

Université de Lille
École Doctorale Biologie Santé



THESE
Pour l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE
Discipline : Immunologie et Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par
Maxime COSTA
Le 13 décembre 2024

**Pertinence des modèles d'organoïdes coliques dérivés de souris et
de patients humains atteints de MICI pour étudier la
différenciation des macrophages intestinaux**

Devant le jury composé de :

Mme Le Docteur **Audrey FERRAND**

Rapporteur

Mme Le Professeur **Rachel LETELLIER**

Rapporteur

Mr Le Professeur **Guillaume BOUGUEN**

Examineur

Mr Le Professeur **Christophe CARNOY**

Examineur - Président du jury

Mr Le Professeur **Benjamin BERTIN**

Directeur de thèse

Mme Le Docteur **Annie STANDAERT**

Co-encadrant de thèse

UFR3S Pharmacie, Institute for Translational Research in Inflammation - INFINITE,
INSERM U1286, Université de Lille

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury, Mme Le Docteur Audrey FERRAND et Mme Le Professeur Rachel LETELLIER pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de recherche, Mr Le Professeur Guillaume BOUGUEN et Mr Le Professeur Christophe CARNOY pour avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail.

Je souhaite également remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, les Professeurs Mathurin FUMERY, Sophie LESTAVEL et Anne MUHR-TAILLEUX pour les échanges et les nombreux conseils lors de ces deux comités. Votre implication m'a permis d'améliorer mon travail et de faire avancer ce projet.

Je tiens également à remercier mes directeurs de thèse, le Professeur Benjamin BERTIN et le Docteur Annie STANDAERT. Merci de m'avoir fait confiance pour le développement des projets que vous m'avez confié. Travailler à vos côtés aura été une expérience très enrichissante scientifiquement et humainement. Merci de m'avoir encouragé et aidé à trouver les solutions aux problèmes rencontrés au cours de cette thèse.

Un grand merci à toute l'équipe INFINITE qui m'a accueilli au cours de ces quatre dernières années. En particulier, un grand merci aux Docteurs Bertrand MERESSE, Pauline ZARNITSKY et Fatima HARRIS ainsi qu'à Marie DELBEKE sans qui ce travail aurait été impossible. Merci également à toutes les personnes du 4^{ème} EST avec qui j'ai passé de très bons moments autour de repas bien mérités.

Je tenais également à remercier les Docteurs Julie DEMARET et Silvia SPECA ainsi que Marie JACOB qui ont participé à la réalisation de ce projet.

Je remercie également le Professeur Benoit FOLIGNÉ pour sa confiance lors de mon recrutement en tant qu'ingénieur dans le service de bactériologie il y a déjà quatre ans. Merci également pour ta participation aux réunions scientifiques du projet de thèse ainsi que pour ton aide technique au cours de ces années.

Je remercie également toutes les personnes du service de bactériologie qui m'ont aidé et soutenu au cours de ces quatre années : Séverine, Béatrice, Isabelle et Fanny. Un grand merci à vous pour tous ces moments passés et votre soutien.

Un grand merci à toutes les personnes du service d'Immunologie-Parasitologie pour votre accueil. En particulier, un grand merci à Muriel pour ton aide et ton soutien au cours de cette thèse. Ça aura été un long parcours semé d'embûches mais on a réussi à s'en sortir !

Merci également à toute l'équipe pédagogique des services de parasitologie et de bactériologie de m'avoir donné l'opportunité de participer aux séances de travaux pratiques à vos côtés. Cela aura été une expérience très enrichissante.

Un grand merci aux Dodos (non, non, il ne sont pas encore éteints), Manon, Tom, Morgane, Julien, Oriane, Guillaume pour tous ces moments passés au cours de ces nombreuses années. Merci également pour ces voyages, ces discussions à refaire le monde, ces centaines de notifications que je reçois et qui font clignoter mon écran quand j'essaie de dormir. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout le soutien que vous m'avez apporté, même à des centaines de kilomètres loin de vous tous.

Je remercie également tous mes amis de Lille, Xing (我们马上就要去唱卡拉 OK 吗?), Mara (Ο καιρός είναι καλός στην Ελλάδα αυτή τη στιγμή, έτσι δεν είναι;), Laura, Quentin, Esther et Aless. Merci pour votre soutien au cours de ces années et ces bons moments passés ensemble en voyage, autour d'un (ou plusieurs) verre(s) ou d'un bon repas.

A ma famille, je suis très chanceux d'être aussi bien entouré... merci pour tout (Je rends ma thèse un 25 octobre, alors bon anniversaire Michel !).

A mes parents, Je voulais vous remercier pour m'avoir toujours soutenu et d'avoir cru en moi. C'est grâce à vous que j'en suis arrivé là. Je vous aime fort.

A ma sœur Dr Charlotte, encore toute mes félicitations et bravo d'avoir réussi à me dépasser malgré mes 21 mois d'avance. Merci de m'avoir soutenu et aidé au cours de ces années.

A ma sœur Anaïs, il y a plein d'autres voies que celle du doctorat, ne fait pas de bêtise... Des bisous de Lille.

Merci enfin à toi Bernie yxda cxdcnb lnb jwwnnb yjbbnnb j vnb lxcnb nc yxda jexra jllnycn mn mnenwra vj onvvn ru h j yudb m'dw jw mnsj. Cj sxrn mn erean, cxw qdvxda nc unb « wxvkandbnnb pjunanb zd'ru c'jaaren nc zdr oxwc aran unb pnwb » lxvvn cd un mrb v'xwc ynavrb mn bdavxwcna lncn nyanden zd'nbc uj cqnbnc nc mn yjbbna mn bdyna vxvnwcb j cnb lxcnb. Sn wn cn mrajrb sjvrb jbbni j zdnu yxwrc s'jr mn uj lqjwln zdn cd yjacjpnv vj ern. Qjcn mn extra ln zdn uj ern wxdb anbnaen nwbnnkun. Sn c'jrvn.

Résumé

Le tractus gastro-intestinal est un exemple remarquable de biologie complexe, avec un dialogue constant entre l'épithélium intestinal, en contact étroit avec le microbiote, et les cellules immunitaires qui protègent l'intestin contre les infections. Les organoïdes ont révolutionné notre approche de la modélisation du compartiment cellulaire intestinal et ont ouvert de nouvelles voies pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'homéostasie intestinale et la pathogénèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. À ce jour, peu de modèles ont été établis pour explorer le rôle du côlon, qui est pourtant le principal site d'inflammation dans la rectocolite hémorragique (RCH). Dans cette étude, nous avons utilisé des milieux conditionnés produits par des organoïdes du côlon (OCM) de souris ou humains (patients contrôles et atteints de RCH) pour étudier la relation entre les macrophages et l'épithélium du côlon. Nous avons étudié les profils transcriptomiques des macrophages dérivés de la moelle osseuse stimulés par l'OCM et avons constaté que ces cellules présentaient une signature anti-inflammatoire unique, distincte de celle des macrophages M2 différenciés par IL-4/IL-13 in vitro. En outre, l'OCM a induit un effet immunorégulateur médié par CD5L, caractérisé par une réduction significative de l'expression d'iNOS induite par le LPS. De plus, l'OCM provenant de côlons humains a inhibé l'expression de cytokines inflammatoires dépendante du LPS dans les macrophages dérivés de monocytes humains. Il est intéressant de noter que le marqueur inflammatoire CD68 a été réduit par l'OCM de patients contrôles mais pas par celui de patients atteints de RCH, ce qui suggère un dysfonctionnement épithélial chez les patients atteints de RCH. Nos résultats font état de nouveaux mécanismes de régulation dans le côlon et soulignent l'importance de développer de nouveaux modèles in vitro pour mieux caractériser la relation entre l'épithélium intestinal et les cellules immunitaires de la muqueuse.

Mots-clés : Intestins – Côlon - Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin – Rectocolite hémorragique – Macrophages - Épithélium intestinal - Organoïdes

Abstract

The gastrointestinal tract is a remarkable example of complex biology, with a constant dialogue between the intestinal epithelium, in close contact with the microbiota, and the immune cells that protect the gut from infection. Organoids have revolutionized our approach to modelling the intestinal cellular compartment and have opened new avenues for unravelling the mechanisms involved in intestinal homeostasis and chronic pathogenesis such as inflammatory bowel disease. To date, few models have been established to explore the role of the colon, which is however the main site of inflammation in ulcerative colitis (UC). Here, we used conditioned media produced by colon organoids (OCM) from mice or human (control and UC patients) to investigate the relationship between macrophages and the colon epithelium. We addressed transcriptomic profiles of OCM-stimulated bone marrow-derived macrophages and found that these cells exhibited a unique anti-inflammatory signature distinct from that of conventional *in vitro* IL-4/IL-13 M2 differentiated macrophages. In addition, OCM induced a clear CD5 antigen-like-mediated immunoregulatory effect characterized by a significant reduction in LPS-induced iNOS expression. In line, OCM from human colons inhibited LPS-dependent inflammatory cytokine expression in human monocytes-derived macrophages. Interestingly, the inflammatory marker CD68 was reduced by OCM from control patients but not from UC patients, suggesting epithelial dysfunction in UC patients. Our results report new regulatory mechanisms in the colon and highlight the importance of developing new *in vitro* models to better characterize the relationship between the intestinal epithelium and immune mucosal cells.

Keywords: Intestines - Colon - Inflammatory bowel disease – Ulcerative colitis - Macrophages - Intestinal epithelium - Organoids

Table des matières

Remerciements	3
Résumé.....	7
Abstract.....	8
Liste des abréviations	11
Liste des Figures.....	15
Introduction.....	17
I - Le système immunitaire	19
A - Généralités	19
B - Les monocytes et macrophages.....	21
II - Le système digestif.....	30
A - Généralités	30
B - La muqueuse intestinale et les cellules épithéliales	30
C - L'immunité intestinale	39
III - Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI).....	50
A - MICI et santé publique.....	50
B - Facteurs de prédisposition des MICI	51
C - Prise en charge thérapeutique actuelle et challenges	57
IV - Modélisation de l'intestin <i>in vitro</i>.....	59
A - Généralités	59
B - Organoïdes intestinaux : production et caractéristiques.....	60
C - Modèles de co-culture d'organoïdes intestinaux.....	62
Contexte et objectifs.....	67
Matériels et méthodes	71
I - Déclaration éthique	73
II - Préparation des organoïdes.....	73
A - Organoïdes murins	73
B - Organoïdes humains.....	74
C - Milieu conditionné produit à partir d'organoïdes (OCM).....	75
III - Cultures cellulaires	75
A - Cellules L929	75
B - Cellules L-WRN	75
C - Cellules RAW 264.7.....	76
D - Cellules BMDM.....	76
E - Cellules hMDM.....	77
IV - Expériences de stimulation par l'OCM	77
V - Quantification de l'élongation des macrophages.....	78
VI - Analyse transcriptionnelle par RT-qPCR.....	78
A - Extraction et rétrotranscription de l'ARN.....	78
B - PCR quantitative en temps réel et analyse	78
VII- Analyses protéiques des Macrophages.....	79
A - Analyse par immunofluorescence	79
B - Western blot	80

C - Cytométrie en flux	81
D - Tests ELISA	82
VIII - Analyse RNA-sequencing (RNA-seq)	82
A - Séquençage de l'ARN	82
B - Analyse des données transcriptomiques.....	83
IX - Expérience de neutralisation du CD5L.....	84
X - Analyses statistiques.....	84
Résultats.....	85
I - L'OCM induit une diminution de l'expression d'iNOS dans les macrophages murins de lignée RAW 264.7	87
II - L'OCM induit un état anti-inflammatoire des macrophages murins dérivés de moelle osseuse (BMDM).....	89
III - Analyse transcriptomique des BMDM de souris stimulés par l'OCM	94
IV - CD5L est impliqué dans l'effet anti-inflammatoire induit par l'OCM dans les BMDM	98
V - Influence de l'OCM humain provenant de patients témoins et de patients atteints de MICI sur des macrophages humains dérivés de monocytes circulants (hMDM)	100
VI - Résultats complémentaires à l'article	102
A - Impact de la différenciation des organoïdes sur l'effet de l'OCM.....	102
B - L'OCM humain réduit la différenciation induite par le LPS des macrophages en M1	105
Discussion et perspectives	107
Conclusion	119
Annexes	121
Annexe 1 - Article de recherche original	123
Annexe 2 - Communications scientifiques.....	179
Bibliographie	181
Résumé.....	218

Liste des abréviations

AGCC : Acide gras à chaîne courte
AGLC : Acides gras à chaîne longue
AhR : récepteur d'aryl hydrocarbure
AIM : Apoptosis Inhibitor of Macrophage
ALD : Affection Longue Durée
APC : Adénomatose Polyposé Coli
Arg1 : Arginase 1
BCR : B Cells Receptor
BMDC : Cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse
BMDM : Macrophages dérivés de moelle osseuse
BMP : protéine morphogénétique osseuse
CCL : Chemokine Ligand
CBC : Columnar Basal Cell
CD : Cluster de Différenciation
CCK : Cholécystokinine
CCR : C-C Chemokine Receptor
CEI : Cellules épithéliales intestinales
CK1 α : Caséine Kinase 1 α
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes
CSF : Colony Stimulating factor
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
CSI : Cellule Souche Intestinale
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CXCL : CXC motif Ligand
DAMP : Damage Associated Molecular Pattern
DC : Cellules Dendritiques
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSC : Distal Stem Cell
DSS : Dextran Sulfate de Sodium

DTT : Dithiothreitol

EAF : Epithélium associé aux follicules lymphoïdes

EEC : Cellules entéroendocrines

ECM : Matrice extracellulaire

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EFS : Etablissement français du sang

EMP : Progéniteur érythro-myéloïde

FACS : Fluorescence-activated Cell Sorting

FCGBP : Fcγ binding protein

Fzd : Frizzled

GAP : Goblet cell-associated antigen passages

GFP : Green Fluorescent Protein

GIP : Peptide insulino-trope dépendant du glucose

GLP : Glucagon-Like Peptide

GO : ontologie des gènes

GPR : Récepteur couplé aux protéines G

GSEA : analyse d'enrichissement des ensembles de gènes ou Gene Set Enrichment Analysis

GSK3β : Glycogène Synthase Kinase 3β

GWAS : Genome Wide Association Study

HGF : Facteur de croissance des hépatocytes

ILC : Cellules lymphoïdes innées

IL : Interleukine

IL1-Ra : IL-1 Receptor Antagonist

IEL : Lymphocyte intraépithélial

iNOS : inducible nitric oxide synthase

iNKT : Invariant Natural Killer

IPSc : Cellules souches pluripotentes induites

IRF : Interferon Responsive Factors

ISEMF : Myofibroblastes sous-épithéliaux intestinaux

JAK : Janus Kinase

LB : Lymphocyte B

LDCV : Grandes vésicules à noyau dense

LP : Lamina Propria

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocyte T
LTreg : Lymphocytes T Régulateurs
LTi : Lymphoid Tissue inducer
MAIT : Mucosal-associated invariant T cells
MC : Maladie de Crohn
M-CSF : Macrophage Colony Stimulating Factor
MDP : Muramyl dipeptide
MerTK : Mer receptor Tyrosine Kinase
MHC : Complexe Majeur d'Histocompatibilité (aussi CMH)
M-ILF : ILF muqueux
MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MIP : Protéine inflammatoire macrophagique
MMP : Metalloproteinase Matricielle
Mrc1 : Mannose Receptor c-type 1
MTX : Méthotrexate
MUC-2 : Mucine-2
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphatase
NK : Natural Killer
NKT : Natural Killer T
NO : Nitric Oxyde
OCM : Milieu conditionné d'organoïdes
PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PGE2 : Prostaglandine E2
PP : Plaques de Peyer
PP2a : Protéine Phosphatase 2a
PRR : Pathogen Recognition Receptor
PSC : Pluripotent Stem Cell
P/S : Pénicilline/Streptomycine
PYY : Peptide YY
qPCR : quantitative PCR

RCH : Rectocolite Hémorragique
RIPA buffer : Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROS : Reactive Oxygen Species
RT : Reverse Transcription
SASP : Sulfasalazine
SD : Standard Deviation
SED : Dôme sous-épithélial
SL : synaptic-like microvesicles
SLMV : Petites microvésicules de type synaptique
SM-ILF : ILF-sous-muqueux
SST : Somatostatine
SVF : Sérum de veau fœtal
TA : Température Ambiante
TAM : Tumor Associated Macrophage
TED : Dendrite transépithélial
TER : résistance transépithéliale
Th : T helper cells
TCR : T Cells Receptor
TFF3 : Trefoil factor 3
TGF- β : Transforming Growth Factor β
TIP DC : Tumor Infiltrating Dendritic Cells
TIM : Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
TIM4 : T-cell Immunoglobulin Mucin receptor 4
TNF : Tumor Necrosis Factor
TP : Thiopurines
UMI : identificateurs moléculaires uniques
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VCAM1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1

Liste des Figures

- **Figure 1** : Cellules du système immunitaire
- **Figure 2** : Monocytes circulants chez la souris
- **Figure 3** : Sous-types de monocytes chez l'Homme
- **Figure 4** : Rôle des différents sous-types de macrophages dans la physiologie des tissus
- **Figure 5** : Polarisation des macrophages
- **Figure 6** : Composition cellulaire de la muqueuse intestinale
- **Figure 7** : Cellules souches intestinales et signaux de régulation
- **Figure 8** : Composition cellulaire des Plaques de Peyer
- **Figure 9** : Fonction des cellules lymphoïdes innées
- **Figure 10** : Fonctions des macrophages intestinaux
- **Figure 11** : Gènes de susceptibilité des MICI
- **Figure 12** : Facteurs de susceptibilité des MICI
- **Figure 13** : Composition cellulaire des organoïdes intestinaux
- **Figure 14** : Représentation schématique du protocole expérimental
- **Figure 15** : Effet de la stimulation de cellules de la lignée macrophagique RAW 264.7 par du milieu conditionné d'organoïdes de souris (OCM)
- **Figure 16** : Effet de la stimulation par le milieu conditionné d'organoïdes de souris (OCM) sur les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM).
- **Figure 17** : Effet de la stimulation par l'OCM sur les BMDM en condition inflammatoire.
- **Figure 18** : L'OCM de souris contrôle la réponse des macrophages de type 1 dépendant du LPS dans les BMDM.
- **Figure 19** : Effet post-traitement de l'OCM sur les BMDM.
- **Figure 20** : Profil d'expression génique de macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) stimulés par l'OCM ou l'IL-4/IL-13.
- **Figure 21** : Analyse par séquençage de l'ARN des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) stimulés par l'OCM ou l'IL-4/IL-13.
- **Figure 22** : Les BMDM traitées par l'OCM présentent un profil cicatrisant.
- **Figure 23** : Rôle de CD5L dans l'effet régulateur de l'OCM de souris.

- **Figure 24** : Effet de l'OCM humain provenant de patients témoins (OCM-CP) et de patients atteints de rectocolite hémorragique (OCM-UC) sur les macrophages humains dérivés de monocytes (hMDM).
- **Figure 25** : Différenciation d'organoïdes murins coliques et effet de l'OCM sur des BMDM.
- **Figure 26** : Représentation schématique du protocole de production d'épithélium dérivés d'organoïdes.
- **Figure 27** : Effet de l'OCM provenant d'organoïdes 2D sur des BMDM.
- **Figure 28** : Effet de l'OCM humain sur la polarisation des hMDM en M1.

Introduction

I - Le système immunitaire

A - Généralités

Le système immunitaire est un ensemble élaboré de cellules interagissant entre elles afin de maintenir l'intégrité de l'organisme. Il se divise en deux catégories : l'immunité innée, première ligne de défense dont la réponse est rapide (agissant en quelques minutes à quelques heures) et dont l'action est non-spécifique d'un pathogène donné mais agissant contre un large panel de motifs moléculaires microbiens conservés, et l'immunité adaptative dont la réponse est plus lente (de quelques jours à quelques semaines) mais spécifique d'un pathogène (Chaplin, 2010) (Figure 1). Lors d'une infection par un nouveau pathogène, il est d'abord reconnu par des récepteurs de l'immunité innée (Pathogen Recognition Receptors ou PRR) qui vont déclencher une première réponse défensive et induire la mise en place d'une réponse adaptative via la sécrétion de médiateurs et la présentation d'antigènes aux cellules immunitaires adaptatives (Chaplin, 2010).

Le système immunitaire inné est composé de barrières physiques et anatomiques (surfaces épithéliales et muqueuses), de cellules effectrices phagocytaires et/ou produisant des cytokines et des médiateurs inflammatoires (Figure 1 : polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages, Natural Killer cells (NK), cellules dendritiques, etc.), de peptides antimicrobiens (défensines, cathélicidines, etc.), de médiateurs solubles (cytokines, chimiokines, etc.) et de récepteurs cellulaires (Toll-like receptor (TLR), PRR par exemple) (Beutler, 2009; Chaplin, 2010; Kumagai and Akira, 2010; Takeuchi and Akira, 2010).

Le système immunitaire adaptatif est constitué de cellules dérivant de progéniteurs lymphoïdes (lymphocytes ou cellules B (LB) et T (LT)) participant à la défense de l'hôte via une immunité spécifique d'un pathogène (Figure 1). Les lymphocytes T exprimant le récepteur TCR sont responsables d'une réponse cellulaire tandis que les LB exprimant le BCR sont responsables d'une réponse humorale (production d'anticorps) (Merlo and Mandik-Nayak, 2013; Sun et al., 2023).

Les lymphocytes T sont divisés en plusieurs sous-groupes : les LT $\alpha\beta$ CD4⁺ auxiliaires (permettant la production de cytokines et de chimiokines coordonnant et régulant la réponse immunitaire), les LT $\alpha\beta$ CD8⁺ cytotoxiques (spécialisés dans la destruction de cellules infectées ou cancéreuses), les lymphocytes T $\gamma\delta$ et enfin les cellules Natural Killer T (NKT). En réponse à la présentation d'un antigène par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les

cellules dendritiques ou les macrophages, les lymphocytes vont subir une activation conduisant à une expansion clonale. L'engagement de molécules de co-stimulation et la production de cytokines par les CPA sont également nécessaires à ce processus. D'autre part, certains de ces lymphocytes activés vont se développer en cellules mémoires permettant une action rapide en cas de nouvelle rencontre avec le même pathogène fournissant ainsi à l'hôte une protection à long terme. Il existe également un sous-type de LT $CD4^+$ appelé LT régulateur (LTreg) qui va être responsable du maintien de la tolérance immunitaire périphérique. De manière intéressante, les LT $CD4^+$ vont pouvoir se différencier en LT auxiliaires qui vont jouer un rôle clé dans la pathogénèse de certaines pathologies inflammatoires intestinales comme les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) (Lu et al., 2022).

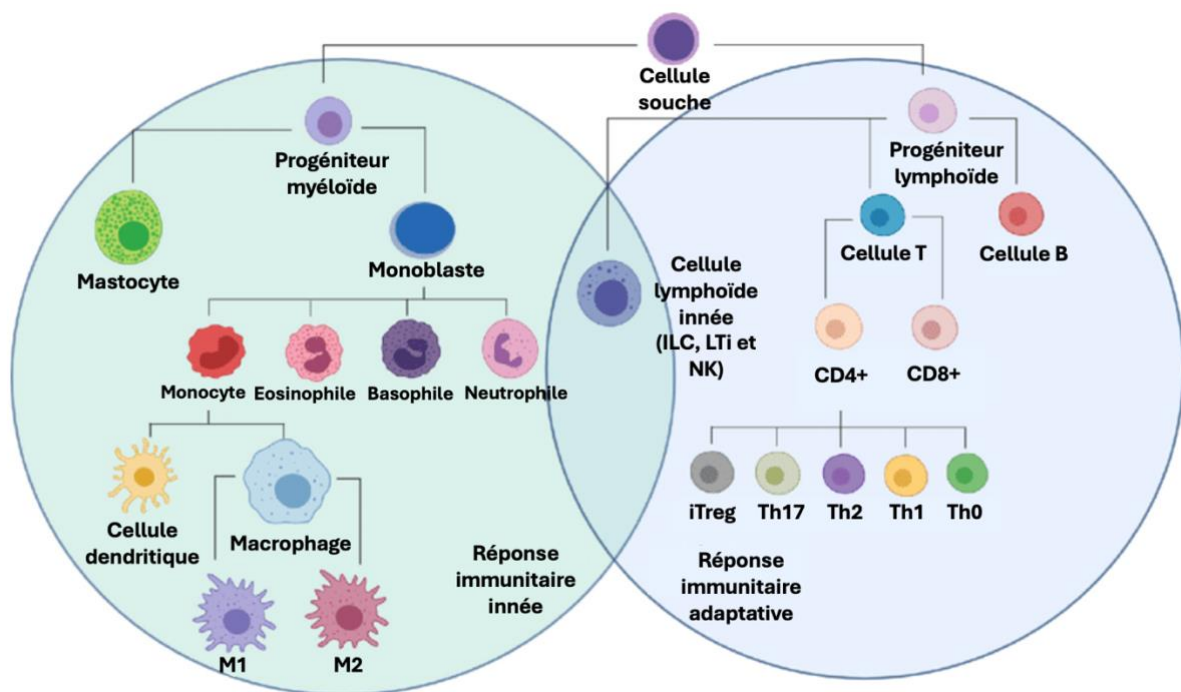


Figure 1 : Cellules du système immunitaire

La réponse immunitaire se divise en deux parties, une réponse immunitaire dite innée et une dite adaptative. Les cellules souches hématopoïétiques donnent naissance à des précurseurs myéloïdes et lymphoïdes qui vont à leur tour donner naissance à de nombreux types de cellules immunitaires appartenant à l'une ou l'autre des deux types de réponse immunitaire. Certaines cellules, dites cellules lymphoïdes innées, sont à l'interface entre ces deux réponses. Adapté de (Torang et al., 2019)

B - Les monocytes et macrophages

1. Hématopoïèse et classification des monocytes

Dès les premiers stades post-nataux, des cellules souches hématopoïétiques (CSH) pluripotentes présentes dans la moelle osseuse vont pouvoir se différencier en cellules progénitrices myéloïdes qui vont sous l'action de facteurs de croissance (comme le Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF)) se différencier en monoblastes puis en pré-monocytes et enfin en monocytes (Auffray et al., 2009). Ces monocytes vont alors rejoindre le sang périphérique et pouvoir être recrutés au niveau des différents organes pour reconstituer les stocks de macrophages tissulaires dérivés de monocytes ou bien en condition inflammatoire initier l'inflammation. Les monocytes sont divisés en plusieurs groupes selon les marqueurs qu'ils expriment et le nombre de sous-groupes varie selon les espèces.

Chez la souris, les monocytes inflammatoires ou classiques (ayant une durée de vie courte) sont caractérisés par l'expression du marqueur inflammatoire Ly6c associé avec le profil $CCR2^{high}CX3CR1^{low}$, tandis que les monocytes non-inflammatoires ou non-classiques présentent un profil $Ly6c^{-}CCR2^{low}CX3CR1^{high}$ et vont être recrutés dans les tissus grâce à l'interaction entre CX3CR1 et CCL3 pour se différencier en macrophages résidents (Yang et al., 2014) (Figure 2). Les monocytes inflammatoires présentent une forte capacité antibactérienne via la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), de cytokines inflammatoires (telles que le Tumor Necrosis Factor (TNF) α et l'IL-6) et leur capacité de phagocytose (Yang et al., 2014). Les monocytes $Ly6c^{-}$ quant à eux, produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 en réponse à une stimulation bactérienne et participent à la réparation tissulaire (Auffray et al., 2009). De manière intéressante, les monocytes $Ly6c^{+}$ ont la capacité de se différencier en $Ly6c^{-}$ dans le sang ou dans la moelle osseuse (Italiani and Boraschi, 2014). D'autre part, la capacité de migration et d'infiltration des monocytes inflammatoires est également supérieure par rapport aux non-inflammatoires grâce à leur expression du CCR2 (Mack et al., 2001; Serbina and Pamer, 2006).

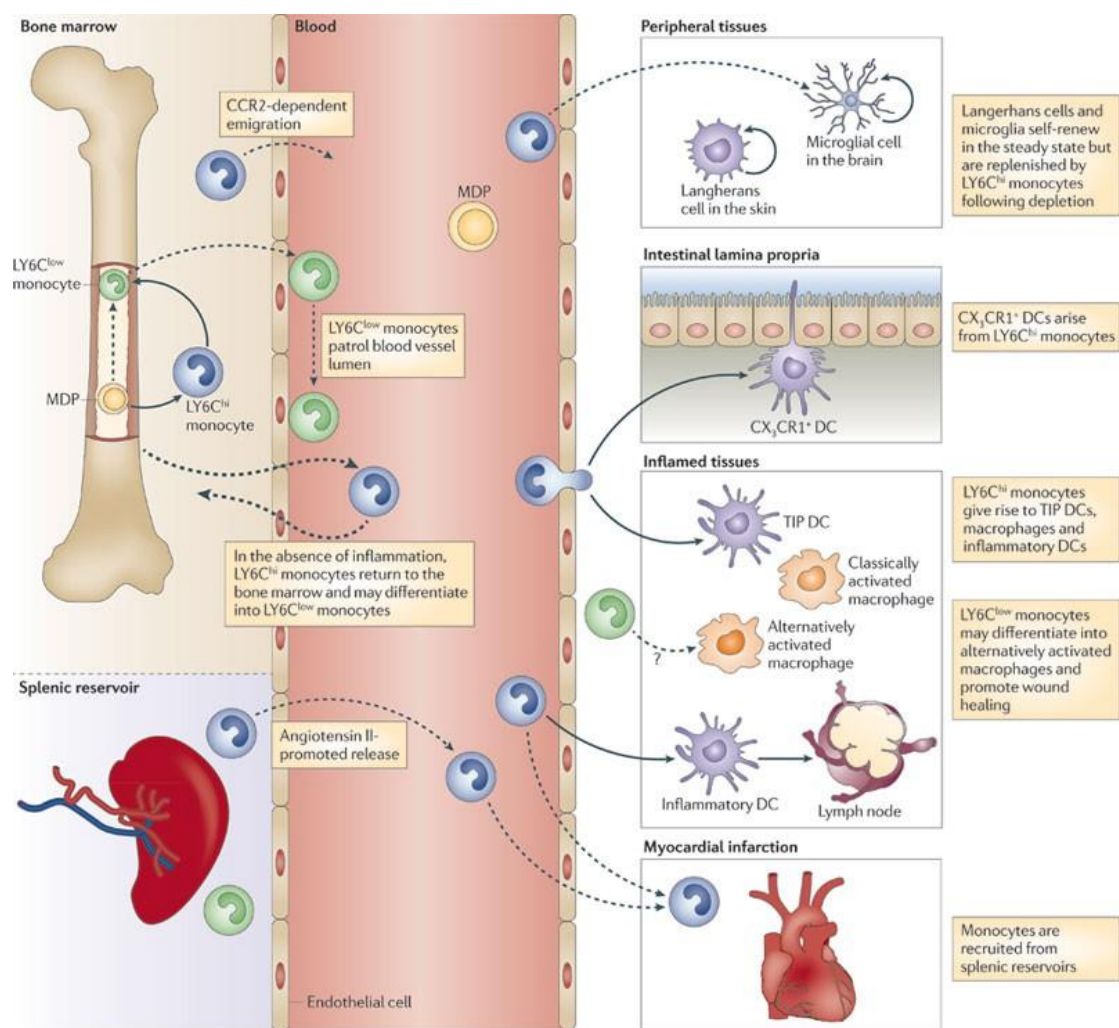


Figure 2 : Monocytes circulants chez la souris

Les précurseurs de la moelle osseuse (MDP) donnent naissance à des monocytes LY6C^{hi} pouvant être recrutés sur le site de l'inflammation et se différencier en cellules dendritiques productrices de TNF et d'iNOS (TIP DCs), en macrophages inflammatoires ou en DCs inflammatoires. Les monocytes LY6C^{low} quant à eux patrouillent dans la circulation sanguine et peuvent être recrutés sur le site de l'inflammation afin de se différencier en monocytes activés de manière alternative participant ainsi à la résolution de l'inflammation et à la cicatrisation tissulaire. (Shi and Pamer, 2011)

Chez l'Homme, trois populations monocytaires ont été identifiées et se distinguent par l'expression des marqueurs CD14 et CD16 : les monocytes dit classiques CD14⁺⁺CD16⁻, les intermédiaires CD14⁺⁺CD16⁺ et les non-classiques CD14⁺CD16⁺⁺ (Ziegler-Heitbrock et al., 2010) (Figure 3). En condition d'homéostasie, la population de monocytes classique décrite comme une population « phagocytaire » est majoritaire et représente environ 85% des monocytes circulants. Cette population est caractérisée par une importante activité phagocytaire, un profil CCR2⁺CX3CR1⁻ et une forte production d'IL-10 en réponse à une stimulation bactérienne (Geissmann et al., 2003; Wong et al., 2012). Des études génétiques ont également montré que ces derniers expriment des gènes associés à l'angiogenèse, à la cicatrisation

muqueuse et à la coagulation (Wong et al., 2011). Les monocytes non-classiques quant à eux représentent environ 10% des monocytes circulants et sont décrits comme des « patrouilleurs » faiblement phagocytaires et produisant des cytokines inflammatoires en réponse à une stimulation bactérienne (Wong et al., 2012; Yang et al., 2014). Ces derniers expriment fortement le CX3CR1 et n'expriment pas le CCR2. Enfin, la population intermédiaire représentant environ 5% des monocytes circulants est dite « inflammatoire ». Les monocytes intermédiaires produisent une importante quantité de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) en réponse au lipopolysaccharide (LPS, un composé de la membrane externe des bactéries à Gram négatif) (Cros et al., 2010; Yang et al., 2014). Durant l'inflammation, les monocytes classiques et intermédiaires migrent dans les tissus via un mécanisme dépendant de la liaison entre CCR2/CCL2 ou CCR5/CCL5 et dépendant de VCAM1/VLA1.

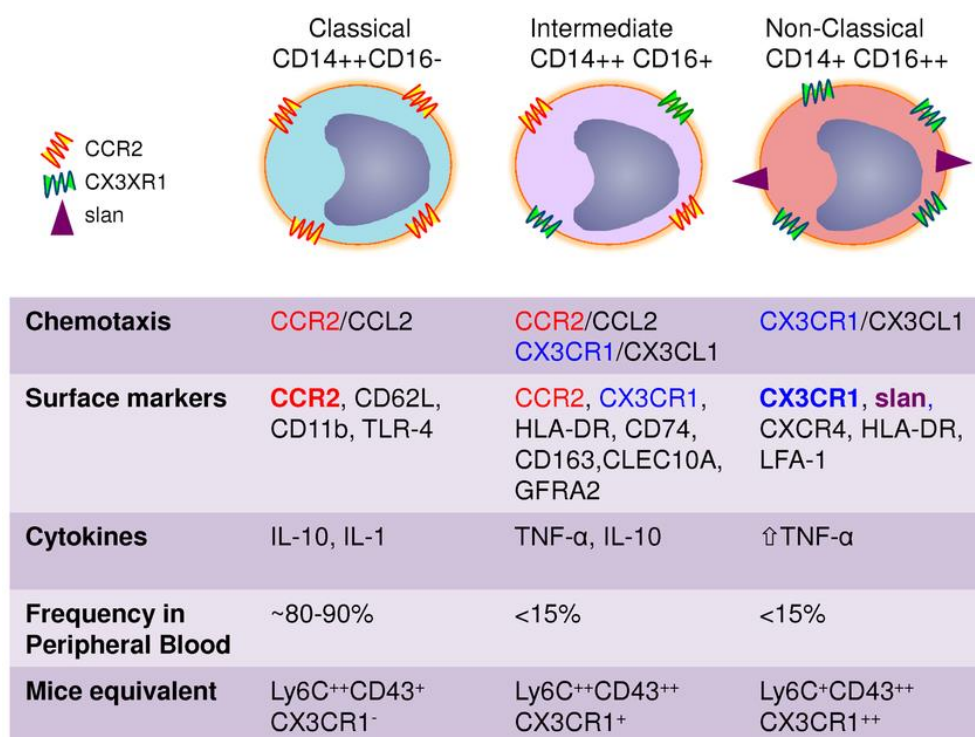


Figure 3 : Sous-types de monocytes chez l'Homme

Les monocytes humains sont classés en trois sous-groupes selon leur expression des marqueurs de surface CD14 et CD16 : les monocytes classiques CD14⁺⁺CD16⁻ (également appelés CD14⁺ ou CD14⁺CD16⁻), les monocytes intermédiaires CD14⁺⁺CD16⁺ (ou CD14⁺CD16⁺ ou CD14⁺CD16^{int/low}) et les monocytes non-classiques CD14⁺CD16⁺⁺ (ou CD14^{Low}CD16⁺ ou CD14^{dim}CD16⁺). (Wacliche et al., 2018)

2. Monocytes et ontogénie des macrophages

Les macrophages tissulaires résidents chez l'adulte proviennent de cellules hématopoïétiques dérivées du mésoderme produites lors de l'embryogenèse. Chez la souris, la période se situant entre les jours 8,5 et 9 du développement embryonnaire est cruciale dans le développement des macrophages résidents dans les tissus. En effet, le jour 8,5 marque le début de la différenciation des progéniteurs érythro-myéloïdes du sac vitellin (EMPs) en pré-macrophages (pMacs) et à partir du jour 9 les pMacs ainsi produits vont commencer à coloniser les tissus embryonnaires (Gomez Perdiguero et al., 2015; Mass et al., 2016). De plus, des monocytes produits à partir des EMPs vont également pouvoir se différencier et participer au pool de macrophages tissulaires (Gomez Perdiguero et al., 2015; Hoeffel et al., 2015). Ces macrophages tissulaires résidents vont pour la plupart maintenir une niche au niveau de l'organe et proliférer localement persistant ainsi chez l'adulte (Hashimoto et al., 2013; Yona et al., 2013) (Figure 4).

Comme décrit précédemment, dès la période post-natale des monocytes du sang circulant vont pouvoir être recrutés au niveau de certains organes pour se différencier en macrophages tissulaires. Néanmoins, tous les organes ne sont pas sujet à ce recrutement de la même manière (Ginhoux and Guilliams, 2016). En effet, il existe des organes dit « fermés » comme le cerveau, l'épiderme, les poumons ou bien le foie, qui ne présentent pas de recrutement de monocytes de manière permanente. L'intestin et le derme sont quant à eux des tissus dit « ouverts », c'est-à-dire possédant un recrutement rapide et permanent de monocytes permettant le renouvellement des macrophages dans l'organe. Tout comme ces derniers, le cœur et le pancréas sont des tissus « ouverts » mais qui présentent cette fois-ci un recrutement lent (Guilliams et al., 2014).

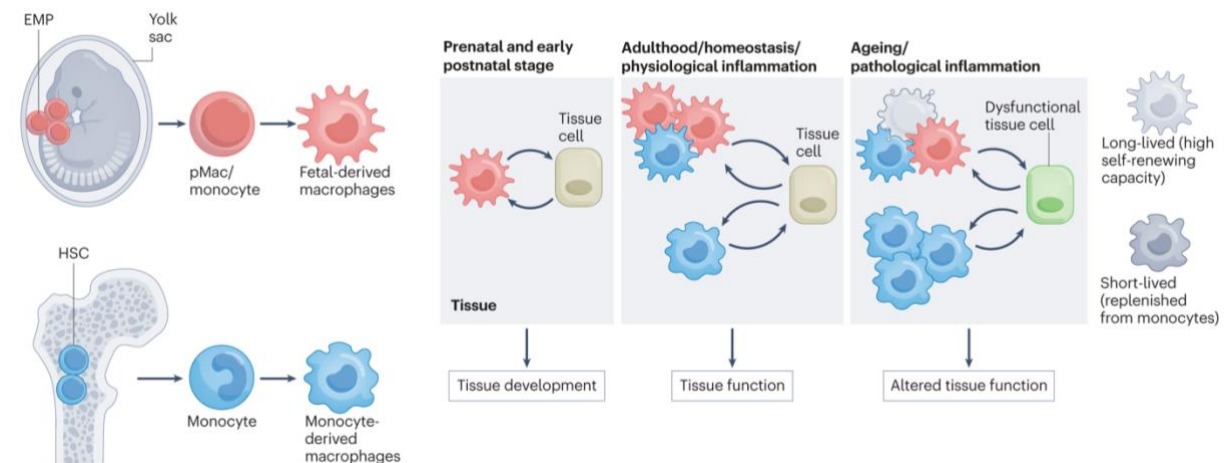


Figure 4 : Rôle des différents sous-types de macrophages dans la physiologie des tissus

Lors de la période prénatale, les progéniteurs érythro-myéloïdes du sac vitellin (EMP) donnent naissance à des pré-macrophages (pMac) et à des monocytes qui peuvent se différencier en macrophages à longue durée de vie résidant dans les tissus. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) quant à elles donnent naissance à des macrophages au début de la période postnatale et à l'âge adulte. En condition d'homéostasie, différentes sous-populations de macrophages dialoguent avec les cellules tissulaires pour soutenir la fonction des tissus. En cas de vieillissement ou d'inflammation pathologique, cet équilibre est perturbé, ce qui déclenche, par exemple, l'apoptose des macrophages à longue durée de vie ou le recrutement accru de macrophages à courte durée de vie dérivés des CSH, entraînant ainsi un dysfonctionnement du tissu. (Mass et al., 2023)

3. Polarisation des macrophages

Les macrophages possèdent une grande plasticité leur permettant de répondre aux différentes stimulations de leur environnement. Ainsi leurs fonctions effectrices sont fortement liées à leur état de différenciation. Les macrophages vont alors être classés selon leur polarisation c'est-à-dire les signaux ayant induit leur différenciation, l'expression de marqueurs de surface et la production de médiateurs solubles. Les macrophages sont classés en deux catégories : les macrophages « classiquement » activés sont appelés M1 et les macrophages activés « de manière alternative » sont appelés M2 (Martinez and Gordon, 2014).

i. Les Macrophages M1

La polarisation des macrophages vers un phénotype M1 est induite par exposition à des ligands des TLR (tels que l'antigène bactérien LPS), associés ou non à des cytokines de type Th1 comme l'IFN- γ ou le TNF- α , ou bien encore par le GM-CSF (Sica and Mantovani, 2012; Trus et al., 2020) (Strizova et al., 2023) (Figure 5). Les M1 interviennent lors des premières étapes de l'inflammation et sont caractérisés par une forte production de cytokines pro-inflammatoires (telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- α), d'espèces réactives de l'oxygène et du

nitrogène (inducible nitric oxide synthase (iNOS), Nitric Oxyde (NO), Reactive Oxygen Species (ROS)), un effet inducteur de la réponse Th1 par la production d'IL-12 et une forte réponse bactéricide et antitumorale (Murray and Wynn, 2011). Les macrophages M1 surexpriment à leur surface des récepteurs membranaires qui les caractérisent. Parmi ces derniers, on retrouve notamment des récepteurs impliqués dans la phagocytose tels que des récepteurs des immunoglobulines appelés Récepteurs Fc-gamma (CD64 (FcγRI), CD32 (FcγRII) et CD16 (FcγRIII)) et des récepteurs des molécules du complément (CD35 (CR1), CD11b/CD18 (CR3) et CD11c/CD18 (CR4)). Ils expriment également fortement le Complexe Majeur d'Histocompatibilité-2 (CMH II) induisant une présentation antigénique accrue et des molécules co-stimulatrices telles que le CD80 et CD86 permettant d'activer la réponse immunitaire adaptative (Mantovani et al., 2005). En outre, ces macrophages expriment fortement les TLRs leur permettant une meilleure reconnaissance des motifs associés aux pathogènes (PAMPs).

La stimulation et l'activation des macrophages mettent en jeu un réseau de molécules de signalisation, de facteurs de transcription (tels que NF-κB, STAT, Interferon Regulatory Factors (IRF)), de mécanismes épigénétiques et de régulateurs post-transcriptionnels (Sica and Mantovani, 2012; Strizova et al., 2023). La stimulation des macrophages par l'IFN-γ et le LPS induit une signalisation impliquant les facteurs de transcription STAT-1, IRF3, IRF5 et NF-κB, qui va conduire à la polarisation des macrophages vers un phénotype M1 et à l'augmentation de la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23 et TNF-α). Les cytokines IL-12, IL-23 et TNF-α ainsi produites vont permettre la mise en place de réponses de type Th1 et Th17 (Krausgruber et al., 2011). Les voies NF-κB et STAT-1 vont également permettre la production de chimiokines telles que le CXC motif Ligand (CXCL) 9, 10 et 11, et de différents Chemokines Ligand (CCLs) impliqués dans le recrutement de cellules immunitaires (par exemple les NK et les LT CD8⁺). De plus, cette activation des M1 induit la production de dérivés de l'oxygène et du nitrogène via la surexpression de l'iNOS et de la Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphatase (NADPH) oxydase (Vignais, 2002). Enfin, cette activation des macrophages conduit à la production de la protéine SOCS3 inhibant la protéine STAT3 (impliquée dans la polarisation M2).

ii. Les Macrophages M2

A l'inverse des macrophages inflammatoires M1, les macrophages M2 exercent une fonction régulatrice associée à la promotion de la réparation et du remodelage tissulaire (Wynn and Vannella, 2016). La population des M2 est hétérogène et se compose de quatre sous-types caractérisés par différents marqueurs phénotypiques et fonctionnels (stimuli polarisants, production de cytokines, expression de récepteurs) : M2a, M2b, M2c et M2d (Mantovani et al., 2004; Martinez and Gordon, 2014) (Figure 5).

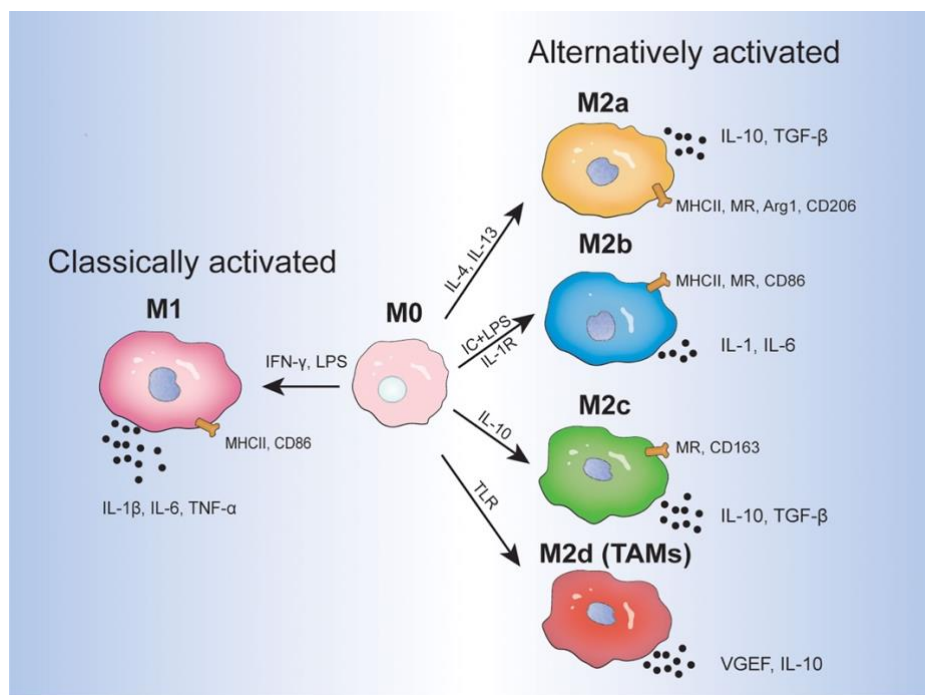


Figure 5 : Polarisation des macrophages

Les macrophages sous l'influence de différents signaux peuvent se différencier en macrophages activés classiquement (M1) ou bien en macrophages activés de manière alternative (M2). La seconde catégorie possède quatre sous-types : M2a, M2b, M2c et M2d. Les macrophages ainsi polarisés possèdent une expression de marqueurs de surface et une production de molécules solubles singulières. (Gao et al., 2022)

Macrophages M2a

La polarisation M2a aussi appelée « polarisation alternative classique » est induite par une exposition des macrophages à l'IL-4 et l'IL-13 produites par différentes cellules immunitaires telles que les polynucléaires éosinophiles, basophiles et les cellules Th2. Ces cytokines vont se fixer à leur récepteur commun composé des sous-unités IL-4R α et IL-13R α 1, et vont induire

une réponse mettant en jeu les facteurs de transcription STAT6 et IRF4 et le récepteur nucléaire PPAR- γ (Sica and Mantovani, 2012; Strizova et al., 2023). Phénotypiquement, les macrophages M2a expriment fortement le CD206 (Macrophage Mannose Receptor 1), la Dectine-1, le récepteur scavenger CD36 et l'Arginase 1 (Arg1) (Shapouri-Moghaddam et al., 2018; Strizova et al., 2023). Ils produisent également les cytokines IL-1Ra (IL-1 Receptor Antagonist), et le Transforming Growth Factor β (TGF- β), ainsi que les chimiokines CCL17 et CCL22 impliquées dans le recrutement de cellules immunitaires liées au développement de l'inflammation allergique de type 2 (Mantovani et al., 2004). En outre, les M2a sont également impliqués dans le remodelage tissulaire et la cicatrisation des plaies.

Macrophages M2b

Induits en réponse aux complexes immuns, aux agonistes des TLR (notamment le LPS) et à l'IL1- β , les M2b jouent un rôle dans l'immunorégulation et dans l'induction d'une réponse Th2 (Strizova et al., 2023). Ces macrophages sont caractérisés par une forte production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, de CCL-1 accompagnée d'une production de cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF- α) (Mosser and Edwards, 2008). Les M2b expriment également les récepteurs de co-stimulation CD80 et CD86 permettant la présentation antigénique et l'activation des cellules T (Edwards et al., 2006).

Macrophages M2c

Les macrophages M2c jouent un rôle crucial dans la réparation tissulaire, la cicatrisation des plaies et possèdent un fort potentiel anti-inflammatoire (Strizova et al., 2023). Ces cellules se différencient par l'action de l'IL-10 (via son récepteur IL-10R et une signalisation impliquant le facteur de transcription STAT-3) et les glucocorticoïdes (Martinez and Gordon, 2014). Les M2c produisent de l'IL-10 en grande quantité et participent aux processus de fibrose via la production de la cytokine pro-fibrotique TGF- β (Sica and Mantovani, 2012). En outre, ces cellules sont impliquées dans le processus de phagocytose des cellules apoptotiques grâce à l'expression du récepteur MerTK (Mer receptor Tyrosine Kinase) et du récepteur scavenger CD163 (Wang et al., 2019).

Macrophages M2d

Un dernier sous-type de macrophages, les M2d, a été mis en évidence en 2007 par Duluc et al. Ces macrophages possèdent un phénotype similaire aux macrophages associés aux tumeurs (TAMs) et jouent un rôle dans l'angiogenèse et la croissance tumorale (Duluc et al., 2007; Strizova et al., 2023). Ces macrophages sont induits par la signalisation dépendante du récepteur de l'adénosine et l'IL-6. Les macrophages M2d présentent une expression accrue de facteurs angiogéniques tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et le TGF- β ainsi que la Métalloprotéinase Matricielle (MMP) 9 impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire et dans la prolifération métastatique. Ils possèdent également un phénotype immunosuppresseur caractérisé par une production accrue d'IL-10 et de TGF- β .

Bien que cette classification soit utile pour expliquer la polarisation des macrophages, il est important de noter que les données actuelles suggèrent plutôt que les macrophages représenteraient un continuum pouvant présenter des phénotypes qui se superposent (Strizova et al., 2023). En effet, cette classification repose sur des expériences de polarisation des macrophages *in vitro* et dans l'organisme les macrophages sont exposés à de nombreux signaux et microenvironnements qui façonnent leur phénotype. De ce fait, il est possible de retrouver des macrophages qui possèdent en même temps et à un moment donné, des caractéristiques de différents sous-types présentés dans cette classification.

Grâce aux différents mécanismes cités précédemment, le système immunitaire va jouer un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie de nombreux tissus. Néanmoins, de nombreux autres types cellulaires présents dans les organes vont également participer activement à la protection de l'organisme en prévenant les dommages que peut causer le milieu extérieur mais également en limitant le contact entre ce dernier et le système immunitaire ce qui pourrait causer une inflammation permanente délétère pour l'organisme. Parmi les organes les plus exposés au milieu extérieur, l'intestin est constamment exposé aux antigènes provenant de la lumière intestinale (bol alimentaire, bactéries de la flore commensale, pathogènes, ...). Ainsi le tube digestif possède de nombreux mécanismes permettant la protection de l'organisme.

II - Le système digestif

A - Généralités

Le rôle du système digestif est de digérer et d'absorber les nutriments présents dans les aliments nécessaires au fonctionnement de l'organisme et d'excréter les déchets. Le transport des aliments le long du tractus digestif se fait grâce au péristaltisme des muscles lisses tandis que la segmentation de ces derniers assure un temps de contact et une exposition à la muqueuse épithéliale suffisante pour permettre l'absorption des nutriments. Le tractus gastro intestinal se divise en deux parties : le tractus supérieur composé de la bouche, de l'œsophage, de l'estomac et de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon) tandis que le tractus inférieur est composé du côlon (ascendant ou proximal, transverse, descendant ou distal), du rectum et de l'anus.

L'œsophage permet le passage des aliments jusqu'à l'estomac dans lequel ils vont être mélangés avec de l'acide gastrique et des sucs digestifs puis broyés afin de permettre leur digestion (Greenwood-Van Meerveld et al., 2017). Les aliments ainsi digérés appelés chyme vont alors être envoyés vers le duodénum. Une fois dans l'intestin grêle, le processus de digestion décompose les protéines, les graisses et les glucides en éléments plus petits pour permettre l'absorption des nutriments. D'autres organes dit accessoires participent également au processus de digestion tels que les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire et le pancréas. Enfin, le contenu de la lumière intestinale, appelé fèces, va subir une dernière phase d'absorption d'eau et des électrolytes dans le côlon avant d'être expulsé par le rectum et le canal anal.

Pour assurer les différentes étapes du processus de digestion, le tractus gastro-intestinal est composé de différentes couches cellulaires : la muqueuse composée de cellules épithéliales et sécrétrices ; la sous-muqueuse contenant des nerfs, des tissus conjonctifs et lymphatiques ; la musculature externe composée de muscles lisses circulaires et longitudinaux ; et l'adventice (Greenwood-Van Meerveld et al., 2017).

B - La muqueuse intestinale et les cellules épithéliales

La muqueuse intestinale est la couche la plus interne du tractus gastro-intestinal qui permet la digestion des aliments et forme une barrière physique et biochimique entre la lumière du tube digestif et la sous-muqueuse protégeant l'organisme des pathogènes et des molécules nocives (Peterson and Artis, 2014). La composition cellulaire ainsi que la structure de l'épithélium

intestinal varient grandement entre l'intestin grêle et le côlon (Hickey et al., 2023) (Figure 6). Dans l'intestin grêle, on retrouve des repliements de l'épithélium appelés villosités dont la taille est réduite au fur et à mesure que l'on s'approche du côlon, et qui permettent d'augmenter la surface de contact avec la lumière intestinale afin de favoriser l'absorption des nutriments. À l'inverse dans le côlon, ces villosités sont absentes et la surface de l'épithélium est lisse. La muqueuse intestinale se compose également d'invaginations appelées cryptes dans lesquelles résident, à leurs bases, les cellules souches intestinales (CSI) (Barker, 2014). Ces dernières vont donner naissance à des cellules prolifératives transitoires qui vont se différencier à mesure qu'elles progressent le long des cryptes avant d'entrer en apoptose et d'être éjectées dans la lumière intestinale une fois arrivées au sommet (Hall et al., 1994). L'épithélium intestinal subit ainsi un renouvellement constant et, dans des conditions homéostatiques, on estime qu'un renouvellement complet d'une crypte intestinale prend de 4 et 5 jours (Bjerknes and Cheng, 2005).

La muqueuse intestinale est principalement composée des cellules absorbantes appelées entérocytes dans l'intestin grêle et colonocytes dans le côlon (Cheng and Leblond, 1974) mais aussi de diverses cellules sécrétoires comme les cellules caliciformes productrices de mucus (Gustafsson and Johansson, 2022), les cellules entéroendocrines sécrétant différentes hormones (Gribble and Reimann, 2019) et les cellules de Paneth produisant des facteurs antimicrobiens participant à la protection de l'épithélium (Lueschow and McElroy, 2020). On retrouve également dans l'épithélium les cellules tuft qui participent à la défense contre les helminthes (Schneider et al., 2019) et les cellules M qui permettent la capture et la présentation d'antigènes de la lumière intestinale aux cellules immunitaires (Dillon and Lo, 2019). Comme dit précédemment, la composition cellulaire de l'épithélium intestinal varie également entre l'intestin grêle et le côlon (Hickey et al., 2023). En effet, à l'inverse de celui de l'intestin grêle, l'épithélium colique est caractérisé par un grand nombre de cellules caliciformes et l'absence de cellules de Paneth et de cellules M (Figure 6).

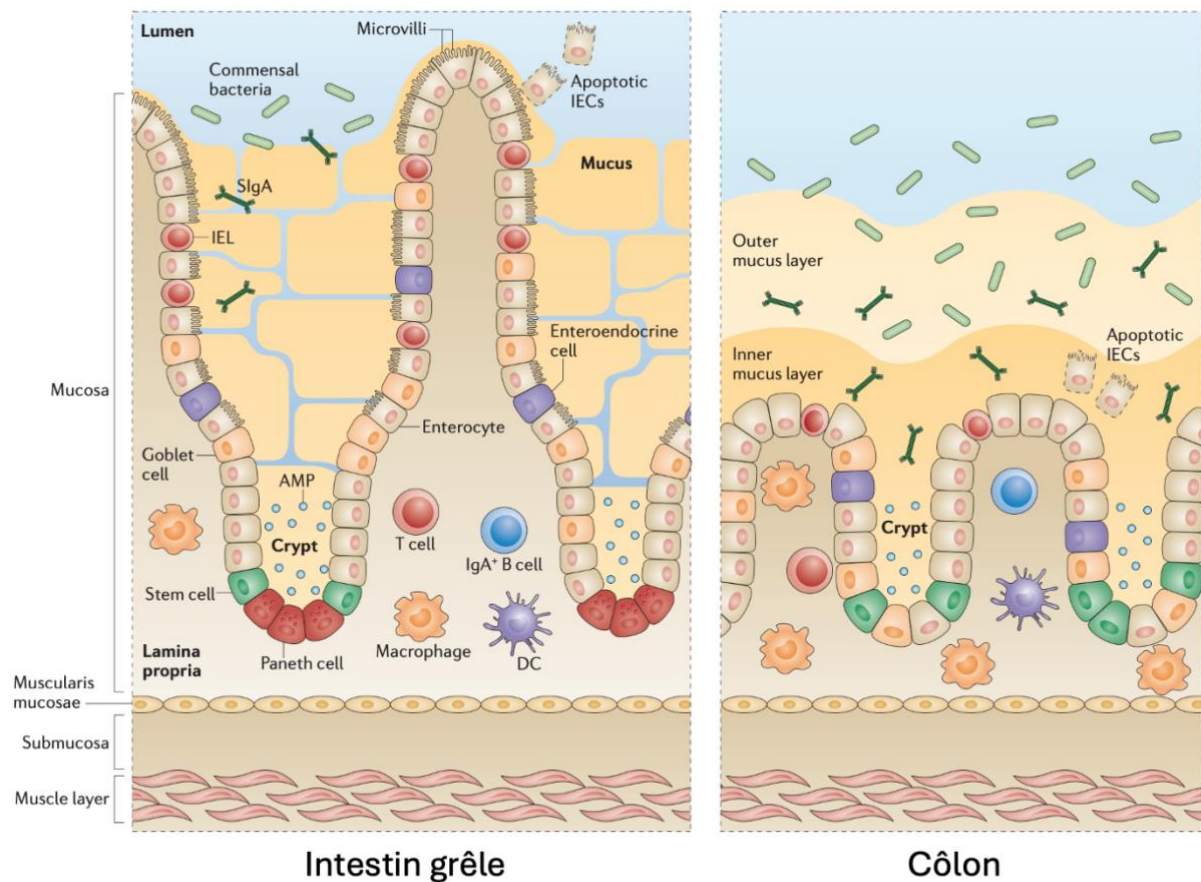


Figure 6 : Composition cellulaire de la muqueuse intestinale

Au niveau de l'intestin grêle, la muqueuse intestinale s'organise sous forme de cryptes et de villosités. Les entérocytes (cellules absorbantes majoritaires de l'épithélium intestinal) possèdent une membrane cellulaire apicale en brosse. Le mucus produit par les cellules caliciformes permet la protection de l'épithélium vis-à-vis des bactéries de la lumière intestinale. Les cellules de Paneth participent également à la défense de l'organisme via la production de peptides antimicrobiens. Différents types de cellules immunitaires sont présentes dans la *lamina propria* sous-jacente à l'épithélium. Au niveau du côlon, il n'y a plus de villosité, le mucus se densifie et les cellules de Paneth disparaissent. Adapté de (Mowat and Agace, 2014)

1. Les cellules souches intestinales

Les cellules souches intestinales (CSI) résident dans le fond des cryptes et sont responsables du renouvellement cellulaire permettant le maintien de la structure et la reconstitution de la muqueuse intestinale tout au long de la vie de l'individu (Barker, 2014). Ces cellules sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier en différents types cellulaires nécessaires au fonctionnement de l'intestin (Cheng and Leblond, 1974).

Les CSI ont un processus d'auto-renouvellement et de différenciation orchestré par différentes voies de signalisation complexes, comme par exemple les voies Wnt, Notch, BMP et Hedgehog (Flier and Clevers, 2009; Fre et al., 2005; Powell et al., 2011; A. J. M. Santos et al., 2018) (Figure 7). Parmi ces voies, la voie Wnt/ β -caténine est essentielle au maintien de la niche de

CSI (Zhan et al., 2017). Les ligands Wnt sont des glycoprotéines sécrétées qui viennent se fixer au complexe formé par le récepteur Frizzled (Fzd) et les co-récepteurs LRP5/6. En l'absence de ligands Wnt, un complexe de destruction multiprotéique est actif dans le cytoplasme et va phosphoryler la β -caténine induisant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Stamos and Weis, 2013). Ce complexe est composé de l'Adénomatose Polyposé Coli (APC), de l'Axine, de la Protéine Phosphatase 2a (PP2a), de la Glycogène Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) et de la Caséine Kinase 1 α (CK1 α). En présence de ligands Wnt, le complexe formé par Fzd et LRP5/6 se dimérise et séquestre le complexe de destruction dans la membrane, inhibant ainsi la dégradation de la β -caténine. Cette dernière va alors s'accumuler dans le cytoplasme, effectuer une translocation vers le noyau, former un complexe actif avec les protéines TCF et LEF pour induire la transcription de gènes prolifératifs. Cette voie peut également être activée par le ligand R-spondine qui vient se fixer à son récepteur LGR5 présent sur les cellules souches permettant ainsi la séquestration du complexe de dégradation de la β -caténine et l'activation de sa voie de signalisation (Kim et al., 2006). LGR5 est fortement exprimé par les cellules souches intestinales et sert de marqueur pour leur détection.

Au niveau de la crypte intestinale, les ligands Wnt forment un gradient dont la concentration la plus élevée se situe au fond de la crypte afin de permettre le maintien du compartiment des cellules souches (Reynolds et al., 2014). Les ligands BMP, responsables de la différenciation des CSI et de leur apoptose, ont quant à eux un gradient contraire avec une concentration plus élevée dans la partie apicale des cryptes. La régulation de la voie BMP dans la partie basale des cryptes intestinales se fait par l'expression d'antagonistes tels que Noggin et Gremlin-1.

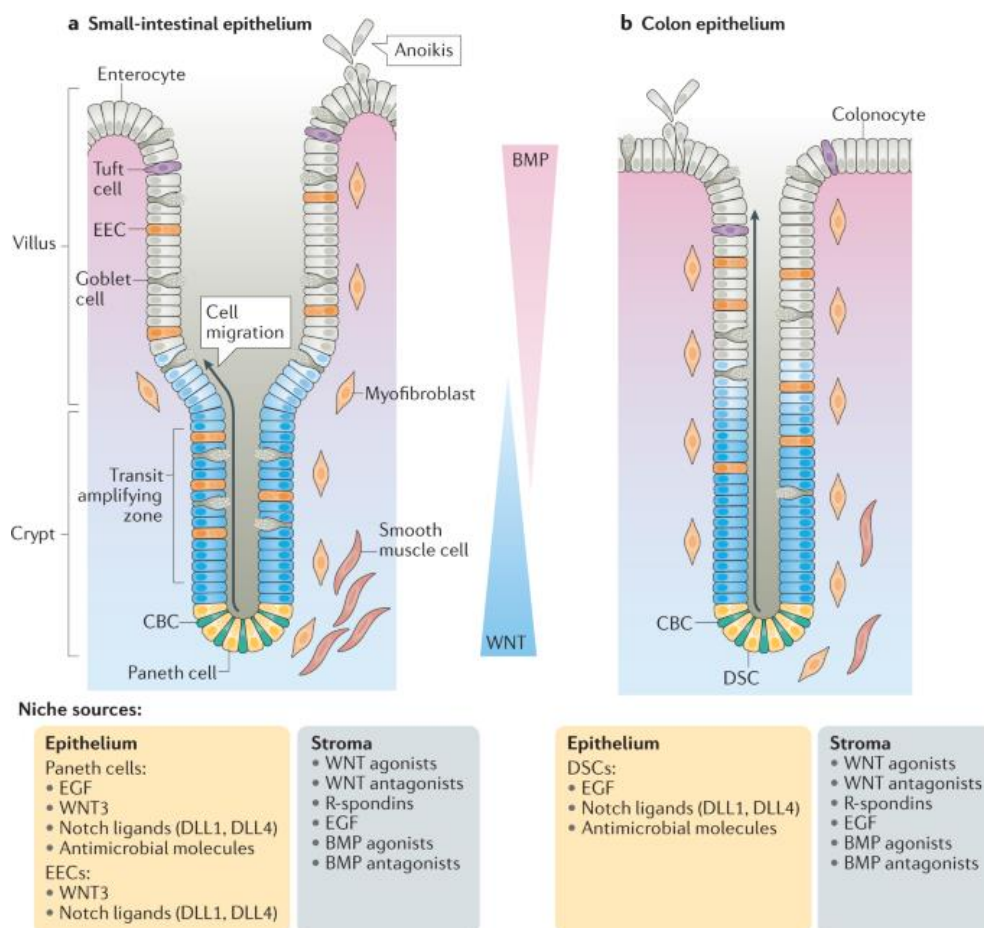


Figure 7 : Cellules souches intestinales et signaux de régulation

La signalisation Wnt induit la prolifération des cellules souches (CBC, DSC) et des cellules dans la zone de transition/amplification (TA) ainsi que la maturation des cellules de Paneth. Les signalisations Notch et Wnt induisent la prolifération des cellules souches intestinales et régulent le maintien des cellules TA et des cellules souches indifférenciées. Enfin, les signaux Hippo et de la protéine morphogénétique osseuse (BMP) inhibent la prolifération de tous les types de cellules sécrétoires et induisent leur maturation. Adapté de (Beumer and Clevers, 2021)

2. Les entérocytes

Les entérocytes (ou colonocytes dans le côlon) sont des cellules épithéliales hyperpolarisées possédant un rôle d'absorption et représentant plus de 80% de l'épithélium intestinal. Elles assurent l'intégrité de la barrière intestinale grâce à un complexe de jonctions cellulaires présent au pôle apical des cellules (Suzuki, 2013). Ce complexe jonctionnel se compose de jonctions adhérentes, serrées et de desmosomes. Tandis que les jonctions adhérentes et les desmosomes permettent l'adhérence mécanique entre les cellules, les jonctions serrées régulent la perméabilité paracellulaire en permettant le passage sélectif d'eau, d'ions, d'acides biliaires non-conjugués et de solutés (Miron and Cristea, 2012).

3. Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes assurent la production de la couche de mucus qui recouvre l'épithélium intestinal permettant ainsi une protection vis-à-vis des éléments de la lumière intestinale. Le mucus est formé de différents composés dont les principaux sont la mucine-2 (MUC2) jouant un rôle central dans la formation du mucus en créant un maillage structural, la Fcγ binding protein (FCGBP) et la calcium-activated chloride channel regulator 1 (CLCA1) (Ehrencrona et al., 2021; Nyström et al., 2018; Rodríguez-Piñeiro et al., 2013). Les propriétés du mucus diffèrent entre l'intestin grêle et le côlon et s'adaptent aux conditions environnantes et aux fonctions de l'organe (Atuma et al., 2001). Dans l'intestin grêle, la fonction principale de l'épithélium intestinal est de digérer et d'absorber les nutriments. La couche de mucus y est plus lâche et peu adhérente à l'épithélium ce qui la rend plus perméable permettant ainsi le passage de nutriments de petite taille et facilitant leur absorption (Atuma et al., 2001; Ermund et al., 2013; Macierzanka et al., 2019). Au niveau du côlon, l'absorption est grandement réduite, les fèces exercent une force mécanique importante sur l'épithélium et la charge bactérienne est beaucoup plus élevée. Le mucus est donc adhérent à l'épithélium, plus dense et abondant permettant ainsi de protéger l'épithélium efficacement (Atuma et al., 2001; Gustafsson et al., 2012; Johansson et al., 2008).

Outre leur rôle dans la production de mucus, les cellules caliciformes participent également à l'échantillonnage des antigènes de la lumière intestinale en formant des « passages d'antigènes associés aux cellules caliciformes » (goblet cell-associated antigen passages en anglais ou GAP) (McDole et al., 2012). Ces antigènes vont ensuite être présentés aux cellules immunitaires innées (phagocytes mononucléés) présentes dans la *lamina propria* induisant ainsi une tolérance vis-à-vis des éléments de la lumière intestinale ainsi que la production d'IL-10 par les macrophages et d'acide rétinoïque par les cellules dendritiques (Kulkarni et al., 2020). Cet environnement tolérogénique va permettre également d'induire la prolifération et la différenciation de cellules Treg et de soutenir une réponse Treg locale venant renforcer la tolérance immunitaire (Knoop et al., 2015; Kulkarni et al., 2020; McDole et al., 2012). Les GAPs sont surtout présents dans l'intestin grêle et en moindre mesure dans le côlon distal, et sont absents du côlon proximal (Kulkarni et al., 2020).

D'autre part, il a également été montré qu'un sous-type de cellules caliciformes appelées cellules caliciformes sentinelles (présentes dans la partie haute des cryptes du côlon distal) était capable d'endocyter des PAMPs et d'induire l'augmentation de la production de mucus par les

cellules environnantes afin de renforcer la barrière de mucus si la charge bactérienne dépasse un certain seuil (Birchenough et al., 2016).

4. Les cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines (EEC) sont des cellules issues de progéniteur de cellules sécrétoires et sont présentes sur l'entière de l'intestin grêle et du côlon (Begg and Woods, 2013; Gribble and Reimann, 2016). Ces cellules sont caractérisées par la présence de vésicules sécrétoires : grandes vésicules à noyau dense (LDCV) et petites microvésicules de type synaptique (SLMV) (Gunawardene et al., 2011). Leur rôle est de produire des hormones peptidiques en réponse aux stimuli de la lumière intestinale qu'elles reçoivent afin de réguler la sécrétion d'enzymes gastro-intestinales, la motilité intestinale et la régulation de l'appétit (Begg and Woods, 2013). Les cellules entéroendocrines sont classées en 8 sous-types selon les hormones qu'elles produisent et leur localisation le long de l'axe crypte-villosité (Gunawardene et al., 2011). Ces cellules sont capables de produire un large panel d'hormones parmi lesquelles on retrouve notamment le peptide insulino-trope dépendant du glucose (GIP) produit par les cellules K, la cholécystokinine (CCK) des cellules I, la sérotonine (5HT) des cellules entérochromaffines, la somatostatine (SST) des cellules D, le peptide YY (PYY) des cellules L ou bien encore le glucagon-like peptide 1 (GLP-1) des cellules L entre autres (Gribble and Reimann, 2016).

Outre leurs rôles précédemment décrits, les EEC jouent aussi un rôle dans le contrôle de l'immunité et expriment des récepteurs impliqués dans la reconnaissance des bactéries intestinales tels que les Toll-like receptor (TLR) 1, 2 et 4 (Bogunovic et al., 2007) ainsi que des récepteurs couplés aux protéines G (GPR40, GPR41, GPR43, GPR119 et GPR120) qui détectent les acides gras à chaîne courte (AGCC) ou les acides gras à chaîne longue (AGLC) produits par le microbiote intestinal (Cummings et al., 1987; Katsuma et al., 2005). En réponse à l'activation des TLRs, les EEC sont directement capables de produire des cytokines comme le $TNF\alpha$, le $TGF\ \beta$ et la protéine inflammatoire macrophagique (MIP) 2 qui vont activer les cellules immunitaires environnantes (Bogunovic et al., 2007). De plus, dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les EEC sont d'importants producteurs, avec les cellules caliciformes, d'IL-17C qui participe à la pathogénèse de la maladie (Friedrich et al., 2015).

Les peptides produits par les EEC participent également au maintien de l'homéostasie intestinale via leur impact sur l'intégrité de l'épithélium. En effet, le GLP-2 est connu pour

maintenir l'intégrité de la barrière intestinale en jouant sur les jonctions serrées (Cani et al., 2009; Dong et al., 2014; Moran et al., 2012) et plus récemment, le GLP-1 a été décrit comme un puissant facteur de croissance des cellules épithéliales (Koehler et al., 2015).

D'autre part, les cellules immunitaires expriment de nombreux récepteurs pour les hormones produites par les EECs (Genton and Kudsk, 2003). La leptine, l'histamine et la sérotonine (5-HT) sont des exemples d'hormones dont le rôle sur les cellules immunitaires innées et adaptatives est déjà largement décrit (Abella et al., 2017; O'Mahony et al., 2011; Shajib and Khan, 2015). Les peptides produits par les EEC jouent un rôle clé dans la polarisation, la prolifération et la migration des cellules T. En effet, on peut citer comme exemple la nesfatine-1 qui participe à l'activation des cellules Th17, tandis que la ghréline les inhibe (Chung et al., 2015; Dixit et al., 2009) ou bien encore la CCK qui induit un phénotype Th2 ou Treg (Zhang et al., 2014). Il a également été décrit que la ghréline induisait une prolifération des cellules T et que l'expression de son récepteur était diminuée dans les cellules T des patients atteints de la maladie de Crohn (Hosomi et al., 2008; Lee et al., 2014). Dans le contexte de colites induites au Dextran Sulfate de Sodium (DSS), la ghréline via son action sur les cellules T et le GLP-1 sur les lymphocytes intraépithéliaux ont montré un effet anti-inflammatoire et une amélioration de la colite (Pamukcu et al., 2013; Yusta et al., 2015). De manière intéressante, les monocytes et les macrophages sont également impactés par la production d'hormones. En effet, CCK permet d'inhiber l'activation des macrophages (De la Fuente et al., 1995; Miyamoto et al., 2012) et notamment la production d'iNOS en réponse à un stimulus bactérien (Saia et al., 2014). De plus, les GLP-1 et 2 ont montré un effet anti-inflammatoire sur les macrophages (Hogan et al., 2014; Xie et al., 2014).

5. Les cellules de Paneth

A l'inverse des autres cellules épithéliales, les cellules de Paneth migrent vers le fond de la crypte jusqu'à s'intercaler entre les cellules souches intestinales. Elles sont identifiables par leur forme pyramidale et cylindrique, et les granules éosinophiles qu'elles contiennent (Lueschow and McElroy, 2020). Une fois matures, elles vont participer à la prolifération et au maintien des cellules souches intestinales grâce à leur production d'EGF, de Notch et de Wnt (Sato et al., 2011b). Leur renouvellement fait également figure d'exception puisqu'elles peuvent persister beaucoup plus longtemps (3 à 6 semaines) que les autres cellules épithéliales avant d'être renouvelées à partir de précurseurs de cellules sécrétoires (Ireland et al., 2005).

Les cellules de Paneth sont impliquées dans la défense contre les pathogènes et dans la réponse inflammatoire (Clevers and Bevins, 2013). Ces fonctions vont être réalisées par le biais de nombreuses protéines et peptides (α -défensine, lysozyme, phospholipase A2, peptides liés à la séquence de cryptine) contenus dans leurs granules acidophiles et qui vont pouvoir être sécrétés de manière constitutive ou bien en réponse à un stimulus (Clevers and Bevins, 2013; Ouellette, 2010).

Au niveau de l'intestin grêle, les défensines constituent la principale classe de peptides antimicrobiens dérivés de l'épithélium participant à la régulation de la densité de la flore intestinale en condition d'homéostasie et à la défense de l'hôte (Dürr et al., 2006; Ganz, 2003a). Il existe deux types de défensines : (1) les α -défensines produites principalement par les cellules de Paneth et les neutrophiles, et (2) les β -défensines produites par les cellules épithéliales (Ganz, 2003a, 2003b; Kolls et al., 2008; Wehkamp et al., 2007). Chez l'Homme, les cellules des Paneth produisent seulement deux type d' α -défensines : HD-5 et HD-6 (De Smet and Contreras, 2005). La plupart des défensines agissent sur les bactéries en perturbant l'intégrité de leur membrane (Zasloff, 2002), tandis que certaines interfèrent avec la synthèse de la paroi bactérienne (de Leeuw et al., 2010; Sass et al., 2010; Schneider et al., 2010). En plus de leurs propriétés antimicrobiennes, plusieurs défensines régulent directement l'immunité comme par exemple HBD1 et HBD2 qui ont une activité chimio-attractante pour les cellules exprimant le CCR6 (Yang et al., 2002, 1999).

La sécrétion de molécules antimicrobiennes par les cellules de Paneth joue également un rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale. En effet, des études ont montré que la perte des cellules de Paneth ou des leurs effecteurs antimicrobiens induisait une augmentation de la translocation de bactéries depuis la lumière intestinale (Brandl et al., 2007; Vaishnava et al., 2008). De plus, une délétion du senseur bactérien NOD2 (exprimé dans l'intestin grêle par les cellules de Paneth) conduit à une diminution de la production d' α -défensine, une altération de la composition de la flore commensale intestinale et à une activation anormale de la réponse immunitaire Th1 (Biswas et al., 2010; Kobayashi et al., 2005; Petnicki-Ocwieja et al., 2009).

6. Les cellules tuft

Les cellules tuft sont des cellules chimio-sensorielles solitaires présentes au niveau des barrières muqueuses qui peuvent détecter les stimuli luminaux et sécréter des molécules effectrices pour réguler la physiologie et l'état immunitaire des tissus environnants (Schneider et al., 2019). Elles sont présentes dans de nombreux tissus comme ceux des voies respiratoires,

de l'urètre et du tube digestif (Hendel et al., 2022). Elles sont caractérisées par une multitude de microvillosités présentes à leur pôle apical (Hoover et al., 2017). Au niveau intestinal, leur principale fonction est d'induire une réponse immunitaire de type 2 via la production d'IL-25 en réponse à une infection parasitaire (Gerbe et al., 2016; Howitt et al., 2016; von Moltke et al., 2016).

C - L'immunité intestinale

1. Les cellules lymphoïdes

Au niveau intestinal, les structures lymphoïdes inductrices telles que le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) et les ganglions lymphatiques sont responsables de l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative (Brandtzaeg et al., 2008; Mowat and Agace, 2014). Les cellules immunitaires effectrices quant à elles sont présentes de manière diffuse dans l'épithélium intestinal et dans la *lamina propria* sous-jacente.

i. GALT et Plaques de Peyer

Le GALT est constitué de tissus lymphoïdes multifolliculaires, tels que les plaques de Peyer (PP) retrouvées sur la partie anti-mésentérique de l'intestin grêle (Figure 8), et de follicules lymphoïdes isolés (ILF) largement retrouvés dans l'intestin grêle et le côlon (Mowat and Agace, 2014). L'épithélium associé aux follicules lymphoïdes (EAF) est une partie particulière de l'épithélium se situant au-dessus des structures lymphoïdes du GALT (Owen and Jones, 1974). L'EAF est recouvert par une fine couche de mucus permettant aux cellules M présentes dans ce dernier de capturer les antigènes provenant de la lumière intestinale (Mabbott et al., 2013). Les cellules M vont ensuite transporter les antigènes jusqu'aux cellules dendritiques présentes en grand nombre dans une région des plaques de Peyer en contact direct avec l'EAF appelée dôme sous-épithélial (SED) (Farstad et al., 1994). La densité et la taille des plaques de Peyer augmentent le long de l'intestin grêle avec un maximum au niveau de l'iléon distal (Cornes, 1965). Outre le SED, les plaques de Peyer contiennent un grand nombre de follicules contenant des cellules B qui sont entourées de petits follicules contenant des cellules T. Au centre des follicules de cellules B se trouvent des centres germinatifs actifs (zone de prolifération des cellules B) suggérant une stimulation immunitaire continue (Yamanaka et al., 2001). Autour de ce centre germinatif, va se trouver une zone contenant des cellules B IgD⁺ naïves elle-même

entourée d'une large zone contenant majoritairement des cellules B mémoires productrices d'IgA et d'IgM (Spencer et al., 1986; Spencer and Sollid, 2016; Zhao et al., 2018). Les follicules de cellules T vont également contenir des cellules T naïves et mémoires (Fenton et al., 2020; Senda et al., 2019). L'arrivée des lymphocytes dans les plaques de Peyer se fait par les veinules à endothélium épais exprimant le récepteur MAdCAM-1 qui va reconnaître l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ présente sur les lymphocytes (Erle et al., 1994; Mörbe et al., 2021). De manière intéressante, il existe également au niveau du côlon des structures macroscopiques semblables aux PP (Owen et al., 1991).

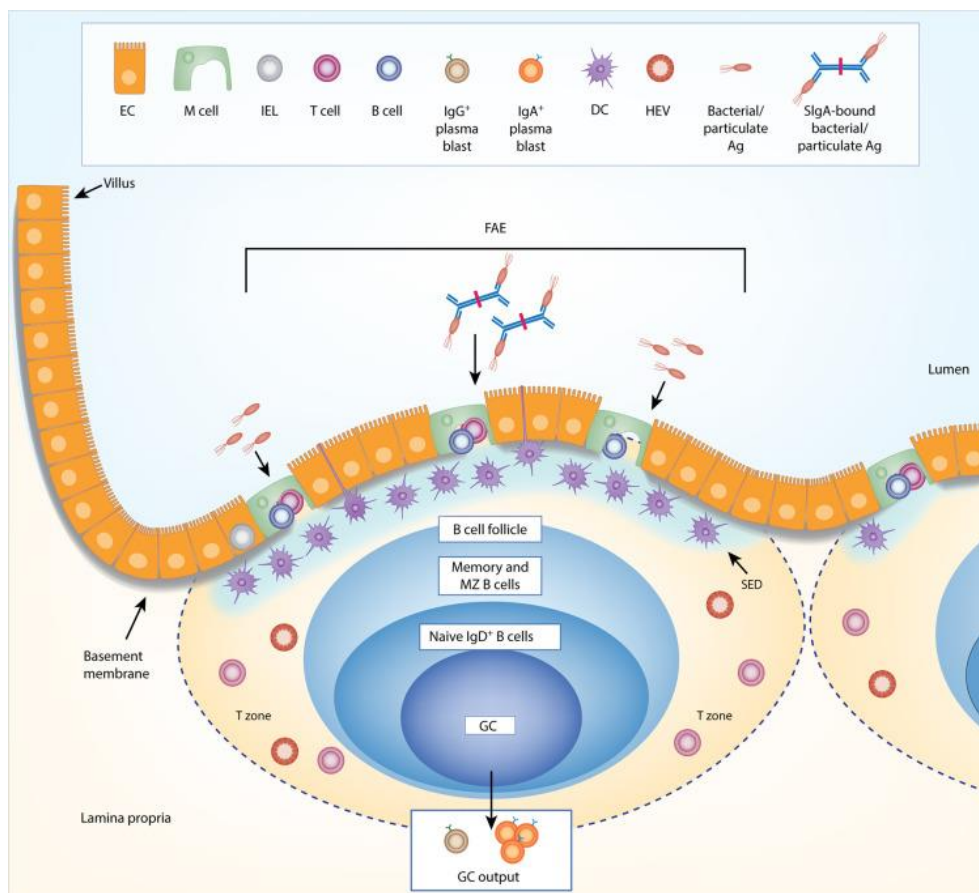


Figure 8 : Composition cellulaire des Plaques de Peyer

Les plaques de Peyer sont constituées d'un épithélium associé aux follicules qui est composé de cellules M permettant l'échantillonnage de la lumière intestinale et la transmission des antigènes aux cellules présentatrices d'antigènes situées dans le dôme sous-épithélial sous-jacent. Les plaques de Peyer sont également constituées de zones T contenant des cellules T naïves et mémoires, et de follicules de cellules B contenant un centre germinatif. (Mörbe et al., 2021)

ii. Follicules lymphoïdes isolés

Les follicules lymphoïdes isolés sont quant à eux retrouvés en grand nombre au niveau du tube digestif (environ 30 000 chez l'Homme) (Trepel, 1974). Différents types d'ILF ont été identifiés et nommés selon leur localisation tissulaire : ILF muqueux (M-ILF) pour les ILF présents uniquement dans la muqueuse de l'iléon et du côlon distal et ILF-sous-muqueux (SM-ILF) pour ceux résidant dans la sous-muqueuse du côlon (Fenton et al., 2020; Jørgensen et al., 2021). Tout comme les Plaques de Peyer, les ILF sont surmontés par un EAF contenant des cellules M et constitués d'un SED riche en cellules dendritiques CD11c⁺, d'un follicule B central pouvant contenir un centre germinatif entouré des follicules T et d'un réseau vasculaire comprenant des vaisseaux MAdCAM-1⁺ (Fenton et al., 2020).

iii. Les lymphocytes intestinaux

De manière plus générale, les cellules T intestinales vont participer à la protection de l'hôte vis-à-vis des pathogènes intestinaux via leur capacité cytotoxique et leur production de cytokines renforçant la barrière intestinale et permettant le recrutement d'autres cellules effectrices ou régulatrices (Ma et al., 2019). Les cellules T retrouvées dans la *lamina propria* intestinale, de type CD4⁺ ou CD8⁺, sont dérivées de cellules T conventionnelles ayant mûri dans les organes lymphoïdes secondaires. Au sein des cellules CD4⁺ intestinales, on retrouve une grande diversité de cellules associées à des réponses Th1, Th2 et Th17 (IL-2⁺, IL-2⁺IFN γ ⁺, IFN γ ⁺, IL-17⁺), et également Treg IL-10⁺ FOXP3⁺ (Ivanov et al., 2006; Ma et al., 2019; Maynard et al., 2007; Sathaliyawala et al., 2013; Veenbergen and Samsom, 2012). Du fait de l'exposition permanente des cellules immunitaires intestinales à des antigènes de la lumière du tube digestif, une réponse tolérogène est mise en place au niveau intestinal afin d'éviter une inflammation constante. Cette réponse est notamment induite par les cellules dendritiques et les cellules épithéliales intestinales qui vont produire différentes molécules (TGF- β , acide rétinoïque, indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) par exemple) orientant les cellules T CD4⁺ vers un phénotype régulateur (Ma et al., 2019). De ce fait, les cellules Treg représentent une partie non-négligeable des cellules T CD4⁺ intestinales (20% de l'intestin grêle et 30% dans le côlon) (Boll and Reimann, 1995).

Outre les lymphocytes présents dans les structures lymphoïdes, il existe certaines cellules T résidentes situées entre les entérocytes au niveau de leur membrane basale qui sont appelées lymphocytes intraépithéliaux (IEL) (Ma et al., 2021). Leur densité est d'environ 1 IEL pour 10

entérocytes au niveau de l'intestin grêle et diminue dans le côlon. Les IEL peuvent être classés en deux catégories TCR⁺ et TCR⁻. Les IEL TCR⁺ peuvent être sous-divisés en deux catégories supplémentaires : les IELs induits (type a ou conventionnels) ayant subi une présentation antigénique post-thymus par des antigènes périphériques avant de se diriger vers l'épithélium intestinal, ou les IELs naturels (type b ou non-conventionnels) qui acquièrent leur phénotype activé dans le thymus en présence d'antigènes du soi avant de se diriger vers l'épithélium (Cheroutre et al., 2011; Hayday and Gibbons, 2008). La majorité des IELs a une activité cytotoxique (grâce à des granules présents dans leur cytoplasme), produit un large panel de cytokines (interféron- γ (IFN- γ), interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-17) et exprime également des récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK (Cheroutre et al., 2011).

Il existe enfin des populations lymphocytaires beaucoup plus rares possédant un TCR invariant, il s'agit des invariant Natural Killer (iNKT) et des mucosal-associated invariant T cells (MAIT) représentant respectivement 0,5% et 2-3% des lymphocytes intestinaux dans le jéjunum chez l'Homme (Le Bourhis et al., 2011; Wingender and Kronenberg, 2008).

Les cellules B sont également retrouvées en grand nombre dans la *lamina propria* intestinale en condition d'homéostasie et peuvent se différencier en lymphocytes B matures appelés plasmocytes capables de produire de grandes quantités d'anticorps (Brandtzaeg, 2010). Les plasmocytes intestinaux produisent majoritairement des IgA (75 à 90% des cellules) mais également des IgM (Brandtzaeg and Johansen, 2005). Chez l'Homme, deux types d'IgA sécrétées sont produites, les IgA1 principalement retrouvées dans l'intestin grêle et les IgA2 majoritaires dans le côlon (Crago et al., 1984; Kett et al., 1986).

iv. Les cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) appartiennent à l'immunité innée mais proviennent des mêmes progéniteurs que les lymphocytes bien qu'ils n'expriment pas le TCR (Ignacio et al., 2017). A l'inverse des autres populations lymphocytaires ou des NK, leur population n'est pas constamment restaurée via la circulation (Gasteiger et al., 2015). Les ILCs peuvent être divisées en 3 groupes selon les stimuli les induisant et leur production de facteurs de transcription et de cytokines : ILC type 1 (comprenant les ILC1 et les NK), ILC type 2 et ILC type 3 (comprenant les ILC3 et les lymphoid tissue inducer (LTi)) (Spits et al., 2013) (Figure 9). Les ILC1 expriment T-bet et produisent de l'IFN- γ , les ILC2 expriment GATA3 et produisent différentes cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13, et les ILC3 expriment ROR γ t et produisent de l'IL-17 et/ou de l'IL-22 (Spits et al., 2013). Au niveau intestinal, deux populations d'ILC1

sont principalement retrouvées : les ILC1 de la *lamina propria* (NKp44⁻, CD161⁺, CD127⁺) et les ILC1 intraépithéliaux (NKp44⁺, CD103⁺, CD127⁻), partageant les propriétés cytotoxiques des NK (Fuchs et al., 2013, p. 1). Grâce à leur production d'IFN- γ , elles participent à l'élimination des pathogènes intracellulaires tels que les bactéries et les virus. Les cellules NK sont également présentes dans la muqueuse et participent au maintien de l'homéostasie par leur production d'INF- γ (cellules CD56^{high}) et leur activité cytotoxique (cellules CD56^{low}) (Elemam et al., 2017; Peters et al., 2016). Les ILC2 sont majoritairement présentes durant le stade fœtal et voient leur population diminuer au profit des ILC1 et ILC3 chez l'adulte en condition d'homéostasie (Ochel et al., 2019, p. 2). Elles participent à la défense contre les parasites extracellulaires en recrutant différentes cellules immunitaires telles que les éosinophiles et en activant les cellules immunitaires environnantes (Spits et al., 2013). Les ILC2 participent également au maintien de la barrière intestinale via leur production d'IL-13 qui favorise la différenciation des cellules souches intestinales en cellules tuft et caliciformes (von Moltke et al., 2016). Les ILC3 participent à la défense contre les bactéries extracellulaires, les champignons et favorisent la cicatrisation tissulaire (Ignacio et al., 2017; Sonnenberg et al., 2012; Tumanov et al., 2011). Elles participent également au maintien de l'homéostasie intestinale en modulant les cellules myéloïdes et épithéliales, par exemple via leur production d'IL-22 stimulant la production de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth (Mortha et al., 2014; Zhou et al., 2019). Les LTi jouent un rôle dans le développement des organes lymphoïdes secondaires et notamment du GALT en favorisant la rétention des cellules hématopoïétiques par les cellules mésenchymateuses et en stimulant le recrutement et l'activation des lymphocytes par les cellules stromales (Saez et al., 2021; Vivier et al., 2018).

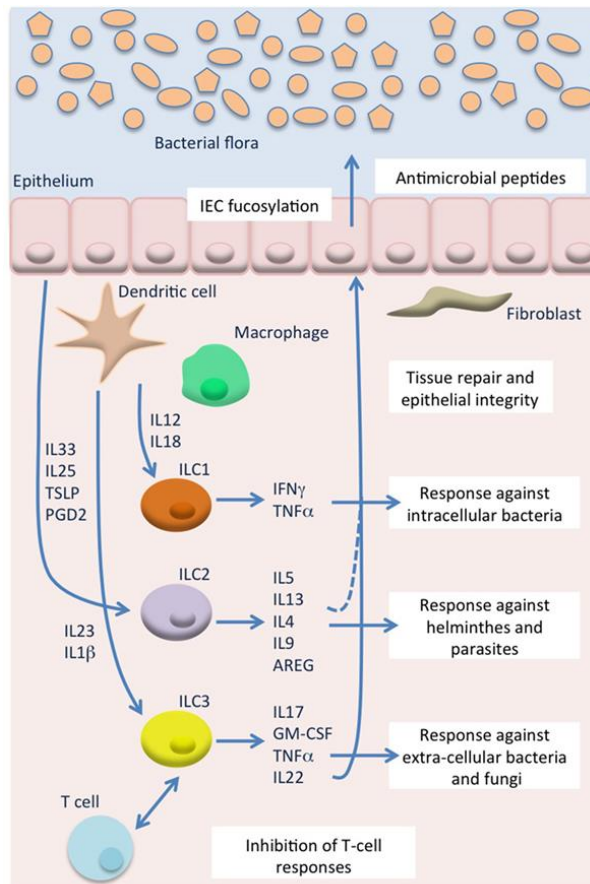


Figure 9 : Fonction des cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) contribuent au maintien de l'homéostasie intestinale via l'induction de réponses antimicrobiennes, la promotion de l'intégrité de la barrière épithéliale et de la réparation des tissus. En réponse aux stimuli microbiens, les cellules dendritiques ou les macrophages produisent différentes cytokines qui vont activer les ILC1 et les ILC3 induisant respectivement une réponse contre les bactéries intracellulaires et les bactéries/champignons extracellulaires. L'activation des ILC2, jouant un rôle clé dans la défense contre les helminthes, est induite par la sécrétion de médiateurs solubles par l'épithélium. Enfin les ILC3 et possiblement les ILC2 participent à l'intégrité de l'épithélium et à la réparation tissulaire. (Geremia and Arancibia-Cárcamo, 2017)

2. Les cellules myéloïdes

Outre le système lymphocytaire, on retrouve au niveau intestinal un vaste réseau de cellules immunitaires dérivées de précurseurs myéloïdes telles que les monocytes et macrophages, les cellules dendritiques et les polynucléaires éosinophiles.

i. Les macrophages intestinaux

Parmi les différentes populations leucocytaires intestinales, celle des macrophages est la plus abondante au niveau de la *lamina propria* (notamment au niveau du côlon) et constitue le plus

grand réservoir de macrophages de l'organisme. Les macrophages permettent la phagocytose de microorganismes et de débris cellulaires, participent au maintien de l'homéostasie intestinale et au renouvellement de l'épithélium par la sécrétion de médiateurs solubles (Hegarty et al., 2023) (Figure 10). Au niveau de l'intestin, des études chez la souris ont montré qu'un large pool de macrophages issus de monocytes circulants CC-chemokine receptor 2-high (CCR2^{hi}), lymphocyte antigen 6C-high (LY6C^{hi}), major histocompatibility complex class II-negative (MHCII⁻) et CX3C-chemokine receptor 1-low (CX3CR1^{low}) est recruté au niveau de la muqueuse intestinale en condition d'homéostasie (Bain et al., 2013). Grâce à différents signaux produits au niveau intestinal tels que le macrophage colony-stimulating factor 1 (CSF1), le TGFβ, l'IL-10, le CX3C-chemokine ligand 1 (CX3CL1), les ligands du récepteur d'aryl hydrocarbure (AhR) dérivés des aliments et les acides gras à chaîne courte (AGCC) produits par le microbiote intestinal, les monocytes se différencient en macrophages matures résidents LY6C⁻ MHCII^{hi} CX3CR1^{hi} présents dans la *lamina propria* (LP) (Na et al., 2019). Néanmoins, une étude de 2018 chez la souris suggère qu'il existe également une population de macrophages résidents à longue durée de vie CX3CR1^{hi} CD4⁺ T cell immunoglobulin mucin receptor 4-positive (TIM4⁺) qui se maintiennent localement dans la sous-muqueuse et la musculature externe (Shaw et al., 2018).

Les macrophages intestinaux résidents répondent faiblement à une stimulation de leurs TLRs par une production de cytokines inflammatoires (telles que l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-12 et le TNF) à bas bruit ne conduisant pas à une inflammation qui serait délétère (Ueda et al., 2010). Néanmoins, ils présentent une activité phagocytaire élevée grâce à l'expression de récepteurs tels que le CD36 et une forte activité bactéricide grâce à l'expression de PRR cytosoliques (Smythies et al., 2005). Les macrophages intestinaux possèdent un phénotype régulateur caractérisé par la production, de manière constitutive ou induite par la stimulation de leurs TLRs, de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 (Cerovic et al., 2014; Ueda et al., 2010). L'IL-10 ainsi produite va induire une réponse tolérante dans la muqueuse intestinale en favorisant notamment la survie et la fonctionnalité des cellules Treg FOXP3⁺ (Hadis et al., 2011; Murai et al., 2009) et en limitant l'activité des cellules T effectrices CD4⁺ (Kayama et al., 2012). De manière intéressante, les macrophages participent également au maintien des cellules Th17 en condition d'homéostasie via la production d'IL-1β induite par le microbiote intestinal (Panea et al., 2015; Shaw et al., 2012). Des études en modèles murins ont également révélé que les macrophages intestinaux favorisent la fonctionnalité et le renouvellement de l'épithélium intestinal via la production de molécules telles que le facteur de croissance des hépatocytes (HGF), la prostaglandine E2 (PGE2) et des molécules de signalisation de la voie Wnt

(D'Angelo et al., 2013; Saha et al., 2016; Cosin-Roger et al., 2016). De plus des études chez la souris ont montré que ces macrophages peuvent agir directement sur la niche des cellules souches intestinales ou bien indirectement en favorisant la fonctionnalité des cellules de Paneth qui, comme décrit précédemment, participent au maintien des CSI (Pull et al., 2005; Sato et al., 2011b; Sehgal et al., 2018). Ces macrophages peuvent également via des dendrites transépithéliales (TED) sonder le contenu luminal de l'intestin sans perturber l'intégrité de l'épithélium grâce au récepteur CX3CR1 (Niess et al., 2005) ce qui pourrait favoriser la tolérance orale aux antigènes venant de l'alimentation (Mazzini et al., 2014). Cette tolérance serait induite par transfert des antigènes aux cellules dendritiques migratoires CD103⁺ via la formation de jonctions gap grâce à la connexine-3 (Mazzini et al., 2014). En outre, les macrophages peuvent réguler les cellules dendritiques via la production d'IL-1 β qui va activer la production du Colony Stimulating factor 2 (CSF2) par les ILC3 induisant ainsi la différenciation des cellules dendritiques intestinales (Greter et al., 2012; Mortha et al., 2014). Outre leur rôle dans la régulation de l'épithélium et de l'immunité, des études chez la souris ont également montré que les macrophages intestinaux favorisent l'intégrité du système vasculaire et interagissent avec le système nerveux entérique (Hegarty et al., 2023).

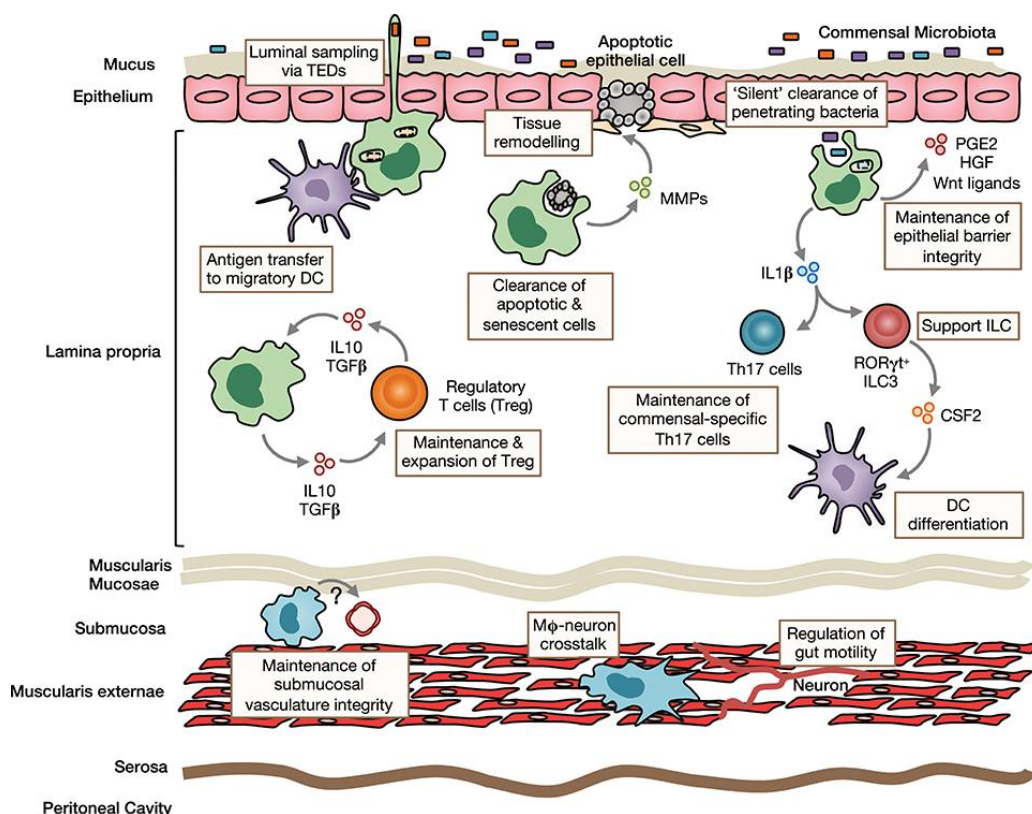


Figure 10 : Fonctions des macrophages intestinaux

Les macrophages de la *lamina propria* (LP) intestinale permettent l'élimination des cellules épithéliales apoptotiques et sénescents. Ils favorisent également l'intégrité de la barrière intestinale en exprimant des métalloprotéinases permettant un remodelage tissulaire et en sécrétant des facteurs qui stimulent le renouvellement des cellules souches épithéliales (prostaglandine E2 (PGE2), facteur de croissance hépatocytaire (HGF) et ligands de Wnt). Les macrophages intestinaux participent à l'échantillonnage de la lumière intestinale via la projection de dendrites transépithéliaux (TED). Les antigènes ainsi acquis peuvent être transférés aux cellules dendritiques (DC) migratrices pour les présenter aux cellules T dans les ganglions lymphatiques mésentériques drainants. Les macrophages intestinaux produisent différentes cytokines immunorégulatrices, telles que l'IL10 et le TGFβ, permettant le maintien et facilitant l'expansion des cellules T régulatrices (Tregs). De la même manière, ils soutiennent les cellules Th17 et les ILC3 par leur production d'IL1β. (Bain and Schridde, 2018)

ii. Les cellules dendritiques intestinales

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules myéloïdes spécialisées dans la présentation d'antigènes. Elles sont composées de deux principaux sous-ensembles : les DC classiques (cDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC) (Guilliams et al., 2014). Les DC, une fois arrivées dans la sous-muqueuse intestinale vont pouvoir échantillonner la lumière intestinale grâce à des dendrites leur permettant de capturer des antigènes directement au travers de l'épithélium ou via les cellules M (Coombes and Powrie, 2008). Ces cellules sont également capables tout comme les macrophages de jouer plusieurs rôles en fonction de leur environnement et des signaux qu'elles perçoivent : inflammatoires induisant une réponse de type Th1/Th2 ou bien

régulateurs en induisant une réponse Treg (Coombes and Powrie, 2008). En condition d'homéostasie, les DC jouent un rôle clé dans l'immunité intestinale en permettant l'induction de la tolérance immunitaire orale et en favorisant la génération de cellules Treg reconnaissant les antigènes oraux et du microbiote intestinal (Esterházy et al., 2016).

Les cDC peuvent être retrouvées dans les structures lymphoïdes intestinales (plaques de Peyer, nœuds lymphatiques mésentériques) ainsi que dans la *lamina propria* de l'intestin grêle et du côlon (Stagg, 2018). Quatre différents sous-types de cellules dendritiques possédant des fonctions différentes ont été décrits dans la *lamina propria* selon leur expression du CD11b et du CD103. Par exemple, les cellules dendritiques CD11b⁺ produisent une quantité élevée d'IL-10 et ont une capacité accrue à induire une réponse de type Th2 (Iwasaki and Kelsall, 2001). A l'inverse, les cellules CD8α⁺ et CD11b⁻CD8α⁻ produisent une plus grande quantité d'IL-12 et induisent la production d'IFNγ par les cellules T (Iwasaki and Kelsall, 2001). Il a également été décrit que seules les DC CD103⁺ induisent l'expression du récepteur de *homing* intestinal CCR9 sur les cellules T tandis que les CD103⁻ induisent la différenciation de cellules T productrices d'IFNγ (Annacker et al., 2005). La répartition dans l'intestin de ces différents sous-types varie également. Par exemple, les DCs CD103⁺CD11b⁺ représentent la majorité des DC dans l'intestin grêle mais deviennent rares dans le côlon (Denning et al., 2011; Persson et al., 2013). A l'inverse, le sous-type majoritaire pour les DC CD103⁺ dans le côlon est CD103⁺CD11b⁻ (Denning et al., 2011).

Les pDC sont également présentes dans la muqueuse intestinale mais en plus faible quantité que les cDC et ne représenteraient que 0,5 à 1% des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) chez l'Homme (Mowat and Agace, 2014; Ye et al., 2020). En condition d'homéostasie, les pDC seraient majoritairement retrouvées dans l'intestin grêle et seulement en faible quantité dans le côlon (Mowat and Agace, 2014). En réponse à une infection bactérienne ou virale, les pDC sont capables de produire de grandes quantités d'interféron de type 1 (Cella et al., 2000; Siegal et al., 1999). Elles participent également à la tolérance immunitaire et jouent un rôle protecteur dans les modèles d'inflammation de l'intestin grêle et d'allergie alimentaire (Mizuno et al., 2012; Smit et al., 2011).

iii. Les polynucléaires éosinophiles

Les polynucléaires éosinophiles sont principalement localisés dans la *lamina propria* (Fulkerson and Rothenberg, 2008) et représentent une part non-négligeable (jusqu'à 30%) des cellules myéloïdes intestinales dans la muqueuse en condition d'homéostasie (Bain et al., 2013;

Mowat and Agace, 2014). Leur nombre augmente le long du tractus digestif pour atteindre un pic dans le côlon ascendant (Matsushita et al., 2015). La fonction des éosinophiles en condition d'homéostasie reste à ce jour peu connue et la majorité des données disponibles proviennent d'études en modèles murins. Néanmoins, ces cellules participeraient au maintien de la barrière intestinale, à l'immunité vis-à-vis des pathogènes intestinaux et interagiraient avec le système nerveux entérique (Loktionov, 2019).

III - Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)

A - MICI et santé publique

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent principalement deux pathologies : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) (Fakhoury et al., 2014). Ces maladies sont caractérisées par une alternance entre poussées inflammatoires et phases de rémission. L'inflammation ainsi causée entraîne des douleurs abdominales violentes, des ténésmes et des épreintes, associées à des diarrhées parfois sanglantes, et une asthénie (Fakhoury et al., 2014). L'évolution chronique invalidante des MICI et leurs complications ont un impact important sur la qualité de vie quotidienne des malades.

Bien qu'elles présentent des caractéristiques communes, la MC et la RCH diffèrent par certains facteurs tels que l'implication des prédispositions génétiques dans le développement de la maladie mais également par le site et la nature des lésions inflammatoires (Seyedian et al., 2019). En effet, la RCH est caractérisée par une inflammation et une ulcération de la muqueuse intestinale, et dans une moindre mesure de la sous-muqueuse, du côlon et du rectum. A l'inverse, la maladie de Crohn peut toucher l'intégralité du tractus gastro-intestinal, de la cavité buccale à l'anus causant une inflammation s'étendant à toutes les couches tissulaires du tube digestif, et pouvant conduire à la formation de fistules (Nielsen et al., 2009).

Selon les derniers chiffres en date provenant du rapport « Global Burden of Disease (GBD) Study 2019 », 4,9 millions de cas de MICI ont été recensés dans le monde (Wang et al., 2023). Bien que traditionnellement décrites comme des maladies des pays occidentaux, la croissance du nombre de cas semble ralentir dans ces pays qui maintiennent tout de même une forte prévalence de ces pathologies. A l'inverse, l'industrialisation de pays émergents a fait exploser le nombre de cas au Moyen-Orient, en Asie et en Amérique du Sud (Ng et al., 2017). Conséquence de cela, les États-Unis et la Chine sont actuellement les pays présentant le plus de cas avec 911 405 et 762 890 cas (66,9 et 245,3 cas par 100 000 habitants) respectivement (Wang et al., 2023).

En France, ces maladies pèsent beaucoup sur le système économique et de santé d'autant qu'elles sont diagnostiquées généralement chez l'adulte jeune, âgé de 20 à 30 ans. D'après les dernières données disponibles, 308 800 personnes étaient inscrites en affection longue durée

(ALD) pour des maladies inflammatoires chroniques intestinales en 2022 représentant un coût d'environ 1,048 milliard d'euros par an pour leur prise en charge*.

B - Facteurs de prédisposition des MICI

Bien que des progrès aient été réalisés dans la compréhension de ces pathologies, la physiopathologie des MICI est complexe, d'origine multifactorielle alliant prédispositions génétiques, facteurs immunologiques et environnementaux, et toujours d'étiologie inconnue (Kofla-Dłubacz et al., 2022). Néanmoins, différents facteurs génétiques, environnementaux ou immunologiques impliqués dans la pathogénèse des MICI ont été identifiés.

1. Facteurs génétiques

L'implication des facteurs génétiques dans la prédisposition aux MICI a été décrite pour la première fois en 1988 dans une publication s'intéressant à une population de jumeaux monozygotes et dizygotes (Tysk et al., 1988). Depuis de nombreuses études ont étayé cette hypothèse en associant un grand nombre de gènes au risque de développer une MICI, ou plus spécifiquement l'une ou l'autre de ces pathologies (figure 11). De manière intéressante, différentes études sur l'apparition des MICI dans des populations de jumeaux ou bien des familles semblent montrer une plus grande implication de la génétique dans la MC par rapport à la RCH (Halme et al., 2006; M. P. C. Santos et al., 2018). En effet, l'étude de Halme et al. décrit que le risque de développer une MICI pour les parents au premier degré d'un patient atteint de MC est de 5 % et celui d'un patient atteint de RCH de 1,6 %. De plus, le taux de concordance chez des jumeaux monozygotes a été estimé à 10-50 % pour la MC et 4-15 % pour la RCH renforçant cette hypothèse (Orholm et al., 2000; Thompson et al., 1996).

En 2001, le Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (*NOD2*) a été le premier gène de susceptibilité à avoir été identifié dans la MC (Ogura et al., 2001). La protéine NOD2 est un récepteur intracellulaire impliqué dans la reconnaissance de produits bactériens conduisant à l'activation de la voie de signalisation NFκB. Il est notamment exprimé par les cellules dendritiques et induit un mécanisme d'autophagie (permettant l'élimination des bactéries) lors de la liaison NOD2/Muramyl dipeptide (MDP, constituant de la paroi bactérienne).

Depuis et avec l'avènement des techniques de séquençage haut débit, des études d'association pangénomiques (Genome-Wide Association Study ou GWAS en anglais) ont permis d'identifier 240 loci associés au développement des MICI dont 30 sont communs à la MC et à la RCH (Huang et al., 2017; Mirkov et al., 2017; Peters et al., 2017). Ces gènes participent à différentes fonctions biologiques telles que la reconnaissance des pathogènes, l'intégrité de la barrière intestinale, l'immunité innée et adaptative, l'inflammation et la fibrose, le stress cellulaire, la signalisation cytokinique ou encore les processus liés à l'inflammasome (Graham and Xavier, 2020).

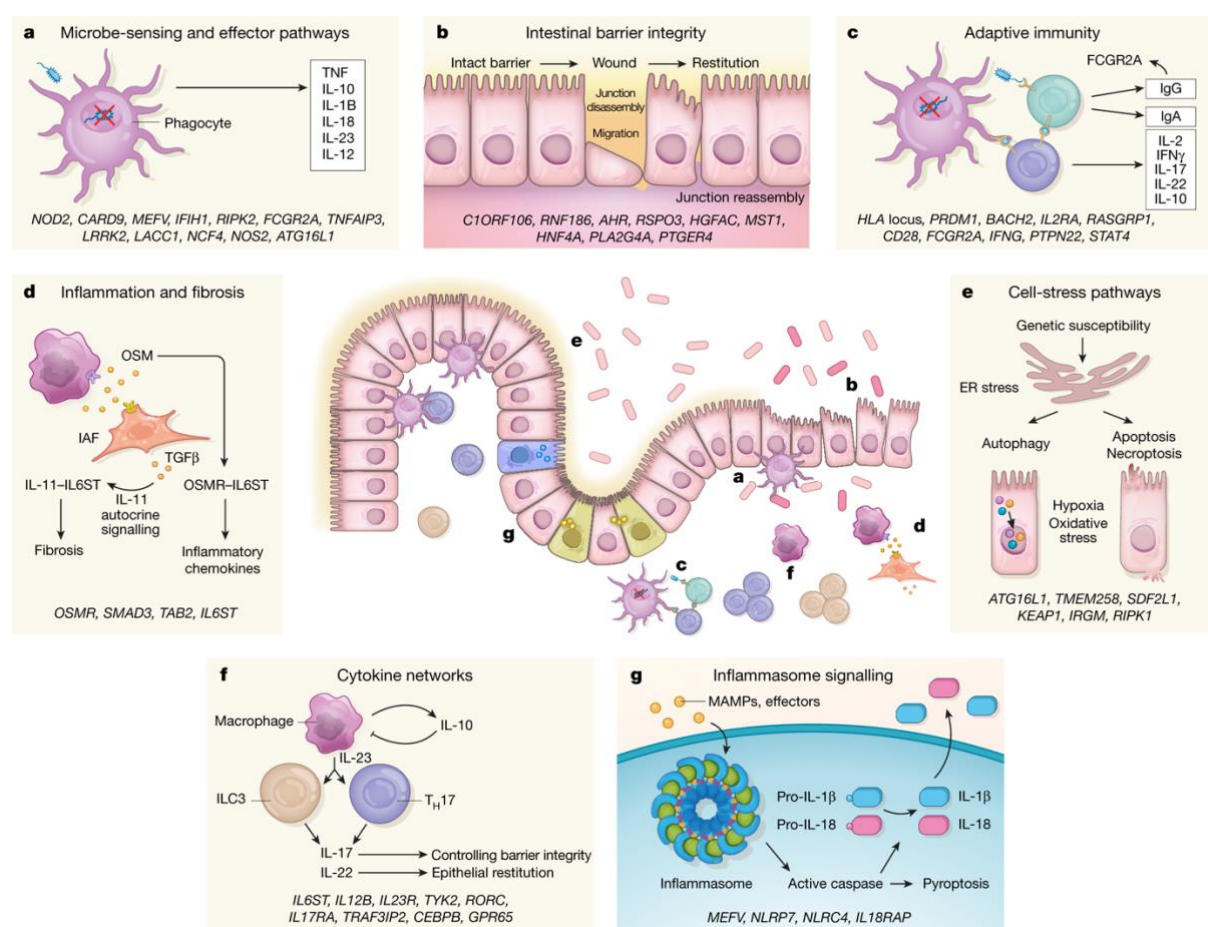


Figure 11 : Gènes de susceptibilité des MICI

Des gènes impliqués dans de nombreux mécanismes physiologiques ont été identifiés comme gènes de susceptibilité des MICI. Parmi ces mécanismes on retrouve la détection bactérienne, l'intégrité de la barrière épithéliale, l'immunité adaptative, l'inflammation et la fibrose, le stress cellulaire, la production de cytokines et l'inflammasome. (Graham and Xavier, 2020)

De manière intéressante, la dysfonction de la barrière épithéliale observée dans la RCH participe activement au développement de la pathologie (Martini et al., 2017a). La plupart des polymorphismes de gènes impliqués dans l'intégrité et la fonctionnalité de l'épithélium

(*HNF4α*, *CDH1*, *LAMB1*, *PTGER4* par exemple) ont été identifiés chez des patients atteints de cette pathologie (Anderson et al., 2011; Khor et al., 2011; UK IBD Genetics Consortium et al., 2009).

HNF4α est un facteur de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires jouant un rôle clé dans l'homéostasie intestinale. Il participe, via la régulation de molécules de signalisation, à l'intégrité de la barrière épithéliale, au renouvellement et à la cicatrisation de l'épithélium (Vemuri et al., 2023). En contexte pathologique, il est diminué chez les patients atteints de RCH. De plus, il a été montré dans un modèle murin de colite au Dextran Sulfate de Sodium (DSS) qu'une suppression conditionnée de HNF4α aggravait les manifestations cliniques et histologiques de la colite (perte de poids, réduction de la longueur du côlon, changements histologiques) (Ahn et al., 2008). Outre son rôle dans le maintien de la barrière épithéliale, il a récemment été montré que HNF4α participait à la régulation du développement des IELs en favorisant leur dialogue avec les cellules épithéliales intestinales grâce à l'expression de molécules de signalisation immunitaire (Btl1, Btl6, H2-T3, Clec2e) (Lei et al., 2022).

Un autre exemple de gène de susceptibilité identifié par GWAS est *CDH1* qui code l'E-cadhérine, la principale cadhérine exprimée par l'épithélium colique. Cette molécule est fortement exprimée dans la partie apicale des cryptes et participe à la formation et au maintien de la barrière intestinale en favorisant le contact entre les cellules épithéliales (Daulagala et al., 2019). Grill et al. ont notamment montré grâce à un modèle murin de délétion conditionnée du gène *CDH1* que la perte de l'E-cadhérine aggravait les symptômes d'une colite au DSS (perte de poids, déshydratation, sang dans les fèces) et provoquait également une inflammation exacerbée du tube digestif (Grill et al., 2015).

Bien que différents gènes de susceptibilité aient été identifiés au travers de ces études, ils n'arrivent pas seuls à expliquer l'apparition des MICI. D'autres facteurs semblent nécessaires au développement de ces pathologies.

2. Facteurs environnementaux

L'augmentation rapide du nombre de cas de MICI dans les pays en voie d'industrialisation ces 20 dernières années laisse penser que les facteurs environnementaux joueraient un rôle clé dans le développement de cette pathologie. En effet, l'apparition de nouvelles mutations favorisant les MICI dans ces populations est peu vraisemblable en seulement quelques décennies. Les facteurs environnementaux regroupent le stress, la pollution, le tabagisme, l'utilisation

d'antibiotiques, l'exposition à des produits chimiques, l'allaitement et l'alimentation (de Castro et al., 2021) (Figure 12).

Parmi les différents facteurs cités précédemment, l'alimentation semble participer de manière importante à la physiopathologie des MICI (Hibi and Ogata, 2006).

Lors des premières années de vie l'allaitement est crucial dans la mise en place de la barrière épithéliale intestinale. En effet, il permet la colonisation de l'intestin par un microbiote équilibré et favorise la mise en place d'une réponse immunitaire mixte Th1/Th2 grâce aux stimulations par les bactéries présentes dans le lait maternel (Walker and Iyengar, 2015). De plus, l'effet protecteur de l'allaitement vis-à-vis des MICI a été suggéré notamment par deux méta-analyses montrant que l'allaitement permettrait de réduire le risque de développer des MICI de manière dose-dépendante avec une plus forte protection dans les 12 mois suivant l'allaitement (Klement et al., 2004; Xu et al., 2017). Néanmoins, ces résultats sont controversés et d'avantage d'études seraient nécessaires afin de déterminer si l'allaitement joue un rôle dans la protection vis-à-vis des MICI.

Outre l'allaitement, l'alimentation en général est un facteur de risque dans le développement des MICI. Il a en effet été montré que la consommation de fruits et légumes riches en fibres permettait de diminuer les risques de développer la MC (Amre et al., 2007; Ananthakrishnan, 2013; Zeng et al., 2017). De plus, les acides gras polyinsaturés de type omega-3 ont été associés à un risque moindre de développer une MICI tandis que les acides gras polyinsaturés de type omega-6 sont associés à un risque accru de développer une RCH (Ananthakrishnan et al., 2014; IBD in EPIC Study Investigators et al., 2009). L'alimentation occidentale se caractérise par une forte consommation de protéines animales, de produits transformés riches en graisses, en sucres et en conservateurs. Bien que l'association entre macronutriments et risques de MICI reste discutée, la consommation de sucres ainsi qu'un apport élevé en graisses animales et en cholestérol est un facteur d'incidence de la RCH et la consommation excessive de produits de fast-food est associée à un risque accru de développement de MC (Ananthakrishnan, 2013; Chiba et al., 2019; Wang et al., 2017; Zeng et al., 2017). Enfin, plusieurs études ont montré l'effet délétère de la consommation d'émulsifiants utilisés dans l'agroalimentaire sur la fonction de la barrière épithéliale soulignant ainsi sa potentielle implication dans le développement des MICI (Chassaing et al., 2015; Naimi et al., 2021; Roberts et al., 2010).

Le tabagisme est un autre facteur environnemental ayant une forte incidence dans les MICI avec une action spécifique selon la maladie. En effet, la consommation de tabac semble aggraver le risque de MC tout en étant protecteur dans la RCH (Lunney et al., 2015; Mahid et al., 2006). Une étude de cohorte récente a notamment montré que le tabagisme, bien que

favorisant le développement de cancers et induisant une mortalité élevée, prévenait l'apparition de la RCH et était associé à moins d'hospitalisations. D'autre part, cette étude montre que fumer n'affecte pas l'occurrence de la MC mais plutôt son intensité, avec une agressivité de la maladie se traduisant par une augmentation des chirurgies (B.-C. Chen et al., 2022). La réponse inflammatoire observée dans la MC proviendrait majoritairement d'une réponse de type Th1 tandis que pour la RCH, ce serait une réponse Th2 qui prédominerait (Li et al., 2016). L'effet différentiel du tabagisme sur ces maladies pourrait s'expliquer par le fait que la nicotine, composé essentiel des cigarettes, a un impact sur la fonction des cellules Th2, diminuant ainsi l'intensité de la RCH, mais pas des Th1, cellules majoritaires dans la MC (Madretsma et al., 1996). Enfin, le tabagisme semblerait altérer les mécanismes d'autophagie ce qui contribuerait au développement de la MC (Monick et al., 2010; Yuan et al., 2024).

Bien que de nombreuses avancées aient été réalisées concernant l'impact des facteurs environnementaux sur le développement des MICI, une publication récente pointe le fait qu'il reste des lacunes dans nos connaissances et que des études supplémentaires sont essentielles pour une meilleure compréhension de ces pathologies (Ho et al., 2019).

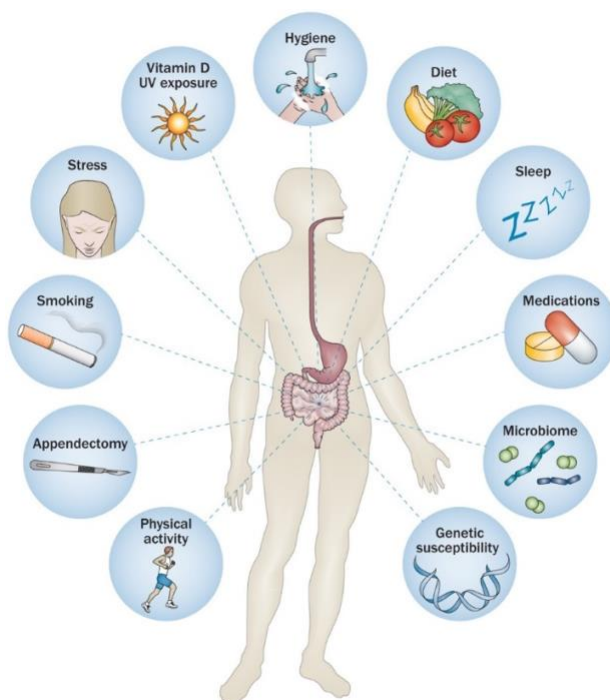


Figure 12 : Facteurs de susceptibilité des MICI

Les MICI sont des maladies d'origine multifactorielle alliant prédispositions génétiques, facteurs immunologiques et environnementaux (alimentation, stress, tabagisme, activité physique, ...). (Ananthakrishnan, 2013)

3. Facteurs immunologiques

Malgré leur étiologie inconnue, il semble que les MICI soient entretenues par une réponse immunitaire altérée contre les microorganismes. Cette réponse immunitaire anormale résulte d'un dérèglement de la réponse immunitaire innée et adaptative (Danese, 2011).

La première ligne de défense est la barrière épithéliale qui limite le contact entre le microbiote et les cellules immunitaires tout en favorisant un environnement tolérogène, et permettant le dialogue entre ces derniers. Dans les MICI, on observe une altération de la barrière intestinale induisant une augmentation de la perméabilité provoquant *in fine* une suractivation du système immunitaire par le microbiote intestinal (Salim and Soderholm, 2011). Cette dysfonction de la barrière intestinale peut être due à une altération de la production du mucus notamment dans la MC (Pullan et al., 1994; Sun et al., 2016), à un défaut de production des peptides antimicrobiens lié à une dysfonction des cellules de Paneth (Gubatan et al., 2021; Wehkamp et al., 2008) ou encore à une perte de fonction des jonctions cellulaires (Landy et al., 2016; Lee, 2015) observée dans ces pathologies.

Les cellules immunitaires innées jouent un rôle clé dans la pathogénèse des MICI. En effet, la libération locale de motifs associés aux dommages (DAMP) ou PAMP suite à une lésion déclenche une inflammation intestinale (Nanini et al., 2018).

Chez les patients MICI, on observe un recrutement accru de macrophages pro-inflammatoires exprimant un niveau élevé du marqueur CD68, des molécules co-stimulatrices CD80, CD86 et du marqueur d'activation CD40 (Lissner et al., 2015a; J. Rugtveit et al., 1997). Ces macrophages ont une production augmentée de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF) et d'iNOS (Lissner et al., 2015a; J. Rugtveit et al., 1997), et surexpriment l'IL-12 et l'IL-23 *in vitro* en réponse à une simulation microbienne (Kamada et al., 2008). De la même manière, une accumulation de cellules dendritiques produisant une quantité significativement augmentée de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-12, TNF) a été décrite dans la *lamina propria* de patients atteints de MICI (Steinbach and Plevy, 2014). De manière intéressante, on retrouve chez les patients RCH une quantité plus importante de cellules NK produisant de grandes quantités d'IL-13 (Fuss et al., 2004).

Dans un second temps, l'inflammation initiée par les cellules immunitaires innées (présentation d'antigènes, production de cytokines) va induire une activation de la réponse adaptative. Les MICI sont caractérisées par une infiltration massive dans la muqueuse inflammée de cellules T CD4⁺ (Bouma and Strober, 2003). Comme décrit précédemment, ces cellules sont divisées en plusieurs sous-groupes parmi lesquels les cellules T helper Th1, Th2, Th17 et les cellules T

régulatrices Treg qui jouent un rôle clé dans la physiologie intestinale et dans la physiopathologie des MICI. En effet, la MC est associée à une réponse de type Th1 (forte production d'IFN- γ et de TNF) induite par la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-12 (Kobayashi et al., 2008; Sakuraba et al., 2009) tandis que la RCH est associée à une réponse Th2 (production d'IL-4 et d'IL-5) induite notamment par la production d'importantes quantités d'IL-13 (Fuss et al., 2004; Kobayashi et al., 2008). Les deux pathologies ont également été associées à une réponse de type Th17 (produisant de l'IL-17A, l'IL-17F et de l'IL-22) induite entre autre par la surproduction d'IL-23 (Díaz Peña et al., 2015; Kobayashi et al., 2008; Rovedatti et al., 2009). Les cellules Treg participent à la régulation de l'inflammation et à la tolérance immunitaire, et l'altération de leur activité est également impliquée dans la pathogenèse des MICI (Maul et al., 2005). Ces cellules produisent des cytokines anti-inflammatoires (telles que le TGF- β et l'IL-10) et expriment des molécules inhibitrices telles que le cytotoxique T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) (Mayne and Williams, 2013; Wing et al., 2019). Elles permettent également la suppression de la réponse Th17 mucoale via l'activation de l'expression du facteur de transcription ROR γ t (Ohnmacht et al., 2015). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré une diminution des cellules Treg dans le sang périphérique dans un modèle de colite murine au DSS et dans la muqueuse intestinale de patients atteints de MICI, tandis qu'une augmentation de la sécrétion de cytokines de type Treg améliore les symptômes des MICI (Acharya et al., 2018; Chamouard et al., 2009; Yu et al., 2019).

C - Prise en charge thérapeutique actuelle et challenges

L'origine multifactorielle des MICI rend l'identification d'une cible thérapeutique difficile. A ce jour, les seuls traitements disponibles sont à visée symptomatique et ont pour but de diminuer l'inflammation intestinale et de limiter les récives. Les traitements conventionnels comprennent les aminosalicylates (sulfasalazine (SASP), acide 5-aminosalicylique (5-ASA)), les corticostéroïdes, les immunosuppresseurs (principalement thiopurines (TPs), méthotrexate (MTX), inhibiteurs de calcineurine et inhibiteurs de Janus Kinase (JAK)) (Cai et al., 2021). De plus, ces dernières années ont vu le développement de différentes biothérapies (anti-TNF, anti-IL12/23, anti-intégrine) qui ont révolutionné l'approche thérapeutique des MICI (Marsal et al., 2022). Néanmoins, malgré l'amélioration des traitements proposés, une part non-négligeable des patients perdent l'efficacité du traitement au fur et à mesure de leur utilisation ou bien ne répondent tout simplement pas. De ce fait, la communauté scientifique s'accorde sur le fait d'un

besoin toujours présent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques répondant aux problématiques de prise en charge des patients atteints de MICI.

L'objectif de ces nouveaux traitements ne sera pas seulement d'induire et de maintenir la rémission des symptômes, ou de prévenir et de traiter les complications, mais également de favoriser une cicatrisation de la muqueuse (élimination de l'inflammation locale et restauration de la structure muqueuse normale) (Villablanca et al., 2022).

Les nouvelles pistes thérapeutiques dans le traitement des MICI regroupent la thérapie par aphérèse (absorption des cellules immunitaires), l'amélioration de la microécologie intestinale (traitements antibiotiques, probiotiques, transplantation fécale), la thérapie cellulaire (transplantation de cellules souches hématopoïétiques, mésenchymateuses ou embryonnaires) et la thérapie par exosomes (Cai et al., 2021).

IV - Modélisation de l'intestin *in vitro*

A - Généralités

Du fait que les pathologies inflammatoires intestinales telles que les MICI ont une prévalence importante et une incidence en augmentation dans de nombreux pays, et compte tenu de la nécessité de rationaliser l'utilisation de modèles animaux dans la recherche, il est nécessaire de développer des modèles reproduisant mieux les caractéristiques de l'intestin. Ces modèles pourront permettre de mieux comprendre la physiologie intestinale en condition d'homéostasie ou pathologique permettant ainsi le développement de nouveaux traitements.

Ces dernières décennies différents modèles *in vitro* ont été développés afin de modéliser l'intestin. Parmi ces derniers, les modèles utilisant des lignées cellulaires immortalisées (comme les cellules Caco-2, HT-29 ou HCT-116) sont largement utilisés. Ces modèles ont l'avantage d'être relativement simples à mettre en place, hautement reproductibles, et leur développement a permis l'identification d'un certain nombre d'événements clés impliqués dans le dialogue entre cellules intestinales. Néanmoins, ces cellules sont d'origine tumorale et peuvent donc présenter des altérations génétiques, métaboliques ou fonctionnelles qui modifient leur comportement par rapport aux cellules saines. De plus, ces modèles ne reproduisent pas l'architecture tissulaire retrouvée *in vivo* limitant ainsi la compréhension des procédés biologiques intestinaux.

Récemment, le développement des organoïdes intestinaux, des modèles tridimensionnels de cellules épithéliales reproduisant l'hétérogénéité cellulaire, la structure et les fonctions des tissus natifs a permis de mieux caractériser les événements clés impliqués dans le dialogue inter-cellulaire. Les organoïdes permettent de reproduire *in vitro* un organe simplifié possédant les caractéristiques tissulaires retrouvée *in vivo* (architecture, composition cellulaire, procédés biologiques) permettant ainsi de mieux comprendre le fonctionnement de l'organe mais également de mimer certaines pathologies. En outre, ces modèles ouvrent la perspective de faciliter la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques et le développement de traitements tout en limitant l'utilisation de modèles animaux.

B - Organoïdes intestinaux : production et caractéristiques

Début 2010, les organoïdes intestinaux ont été le premier type d'organoïdes à être développé à partir de cellules souches LGR5+ situées au fond des cryptes de l'intestin grêle (Sato et al., 2011a, 2009). Depuis, différents protocoles ont été développés pour différencier les organoïdes à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) (Frum and Spence, 2021) ou plus communément à partir de cellules souches multipotentes isolées et de cellules progénitrices présentes dans les cryptes intestinales (Ostrop et al., 2021; Qu et al., 2021) (Figure 13). Les organoïdes produits par la seconde méthode sont conventionnellement appelés entéroïdes lorsqu'ils sont produits à partir de l'intestin grêle et colonoïdes lorsqu'ils proviennent du côlon (Stelzner et al., 2012).

La première méthode pour générer des organoïdes a été développée par Spence et al. en 2011 et repose sur l'utilisation d'iPSC (Spence et al., 2011). Cette méthode est utilisée lorsque le tissu intestinal est limité, ou lorsque les procédures invasives ne sont tout simplement pas possibles (par exemple chez les patients). Ce protocole comprend plusieurs étapes : différenciation des iPSC en endoderme définitif, maturation de l'endoderme de l'intestin postérieur et formation de sphéroïdes qui bourgeonnent à partir de l'épithélium monocouche. Ces sphéroïdes bourgeonnants sont ensuite transférés dans des conditions de culture d'organoïdes (Mahé et al., 2014; Spence et al., 2011). Les organoïdes ainsi formés présentent des structures semblables à celles d'un intestin fœtal et ne reproduisent pas le processus de différenciation retrouvé dans l'intestin mature, ce qui limite leur utilisation pour l'étude des stades adultes de l'intestin (Spence et al., 2011). Néanmoins, ils reproduisent les stades de développement de l'intestin grêle fœtal et sont donc particulièrement adaptés à l'étude de ce processus (Wells and Spence, 2014). Il est également important de noter que des études récentes ont montré qu'au fil des cultures, les organoïdes continuent de mûrir, imitant ainsi le processus de développement de l'embryon au fœtus et à l'adulte (Kraiczy et al., 2019; Lewis et al., 2019; van der Hee et al., 2020). Contrairement aux entéroïdes, les organoïdes dérivés d'iPSC présentent des cellules mésenchymateuses avec l'épithélium, formant un microenvironnement cellulaire similaire à celui observé dans l'intestin. Cependant, cela peut également rendre plus difficile l'exploration des mécanismes moléculaires qui se produisent spécifiquement entre les cellules épithéliales intestinales (CEI). Pour résoudre ce problème, Mithal et al. ont récemment développé une nouvelle stratégie pour générer des organoïdes intestinaux humains dérivés d'iPSCs mais dépourvus de mésenchyme (Mithal et al., 2020).

La deuxième méthode permettant de générer des organoïdes est plus fréquemment utilisée par la simplicité du protocole et fait appel à des cellules souches provenant directement du tissu intestinal qui sont capables de se différencier en tous les types de cellules épithéliales intestinales. Pour produire les organoïdes, les cryptes sont d'abord isolées du tissu intestinal par digestion enzymatique et/ou par dissociation mécanique. Elles sont ensuite intégrées dans une matrice basale synthétique et cultivées dans un milieu contenant divers facteurs de croissance (EGF, noggin et R-spondine) permettant la prolifération et le maintien des cellules souches intestinales et des inhibiteurs qui augmentent la prolifération tout en empêchant l'apoptose des cellules (l'inhibiteur de la voie ROCK Y27632 et l'inhibiteur de la p38 Sb202190) (Sato et al., 2011a; Wu et al., 2016; Holmberg et al., 2017). Par rapport aux organoïdes dérivés d'iPSC, les entéroïdes reproduisent plus fidèlement l'architecture de l'intestin et les profils génétiques des différents types de cellules épithéliales intestinales présents chez l'adulte (Schuijers and Clevers, 2012). Les organoïdes produits par cette méthode contiennent des types de cellules uniquement dérivées des cellules souches intestinales, telles que les entérocytes, les progéniteurs absorbants et sécrétoires, les EEC, les cellules tuft, les cellules de Paneth et les cellules caliciformes (Taelman et al., 2022a).

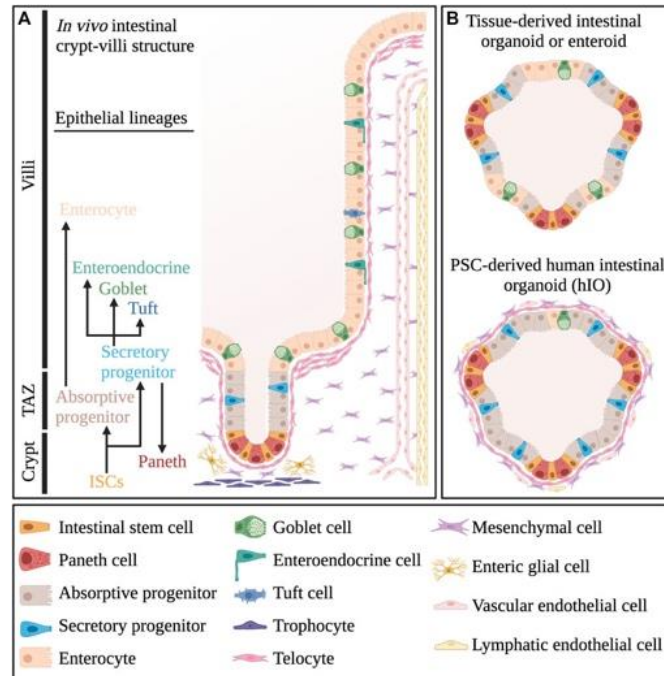


Figure 13 : Composition cellulaire des organoïdes intestinaux

A. Types cellulaires retrouvés dans la muqueuse intestinale. **B.** Composition cellulaires d'organoïdes dérivés de tissus (entéroïdes) ou d'organoïdes dérivés de cellules souches pluripotentes (hIOs). (Taelman et al., 2022b)

C - Modèles de co-culture d'organoïdes intestinaux

Les précédents modèles d'organoïdes permettent d'étudier la relation entre les cellules épithéliales intestinales en contextes physiologiques ou pathologiques. Néanmoins, afin d'aller plus loin dans la modélisation de l'intestin, il est intéressant d'ajouter d'autres types cellulaires non-épithéliaux qui interagissent avec les CEI tels que les cellules immunitaires ou stromales ou bien encore des bactéries du microbiote intestinal. Ces dernières années, plusieurs équipes ont décrit des modèles d'organoïdes intestinaux plus complexes incluant la co-cultures d'organoïdes avec d'autres types cellulaires ou bien des modèles de stimulation avec du milieu conditionné permettant ainsi de mieux comprendre l'interaction entre ces cellules et de perfectionner la modélisation de pathologies intestinales.

1. Cellules stromales

Les cellules stromales intestinales, telles que les fibroblastes et les myofibroblastes, sont situées dans la *lamina propria* et sont en contact étroit avec les cellules souches des cryptes intestinales. (Owens and Simmons, 2013). Les cellules stromales produisent diverses molécules qui sont essentielles à la fonctionnalité des CSI (maintien, prolifération et différenciation) (Göke et al., 1998; Harnack et al., 2019; Degirmenci et al., 2018; Kabiri et al., 2014). De plus, ces cellules sont impliquées dans la réparation tissulaire et en contexte pathologique dans l'apparition de la fibrose intestinale (Sagaradze et al., 2020). Par conséquent, l'utilisation de ces cellules dans des modèles intestinaux est pertinente. D'autant plus que, dans le contexte des MICI, la réparation tissulaire et la prévention de la fibrose auxquelles participent les fibroblastes sont des enjeux majeurs dans l'élaboration de nouveaux traitements.

Différentes études ont mis au point et caractérisé des modèles de co-culture utilisant des cellules stromales. Dans un modèle de co-culture murine, Moussa et al. ont récemment montré que les cellules stromales mésenchymateuses augmentaient la prolifération (nombre et taille) des organoïdes intestinaux en inhibant la voie BMP reproduisant ainsi les mécanismes observés dans le tissu natif (Moussa et al., 2020). Les myofibroblastes sous-épithéliaux intestinaux (ISEMF) sont connus pour réguler le comportement des cellules souches intestinales en sécrétant des facteurs de croissance tels que les ligands Wnt et les antagonistes BMP (Roulis and Flavell, 2016). Ainsi, deux études ont mis en évidence que la co-culture d'ISEMFs avec des organoïdes intestinaux humains permettait le développement d'organoïdes sans besoin d'ajout de facteurs de croissance supplémentaires, et améliorait même la croissance et la formation des

organoïdes (Lahar et al., 2011; Lei et al., 2014). Plus récemment, une équipe a réussi à produire ce qu'ils ont appelé des « assembloïdes » murins, c'est-à-dire des organoïdes de côlon entourés d'une couche de différents types de cellules stromales (Lin et al., 2023). Leur modèle reproduit l'architecture intestinale et le développement des cryptes matures (maintien des cellules souches/progénitrices et maturation en types de cellules sécrétrices/absorbantes). De plus, ils ont montré, comme cela a été décrit pour les modèles d'organoïdes intestinaux humains, que la supplémentation n'était pas nécessaire pour le développement des organoïdes (Lin et al., 2023). Comme décrit précédemment, outre leur rôle dans le maintien de la niche des cellules souches intestinales, les cellules stromales jouent également un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie et de la réparation des tissus (Owens and Simmons, 2013). Dans un contexte d'inflammation, les myofibroblastes sont activés et commencent à proliférer, ce qui entraîne la production de matrice extracellulaire (ECM) (Wynn, 2008). La fibrose intestinale, qui est un problème courant dans les MICI (>30% des patients atteints par la MC et environ 5% chez la patients RCH), est causée par un déséquilibre entre la production et la dégradation de la MEC (Latella et al., 2015; Rieder et al., 2017). Récemment, des progrès significatifs ont été réalisés dans la compréhension de la biologie des cellules stromales intestinales en utilisant des systèmes de culture 2D de cellules mésenchymateuses primaires isolées à partir d'intestins humains provenant de patients contrôles ou malades. Les organoïdes intestinaux humains semblent être un choix prometteur pour modéliser l'interaction entre les cellules stromales et épithéliales, car leur composition cellulaire leur permet de reproduire l'inflammation et la fibrose intestinales de manière plus précise que les modèles classiques utilisant des lignées cellulaires (Taelman et al., 2022a).

2. Cellules immunitaires

Comme décrit précédemment, plusieurs sous-ensembles de cellules immunitaires sont présents dans l'épithélium intestinal et la *lamina propria*, où ils peuvent moduler l'homéostasie tissulaire et permettent la mise en place de la réponse immunitaire en cas de lésions ou d'infections (Mowat and Agace, 2014). Ces dernières années, de nouveaux modèles ont été développés pour accroître la pertinence des modèles organoïdes dans les pathologies impliquant des cellules immunitaires telles que les maladies inflammatoires chroniques.

i. Monocytes et macrophages

Les macrophages apparaissent comme des acteurs centraux dans l'orchestration des réponses immunitaires, la réparation des tissus et le maintien de l'homéostasie tissulaire dans le microenvironnement intestinal (Delfini et al., 2022). Les progrès récents dans notre compréhension des interactions entre les cellules intestinales et les macrophages ont mis en lumière leur rôle dans de nombreux processus physiologiques et en conditions pathologiques (MICI, troubles métaboliques et infections) (Na et al., 2019).

Différents modèles ont ainsi été développés et incluent la co-culture d'organoïdes avec des macrophages provenant de lignées cellulaires ou des macrophages primaires.

Une équipe a mis en place un modèle qui utilise des micro-puits pour cultiver des organoïdes intestinaux avec des cellules RAW 264.7 (Kakni et al., 2022a). Dans leur modèle, les auteurs ontensemencé des gouttelettes de matrice extracellulaire synthétique contenant des organoïdes dans des micro-puits contenant des macrophages. De manière intéressante, la co-culture a induit un changement morphologique des organoïdes, les transformant en structures sphériques. Inversement, les cellules épithéliales semblent exercer un effet anti-inflammatoire sur les macrophages en réduisant la production de plusieurs cytokines inflammatoires (par exemple IL1 β , IL6, IL12, TNF- α) dans leur modèle de co-culture par rapport aux cellules RAW 264.7 seules. Ces résultats suggèrent que ce modèle est capable de reproduire la fonction immunomodulatrice des cellules épithéliales décrite *in vivo* (Kakni et al., 2022a).

A l'inverse du phénotype anti-inflammatoire des macrophages décrit dans l'étude précédente, une étude récente a montré que les monocytes du sang périphérique cultivés conjointement avec des organoïdes intestinaux humains migraient vers les cellules épithéliales pour interagir avec elles, adoptant ainsi un phénotype "intermédiaire" caractérisé par une augmentation des CD14, CD16 et du CMH II (Jose et al., 2020a).

Contrairement aux organoïdes cultivés en 3D, la culture d'organoïdes intestinaux monocouches sur des inserts perméables permet l'accès aux pôles basaux et luminaux de l'épithélium plus simplement. En 2017, Noel et al. ont décrit et caractérisé un système dans lequel un épithélium dérivé d'organoïdes a été co-cultivé avec des macrophages dérivés de monocytes humains fraîchement isolés situés de l'autre côté de l'insert perméable (Noel et al., 2017a). Dans ce modèle, les macrophages interagissent et communiquent avec l'épithélium par l'intermédiaire de projections cytoplasmiques, renforçant la fonction de barrière intestinale en augmentant la hauteur de la monocouche et en améliorant les valeurs de résistance transépithéliale (TER). Ces améliorations persistent lors d'une infection par *Escherichia coli* entérotoxigène. En effet,

bien que les valeurs TER aient diminué lors de l'infection, elles se sont partiellement rétablies en présence de macrophages. En outre, les auteurs ont décrit une clairance phagocytaire avide des bactéries par les extensions dendritiques transépithéliales, ce qui correspond à la détection et au piégeage de l'antigène luminal. De manière intéressante, l'augmentation de la production par les macrophages de cytokines pro-inflammatoires (IL-8 et IFN- γ) en réponse à l'infection ne s'est pas produite lorsque les macrophages étaient co-cultivés avec l'épithélium (Noel et al., 2017a).

Un des enjeux dans le développement de nouveaux traitements pour les MICI est la limitation des phénomènes de fibrose intestinale. Lors de la fibrose intestinale, un phénomène appelé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) se met en place et induit la transformation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses qui vont produire de grandes quantités de matrice extra-cellulaire participant ainsi au développement de la fibrose (Kalluri and Weinberg, 2009). A ce jour, peu de modèles sont disponibles pour étudier ce phénomène et ceux disponibles présentent des limites. Hahn et al. en 2017 ont proposé un modèle de TEM utilisant la lignée cellulaire de macrophages murins RAW 264.7 cultivés sur des inserts pouvant être mis en contact avec des organoïdes intestinaux (Hahn et al., 2017a). Dans ce modèle la TEM induite par l'ajout dans le milieu de culture des organoïdes de TGF- β 1 semble agir de manière synergique avec le TNF- α produit par les macrophages augmentant ainsi le pourcentage de cellules mésenchymateuses.

L'ensemble de ces études confirment qu'il existe une interaction importante entre les macrophages et les cellules épithéliales intestinales. Cela souligne l'importance des modèles cellulaires incluant les cellules immunitaires pour mieux reproduire et comprendre la physiologie intestinale.

ii. Autres types cellulaires : cellules dendritiques et lymphocytes

Dans l'intestin, les cellules dendritiques sont situées dans la sous-muqueuse où elles sont responsables de l'absorption, du traitement et de la présentation des antigènes aux cellules T afin de stimuler une réponse immunitaire adaptative tout en maintenant la tolérance immunitaire vis-à-vis du microbiote intestinal. Lorsqu'elles perçoivent une perturbation de l'homéostasie tissulaire, elles subissent une maturation qui leur permet de sécréter des cytokines essentielles à l'activation et à la polarisation des lymphocytes T (Patente et al., 2019). Des modèles de co-culture ont été développés et ont permis de mettre en évidence l'interaction entre les cellules dendritiques et les organoïdes comme l'illustre le travail d'Ihara et al. qui ont

démontré que les ligands de Notch (Jagged 1 et 2) produits par les DC impactaient la croissance et la maturation des organoïdes (Ihara et al., 2018).

Les lymphocytes jouent un rôle clé dans l'immunité intestinale et participent également au développement de pathologies telles que les MICI. De plus, leur étude est pertinente dans la compréhension de la physiologie intestinale et dans le développement de nouvelles pistes thérapeutiques. Dans le contexte de la maladie de Crohn, Hammoudi et al. ont développé un modèle autologue innovant impliquant la co-culture de lymphocytes T muqueux avec des organoïdes iléaux provenant de patients humains afin d'étudier l'interaction entre ces cellules (Hammoudi et al., 2022). Ils ont tout d'abord montré que les lymphocytes et les cellules épithéliales interagissaient dans leur modèle. En outre, les cellules T de patients atteints de la maladie de Crohn, lorsqu'elles sont stimulées par le LPS, induisent une plus grande cytotoxicité contre les cellules épithéliales autologues que les patients témoins via une voie NKG2D- et CD103-dépendante (Hammoudi et al., 2022). Ces résultats soulignent l'importance des modèles intégrés pour étudier les interactions cellule-cellule dans des pathologies telles que les MICI.

Contexte et objectifs du projet de recherche

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin représentent un enjeu majeur du XXI^e siècle avec une prévalence importante et une incidence en constante augmentation dans de nombreux pays. De plus, un nombre non-négligeable de patients ont une prise en charge thérapeutique insuffisante ou ne répondent pas de manière satisfaisante aux traitements actuels. Par exemple, dans le cadre de la thérapie par anti-TNF, des études suggèrent qu'une non-réponse primaire arriverait dans 10 à 40% des cas et qu'une perte de réponse au cours du temps pourrait arriver dans jusqu'à 50% des cas (Marsal et al., 2022). De ce fait, il y a un besoin important de continuer à développer de nouveaux traitements et de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques. Parmi les pistes prometteuses, le ciblage des macrophages semble pertinent au vu de leur rôle dans la physiologie intestinale (Na et al., 2019). En outre, différentes études suggèrent un lien de causalité entre les MICI et un défaut dans la différenciation des monocytes vers les macrophages pro-résolutifs. En effet, les monocytes circulants de patients atteints de la MC semblent présenter une sécrétion excessive de TNF et d'IL-23 associée à une perturbation de la réponse précoce à l'invasion bactérienne (Glasser and Darfeuille-Michaud, 2008; Kamada et al., 2008; Mazlam and Hodgson, 1992; Radwan et al., 2010; Schwarzmaier et al., 2013). Une altération de la morphologie, de l'expression de marqueurs de surface ainsi que de la fonctionnalité (survie des bactéries intracellulaires prolongée, induction accrue de la voie Th17) des macrophages coliques a également été décrite dans la MC (Dige et al., 2016; Ogino et al., 2013). De manière intéressante, plusieurs études suggèrent que la thérapie anti-TNF (influximab) agirait grâce aux macrophages régulateurs producteurs d'IL-10 et qu'une induction de ces macrophages serait également observée chez les patients présentant une cicatrisation muqueuse suite au traitement (Koelink et al., 2020; Vos et al., 2012). Ainsi, ces données pointent le rôle crucial des macrophages dans le développement et la résolution de l'inflammation des MICI et renforcent l'intérêt d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de différenciation des macrophages au niveau intestinal.

Parmi les acteurs participant à la régulation de la différenciation des macrophages, on retrouve l'épithélium intestinal qui, via la production de médiateurs solubles tels que des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance (TSLP, IL-10, IL25, TGF- β , ...) induit la polarisation des macrophages vers un phénotype régulateur (W. Chen et al., 2022). De manière intéressante,

différentes études ont montré qu'un défaut de fonctionnalité de l'épithélium colique était un des facteurs clé du développement de la RCH (Kobayashi et al., 2020). En effet, chez des patients atteints de la RCH, l'épithélium intestinal présente des altérations de gènes impliqués dans la fonctionnalité de la barrière intestinale (Graham and Xavier, 2020). Au niveau physiologique, on retrouve un défaut de production de mucus dans le côlon avec une diminution de la synthèse des composants principaux du mucus MUC2 et FCGBP corrélée à un défaut de fonctionnalité des cellules caliciformes (van der Post et al., 2019). Les jonctions serrées entre les cellules épithéliales sont également perturbées chez ces patients favorisant la perméabilité de l'épithélium intestinal (Martini et al., 2017). Enfin, les précédents travaux du laboratoire ont montré que les colonocytes de patients atteints de RCH présentent un défaut d'expression du récepteur PPAR γ en lien avec leur incapacité à produire du cortisol intestinal (Bouguen et al., 2015; Dubuquoy et al., 2003). Cette dysfonction impacte également l'expression de certaines cytokines par l'épithélium colique, telle que la TSLP (Martin Mena et al., 2017). L'ensemble de ces données montre clairement un défaut de fonctionnalité de l'épithélium intestinal chez les patients atteints de RCH. Néanmoins, les conséquences de ce défaut de fonctionnalité sur la différenciation des macrophages n'ont pas encore été explorées.

Pour étudier cet aspect, l'utilisation de modèles cellulaires reproduisant le dialogue entre cellules épithéliales est nécessaire. Avec la démocratisation de l'utilisation des organoïdes, de nouveaux modèles ont émergé utilisant des organoïdes intestinaux mis en contact de manière directe ou indirecte avec des macrophages afin de permettre d'étudier le lien entre l'épithélium intestinal et les macrophages. Jusqu'à présent, les différents modèles existants se sont majoritairement concentrés sur l'intestin grêle, étudiant très peu le côlon qui est pourtant un organe à part entière qui se distingue de l'intestin grêle par son architecture, sa composition cellulaire et sa physiologie (Kromann et al., 2024). Le développement et la caractérisation d'un modèle utilisant des organoïdes de côlon et des macrophages sont donc nécessaires d'autant plus que la RCH touche uniquement cette partie du tube digestif, ne s'étendant jamais à l'intestin grêle. De plus, des études récentes ont montré que, comme attendu, les modifications génétiques observées chez les patients étaient également retrouvées dans les organoïdes, et que les modifications épigénétiques étaient également maintenues dans ces cellules (Dotti et al., 2017; Lucafò et al., 2022) venant confirmer le fait que le modèle organoïde se positionne de manière pertinente pour étudier cette pathologie.

C'est donc dans ce cadre que le projet développé au cours de cette thèse s'est inscrit et avait pour objectif d'explorer l'interaction entre cellules épithéliales et macrophages en s'appuyant sur la culture d'organoïdes issus de côlon (colonoïdes).

L'objectif principal de ce projet a été de développer un modèle de stimulation de macrophages par du milieu conditionné provenant d'organoïdes coliques afin d'étudier l'effet des facteurs solubles produit par l'épithélium colique sur les macrophages.

Dans un premier temps, des organoïdes coliques murins et des macrophages de lignée (RAW 264.7) ont été utilisés. L'effet du traitement par le milieu conditionné sur la polarisation des macrophages a été évalué par RT-qPCR en ciblant différents gènes d'intérêt pour discriminer les états de polarisation des macrophages.

Dans un deuxième temps, les effets observés ont été confirmés, puis étudiés plus en détail, chez des macrophages primaires dérivés de moelle osseuse. Ces macrophages présentent l'avantage d'être plus représentatifs de ceux retrouvés dans l'intestin qui est un organe ouvert possédant un renouvellement constant des macrophages résidents à partir de monocytes circulants provenant de la moelle osseuse. L'état de polarisation des macrophages suite au traitement par le milieu conditionné a été étudié aux niveaux génique et protéique. Le transcriptome des macrophages a également été analysé et comparé à celui de macrophages pro-résolutifs (macrophages M2a induits par IL-4/IL-13) afin d'apprécier de manière plus globale l'effet du milieu conditionné.

Enfin, la dernière partie du projet a consisté à transposer le modèle utilisé chez l'Homme. Ce modèle de stimulation a été réalisé en utilisant des organoïdes provenant de pièces opératoires coliques de patients (contrôles ou RCH) ainsi que des macrophages dérivés de monocytes du sang circulant (donneurs sains). L'effet du traitement par les différents milieux conditionnés obtenus a de nouveau été étudié au niveau génique et protéique afin d'évaluer la capacité des cellules épithéliales primaires humaines à instruire une polarisation des macrophages et si un défaut de cette polarisation pouvait être observé avec les échantillons issus des patients atteints de RCH

Les données présentées dans la suite de ce manuscrit sont en partie issues de l'article intitulé « **Relevance of mouse and human IBD patients-derived colon organoids to investigate intestinal macrophage differentiation** » qui est actuellement en révision auprès du Journal of Leukocyte Biology (JLB) et qui a été retravaillé en français pour les besoins de la rédaction de cette thèse. La version originale de l'article est disponible en annexe.

Matériels et méthodes

I - Déclaration éthique

Le comité d'éthique de l'expérimentation animale a approuvé le protocole expérimental pour les animaux (APAFIS#40805-2023020311123046 v4).

Pour les expériences avec des échantillons humains, un comité d'éthique local (Comité de Protection des Personnes Nord-Ouest IV, CHRU Lille, France) a approuvé l'étude et tous les sujets ont donné leur consentement éclairé (No. DC-2008-642). Des échantillons coliques chirurgicaux ont été prélevés chez des patients ayant un diagnostic établi de RCH selon les critères internationaux (côlon sigmoïde (n=3) ; côlon droit (n=3) ; côlon gauche (n=4)) et chez des patients témoins (patients opérés pour un cancer colorectal (n=4) et patients opérés pour une diverticulite du côlon sigmoïde (n=1)). Les cryptes coliques ont été isolées à partir d'une résection colique dans une zone non-inflammatoire ou macroscopiquement saine du tissu pour générer des organoïdes.

II - Préparation des organoïdes

A - Organoïdes murins

Les côlons ont été prélevés sur des souris mâles C57BL/6 (Janvier-labs) âgées de 7 semaines après euthanasie par dislocation cervicale. Après l'isolement, le côlon a été rincé deux fois avec du PBS 1X, suivi d'un lavage rapide avec de l'éthanol et enfin avec du PBS 1X à nouveau. Le côlon a ensuite été coupé en morceaux de 2 mm et placé dans un tube conique contenant 15 ml de PBS + DTT (10 mM). Les morceaux d'intestin ont ensuite été agités par aspiration et refoulement trois fois avec une pipette avant que le surnageant ne soit éliminé. Les échantillons ont ensuite été transférés dans un tube contenant 30 ml de PBS + EDTA (8 mM) et incubés sous agitation à 4°C pendant 1 heure. Enfin, après avoir retiré le surnageant, 10 ml de PBS ont été ajoutés avant de pipeter à nouveau le contenu du tube pour séparer les cryptes des morceaux d'intestin. Le surnageant contenant les cryptes a ensuite été filtré à travers un filtre de 70 µm. Après une dernière centrifugation à 70 g pendant 5 minutes, 10 mL de DMEM ont été ajoutés au culot et les cryptes ont été comptées. Pour produire des organoïdes, les cryptes ont été mélangées avec du Matrigel (Corning, réf. 356234) dilué à un ratio de 2 : 1 dans du milieu de culture afin d'obtenir 1000 cryptes par 30 µL de Matrigel dilué (= 1 dôme). Le mélange a ensuite été ajouté goutte à goutte dans des plaques de 24 puits traitées pour la culture tissulaire.

Après polymérisation du Matrigel à 37°C et 5% CO₂ pendant 15 min, un milieu de culture composé de milieu Advanced DMEM/F-12 (Gibco, réf. 12634010) + Glutamax 1X (Gibco, réf. 35050-038) + 50% de milieu conditionné L-WRN + 10% de sérum bovin fœtal (SVF) + 1% de pénicilline/streptomycine (P/S) + 1% d'amphotéricine B (Gibco, réf. 15290026) a été ajouté dans les puits contenant les dômes de Matrigel. Les inhibiteurs Y-27632 (Tocris, réf. 1614) et SB-431542 (Tocris, réf. 1254) ont également été ajoutés au milieu de culture pendant les deux premiers jours de culture. Le milieu a été renouvelé tous les 2 jours. Le passage des organoïdes a été réalisés tous les 5-7 jours en utilisant le réactif de dissociation TrypLE (Gibco, réf. 12604-013).

B - Organoïdes humains

Des cultures d'organoïdes humains ont été établies à partir de tissus coliques prélevés après une intervention chirurgicale chez des patients témoins (cancer, diverticulite) ou des patients atteints de RCH. La première étape a consisté à séparer la muqueuse de la sous-muqueuse à l'aide de ciseaux. La muqueuse a ensuite été découpée en morceaux de 4 mm² et placée dans une solution de chélation (Na₂ HPO₄ 5,6 mM, KH₂ PO₄ 8 mM, NaCl 92,2 mM, KCl 1,6 mM, saccharose 43,4 mM, D-sorbitol 54,9 mM) + DTT 0,5 mM. Après avoir agité les morceaux d'intestin par aspiration/refoulement avec une pipette, le surnageant a été remplacé par un milieu contenant 0,5 mM d'EDTA et le tube a été incubé pendant 1 heure à 4°C sous agitation. Enfin, le surnageant a été jeté et remplacé par une solution de chélation + 20 % de SVF. Les échantillons ont été agités par aspiration/refoulement avec une pipette plusieurs fois pour séparer les cryptes du tissu. Les surnageants contenant les cryptes ont ensuite été collectés, filtrés à travers un filtre de 100 µm et centrifugés à 300 g pendant 5 min à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot a été lavé une fois avec de l'Advanced DMEM/F12 (Gibco, réf. 12634-010). Les cryptes ont été comptées puis incluses dans du Matrigel dilué à un ratio de 2 : 1 avec du milieu de culture Intesticult® humain (Stemcell, réf. 06010) afin d'obtenir 1000 cryptes par 30 µL de Matrigel dilué. Après polymérisation à 37°C et 5% de CO₂ pendant 15 minutes, du milieu de culture Intesticult a été ajouté aux puits contenant les dômes. Comme pour les organoïdes murins, les inhibiteurs Y-27632 et SB-431542 ont été ajoutés pendant les 2 premiers jours de culture et le milieu a été changé tous les 2 jours. Le passage des organoïdes a été effectué tous les 7 à 9 jours de culture en utilisant le réactif de dissociation TrypLE.

C - Milieu conditionné produit à partir d'organoïdes (OCM)

Les organoïdes coliques murins et humains utilisés dans cette étude étaient au passage 6 à 9 lorsque le milieu conditionné a été prélevé. Le milieu conditionné a été prélevé au 7^{ème} jour de culture pour les organoïdes de souris et au 7^{ème} à 9^{ème} jour pour les organoïdes humains (selon le patient, la croissance des organoïdes et donc le moment du prélèvement peut changer). Le milieu conditionné était un milieu de culture d'organoïdes vieux de 48 heures qui a ensuite été filtré à travers un filtre de 0,22 µm. En raison de la variation du temps de collecte, tous les milieux ont été congelés à -20°C avant d'être utilisés.

III - Cultures cellulaires

A - Cellules L929

Après décongélation, 2×10^6 cellules L929 ont étéensemencées dans une flasque de culture cellulaire de 150 cm² contenant du milieu de culture DMEM + 10% SVF + 1% P/S, incubées à 37°C et 5% CO₂ jusqu'à atteindre 70% de confluence. Le passage des cellules a ensuite été réalisé par rinçage avec du PBS 1X avant de traiter les cellules avec de la trypsine et de les incuber à 37°C pendant 5 minutes. Après avoir arrêté l'effet de la trypsine en ajoutant du milieu de culture frais, les cellules ont été centrifugées à 500g pendant 5 minutes pour éliminer le surnageant avant d'être divisées en 4 nouvelles flasques. Ce processus a été répété une seconde fois pour obtenir le nombre de flasques désiré. Après le dernier passage, les cellules ont été cultivées pendant 10 jours pour produire le milieu conditionné. Au jour 10, le milieu a été collecté, centrifugé à 1000 g pendant 5 minutes pour éliminer les débris, et le surnageant a été filtré à travers un filtre de 0,22 µm. Le milieu conditionné a ensuite été conservé à -80°C avant utilisation.

B - Cellules L-WRN

Après décongélation, 2×10^6 cellules L-WRN ont étéensemencées dans une flasque de culture de 150 cm² contenant du milieu de culture DMEM + 10% SVF + 1% P/S et incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 24 heures. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par du milieu de culture frais contenant de la généticine (Sigma-Aldrich, réf. G8168) et de l'hygromycine B (Invitrogen, réf. ant-hg-1). Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 2-3 jours pour

atteindre la confluence. Le passage des cellules a ensuite été réalisé par la méthode classique de la trypsine décrite ci-dessus et réparties dans 5 nouvelles flasques contenant du milieu de culture sans généticine et sans hygromycine B, qui ont été incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 3-4 jours. Lorsque les cellules ont atteint une sur-confluence (certains agrégats cellulaires commencent à se détacher du tapis cellulaire), les cellules ont été rincées et le milieu a été remplacé par un milieu de culture contenant de l'Advanced DMEM/F-12 + Glutamax + 20% SVF + 1% P/S et incubé à 37°C, 5% CO₂ pendant 1 jour. Le milieu de culture conditionné a été collecté, centrifugé à 2000g pendant 8 minutes, puis filtré à travers un filtre de 0,22µm et du milieu frais a été ajouté dans les flasques. Cette procédure de récolte a été répétée chaque jour pendant 4 jours afin de produire un lot de milieu conditionné L-WRN.

C - Cellules RAW 264.7

La lignée cellulaire murine de macrophages RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) a été cultivée jusqu'à confluence dans du DMEM + 10% SVF + 1% P/S dans des flasques de 150 cm². Les passages ont été réalisés tous les 5 jours en détachant les cellules à l'aide d'un grattoir. Pour les expériences de stimulation des cellules par de l'OCM, les cellules ont étéensemencées dans des plaques de culture 24 puits à une densité de 3 x 10⁵ cellules par puits et ont pu adhérer au fond du puits pendant une nuit avant l'expérience.

D - Cellules BMDM

Les macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris (BMDM) ont été obtenus comme suit : les cellules de la moelle osseuse ont été isolées à partir du fémur et du tibia de souris mâles C57BL/6 âgées de 7 semaines (Janvier-labs), puis filtrées à travers un filtre de 70 µm avant la lyse des érythrocytes par traitement avec du tampon de lyse des globules rouges (Invitrogen, réf. 00-4333) pendant 1 minute, conformément aux recommandations du fabricant. Les cellules ont ensuite étéensemencées dans une flasque de 75 cm² à une densité de 1,5 x 10⁷ cellules dans 15 mL de DMEM + 10% SVF + 20% milieu conditionné L929. Le deuxième jour, le milieu a été changé et le jour 5, les cellules ont été réparties dans deux nouvelles flasques pour permettre leur prolifération. Au 7ème jour, les cellules sont prêtes à être utilisées. Pour les expériences de stimulation des cellules par de l'OCM, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 1,5 x 10⁵ cellules par puits et ont pu adhérer au fond du puits pendant une

nuît avant l'expérience. La polarisation des macrophages en M2 a été réalisée en incubant les cellules avec 20 ng/mL d'IL-4 et d'IL-13 pendant 24h.

E - Cellules hMDM

Les macrophages dérivés de monocytes humains (hMDMs) ont été obtenus comme suit : les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées à partir d'échantillons de sang frais (< 24h) de donneurs sains achetés auprès de l'Établissement français du sang (EFS). Les échantillons de sang ont été homogénéisés puis dilués au 1 : 1 dans du milieu RPMI (Gibco, réf. 21875034). Les échantillons ont ensuite été placés sur un Pancoll (Pan-biotech, réf. P04-60500) à un ratio de 2 : 1 et centrifugés à 400 g pendant 30 minutes à température ambiante (TA) avec une accélération de 4 et sans frein. Les anneaux de PBMC ont ensuite été collectés et transférés dans des tubes contenant du milieu RPMI et centrifugés à 400 g pendant 7 minutes à température ambiante. Les cellules ont été lavées une fois avec du RMPI et centrifugées dans les mêmes conditions que précédemment. Les monocytes ont ensuite été comptés en utilisant un marquage avec des anticorps dirigés contre le CD45 et le CD14 couplés à un fluorochrome sur un cytomètre DXFlex (Beckman Coulter) (liste des anticorps dans le tableau « hMDM Analyse FACS » dans la partie « VII – Analyse protéique des macrophages » et la sous-partie « C – Cytométrie en flux » page 77). Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont étéensemencés dans des plaques de culture 12 puits contenant du RPMI en utilisant le comptage précédent pour s'assurer que $3,5 \times 10^5$ monocytes étaient présents dans chaque puits. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 1 heure pour permettre aux monocytes d'adhérer. Les cellules ont ensuite été délicatement lavées trois fois avec du milieu RMPI frais pour éliminer les cellules non-attachées avant que du RPMI + 10% SVF + 1% P/S contenant 20 µg/mL de M-CSF (R&D Systems, réf. 216-MC) ne soit ajouté aux puits. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C, 5% CO₂. Au jour 3, les cellules ont été lavées trois fois avec du RPMI, et le milieu a été remplacé par du milieu de culture sans M-CSF. Au jour 6, les cellules ont été lavées juste avant les expériences de stimulation avec l'OCM.

IV - Expériences de stimulation par l'OCM

Pour les expériences de stimulation, des macrophages (RAW 264.7, BMDM, hMDMs)ensemencés dans des plaques 12 ou 24 puits ont été exposés à de l'OCM +/- LPS (100 ng/mL) pendant 6 ou 24 heures. Des milieux de culture n'ayant pas été en contact avec les organoïdes ont été utilisés comme contrôles. Pour les expériences sur les BMDM, tous les milieux utilisés

(milieu témoin ou OCM) ont été dilués avec 20% de milieu conditionné L929. Après stimulation, les cellules ont été lavées une fois avec du PBS 1X et utilisées pour les différentes analyses.

V - Quantification de l'élongation des macrophages

Pour l'examen de la morphologie des BMDM, les cellules ont été photographiées à l'aide d'un microscope Leica DMIL LED avec une caméra K3 (Leica) à un grossissement de 10X. L'élongation des macrophages a été quantifiée en mesurant la longueur et la largeur de chaque cellule sur 5 et 6 champs dans deux expériences indépendantes à l'aide du logiciel ImageJ2. Le facteur d'élongation a ensuite été calculé pour chaque cellule et représente la longueur divisée par la largeur. La moyenne des valeurs pour chaque champ a ensuite été calculée et représentée graphiquement.

VI - Analyse transcriptionnelle par RT-qPCR

A - Extraction et rétrotranscription de l'ARN

Les échantillons ARN ont été isolés soit avec le kit d'extraction d'ARN NucleoSpin (Machery-Nagel réf. 740955) pour les RAW 264.7, soit avec le kit NucleoSpin RNA XS plus (Machery-Nagel réf. 740990) pour les BMDM et les hMDMs, selon les instructions du fabricant. Le fluoromètre Qubit 3 (Invitrogen) et le kit RNA Broad range assay (Invitrogen, réf. Q10211) ont été utilisés pour doser les échantillons d'ARN. L'ARN total a été converti en ADNc à l'aide du cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, réf. 4368814) conformément aux instructions du fabricant.

B - PCR quantitative en temps réel et analyse

Les tests PCR quantitatifs ont été réalisés à l'aide du Fast SYBR Green Mix (Applied Biosystems, réf. 4385612) et de l'instrument Quantstudio 3 (Applied Biosystems). L'analyse des signaux qPCR a été réalisée à l'aide de la méthode de quantification relative ΔC_t en utilisant la GAPDH comme gène de référence.

Amorces oligonucléotidiques murines		
	Séquences	
Gènes	Sens 5'-3'	Antisens 5'-3'
<i>Mrc1</i>	GTTCACCTGGAGTGATGGTTCTC	AGGACATGCCAGGGTCACCTTT
<i>Cd163</i>	GGCTAGACGAAGTCATCTGCAC	CTTCGTTGGTCAGCCTCAGAGA
<i>Cd14</i>	CCCAAGCACACTCGCTCAAC	GGAGGGTCGGGAACCTGAGG
<i>iNOS</i>	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG
<i>Arg1</i>	CATTGGCTTGCGAGACGTAGAC	GCTGAAGGTCTCTTCCATCACC
<i>Cd36</i>	GGCCAAGCTATTGCGACA	CAGATCCGAACACAGCGTAGA
<i>Cd51</i>	GTTGGATCGTGTTTTTCAGA	TCCCACTAGCTGCACTTTCGT
<i>Slc40a1</i>	GGCATAAGGCTGTTGTGCTT	TCATGACACCAGGCGTTCTG
<i>Klf10</i>	AGTGACTTTGAAGCGGTGGA	AAGGTGCGTTAAACAAAATGC
<i>Ror-alpha</i>	TTCCATGCAAGATCTGTGGAGAC	TGCAGCCTTCACACGTAAT
<i>Tlr2</i>	GCGGACTGTTTCCTTCTGAC	CCAAAGAGCTCGTAGCATCC
<i>Tnf-alpha</i>	CCTGTAGCCACGTCGTAG	GGGAGTAGCAAGGTACAACCC
<i>Il-12p40</i>	GGAAGCACGGCAGCAGAAT	GGCGGGTCTGGTTTGATG
<i>IL-6</i>	CTTCACAAGTCGGAGGCTTA	TTCTGCAAGTGCATCATCGT
<i>Villin-1</i>	ATGACTCCAGCTGCCTTCTCT	GCTCTGGGTTAGAGCTGTAAG
<i>Muc-2</i>	ATGCCACCTCCTCAAAGAC	GTAGTTTCCGTTGGAACAGTGAA
<i>Lgr5</i>	CAGCGTCTTCACCTCCTACC	TGTGTCAAAGCATTTCCAGC
<i>TFF3</i>	TCTGGCTAATGCTGTTGGTG	ATGTGACAGAGGGGTAGCCA
<i>GAPDH</i>	ATGGGAAGCTTGTCATCAACG	GGCAGTGATGGCATGGACTG

Amorces oligonucléotidiques humaines		
	Séquences	
Gènes	Sens 5'-3'	Antisens 5'-3'
<i>Tnf-alpha</i>	ATCAATCGGCCCCGACTATCTC	ACAGGGCAATGATCCCAAAGT
<i>IL-1beta</i>	CCACAGACCTTCCAGGAGAATG	GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG
<i>IL12-p40</i>	GACATTCTGCGTTCAGGTCCAG	CATTTTTGCGGCAGATGACCGTG
<i>IL-6</i>	CTGCAGCCACTGGTTCTGT	GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA
<i>Ccl19</i>	CCAACTCTGAGTGGCACCAA	TGAACACTACAGCAGGCACC
<i>Cxcl11</i>	TTAAACAAACATGAGTGTGAAGGG	CGTTGTCCTTTATTTTCTTTCAGG
<i>Cd51</i>	GACGAGAAGCAACCCTTCAG	CCCAGAGCAGAGGTTGTCTC
<i>GAPDH</i>	GACACCCACTCCTCCACCTTT	TTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT

VII- Analyses protéiques des Macrophages

A - Analyse par immunofluorescence

Les BMDM ont été fixés pendant une nuit à 4°C avec du paraformaldéhyde tamponné 4% (Microm Microtech, réf. 40877-36), lavés deux fois avec du PBS et perméabilisés pendant 5 minutes avec du PBS + 0,1% de Triton 100X (Sigma-aldrich, réf. X100). Les sites de liaison non-spécifiques ont été bloqués par incubation dans du PBS + SVF 10% pendant 30 minutes à

température ambiante. Les macrophages ont été marqués avec un anticorps primaire anti-iNOS dans du PBS pendant une nuit à 4°C, puis lavés trois fois avec du PBS + 0,1% Tween20 (Fisher, réf. BP337) et une fois avec du PBS avant d'être marqués avec un anticorps secondaire couplé à la GFP, du DAPI et de la phalloïdine dans du PBS pendant 1 heure à température ambiante. Enfin, les macrophages ont été lavés deux fois dans du PBS et visualisés avec un microscope CD7 (Zeiss) à un grossissement de 20X. Le traitement des images a été effectué à l'aide du logiciel Zen (Zeiss) et d'ImageJ2.

Anticorps et réactifs fluorescents		
	référence	dilution
iNOS	ab178945 (abcam)	1/1000
Anticorps secondaire GFP	E-AB-1103 (Elabscience)	1/200
Phalloïdine	A12381 (Invitrogen)	1/400
DAPI	D9542 Sigma-Aldrich	1/10000

B - Western blot

Les cellules RAW 264.7 ont étéensemencées dans une plaque 24 puits à une densité de 3×10^5 cellules par puits et ont pu adhérer au fond du puits pendant une nuit avant l'expérience. Les cellules ont ensuite été exposées à l'OCM +/- LPS (100 ng/mL) pendant 15 minutes, lavées avec du PBS et lysées dans un tampon RIPA (Merck, réf. 20-188) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma-Aldrich, réf. P8340) pendant 1 heure sur de la glace. Les lysats ont ensuite été centrifugés à 11000 g pendant 5 minutes à 4°C et le surnageant contenant les protéines a été recueilli. La concentration en protéines a été déterminée à l'aide du kit Qubit Protein Assay (Invitrogen, réf. Q33211). Les protéines ont été dénaturées dans un tampon de Laemmli SDS (Alfa Aesar, réf. J60015) à 100°C pendant 5 minutes. Les échantillons de protéines (30 µL) ont été séparés sur un gel de Tris-glycérine à 12% (Invitrogen, réf. XP001120BOX), puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a ensuite été bloquée dans du PBS 5% de lait + 0,1 % de tween pendant 1 heure sous agitation à température ambiante. La membrane a ensuite été rincée trois fois avec du PBS + 0,4 % Tween20 pendant 5 minutes sous agitation avant d'être incubée avec l'anticorps primaire pendant une nuit à 4°C sous agitation. La membrane a ensuite été rincée trois fois avant l'ajout de l'anticorps secondaire pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage, la membrane a été incubée avec le réactif Novex ECL (Invitrogen, réf. WP20005) sous agitation à température ambiante et dans l'obscurité pendant 10 minutes. Les résultats ont été lus sur

l'appareil d'imagerie Fusion FX (Vilber). L'intensité des signaux a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ2.

Anticorps pour Western blot		
	référence	dilution
I κ B α	ab32518 (abcam)	1/2000
Bêta-actine	15G5A11/E2 (Invitrogen)	1/2000
IgG-HRP anti-souris	#7076 (Cell signaling technology)	1/10000
Anti-lapin-HRP	20402 (Biotium)	1/10000

C - Cytométrie en flux

Les cellules ont été récoltées à l'aide d'un grattoir et lavées dans du PBS 1X, puis transférées dans un tube conique contenant 100 μ L de PBS + 2% SVF par million de cellules et incubées pendant 10 min à 4°C. Après incubation, les cellules ont été centrifugées à 500 g pendant 8 minutes à 4°C. Le surnageant a ensuite été éliminé avant que le mélange d'anticorps ne soit ajouté à un volume final de 20 μ L par échantillon. Les cellules ont été incubées pendant 25 minutes à 4°C dans l'obscurité. 50 μ L de solution de lyse BD FACS (Fisher, réf. 10141013) ont ensuite été ajoutés à chaque échantillon pour les fixer. Après 5 minutes à température ambiante dans l'obscurité, les cellules ont été lavées dans du PBS 1X, centrifugées à 500 g pendant 8 minutes à 4°C et 300 μ L de PBS ont été ajoutés à chaque échantillon. Les cellules ont ensuite été analysées à l'aide du cytomètre Cytoflex (Beckman Coulter). Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel FlowJo v10.10 (BD biosciences).

BMDM Analyse FACS		
	référence	dilution
FITC-CD206	141703 (BioLegend)	1/10
PE-Dazzle594-CD163	155315 (BioLegend)	1/20
APC-CD36	102611 (BioLegend)	1/20
BV510-CD80	104741 (BioLegend)	1/20
BV421-CD68	137017 (BioLegend)	1/20
PE-F4/80	123110 (BioLegend)	1/20

hMDM Analyse FACS		
	référence	dilution
Pc5.5-CD14	A70204 (Beckman Coulter)	1/20
KrO-CD45	B36294 (Beckman Coulter)	1/20
PE/Cy7-CD68	333816 (BioLegend)	1/20
FITC-CD163	130-112-132 (Miltenyi Biotech)	1/50
AF700-CD206	141734 (BioLegend)	1/20
APC A750-CD80	B30643 (Beckman Coulter)	1/10

D - Tests ELISA

Tous les tests ELISA présentés dans cet article ont été réalisés sur des surnageants recueillis après 24 heures de stimulation des macrophages (BMDM ou hMDM) avec de l'OCM et conformément aux instructions du fabricant. L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques Anthos 2010 (Biochrom).

Kits ELISA	
	référence
CD5L	EM15RB (Thermofisher Scientific)
Souris IL-6	555240 (BD Biosciences)
Souris IL12p40	555165 (BD Biosciences)
Souris TNF- α	DY410-05 (Biotechne)
IL1- humain β	DY201 (Biotechne)
IL-6 humain	DY206 (Biotechne)
IL12p40 humain	DY1240 (Biotechne)
TNF- humain α	88-7346-22 (Invitrogen)

VIII - Analyse RNA-sequencing (RNA-seq)

A - Séquençage de l'ARN

Les BMDM utilisés pour le séquençage de l'ARN ont étéensemencés à une densité de $1,5 \cdot 10^5$ cellules par puits dans des plaques de culture 12 puits et exposés à l'OCM ou à 20 ng/mL d'IL-4 et d'IL-13 pendant 24 heures. Chaque condition a été réalisée en quadruplicat. Construction de bibliothèques de séquençage : à partir de 4 μ L d'ARN total, 1 μ L de contrôle ERCC spike-in a été ajouté aux échantillons d'ARN. La génération de bibliothèques a ensuite été initiée par l'amorçage d'oligo dT, à partir d'ARN total (entre 50 et 200 ng). L'amorce contient déjà des séquences de liaison compatibles avec Illumina. Après la synthèse du premier brin, l'ARN a été dégradé et la

synthèse du second brin a été initiée par un amorçage aléatoire et une ADN polymérase. L'amorce aléatoire contient également des séquences de liaison 5' compatibles avec Illumina. À cette étape, des identificateurs moléculaires uniques (UMI) ont été introduits, ce qui a permis d'éliminer les doublons de PCR au cours de l'analyse. Après avoir obtenu la bibliothèque d'ADNc double brin, celle-ci a été purifiée à l'aide de billes magnétiques et amplifiée. Pendant l'amplification de la librairie, les codes-barres et les séquences nécessaires à la génération des clusters (index i7 en 3' et index i5 en 5') ont été introduits grâce à des séquences de liaison compatibles avec Illumina. Le nombre de cycles dépend de la quantité de départ : entre 14 cycles pour 200 ng d'ARN total et 16 cycles pour 50 ng d'ARN total. La librairie finale a été purifiée et déposée sur une puce à ADN haute sensibilité pour être contrôlée sur le bioanalyseur Agilent 2100. La concentration de la librairie et la distribution de taille ont été vérifiées. Chaque librairie a été regroupée de manière équimolaire, et le pool final a également été contrôlé sur le bioanalyseur Agilent 2100 et séquencé sur Nova 6000 (Illumina) avec une chimie de 100 cycles. La puce utilisée était une flowcell S2 avec un kit 100 cycles version 1.5.

B - Analyse des données transcriptomiques

Pour éliminer les régions de mauvaise qualité et les poly(A) des reads, nous avons utilisé le programme fastp. Nous avons utilisé un seuil de score de qualité de 20 et supprimé les lectures plus courtes que 25 pb. Les alignements de lectures ont été réalisés à l'aide du programme STAR avec la souris de référence du génome (GRCm39) et les annotations des gènes de référence (Ensembl). L'UMI (Unique Molecular Index) a permis de réduire les erreurs et le biais de la PCR quantitative en utilisant fastp et umi-tools. Sur la base des alignements de lectures, le nombre de molécules par gène a été compté à l'aide de FeatureCount. D'autres programmes ont été utilisés pour le contrôle de la qualité des lectures et pour le flux de travail, tels que qualimap, fastp, FastQC et MultiQC. L'expression génique différentielle de l'ARN-seq a été réalisée à l'aide du logiciel R/Bioconductor DESeq2 ³⁶. Le seuil pour les gènes différentiellement exprimés était la valeur $p \text{ padj (BH)} < 0,05$. Ensuite, l'analyse d'enrichissement des ensembles de gènes (GSEA) des gènes différentiellement exprimés a été réalisée à l'aide de Clusterprofile v3.0.4 (paramètres par défaut) dans le logiciel R. Les données de séquençage ont été déposées sur NCBI – SRA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>; numéro de projet PRJNA1136425).

IX - Expérience de neutralisation du CD5L

Les BMDM ont étéensemencés à une densité de $1,5 \times 10^5$ cellules par puits dans une plaque 24 puits et ont pu adhérer au fond du puits pendant une nuit avant l'expérience. Les cellules ont été traitées avec du milieu contrôle ou de l'OCM et, pour certaines conditions, 10 $\mu\text{g/mL}$ d'anticorps anti-CD5L (ou 10 $\mu\text{g/mL}$ d'IgG de contrôle) ont été ajoutés au milieu de culture pendant 24 heures.

Expérience de neutralisation du Cd5l		
	référence	concentration
Anticorps Cd5l	AF 2834 (R&Dsystems)	10 $\mu\text{g/mL}$
IgG contrôle	AB-108-C (R&Dsystems)	10 $\mu\text{g/mL}$

X - Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Sauf indication contraire, les résultats sont exprimés en moyenne (SD) d'au moins deux expériences indépendantes. La normalité des données a été vérifiée avant l'application des tests statistiques paramétriques ou non-paramétriques. Les tests statistiques utilisés pour les analyses sont indiqués dans la légende de chaque figure.

Résultats

I - L'OCM induit une diminution de l'expression d'iNOS dans les macrophages murins de lignée RAW 264.7

Afin d'étudier le rôle des éléments solubles produits par les cellules épithéliales du côlon sur la différenciation des macrophages, nous avons développé un modèle de production de milieu conditionné d'organoïdes coliques dans lequel nous avons cultivé des macrophages. Plus précisément, nous avons isolé des cryptes provenant de côlons de souris ou bien de pièces opératoires de côlons de patients contrôles ou atteints de RCH. Ces cryptes ont ensuite été différenciées en organoïdes et après plusieurs passages, le milieu de culture des organoïdes a été récolté. Des macrophages de lignées cellulaires ou bien des macrophages primaires murins et humains ont enfin été exposés à ce milieu en condition basale ou inflammatoire avant une analyse génique et protéique de leur profil (figure 14).

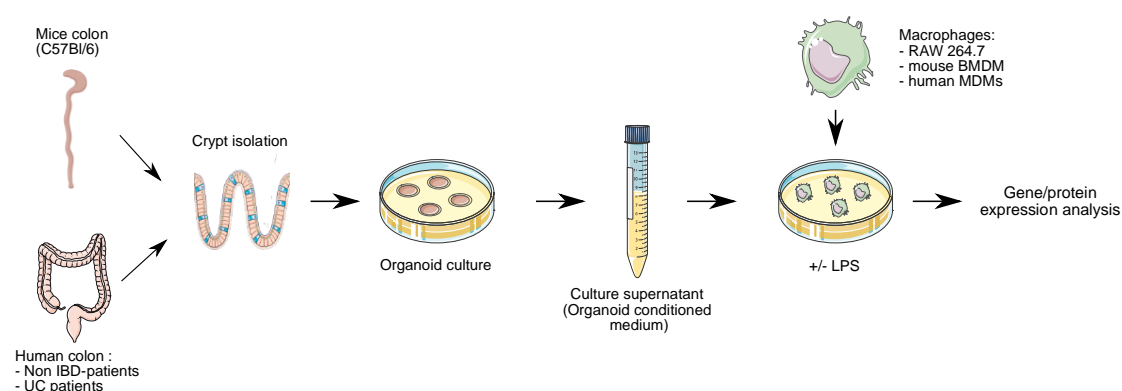


Figure 14 : Représentation schématique du protocole expérimental

Le microenvironnement intestinal étant reconnu pour ses fonctions homéostatiques impliquées dans l'induction de la tolérance immunitaire à l'égard des microbes commensaux et des antigènes inoffensifs, nous avons utilisé ce modèle pour caractériser le rôle joué par les cellules épithéliales dans la polarisation des macrophages vers un profil immunorégulateur. Nous avons d'abord cultivé la lignée cellulaire de macrophages murins RAW 264.7 dans le milieu produit par les organoïdes coliques murins puis analysé l'expression des marqueurs de macrophages « alternatifs » (M2). Les résultats illustrés dans la figure 15A, montrent qu'après 24h de culture des macrophages, le milieu conditionné des organoïdes (OCM) n'a pas induit de manière significative l'expression des marqueurs des macrophages M2 tels que *Mrc1* (CD206), *CD163* ou *Arg1/CD36* (non détectés ; données non présentées). Cependant, lorsque des macrophages stimulés par du LPS ont été traités simultanément avec de l'OCM, l'induction de

l'expression LPS-dépendante du gène *iNOS* a été presque abolie à 6h et fortement réduite de 80% à 24h (Figure 15B). L'analyse par western-blot de l'expression d'I κ B α a suggéré que l'OCM était capable de réduire la dégradation d'I κ B α induite par le LPS dès 15 minutes après le traitement par le LPS (Figure 15C). Ces premières observations suggèrent que l'OCM possède des propriétés anti-inflammatoires. Afin de s'assurer que l'effet anti-inflammatoire obtenu avec l'OCM était exclusivement dû à la présence de facteurs solubles produits par les cellules épithéliales et libérés dans le milieu de culture, nous avons préparé un milieu conditionné témoin obtenu uniquement par contact avec des dômes de Matrigel vides (non-ensemencés avec des cryptes de côlon) et testé ce milieu sur des cellules RAW264.7 stimulées par le LPS. Comme le montre la figure 15D, l'OCM a de nouveau montré une très forte inhibition de l'induction LPS-dépendante de l'expression du gène de *iNOS* (condition OCM + LPS), alors que le milieu conditionné naïf de contrôle (Matri. + LPS) n'a montré aucun effet. Ceci indique que des facteurs solubles libérés par les cellules épithéliales coliques sont impliqués dans l'effet anti-inflammatoire observé.

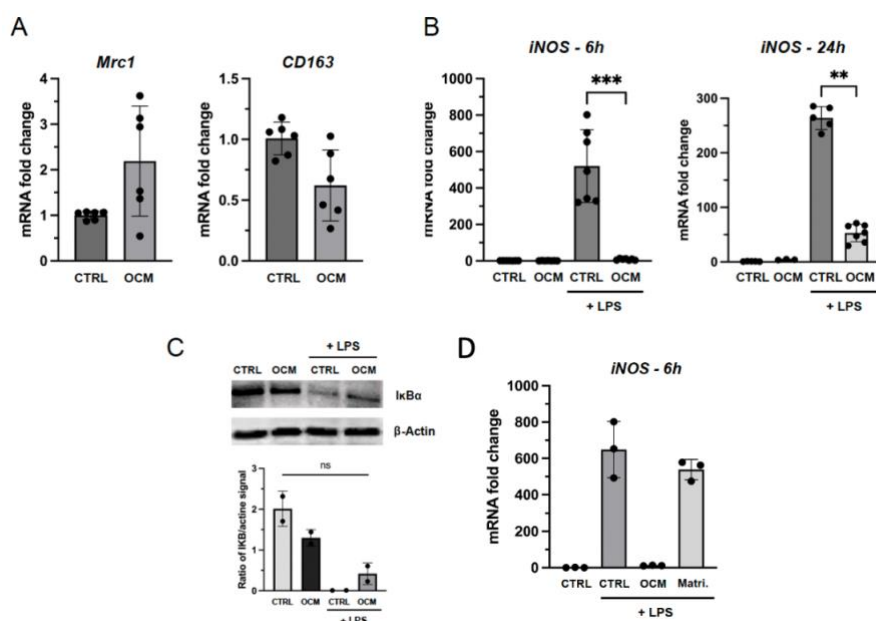


Figure 15 : Effet de la stimulation de cellules de la lignée macrophagique RAW 264.7 par du milieu conditionné d'organoïdes de souris (OCM).

A. Analyse qPCR de l'expression des marqueurs M2 par les cellules RAW 264.7 après un traitement de 24h avec l'OCM. **B.** Expression ARNm d'*iNOS* après stimulation avec OCM +/- LPS (100 ng/mL) pendant 6h et 24h. **C.** Analyse par Western blot de l'expression d'I κ B α après 15 min de stimulation avec l'OCM +/- LPS (image supérieure). Analyse de l'intensité du signal du rapport I κ B α /actine à l'aide du logiciel ImageJ2 (image inférieure). **D.** Niveau d'expression de l'ARNm d'*iNOS* après stimulation avec l'OCM +/- LPS ou le contrôle Matrigel à 6h dans la lignée cellulaire de macrophages RAW 264.7 Les données sont exprimées en moyenne +/- SD (n=6 (A-B), n=2 (C)). Les données représentent les résultats regroupés de 2 expériences indépendantes (A-C). ** P < 0,01, *** P < 0,001 ; ns, non significatif (Mann-Whitney).

II - L'OCM induit un état anti-inflammatoire des macrophages murins dérivés de moelle osseuse (BMDM)

En tant que lignée cellulaire transformée, les cellules RAW 264.7 peuvent présenter l'inconvénient de ne pas reproduire précisément toutes les caractéristiques des macrophages primaires et peuvent présenter des différences dans certaines fonctions ou dans l'expression des gènes. Nous avons donc décidé de reproduire nos expériences précédentes en utilisant des macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris (BMDM) et avons comparé l'effet de l'OCM à celui du cocktail de cytokines IL-4/IL-13, classiquement connu pour induire des macrophages M2 alternativement activés *in vitro*. Nous avons d'abord observé au microscope optique les caractéristiques morphologiques des BMDM cultivés avec de l'OCM, de l'IL-4/IL-13 (IL-4/IL-13) ou un milieu témoin. De façon inattendue, les BMDM traitées avec de l'OCM ont présenté un aspect fusiforme ressemblant à la forme des macrophages traités avec de l'IL-4/IL-13, avec une augmentation significative de leur élongation par rapport aux contrôles (Figure 16A ; conditions sans LPS). De plus, nous avons également observé qu'en présence de LPS, les macrophages traités à l'OCM présentaient un degré d'élongation plus élevé par rapport au contrôle, bien que non significatif (Figure 16A ; conditions avec LPS). L'analyse de l'expression de l'ARNm a montré que, contrairement au cocktail IL-4/IL-13, l'OCM n'a pas induit de manière significative l'expression des gènes marqueurs classiques des macrophages M2 tels que *Mrc1* (CD206) et *Arg1* dans les BMDM, alors qu'une induction similaire du gène scavenger *CD36* a été observée dans les deux conditions (Figure 16B). Au niveau protéique, l'analyse par cytométrie de flux de l'expression des marqueurs de surface M2 CD206, CD163 et CD36 a montré que l'OCM n'induisait pas l'expression de ces marqueurs dans les BMDM par rapport aux cellules de contrôle (Figure 16C).

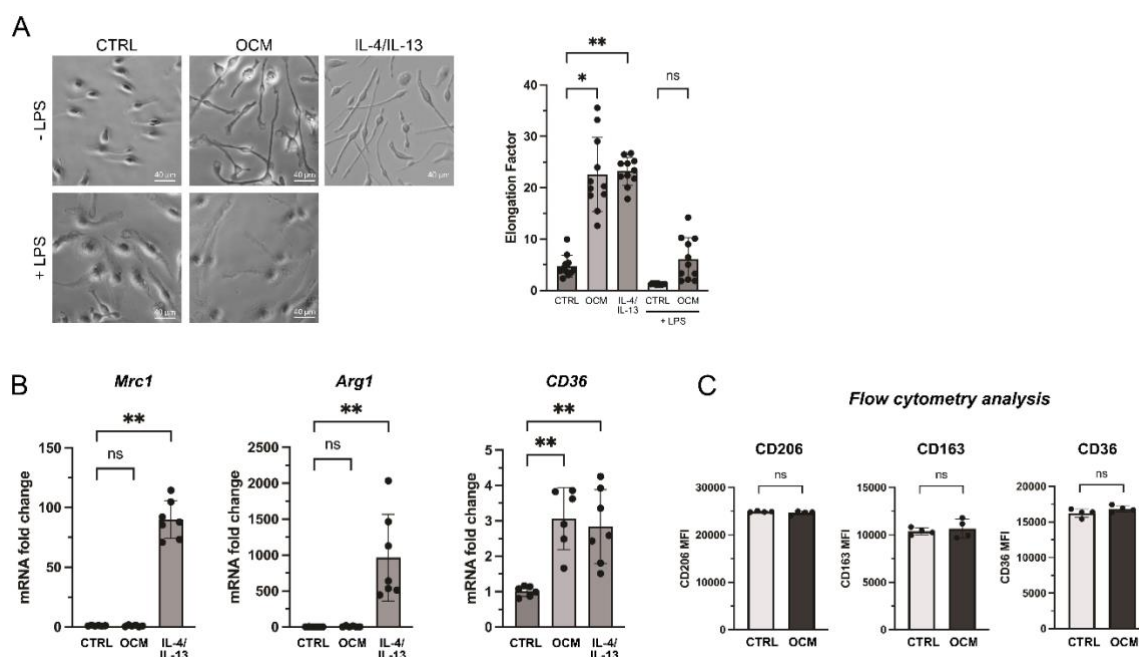


Figure 16 : Effet de la stimulation par le milieu conditionné d'organoïdes de souris (OCM) sur les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM).

A. Aspect morphologique des cellules BMDM observé en microscopie confocale (X20) après traitement avec de l'OCM +/- LPS (100 ng/mL) ou de l'IL-4/IL-13 (20 ng/mL) pendant 24h (panneau de gauche). Facteur d'élongation (longueur divisée par la largeur) des cellules correspondant aux conditions précédentes (panneau de droite). Les données sont présentées en moyenne +/- SD de deux expériences indépendantes (n = 11 champs microscopiques comptés ; 2 expériences indépendantes). **B.** Analyse qPCR de l'expression des marqueurs M2 par les cellules BMDM après 24h de traitement avec l'OCM ou l'IL-4/IL-13. Les données sont présentées en moyenne +/- SD (n = 6-7) de 2 expériences indépendantes. **C.** Analyse par cytométrie en flux du niveau d'expression des protéines CD206, CD163 et CD36 dans les cellules BMDM après un traitement de 24h avec l'OCM. Les données sont exprimées en intensité moyenne de fluorescence (MFI) +/- SD (n = 4). * P < 0,05, ** P < 0,01 ; ns, non-significatif (Mann-Whitney).

Cependant, comme observé avec les cellules RAW 264.7, l'OCM a induit une très forte inhibition de l'expression du gène *iNOS* après stimulation des BMDM par le LPS : l'expression de l'ARNm codant pour *iNOS* induite par le LPS a été significativement réduite de plus de 50% après 6h ou 24h de co-stimulation avec l'OCM (Figure 17A). Il est important de noter que, comme pour les cellules RAW 264.7, le milieu de culture conditionné contrôle obtenu par contact avec les dômes de Matrigel vides (appelé "Matri.") n'a eu aucun effet sur l'expression du gène *iNOS* induite par le LPS (Figure 17B). Cela confirme clairement que des régulateurs solubles produits par les cellules épithéliales du côlon sont spécifiquement impliqués dans l'effet anti-inflammatoire. L'expression de la protéine *iNOS* a ensuite été analysée par immunofluorescence et quantification du signal GFP intracytoplasmique associé à la détection

de cette enzyme. Cette approche a confirmé qu'en présence d'OCM, la capacité d'induction d'iNOS par le LPS était drastiquement inhibée (Figure 17C).

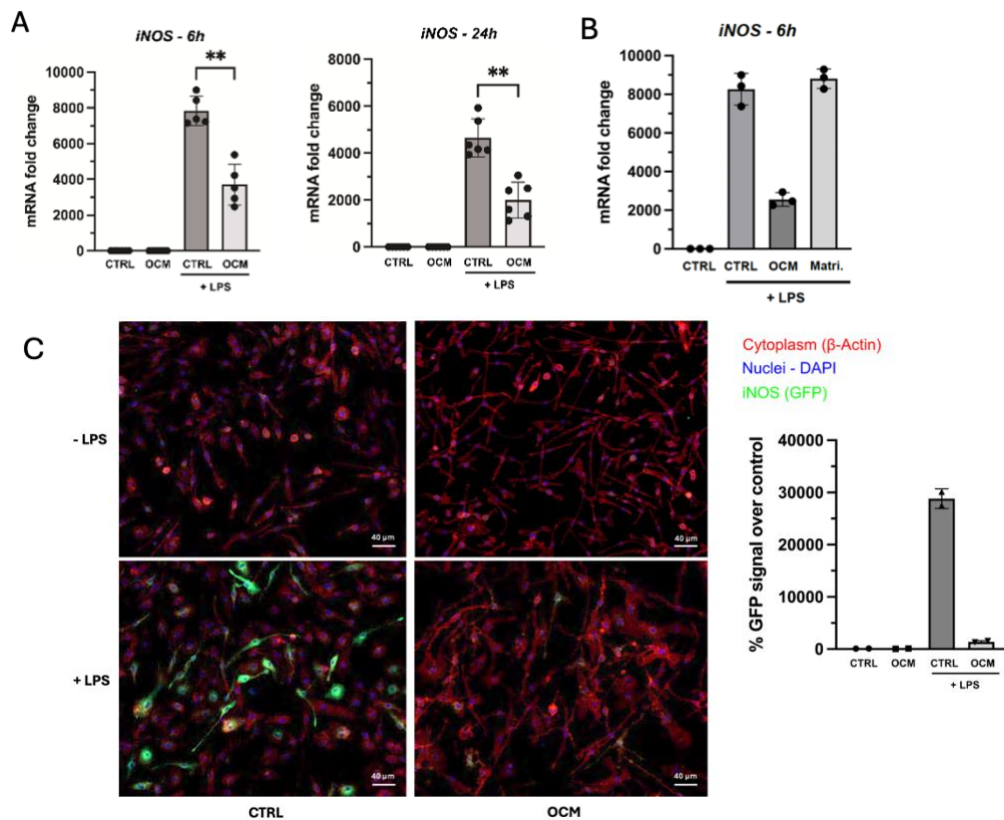


Figure 17 : Effet de la stimulation par l'OCM sur les BMDM en condition inflammatoire.

A. Expression de l'ARNm d'iNOS après stimulation avec de l'OCM +/- LPS (100 ng/mL) pendant 6h et 24h. Les données sont présentées comme la moyenne +/- SD (n = 5-6) de 2 expériences indépendantes. **B.** Niveau d'expression de l'ARNm d'iNOS après stimulation avec de l'OCM +/- LPS ou le contrôle Matrigel à 6h dans les BMDM. Les données représentent la moyenne +/- SD (n=3). **C.** Détermination de l'expression de la protéine iNOS par immunofluorescence dans les BMDM stimulés avec de l'OCM +/- LPS pendant 24h. Coloration par fluorescence des cellules BMDM (noyaux = bleu, cytoplasme = rouge, iNOS = vert). Quantification du signal GFP. Les données sont exprimées en moyenne +/- SD (n = 2 champs microscopiques comptés d'une expérience). ** P < 0,01 (Mann-Whitney).

Outre la réponse iNOS, nous avons également examiné l'effet de l'OCM sur l'induction par le LPS d'autres marqueurs inflammatoires caractéristiques d'une réponse macrophagique de type 1 (Figure 18). L'analyse par RT-qPCR a montré que l'OCM réduisait de manière significative l'expression induite par le LPS de l'ARNm codant pour le *récepteur Toll-Like 2* (marqueur M1) ainsi que l'ARNm codant pour l'interleukine-6 (*IL-6*) et la sous-unité p40 de l'interleukine 12 (*IL-12-p40*) (Figure 18A). La quantification de ces cytokines par ELISA dans les surnageants de culture des BMDM stimulées par le LPS et traitées par l'OCM a montré une tendance à la réduction de l'expression des protéines IL-6 et IL-12-p40 par rapport aux BMDM stimulées par

le LPS seul, bien que cette diminution ne soit pas statistiquement significative (Figure 18B). Cependant, lorsque nous avons évalué le pourcentage de BMDM différenciés en macrophages inflammatoires de type M1 après 24h de stimulation par LPS en utilisant l'analyse par cytométrie en flux des cellules doublement positives pour les marqueurs CD68 et CD80, nous avons observé que l'OCM inhibait significativement la différenciation de ces cellules de plus de 60%, renforçant clairement l'idée que, dans notre modèle, l'OCM possède une activité anti-inflammatoire convaincante (Figure 18C).

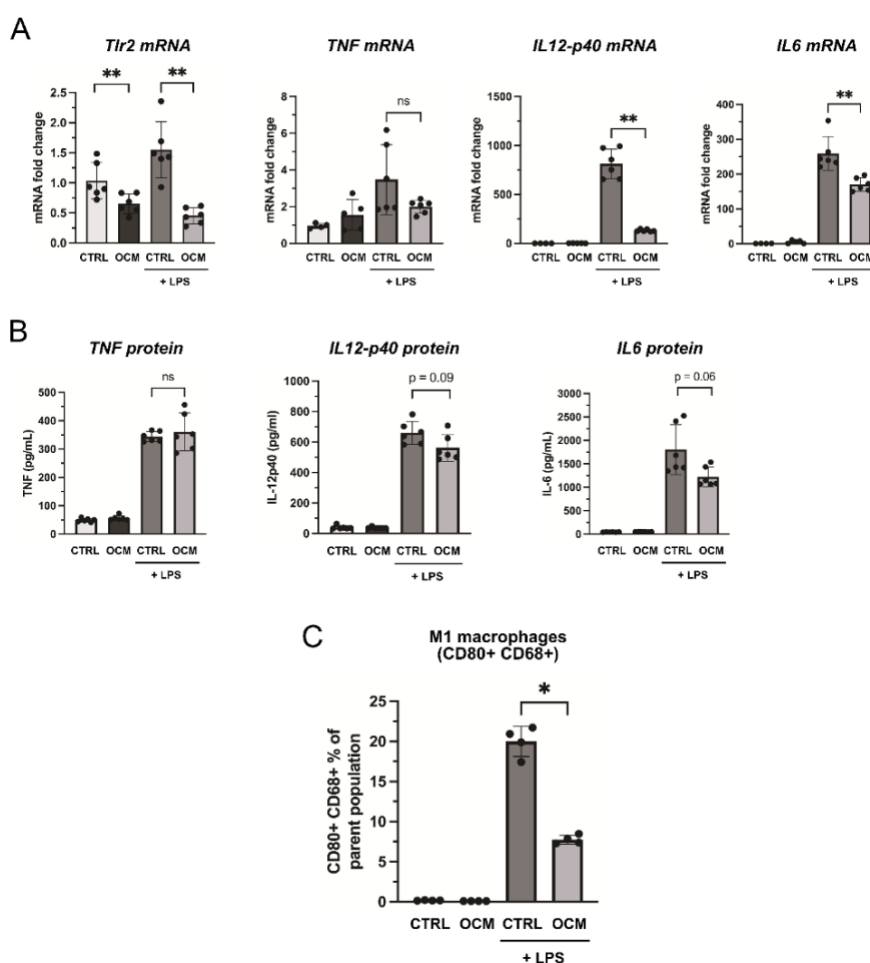


Figure 18 : L'OCM de souris contrôle la réponse des macrophages de type 1 dépendant du LPS dans les BMDM.

A. Analyse qPCR de l'expression de TLR2 (marqueur M1) et de cytokines inflammatoires (TNF, IL-12-p40, IL-6) par les cellules BMDM après stimulation avec de l'OCM +/- LPS (100 ng/mL) pendant 24 heures. Les données sont présentées en tant que moyenne +/- SD (n = 6) de 2 expériences indépendantes. **B.** Quantification par ELISA des cytokines inflammatoires (TNF, IL-12-p40, IL-6) dans le surnageant de culture des cellules BMDM après stimulation avec de l'OCM +/- LPS (100 ng/mL) pendant 24 heures. Les données sont présentées comme la moyenne +/- SD (n = 6) de 2 expériences indépendantes. **C.** Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules CD80/CD68 positives parmi les BMDM après stimulation avec de l'OCM +/- LPS (100 ng/mL) pendant 24 heures. Les données sont présentées en moyenne +/- SD (n = 4). * P < 0,05, ** P < 0,01 ; ns, non significatif (Mann-Whitney).

Enfin, nous nous sommes intéressés à la durée de l'effet anti-inflammatoire induit par l'OCM sur les macrophages, et nous avons cherché à savoir si l'effet du traitement pouvait persister après son retrait. A cette fin, des BMDM ont été cultivées dans de l'OCM ou dans un milieu témoin pendant 24h, puis les milieux ont été remplacés par un milieu de culture de BMDM classique contenant ou non du LPS. L'analyse de l'expression génétique de l'ARNm codant pour *iNOS* a été réalisée 6h ou 24h après la stimulation par le LPS. Il est intéressant de noter que les BMDM traitées au LPS présentaient une augmentation importante des niveaux d'ARNm d'*iNOS*, qui a été significativement atténuée par le prétraitement à l'OCM. L'inhibition de l'expression d'*iNOS* induite par le LPS a donc été maintenue à 6 et 24 heures après le retrait de l'OCM (Figure 19), ce qui suggère que les facteurs produits par les cellules épithéliales polarisent durablement les macrophages vers un phénotype immunorégulateur.

Dans l'ensemble, nos résultats soutiennent l'idée que le milieu conditionné des organoïdes du côlon induit des fonctions immunorégulatrices dans les macrophages murins qui n'impliquent pas la polarisation classique vers un phénotype de type M2.

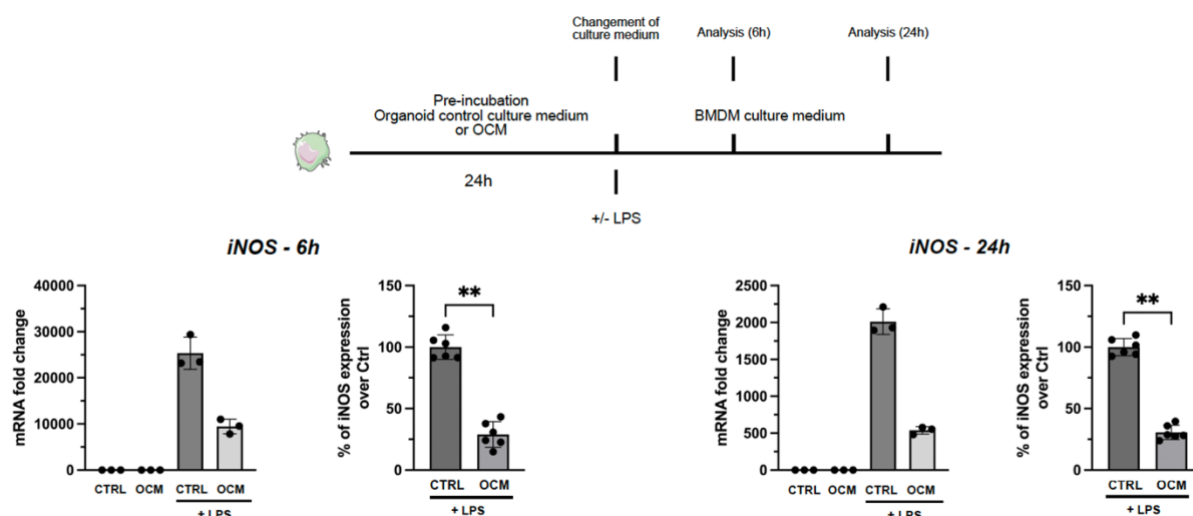


Figure 19 : Effet post-traitement de l'OCM sur les BMDM.

Représentation schématique du protocole expérimental (en haut). Pour chaque durée d'expérience (6h ou 24h) sont représentés l'expression de l'ARNm d'*iNOS* (une expérience représentative de deux, n=3, moyenne +/- SD ; graphiques de gauche) et le pourcentage du niveau d'expression de l'ARNm d'*iNOS* en condition LPS avec le niveau d'expression mesuré dans les cellules contrôles stimulées avec du LPS seul utilisé comme référence et défini comme 100% (pool de deux expériences indépendantes, n=6, moyenne +/- SD ; graphiques de droite). ** P < 0,01 (Mann-Whitney).

III - Analyse transcriptomique des BMDM de souris stimulés par l'OCM

Comme le milieu conditionné d'organoïdes induit des macrophages anti-inflammatoires qui n'expriment pas les marqueurs macrophagiques M2 « classiques », nous avons effectué une analyse RNA-seq pour mieux caractériser ces cellules et comparer leur transcriptome avec celui des BMDM stimulés par IL-4/IL-13 ainsi qu'avec les cellules non traitées à 24h. L'analyse en composantes principales (ACP) a montré que les trois populations respectives de macrophages respectives (non-traitées, OCM, IL-4/IL-13) étaient distinctement regroupées, avec une plus grande distance entre les macrophages traités par l'OCM et les macrophages traités par l'IL-4/IL-13- qu'entre les cellules de contrôle et l'une ou l'autre de ces deux populations de cellules stimulées (Figure 20A). Les différences d'expression génique ont été cartographiées à l'aide d'une heatmap et les résultats ont clairement confirmé que les macrophages traités par l'OCM ont un profil d'expression génique unique, comprenant certains gènes qui varient de la même manière que les macrophages traités par l'IL-4/IL-13, mais montrant des différences pour de nombreux gènes qui varient de manière complètement opposée (figure 20B). Au total, 1821 gènes avec une induction d'expression $> 1,5$ ont été retrouvés différemment exprimés entre les macrophages traités par l'OCM et les macrophages M2 traités par l'IL-4/IL-13 (comprenant près de 60 % de gènes régulés à la hausse et 40 % de gènes régulés à la baisse), ce qui correspond à 2 fois plus de changements que ceux observés entre les macrophages traités par l'OCM et les contrôles (figure 20C). Cette première analyse suggère fortement que l'OCM est capable de différencier des macrophages avec des propriétés anti-inflammatoires, présentant une signature génétique spécifique, qui est clairement distincte du profil fonctionnel des macrophages M2 activés alternativement *in vitro*.

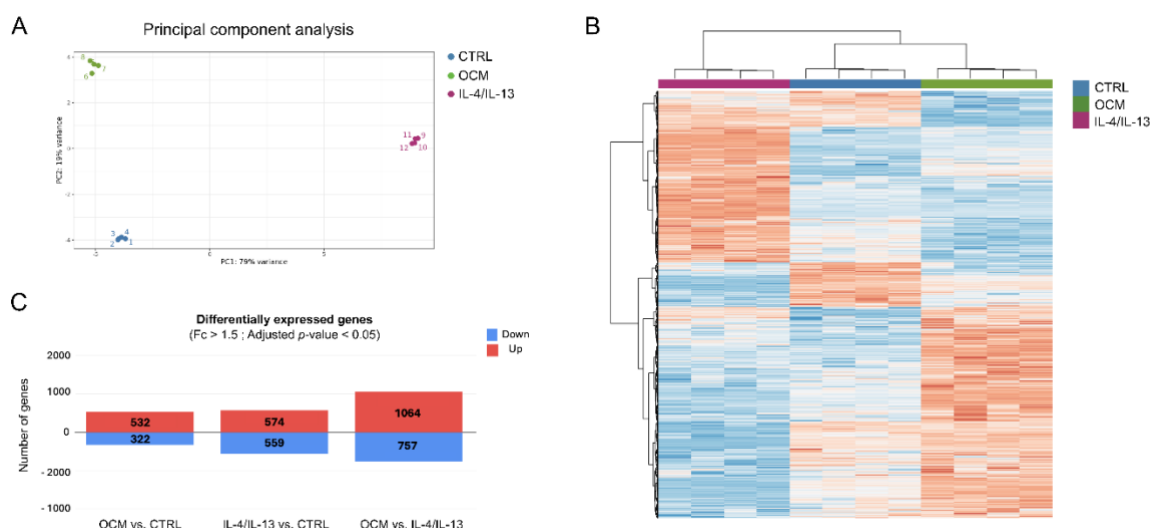


Figure 20 : Profil d'expression génique de macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) stimulés par l'OCM ou l'IL-4/IL-13.

A. Analyse en composantes principales (ACP) des BMDM provenant des conditions de contrôle, OCM et IL-4/IL-13 (n=4). **B.** Heatmap représentant le profil d'expression génique des BMDM provenant des 3 conditions (foldchange >1,5 et valeur p ajustée <0,05). **C.** Nombre de gènes différentiellement régulés à la hausse ou à la baisse dans les comparaisons par paire des 3 conditions (foldchange >1,5 et valeur p ajustée <0,05).

Comme nos analyses RT-qPCR précédentes suggéraient que les macrophages OCM n'exprimaient pas les marqueurs M2 classiques, nous avons examiné attentivement la modulation de l'expression de ces gènes dans l'analyse transcriptomique. Comme prévu, les macrophages stimulés par l'IL-4/IL-13 ont montré une régulation à la hausse des marqueurs M2 classiques, tels que *Mrc1* (CD206), *Arg1*, *PPARGgamma*, *Clec7a*, *Clec10a*, *Il-10* ou *Cdh1* (Figure 21A). Dans les macrophages OCM, aucun de ces gènes n'était induit (*Mrc1*, *Il-10*, *Cdh1*) et d'autres étaient partiellement modulés (*Arg1*, *Clec7a*, *Clec10a*, *PPARGgamma*), confirmant nos observations précédentes. Ces deux populations ne partagent que 96 gènes régulés à la hausse et 81 gènes régulés à la baisse (figure 21B et annexe 1 – « supplemental table 1 » p.156-170), ce qui confirme clairement l'existence de sous-types distincts de macrophages anti-inflammatoires. Il convient de noter que des gènes associés à la réponse inflammatoire (par exemple *S100a8*, *Fcgr1*, *Clqa*, *Cxcl10*) ont été régulés à la baisse dans les deux populations (annexe 1 – « supplemental table 1 » p.156-170). Le profil unique des macrophages OCM comprend notamment la régulation à la hausse de l'expression de gènes associés à un profil anti-inflammatoire et à un phénotype « régulateur », tels que le *CD5-antigen like* (CD5L) (Sanjurjo et al., 2018), *Slc40a1* (ferroportine) (Johnson et al., 2010) et les facteurs de transcription *KLF10* (Papadakis et al., 2015), *Notch4* (López-López et al., 2021) et *RORα* (Han

et al., 2017). L'analyse quantitative par RT-PCR a confirmé que *CD5L* et *Slc40a1* étaient spécifiquement induits par les macrophages traités à l'OCM, tandis que *KLF10* et *RORα* étaient également régulés à la hausse dans les macrophages IL-4/IL-13 (figure 21C).

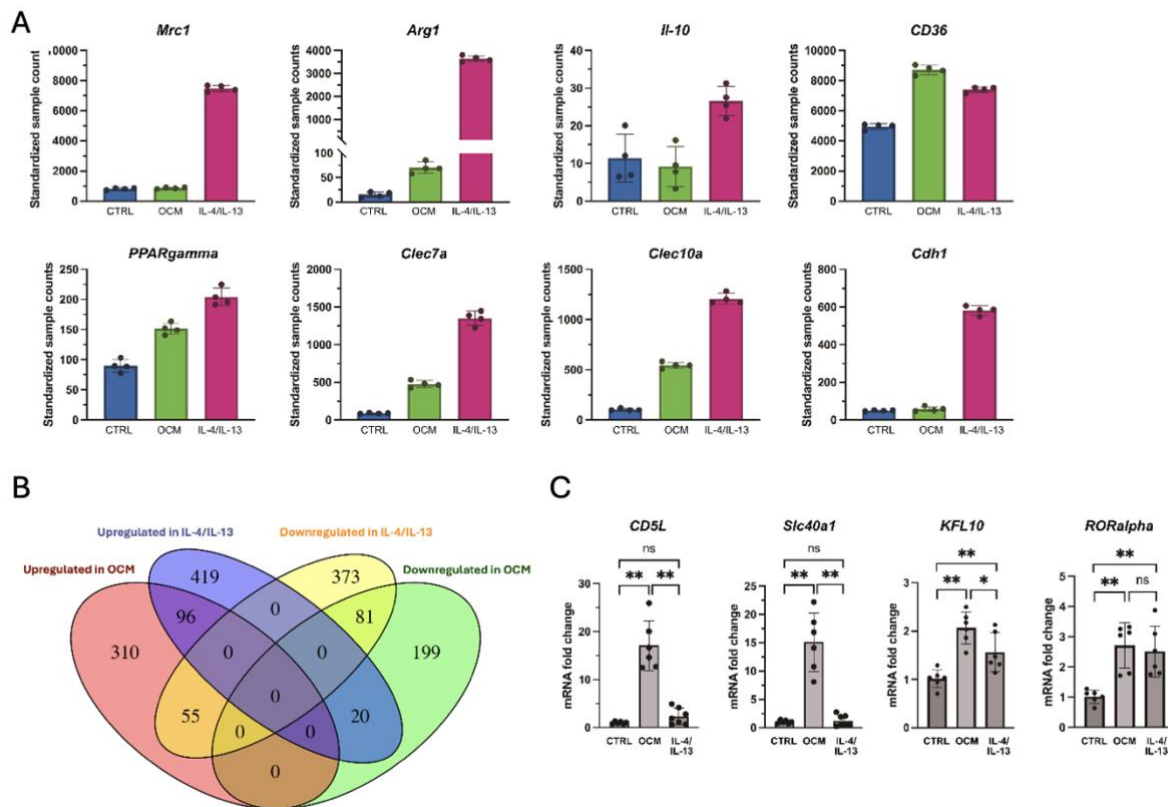


Figure 21 : Analyse par séquençage de l'ARN des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) stimulés par l'OCM ou l'IL-4/IL-13.

A. Comptes d'échantillons standardisés des marqueurs M2 dans les 3 conditions. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 4) **B.** Diagramme de Venn des gènes différentiellement exprimés dans les BMDM stimulées avec l'OCM ou l'IL-4/IL-13 **C.** Analyse qPCR des gènes d'intérêt. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 6). Les données sont les résultats regroupés de 2 expériences indépendantes (C). * P < 0,05, ** P < 0,01 ; ns, non significatif (Mann-Whitney).

Pour mieux comprendre les voies biologiques qui pourraient être spécifiquement modulées dans les macrophages traités avec de l'OCM, nous avons enfin effectué une analyse d'enrichissement de l'ensemble des gènes (GSEA) sur notre ensemble de données. Cette analyse a révélé que plusieurs voies de signalisation classiques associées aux fonctions des macrophages étaient modulées dans les macrophages traités à l'OCM et, fait intéressant, la voie de signalisation associée à la cicatrisation, une caractéristique des macrophages très étudiée et prometteuse pour le développement thérapeutique, s'est avérée être l'une des voies les plus régulées (figure 22A) (Kim and Nair, 2019). Les macrophages pro-cicatrisants sont généralement caractérisés par la

production de plusieurs facteurs de croissance tels que le *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), l'*Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1), le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) et le *Transforming Growth Factor- β 1* (TGF- β 1), qui sont impliqués dans la prolifération cellulaire, la formation du tissu de granulation et l'angiogenèse. Ces macrophages produisent également la Metalloprotéinase Matricielle (MMP) 12 et l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases 1 (TIMP1) pour réguler la production de matrice extracellulaire pendant le processus de cicatrisation. Ici, les macrophages traités par l'OCM ont montré une expression accrue de *PDGF- α* , *IGF-1*, *VEGF- α* et *Mmp12*, (Figure 22B). Il n'y a pas eu de changement dans l'expression de *TIMP1* et *TGF- β 1* (données non-montrées). Par rapport aux BMDM stimulés par de l'IL-4/IL-13, l'induction de certains gènes était moins marquée dans les macrophages traités par OCM, mais là encore, nous avons également observé des réponses opposées entre ces deux populations de cellules, notamment en ce qui concerne l'expression du *VEGF- α* , un facteur clé de l'angiogenèse et de l'épithélialisation lors de la cicatrisation des plaies (Bao et al., 2009), qui était induit par la stimulation avec l'OCM mais inhibé par l'IL-4/IL-13 (Figure 22C).

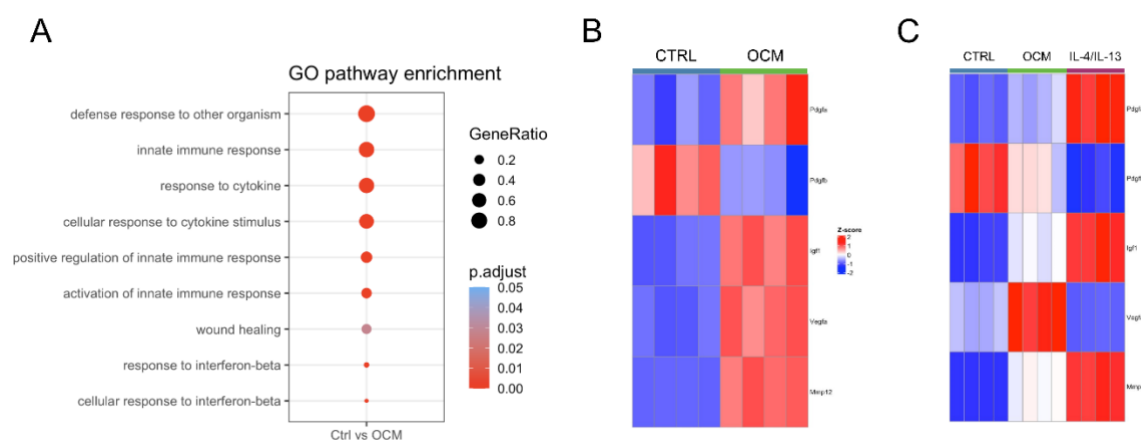


Figure 22 : Les BMDM traités par l'OCM présentent un profil cicatrisant.

Analyse de l'ontologie des gènes (GO) différentiellement exprimés (DEG) dans les BMDM entre les conditions Ctrl et OCM. Les termes GO sélectionnés sont représentés par des points colorés en fonction des valeurs p et classés par leur ratio de gènes (nombre de DEG retrouvés dans la voie de signalisation divisé par le nombre de gènes totaux de la voie de signalisation). **B.** Heatmap représentant l'expression des gènes associés à la cicatrisation des BMDM dans les conditions Ctrl et OCM (valeur p ajustée <0,05). **C.** Heatmap représentant l'expression des gènes associés à la cicatrisation des BMDM dans les conditions Ctrl, OCM et IL-4/IL-13 (valeur p ajustée <0,05).

Collectivement, ces résultats démontrent que les facteurs solubles libérés par les colonoïdes différencient des macrophages immunorégulateurs uniques, distincts des macrophages M2 conventionnels alternativement activés.

IV - CD5L est impliqué dans l'effet anti-inflammatoire induit par l'OCM dans les BMDM

Comme le *CD5L* (ou AIM pour Apoptosis Inhibitor of Macrophage) semble être spécifiquement induit par l'OCM dans les BMDM, nous avons souhaité mieux comprendre le rôle joué par ce gène dans l'effet anti-inflammatoire induit par l'OCM. *CD5L* est une protéine sécrétée qui joue un rôle modulateur important dans l'inflammation aiguë et chronique (Sanjurjo et al., 2015b). Ce facteur soluble a été caractérisé comme un Pathogen Recognition Receptor (PRR) capable de se lier au LPS (Sarrias et al., 2005) et a plus récemment été reconnu comme un moteur de la polarisation des macrophages M2 (Sanjurjo et al., 2018). Afin de confirmer l'induction de l'expression de l'ARNm *CD5L* par l'OCM, nous avons quantifié la protéine *CD5L* par ELISA dans les surnageants de culture de BMDM stimulés ou non par l'OCM. Nous avons observé qu'après 24h de traitement, la quantité de protéine *CD5L* avait significativement doublé, confirmant la capacité de l'OCM à réguler l'expression de cette protéine clé (Figure 23A). Compte tenu de la caractérisation de *CD5L* comme un facteur anti-inflammatoire (Sanjurjo et al., 2018) (Sarrias et al., 2005) nous avons cherché à déterminer si l'induction de l'expression de cette protéine pouvait être impliquée dans l'effet inhibiteur de l'expression du gène *iNOS* induit par l'OCM en présence de LPS. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une expérience de neutralisation de *CD5L* en utilisant un sérum polyclonal anti-*CD5L* et avons mesuré l'expression du gène *iNOS* dans les BMDM de souris. Comme le montre la figure 23B, alors que le LPS seul induit fortement l'expression de l'ARNm d'*iNOS* et que l'OCM inhibe significativement cette réponse, l'ajout d'un sérum polyclonal anti-*CD5L* abolit spécifiquement l'effet régulateur de l'OCM.

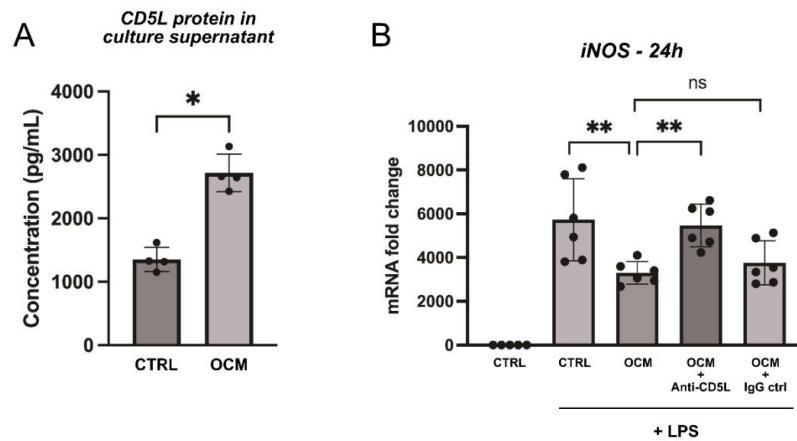


Figure 23 : Rôle de CD5L dans l'effet régulateur de l'OCM de souris.

A. Quantification par ELISA du CD5L dans le surnageant de BMDM contrôles ou traités par l'OCM pendant 24h. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 4). **B.** Les BMDM ont été incubées avec l'OCM +/- LPS (100ng/mL) et l'anticorps CD5L (10 μ g/mL) ou l'IgG de contrôle (10 μ g/mL) pendant 24h avant l'analyse de l'expression ARNm d'iNOS. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 6). Les données sont issues de 2 expériences indépendantes. * P < 0,05, ** P < 0,01 (Mann-Whitney).

Ainsi, ces résultats établissent un lien fonctionnel entre le profil unique des macrophages polarisés par l'OCM et leur activité anti-inflammatoire, qui implique donc, au moins en partie, les propriétés anti-inflammatoires de la protéine CD5L dont l'expression est spécifiquement induite par les facteurs solubles libérés par les colonocytes.

V - Influence de l'OCM humain provenant de patients témoins et de patients atteints de MICI sur des macrophages humains dérivés de monocytes circulants (hMDM)

Afin de mieux comprendre les interactions entre cellules épithéliales et macrophages dans le contexte de l'homéostasie intestinale humaine, nous avons transposé notre protocole à un modèle humain. Cette approche vise également à identifier d'éventuelles altérations de ce dialogue pouvant contribuer au développement de pathologies inflammatoires digestives telles que les MICI. Nous avons donc stimulé des hMDM avec de l'OCM colique préparé à partir d'échantillons chirurgicaux de côlon provenant de patients témoins (cancer, diverticulite) ou de patients atteints de RCH. Étant donné que les hMDM ne présentent pas d'augmentation de l'expression d'iNOS suite à un traitement par le LPS (Fang and Vazquez-Torres, 2002), nous avons basé notre analyse sur l'expression d'autres marqueurs inflammatoires (cytokines et chimiokines) qui ont été décrits comme étant régulés à la hausse en réponse à la stimulation par le LPS (Alasoo et al., 2015). Les macrophages traités par l'OCM provenant d'organoïdes de patients témoins (OCM-CP) ont montré une inhibition significative de l'expression LPS-dépendante de l'ARNm de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1 β , IL-12-p40, IL-6) et de la chimiokine CCL19 (Figure 24A), ce qui suggère le potentiel immunorégulateur de l'OCM du côlon humain. Ce résultat a ensuite été confirmé par des dosages en ELISA des cytokines présentes dans les surnageants de culture des hMDM exposés à l'OCM humain, qui ont clairement montré que le milieu conditionné des colonoïdes des patients témoins réduisait de manière significative la production de TNF, IL-1 β , IL-12-p40 et IL-6 induite par le LPS (figure 24B). Notre hypothèse est que les patients souffrant de RCH présentent un défaut de la fonction épithéliale qui pourrait affecter le dialogue avec les macrophages et ses propriétés immunorégulatrices (Martini et al., 2017b; Mokry et al., 2014; Roda et al., 2010). Le milieu de culture d'organoïdes provenant de patients atteints de RCH (OCM-UC) présentait une réponse globalement similaire à la réponse obtenue pour les patients témoins, à l'exception des ARNm codant pour le TNF et l'IL-6, qui tendent à présenter des niveaux légèrement plus élevés, bien que non significatifs (figure 24A). De plus, alors que la production d'IL-6 induite par le LPS a été significativement diminuée par l'OCM-CP dans les surnageants de culture, cette inhibition significative a été perdue lorsque les hMDM ont été traités avec l'OCM-UC (Figure 24B). Enfin, une analyse par cytométrie en flux a été réalisée afin d'observer la modulation de l'expression des marqueurs M1 et M2 à la surface des hMDM. Il est intéressant de noter que l'induction du

marqueur CD68 (récepteur phagocytaire surexprimé dans les macrophages M1) par le traitement au LPS a été réduite dans la condition OCM-CP mais pas dans la condition OCM-UC, ce qui suggère que l'OCM des patients atteints de RCH n'a pas contrôlé l'induction dépendante du LPS de ce marqueur pro-inflammatoire (Figure 24C). Ainsi, ces données démontrent que les colonoïdes dérivés de patients sont également capables d'induire une activité anti-inflammatoire dans les macrophages humains *in vitro*, et suggèrent que ce modèle pourrait être utile pour identifier les défauts dans les propriétés homéostatiques des cellules épithéliales du côlon chez les patients atteints de RCH ou d'autres troubles inflammatoires.

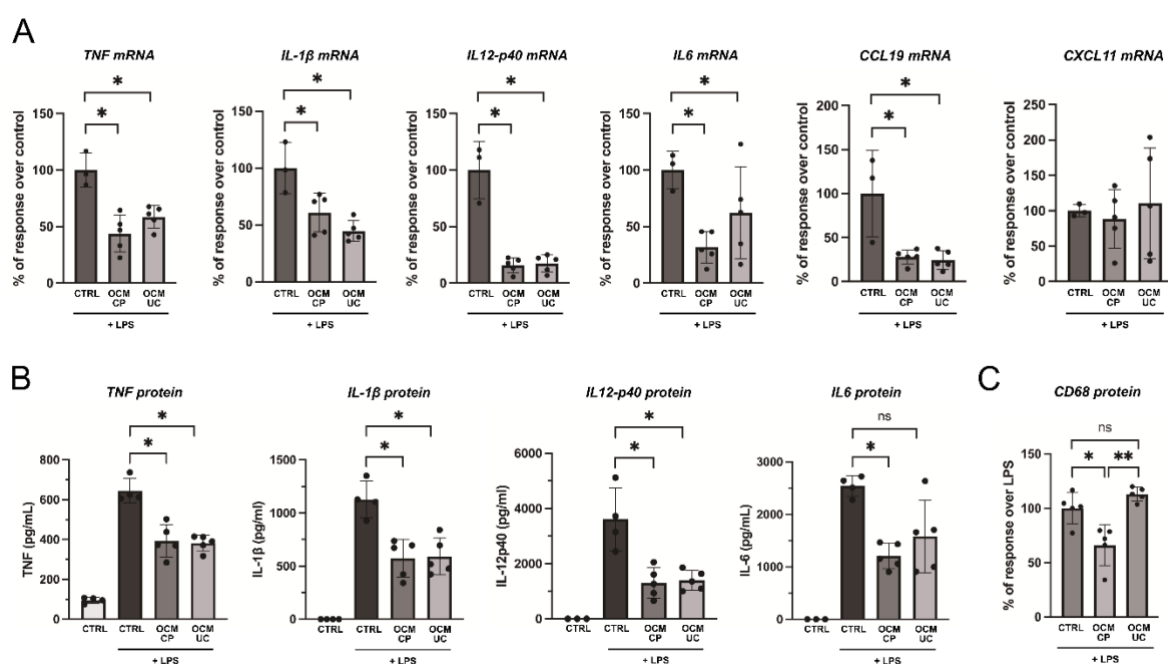


Figure 24 : Effet de l'OCM humain provenant de patients témoins (OCM-CP) et de patients atteints de rectocolite hémorragique (OCM-UC) sur les macrophages humains dérivés de monocytes (hMDM).

A. Analyse qPCR des marqueurs pro-inflammatoires. Les données sont représentées en pourcentage du niveau de réponse de l'ARNm de chaque gène, le niveau d'expression mesuré dans les cellules contrôles stimulées avec du LPS étant utilisé comme référence et défini comme 100 %. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3-5). **B.** Quantification par ELISA des cytokines pro-inflammatoires dans le surnageant de culture des hMDM contrôles (traités ou non avec du LPS) et des hMDM traités avec de l'OCM de patients contrôles ou atteints de RCH en présence de LPS (100ng/mL) pendant 24h. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3-5). **C.** Analyse du niveau d'expression de la protéine membranaire CD68 par cytométrie de flux dans les cellules hMDM traités avec l'OCM de patients témoins ou atteints de RCH en présence de LPS (100ng/mL). Les données sont représentées en pourcentage, le niveau d'expression mesuré dans les cellules contrôles stimulées par le LPS servant de référence et étant défini comme 100 %. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD (n=5). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; ns, non significatif (Mann-Whitney).

VI - Résultats complémentaires à l'article

A - Impact de la différenciation des organoïdes sur l'effet de l'OCM

Les organoïdes utilisés dans cette étude sont des organoïdes cultivés dans un milieu de maintien du phénotype des cellules souches permettant de soutenir la croissance cellulaire et donc la production d'organoïdes peu différenciés. Une différenciation de ces derniers est possible en favorisant la différenciation des cellules souches intestinales présentes dans les organoïdes en différents types de cellules épithéliales (EEC, Paneth, caliciformes, ...). La composition des organoïdes sera alors plus proche de celle retrouvée *in vivo*.

En parallèle des résultats présentés précédemment, nous avons voulu savoir si la différenciation des organoïdes impactait l'effet de l'OCM observé chez les BMDM. Pour ce faire, nous avons tenté de différencier les organoïdes en supprimant certains facteurs de croissance du milieu de culture et nous avons utilisé le milieu conditionné ainsi produit pour stimuler les BMDM. Plus précisément, nous avons changé le milieu de culture des organoïdes au jour 3 de culture et l'avons remplacé par un milieu de différenciation. Le milieu de différenciation est basé sur la réduction de la concentration du milieu conditionné L-WRN à 5% (qui contient le facteur Wnt3a, qui réduit la capacité de différenciation des cellules souches intestinales), l'augmentation de la concentration de SVF à 20% et la supplémentation en DAPT (5 μ M) et EGF (50 ng/mL) (Sato et al., 2011a).

Nous avons évalué le statut de différenciation des organoïdes en mesurant l'expression relative des marqueurs cellulaires associés aux différents types de cellules potentiellement présentes dans l'épithélium intestinal. L'expression de Lgr5 (marqueur des cellules souches intestinales) est fortement diminuée dans les organoïdes différenciés alors que l'expression des marqueurs de différenciation des cellules épithéliales intestinales tels que villin-1, Muc-2 ou trefoil factor 3 (TFF3) est significativement augmentée, illustrant les changements induits par le protocole de différenciation (Figure 25A). Nous avons recueilli le milieu conditionné produit par ces organoïdes « différenciés » afin de stimuler les BMDMs en absence ou en présence de LPS. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'OCM provenant d'organoïdes différenciés par rapport à l'OCM produit par des organoïdes non-différenciés. En effet, l'OCM des organoïdes « différenciés » n'a pas induit l'expression de *Mrc1* (CD206), a induit l'expression de CD5L et a réduit l'expression d'iNOS induite par le LPS dans la même mesure que l'OCM provenant

d'organoïdes indifférenciés (Figure 25B). Ces résultats suggèrent que la différenciation des organoïdes ne semble pas impacter la réponse des BMDM au traitement par l'OCM.

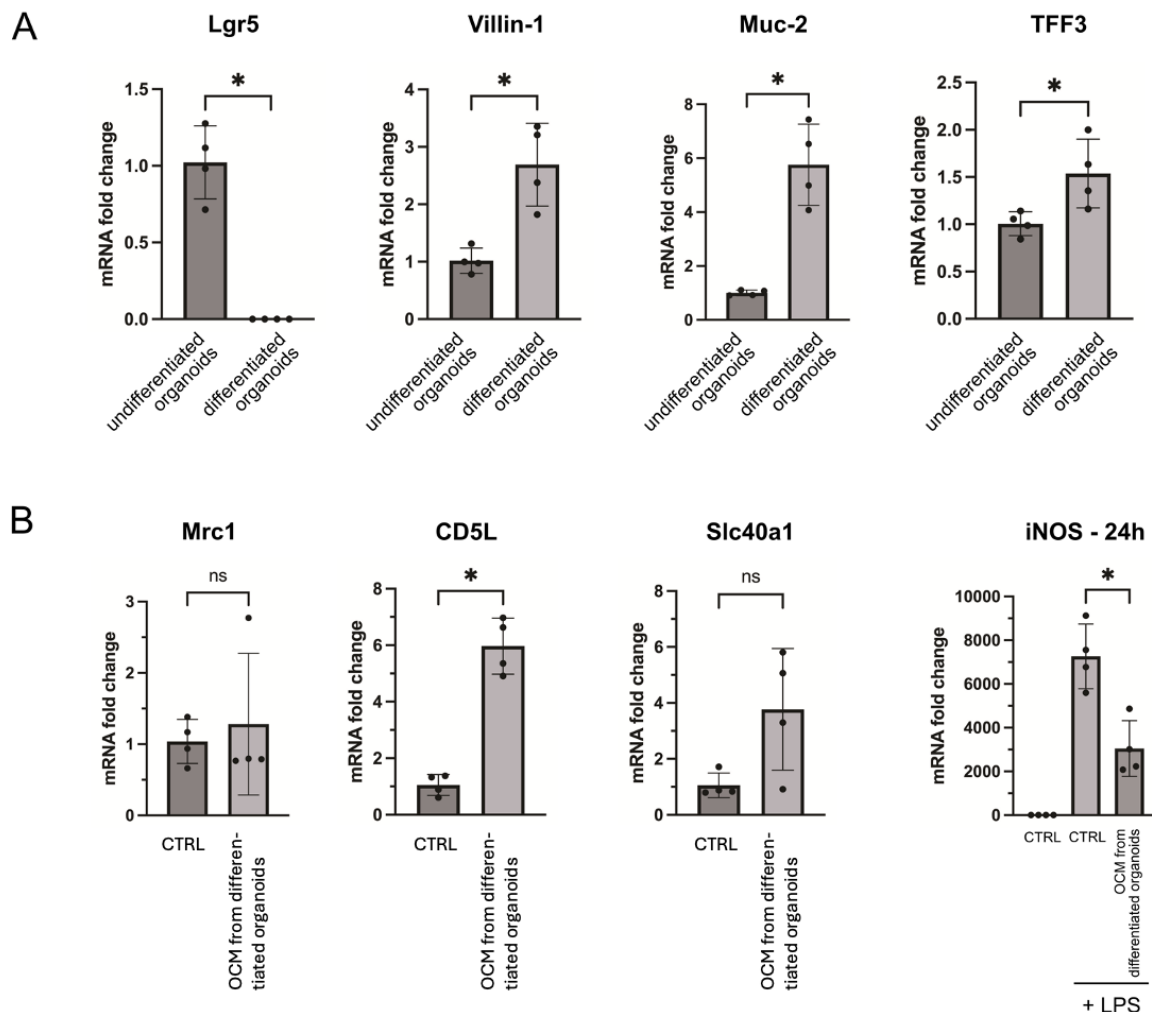


Figure 25 : Différenciation d'organoïdes murins coliques et effet de l'OCM sur des BMDM.

A. Analyse qPCR de marqueurs de différenciation des organoïdes. **B.** Marqueurs d'intérêt de l'étude analysés en qPCR dans des BMDM traités avec de l'OCM d'organoïdes différenciés. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD (n=4). * $P < 0,05$; ns, non significatif (Mann-Whitney).

Nous avons également travaillé sur le développement d'un autre modèle de culture de colonoïdes en monocouche 2D (figure 26). Ce modèle a pour avantage d'être plus reproductible, il mime mieux le tissu natif et permet facilement l'accès au pôle apical des cellules (pour par exemple appliquer un traitement ou bien ajouter une composante bactérienne au modèle).

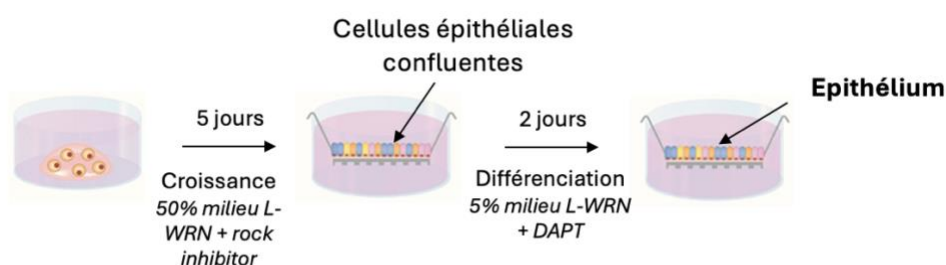


Figure 26 : Représentation schématique du protocole de production d'épithélium dérivés d'organoïdes.

Dans ce modèle, la différenciation des organoïdes 3D en épithélium a été réalisée en cultivant des cellules épithéliales primaires sur une membrane semi-perméable (transwells®) et en adaptant le protocole décrit par Kardia et al. (Kardia et al. Scientific Reports 2021). Brièvement, après avoirensemencé sur transwell des cellules épithéliales obtenues par rupture chimique d'organoïdes, nous les avons cultivées pendant 5 jours avec le milieu de culture organoïde classique avant d'ajouter du milieu de différenciation pendant 2 jours. Au 7^{ème} jour de culture, nous avons changé le milieu et récolté le milieu basal après 2 jours de culture supplémentaire. Ce milieu a été utilisé comme milieu conditionné afin de stimuler des BMDM. Comme pour les organoïdes 3D différenciés, nous avons voulu voir si ce nouveau protocole impactait la réponse des BMDM au milieu ainsi produit. Nous avons obtenu des résultats similaires à ceux de l'OCM non-différencié : le milieu conditionné épithélial obtenu à partir du pôle basal (ECM) n'a pas induit l'expression de l'ARNm de l'Arginase 1 ni de *Mrc1*, mais a induit l'expression des gènes *CD5L*, *Slc40a1*, *KLF10* et *RORalpha* avec la même intensité que ceux obtenus avec l'OCM non-différencié (Figure 27A). De plus, ce milieu conditionné présente les mêmes capacités anti-inflammatoires concernant la régulation de l'expression d'iNOS induite par le LPS (Figure 27B). Ces résultats suggèrent que l'utilisation d'un épithélium 2D conviendrait à la suite de l'étude de par les nombreux avantages que ce modèle apporterait. Néanmoins, ces résultats sont préliminaires comme l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois (ce qui explique l'absence de significativité statistique des résultats) et une confirmation de ces derniers est nécessaire.

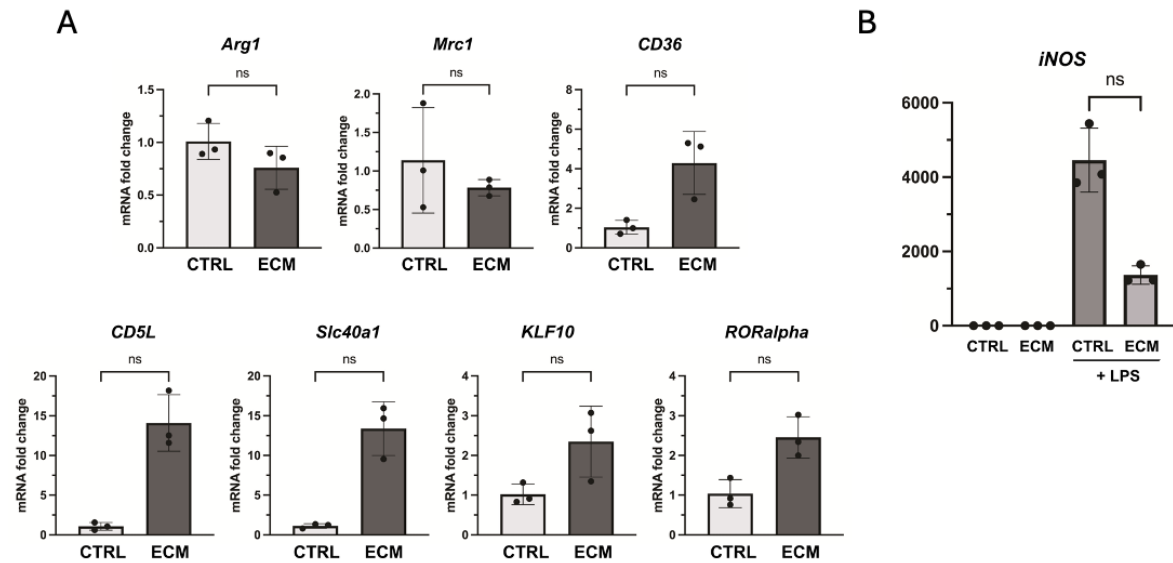


Figure 27 : Effet de l'OCM provenant d'organoïdes 2D sur des BMDM.

Analyse qPCR de l'expression **A.** des gènes d'intérêt de l'étude et **B.** d'iNOS dans des BMDM traités par l'OCM d'organoïdes 2D +/- LPS (100 ng/mL). Les données sont exprimées en moyenne +/- SD (n=3). ns, non significatif (Mann-Whitney).

B - L'OCM humain réduit la différenciation induite par le LPS des macrophages en M1

De manière complémentaire à nos résultats de cytométrie en flux sur les hMDMs, une étude préliminaire a également montré que l'OCM de patients induisait une diminution moyenne de 60% du pourcentage de macrophages M1 CD80⁺CD68⁺ (Figure 27). Ces résultats semblent confirmer l'effet observé chez la souris mais nécessiteraient l'inclusion d'un plus grand nombre de patients et permettraient potentiellement d'observer une différence entre les patients contrôles et RCH.

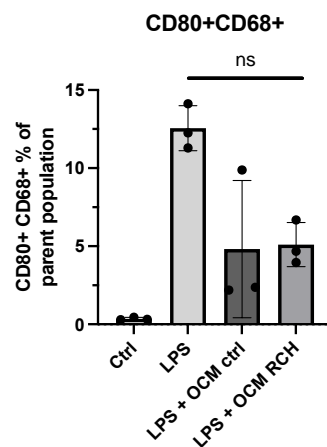


Figure 28 : Effet de l'OCM humain sur la polarisation des hMDM en M1.

Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules CD80/CD68 positives parmi les hMDM après stimulation avec de l'OCM +/- LPS (100 ng/mL) pendant 24 heures. Les données sont présentées en moyenne +/- SD (n = 4). ns, non significatif (Mann-Whitney).

Discussion et perspectives

Dans cette étude, nous avons développé un modèle de dialogue entre les cellules épithéliales coliques primaires de souris ou humaines et les macrophages. Ce modèle, basé sur l'utilisation d'un milieu conditionné d'organoïdes, a permis de mettre en évidence les propriétés immunorégulatrices des cellules épithéliales par le biais de leurs sécrétions solubles. Plus précisément, le milieu conditionné de colonoïdes de souris a induit une différenciation des BMDM vers un état anti-inflammatoire, caractérisé par une signature génétique "régulatrice" spécifique et unique associée à la régulation à la hausse de certains marqueurs anti-inflammatoires, notamment le CD5L. Nos résultats montrent que le CD5L joue un rôle essentiel dans le contrôle par l'OCM de la réponse iNOS induite par le LPS dans les BMDM. De plus, les macrophages humains traités avec le milieu conditionné de colonoïdes humains ont également montré des propriétés anti-inflammatoires en régulant l'expression de plusieurs cytokines inflammatoires. Enfin, nous avons constaté que l'OCM provenant de patients témoins, contrairement à celui de patients atteints de RCH, était capable de réduire l'expression du marqueur CD68 par les macrophages humains, ce qui souligne l'utilité de notre modèle pour identifier la production dérégulée de facteurs immunorégulateurs par les cellules épithéliales intestinales chez les patients atteints de MICI.

Modèle de stimulation par l'OCM pour étudier l'intestin *in vitro*

Au cours de la dernière décennie, des progrès significatifs ont été réalisés dans le développement de nouveaux modèles intestinaux *in vitro*. Notamment, les organoïdes tendent à mieux reproduire les caractéristiques intestinales, y compris l'architecture 3D de la crypte et de la villosité, la composition cellulaire, l'absorption et le métabolisme des médicaments (Taelman et al., 2022). Récemment, de nouveaux modèles de co-culture d'organoïdes intestinaux et de cellules immunitaires ont été développés pour mieux comprendre le rôle de l'épithélium dans la régulation immunitaire. (Bar-Ephraïm et al., 2020). À ce jour, seuls quelques modèles se sont concentrés sur la relation entre l'épithélium intestinal et les macrophages (Hahn et al., 2017; Jose et al., 2020; Kakni et al., 2022; Noel et al., 2017; Zhang et al., 2023) et aucun de ces travaux n'a utilisé d'organoïdes coliques. Ainsi, à notre connaissance, notre travail est le premier à se concentrer sur les fonctions homéostatiques et les propriétés immunorégulatrices de l'épithélium colique en utilisant des colonoïdes dérivés de souris et de patients. De plus, puisqu'il est bien reconnu que le dysfonctionnement des cellules épithéliales du côlon est une caractéristique de la RCH, nous émettons l'hypothèse que les colonocytes pourraient jouer un rôle important dans le développement de la RCH (Ojo et al., 2022) et que les colonocytes de patients atteints de RCH sont incapables de sécréter correctement les facteurs

normalement impliqués dans l'homéostasie de la muqueuse intestinale. Pour répondre à cette question, nous avons choisi de développer et d'étudier un modèle basé sur l'analyse de l'effet induit par le milieu conditionné d'organoïdes coliques, qui nous semble le plus adapté pour identifier les défauts de sécrétion de facteurs immunorégulateurs par les cellules épithéliales. L'effet des macrophages sur l'épithélium intestinal a été largement décrit (Cao et al., 2022; W. Chen et al., 2022) et a même été rapporté dans des modèles de co-culture (Kakni et al., 2022; Noel et al., 2017) et, évidemment, nous n'excluons pas que cette partie du dialogue entre les cellules épithéliales et myéloïdes joue un rôle important dans l'homéostasie intestinale et le développement des MICI. Néanmoins, notre modèle présente l'avantage d'être facile à mettre en place, hautement reproductible et spécifiquement conçu pour étudier l'effet des facteurs solubles sur les macrophages en éliminant les autres interactions (par exemple le contact direct et les sécrétions des macrophages) qui peuvent compliquer l'identification des mécanismes de régulation impliquant la sécrétion de facteurs solubles épithéliaux.

Effet de l'OCM sur la polarisation des BMDM

iNOS est un marqueur classique des macrophages inflammatoires chez la souris, dont l'expression est induite par la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes tels que le LPS (Jablonski et al., 2015; MacMicking et al., 1997). Nous avons montré dans cette étude que l'OCM était capable de contrôler fortement la réponse iNOS induite par le LPS à la fois dans la lignée cellulaire macrophagique (RAW 264.7) et dans les macrophages primaires (BMDM) de souris, ce qui confirme que notre modèle est capable de reproduire les propriétés immunorégulatrices de l'épithélium intestinal. De manière intéressante, l'inhibition d'iNOS induite par l'OCM persistait 24h après son retrait suggérant ainsi que l'OCM serait capable d'induire une modification durable des BMDM. Une des pistes possibles serait l'induction de modifications épigénétiques par l'OCM. A notre connaissance, ce type d'étude n'a jamais été réalisé sur un modèle similaire et serait donc intéressant à mettre en œuvre.

En condition non-inflammatoire, les BMDM traités avec de l'OCM ont également montré une augmentation significative et spécifique de gènes qui n'ont pas été retrouvés dans les macrophages M2 IL-4/IL-13. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que les cellules épithéliales intestinales ne sont pas capables de produire les cytokines IL-4 et IL-13 (principalement produites par les cellules Th2), mais façonnent les macrophages en produisant d'autres facteurs (c'est-à-dire IL-10, TGF-beta, IL-25, ...) (Cao et al., 2022; W. Chen et al., 2022; Peterson and Artis, 2014). La prochaine étape de notre travail consistera à identifier la contribution respective de ces cytokines lors de l'induction des profils de macrophages obtenus

dans notre modèle. Une approche ciblée de dosage dans l'OCM de ces molécules pourrait être réalisée par des technique d'ELISA.

Par ailleurs, il est reconnu que les CEI sont également capables de produire de petites molécules, autres que des cytokines, ayant des capacités immunorégulatrices. Par exemple, chez la souris, les cellules prolifératives des cryptes intestinales ont été décrites comme capables de produire de la corticostérone, un glucocorticoïde aux propriétés anti-inflammatoires (Cima et al., 2004). D'autres travaux, dont ceux du laboratoire, ont étendu cette observation à l'homme et démontré le défaut de production de cortisol intestinal chez les patients atteints de RCH (Bouguen et al., 2015; Sidler et al., 2011). À notre connaissance, la production de glucocorticoïdes endogènes par les organoïdes intestinaux n'a jamais été étudiée et mérite donc clairement d'être caractérisée dans notre modèle. Ainsi une approche ciblée de dosage des glucocorticoïdes dans le milieu conditionné par une technique d'ELISA permettra d'évaluer cette synthèse par les colonoïdes. D'un point de vue fonctionnel, la production de milieux conditionnés à partir d'organoïdes issus de souris déficientes pour la production de cortisol intestinal (souris *lrh1*^{-/-} (Coste et al., 2007) et/ou *Cyp11b1*^{-/-} (Mullins et al., 2009) par exemple) permettra d'apprécier l'impact des glucocorticoïdes sur la polarisation de nos macrophages.

En parallèle, face à la quantité d'acteurs potentiels, une approche non-ciblée d'identification des composés présents dans l'OCM serait également pertinente à développer. De manière intéressante, une étude sur un modèle similaire au notre utilisant du milieu conditionné provenant d'organoïdes murins d'intestin grêle a utilisé une technique non-ciblée de spectrométrie de masse afin d'identifier l'acide malique comme responsable (au moins en partie) de l'effet de immunorégulateur du milieu conditionné de l'épithélium de l'intestin grêle (Zhang et al., 2023). Une approche similaire utilisant la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS) pourrait être envisagée afin d'identifier plus précisément la composition de l'OCM dans notre modèle.

Profil transcriptomique des BMDM traités avec l'OCM

Alors que l'utilisation des organoïdes se généralise et que des modèles de co-culture/co-stimulation sont progressivement développés, peu d'études ont analysé les profils d'expression génique des cellules immunitaires « co-cultivées » avec les organoïdes afin, notamment, de les comparer avec les données obtenues *in vivo*. Nous avons comparé nos données RNAseq avec celles obtenues par Schridde et al (Schridde et al., 2017) qui ont exploré l'analyse transcriptomique de la série de différenciation monocyte-macrophage dans la muqueuse colique de souris normale. Nous avons observé que le profil transcriptomique de nos macrophages

traités à l'OCM était différent de celui obtenu *in vivo* dans les macrophages du côlon de souris, confirmant clairement que les cellules épithéliales seules n'étaient pas en mesure de reproduire complètement l'environnement colique trouvé *in vivo*. Néanmoins, l'OCM seul est capable d'induire l'expression de certains marqueurs classiques des macrophages M2 (*Arg1*, *Clec7a*, *Clec10a*) et, de façon intéressante, de facteurs de transcription dont l'activité est associée à la différenciation et/ou au maintien du phénotype M2 immunorégulateur des macrophages tels que PPARgamma (Yu et al., 2023), KLF10 (Papadakis et al., 2015), Notch4 (López-López et al., 2021) ou RORalpha (Nejati Moharrami et al., 2018). Ce dernier est particulièrement intéressant car il a été clairement démontré que ce récepteur nucléaire est impliqué dans le contrôle de l'état inflammatoire des macrophages (Nejati Moharrami et al., 2018), qu'il augmente la polarisation M2 des macrophages hépatiques et protège contre la NASH (Han et al., 2017) et que son rôle dans le côlon et au cours des MICI est peu étudié et mérite d'être approfondi. Ainsi, bien que simplifié, nous pensons que notre modèle peut conduire à l'identification de mécanismes et/ou de molécules impliqués dans la différenciation des macrophages intestinaux à l'état stable qu'il serait également intéressant d'explorer dans un contexte pathologique tel que les MICI.

Rôle de CD5L dans l'inhibition d'iNOS

Parmi les gènes spécifiquement induits par l'OCM, le CD5L semble particulièrement intéressant. Cette protéine est impliquée dans un large spectre de processus biologiques et de situations pathologiques (Yang et al., 2023). Bien que son rôle précis dans l'homéostasie tissulaire et la réponse immunitaire reste à caractériser, nos données montrent que l'OCM est capable d'induire l'expression et la sécrétion de CD5L par les macrophages murins et que la neutralisation de cette protéine dans le milieu de culture empêche l'inhibition de la production d'iNOS par l'OCM. Ces résultats sont en accord avec de précédents travaux qui ont initialement identifié le CD5L comme une glycoprotéine soluble appartenant à la superfamille des récepteurs scavenger riches en cystéine (Gebe et al., 1997) et ont démontré sa capacité à se lier au LPS et à le neutraliser (Sarrias et al., 2005). Plus important encore, cette protéine a récemment été impliquée dans la polarisation des macrophages vers un profil anti-inflammatoire M2 (Sanjurjo et al., 2018) ce qui renforce l'idée que dans notre modèle, l'OCM et, par conséquent, les facteurs solubles libérés par les cellules épithéliales du côlon, sont en effet capables de différencier les macrophages avec un profil anti-inflammatoire. Notre test de neutralisation de la protéine CD5L montre clairement que l'effet anti-inflammatoire de l'OCM observé sur la régulation de l'expression d'iNOS en présence de LPS implique le CD5L et, à

notre connaissance, il s'agit de la première description sur l'immunorégulation d'iNOS médiée par le CD5L. Bien que le mécanisme exact reste à déterminer, nous pouvons fortement supposer que cet effet implique l'inhibition de la capacité de neutralisation du LPS par le CD5L. Cependant, nous ne pouvons pas exclure d'autres mécanismes. Par exemple, il a été décrit que le CD5L recombinant induit la production de ROS dans les monocytes du sang périphérique. (Sanjurjo et al., 2018). Comme les ROS sont impliqués dans la régulation de la voie iNOS (Sun et al., 2010) on peut également supposer que la neutralisation du CD5L pourrait interférer avec ce mécanisme. En outre, il a été suggéré que le récepteur CD36 peut agir en tant que récepteur cellulaire pour le CD5L (Sanjurjo et al., 2015a). Comme nous avons observé une induction de l'expression du CD36 par l'OCM, nous pouvons également imaginer que la neutralisation du CD5L pourrait perturber les mécanismes cellulaires impliquant l'activation du récepteur CD36 par son ligand CD5L.

Pour la suite du projet, une première étape serait d'aller plus loin dans la caractérisation de l'effet régulateur du CD5L en utilisant par exemple du CD5L recombinant afin de stimuler des BMDM pour voir si une régulation d'iNOS est également présente et si oui, la comparer à celle observée lors du traitement avec l'OCM. Il serait alors possible de voir par cette technique si le CD5L seul permet d'induire la régulation d'iNOS ou bien s'il agit de concert avec d'autres molécules pour induire son effet. Une approche complémentaire utilisant des macrophages provenant de souris ayant subi une délétion spécifique pour le CD5L dans les cellules de moelle osseuse pourrait également être utilisée afin de mieux caractériser l'effet d'une inhibition totale de la voie CD5L sur la régulation des BMDM par l'OCM.

Une deuxième étape consisterait en l'identification des facteurs de l'OCM responsables de l'induction de l'expression de CD5L dans les BMDM. A ce jour, la régulation de l'expression de CD5L dans les macrophages est encore imparfaitement caractérisée. Néanmoins, il a été montré qu'elle implique les récepteurs nucléaires Liver X Receptors (LXRs) (Sanjurjo et al., 2015b). Cette famille de facteurs de transcription ligand-dépendants est naturellement activée par les dérivés oxydés du cholestérol (oxystérols) (Steffensen et al., 2013). D'autre part, une induction de l'expression de CD5L a également été décrite lors de la maturation d'hMDM via le GM-CSF (Amézaga et al., 2014). Ces molécules peuvent être produites par l'épithélium intestinal et pourraient donc induire l'expression de CD5L dans notre modèle (Ceglia et al., 2022; Egea et al., 2013). Afin de valider l'implication de la voie LXR dans la régulation de l'expression de CD5L que nous observons, nous pourrions utiliser des antagonistes de LXR qui ajoutés dans l'OCM, pourraient entrer en compétition avec les molécules activant LXR présentes dans ce dernier. Si la voie LXR est impliquée, nous pourrions alors doser les

oxystérols présents dans l'OCM par des techniques d'ELISA. De manière intéressante, les ligands de LXR tels que l'oxystérol peuvent également être produit de manière endogène (Fu et al., 2001) et leur production par les BMDM eux-mêmes sous l'influence de facteurs présents dans l'OCM pourrait également être possible. Afin de vérifier cette hypothèse, les voies d'oxydation du cholestérol pourraient être ciblées en inhibant les enzymes qui en sont responsables avec des inhibiteurs ajoutés dans l'OCM afin de voir si l'induction de l'expression de CD5L est abolie ou non.

Le ciblage de LXR est d'autant plus pertinent qu'en 2011, une étude cas-témoins dans une cohorte danoise a révélé que des variants du gène codant pour les LXRs confèrent un risque accru de développement de la RCH (Andersen, 2011). Depuis, les quelques études qui ont exploré le rôle des LXR au cours de l'inflammation intestinale ont suggéré un rôle anti-inflammatoire prometteur de ce récepteur dans des modèles expérimentaux de colite (Jakobsson et al., 2014; Miranda-Bautista et al., 2021). Dans ce contexte, le développement d'un modèle préclinique basé sur des organoïdes de patients offrirait l'opportunité de tester, chez l'homme, si la modulation de la voie LXR par des agonistes naturels ou synthétiques de ces récepteurs serait une approche intéressante pour un nouveau développement thérapeutique, et permettrait également d'élucider les détails des acteurs cellulaires impliqués.

CD5L chez l'Homme

Le rôle du CD5L chez l'homme dans l'intestin est moins bien documenté et reste à déterminer. À ce jour, une seule étude a porté sur le CD5L chez les patients atteints de MICI. Ces travaux suggèrent que les patients atteints de la maladie de Crohn ont des niveaux circulants de CD5L plus élevés que les patients atteints de RCH ou les volontaires sains, et proposent que le CD5L puisse participer à l'inflammation intestinale chez les patients atteints de la maladie de Crohn en inhibant l'apoptose des macrophages (Ono et al., 2017). Nos données chez la souris et celles obtenues récemment par d'autres suggèrent au contraire que le CD5L participe à l'homéostasie de la réponse immunitaire en contrecarrant la réponse inflammatoire, notamment celle induite par le LPS. Malheureusement, nous n'avons pas pu détecter d'induction significative de l'expression de CD5L par le milieu conditionné de colonoïdes de patients (contrôle ou RCH) dans nos macrophages humains dérivés de monocytes (données non-montrées), ce qui suggère que le mécanisme de régulation semble être différent de celui observé dans le modèle murin et reste à élucider. La question de la régulation du CD5L au sein de la muqueuse colique humaine mérite clairement d'être approfondie, et nous prévoyons notamment d'analyser l'expression du CD5L directement chez les patients atteints de MICI.

Un rôle de la ferroportine dans la régulation des macrophages ?

La ferroportine (*Slc40a1*) fait partie des gènes dont l'expression est la plus fortement modifiée dans notre analyse par RNA sequencing. La ferroportine est une protéine impliquée dans le recyclage du fer et notamment celui acquis par les macrophages via la dégradation des érythrocytes sénescents ou endommagés (érythrophagocytose). Son action est inhibée par l'hépcidine (Donovan et al., 2005). De manière intéressante, une étude a montré qu'une surexpression de la ferroportine dans les macrophages murins J774 induisait une diminution de la production de la protéine iNOS en réponse à une stimulation par le LPS (Johnson et al., 2010) suggérant un rôle de la ferroportine dans la régulation d'iNOS en contexte inflammatoire. Des études supplémentaires sur l'implication de la ferroportine dans la régulation d'iNOS dans notre modèle serait intéressantes et permettraient de mieux comprendre le rôle de cette protéine et du métabolisme du fer dans la régulation de l'inflammation.

Les MICI sont associées à une déficience en fer chez un grand nombre de patients (jusqu'à 76% des patients selon les études) (Peoc'h et al., 2021). Cette déficience en fer peut être provoquée par une augmentation de l'hépcidine induite par l'inflammation présente au niveau de l'intestin. Plus précisément, une augmentation de la production des cytokines inflammatoires (et notamment de l'IL-6) semble induire l'augmentation de la production de l'hépcidine inhibant ainsi l'action de la ferroportine (Al and Yz, 2017). Néanmoins, une étude récente rapporte une légère augmentation de l'hépcidine chez les patients MICI avec une grande hétérogénéité entre les patients (Soltanieh et al., 2024). En outre, cette étude suggère que des études sur un plus grand nombre de patients seraient nécessaires pour déterminer l'implication de cette molécule dans les MICI.

A ce jour, les recherches spécifiques sur l'expression ou la régulation directe de la ferroportine chez les patients MICI sont limitées. Une étude de l'expression de l'axe ferroportine/hépcidine au niveau intestinal et de la régulation par l'épithélium de l'expression de la ferroportine pourrait permettre de mieux comprendre la dérégulation de cet axe au cours des MICI.

Effet de l'OCM humain sur les macrophages

La relation entre les organoïdes du côlon humain et les macrophages n'a pas encore été pleinement explorée et très peu de modèles ont été établis à ce jour. Dans les MICI, comme la RCH, l'épithélium intestinal joue un rôle crucial dans le développement de la pathologie et de nouveaux modèles sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents (Martini et al., 2017b; Ojo et al., 2022; Parikh et al., 2019). Notre objectif final étant de mieux

comprendre le rôle des sécrétions des cellules épithéliales dans la régulation de la fonction macrophagique et de voir si le défaut de la fonction épithéliale rapporté chez les patients atteints de RCH pourrait affecter ce mécanisme, nous avons transposé notre modèle de stimulation par l'OCM à l'homme (échantillons de patients non-atteints de MICI et de patients atteints de RCH). Nos résultats ont montré qu'en présence de LPS, les macrophages humains présentaient une diminution similaire de l'expression de ces marqueurs à la fois avec l'OCM de patients contrôles et des patients atteints de RCH, confirmant que les cellules épithéliales du côlon humain présentent également des propriétés immunorégulatrices vis-à-vis des macrophages. La *lamina propria* de l'intestin inflammé des patients atteints de RCH est largement infiltrée par des cellules monocytaires CD68+, et l'équilibre des sous-populations de macrophages est modifié en faveur d'un état pro-inflammatoire (Lissner et al., 2015b). Notre étude a montré que l'OCM de patients atteints de RCH ne parvenait pas à contrôler l'induction de CD68 induite par le LPS dans les macrophages, alors que l'OCM de patients non-atteints de RCH conservait cette capacité, ce qui suggère que notre modèle peut aider à identifier les défauts dans les propriétés immunorégulatrices de l'épithélium colique chez les patients souffrant de RCH. L'environnement de culture et les procédures expérimentales étant standardisés, l'explication la plus probable pourrait être que les organoïdes de patients atteints de RCH présentent une modification génétique ou épigénétique susceptible d'affecter la voie de régulation du CD68. Il convient de noter que ces modifications (épi)-génétiques persistent dans les organoïdes de patients atteints de MICI et sont stables dans le temps (Lucafò et al., 2022). Cette analyse permet d'étudier rétrospectivement les organoïdes identifiés comme dysfonctionnels et de caractériser le mécanisme cellulaire et moléculaire à l'origine du défaut.

La trajectoire de développement des modèles organoïdes de patients atteints de MICI est de se complexifier en intégrant de multiples types cellulaires dans le but de ne pas "simplement" modéliser l'épithélium, mais plutôt de reproduire la complexité de la muqueuse intestinale, et d'offrir l'opportunité de développer des outils précliniques chez l'homme et d'améliorer les traitements actuels ou d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques. Dans ces modèles, la détermination de la régulation de gènes jusqu'alors mal caractérisée au cours de l'homéostasie intestinale ou du développement des MICI pourrait conduire à l'exploration de nouvelles voies de signalisation. L'identification du gène CD5L dans notre étude illustre bien ce processus. Ainsi, grâce aux progrès de la technologie de culture d'organoïdes provenant de patients atteints de MICI et à la complexité croissante des systèmes de modélisation de la muqueuse intestinale, les colonoïdes ont de nombreux atouts pour conduire à un modèle pertinent de RCH qui pourrait être intégré dans une future stratégie de médecine de précision.

Développement de modèles d'organoïdes 2D

Bien que notre modèle présente de nombreux avantages (reproductibilité, facilité de mise en place et de production de l'OCM), il présente aussi différentes limites : (1) l'impossibilité de traiter les organoïdes par le pôle apical simplement (micro-injection obligatoire), (2) l'impossibilité de traiter les organoïdes sans que le traitement ne soit retrouvé dans l'OCM et (3) l'impossibilité de co-cultiver directement les macrophages avec les organoïdes. L'axe de développement le plus prometteur du projet est l'utilisation d'un modèle 2D d'organoïdes. En effet, ce modèle bien que plus complexe à mettre en œuvre consiste en l'utilisation d'une membrane semi-perméable supportant la croissance de l'épithélium. L'utilisation d'organoïdes 2D permet de délimiter deux compartiments ouvrant ainsi la possibilité de traiter les cellules épithéliales au pôle apical et de récupérer l'OCM dans le compartiment basal sans que la molécule utilisée pour le traitement ne soit retrouvée dans l'OCM ainsi produit. On peut alors imaginer utiliser des molécules pour stimuler/inhiber des fonctions de l'épithélium, ajouter des bactéries ou bien encore mimer l'inflammation de l'épithélium afin de caractériser l'effet de ces conditions sur les sécrétions des cellules épithéliales. De plus, ce modèle ouvre la voie à la co-culture directe entre les cellules épithéliales et les macrophages (ou d'autres cellules) qui pourront soit être cultivés au fond du puits soit directement sur l'autre face de la membrane semi-perméable permettant une interaction directe cellules-cellules (Noel et al., 2017).

De manière intéressante, nos données préliminaires ont montré que l'OCM de colonoïdes murins récolté au pôle basal des organoïdes 2D produisait un effet similaire à celui de l'OCM d'organoïdes 3D validant ainsi la possibilité de l'utilisation de ce modèle pour continuer notre projet. Néanmoins, ce modèle est plus difficile à mettre en place et depuis cette expérience préliminaire nous n'avons pas réussi à produire de nouveau des organoïdes 2D chez la souris.

Pertinence du modèle pour étudier le défaut de l'épithélium dans la RCH

Enfin se pose la question de savoir si notre modèle est pertinent pour identifier de potentiels défaut de régulation des macrophages par l'épithélium chez les patients atteints de RCH.

Du point de vue de nos résultats, bien que nous n'ayons pas identifié de différence claire entre les patients contrôles et RCH dans la régulation de l'expression et la production de cytokines inflammatoires par l'OCM dans les hMDM, des tendances sont observées pour l'IL6. De plus, grâce à notre modèle, nous avons pu identifier un défaut de régulation de l'expression de CD68 avec l'OCM de patients atteints de RCH soulignant un défaut de régulation de ce marqueur par rapport aux contrôles.

D'un point de vue plus global, les organoïdes semblent tout à fait adaptés pour étudier les dysfonctionnements des cellules épithéliales chez les patients atteints de MICI. En effet, des études récentes ont mis en avant l'utilisation des organoïdes pour étudier les modifications génétiques et épigénétiques des cellules épithéliales impactant notamment la fonction de la barrière épithéliale qui sont conservées dans les organoïdes et perdurent au cours du temps (Lucafò et al., 2022).

En conclusion, bien que nos résultats aient encore besoin d'être étoffés en incluant un plus grand nombre de patients à l'étude, l'ensemble de nos données ainsi que les différentes études disponibles dans la bibliographie suggèrent que les modèles organoïdes, y compris le nôtre, sont des outils prometteurs pour la caractérisation des dysfonctionnements de l'épithélium intestinal chez les patients atteints de RCH.

Conclusion

Dans un contexte où la réduction de l'utilisation de modèles *in vivo* est une priorité, ce travail de recherche a permis de développer un modèle *in vitro* innovant combinant des organoïdes coliques et des macrophages. Ce modèle a permis de mieux comprendre le rôle clé de l'épithélium dans la régulation des macrophages au niveau du côlon. Notamment, il a conduit à l'identification d'une nouvelle voie de régulation d'iNOS dans les macrophages, soulignant ainsi la pertinence de tels modèles pour explorer le dialogue entre cellules épithéliales et immunitaires. Ces résultats ouvrent également la voie à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour les maladies inflammatoires intestinales. Par ailleurs, notre étude montre que ce modèle peut être utilisé pour identifier des dysfonctionnements épithéliaux spécifiques chez les patients atteints de MICI, offrant ainsi de nouvelles perspectives pour mieux comprendre et traiter cette pathologie.

Annexes

Annexe 1 - Article de recherche original

Relevance of mouse and human IBD patients-derived colon organoids to investigate intestinal macrophage differentiation

Maxime Costa¹, Muriel Pottier¹, Marie Jacob¹, Pauline Zarnitsky¹, Benjamin Segain¹, Martin Figeac², Shéhérazade Sebda², Frédéric Leprêtre², Bertrand Meresse¹, Julie Demaret¹, Benoît Folligné¹, Annie Standaert^{1,3}, Benjamin Bertin^{1,3}

¹Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 - INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France

²Plateau de Génomique Fonctionnelle et Structurale, CHU Lille, Univ. Lille, Lille France.

³equally contributing senior authors

Correspondence:

Benjamin Bertin, INFINITE U1286 Inserm Université de Lille

Service d'immunologie, Faculté de Pharmacie – 3 rue du Pr. Laguesse – 59000 Lille – France

benjamin.bertin@univ-lille.fr - +33 (0)3 20 96 49 60

ABSTRACT

The gastrointestinal tract is a remarkable example of complex biology, with a constant dialogue between the intestinal epithelium, in close contact with the microbiota, and the immune cells that protect the gut from infection. Organoids have revolutionized our approach to modelling the intestinal cellular compartment and have opened new avenues for unravelling the mechanisms involved in intestinal homeostasis and chronic pathogenesis such as inflammatory bowel disease. To date, few models have been established to explore the role of the colon, which is however the main site of inflammation in ulcerative colitis (UC). Here, we used conditioned media produced by colon organoids (OCM) from mice or human (control and UC patients) to investigate the relationship between macrophages and the colon epithelium. We addressed transcriptomic profiles of OCM-stimulated bone marrow-derived macrophages and found that these cells exhibited a unique anti-inflammatory signature distinct from that of conventional *in vitro* IL-4/IL-13 M2 differentiated macrophages. In addition, OCM induced a clear CD5 antigen-like-mediated immunoregulatory effect characterized by a significant reduction in LPS-induced iNOS expression. In line, OCM from human colons inhibited LPS-dependent inflammatory cytokine expression in human monocytes-derived macrophages. Interestingly, the inflammatory marker CD68 was reduced by OCM from control patients but not from UC patients, suggesting epithelial dysfunction in UC patients. Our results report new regulatory mechanisms in the colon and highlight the importance of developing new *in vitro* models to better characterize the relationship between the intestinal epithelium and immune mucosal cells.

Summary sentence:

Using mouse and human organoid conditioned media, we showed that colon epithelial cells shape macrophages through a unique anti-inflammatory profile.

Keywords (3 – 5):

Colonic organoids – intestinal epithelial functions – macrophages – *in vitro* model - inflammatory bowel disease

INTRODUCTION

Coordinated interaction between epithelial and immune myeloid cells is critical to mucosal homeostasis within the gut. One of the major immune cells involved in this dialogue is the macrophage¹. As a critical component of the innate immune system, macrophages are involved in various physiological processes, including pathogen recognition, clearance of cellular debris, tissue repair, and modulation of immune responses²⁻⁴. Their distribution throughout various tissues allows them to carry out a wide range of functions essential for maintaining the overall health and integrity of the organism⁵⁻⁷.

In the digestive tract, macrophages play an essential role in maintaining immune defense and intestinal homeostasis⁸⁻¹⁰. Under physiological conditions, these functions require a constant and harmonious dialogue between these immune cells and the intestinal epithelial cells (IECs)^{1,11}. The disruption of these reciprocal exchanges is often associated with the development of chronic digestive pathologies, such as inflammatory bowel diseases^{1,11}. Understanding the molecular pathways involved in the collaboration between macrophages and IECs might lead to the development of new therapeutic targets that would promote tissue regeneration and repair^{12,13}.

To address this issue, various *in vitro* models have been developed using different intestinal immortalized human cell lines (Caco-2, HT-29, T84, ...), co-cultured with monocyte cell lines (RAW264.7, THP-1, J774)¹⁴⁻¹⁶. These models have the advantage of being relatively simple to implement and reproducible, and their development has enabled the identification of several key events involved in this inter-cellular dialogue. However, these cells also have the disadvantage of being derived from tumors and may therefore have heterogeneous genetic alterations that do not reflect normal cell behavior. In addition, the lack of tissue architecture in these models necessarily reduces our ability to characterize the real biological processes, which take place in healthy tissues *in vivo*.

Recently, the organoid technology has revolutionized these *in vitro* approaches by enabling the establishment of three-dimensional models that reproduce the cellular heterogeneity, structure and functions of native's tissues¹⁷. The promise of this technology is based on the ability to produce and cultivate *in vitro* a simplified organ with a realistic architecture, allowing to mimic certain pathologies and to develop the discovery of new treatments by limiting the use of animal models, as well as developing regenerative or personalized medicine¹⁸⁻²⁰. From a more fundamental point of view, these new *in vitro* culture models open up the perspective of better characterizing the cell-cell interactions involved in tissue homeostasis in a more physiologically

relevant context than hitherto possible using the tools available to date. To this end, complex models that include innate myeloid cells co-cultured with intestinal organoids or stimulated by organoids conditioned medium were recently developed ²⁰. For example, co-culture of mouse bone marrow-derived macrophages with small intestine organoids showed that macrophages were sensitive to factors released by the epithelium, polarizing them towards an anti-inflammatory phenotype with an increased expression of M2-type markers (e.g. Mrc1, Ym1, IL10, Arg1) and a decrease in the production of several inflammatory cytokines (e.g. IL-1b, IL-6, IL-12, TNF- α) ^{21,22}. In a human enteroid/myeloid cells co-culture model, it has been reported that blood monocytes were able to migrate towards epithelial cells, thus recapitulating the chemotaxis observed *in vivo* ²³. In an infectious context, the interaction between macrophages (derived from human peripheral blood monocytes) and epithelial cells from an enteroid monolayer was able to strengthen the epithelial barrier and induce a tolerogenic environment by controlling the production of inflammatory cytokines in response to the presence of pathogenic bacteria ²⁴.

The promise of these new models is also particularly attractive in the context of inflammatory bowel diseases, and in particular ulcerative colitis (UC), in which molecular and cellular dysfunctions of the colonic epithelial tissue play an active role in the development of the pathology ²⁵⁻²⁷. For example, it is now well established that polymorphisms within genes involved in epithelial proliferation and barrier as well as wound repair (HNF4A, CDH1, LAMB1, PTGER4) are specifically associated with the risk of developing UC ²⁸⁻³⁰. Furthermore, we and others have clearly characterized defects in the production of anti-inflammatory molecules (glucocorticoids for instance) or anti-microbial peptides in epithelial cells of UC patients, specifically associated with a loss of immunoregulatory factor activity such as PPARgamma ³¹⁻³³. Despite this, the functional consequences of these defects are still poorly studied or understood in disease pathogenesis. As a model of the colonic epithelium, colonoids hold great promise for research dedicated to the physiology of the large intestine as well as the pathophysiology of UC ²⁵. Whereas, colonoids derived from mouse large intestine and from UC patients are now well established ^{34,35}, only few studies have explored these models to decipher the cellular and molecular dialogue between colonic epithelial and myeloid cells. Thus, in this study, we aimed to develop a model for assessing the importance of soluble factors produced by colonic epithelial cells in macrophage differentiation/polarization. To this end, we cultured different types of macrophages in presence of murine and human colonoid conditioned medium, then assessed the response of these macrophages to an inflammatory

stimulus, as well as studied the transcriptomic profile of these cells by RNA-seq. Our results demonstrated that murine colonoid conditioned medium can differentiate anti-inflammatory macrophages with a unique transcriptomic signature different from that of “classic” alternatively activated macrophages (M2 macrophages). The relevance of the model was further supported by the finding that conditioned human colonoid medium from non-IBD patients can also induce an anti-inflammatory response in LPS-stimulated human macrophages, whereas conditioned colonoid medium from UC patients showed reduced regulatory activity.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

The animal experiment ethics committee approved the experimental animal study protocol (APAFIS#40805-2023020311123046 v4).

For experiments with human samples, a local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Nord Ouest IV, CHRU Lille, France) approved the study and all subjects gave informed consent (No. DC-2008-642). Surgical colonic samples were obtained from patients with an established diagnosis of UC according to international criteria (sigmoid colon (n=3) ; right colon (n=3) ; left colon (n=4)) and from control patients (patients underwent surgery for colorectal cancer (n=4) and patients for diverticulitis of the sigmoid (n=1)). Colonic crypts were isolated from colonic resection in non-inflammatory or macroscopic healthy zone of tissue to generate organoids.

Murine organoids preparation

Colons were collected from 7-week-old male C57BL/6 mice (Janvier-labs) after euthanizing by cervical dislocation. After isolation, the colon was rinsed twice with ice-cold PBS 1X, followed by a quick wash with ethanol and finally with PBS 1X again. The colon was then cut into 2 mm pieces and placed in a conical tube containing 15 mL of PBS + DTT (10mM). The pieces of intestine were then pipetted up and down three times before the supernatant was removed. The samples were then transferred to a tube containing 30 mL of PBS + EDTA (8mM) and stirred at 4°C for 1 hour. Finally, after removing the supernatant, 10 mL of ice-cold PBS was added before pipetting up and down to separate the crypts from the intestinal pieces. The supernatant containing crypts was then filtered through a 70 µm filter. After a final centrifugation at 70g for 5 minutes, 10 mL DMEM was added to the pellet and crypts were counted. To produce organoids, crypts were suspended with Matrigel (Corning, ref. 356234) diluted 2:1 in culture medium at a ratio of 1000 crypts per 30 µL of diluted Matrigel (= 1 dome). The mixture was then added dropwise to tissue culture treated 24-well plates. After Matrigel polymerization at 37°C and 5% CO₂ for 15 min, culture medium consisting of advanced DMEM/F-12 medium (Gibco, ref. 12634010) + Glutamax 1X (Gibco, ref. 35050-038) + 50% L-WRN conditioned medium + 10% fetal bovine serum (FBS) + 1% penicillin/streptomycin (P/S) + 1% amphotericin B (Gibco, ref. 15290026) was added to the Matrigel dome. Y-27632 (Tocris, ref. 1614) and SB-431542 (Tocris, ref. 1254) inhibitors were also added to the culture medium for

the first two days of culture. The medium was refreshed every 2 days. Organoids were passaged every 5-7 days using Tryple dissociation reagent (Gibco, ref. 12604-013).

Human organoids preparation

Human organoid cultures were established from colonic tissues collected after surgery in control patients (cancer, diverticulitis) or ulcerative colitis patients. The first step was to separate the mucosa from the submucosa using scissors. The mucosa was then cut into 4 mm² pieces and placed in chelating solution (Na₂HPO₄ 5.6 mM, KH₂PO₄ 8 mM, NaCl 92.2 mM, KCl 1.6 mM, sucrose 43.4 mM, D-sorbitol 54.9 mM) + DTT 0.5 mM. After pipetting the intestinal pieces up and down, the supernatant was replaced with a new one containing 0.5 mM EDTA and incubated for 1 hour at 4°C with shaking. Finally, the supernatant was discarded and replaced with chelating solution + 20% FBS. The samples were pipetted up and down several times to separate the crypts from the tissue. The supernatants containing crypts were collected, filtered through a 100 µm filter and centrifuged at 300 g for 5 min at 4°C. After removal of the supernatant, the pellet was washed once with advanced DMEM/F12 (Gibco, ref. 12634-010). These crypts were counted and then embedded in Matrigel diluted 2:1 with human Intesticult medium (Stemcell, ref. 06010) at a ratio of 1000 crypts per 30 µL of diluted Matrigel. After polymerization at 37°C and 5% CO₂ for 15 minutes, Intesticult medium was added to the wells. As with murine organoids, Y-27632 and SB-431542 inhibitors were added for the first 2 days of culture and the medium was refreshed every 2 days. Passages were performed after 7 to 9 days of culture using TrypLE dissociation reagent.

Organoid conditioned medium (OCM)

The mouse and human colonic organoids used in this study were at passage 6 to 9 when the conditioned medium was collected. The time of collection of the conditioned medium was day 7 of culture for mouse organoids and day 7 to 9 for human organoids (depending on the patient, the time of collection was affected). The conditioned medium was a 48-hour old organoid culture medium which was then filtered through a 0.22 µm filter. Due to the variation in collection time, all media were then frozen at -20°C prior to use.

Cell culture and stimulation

After thawing, 2 x 10⁶ L929 cells were seeded in a 150 cm² cell culture flask containing DMEM + 10% FBS + 1% P/S culture medium, incubated at 37°C, 5% CO₂ and allowed to reach 70% confluence. The cells were then passaged by rinsing with PBS 1X before treatment with trypsin

and incubation at 37°C for 5 minutes. After stopping the trypsin effect by adding fresh culture medium, the cells were centrifuged at 500g for 5 minutes to remove the supernatant before dividing into 4 new flasks. This process was repeated once to obtain the desired number of flasks. After final passage, the cells were cultured for 10 days to produce the conditioned medium. On day 10, the medium was collected, centrifuged at 1000 g for 5 min to remove debris, and the supernatant was filtered through a 0.22 µm filter. The conditioned medium was then stored at -80°C.

After thawing, 2.10^6 L-WRN cells were seeded in a 150 cm² culture flask containing DMEM + 10% FBS + 1% P/S culture medium and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24 hours. The culture medium was then replaced with fresh culture medium containing geneticin (Sigma-Aldrich, ref. G8168) and hygromycin B (Invitrogen, ref. ant-hg-1). The cells were then incubated at 37°C, 5% CO₂ for 2-3 days to reach confluence. Cells were then passaged by the classical trypsin method described above and divided into 5 new flasks containing culture medium without geneticin and hygromycin B, which were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 3-4 days. When the cells reached over-confluence (some cell aggregates begin to detach from the cell layer), the cells were rinsed and the medium was replaced with a culture medium containing Advanced DMEM/F-12 + Glutamax + 20% FBS + 1% P/S and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 1 day. Conditioned culture medium was collected, centrifuged at 2000g for 8 minutes, then filtered through a 0.22µm filter and fresh medium was added to flasks. This harvesting procedure was repeated each day for 4 days.

The murine RAW 264.7 macrophage cell line (ATCC® TIB-71™) was grown to confluence in DMEM + 10% FBS + 1% P/S in 150 cm² flasks. Passages were performed every 5 days by the classical scrapping method. For cell stimulation, cells were seeded in 24-well plates at a density of 3×10^5 cells per well and allowed to attach overnight before the experiment.

Mouse bone marrow-derived macrophages (BMDM) were obtained as follow: bone marrow precursors were isolated from the femur and tibia of 7-weeks old male C57BL/6 mice (Janvier-labs) and then filtered through a 70 µm filter prior to erythrocyte lysis by treatment with RBC lysis buffer (Invitrogen, ref. 00-4333) for 1 minute according to the manufacturer recommendations. Cells were then seeded into a 75 cm² flask at a density of 1.5×10^7 cells in 15 mL DMEM + 10% FBS + 20% L929 conditioned medium. On day 2, the medium was changed and on day 5 the cells were split into 2 flasks to allow proliferation. At day 7, cells were ready to use. For cell stimulation, cells were seeded in 24-well plates at a density of 1.5×10^5 cells per well and allowed to attach overnight before the experiment. Polarization of

macrophage culture into M2 was achieved by incubating cells with 20 ng/mL of IL-4 and IL-13 for 24h.

Human macrophages-derived monocytes (hMDMs) were obtained as follow: peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from fresh blood samples (<24h) of healthy donors purchased from the French Blood Establishment (EFS). Blood samples were homogenized and then diluted 1:1 in RPMI medium (Gibco, ref. 21875034). Samples were then placed on a Pancoll (Pan-biotech, ref. P04-60500) at a ratio of 2:1 and centrifuged at 400 g for 30 minutes at room temperature (RT) with an acceleration of 4 and no brakes. PBMC rings were then collected and transferred to tubes containing RPMI medium and centrifuged at 400 g for 7 minutes at RT. Cells were washed once with RMPI and centrifuged under the same conditions as before. Monocytes were then counted using CD45 and CD14 staining on a DXFlex (Beckman Coulter) cytometer (list of antibodies in Supplemental table 3). PBMC were seeded into 12-well plates containing RPMI using the previous count to ensure that $3.5 \cdot 10^5$ monocytes were present in each well. Plates were incubated at 37°C for 1 hour to allow monocytes to adhere. The cells were then gently washed three times with fresh RMPI medium to remove unattached cells before RPMI + 10% FBS + 1% P/S containing 20 µg/mL M-CSF (R&D Systems, ref. 216-MC) was added to the wells. The cells were then incubated at 37°C, 5% CO₂. The cells were washed three times with RPMI, and the medium was replaced with culture medium without M-CSF on day 3. On day 6, the cells were washed just prior cell stimulation. For cell stimulation, macrophages (RAW 264.7, BMDM, hMDMs) seeded in 12- or 24-well plates were exposed to OCM +/- LPS (100 ng/mL) for 6 or 24 hours. Culture media that have not been in contact with organoids were used as controls. For BMDM experiments, all media used (control medium or OCM) were diluted with 20% of L929 conditioned medium. After stimulation, the cells were washed once with PBS 1X and used for the different analyses.

Quantification of macrophage elongation

For examination of the macrophage morphology, cells were photographed using Leica DMIL LED microscope with a K3 camera (Leica) at a 10X magnification. Elongation of macrophages were quantified by measuring the length and the width of each cell of 5 and 6 fields in two independent experiments using with ImageJ2 software. The elongation factor was then calculated for each cell and represent the length divided by the width. A mean of the values for each field were then calculated and plotted.

RNA isolation and qRT-PCR

RNA samples were isolated either with the NucleoSpin RNA Extraction Kit (Machery-Nagel ref. 740955) for RAW 264.7 or with the NucleoSpin RNA XS plus Kit (Machery-Nagel ref. 740990) for BMDM and hMDMs, according to manufacturer's instructions. The Qubit 3 fluorometer device (Invitrogen) and the RNA Broad range assay kit (Invitrogen, ref. Q10211) were used to dose RNA samples. Total RNA was converted into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, ref. 4368814) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR assays were performed using Fast SYBR Green Mix (Applied Biosystems, ref. 4385612) and the Quantstudio 3 instrument (Applied Biosystems). Analysis of qPCR signals was performed using ΔC_t relative quantification method using GAPDH as a reference gene. All primers used in these experiments are listed in the supplemental table 2.

Immunofluorescence staining

BMDM were fixed overnight at 4°C with 4% paraformaldehyde buffered (Micom Microtech, ref. 40877-36), washed twice with PBS, permeabilized for 5 minutes with PBS + 0.1% Triton 100X (Sigma-aldrich, ref. X100). Non-specific binding sites were blocked by incubation with FBS 10% in PBS for 30 minutes at RT. Macrophages were labelled with primary antibodies in PBS overnight at 4°C, then washed three times with PBS + 0.1% Tween20 (Fisher, ref. BP337) and once with PBS before labelling with secondary antibodies, DAPI and phalloidin in PBS for 1h at RT. All antibodies, fluorescent reactive and dilutions are listed in the supplementary data. Finally, macrophages were washed twice in PBS and visualized with a CD7 (Zeiss) at 20× magnification. Image processing was performed using Zen software (Zeiss) and ImageJ2. List of reagents and antibodies used in this experiment are listed in the supplemental table 3.

Western blot

RAW 264.7 cells were seeded in a 24-well plate at a density of 3×10^5 cells per well and allowed to attach overnight. Cells were then exposed to OCM +/- LPS (100ng/mL) for 15 minutes, washed with PBS and then lysed in RIPA buffer (Merck, ref. 20-188) containing protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, ref. P8340) for 1 hour on ice. The lysates were then centrifuged at 11000 g for 5 minutes at 4°C and the protein-containing supernatant was collected. The protein concentration was determined using the Qubit Protein Assay kit (Invitrogen, ref. Q33211). Proteins were denatured in Laemmli SDS sample buffer (Alfa Aesar, ref. J60015) at 100°C for 5 minutes. Protein samples (30 μ L) were separated onto a 12% Tris-

glycerin gel (Invitrogen, ref. XP001120BOX), then transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was then blocked using 5% milk in PBS + 0,1 % tween for 1 hour under agitation at RT. The membrane was then rinsed three times with PBS + 0,4 % Tween20 for 5 minutes under agitation before incubation with primary antibody overnight at 4°C under agitation (antibodies references and dilutions are listed in the supplemental data) . The membrane was then rinsed again three times before the secondary antibody was added for 1 hour at RT. After washing, the membrane was incubated with Novex ECL substrate reagent (Invitrogen, ref. WP20005) under agitation at RT in the dark for 10 minutes. The results were read on the Fusion FX (Vilber) imaging device. The signals intensities were quantified using ImageJ2 software. Antibodies used in this experiment are listed in the supplemental table 3.

Flow cytometry

Cells were harvested with a cell scraper and washed in PBS 1X, then transferred to a conical tube containing 100 µL of PBS + 2% FBS per million cells and incubated for 10 min at 4°C. After incubation, the cells were centrifuged at 500 g for 8 minutes at 4°C. The supernatant was then removed before antibody mixture was added to a final volume of 20 µL per sample and incubated for 25 minutes at 4°C in the dark. 50 µL of BD FACS lysing solution (Fisher, ref. 10141013) was then added to each sample to fixate them and allowed to stand for 5 minutes at room temperature in the dark. Finally, the cells were washed in PBS 1X, centrifuged at 500 g for 8 minutes at 4°C and 300 µL of PBS was added to each sample. Cells were then analyzed using the Cytoflex (Beckman Coulter) cytometer. Results were analyzed using FlowJo v10.10 software (BD biosciences). Antibodies used in this experiment are listed in the supplemental table 3.

RNA-sequencing

BMDM used for the RNA-sequencing were seeded at a density of $1,5 \cdot 10^5$ cells per well in 12-well plates and exposed to OCM or 20 ng/mL of IL-4 and IL-13 for 24 hours. Each condition was performed in quadruplicate. Construction of sequencing libraries starting from 4µL of total RNA, 1µL of ERCC spike-in control was added to RNA samples. Library generation was then initiated by oligo dT priming, from total RNA (between 50 and 200 ng). The primer already contains Illumina-compatible linker sequences. After first strand synthesis the RNA was degraded, and second strand synthesis was initiated by random priming and a DNA polymerase. The random primer also contains 5' Illumina-compatible linker sequences. At this step Unique Molecular Identifiers (UMIs) were introduced allowing the elimination of PCR duplicates

during the analysis. After obtaining the double stranded cDNA library, the library was purified with magnetic beads and amplified. During the library amplification, the barcodes and sequences required for cluster generation (index i7 in 3' and index i5 in 5') were introduced due to Illumina-compatible linker sequences. The number of cycles depends on the starting quantity: between 14 cycles for 200 ng of total RNA and 16 cycles for 50 ng of total RNA. The final library was purified and deposited on High sensitivity DNA chip to be controlled on Agilent bioanalyzer 2100. The library concentration and the size distribution were checked. Each library was pooled equimolarly, and the final pool was also controlled on Agilent bioanalyzer 2100 and sequenced on Nova 6000 (Illumina) with 100 cycles chemistry. Chip used were a flowcell S2 with a 100 cycles kit version 1.5.

Data analysis for transcriptomic data

To eliminate poor quality regions and poly(A) of the reads, we used the fastp program. We used quality score threshold of 20 and removed the reads shorter than 25 pb. The read alignments were performed using the STAR program with the genome reference mouse (GRCm39) and the reference gene annotations (Ensembl). The UMI (Unique Molecular Index) allowed to reduce errors and quantitative PCR bias using fastp and umi-tools. Based on read alignments, the number of molecules by gene was counted using FeatureCount. Other programs were performed for the quality control of reads and for the workflow as qualimap, fastp, FastQC and MultiQC. Differential Gene Expression of RNA-seq was performed with R/Bioconductor package DESeq2³⁶. The cut-off for differentially expressed genes was p-value padj (BH) < 0.05. Then, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of differentially expressed genes were performed using Clusterprofile v3.0.4 package (default parameters) in R software. Sequencing data have been deposited on NCBI - SRA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra> ; project number PRJNA1136425).

ELISA assays

All ELISA assays presented in this article were performed on supernatants collected after 24 h of stimulation of macrophages (BMDM or hMDM) with OCM according to the manufacturer's instructions. ELISA kit references are listed in Supplemental Table 4. Absorbance was measured using an Anthos 2010 microplate reader (Biochrom).

CD5L neutralizing assay

BMDM were seeded at a density of $1,5 \times 10^5$ cells per well in a 24-well plate and allowed to attach overnight. Cells were treated with control medium or OCM and, for some conditions, 10 $\mu\text{g/mL}$ of anti-CD5L antibody (or 10 $\mu\text{g/mL}$ of IgG control) were added to the culture medium for 24 hours. Antibodies used in this experiment are listed in the supplemental table 3.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Unless otherwise indicated, results are expressed as mean (SD) of at least two independent experiments. Data were tested for normality before parametric or nonparametric statistical tests were applied. Statistical tests used for the specific analyses are indicated in each figure caption.

RESULTS

Epithelial organoid conditioned medium induces anti-inflammatory state of murine macrophages

In order to investigate the role of soluble elements produced by colonic epithelial cells on macrophage differentiation, we developed a conditioned medium production model of colon organoids in which we cultured different macrophage lines (Supplemental Figure 1A). Given that the intestinal microenvironment is recognized for its homeostatic functions involved in the induction of immune tolerance towards both commensal microbes and unharmed antigens, we used this model to characterize the role played by epithelial cells in polarizing macrophages towards an immunoregulatory profile. To this end, we first cultured the murine macrophage cell line RAW 264.7 in the medium produced by mouse colon organoids and analyzed the expression of alternatively activated (M2) macrophage markers. As shown in figure 1A, culturing macrophages for 24h in organoid conditioned medium (OCM) did not significantly induce the expression of any M2 macrophage markers such as *Mrc1* (CD206), *CD163* or *Arg1/CD36* (not detected; data not shown). However, when LPS-stimulated macrophages were simultaneously treated with OCM, LPS-dependent *iNOS* gene expression induction was nearly abolished at 6h and strongly reduced by up to 80% at 24h (Figure 1B). Western-blot analysis of I κ B α expression suggest that OCM was able to reduce I κ B α degradation induced by LPS as soon as at 15 minutes after LPS treatment (Figure 1C). These observations suggest that OCM possesses anti-inflammatory properties. To ensure that the anti-inflammatory effect obtained with OCM was exclusively due to the presence of soluble factors produced by epithelial cells that were released into the culture medium, we prepared a control conditioned medium obtained only by contact with empty Matrigel domes (not seeded with colon crypts) and tested this medium on LPS-stimulated RAW264.7 cells. As shown in Supplemental Figure 2A, OCM again showed a very strong inhibition of LPS-dependent induction of *iNOS* gene expression (OCM + LPS condition), whereas the control naive conditioned medium (Matri. + LPS) showed no effect. This indicates that soluble factors released by colonic epithelial cells are involved in the observed anti-inflammatory effect.

As a transformed cell line, RAW 264.7 may have the disadvantage of not precisely reproducing the full characteristics of primary macrophages and may show differences in certain functions or gene expression. We therefore decided to reproduce our previous experiments using mouse bone marrow-derived macrophages (BMDM) and compared the effect of OCM with that of the

IL-4/IL-13 cytokine cocktail, classically known to induce alternatively activated M2 macrophages *in vitro*. We first observed the morphological features of BMDM, cultured with OCM, IL-4 and IL-13 (IL-4/IL-13) or control medium by light microscopy. Unexpectedly, the OCM-treated BMDM exhibited a spindle-shaped appearance with a significant increase in the elongation factor compared to controls which resembled the shape of IL-4/IL-13-treated macrophages (Figure 2A; conditions without LPS). Analysis of mRNA expression showed that, in contrast to the IL-4/IL-13 cocktail, OCM did not significantly induce the expression of classical M2 macrophage marker genes such as *Mrc1* (CD206) and *Arg1* in BMDM, whereas a similar induction of the scavenger gene *CD36* was observed in both conditions (Figure 2B). At the protein level, flow cytometry analysis of the expression of M2 surface markers CD206, CD163 and CD36 showed that OCM did not induce the expression of these markers in BMDM compared to control cells (Figure 2C). However, as observed with RAW 264.7 cells, OCM induced a very strong inhibition of *iNOS* gene expression after LPS stimulation of BMDM: LPS-induced expression of mRNA encoding iNOS was significantly reduced by more than 50% after 6h or 24h of co-stimulation with OCM (Figure 2D). The expression of iNOS protein was then analyzed using immunofluorescence and quantification of the intracytoplasmic GFP signal associated with detection of this enzyme. This approach confirmed that, in the presence of OCM, the ability to induce iNOS by LPS is drastically inhibited (Figure 2E). We further examined the effect of OCM on the LPS-dependent induction of other inflammatory markers characteristic of a type 1 macrophage response (Supplemental Figure 3). Analysis of mRNA expression showed that OCM significantly reduced the LPS-induced expression of mRNA encoding *Toll-Like Receptor 2* (M1 marker) as well as the mRNA encoding interleukin-6 (*IL-6*) and the p40 subunit of interleukin 12 (*IL-12-p40*) (Supplemental Figure 3A). Quantification of these cytokines by ELISA in the culture supernatants of LPS-stimulated BMDM treated with OCM showed a trend towards reduced expression of IL-6 and IL-12-p40 proteins compared with BMDM stimulated with LPS alone, although this decrease did not reach statistical significance (Supplemental Figure 3B). However, when we assessed the percentage of BMDM differentiated into M1-type inflammatory macrophages after 24h of LPS stimulation by using flow cytometry analysis of double-positive cells for CD68 and CD80 markers, we observed that OCM significantly inhibited the differentiation of these cells by over 60%, clearly strengthening the idea that, in our model, OCM possesses compelling anti-inflammatory activity (Supplemental Figure 3C). In addition, in term of cellular morphology, we also observed that, in the presence of LPS, OCM-treated macrophages present a higher degree of elongation compared to the control, although not significant (Figure 2A; conditions with LPS). Importantly, as with RAW

264.7 cells, the control conditioned culture medium obtained by contact with the empty Matrigel domes (referred to as “Matri.”) showed no effect on the LPS-induced *iNOS* gene expression (Supplemental Figure 2B). This clearly confirm that soluble regulators produced by colonic epithelial cells are specifically involved in the anti-inflammatory effect. Finally, we also addressed the duration of the anti-inflammatory effect induced by OCM on macrophages, and investigated whether the treatment could persist after its removal. To this end, BMDM were cultivated in OCM or control medium during 24h, then culture media were replaced with classical BMDM culture medium containing or not LPS. Gene expression analysis of mRNA encoding *iNOS* was performed at 6h or 24h after LPS stimulation. Interestingly, the BMDM treated with LPS had significantly increased mRNA levels of *iNOS* which were significantly attenuated by OCM pre-treatment. The inhibition of LPS-induced *iNOS* expression was thus maintained at 6 and 24 hours after OCM removal (Figure 2F), suggesting that factors produced by epithelial cells durably polarize macrophages towards an immunoregulatory phenotype. Taken together, our results support the idea that colon organoid conditioned medium induces immunoregulatory functions in murine macrophages which do not involve classical polarization toward a M2-like phenotype.

Transcriptomic analysis of OCM-stimulated mouse BMDM.

Since organoid conditioned medium induces anti-inflammatory macrophages that do not express « classical » M2 macrophage markers, we performed RNA-seq analysis to better characterize these cells and compare their transcriptome with that of IL-4/IL-13-stimulated BMDM together with untreated cells at 24h. Principal component analysis (PCA) showed that the three respective macrophage populations (untreated, OCM-macrophages, IL-4/IL-13-macrophages) were distinctly clustered within their own groups, with a greater distance between OCM-macrophages and IL-4/IL-13-macrophages than between control cells and either among these two stimulated macrophage populations (Figure 3A). Gene expression differences were mapped using a heatmap, and the results clearly confirmed that OCM-macrophages have a unique gene expression profile, including some genes that vary in the same way as IL-4/IL-13-macrophages, but showing differences for many genes that vary in completely opposite ways (Figure 3B). A total of 1821 genes with a fold change > 1.5 were differentially expressed between OCM-macrophages and IL-4/IL-13-M2 macrophages (comprising near 60% upregulated and 40% downregulated), corresponding to 2-fold more changes than observed between OCM-macrophages and control cells (Figure 3C). This first approach strongly suggests that OCM is able to differentiate macrophages with anti-inflammatory properties, harboring a

specific gene signature, which is clearly distinct from functional profile of *in vitro* alternatively activated M2 macrophages. As our previous qRT-PCR analyses suggested that OCM-macrophages did not express classical M2 markers, we looked carefully at the modulation of expression of these genes in the transcriptomic analysis. As expected, IL-4/IL-13-stimulated macrophages showed up-regulation of classical M2 markers, such as *Mrc1* (CD206), *Arg1*, *PPARGgamma*, *Clec7a*, *Clec10a*, *Il-10* or *Cdh1* (Figure 3D). In OCM-macrophages, none of these genes were induced (*Mrc1*, *Il-10*, *Cdh1*) or at least partially modulated (*Arg1*, *Clec7a*, *Clec10a*, *PPARGgamma*), confirming our previous observations. These two populations shared only 96 upregulated genes and 81 downregulated genes (Figure 3E and supplemental table 1), clearly confirming the existence of distinct subtypes of anti-inflammatory macrophages. Of note, genes associated with the inflammatory response (e.g. *Sl100a8*, *Fcgr1*, *Clqa*, *Cxcl10*) were found to be downregulated in both populations (supplemental table 1). The unique profile of OCM-macrophages includes notably the upregulation of genes associated with an anti-inflammatory profile and a “regulatory” phenotype such as *CD5-antigen like* (CD5L)³⁷, *SLC40A1* (ferroportin)³⁸ and the transcription factors *KLF10*³⁹, *NOTCH4*⁴⁰ and *RORα*⁴¹. Quantitative RT-PCR analysis confirmed that *CD5L* and *SLC40A1* were specifically induced by OCM-treated macrophages, whereas *KLF10* and *RORα* were also upregulated in IL-4/IL-13 macrophages (Figure 3F).

To gain further insight into biologic pathways that could be specifically modulated in OCM-treated macrophages, we performed gene set enrichment analysis (GSEA) on our data set. It revealed that several classical pathways associated with macrophage functions were modulated in OCM-treated macrophages, and, interestingly, the wound healing pathway, a highly studied feature of macrophages that holds promise for therapeutic development, was found to be one of the most upregulated (supplemental figure 4A)⁴². Pro-wound healing macrophages are generally characterized by the production of several growth factors such as Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), Vascular endothelial growth factor (VEGF) and Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1), which are involved in cell proliferation, granulation tissue formation and angiogenesis. These macrophages also produce metalloproteinase 12 (Mmp12) and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP1) to regulate extracellular matrix production during wound healing process. Here, OCM-treated macrophages showed an increased expression of *PDGF-α*, *IGF-1*, *VEGF-α* and *Mmp12*, (Supplemental Figure 4B). There was no change in the expression of *TIMP1* and *TGF-β1* (data not shown). Compared to BMDM stimulated with IL-4/IL-13, the induction of some genes was

less marked in OCM-treated macrophages, but again, we also observed opposite response between these two populations of cells, notably concerning the expression of *VEGF- α* , a key factor of angiogenesis and epithelialization during wound healing⁴³, which was induced by OCM stimulation but inhibited by IL-4/IL-13 (Supplemental Figure 4C).

Collectively, these results demonstrate that soluble factors released by colonoids differentiate unique immunoregulatory macrophages that are distinct from conventional alternatively activated M2 macrophages.

CD5L is involved in the anti-inflammatory effect induced by OCM in BMDM

As *CD5L* (or AIM for Apoptosis Inhibitor of Macrophage) appears to be specifically induced by OCM in BMDM, we further investigated the role played by this gene in the anti-inflammatory effect induced by OCM. *CD5L* is a secreted protein that plays an important modulating role in acute and chronic inflammation⁴⁴. This soluble factor has been characterized as a pattern recognition receptor (PRR) able to bind to LPS⁴⁵ and has more recently been recognized as a driver of M2 macrophage polarization³⁷. In order to confirm the induction of *CD5L* mRNA expression by OCM, we quantified *CD5L* protein by ELISA in BMDM culture supernatants stimulated or not with OCM. We observed that following 24h of treatment, the amount of *CD5L* protein had significantly doubled, confirming the ability of OCM to regulate the expression of this key protein (Figure 4A). Given the characterization of *CD5L* as an anti-inflammatory factor^{37 45}, we wondered whether the induction of expression of this protein might be involved in the inhibitory effect of *iNOS* gene expression induced by OCM in the presence of LPS. To test this hypothesis, we performed a *CD5L* neutralization experiment using polyclonal serum and further measured *iNOS* gene expression in mouse BMDM. As shown in Figure 4B, whereas LPS alone strongly induced *iNOS* mRNA expression and OCM significantly inhibited this response, the addition of a polyclonal anti-*CD5L* serum specifically abolished the regulatory effect of OCM. Thus, these results establish a functional link between the unique profile of OCM-polarized macrophages and their anti-inflammatory activity, which therefore involves, at least in part, the anti-inflammatory properties of the *CD5L* protein whose expression is specifically induced by the soluble factors released by colonocytes

Influence of human OCM from control and IBD patients on human monocytes-derived macrophages (hMDM).

We finally raised the question of applying this model to humans, in order to better understand the epithelial cell/macrophage dialogue during intestinal homeostasis, as well as identifying

potential defects in such dialogue that could contribute to the development of digestive inflammatory pathologies such as IBD. Thus, we decided to transpose and extend our protocol by culturing human monocyte-derived macrophages (hMDM) in colonic OCM prepared from surgical colon samples from either control (cancer, diverticulitis) or ulcerative colitis (UC) patients. Since hMDMs do not exhibit an upregulation of iNOS expression after LPS treatment⁴⁶, we based our analysis on the expression of other inflammatory markers (cytokines and chemokines) that have been reported to be upregulated in response to LPS stimulation⁴⁷. Macrophages treated with OCM from control patient organoids (OCM-CP) showed a significant inhibition of the LPS-dependent induction of mRNA expression of several pro-inflammatory cytokines (e.g. TNF, IL-1 β , IL-12-p40, IL-6) and the chemokine CCL19 (Figure 5A), suggesting the immunoregulatory potential of human colonic OCM. This result was then confirmed by ELISA assays of cytokines in hMDM culture supernatants, which clearly showed that colonoid conditioned medium from control patients significantly reduced LPS-induced production of TNF, IL-1 α , IL-12-p40 and IL-6 (Figure 5B). It is speculated that patients suffering from UC show a defect in epithelial function that could affect the dialogue with macrophages and its immunoregulatory properties^{48–50}. Organoid culture medium from UC patients (OCM-UC) had the same magnitude of response as control patients, except for mRNA encoding TNF and IL-6, which tend to have slightly elevated levels, although not significantly (Figure 5A). Moreover, while LPS-induced IL-6 production was significantly decreased by OCM-CP in culture supernatants, this significant inhibition was lost when hMDMs were treated with OCM-UC (Figure 5B). Lastly, flow cytometry was performed to observe the modulation of expression of M1 and M2 markers on the cell surface of hMDM. Interestingly, the induction of the CD68 marker (phagocytic receptor upregulated in M1 macrophages) by LPS treatment was found to be reduced in the OCM-CP condition but not in the OCM-UC condition, suggesting that OCM from UC patients failed to control the LPS-dependent induction of this pro-inflammatory macrophage marker (Figure 5C). Thus, these data demonstrate that patient-derived colonoids are also able to induce anti-inflammatory activity in human macrophages *in vitro*, and suggest that this model could be helpful to identify defects in the homeostatic properties of colonic epithelial cells in UC patients or other inflammatory disorders.

DISCUSSION

In this study, we report the establishment of a model of dialogue between primary mouse/human colonic epithelial cells and macrophages using organoid conditioned media and which demonstrates the immunoregulatory properties of epithelial cells through their soluble secretions. More specifically, mouse colonoid conditioned medium was able to differentiate BMDM towards an anti-inflammatory state, characterized by a unique “regulatory” specific gene signature associated with the upregulation of some anti-inflammatory markers such as CD5L. Our results show that this molecule is essential for the control of the LPS-induced iNOS response in BMDM by OCM. In addition, human macrophages treated with human colonoid conditioned medium also exhibited anti-inflammatory properties by regulating the expression of several inflammatory cytokines. Finally, we found that OCM from control patients, but not UC patients, was able to reduce the expression of the CD68 marker by human macrophages, highlighting the usefulness of our model in order to identify dysregulated production of immunoregulatory factors by intestinal epithelial cells in IBD patients.

Over the last decade significant progresses have been made in the development of new *in vitro* intestinal models, e.g. organoids, that tend to better recapitulate intestinal characteristics, including 3D crypt-villus architecture, cell composition, drug absorption and metabolism ¹⁹. Recently, new co-culture models of intestinal organoids and immune cells have emerged to better understand the role of the epithelium in immune regulation ¹⁸. To date, only few models have focused on the relationship between the intestinal epithelium and macrophages ^{21–24,51} and none of these works have used colonic organoids. Thus, to our knowledge, our work is the first to focus on the homeostatic functions and immunoregulatory properties of the colonic epithelium using colonoids derived from mice and patients. Moreover, since, it is well recognized that colonic epithelial cells dysfunction is a hallmark of UC ²⁵, we hypothesize that colonocytes from UC patients are unable to properly secrete factors normally involved in intestinal mucosal homeostasis. To answer this question, we have chosen to develop and study a model based on the analysis of the effect induced by conditioned colonoid medium, which we believe is the most suitable for identifying defects in the secretion of immunoregulatory factors by epithelial cells. The effect of macrophages on the intestinal epithelium has been extensively described ⁵² and has even been reported in co-culture models ^{22,24}, and, obviously, we do not exclude that this part of the dialogue between epithelial and myeloid cells plays an important role in intestinal homeostasis and the development of IBD. Nevertheless, our model has the advantage of being easy to set up, highly reproducible and specifically designed to study the

effect of soluble factors on macrophages by eliminating other interactions (e.g. direct contact and macrophage secretions) that can complicate the identification of regulatory mechanisms involving epithelial soluble factor secretion.

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is a classical marker of inflammatory macrophages in the mouse, which expression is induced by recognition of pathogen-associated molecular patterns such as LPS ^{53,54}. Here we showed that OCM was able to strongly control the LPS-induced iNOS response in both macrophage cell line (RAW 264.7) and primary macrophages (mouse BMDM), confirming that our model was able to recapitulate the immunoregulatory properties of the intestinal epithelium. In addition, OCM-treated BMDM showed a significant and specific upregulation of genes which were not found in IL-4/IL-13 M2 macrophages. These differences could be explained by the fact that intestinal epithelial cells are not able to produce IL-4/IL-13 cytokines (mainly produced by Th2 cells), but shape macrophages by producing other factors (i.e. IL-10, TGF-beta, IL-25, ...) ^{52,55}. The next step in our work will be to identify the respective contribution of these cytokines during the induction of the macrophage profiles obtained in our model. In addition, it is recognized that IEC are also able to produce small molecules, others than cytokines, with immunoregulatory capacities. For instance, in mice, the proliferative cells of the intestinal crypts have been described as able to produce corticosterone, a glucocorticoid with anti-inflammatory properties ⁵⁶. We and others have extended this observation to humans and demonstrated the defect of intestinal cortisol production in UC patients^{31,57}. To our knowledge, the production of endogenous glucocorticoids by organoids has never been studied, and thus, clearly deserves to be characterized in our model. While the use of organoids is becoming more widespread, and co-culture/co-stimulation models are gradually being developed, few studies have analyzed the gene expression profiles of immune cells "co-cultured" with organoids in order, in particular, to compare them with data obtained *in vivo*. We compared our RNAseq data with those obtained by Schridde et al ⁵⁸, who explored transcriptomic analysis of the monocyte-macrophage differentiation series in normal mouse colonic mucosa. Obviously, we observed that the transcriptomic profile of our OCM-treated macrophages was distinct from that obtained *in vivo* in mouse colon macrophages, clearly confirming that epithelial cells alone were not able to fully recapitulate the colonic environment found *in vivo*. Nevertheless, OCM alone is able to induce the expression of some classic M2 macrophage markers (*Arg1*, *Clec7a*, *Clec10a*) and, interestingly, transcription factors whose activity is associated with the differentiation and/or maintenance of the immunoregulatory M2 phenotype of macrophages such as PPARgamma ⁵⁹, KLF10 ³⁹, Notch4 ⁴⁰ or RORalpha ⁶⁰. This

latter is of particular interest as it has been clearly shown that this nuclear receptor is involved in controlling the inflammatory state of macrophages ⁶⁰, increasing M2 polarization of liver macrophages and protecting against NASH ⁴¹, and that its role in the colon and during IBD is poorly studied and warranted further investigation. Thus, although simplified, we believe that our model can lead to the identification of mechanisms and/or molecules involved in intestinal macrophage differentiation under steady-state that would also be interesting to explore in a pathological context such IBD.

Among the genes specifically induced by OCM, CD5L appears particularly relevant. This protein is involved in a large spectrum of biological process and pathological conditions ⁶¹. Although its precise role during tissue homeostasis and immune response remains to be characterized. Our data show that OCM is able to induce CD5L expression and secretion by murine macrophages and that neutralization of this protein in the culture medium inhibits the anti-inflammatory effect of OCM. These results are in line with previous works which initially identified CD5L as a soluble glycoprotein belonging to the scavenger receptor cysteine rich superfamily ⁶² and demonstrated its ability to bind and neutralize LPS ⁴⁵. More importantly, this protein has recently been involved in the polarization of macrophages towards an M2 anti-inflammatory profile ³⁷, strengthening the view that in our model, OCM, and consequently, soluble factors released by colonic epithelial cells, are indeed able to differentiate macrophages with an anti-inflammatory profiles. Our CD5L protein neutralization assay clearly shows that the anti-inflammatory effect of OCM observed on the regulation of iNOS expression in the presence of LPS involves CD5L and, to the best of our knowledge, it is the first report of CD5L-mediated immunoregulation of iNOS. Although the exact mechanism remains to be determined, we can strongly speculate that this effect involves inhibition of the LPS-neutralizing capacity of CD5L. However, we cannot exclude other mechanisms. For example, it has been described that recombinant CD5L induces ROS production in peripheral blood monocytes ³⁷. As ROS are involved in the regulation of iNOS pathway ⁶³, we can also speculate that neutralization of CD5L could interfere with this mechanism. Moreover, it has been suggested that the scavenger receptor CD36 can act as a cellular receptor for CD5L ⁶⁴. As we observed an upregulation of CD36 expression by OCM, we can also imagine that CD5L neutralization might disrupt the cellular mechanisms involving activation of the CD36 receptor by its CD5L ligand.

The role of CD5L in human within the gut is less documented and remains to be determined. To date, only one study has investigated CD5L in IBD patients. This work suggests that Crohn's disease patients have higher circulating levels of CD5L than UC patients or healthy volunteers,

and proposes that CD5L may participate in intestinal inflammation in Crohn's patients by inhibiting macrophage apoptosis ⁶⁵. Our data in mice and those recently obtained by others suggest, on the contrary, that CD5L participates in the homeostasis of the immune response by counteracting the inflammatory response, notably those induced by LPS. Unfortunately, we were unable to detect any significant induction of CD5L expression by the conditioned medium of colonoids from patients (control or UC) in our human monocyte-derived macrophages (data not shown), suggesting that the regulatory mechanism involved is different from that observed in mouse model and remains to be elucidated. The question of the regulation of CD5L within human colonic mucosa clearly deserves further investigation, and we notably plan to analyze CD5L expression directly in IBD patients.

The relationship between human colon organoids and macrophages has yet to be fully explored and very few models have been established to date. In IBD, such as UC, the intestinal epithelium plays a crucial role in the development of pathology and new models are needed to better understand the underlying mechanisms ^{25,49,66}. Since our ultimate aim is to gain insight into the role of epithelial cell secretions in the regulation of macrophagic function, and to see whether the defect in epithelial function reported in UC patients could affect this mechanism, we transposed our OCM stimulation model to humans (non-IBD and UC patient samples). Our results showed that, in the presence of LPS, the human macrophages showed similar downregulation of expression of these markers both with OCM from control and UC patients, confirming that human colonic epithelial cells also exhibit immunoregulatory properties over macrophages. The lamina propria of the inflamed gut in UC patients is extensively infiltrated by CD68+ monocytic cells, and the balance of macrophage subpopulations is altered toward a proinflammatory state ⁶⁷. Our study found that OCM from UC patient failed to control the LPS-dependent induction of CD68 in macrophages while OCM from non-IBD patients retained this capacity, suggesting that our model may help to identify defects in the immunoregulatory properties of the colonic epithelium in patients suffering from UC. As the culture environment and the experimental procedures are standardized, the most likely explanation could be that UC patient organoids have a genetic or epigenetic modification that could affect the CD68 regulatory pathway. Of note, it has been reported that these (epi)-genetic modifications persist in IBD patient organoids and are stable over time ⁶⁸, providing the opportunity to retrospectively study organoids identified as dysfunctional, and characterize the cellular and molecular mechanism causing the defect.

The developmental trajectory of organoid models of IBD patients is to become more complex by integrating multiple cell types with the aim of not “simply” modeling the epithelium, but rather reproducing the complexity of the intestinal mucosa, and offering the opportunity to develop preclinical tools in humans and improve current treatments or identify new therapeutic avenues. In these models, determining the regulation of genes that have been previously poorly characterized during intestinal homeostasis or IBD development could lead to the exploration of new signaling pathways. The identification of the CD5L gene in our study provides a good illustration of this process. The regulation of CD5L expression involves the nuclear receptor Liver X Receptors (LXRs)⁴⁴. This family of ligand-dependent transcription factors is naturally activated by oxidized cholesterol derivatives (oxysterols)⁶⁹. In 2011, a case-control study in a Danish cohort revealed that variants in the gene encoding LXRs confer an increased risk of UC development⁷⁰. Since then, the few studies that have explored the role of LXR during intestinal inflammation have suggested a promising anti-inflammatory role for this receptor in experimental models of colitis^{71,72}. In this context, the development of a preclinical model based on patient organoids would offer the opportunity to test, in human, whether modulation of the LXR pathway by natural or synthetic agonists of these receptors would be an interesting approach for a new therapeutic development, and would also enable to unravel the details of the cellular players involved. Thus, with further advances in organoid culture technology from IBD patients and the increasing complexity of intestinal mucosa modeling systems, colonoids have many strengths to lead to a relevant model of UC that could be integrated in a future precision medicine strategy.

ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge the support of the DigestScience Foundation and the Association François Aupetit (AFA).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MC, BF, AS, JD, BB designed the study – MC, MP, MJ, PZ, BS performed experiments and collected data – MC, BF, AS, BB performed analysis of the data – MF, SS, FL performed transcriptomic experiments and contributed to transcriptomic data analysis – PZ, BM collected human colonic samples and managed clinical data – MC, AS, BB wrote the manuscript – All the authors: review editing of the paper and final approval of manuscript – AS and BB are equally contributing senior authors

DISCLOSURE

None of the authors of this manuscript have a financial interest related to this work

Bibliographie

1. Chen Y, Tang L. The crosstalk between parenchymal cells and macrophages: A keeper of tissue homeostasis. *Front Immunol.* 2022;13:1050188.
2. Gordon S, Plüddemann A. Macrophage Clearance of Apoptotic Cells: A Critical Assessment. *Front Immunol.* 2018;9:127.
3. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity.* 2016;44:450–462.
4. Muntjewerff EM, Meesters LD, van den Bogaart G. Antigen Cross-Presentation by Macrophages. *Frontiers in Immunology*;11 Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01276>. 2020. Accessed August 2, 2023.
5. Park MD, Silvín A, Ginhoux F, et al. Macrophages in health and disease. *Cell.* 2022;185:4259–4279.
6. Sreejit G, Fleetwood AJ, Murphy AJ, et al. Origins and diversity of macrophages in health and disease. *Clin & Trans Imm.* 2020;9:e1222.
7. Mass E, Nimmerjahn F, Kierdorf K, et al. Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. *Nat Rev Immunol.* 2023;23:563–579.
8. Bain CC, Schridde A. Origin, Differentiation, and Function of Intestinal Macrophages. *Frontiers in Immunology*;9 Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02733>. 2018. Accessed September 18, 2023.
9. Hegarty LM, Jones G-R, Bain CC. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2023;20:538–553.
10. Delfini M, Stakenborg N, Viola MF, et al. Macrophages in the gut: Masters in multitasking. *Immunity.* 2022;55:1530–1548.
11. Ghilas S, O’Keefe R, Mielke LA, et al. Crosstalk between epithelium, myeloid and innate lymphoid cells during gut homeostasis and disease. *Front Immunol.* 2022;13:944982.
12. Guenin-Mace L, Konieczny P, Naik S. Immune-Epithelial Cross Talk in Regeneration and Repair. *Annu Rev Immunol.* 2023;41:207–228.
13. Na YR, Stakenborg M, Seok SH, et al. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16:531–543.
14. Al-Ghadban S, Kaissi S, Homaidan FR, et al. Cross-talk between intestinal epithelial cells and immune cells in inflammatory bowel disease. *Sci Rep.* 2016;6:29783.
15. Leonard F, Collnot E-M, Lehr C-M. A Three-Dimensional Coculture of Enterocytes, Monocytes and Dendritic Cells To Model Inflamed Intestinal Mucosa in Vitro. *Mol Pharmaceutics.* 2010;7:2103–2119.
16. Rahman S, Ghiboub M, Donkers JM, et al. The Progress of Intestinal Epithelial Models from Cell Lines to Gut-On-Chip. *IJMS.* 2021;22:13472.
17. Kim J, Koo B-K, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21:571–584.
18. Bar-Ephraim YE, Kretzschmar K, Clevers H. Organoids in immunological research. *Nat Rev Immunol.* 2020;20:279–293.
19. Taelman J, Diaz M, Guiu J. Human Intestinal Organoids: Promise and Challenge. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*;10 Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.854740>. 2022. Accessed August 31, 2023.
20. Günther C, Winner B, Neurath MF, et al. Organoids in gastrointestinal diseases: from experimental models to clinical translation. *Gut.* 2022;71:1892–1908.

21. Zhang F-L, Hu Z, Wang Y-F, et al. Organoids transplantation attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in mice through L-Malic acid-mediated M2 macrophage polarization. *Nat Commun*. 2023;14:6779.
22. Kakni P, Truckenmüller R, Habibović P, et al. A Microwell-Based Intestinal Organoid-Macrophage Co-Culture System to Study Intestinal Inflammation. *IJMS*. 2022;23:15364.
23. Jose SS, De Zuani M, Tidu F, et al. Comparison of two human organoid models of lung and intestinal inflammation reveals Toll-like receptor signalling activation and monocyte recruitment. *Clinical & Translational Immunology*. 2020;9:e1131.
24. Noel G, Baetz NW, Staab JF, et al. A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate mucosal gut physiology and host-pathogen interactions. *Sci Rep*. 2017;7:45270.
25. Ojo BA, VanDussen KL, Rosen MJ. The Promise of Patient-Derived Colon Organoids to Model Ulcerative Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2022;28:299–308.
26. Ollivier A, Mahe MM, Guasch G. Modeling Gastrointestinal Diseases Using Organoids to Understand Healing and Regenerative Processes. *Cells*. 2021;10:1331.
27. Hentschel V, Seufferlein T, Armacki M. Intestinal organoids in coculture: redefining the boundaries of gut mucosa ex vivo modeling. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2021;321:G693–G704.
28. The UK IBD Genetics Consortium, The Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet*. 2009;41:1330–1334.
29. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*. 2011;43:246–252.
30. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474:307–317.
31. Bouguen G, Langlois A, Djouina M, et al. Intestinal steroidogenesis controls PPAR γ expression in the colon and is impaired during ulcerative colitis. *Gut*. 2015;64:901–910.
32. Martin Mena A, Langlois A, Specia S, et al. The Expression of the Short Isoform of Thymic Stromal Lymphopoietin in the Colon Is Regulated by the Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma and Is Impaired during Ulcerative Colitis. *Front Immunol*. 2017;8:1052.
33. Peyrin-Biroulet L, Beisner J, Wang G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:8772–8777.
34. d'Aldebert E, Quaranta M, Sébert M, et al. Characterization of Human Colon Organoids From Inflammatory Bowel Disease Patients. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:363.
35. Dotti I, Mayorgas A, Salas A. Generation of human colon organoids from healthy and inflammatory bowel disease mucosa. *PLoS ONE*. 2022;17:e0276195.
36. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15:550.
37. Sanjurjo L, Aran G, Téllez É, et al. CD5L Promotes M2 Macrophage Polarization through Autophagy-Mediated Upregulation of ID3. *Front Immunol*. 2018;9:480.
38. Johnson EE, Sandgren A, Cherayil BJ, et al. Role of Ferroportin in Macrophage-Mediated Immunity. *Infect Immun*. 2010;78:5099–5106.
39. Papadakis KA, Krempski J, Svingen P, et al. Krüppel-like factor KLF10 deficiency predisposes to colitis through colonic macrophage dysregulation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2015;309:G900–G909.

40. López-López S, Romero De Ávila MJ, Hernández De León NC, et al. NOTCH4 Exhibits Anti-Inflammatory Activity in Activated Macrophages by Interfering With Interferon- γ and TLR4 Signaling. *Front Immunol*. 2021;12:734966.
41. Han Y-H, Kim H-J, Na H, et al. ROR α Induces KLF4-Mediated M2 Polarization in the Liver Macrophages that Protect against Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cell Reports*. 2017;20:124–135.
42. Kim SY, Nair MG. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunol Cell Biol*. 2019;97:258–267.
43. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, et al. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *Journal of Surgical Research*. 2009;153:347–358.
44. Sanjurjo L, Aran G, Roher N, et al. AIM/CD5L: a key protein in the control of immune homeostasis and inflammatory disease. *Journal of Leukocyte Biology*. 2015;98:173–184.
45. Sarrias M-R, Roselló S, Sánchez-Barbero F, et al. A Role for Human SP α as a Pattern Recognition Receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280:35391–35398.
46. Fang FC, Vazquez-Torres A. Nitric oxide production by human macrophages: there's NO doubt about it. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2002;282:L941–L943.
47. Alasoo K, Martinez FO, Hale C, et al. Transcriptional profiling of macrophages derived from monocytes and iPS cells identifies a conserved response to LPS and novel alternative transcription. *Sci Rep*. 2015;5:12524.
48. Roda G, Sartini A, Zambon E, et al. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2010;16:4264–4271.
49. Martini E, Krug SM, Siegmund B, et al. The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2017;4:33–46.
50. Mokry M, Middendorp S, Wiegerinck CL, et al. Many Inflammatory Bowel Disease Risk Loci Include Regions That Regulate Gene Expression in Immune Cells and the Intestinal Epithelium. *Gastroenterology*. 2014;146:1040–1047.
51. Hahn S, Nam M-O, Noh JH, et al. Organoid-based epithelial to mesenchymal transition (OEMT) model: from an intestinal fibrosis perspective. *Sci Rep*. 2017;7:2435.
52. Cao Q, Mertens RT, Sivanathan KN, et al. Macrophage orchestration of epithelial and stromal cell homeostasis in the intestine. *Journal of Leukocyte Biology*. 2022;112:313–331.
53. MacMicking J, Xie Q, Nathan C. NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:323–350.
54. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, et al. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS ONE*. 2015;10:e0145342.
55. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:141–153.
56. Cima I, Corazza N, Dick B, et al. Intestinal Epithelial Cells Synthesize Glucocorticoids and Regulate T Cell Activation. *The Journal of Experimental Medicine*. 2004;200:1635–1646.
57. Sidler D, Renzulli P, Schnoz C, et al. Colon cancer cells produce immunoregulatory glucocorticoids. *Oncogene*. 2011;30:2411–2419.
58. Schridde A, Bain CC, Mayer JU, et al. Tissue-specific differentiation of colonic macrophages requires TGF β receptor-mediated signaling. *Mucosal Immunology*. 2017;10:1387–1399.
59. Yu L, Gao Y, Aaron N, et al. A glimpse of the connection between PPAR γ and macrophage. *Front Pharmacol*. 2023;14:1254317.
60. Nejati Moharrami N, Bjørkøy Tande E, Ryan L, et al. ROR α controls inflammatory state of human macrophages. *PLoS ONE*. 2018;13:e0207374.

61. Yang H, Luo Y, Lai X. The comprehensive role of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) in pathological conditions. *Clinical and Experimental Immunology*. 2023;212:184–198.
62. Gebe JA, Kiener PA, Ring HZ, et al. Molecular Cloning, Mapping to Human Chromosome 1 q21-q23, and Cell Binding Characteristics of Sp α , a New Member of the Scavenger Receptor Cysteine-rich (SRCR) Family of Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:6151–6158.
63. Sun J, Druhan LJ, Zweier JL. Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010;494:130–137.
64. Sanjurjo L, Amézaga N, Aran G, et al. The human CD5L/AIM-CD36 axis: A novel autophagy inducer in macrophages that modulates inflammatory responses. *Autophagy*. 2015;11:487–502.
65. Ono Y, Kanmura S, Morinaga Y, et al. The utility of apoptosis inhibitor of macrophages as a possible diagnostic marker in patients with Crohn's disease. *BMC Gastroenterol*. 2017;17:40.
66. Parikh K, Antanaviciute A, Fawcner-Corbett D, et al. Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease. *Nature*. 2019;567:49–55.
67. Lissner D, Schumann M, Batra A, et al. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD: *Inflammatory Bowel Diseases*. 2015;1.
68. Lucafò M, Muzzo A, Marcuzzi M, et al. Patient-derived organoids for therapy personalization in inflammatory bowel diseases. *WJG*. 2022;28:2636–2653.
69. Steffensen KR, Jakobsson T, Gustafsson J-Å. Targeting liver X receptors in inflammation. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2013;17:977–990.
70. Andersen V. Polymorphisms in NF- κ B, PXR, LXR, PPAR γ and risk of inflammatory bowel disease. *WJG*. 2011;17:197.
71. Jakobsson T, Vedin L-L, Hassan T, et al. The oxysterol receptor LXR β protects against DSS- and TNBS-induced colitis in mice. *Mucosal Immunology*. 2014;7:1416–1428.
72. Miranda-Bautista J, Rodríguez-Feo JA, Puerto M, et al. Liver X Receptor Exerts Anti-Inflammatory Effects in Colonic Epithelial Cells via *ABCA1* and Its Expression Is Decreased in Human and Experimental Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2021;27:1661–1673.

FIGURES

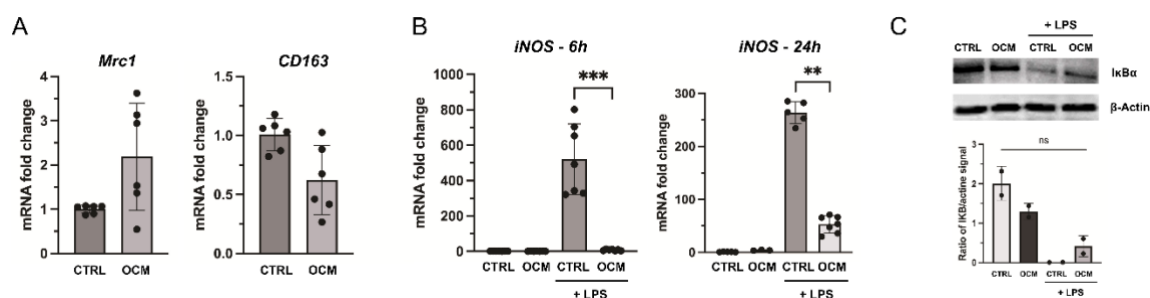


Figure 1. Effect of mouse Organoid Conditioned Medium (OCM) stimulation on the RAW 264.7 macrophage cell line. **A.** qPCR analysis of M2 marker expression by RAW 264.7 cells after 24h treatment with OCM. **B.** iNOS mRNA expression after stimulation with OCM +/- LPS (100 ng/mL) for 6h and 24 hours. **C.** Western blot analysis of IκBα protein level after 15 min stimulation with OCM +/- LPS (upper image). Analysis of IκBα/actin ratio signal intensity using ImageJ2 software (lower panel). Data are expressed as mean +/- SD (n=6 (A-B), n=2 (C)). Data represent pooled results of 2 independent experiments. ** P < 0.01, *** P < 0.001 ; ns, not significant (Mann-Whitney).

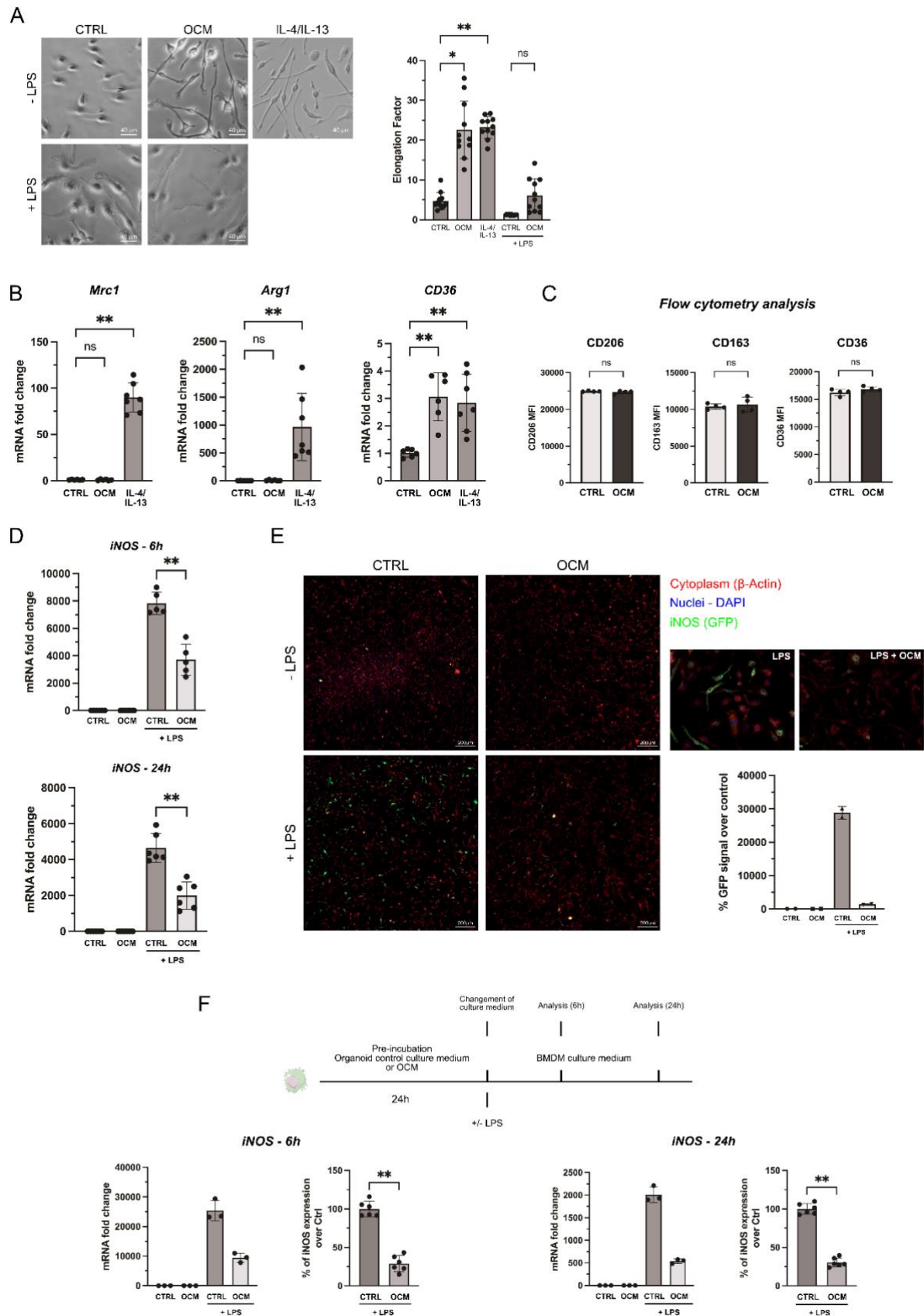


Figure 2. Effect of mouse Organoid Conditioned Medium (OCM) stimulation on Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDM) cells. A. Morphological aspect of BMDM cells

observed in confocal microscopy (X20) after treatment with OCM +/- LPS (100 ng/mL) or IL-4/IL-13 (20 ng/mL) for 24h (left panel). Elongation factor (length divided by width) of cells corresponding to the previous conditions (right panel). Data are presented as mean +/- SD of two independent experiments (n = 11 microscopic fields counted; 2 independent experiments)

B. qPCR analysis of the expression of M2 markers by BMDM cells after 24h treatment with OCM or IL-4/IL-13. Data are presented as mean +/- SD (n = 6-7) of 2 independent experiments.

C. Flow cytometry analysis of CD206, CD163 and CD36 protein expression level in BMDM cells after 24h treatment with OCM. Data are expressed as mean fluorescent intensity (MFI) +/- SD (n = 4).

D. iNOS mRNA expression after stimulation with OCM +/- LPS (100 ng/mL) for 6h and 24 hours. Data are presented as mean +/- SD (n = 5-6) of 2 independent experiments.

E. Determination of iNOS protein expression by immunofluorescence in BMDM with OCM +/- LPS for 24h. Fluorescence staining of BMDM cells (nuclei = blue, cytoplasm = red, iNOS = green). Quantification of GFP signal. Data are expressed as mean +/- SD (n = 2 microscopic fields counted of one experiment)

F. Effect of OCM over time. Schematic representation of the experimental protocol (above). For each time point, iNOS mRNA expression (one experiment representative of two, n=3, mean +/- SD; left graphic) and percentage of iNOS mRNA expression level in LPS conditions with expression level measured in control cells stimulated with LPS used as reference and defined as 100% (pool of two independent experiments, n=6, mean +/- SD ; right graphic). ** P < 0.01; ns, not significant (Mann-Whitney).

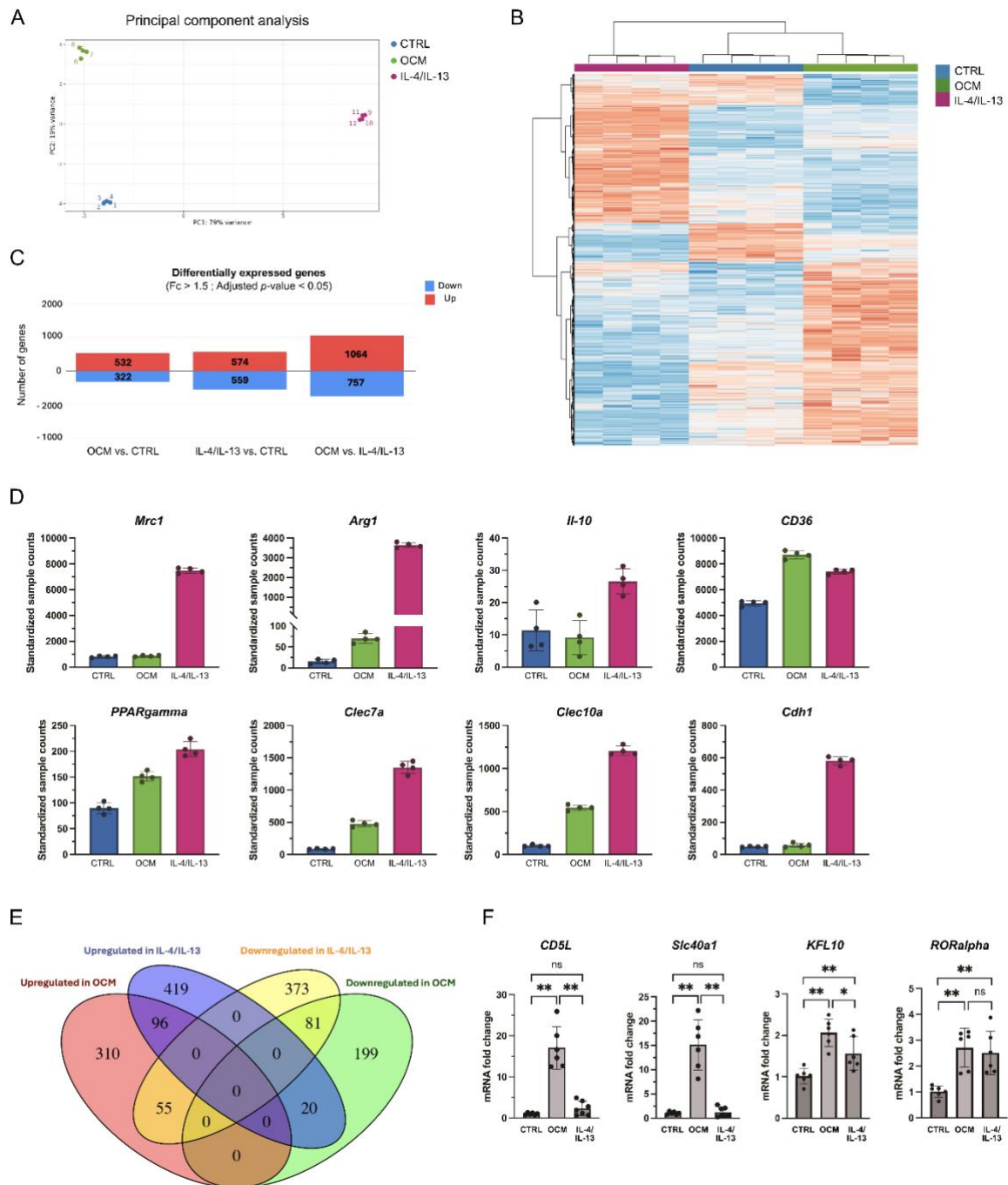


Figure 3. RNA sequencing analysis of Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDM) stimulated with OCM or IL-4/IL-13. **A.** Principal component analysis (PCA) of BMDM from control, OCM and IL-4/IL-13 conditions (n=4) **B.** Heatmap representing the gene expression profile of BMDM from the 3 conditions (fold change >1.5 and adjusted p-value <0.05). **C.** Number of differentially up- or down-regulated genes in pairwise comparisons of the 3 conditions (foldchange >1.5 and adjusted p-value <0.05). **D.** Standardized sample counts of M2 markers in the 3 conditions. Data are expressed as mean +/- SD (n = 4) **E.** Venn diagram of genes differentially expressed in BMDM stimulated with OCM or IL-4/IL-13 **F.** qPCR analysis

of genes of interest. Data are expressed as mean \pm SD ($n = 6$). Data are pooled results of 2 independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; ns, not significant (Mann-Whitney).

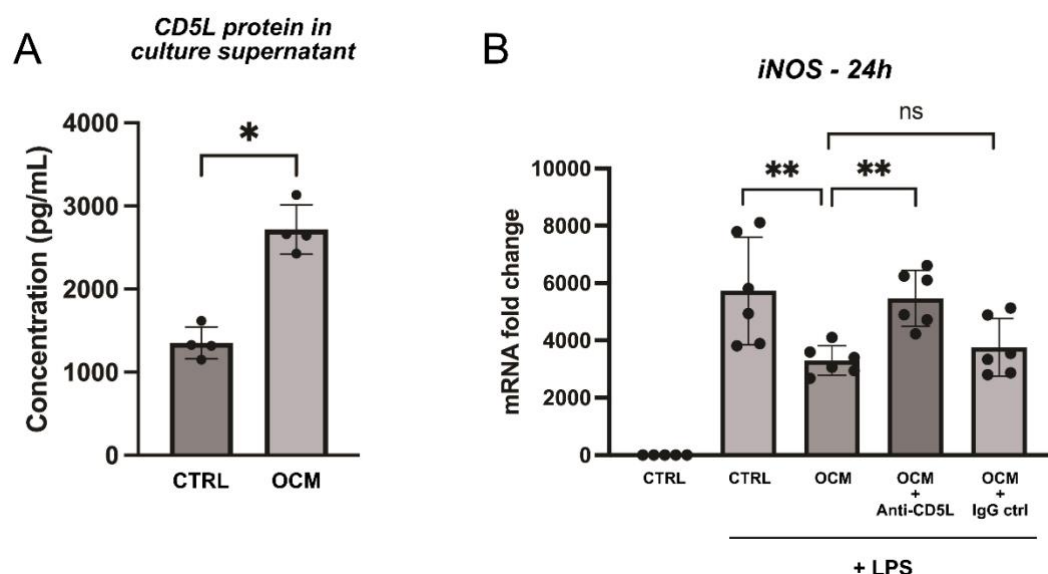


Figure 4. Role of CD5L in mouse OCM regulatory effect. **A.** ELISA quantification of CD5L in the supernatant of control or OCM-treated BMDM for 24h. Data are expressed as mean \pm SD ($n = 4$). **B.** BMDM were incubated with OCM +/- LPS (100ng/mL) and CD5L antibody (10 μ g/mL) or control IgG (10 μ g/mL) for 24h before analysis of iNOS mRNA expression. Data are expressed as mean \pm SD ($n = 6$). Data are a pool of 2 independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Mann-Whitney).

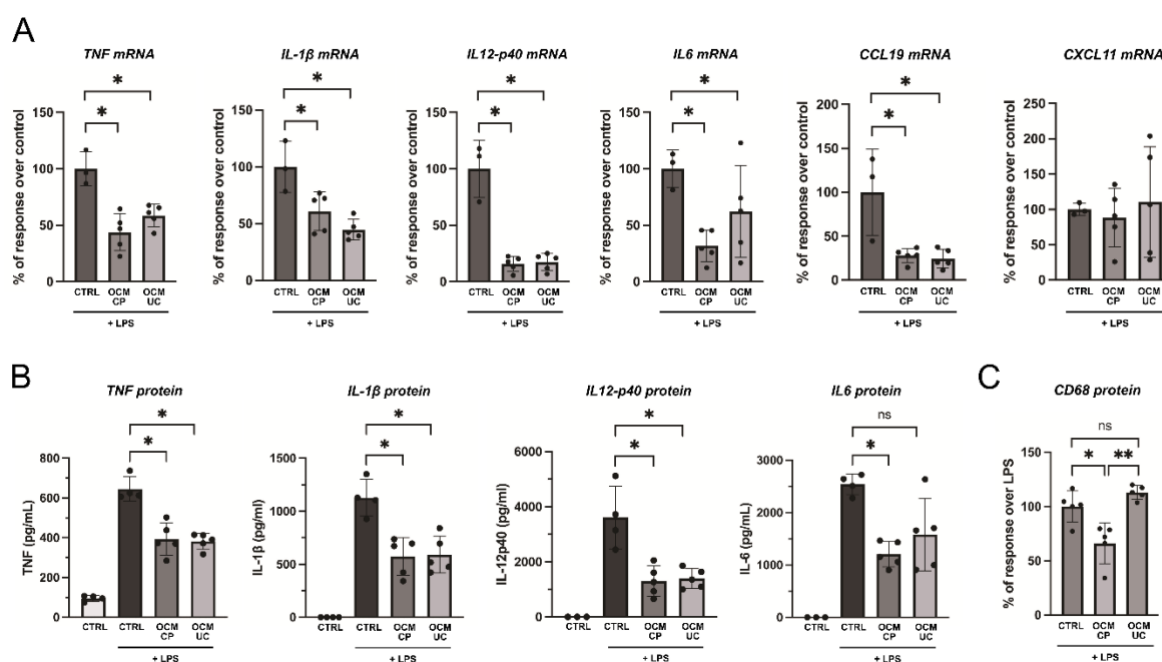
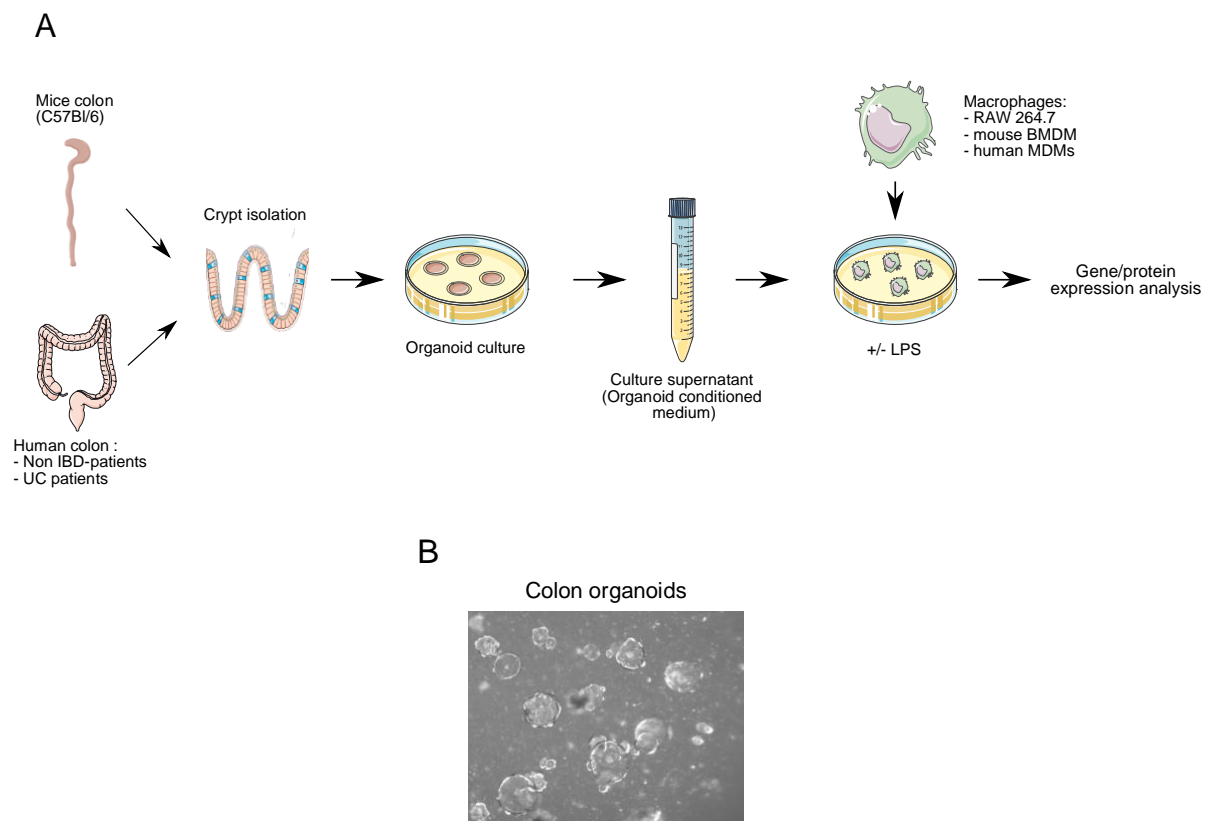
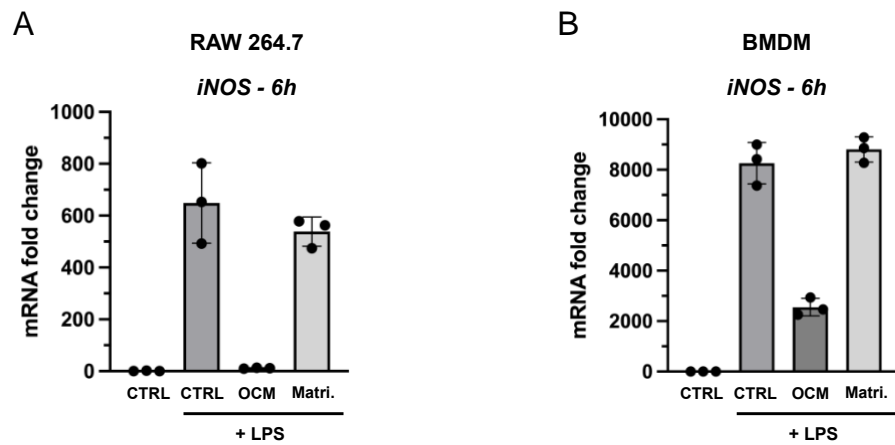


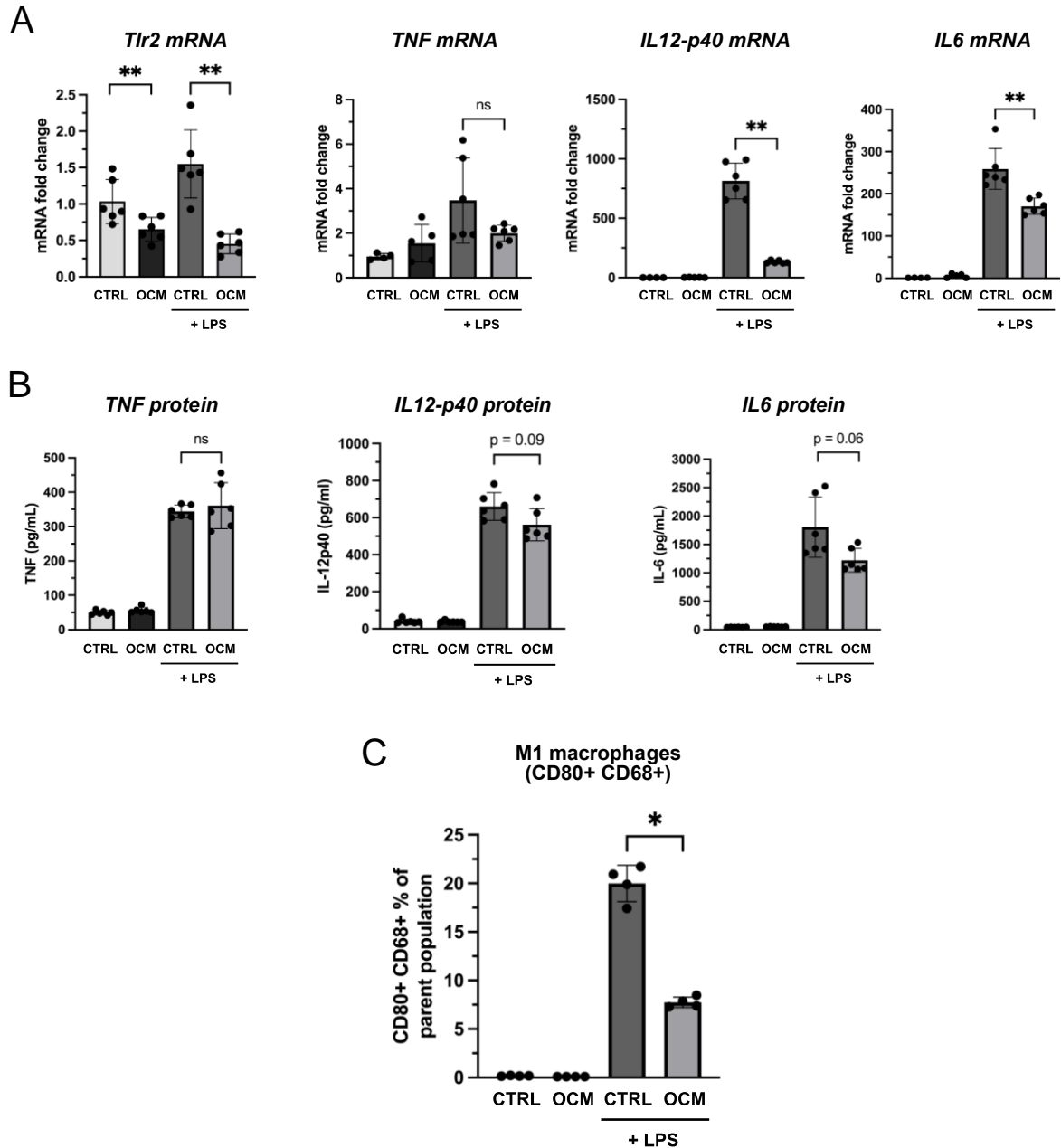
Figure 5. Effect of human OCM from control patients (OCM-CP) and Ulcerative Colitis patients (OCM-UC) on human Monocyte-Derived Macrophages (hMDM). **A.** qPCR analysis of pro-inflammatory markers. Data are represented as a percentage of the mRNA response level of each gene, with expression level measured in control cells stimulated with LPS used as reference and defined as 100%. Data are expressed as mean \pm SD (n=3-5). **B.** ELISA quantification of pro-inflammatory cytokines in the culture supernatant of control hMDM (treated or not with LPS) and hMDM treated with OCM from control or UC patients in the presence of LPS (100ng/mL) for 24h. Data are expressed as mean \pm SD (n=3-5). **C.** Analysis of CD68 membrane protein expression level by flow cytometry in hMDM treated with OCM from control or UC patients in the presence of LPS (100ng/mL). Data are represented as a percentage, with expression level measured in control cells stimulated with LPS used as reference and defined as 100%. Data are expressed as mean \pm SD (n=5). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; ns, not significant (Mann-Whitney).



Supplemental figure 1: Schematic representation of the experimental protocol **(A)** and representative image of mouse colon organoid appearance when the conditioned media were collected **(B)**.



Supplemental figure 2: conditioned medium produced by contact with empty Matrigel domes do not show any anti-inflammatory effect. *iNOS* mRNA expression level after stimulation with OCM +/- LPS or Matrigel control at 6h in RAW 264.7 macrophage cell line (A) and in BMDM (B). Data represent mean +/- SD (n=3).



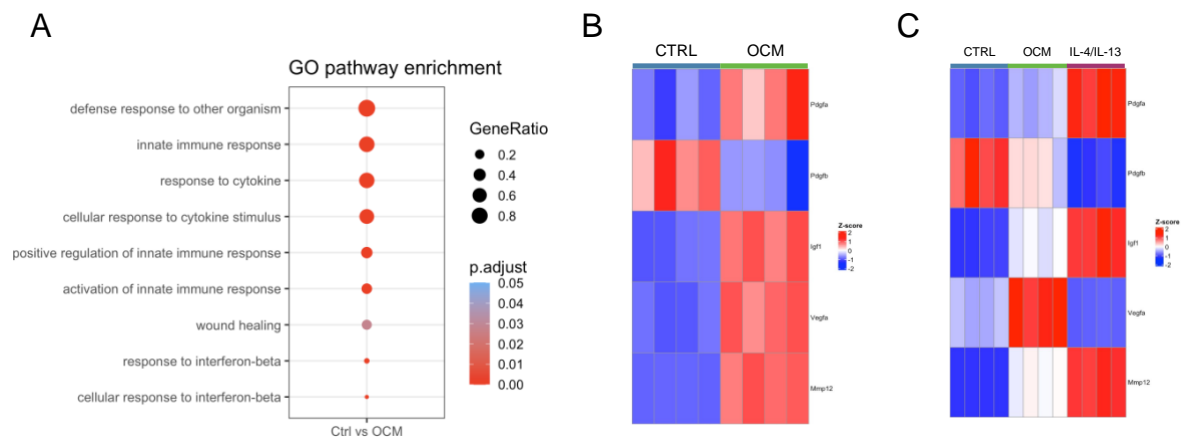
Supplemental Figure 3: mouse OCM controls the LPS-dependent type 1 macrophage response in BMDM.

A. qPCR analysis of the expression of TLR2 (M1 marker) and inflammatory cytokines (TNF, IL-12-p40, IL-6) by BMDM cells after stimulation with OCM +/- LPS (100 ng/mL) for 24 hours. Data are presented as mean +/- SD (n = 6) of 2 independent experiments.

B. ELISA quantification of inflammatory cytokines (TNF, IL-12-p40, IL-6) in the culture supernatant of BMDM cells after stimulation with OCM +/- LPS (100 ng/mL) for 24 hours. Data are presented as mean +/- SD (n = 6) of 2 independent experiments.

C. Flow cytometry analysis of the percentage of CD80/CD68 positive cells among BMDM after stimulation with OCM +/- LPS (100 ng/mL) for 24 hours. Data are presented as mean +/- SD (n = 4).

* P < 0.05, ** P < 0.01; ns, not significant (Mann-Whitney).



Supplemental figure 4: OCM-treated BMDM exhibit a wound-healing profile. **A.** Gene ontology (GO) analysis of differentially expressed genes of BMDM between Ctrl and OCM conditions. Selected GO terms are represented by dots colored by p-values and sized by gene ratio. **B.** Heatmap representing the wound healing associated genes expression of BMDM from Ctrl and OCM conditions (adjusted p-value <0.05). **C.** Heatmap representing the wound healing associated genes expression of BMDM from Ctrl, OCM and IL-4/IL-13 conditions (adjusted p-value <0.05).

Supplemental table 1: genes differentially expressed in BMDM stimulated with OCM or IL-4/IL-13

Upregulated only in OCM	Upregulated only in IL-4/IL-13	Downregulated only in OCM	Downregulated only in IL-4/IL-13	Upregulated in OCM and IL-4/IL-13	Downregulated in OCM and Upregulated in IL-4/IL-13	Upregulated in OCM and Downregulated in IL-4/IL-13	Downregulated in OCM and IL-4/IL-13
Snord87	Eya1	Cdk15	Gsta3	Arhgef4	Il1rl2	Slc40a1	Bend6
Npas2	Paqr8	Nop58	Dst	Il1rl1	Arl4c	Stat4	Stat1
Tbc1d8	Slc9a2	Snora41	Sema4c	Plcl1	Rgl1	Hecw2	Htr2b
Rftn2	Raph1	Ccnyl1	Rnf149	Cd28	Fcgr2b	Gpr35	Marco
Gm8292	Idh1	Fzd5	Gm23722	D630023F18Rik	Flrt3	Mr1	Ptgs2os2
Fzd7	Map2	Nhej1	Stk17b	Ramp1	P2ry14	Fcgr4	Olfml2b
Ikzf2	Tns1	Acs13	Aox1	St8sia4	Tent5c	Slamf7	Ifi206
Fam174a	Stk11ip	Utp14b	Slc11a1	Ephx1	Dhcr24	AA467197	Ifi213
Pam	Nyap2	LOC102637806	Pid1	Plxdc2	Tmco4	Acss2	Ifi211
Cd55	Gpc1	Gm23370	Dner	Fut7	Cyp51	Procr	Ifi205
Cfh	Dusp28	Fam72a	Mgat5	Ier5l	Flt1	Sirpb1b	Ass1
Gm9530	Rnf152	Kif14	Ikbke	Ak1	Ang	Mgst2	Morrbid
Vamp4	Serpinb12	Dhx9	Klhl12	Ptgs1	Fasn	Fcrl1	Slpi
Sell	Cxcr4	Hsd17b7	Ppp1r12b	Chac1	H2ac6	Lpar1	Zbp1
F5	Il10	Cd244a	Kif21b	Sord	Pxdc1	Id3	Bbs12
Aldh9a1	Tmcc2	Igsf9	Rgs1	Acss1	Socs1	Bst1	Tlr2
Pbx1	Phlda3	Ifi208	Lamc1	Tox2	Rmi2	Serpine1	S100a8
Pcp4l1	Slc19a2	Ifi203	Ralgps2	Lanc13	Acat2	Cped1	Fcgr1
D730003I15Rik	Sft2d2	Exo1	B4galt3	Zmat3	Abcg1	Pde1c	Olfml3
G0s2	Sh2d1b1	Pdss1	F11r	P2ry1	Fads2	Fam13a	AI504432
Cd34	Fcgr3	Exosc2	Vangl2	Selenbp1		2310010J17Rik	Ndst3
A330023F24Rik	Nit1	Rnd3	Slamf9	Trp53inp1		Gprc5b	Gbp5

Armc3	Sdccag8	Selenoh	Ifi209	Atp6v0d2		Ifitm6	Gbp3
Etl4	Batf3	Nr1h3	Ifi204	Rragd		Tnni2	Ifi44
Tmem203	Traf5	Prr5l	Itga8	Pink1		Hivep2	Tmeffl
Fcna	Hhat	Commd9	Trdmt1	Padi2		Fabp7	Abca1
Gm25541	Mrc1	Aven	Otud1	Dhrs3		Zfr2	Pde4b
Slc2a8	Pnpla7	Spint1	Coq4	Arap2		Col4a1	Marcks1
Sp3os	Olfm1	Slc24a5	Ptges	Mettl27		Col4a2	Runx3
Fkbp7	Ralgds	Bub1	Ralgps1	Slc46a3		Cadps	Luzp1
Cd59a	Ncs1	Fam83d	Dab2ip	Asb4		Egr3	C1qa
Prrg4	Angptl2	Srsf6	Gca	Asns		St14	Pdpn
Ccdc73	Lhx2	Aurka	Galnt3	Abtb1		Esam	Isg15
Bmf	Nek6	Cass4	Itga6	Pparg		Acsbg1	Nfxl1
Sqor	Cytip	Pmepa1	Calcr1	Clec4b1		Smad6	Cxcl10
Zc3h6	Cobll1	Ogfr	Dgkz	Vwf		Cmtm8	Oasl2
Ap5s1	Scn3a	Rtel1	Chst1	Clec7a		Slc22a4	Oasl1
Tspyl3	Dhrs9	Dkc1	Tcp1l11	Cebpa		Ccl6	Oas2
Ndr3	Gpr155	Siah1b	Ivd	Fcgrt		Cmah	Oasl3
Pabpc11	Plekha3	P2ry13	Slc28a2	Dbp		Ninj1	Il17ra
B630019K06Ri	Ccdc141	P2ry12	Mertk	Man2a2		Dbn1	Usp18
k	Sestd1	Gpatch4	Slc20a1	Cracr2b		Cxcl14	Saa3
Xlr	Ldlrad3	Smg5	Siglec1	Tnfrsf26		Arrdc3	Sema4b
Plxnb3	Abtb2	Mstol	Plcb4	Arg1		Egln3	Gdpd5
Gdi1	Rcn1	Adar	Jag1	Oit3		Fos	Trim30b
Ikbkg	Map1a	Ctsk	Ralgapa2	Ddit4		Card6	Irf7
Cxcr3	Gatm	Ciart	Cd93	Egr2		5430437J10Rik	Nuak1
Pgk1	Slc30a4	Csf1	Ninl	Tcp1l12		Lix1	Stat2
Col4a5	Secisbp21	Gar1	Hck	Mcf2l		Vegfa	Sipa1l2
Kctd12b	MacroD2	Cenpe	Src	Hpgd		Trem12	Pnp2
Sat1	Cst7	Gbp7	Cebpb	Mfap3l		Egr1	Mrpl52
Ptchd1							

Noct	Pdrg1	Kyat3	Helz2	Lpl		Sncaip	Mmp14
Mgarp	Zhx3	Tgfbr1	Cybb	Gdf15		Synpo	Spata13
Setd7	Mybl2	Mexis	AA414768	Ndrgr4		Papss2	Acod1
Pfn2	Sdc4	Tle1	Il13ra1	Tsc22d1		ND6	Cx3cr1
Kpna4	Sys1	Acot11	Dusp9	Ednrb			Cxcl16
Gm22009	Ocstamp	Btbd19	F630028O10Rik	Mmp13			Zmynd15
Tmem154	Slco4a1	Kif2c	Efnb1	Mmp12			Cdk5r1
Cd5l	Cln5	Cdc20	Il2rg	Or8b53			Ccl5
Gm15417	Cacna1f	Snora73b	Lpar4	Fxyd2			Rnf213
Ecm1	Chst7	Hmgn2	Gm6377	Aph1c			Aoah
Sv2a	Slc9a6	Aunip	Radx	Tcta			Carmil1
Ppm1j	L1cam	Slc66a1	Sirpb1a	Tmem158			Gcnt2
Rhoc	Prrg1	Mthfr	Sirpb1c	Ccr1			Adcy2
Gm5547	Dlg3	Tmem201	Skil	Fgf11			Gm22748
Cd53	Nhs12	Slc4a2	Cetn4	Acap1			Rsad2
Gstm1	Srpx2	Tyms	Intu	Mgl2			Gpr84
Gstm4	Tsc22d3	Gbp9	Slc7a11	Clec10a			Mx1
Sort1	Ammecr1	Mvk	Maml3	Ypel2			Mx2
Lrrc39	Sh3kbp1	Oas1a	B3galnt1	Rdm1			Aif1
Gclm	Tlr8	Gm10167	Rapgef2	Itgb3			H2-T24
Bdh2	Arhgap6	Parp12	Cd1d1	Rptoros			Enpp4
Gipc2	Fabp5	Cd207	1500004A13Rik	Baiap2			Trem1
Plag1	Fabp4	Pradc1	H2ac20	Gm12589			Ms4a4c
Asph	Gm5150	Gm26175	Rwdd3	Serpinb1a			Ms4a6b
Tmem64	Cldn11	Stk38l	Tifa	Serpinb1c			Ch25h
Tbc1d2	Gnb4	Tmem238	Bank1	Serpinb9b			Ifit2
Tmem38b	Tmem144	Grwd1	Gbp2	Trib2			Ifit3
Plin2	Gask1b	Igf1r	Ssx2ip	Lpin1			Ifit1bl1
Cdkn2b	Pdgfc	Slco3a1	Chd7	Ahr			Ifit3b
Gm12708	Etv3	Aen	Fbx14	Ahnak2			Ifit1

Prkaa2	Fdps	Prc1	Bach2os	Ctnnd2			
Plpp3	Phgdh	Trim30c	Tmem8b	Dcstamp			
Gm22980	Wars2	Gm24888	Msantd3	Fbxo32			
Snord55	Igsf3	Gm25636	Rnf183	Tmem71			
Hyi	Inka2	Igsf6	Hdhd3	Csf2rb2			
Ccdc30	Chil3	Plk1	Zfp618	Abcd2			
Rab42	Psrc1	Kdm8	Ambp	Itgb7			
Padi4	Bcar3	Hirip3	Hook1	Klhl24			
Epha2	Gm4610	Pald1	Ak4	Pacrg			
Fblim1	Pla2g12a	Dna2	4933424M12Ri k	Crebrf			
Tmem82	Casp6	Parpbp	Prdx1	Rasgrp3			
Per3	Ddit4l	Sros1	Ptafr	Cystm1			
Gm22897	Tspan5	Mettl1	Smpdl3b	Ctsf			
Abcb1a	Ptger3	Ankrd52	Fgr	Macrodl			
Abcb4	Fam110b	Arglu1	Slc25a33	Klf9			
Sema3c	Pdp1	Gm24698	Plekhn1				
Cd36	Ankrd6	Lsm6	Cdk14				
A630072M18Ri k	Mob3b	Ddx39a	Gsap				
Nos3	Aqp3	Nfix	Cpeb2				
Khk	Il11ra1	Wdr83	Fbxl5				
Slc2a9	Cd72	Cenpt	Tapt1				
Pcdh7	Clta	Klhdc4	Txk				
Gnpda2	Klf4	Pnp	Afp				
Hopx	Ptpn3	Mettl17	Rassf6				
Ppbp	Tnfsf8	Slc7a7	Cxcl3				
Hpse	Tlr4	Dhrs4	Cxcl1				
Gm24265	Dennd4c	Ska3	Cxcl2				
Gm24407	Mlt3	Phf11c	Gpat3				

Tmem116	Tusc1	Ldlr	Arhgap24				
Rilpl2	Nfia	Usp2	Spp1				
Card11	Slc6a9	H2ax	Ift81				
Tecpr1	Exo5	Cspg4	A930024E05Ri k				
N4bp2l1	Smap2	Pif1	Hcar2				
Hilpda	Azin2	Mns1	Rilpl1				
Tpk1	Ak2	Snhg5	Zcwpw1				
Lrrc6l	Rnf19b	Il20rb	Pilra				
Gsdme	C77080	Traip	Pilrb1				
Gadd45a	Cnr2	Nme6	Pilrb2				
Mlap	Zfp268	Gm26448	Nxpe5				
Loxl3	Hgf	Znrf3	Trappc14				
Wbp1	Abcb8	Irgm1	Cav1				
2610306M01Ri k	Insig1	Hnrnp1	Met				
Clec2i	AI839979	Slc36a1	Plxna4os1				
Gabarapl1	Fosl2	Igtp	Akr1b8				
Mansc1	Mxd4	Irgm2	Cald1				
Crebl2	Rgs12	Nlrp1a	Clec5a				
Gprc5a	9230114K14Rik	Pimreg	Tmem176a				
Rassf8	Rhoh	Lgals9	St3gal5				
Caprin2	Stap1	Ccl7	Hk2				
Gm15931	Thap6	Ccl12	Wdr54				
Isoc2b	Naaa	Slfn5	Prokr1				
Inafm1	Abcg3	Slfn8	Chchd6				
Trappc6a	Acad12	Prr11	Irak2				
Eid2b	Hvcn1	Ska2	Clec4n				
Zfp30	Sh2b2	Luc7l3	Clec4d				
Hcst	Pdgfa	Eme1	Clec4e				

Tmc3	Mad11l	Dhx58	C1rl				
Il16	Amz1	Plekhh3	C1ra				
Aqp11	D5Ert605e	Ifi35	P3h3				
Capn5	Ubl3	Hrob	Ccnd2				
Snord15a	B3glt	Ubtf	Cd69				
Ucp2	Slc25a13	Kif18b	Klra2				
Folr1	Gpr85	Kpna2	Magohb				
E430018J23Rik	Tfec	Llgl2	Dusp16				
Stk32c	Wdr91	Trim65	Plekha5				
Lrrc27	Hipk2	Ccdc137	C5ar1				
Urah	Slc37a3	H2ac22	Dmwd				
Pnpla2	Rab19	H2ac8	Dmpk				
Cdkn1c	Ephb6	Mboat1	Vasp				
E230032D23Rik	Pals2	Rgs14	Fosb				
k							
Cnksr3	Znrf2	Tent4a	Relb				
Akap7	Aqp1	Vcan	Nectin2				
Arhgap18	Ndnf	Ccnb1	Bcl3				
Tspyl4	Rab11fip5	Depdc1b	Pou2f2				
Cd24a	Anxa4	Gm36161	Spred3				
Unc5b	Mrps25	Cmpk2	Nfkbid				
Lrrc20	Rbsn	Trmt61a	Ppp1r15a				
Srgn	Mitf	Tedc1	Ctsc				
Gstt3	Bhlhe40	Sqle	Usp35				
Gstt2	Plxnd1	Sla	Tsku				
Mif	Pex26	Gcat	Trim30a				
Gadd45b	Clec4a1	Ccdc134	Trim30d				
Tle6	Clec4a3	Pus7l	Gvin2				
Gm4924	Clec4a2	Espl1	Ampd3				
Ckap4	Hebp1	Nmr1l	Calcb				

Dgka	Gm19434	Pmm2	Nucb2				
Mmp19	Gsg1	Dgcr8	Cdr2				
Evi5l	Eps8	Gm24616	Prkcb				
Snord13	Mgst1	Rtp4	Il4ra				
2500002B13Rik	St8sia1	Parp14	Sez6l2				
Lpar2	Irag2	Parp9	Itgal				
Tmem38a	Lilra6	Polq	Bnip3				
Adgre5	Ehd2	Qtrt2	Syne1				
Tk2	Sipa1l3	Itsn1	Sash1				
Dpep2	Plekhf1	Fgd2	Adgb				
Nqo1	Siglecf	Hnrnpm	Rab32				
Pkd1l2	Cd33	Kifc1	Txlnb				
2410022M11Rik	Klk1b11	Hspa1b	Tnfaip3				
k	Atf5	Hspa1a	Pde7b				
Neil2	Il4i1	Gm23442	Ahi1				
Phxr4	Rpl13a	Sema6b	Raet1a				
Sesn3	Mfge8	Eif2ak2	Slc16a10				
4931406C07Rik	Anpep	Gm23639	Prdm1				
Angptl6	Cpeb1	Kif20a	Lilrb4a				
Tmem205	Fzd4	Lmnbl	Rhobtb1				
Plppr2	Map6	Rbm4b	Trpm2				
Zfp810	Pgm2l1	Rab3il1	Dnmt3l				
Tmem25	Fchsd2	Fads3	Arid3a				
Gm5617	Nlrp10	Ccdc86	Gm16104				
Zbtb16	Rras2	Ms4a14	Txnrd1				
Layn	Sult1a1	Ms4a7	Eid3				
Rora	Itgax	Ms4a4b	Chst1l				
Aqp9	Lhpp	Ms4a6c	Elk3				
Atosa	Fam53b	Ms4a6d	Dusp6				
Plscr4							

Trf	Inpp5a	Scd2	Phlda1				
Nudt16	Gm16201	Fbxl15	Lyz2				
Nicn1	Spef11	Sfxn2	Lyz1				
Slc25a20	Zfp511	Atrnl1	Mdm1				
Ccr2	Msx3		Hmga2				
Pik3ip1	Cd151		Marchf9				
Tcn2	Mrgpre		Mcemp1				
Ltc4s	Plekhg1		Rab20				
Snord118	Ust		Angpt2				
Nlgn2	Nhs11		Gsr				
Atp2a3	Hebp2		Rbpms				
Srr	Dse		Ppp1r3b				
Sez6	Fyn		Prag1				
Wfdc17	Cd164		Msr1				
Wfdc18	Man1a		Mtus1				
Tspoap1	Reep3		Klf2				
Fam117a	Ado		Tom1				
Stac2	Zfp365		Hmox1				
Fbxl20	Tmem26		Inpp4b				
Thra	Pdxk		Rnf150				
Cntd1	Med16		Ier2				
Hexim2	Gamt		Junb				
Abca8b	Adamts15		Nod2				
Kcnj2	Matk		Lpcat2				
Cd300a	Gna15		Rrad				
Rab37	Igf1		Fhod1				
Oxld1	Socs2		Slc9a5				
Pycr1	Nab2		Sntb2				
Acot13	Irs2		Zfp821				
Serpinb6b	F7		Irf8				

Serpinb9	F10	Plau				
Serpinb1b	Rasa3	Lrmda				
1110046J04Rik	Fgfr1	Tnnc1				
Bph1	Dusp4	Gch1				
Tubb2b	Slc7a2	Peli2				
Slc22a23	Snx25	Sdr39u1				
F13a1	Vegfc	Phf11a				
Gm34084	Homer3	Phf11b				
Pde8b	Large1	Slc25a37				
Elovl7	N4bp1	Ppp3cc				
Plk2	Adcy7	Slc39a14				
Kif3c	Tppp3	Lpar6				
Klf11	Cdh1	Rgcc				
Prkar2b	Mvd	Kbtbd7				
Tspan13	Rnf166	Dach1				
Nubpl	Cbfa2t3	Kctd12				
Gm22513	Thrb	Gm34643				
Dmac2l	Kctd6	Spry2				
Hspa2	Tmem273	Amotl1				
Acot2	Lgals3	Icam1				
Acot1	Klhl33	Il18				
Ston2	Apex1	Zc3h12c				
Ttc7b	Rnase4	Rab39				
Ifi27	Rnase2a	Dmxl2				
5033406O09Rik	Ltb4r1	Pstpip1				
Ankrd33b	Wdfy2	Arid3b				
Sdc2	Fdft1	Smad3				
Laptn4b	Htr2a	Zfp949				
Matn2	Lacc1	Plod2				
Klf10	Mmp27	Pik3cb				

Dpys	Shfl	Hemk1				
Ext1	Gm16845	Lgalsl				
Ndrp1	Eepd1	Stk10				
Smpd5	Aplp2	Or2v1				
Oplah	Vwa5a	Ifi47				
C030006K11Ri	Nectin1	Lym7				
k						
Gm36738	Tmem202	Nlrp3				
Fam83f	Myo1e	Zswim7				
Tfcp2	Slc17a5	Slc25a35				
Pou6f1	Bcl2a1b	Arrb2				
Cela1	Mras	Xaf1				
Krt80	Ppp2r3a	Rap1gap2				
Igfbp6	Acy1	Cpd				
Mpv17l	Cyb561d2	Ssh2				
Abcc5	Pfkfb4	Rffl				
Fam131a	Fbxl2	Slfn4				
Igf2bp2	Slc25a38	Slfn3				
Dgkg	Lyzl4	Ccl3				
St3gal6	Cdcp1	Ccl4				
Gbe1	Ccr3	Gdpc1				
Hlcs	Snhg15	Abcc3				
Mettl26	Cnrip1	Xylt2				
Phf1	Acyp2	Arl5c				
Trp53cor1	Wwc1	Pgap3				
Tmem217	Ccng1	Tns4				
Cyp4f13	Mgat1	Limd2				
Angptl4	Rnfl30	Abca5				
H2-Ob	Ccdc69	Cd300e				
Notch4	2810001G20Rik	Tmc8				

Hspa11	Myh10	Socs3				
Vwa7	Tnfsf12	Slc16a3				
Ddah2	Scimp	Prss16				
Clic5	Rtn4rl1	H1f4				
Ptprrs	Rilp	Ripor2				
Vmac	Rflnb	Aldh5a1				
Slc25a23	Ankrd13b	Mak				
Haa0	Tob1	Sema4d				
Dync2li1	Cavin1	Gadd45g				
Epas1	Atp6v0a1	Pdlim7				
Bambi	Cd300lg	Golm1				
Lama3	Plekhl1	Slc6a19				
Sil1	Tanc2	Glrx				
Gm4013	Btbd17	Gtf2h2				
Pmaip1	Cd300lb	Ccdc125				
Acaa2	Cd300ld	Zswim6				
Ltbp3	Cbx8	Snx18				
Lipa	Tbc1d16	Gm6682				
Sorbs1	Slc26a11	Wdr35				
Frat2	Endov	Odc1				
Lzts2	Cbr2	Cdhr3				
Pdcd4	Idi1	Nfkb1a				
Tcf7l2	H2bc4	At1l				
Adrb1	Hfe	Ltbp2				
Gfra1	Dusp22	Tgfb3				
Grk5	Irf4	Ptger4				
	Edn1	Retreg1				
	Gfod1	Trps1				
	Cd83	Trib1				
	Dtnbp1	Slc39a4				

Rnf144b	Maff				
Auh	Pdgfb				
Nfil3	Bik				
Tspan17	Rnd1				
Tifab	Slc11a2				
1810034E14Rik	Tamalin				
Srd5a1	Nr4a1				
Ahrr	Itga5				
F2rl2	Nlrc3				
Rgs7bp	Cebpd				
Il6st	2510009E07Rik				
Arl15	1300002E11Rik				
Hmgcs1	Lmln				
Dnmt3aos	Csta2				
Mboat2	Nfkbiz				
Rnf144a	Jam2				
Agmo	Ets2				
Stxbp6	Ezr				
Rhoj	Tagap				
Syne2	Agpat4				
Rab15	Riok2				
Zfp361l	Spaca6				
Actn1	Fpr2				
Ttc9	Zfp229				
Gm25776	Msrbl				
Flrt2	Dusp1				
Ccdc88c	Itpr3				
Ighm	Hmga1				
Oxct1	Pim1				
Lifr	Tnf				

Ank	Pla2g7				
Otulin	Nfkbie				
Deptor	Rsph9				
Lratd2	A530064D06Ri				
Arhgap39	k				
Csf2rb	Trem3				
Nptxr	Trem14				
Mrtfa	B430306N03Ri				
Pmm1	k				
Cenpm	Tnfsf9				
Pim3	C3				
Galnt6	Nlrc4				
Csad	Plekhh2				
Map3k12	Colec12				
Srl	Spata24				
Ciita	Cd14				
Snn	Arap3				
Snx29	4930503L19Rik				
Cpped1	Pstpip2				
Shisa9	Cdc42ep2				
Pi4ka	Ehd1				
Arvcf	Ccdc88b				
Comt	Prdx5				
Ap2m1	Mpeg1				
St6gal1	Dock8				
Hes1	Acta2				
Fam43a	Nfkb2				
Bex6	As3mt				
	Gsto2				
	Dusp5				

	<p> Tnk2 Arhgap31 Cd200r1 Retnla Cblb Dcbld2 Mir99ahg Tiam1 Mrps6 Slc5a3 Brwd1 B3galt4 H2-DMa H2-Ab1 H2-Aa H2-Eb1 Or5v1 9130008F23Rik Adgre1 Xdh Gm18068 Ttc27 Qpct Galm Socs5 Crem Arhgap12 Slc39a6 Hbegf Arhgap26 </p>	Nanos1					
--	---	--------	--	--	--	--	--

Chsy3							
Cd74							
Camk2a							
Ppargc1b							
Pcyox11							
Afap111							
Batf2							
Ahnak							
Lpxn							
Jak2							
Lipn							
Hectd2os							
Fgfbp3							
Pdlim1							
Gsto1							
Add3							
Ablim1							

Supplemental table 2: sequences of oligonucleotide primers used in qPCR.

Mouse oligonucleotide primers		
	Sequences	
Genes	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
<i>Mrc1</i>	GTTACACCTGGAGTGATGGTTCTC	AGGACATGCCAGGGTCACCTTT
<i>Cd163</i>	GGCTAGACGAAGTCATCTGCAC	CTTCGTTGGTCAGCCTCAGAGA
<i>Cd14</i>	CCCAAGCACACTCGCTCAAC	GGAGGGTCGGGAAGTTGAGG
<i>iNOS</i>	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG
<i>Arg1</i>	CATTGGCTTGCGAGACGTAGAC	GCTGAAGGTCTCTTCCATCACC
<i>Cd36</i>	GGCCAAGCTATTGCGACA	CAGATCCGAACACAGCGTAGA
<i>Cd51</i>	GTTGGATCGTGTTTTTCAGA	TCCCACTAGCTGCACTTTCGT
<i>Slc40a1</i>	GGCATAAGGCTGTTGTGCTT	TCATGACACCAGGCGTTCTG
<i>Klf10</i>	AGTGACTTTGAAGCGGTGGA	AAGGTGCGTTAAACAAAATGC
<i>Ror-alpha</i>	TTCCATGCAAGATCTGTGGAGAC	TGCAGCCTTCACACGTAAT
<i>Tlr2</i>	GCGGACTGTTTCCTTCTGAC	CCAAAGAGCTCGTAGCATCC
<i>Tnf-alpha</i>	CCTGTAGCCACGTCGTAG	GGGAGTAGCAAGGTACAACCC
<i>Il-12p40</i>	GGAAGCACGGCAGCAGAAT	GGCGGGTCTGGTTTGATG
<i>IL-6</i>	CTTCACAAGTCGGAGGCTTA	TTCTGCAAGTGCATCATCGT
<i>GAPDH</i>	ATGGGAAGCTTGTCATCAACG	GGCAGTGATGGCATGGACTG

Human oligonucleotide primers		
	Sequences	
Genes	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
<i>Tnf-alpha</i>	ATCAATCGGCCCCGACTATCTC	ACAGGGCAATGATCCCAAAGT
<i>IL-1beta</i>	CCACAGACCTTCCAGGAGAATG	GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG
<i>IL12-p40</i>	GACATTCTGCGTTCAGGTCCAG	CATTTTTGCGGCAGATGACCGTG
<i>IL-6</i>	CTGCAGCCACTGGTTCTGT	GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA
<i>Ccl19</i>	CCAACTCTGAGTGGCACCAA	TGAACACTACAGCAGGCACC
<i>Cxcl11</i>	TTAAACAAACATGAGTGTGAAGGG	CGTTGTCCCTTTATTTTCTTTCAGG
<i>Cd51</i>	GACGAGAAGCAACCCTTCAG	CCCAGAGCAGAGGTTGTCTC
<i>GAPDH</i>	GACACCCACTCCTCCACCTTT	TTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT

Supplemental table 3: antibodies and reagents for immunofluorescence experiment used in the study (reference and dilution)

Western blot antibodies		
	reference	dilution
IκBa	ab32518 (abcam)	1/2000
Beta actine	15G5A11/E2 (Invitrogen)	1/2000
anti mouse IgG-HRP	#7076 (Cell signaling technology)	1/10000
anti rabbit-HRP	20402 (Biotium)	1/10000

BMDM FACS analysis		
	reference	dilution
FITC-CD206	141703 (BioLegend)	1/10
PE-Dazzle594-CD163	155315 (BioLegend)	1/20
APC-CD36	102611 (BioLegend)	1/20
BV510-CD80	104741 (BioLegend)	1/20
BV421-CD68	137017 (BioLegend)	1/20
PE-F4/80	123110 (BioLegend)	1/20

iNOS protein experiment		
	reference	dilution
iNOS	ab178945 (abcam)	1/1000
GFP secondary antibody	E-AB-1103 (Elabscience)	1/200
phalloidin	A12381 (Invitrogen)	1/400
DAPI	D9542 Sigma-Aldrich	1/10000

hMDM FACS analysis		
	reference	dilution
Pc5.5-CD14	A70204 (Beckman Coulter)	1/20
KrO-CD45	B36294 (Beckman Coulter)	1/20
PE/Cy7-CD68	333816 (BioLegend)	1/20
FITC-CD163	130-112-132 (Miltenyi Biotech)	1/50
AF700-CD206	141734 (BioLegend)	1/20

Cd5l neutralization assay		
	reference	concentration
Cd5l antibody	AF 2834 (R&Dsystems)	10 µg/mL
Control IgG	AB-108-C (R&Dsystems)	10 µg/mL

Supplemental table 4 : ELISA kits (references)

ELISA Kits	
	reference
CD5L	EM15RB (Thermofisher scientific)
Mouse IL-6	555240 (BD Biosciences)
Mouse IL12p40	555165 (BD Biosciences)
Mouse TNF- α	DY410-05 (Biotechne)
Human IL1- β	DY201 (Biotechne)
Human IL-6	DY206 (Biotechne)
Human IL12p40	DY1240 (Biotechne)
Human TNF- α	88-7346-22 (Invitrogen)

Annexe 2 - Communications scientifiques

Communications orales :

- **Séminaire hebdomadaire INFINITE** – 28 avril 2022 – Sujet : Rôle du récepteur aux acides biliaires TGR5 dans l'inflammation intestinale au cours des MICI
- Présentation vidéo pour la **23^{ème} journée André Verbert** (2023) – École Doctorale de Biologie Santé de Lille (EDBSL) – Sujet : Impact of the intestinal microenvironment on macrophage development

Bibliographie

Abella, V., Scotece, M., Conde, J., Pino, J., Gonzalez-Gay, M.A., Gómez-Reino, J.J., Mera, A., Lago, F., Gómez, R., Gualillo, O., 2017. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nat Rev Rheumatol* 13, 100–109. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.209>

Acharya, S., Timilshina, M., Jiang, L., Neupane, S., Choi, D.-Y., Park, S.W., Lee, S.Y., Jeong, B.-S., Kim, J.-A., Nam, T.-G., Chang, J.-H., 2018. Amelioration of Experimental autoimmune encephalomyelitis and DSS induced colitis by NTG-A-009 through the inhibition of Th1 and Th17 cells differentiation. *Sci Rep* 8, 7799. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26088-y>

Ahn, S.-H., Shah, Y.M., Inoue, J., Morimura, K., Kim, I., Yim, S., Lambert, G., Kurotani, R., Nagashima, K., Gonzalez, F.J., Inoue, Y., 2008. Hepatocyte nuclear factor 4 α in the intestinal epithelial cells protects against inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 14, 908–920. <https://doi.org/10.1002/ibd.20413>

Al, L., Yz, G., 2017. Role of hepcidin-ferroportin axis in the pathophysiology, diagnosis, and treatment of anemia of chronic inflammation. *Hemodialysis international. International Symposium on Home Hemodialysis* 21 Suppl 1. <https://doi.org/10.1111/hdi.12543>

Alasoo, K., Martinez, F.O., Hale, C., Gordon, S., Powrie, F., Dougan, G., Mukhopadhyay, S., Gaffney, D.J., 2015. Transcriptional profiling of macrophages derived from monocytes and iPS cells identifies a conserved response to LPS and novel alternative transcription. *Sci Rep* 5, 12524. <https://doi.org/10.1038/srep12524>

Amézaga, N., Sanjurjo, L., Julve, J., Aran, G., Pérez-Cabezas, B., Bastos-Amador, P., Armengol, C., Vilella, R., Escolà-Gil, J.C., Blanco-Vaca, F., Borràs, F.E., Villedor, A.F., Sarrias, M.R., 2014. Human scavenger protein AIM increases foam cell formation and CD36-mediated oxLDL uptake. *Journal of Leukocyte Biology* 95, 509–520. <https://doi.org/10.1189/jlb.1212660>

Amre, D.K., D'Souza, S., Morgan, K., Seidman, G., Lambrette, P., Grimard, G., Israel, D., Mack, D., Ghadirian, P., Deslandres, C., Chotard, V., Budai, B., Law, L., Levy, E., Seidman, E.G., 2007. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *Am J Gastroenterol* 102, 2016–2025. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01411.x>

Ananthakrishnan, A.N., 2013. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 9, 367–374.

Ananthakrishnan, A.N., Khalili, H., Konijeti, G.G., Higuchi, L.M., de Silva, P., Fuchs, C.S., Willett, W.C., Richter, J.M., Chan, A.T., 2014. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 63, 776–784. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305304>

Andersen, V., 2011. Polymorphisms in NF- κ B, PXR, LXR, PPAR γ and risk of inflammatory

bowel disease. *WJG* 17, 197. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i2.197>

Anderson, C.A., Boucher, G., Lees, C.W., Franke, A., D'Amato, M., Taylor, K.D., Lee, J.C., Goyette, P., Imielinski, M., Latiano, A., Lagacé, C., Scott, R., Amininejad, L., Bumpstead, S., Baidoo, L., Baldassano, R.N., Barclay, M., Bayless, T.M., Brand, S., Büning, C., Colombel, J.-F., Denson, L.A., De Vos, M., Dubinsky, M., Edwards, C., Ellinghaus, D., Fehrmann, R.S.N., Floyd, J.A.B., Florin, T., Franchimont, D., Franke, L., Georges, M., Glas, J., Glazer, N.L., Guthery, S.L., Haritunians, T., Hayward, N.K., Hugot, J.-P., Jobin, G., Laukens, D., Lawrance, I., Lémann, M., Levine, A., Libioulle, C., Louis, E., McGovern, D.P., Milla, M., Montgomery, G.W., Morley, K.I., Mowat, C., Ng, A., Newman, W., Ophoff, R.A., Papi, L., Palmieri, O., Peyrin-Biroulet, L., Panés, J., Phillips, A., Prescott, N.J., Proctor, D.D., Roberts, R., Russell, R., Rutgeerts, P., Sanderson, J., Sans, M., Schumm, P., Seibold, F., Sharma, Y., Simms, L., Seielstad, M., Steinhart, A.H., Targan, S.R., van den Berg, L.H., Vatn, M., Verspaget, H., Walters, T., Wijmenga, C., Wilson, D.C., Westra, H.-J., Xavier, R.J., Zhao, Z.Z., Ponsioen, C.Y., Andersen, V., Torkvist, L., Gazouli, M., Anagnou, N.P., Karlsen, T.H., Kupcinkas, L., Sventoraityte, J., Mansfield, J.C., Kugathasan, S., Silverberg, M.S., Halfvarson, J., Rotter, J.I., Mathew, C.G., Griffiths, A.M., Gearry, R., Ahmad, T., Brant, S.R., Chamaillard, M., Satsangi, J., Cho, J.H., Schreiber, S., Daly, M.J., Barrett, J.C., Parkes, M., Annesse, V., Hakonarson, H., Radford-Smith, G., Duerr, R.H., Vermeire, S., Weersma, R.K., Rioux, J.D., 2011. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 43, 246–252. <https://doi.org/10.1038/ng.764>

Annacker, O., Coombes, J.L., Malmstrom, V., Uhlig, H.H., Bourne, T., Johansson-Lindbom, B., Agace, W.W., Parker, C.M., Powrie, F., 2005. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med* 202, 1051–1061. <https://doi.org/10.1084/jem.20040662>

Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., Holm, L., 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G922–G929. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.5.G922>

Auffray, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F., 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669–692. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>

Bain, C.C., Schridde, A., 2018. Origin, Differentiation, and Function of Intestinal Macrophages. *Frontiers in Immunology* 9.

Bain, C.C., Scott, C.L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Guillems, M., Malissen, B., Agace, W.W., Mowat, A.M., 2013. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol* 6, 498–510. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.89>

Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M.S., Ehrlich, H.P., Brem, H., 2009. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *Journal of Surgical Research* 153, 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.04.023>

Bar-Ephraim, Y.E., Kretzschmar, K., Clevers, H., 2020. Organoids in immunological research. *Nat Rev Immunol* 20, 279–293. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0248-y>

- Barker, N., 2014. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 19–33. <https://doi.org/10.1038/nrm3721>
- Begg, D.P., Woods, S.C., 2013. The endocrinology of food intake. *Nat Rev Endocrinol* 9, 584–597. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.136>
- Beumer, J., Clevers, H., 2021. Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 39–53. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0278-0>
- Beutler, B.A., 2009. TLRs and innate immunity. *Blood* 113, 1399–1407. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-019307>
- Birchenough, G.M.H., Nyström, E.E.L., Johansson, M.E.V., Hansson, G.C., 2016. A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science* 352, 1535–1542. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7419>
- Biswas, A., Liu, Y.-J., Hao, L., Mizoguchi, A., Salzman, N.H., Bevins, C.L., Kobayashi, K.S., 2010. Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 14739–14744. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003363107>
- Bjerknes, M., Cheng, H., 2005. Gastrointestinal stem cells. II. Intestinal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G381–387. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00160.2005>
- Bogunovic, M., Davé, S.H., Tilstra, J.S., Chang, D.T.W., Harpaz, N., Xiong, H., Mayer, L.F., Plevy, S.E., 2007. Enteroendocrine cells express functional Toll-like receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G1770–1783. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00249.2006>
- Boll, G., Reimann, J., 1995. Lamina propria T cell subsets in the small and large intestine of euthymic and athymic mice. *Scand J Immunol* 42, 191–201. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1995.tb03645.x>
- Bouguen, G., Langlois, A., Djouina, M., Branche, J., Koriche, D., Dewaeles, E., Mongy, A., Auwerx, J., Colombel, J.-F., Desreumaux, P., Dubuquoy, L., Bertin, B., 2015. Intestinal steroidogenesis controls PPAR γ expression in the colon and is impaired during ulcerative colitis. *Gut* 64, 901–910. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307618>
- Bouma, G., Strober, W., 2003. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 3, 521–533. <https://doi.org/10.1038/nri1132>
- Brandl, K., Plitas, G., Schnabl, B., DeMatteo, R.P., Pamer, E.G., 2007. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* 204, 1891–1900. <https://doi.org/10.1084/jem.20070563>
- Brandtzaeg, P., 2010. Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation. *Immunol Invest* 39, 303–355. <https://doi.org/10.3109/08820131003680369>
- Brandtzaeg, P., Johansen, F.-E., 2005. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev* 206, 32–63.

<https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00283.x>

Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R., Russell, M.W., 2008. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol* 1, 31–37.
<https://doi.org/10.1038/mi.2007.9>

Cai, Z., Wang, S., Li, J., 2021. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review. *Frontiers in Medicine* 8.

Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58, 1091–1103.
<https://doi.org/10.1136/gut.2008.165886>

Cao, Q., Mertens, R.T., Sivanathan, K.N., Cai, X., Xiao, P., 2022. Macrophage orchestration of epithelial and stromal cell homeostasis in the intestine. *Journal of Leukocyte Biology* 112, 313–331. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU0322-176R>

Ceglia, S., Berthelette, A., Howley, K., Li, Y., Yiew, N.K.H., Xu, Y., Brink, R.A., Cyster, J.G., Hooper, L.V., Randolph, G.J., Reboldi, A., 2022. Epithelial-derived oxysterol production tunes intestinal IgA secretion against commensals and enteric pathogen in tissue. *The Journal of Immunology* 208, 115.07. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.208.Supp.115.07>

Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., Colonna, M., 2000. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 1, 305–310. <https://doi.org/10.1038/79747>

Cerovic, V., Bain, C.C., Mowat, A.M., Milling, S.W.F., 2014. Intestinal macrophages and dendritic cells: what's the difference? *Trends Immunol* 35, 270–277.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2014.04.003>

Chamouard, P., Monneaux, F., Richert, Z., Voegeli, A.-C., Lavaux, T., Gaub, M.P., Baumann, R., Oudet, P., Muller, S., 2009. Diminution of Circulating CD4+CD25 high T cells in naïve Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 54, 2084–2093. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0590-6>

Chaplin, D.D., 2010. Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol* 125, S3–23.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>

Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J.K., Poole, A.C., Srinivasan, S., Ley, R.E., Gewirtz, A.T., 2015. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 519, 92–96. <https://doi.org/10.1038/nature14232>

Chen, B.-C., Weng, M.-T., Chang, C.-H., Huang, L.-Y., Wei, S.-C., 2022. Effect of smoking on the development and outcomes of inflammatory bowel disease in Taiwan: a hospital-based cohort study. *Sci Rep* 12, 7665. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11860-y>

Chen, W., Liu, D., Ren, C., Su, X., Wong, C.-K., Yang, R., 2022. A Special Network Comprised of Macrophages, Epithelial Cells, and Gut Microbiota for Gut Homeostasis. *Cells* 11, 307. <https://doi.org/10.3390/cells11020307>

Cheng, H., Leblond, C.P., 1974. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine I. Columnar cell. *American Journal of Anatomy* 141, 461–479. <https://doi.org/10.1002/aja.1001410403>

Cheroutre, H., Lambolez, F., Mucida, D., 2011. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 11, 445–456. <https://doi.org/10.1038/nri3007>

Chiba, M., Nakane, K., Komatsu, M., 2019. Westernized Diet is the Most Ubiquitous Environmental Factor in Inflammatory Bowel Disease. *Perm J* 23, 18–107. <https://doi.org/10.7812/TPP/18-107>

Chung, Y., Kim, H., Im, E., Kim, P., Yang, H., 2015. Th 17 Cells and Nesfatin-1 are associated with Spontaneous Abortion in the CBA/j × DBA/2 Mouse Model. *Dev Reprod* 19, 243–252. <https://doi.org/10.12717/DR.2015.19.4.243>

Cima, I., Corazza, N., Dick, B., Fuhrer, A., Herren, S., Jakob, S., Ayuni, E., Mueller, C., Brunner, T., 2004. Intestinal Epithelial Cells Synthesize Glucocorticoids and Regulate T Cell Activation. *The Journal of Experimental Medicine* 200, 1635–1646. <https://doi.org/10.1084/jem.20031958>

Clevers, H.C., Bevins, C.L., 2013. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annu Rev Physiol* 75, 289–311. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183744>

Coombes, J.L., Powrie, F., 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 8, 435–446. <https://doi.org/10.1038/nri2335>

Cornes, J.S., 1965. Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer's patches. *Gut* 6, 225–229. <https://doi.org/10.1136/gut.6.3.225>

Cosín-Roger, J., Ortiz-Masiá, D., Calatayud, S., Hernández, C., Esplugues, J.V., Barrachina, M.D., 2016. The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD. *Mucosal Immunol* 9, 986–998. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.123>

Coste, A., Dubuquoy, L., Barnouin, R., Annicotte, J.-S., Magnier, B., Notti, M., Corazza, N., Antal, M.C., Metzger, D., Desreumaux, P., Brunner, T., Auwerx, J., Schoonjans, K., 2007. LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13098–13103. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702440104>

Crago, S.S., Kutteh, W.H., Moro, I., Allansmith, M.R., Radl, J., Haaijman, J.J., Mestecky, J., 1984. Distribution of IgA1-, IgA2-, and J chain-containing cells in human tissues. *J Immunol* 132, 16–18.

Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J.-P., D'Cruz, D., Casanova, J.-L., Trouillet, C., Geissmann, F., 2010. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.012>

Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P., Macfarlane, G.T., 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221–1227. <https://doi.org/10.1136/gut.28.10.1221>

Danese, S., 2011. Immune and nonimmune components orchestrate the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 300, G716–G722. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00472.2010>

D'Angelo, F., Bernasconi, E., Schäfer, M., Moyat, M., Michetti, P., Maillard, M.H., Velin, D., 2013. Macrophages promote epithelial repair through hepatocyte growth factor secretion. *Clin Exp Immunol* 174, 60–72. <https://doi.org/10.1111/cei.12157>

Daulagala, A.C., Bridges, M.C., Kourtidis, A., 2019. E-cadherin Beyond Structure: A Signaling Hub in Colon Homeostasis and Disease. *Int J Mol Sci* 20, 2756. <https://doi.org/10.3390/ijms20112756>

de Castro, M.M., Pascoal, L.B., Steigleder, K.M., Siqueira, B.P., Corona, L.P., Ayrizono, M. de L.S., Milanski, M., Leal, R.F., 2021. Role of diet and nutrition in inflammatory bowel disease. *World J Exp Med* 11, 1–16. <https://doi.org/10.5493/wjem.v11.i1.1>

De la Fuente, M., Campos, M., Del Rio, M., Hernanz, A., 1995. Inhibition of murine peritoneal macrophage functions by sulfated cholecystokinin octapeptide. *Regul Pept* 55, 47–56. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(94\)00091-b](https://doi.org/10.1016/0167-0115(94)00091-b)

de Leeuw, E., Li, Changqing, Zeng, P., Li, Chong, Diepeveen-de Buin, M., Lu, W.-Y., Breukink, E., Lu, W., 2010. Functional Interaction of Human Neutrophil Peptide-1 with the cell wall precursor Lipid II. *FEBS Lett* 584, 1543–1548. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.004>

De Smet, K., Contreras, R., 2005. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* 27, 1337–1347. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-0936-5>

Degirmenci, B., Valenta, T., Dimitrieva, S., Hausmann, G., Basler, K., 2018. GLI1-expressing mesenchymal cells form the essential Wnt-secreting niche for colon stem cells. *Nature* 558, 449–453. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0190-3>

Delfini, M., Stakenborg, N., Viola, M.F., Boeckxstaens, G., 2022. Macrophages in the gut: Masters in multitasking. *Immunity* 55, 1530–1548. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.08.005>

Denning, T.L., Norris, B.A., Medina-Contreras, O., Manicassamy, S., Geem, D., Madan, R., Karp, C.L., Pulendran, B., 2011. Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization. *J Immunol* 187, 733–747. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002701>

Díaz Peña, R., Valdés, E., Cofré, C., Castro-Santos, P., 2015. Th17 response and autophagy--main pathways implicated in the development of inflammatory bowel disease by genome-wide association studies. *Rev Esp Enferm Dig* 107, 559–565. <https://doi.org/10.17235/reed.2015.3670/2015>

Dige, A., Magnusson, M.K., Öhman, L., Hvas, C.L., Kelsen, J., Wick, M.J., Agnholt, J., 2016. Reduced numbers of mucosal DR(int) macrophages and increased numbers of CD103(+) dendritic cells during anti-TNF- α treatment in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 51, 692–699. <https://doi.org/10.3109/00365521.2015.1134649>

Dillon, A., Lo, D.D., 2019. M Cells: Intelligent Engineering of Mucosal Immune Surveillance. *Front Immunol* 10, 1499. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01499>

Dixit, V.D., Yang, H., Cooper-Jenkins, A., Giri, B.B., Patel, K., Taub, D.D., 2009. Reduction of T cell-derived ghrelin enhances proinflammatory cytokine expression: implications for age-associated increases in inflammation. *Blood* 113, 5202–5205. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-181255>

Dong, C.X., Zhao, W., Solomon, C., Rowland, K.J., Ackerley, C., Robine, S., Holzenberger, M., Gonska, T., Brubaker, P.L., 2014. The intestinal epithelial insulin-like growth factor-1 receptor links glucagon-like peptide-2 action to gut barrier function. *Endocrinology* 155, 370–379. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1871>

Donovan, A., Lima, C.A., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Zon, L.I., Robine, S., Andrews, N.C., 2005. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism* 1, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.01.003>

Dotti, I., Mora-Buch, R., Ferrer-Picón, E., Planell, N., Jung, P., Masamunt, M.C., Leal, R.F., Carpi, J.M. de, Llach, J., Ordás, I., Batlle, E., Panés, J., Salas, A., 2017. Alterations in the epithelial stem cell compartment could contribute to permanent changes in the mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 66, 2069–2079. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312609>

Dubuquoy, L., Jansson, E.A., Deeb, S., Rakotobe, S., Karoui, M., Colombel, J.-F., Auwerx, J., Pettersson, S., Desreumaux, P., 2003. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124, 1265–1276. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)00271-3](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)00271-3)

Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., Moles, M.-P., Grimaud, L., Lenoir, J., Preisser, L., Anegón, I., Catala, L., Ifrah, N., Descamps, P., Gamelin, E., Gascan, H., Hebbbar, M., Jeannin, P., 2007. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 110, 4319–4330. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-072587>

Dürr, U.H.N., Sudheendra, U.S., Ramamoorthy, A., 2006. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1758, 1408–1425. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.03.030>

Edwards, J.P., Zhang, X., Frauwirth, K.A., Mosser, D.M., 2006. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 80, 1298–1307. <https://doi.org/10.1189/jlb.0406249>

Egea, L., McAllister, C.S., Lakhdari, O., Minev, I., Shenouda, S., Kagnoff, M.F., 2013. GM-CSF Produced by Nonhematopoietic Cells Is Required for Early Epithelial Cell Proliferation and Repair of Injured Colonic Mucosa. *The Journal of Immunology* 190, 1702–1713. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202368>

Ehrencrona, E., van der Post, S., Gallego, P., Recktenwald, C.V., Rodriguez-Pineiro, A.M., Garcia-Bonete, M.-J., Trillo-Muyo, S., Bäckström, M., Hansson, G.C., Johansson, M.E.V., 2021. The IgGFC-binding protein FCGBP is secreted with all GDF sequences cleaved but maintained by interfragment disulfide bonds. *J Biol Chem* 297, 100871. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100871>

Elemam, N.M., Hannawi, S., Maghazachi, A.A., 2017. Innate Lymphoid Cells (ILCs) as Mediators of Inflammation, Release of Cytokines and Lytic Molecules. *Toxins (Basel)* 9, 398. <https://doi.org/10.3390/toxins9120398>

Erle, D.J., Briskin, M.J., Butcher, E.C., Garcia-Pardo, A., Lazarovits, A.I., Tidswell, M., 1994. Expression and function of the MAdCAM-1 receptor, integrin $\alpha 4 \beta 7$, on human leukocytes. *J Immunol* 153, 517–528.

Ermund, A., Schütte, A., Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Hansson, G.C., 2013. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305, G341–347. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00046.2013>

Esterházy, D., Loschko, J., London, M., Jove, V., Oliveira, T.Y., Mucida, D., 2016. Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral Treg cells and tolerance. *Nat Immunol* 17, 545–555. <https://doi.org/10.1038/ni.3408>

Fakhoury, M., Negrulj, R., Mooranian, A., Al-Salami, H., 2014. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *J Inflamm Res* 7, 113–120. <https://doi.org/10.2147/JIR.S65979>

Fang, F.C., Vazquez-Torres, A., 2002. Nitric oxide production by human macrophages: there's NO doubt about it. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 282, L941–L943. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00017.2002>

Farstad, I.N., Halstensen, T.S., Fausa, O., Brandtzaeg, P., 1994. Heterogeneity of M-cell-associated B and T cells in human Peyer's patches. *Immunology* 83, 457–464.

Fenton, T.M., Jørgensen, P.B., Niss, K., Rubin, S.J.S., Mörbe, U.M., Riis, L.B., Da Silva, C., Plumb, A., Vandamme, J., Jakobsen, H.L., Brunak, S., Habtezion, A., Nielsen, O.H., Johansson-Lindbom, B., Agace, W.W., 2020. Immune Profiling of Human Gut-Associated Lymphoid Tissue Identifies a Role for Isolated Lymphoid Follicles in Priming of Region-Specific Immunity. *Immunity* 52, 557–570.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.02.001>

Flier, L.G. van der, Clevers, H., 2009. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology* 71, 241–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163145>

Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., Artavanis-Tsakonas, S., 2005. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 435, 964–968. <https://doi.org/10.1038/nature03589>

Friedrich, M., Diegelmann, J., Schaubert, J., Auernhammer, C.J., Brand, S., 2015. Intestinal neuroendocrine cells and goblet cells are mediators of IL-17A-amplified epithelial IL-17C production in human inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol* 8, 943–958.

<https://doi.org/10.1038/mi.2014.124>

Frum, T., Spence, J.R., 2021. hPSC-derived organoids: models of human development and disease. *J Mol Med (Berl)* 99, 463–473. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01969-w>

Fu, X., Menke, J.G., Chen, Y., Zhou, G., MacNaul, K.L., Wright, S.D., Sparrow, C.P., Lund, E.G., 2001. 27-Hydroxycholesterol Is an Endogenous Ligand for Liver X Receptor in Cholesterol-loaded Cells*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 38378–38387. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105805200>

Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., Colonna, M., 2013. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN- γ -producing cells. *Immunity* 38, 769–781. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.010>

Fulkerson, P.C., Rothenberg, M.E., 2008. Origin, regulation and physiological function of intestinal eosinophils. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 22, 411. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2007.10.023>

Fuss, I.J., Heller, F., Boirivant, M., Leon, F., Yoshida, M., Fichtner-Feigl, S., Yang, Z., Exley, M., Kitani, A., Blumberg, R.S., Mannon, P., Strober, W., 2004. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 113, 1490–1497. <https://doi.org/10.1172/JCI19836>

Ganz, T., 2003a. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 710–720. <https://doi.org/10.1038/nri1180>

Ganz, T., 2003b. The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integr Comp Biol* 43, 300–304. <https://doi.org/10.1093/icb/43.2.300>

Gao, J., Liang, Y., Wang, L., 2022. Shaping Polarization Of Tumor-Associated Macrophages In Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.888713>

Gasteiger, G., Fan, X., Dikiy, S., Lee, S.Y., Rudensky, A.Y., 2015. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science* 350, 981–985. <https://doi.org/10.1126/science.aac9593>

Gebe, J.A., Kiener, P.A., Ring, H.Z., Li, X., Francke, U., Aruffo, A., 1997. Molecular Cloning, Mapping to Human Chromosome 1 q21-q23, and Cell Binding Characteristics of Sp α , a New Member of the Scavenger Receptor Cysteine-rich (SRCR) Family of Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 272, 6151–6158. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.10.6151>

Geissmann, F., Jung, S., Littman, D.R., 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71–82. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00174-2)

Genton, L., Kudsk, K.A., 2003. Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition. *Am J Surg* 186, 253–258. [https://doi.org/10.1016/s0002-9610\(03\)00210-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9610(03)00210-1)

Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P.,

- Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., Bruschi, M., Marcus, Y., Zimmermann, V.S., Taylor, N., Maizels, R.M., Jay, P., 2016. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 529, 226–230. <https://doi.org/10.1038/nature16527>
- Geremia, A., Arancibia-Cárcamo, C.V., 2017. Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. *Front. Immunol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01296>
- Ginhoux, F., Williams, M., 2016. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>
- Glasser, A.-L., Darfeuille-Michaud, A., 2008. Abnormalities in the handling of intracellular bacteria in Crohn's disease: a link between infectious etiology and host genetic susceptibility. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 56, 237–244. <https://doi.org/10.1007/s00005-008-0026-1>
- Göke, M., Kanai, M., Podolsky, D.K., 1998. Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am J Physiol* 274, G809-818. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.274.5.G809>
- Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., Rodewald, H.-R., 2015. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature13989>
- Graham, D.B., Xavier, R.J., 2020. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. *Nature* 578, 527–539. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2025-2>
- Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A.C., Grundy, D., 2017. Gastrointestinal Physiology and Function. *Handb Exp Pharmacol* 239, 1–16. https://doi.org/10.1007/164_2016_118
- Greter, M., Helft, J., Chow, A., Hashimoto, D., Mortha, A., Agudo-Cantero, J., Bogunovic, M., Gautier, E.L., Miller, J., Leboeuf, M., Lu, G., Aloman, C., Brown, B.D., Pollard, J.W., Xiong, H., Randolph, G.J., Chipuk, J.E., Frenette, P.S., Merad, M., 2012. GM-CSF Controls Nonlymphoid Tissue Dendritic Cell Homeostasis but Is Dispensable for the Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity* 36, 1031–1046. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.027>
- Gribble, F.M., Reimann, F., 2019. Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 15, 226–237. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0168-8>
- Gribble, F.M., Reimann, F., 2016. Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annu Rev Physiol* 78, 277–299. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105439>
- Grill, J.I., Neumann, J., Hiltwein, F., Kolligs, F.T., Schneider, M.R., 2015. Intestinal E-cadherin Deficiency Aggravates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis. *Dig Dis Sci* 60, 895–902. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3551-x>
- Gubatan, J., Holman, D.R., Puntasecca, C.J., Polevoi, D., Rubin, S.J., Rogalla, S., 2021. Antimicrobial peptides and the gut microbiome in inflammatory bowel disease. *World J*

Gastroenterol 27, 7402–7422. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i43.7402>

Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., Yona, S., 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14, 571–578. <https://doi.org/10.1038/nri3712>

Gunawardene, A.R., Corfe, B.M., Staton, C.A., 2011. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *Int J Exp Pathol* 92, 219–231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2011.00767.x>

Gustafsson, J.K., Ermund, A., Johansson, M.E.V., Schütte, A., Hansson, G.C., Sjövall, H., 2012. An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302, G430–438. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00405.2011>

Gustafsson, J.K., Johansson, M.E.V., 2022. The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 19, 785–803. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00675-x>

Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Müller, W., Sparwasser, T., Förster, R., Pabst, O., 2011. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3⁺ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 34, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.01.016>

Hahn, S., Nam, M.-O., Noh, J.H., Lee, D.H., Han, H.W., Kim, D.H., Hahm, K.B., Hong, S.P., Yoo, J.-H., Yoo, J., 2017a. Organoid-based epithelial to mesenchymal transition (OEMT) model: from an intestinal fibrosis perspective. *Sci Rep* 7, 2435. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02190-5>

Hahn, S., Nam, M.-O., Noh, J.H., Lee, D.H., Han, H.W., Kim, D.H., Hahm, K.B., Hong, S.P., Yoo, J.-H., Yoo, J., 2017b. Organoid-based epithelial to mesenchymal transition (OEMT) model: from an intestinal fibrosis perspective. *Sci Rep* 7, 2435. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02190-5>

Hall, P.A., Coates, P.J., Ansari, B., Hopwood, D., 1994. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 107 (Pt 12), 3569–3577. <https://doi.org/10.1242/jcs.107.12.3569>

Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Farkkila, M., Kontula, K., 2006. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 12, 3668–3672. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i23.3668>

Hammoudi, N., Hamoudi, S., Bonnereau, J., Bottois, H., Pérez, K., Bezault, M., Hassid, D., Chardiny, V., Grand, C., Gergaud, B., Bonnet, J., Chedouba, L., Tran Minh, M.-L., Gornet, J.-M., Baudry, C., Corte, H., Maggiori, L., Toubert, A., McBride, J., Brochier, C., Neighbors, M., Le Bourhis, L., Allez, M., 2022. Autologous organoid co-culture model reveals T cell-driven epithelial cell death in Crohn's Disease. *Frontiers in Immunology* 13.

Han, Y.-H., Kim, H.-J., Na, H., Nam, M.-W., Kim, J.-Y., Kim, J.-S., Koo, S.-H., Lee, M.-O., 2017. ROR α Induces KLF4-Mediated M2 Polarization in the Liver Macrophages that Protect

against Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cell Reports* 20, 124–135.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.017>

Harnack, C., Berger, H., Antanaviciute, A., Vidal, R., Sauer, S., Simmons, A., Meyer, T.F., Sigal, M., 2019. R-spondin 3 promotes stem cell recovery and epithelial regeneration in the colon. *Nat Commun* 10, 4368. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12349-5>

Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S.W., Forsberg, E.C., Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E.R., Ginhoux, F., Frenette, P.S., Merad, M., 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792–804.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>

Hayday, A., Gibbons, D., 2008. Brokering the peace: the origin of intestinal T cells. *Mucosal Immunol* 1, 172–174. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.8>

Hegarty, L.M., Jones, G.-R., Bain, C.C., 2023. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 20, 538–553.
<https://doi.org/10.1038/s41575-023-00769-0>

Hendel, S.K., Kellermann, L., Hausmann, A., Bindsløv, N., Jensen, K.B., Nielsen, O.H., 2022. Tuft Cells and Their Role in Intestinal Diseases. *Front. Immunol.* 13.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.822867>

Hibi, T., Ogata, H., 2006. Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 41, 10–16. <https://doi.org/10.1007/s00535-005-1744-3>

Hickey, J.W., Becker, W.R., Nevins, S.A., Horning, A., Perez, A.E., Zhu, C., Zhu, B., Wei, B., Chiu, R., Chen, D.C., Cotter, D.L., Esplin, E.D., Weimer, A.K., Caraccio, C., Venkataraman, V., Schürch, C.M., Black, S., Brbić, M., Cao, K., Chen, S., Zhang, W., Monte, E., Zhang, N.R., Ma, Z., Leskovec, J., Zhang, Z., Lin, S., Longacre, T., Plevritis, S.K., Lin, Y., Nolan, G.P., Greenleaf, W.J., Snyder, M., 2023. Organization of the human intestine at single-cell resolution. *Nature* 619, 572–584. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05915-x>

Ho, S.-M., Lewis, J.D., Mayer, E.A., Bernstein, C.N., Plevy, S.E., Chuang, E., Rappaport, S.M., Croitoru, K., Korzenik, J.R., Krischer, J., Hyams, J.S., Judson, R., Kellis, M., Jerrett, M., Miller, G.W., Grant, M.L., Shtraizent, N., Honig, G., Hurtado-Lorenzo, A., Wu, G.D., 2019. Challenges in IBD Research: Environmental Triggers. *Inflamm Bowel Dis* 25, S13–S23. <https://doi.org/10.1093/ibd/izz076>

Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F.F., See, P., Beaudin, A.E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E.C., Poidinger, M., Zolezzi, F., Larbi, A., Ng, L.G., Chan, J.K.Y., Greter, M., Becher, B., Samokhvalov, I.M., Merad, M., Ginhoux, F., 2015. C-Myb⁺ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* 42, 665–678. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.011>

Hogan, A.E., Gaoatswe, G., Lynch, L., Corrigan, M.A., Woods, C., O'Connell, J., O'Shea, D., 2014. Glucagon-like peptide 1 analogue therapy directly modulates innate immune-mediated inflammation in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 57, 781–784.
<https://doi.org/10.1007/s00125-013-3145-0>

Holmberg, F.E., Seidelin, J.B., Yin, X., Mead, B.E., Tong, Z., Li, Y., Karp, J.M., Nielsen, O.H., 2017. Culturing human intestinal stem cells for regenerative applications in the treatment of inflammatory bowel disease. *EMBO Mol Med* 9, 558–570. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607260>

Hoover, B., Baena, V., Kaelberer, M.M., Getaneh, F., Chinchilla, S., Bohórquez, D.V., 2017. The intestinal tuft cell nanostructure in 3D. *Sci Rep* 7, 1652. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01520-x>

Hosomi, S., Oshitani, N., Kamata, N., Sogawa, M., Yamagami, H., Watanabe, K., Tominaga, K., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Maeda, K., Hirakawa, K., Arakawa, T., 2008. Phenotypical and functional study of ghrelin and its receptor in the pathogenesis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 14, 1205–1213. <https://doi.org/10.1002/ibd.20477>

Howitt, M.R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A.M., Tran, S.V., Weinstock, J.V., Gallini, C.A., Redding, K., Margolskee, R.F., Osborne, L.C., Artis, D., Garrett, W.S., 2016. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science* 351, 1329–1333. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1648>

Huang, H., Fang, M., Jostins, L., Mirkov, M.U., Boucher, G., Anderson, C.A., Andersen, V., Cleynen, I., Cortes, A., Crins, F., D'Amato, M., Deffontaine, V., Dimitrieva, J., Docampo, E., Elansary, M., Farh, K.K.-H., Franke, A., Gori, A.-S., Goyette, P., Halfvarson, J., Haritunians, T., Knight, J., Lawrance, I.C., Lees, C.W., Louis, E., Mariman, R., Meuwissen, T., Mni, M., Momozawa, Y., Parkes, M., Spain, S.L., Théâtre, E., Trynka, G., Satsangi, J., van Sommeren, S., Vermeire, S., Xavier, R.J., Weersma, R.K., Duerr, R.H., Mathew, C.G., Rioux, J.D., McGovern, D.P., Cho, J.H., Georges, M., Daly, M.J., Barrett, J.C., 2017. Fine-mapping inflammatory bowel disease loci to single variant resolution. *Nature* 547, 173–178. <https://doi.org/10.1038/nature22969>

IBD in EPIC Study Investigators, Tjonneland, A., Overvad, K., Bergmann, M.M., Nagel, G., Linseisen, J., Hallmans, G., Palmqvist, R., Sjodin, H., Hagglund, G., Berglund, G., Lindgren, S., Grip, O., Palli, D., Day, N.E., Khaw, K.-T., Bingham, S., Riboli, E., Kennedy, H., Hart, A., 2009. Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: a nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut* 58, 1606–1611. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.169078>

Ignacio, A., Breda, C.N.S., Camara, N.O.S., 2017. Innate lymphoid cells in tissue homeostasis and diseases. *World J Hepatol* 9, 979–989. <https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i23.979>

Ihara, S., Hirata, Y., Hikiba, Y., Yamashita, A., Tsuboi, M., Hata, M., Konishi, M., Suzuki, N., Sakitani, K., Kinoshita, H., Hayakawa, Y., Nakagawa, H., Ijichi, H., Tateishi, K., Koike, K., 2018. Adhesive Interactions between Mononuclear Phagocytes and Intestinal Epithelium Perturb Normal Epithelial Differentiation and Serve as a Therapeutic Target in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis* 12, 1219–1231. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy088>

Ireland, H., Houghton, C., Howard, L., Winton, D.J., 2005. Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine paneth cell longevity in the murine small intestine. *Developmental Dynamics* 233, 1332–1336. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20446>

Italiani, P., Boraschi, D., 2014. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs.

Functional Differentiation. *Front Immunol* 5, 514. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>

Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., Littman, D.R., 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 126, 1121–1133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>

Iwasaki, A., Kelsall, B.L., 2001. Unique functions of CD11b⁺, CD8 α ⁺, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol* 166, 4884–4890. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.8.4884>

Jablonski, K.A., Amici, S.A., Webb, L.M., Ruiz-Rosado, J.D.D., Popovich, P.G., Partida-Sanchez, S., Guerau-de-Arellano, M., 2015. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS ONE* 10, e0145342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145342>

Jakobsson, T., Vedin, L.-L., Hassan, T., Venteclef, N., Greco, D., D'Amato, M., Treuter, E., Gustafsson, J.-Å., Steffensen, K.R., 2014. The oxysterol receptor LXR β protects against DSS- and TNBS-induced colitis in mice. *Mucosal Immunology* 7, 1416–1428. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.31>

Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G.C., 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15064–15069. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>

Johnson, E.E., Sandgren, A., Cherayil, B.J., Murray, M., Wessling-Resnick, M., 2010. Role of Ferroportin in Macrophage-Mediated Immunity. *Infect Immun* 78, 5099–5106. <https://doi.org/10.1128/IAI.00498-10>

Jørgensen, P.B., Fenton, T.M., Mörbe, U.M., Riis, L.B., Jakobsen, H.L., Nielsen, O.H., Agace, W.W., 2021. Identification, isolation and analysis of human gut-associated lymphoid tissues. *Nat Protoc* 16, 2051–2067. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00482-1>

Jose, S.S., De Zuani, M., Tidu, F., Hortová Kohoutková, M., Pazzagli, L., Forte, G., Spaccapelo, R., Zelante, T., Frič, J., 2020a. Comparison of two human organoid models of lung and intestinal inflammation reveals Toll-like receptor signalling activation and monocyte recruitment. *Clinical & Translational Immunology* 9, e1131. <https://doi.org/10.1002/cti2.1131>

Jose, S.S., De Zuani, M., Tidu, F., Hortová Kohoutková, M., Pazzagli, L., Forte, G., Spaccapelo, R., Zelante, T., Frič, J., 2020b. Comparison of two human organoid models of lung and intestinal inflammation reveals Toll-like receptor signalling activation and monocyte recruitment. *Clinical & Translational Immunology* 9, e1131. <https://doi.org/10.1002/cti2.1131>

Kabiri, Z., Greicius, G., Madan, B., Biechele, S., Zhong, Z., Zaribafzadeh, H., Edison, Aliyev, J., Wu, Y., Bunte, R., Williams, B.O., Rossant, J., Virshup, D.M., 2014. Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts. *Development* 141, 2206–2215. <https://doi.org/10.1242/dev.104976>

Kakni, P., Truckenmüller, R., Habibović, P., van Griensven, M., Giselbrecht, S., 2022a. A Microwell-Based Intestinal Organoid-Macrophage Co-Culture System to Study Intestinal Inflammation. *Int J Mol Sci* 23, 15364. <https://doi.org/10.3390/ijms232315364>

- Kakni, P., Truckenmüller, R., Habibović, P., Van Griensven, M., Giselsbrecht, S., 2022b. A Microwell-Based Intestinal Organoid-Macrophage Co-Culture System to Study Intestinal Inflammation. *IJMS* 23, 15364. <https://doi.org/10.3390/ijms232315364>
- Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., Sakuraba, A., Kitazume, M.T., Sugita, A., Koganei, K., Akagawa, K.S., Hibi, T., 2008. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest* 118, 2269–2280. <https://doi.org/10.1172/JCI34610>
- Katsuma, S., Hatae, N., Yano, T., Ruike, Y., Kimura, M., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., 2005. Free fatty acids inhibit serum deprivation-induced apoptosis through GPR120 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *J Biol Chem* 280, 19507–19515. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412385200>
- Kayama, H., Ueda, Y., Sawa, Y., Jeon, S.G., Ma, J.S., Okumura, R., Kubo, A., Ishii, M., Okazaki, T., Murakami, M., Yamamoto, M., Yagita, H., Takeda, K., 2012. Intestinal CX3C chemokine receptor 1(high) (CX3CR1(high)) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 5010–5015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114931109>
- Kett, K., Brandtzaeg, P., Radl, J., Haaijman, J.J., 1986. Different subclass distribution of IgA-producing cells in human lymphoid organs and various secretory tissues. *J Immunol* 136, 3631–3635.
- Khor, B., Gardet, A., Xavier, R.J., 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 307–317. <https://doi.org/10.1038/nature10209>
- Kim, K.-A., Zhao, J., Andarmani, S., Kakitani, M., Oshima, T., Binnerts, M.E., Abo, A., Tomizuka, K., Funk, W.D., 2006. R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. *Cell Cycle* 5, 23–26. <https://doi.org/10.4161/cc.5.1.2305>
- Kim, S.Y., Nair, M.G., 2019. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunol Cell Biol* 97, 258–267. <https://doi.org/10.1111/imcb.12236>
- Klement, E., Cohen, R.V., Boxman, J., Joseph, A., Reif, S., 2004. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 80, 1342–1352. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.5.1342>
- Knoop, K.A., McDonald, K.G., McCrate, S., McDole, J.R., Newberry, R.D., 2015. Microbial sensing by goblet cells controls immune surveillance of luminal antigens in the colon. *Mucosal Immunol* 8, 198–210. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.58>
- Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Núñez, G., Flavell, R.A., 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307, 731–734. <https://doi.org/10.1126/science.1104911>
- Kobayashi, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kamada, N., Chinen, H., Saito, R., Kitazume, M.T., Nakazawa, A., Sugita, A., Koganei, K., Isobe, K., Hibi, T., 2008. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 57, 1682–1689.

<https://doi.org/10.1136/gut.2007.135053>

Kobayashi, T., Siegmund, B., Le Berre, C., Wei, S.C., Ferrante, M., Shen, B., Bernstein, C.N., Danese, S., Peyrin-Biroulet, L., Hibi, T., 2020. Ulcerative colitis. *Nat Rev Dis Primers* 6, 74. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0205-x>

Koehler, J.A., Baggio, L.L., Yusta, B., Longuet, C., Rowland, K.J., Cao, X., Holland, D., Brubaker, P.L., Drucker, D.J., 2015. GLP-1R agonists promote normal and neoplastic intestinal growth through mechanisms requiring Fgf7. *Cell Metab* 21, 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.02.005>

Koelink, P.J., Bloemendaal, F.M., Li, B., Westera, L., Vogels, E.W.M., van Roest, M., Gloudemans, A.K., van 't Wout, A.B., Korf, H., Vermeire, S., Te Velde, A.A., Ponsioen, C.Y., D'Haens, G.R., Verbeek, J.S., Geiger, T.L., Wildenberg, M.E., van den Brink, G.R., 2020. Anti-TNF therapy in IBD exerts its therapeutic effect through macrophage IL-10 signalling. *Gut* 69, 1053–1063. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318264>

Kofla-Dłubacz, A., Pytrus, T., Akutko, K., Sputa-Grzegorzówka, P., Piotrowska, A., Dziegiel, P., 2022. Etiology of IBD—Is It Still a Mystery? *Int J Mol Sci* 23, 12445. <https://doi.org/10.3390/ijms232012445>

Kolls, J.K., McCray, P.B., Chan, Y.R., 2008. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat Rev Immunol* 8, 829–835. <https://doi.org/10.1038/nri2433>

Kraiczy, J., Nayak, K.M., Howell, K.J., Ross, A., Forbester, J., Salvestrini, C., Mustata, R., Perkins, S., Andersson-Rolf, A., Leenen, E., Liebert, A., Vallier, L., Rosenstiel, P.C., Stegle, O., Dougan, G., Heuschkel, R., Koo, B.-K., Zilbauer, M., 2019. DNA methylation defines regional identity of human intestinal epithelial organoids and undergoes dynamic changes during development. *Gut* 68, 49–61. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314817>

Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., Udalova, I.A., 2011. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 12, 231–238. <https://doi.org/10.1038/ni.1990>

Kromann, E.H., Cearra, A.P., Neves, J.F., 2024. Organoids as a tool to study homeostatic and pathological immune–epithelial interactions in the gut. *Clinical and Experimental Immunology* 218, 28–39. <https://doi.org/10.1093/cei/uxad118>

Kulkarni, D.H., Gustafsson, J.K., Knoop, K.A., McDonald, K.G., Bidani, S.S., Davis, J.E., Floyd, A.N., Hogan, S.P., Hsieh, C.-S., Newberry, R.D., 2020. Goblet cell associated antigen passages support the induction and maintenance of oral tolerance. *Mucosal Immunol* 13, 271–282. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0240-7>

Kumagai, Y., Akira, S., 2010. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol* 125, 985–992. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.01.058>

Lahar, N., Lei, N.Y., Wang, J., Jabaji, Z., Tung, S.C., Joshi, V., Lewis, M., Stelzner, M., Martín, M.G., Dunn, J.C.Y., 2011. Intestinal Subepithelial Myofibroblasts Support in vitro and in vivo Growth of Human Small Intestinal Epithelium. *PLOS ONE* 6, e26898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026898>

- Landy, J., Ronde, E., English, N., Clark, S.K., Hart, A.L., Knight, S.C., Ciclitira, P.J., Al-Hassi, H.O., 2016. Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 22, 3117–3126. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i11.3117>
- Latella, G., Di Gregorio, J., Flati, V., Rieder, F., Lawrance, I.C., 2015. Mechanisms of initiation and progression of intestinal fibrosis in IBD. *Scand J Gastroenterol* 50, 53–65. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.968863>
- Le Bourhis, L., Guerri, L., Dusseaux, M., Martin, E., Soudais, C., Lantz, O., 2011. Mucosal-associated invariant T cells: unconventional development and function. *Trends Immunol* 32, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.02.005>
- Lee, J.H., Patel, K., Tae, H.J., Lustig, A., Kim, J.W., Mattson, M.P., Taub, D.D., 2014. Ghrelin augments murine T-cell proliferation by activation of the phosphatidylinositol-3-kinase, extracellular signal-regulated kinase and protein kinase C signaling pathways. *FEBS Lett* 588, 4708–4719. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.10.044>
- Lee, S.H., 2015. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest Res* 13, 11–18. <https://doi.org/10.5217/ir.2015.13.1.11>
- Lei, N.Y., Jabaji, Z., Wang, J., Joshi, V.S., Brinkley, G.J., Khalil, H., Wang, F., Jaroszewicz, A., Pellegrini, M., Li, L., Lewis, M., Stelzner, M., Dunn, J.C.Y., Martín, M.G., 2014. Intestinal Subepithelial Myofibroblasts Support the Growth of Intestinal Epithelial Stem Cells. *PLOS ONE* 9, e84651. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084651>
- Lei, X., Ketelut-Carneiro, N., Shmuel-Galia, L., Xu, W., Wilson, R., Vierbuchen, T., Chen, Y., Reboldi, A., Kang, J., Edelblum, K.L., Ward, D., Fitzgerald, K.A., 2022. Epithelial HNF4A shapes the intraepithelial lymphocyte compartment via direct regulation of immune signaling molecules. *J Exp Med* 219, e20212563. <https://doi.org/10.1084/jem.20212563>
- Lewis, S.K., Nachun, D., Martin, M.G., Horvath, S., Coppola, G., Jones, D.L., 2019. DNA Methylation Analysis Validates Organoids as a Viable Model for Studying Human Intestinal Aging. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 9, 527–541. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.11.013>
- Li, J., Ueno, A., Fort Gasia, M., Luider, J., Wang, T., Hirota, C., Jijon, H.B., Deane, M., Tom, M., Chan, R., Barkema, H.W., Beck, P.L., Kaplan, G.G., Panaccione, R., Qian, J., Iacucci, M., Gui, X., Ghosh, S., 2016. Profiles of Lamina Propria T Helper Cell Subsets Discriminate Between Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 22, 1779–1792. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000811>
- Lin, M., Hartl, K., Heuberger, J., Beccaceci, G., Berger, H., Li, H., Liu, L., Müllerke, S., Conrad, T., Heymann, F., Woehler, A., Tacke, F., Rajewsky, N., Sigal, M., 2023. Establishment of gastrointestinal assembloids to study the interplay between epithelial crypts and their mesenchymal niche. *Nat Commun* 14, 3025. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38780-3>
- Lissner, D., Schumann, M., Batra, A., Kredel, L.-I., Kühl, A.A., Erben, U., May, C., Schulzke, J.-D., Siegmund, B., 2015a. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 21, 1297–1305.

<https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000384>

Lissner, D., Schumann, M., Batra, A., Kredel, L.-I., Kühl, A.A., Erben, U., May, C., Schulzke, J.-D., Siegmund, B., 2015b. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD: Inflammatory Bowel Diseases 1. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000384>

Loktionov, A., 2019. Eosinophils in the gastrointestinal tract and their role in the pathogenesis of major colorectal disorders. *World J Gastroenterol* 25, 3503–3526. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i27.3503>

López-López, S., Romero De Ávila, M.J., Hernández De León, N.C., Ruiz-Marcos, F., Baladrón, V., Nueda, M.L., Laborda, J., García-Ramírez, J.J., Monsalve, E.M., Díaz-Guerra, M.J.M., 2021. NOTCH4 Exhibits Anti-Inflammatory Activity in Activated Macrophages by Interfering With Interferon- γ and TLR4 Signaling. *Front. Immunol.* 12, 734966. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.734966>

Lu, Q., Yang, M., Liang, Y., Xu, J., Xu, H., Nie, Y., Wang, L., Yao, J., Li, D., 2022. Immunology of Inflammatory Bowel Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutics. *J Inflamm Res* 15, 1825–1844. <https://doi.org/10.2147/JIR.S353038>

Lucafò, M., Muzzo, A., Marcuzzi, M., Giorio, L., Decorti, G., Stocco, G., 2022. Patient-derived organoids for therapy personalization in inflammatory bowel diseases. *WJG* 28, 2636–2653. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i24.2636>

Lueschow, S.R., McElroy, S.J., 2020. The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature Small Intestine. *Front. Immunol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00587>

Lunney, P.C., Kariyawasam, V.C., Wang, R.R., Middleton, K.L., Huang, T., Selinger, C.P., Andrews, J.M., Katelaris, P.H., Leong, R.W.L., 2015. Smoking prevalence and its influence on disease course and surgery in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 42, 61–70. <https://doi.org/10.1111/apt.13239>

Ma, H., Qiu, Y., Yang, H., 2021. Intestinal intraepithelial lymphocytes: Maintainers of intestinal immune tolerance and regulators of intestinal immunity. *J Leukoc Biol* 109, 339–347. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU0220-111>

Ma, H., Tao, W., Zhu, S., 2019. T lymphocytes in the intestinal mucosa: defense and tolerance. *Cell Mol Immunol* 16, 216–224. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0208-2>

Mabbott, N.A., Donaldson, D.S., Ohno, H., Williams, I.R., Mahajan, A., 2013. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* 6, 666–677. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.30>

Macierzanka, A., Mackie, A.R., Krupa, L., 2019. Permeability of the small intestinal mucus for physiologically relevant studies: Impact of mucus location and ex vivo treatment. *Sci Rep* 9, 17516. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53933-5>

Mack, M., Cihak, J., Simonis, C., Luckow, B., Proudfoot, A.E., Plachý, J., Brühl, H., Frink, M., Anders, H.J., Vielhauer, V., Pfisteringer, J., Stangassinger, M., Schlöndorff, D., 2001. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J*

Immunol 166, 4697–4704. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.7.4697>

MacMicking, J., Xie, Q., Nathan, C., 1997. NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323–350.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323>

Madretsma, S., Wolters, L.M., van Dijk, J.P., Tak, C.J., Feyerabend, C., Wilson, J.H., Zijlstra, F.J., 1996. In-vivo effect of nicotine on cytokine production by human non-adherent mononuclear cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 8, 1017–1020.
<https://doi.org/10.1097/00042737-199610000-00016>

Mahé, M.M., Aihara, E., Schumacher, M.A., Zavros, Y., Helmrath, M.A., Sato, T., Shroyer, N.F., 2014. Establishment of gastrointestinal epithelial organoids.

Mahid, S.S., Minor, K.S., Soto, R.E., Hornung, C.A., Galandiuk, S., 2006. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 81, 1462–1471.
<https://doi.org/10.4065/81.11.1462>

Mantovani, A., Sica, A., Locati, M., 2005. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23, 344–346. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.10.001>

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>

Marsal, J., Acosta, M.B., Blumenstein, I., Cappello, M., Bazin, T., Sebastian, S., 2022. Management of Non-response and Loss of Response to Anti-tumor Necrosis Factor Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Medicine* 9, 897936.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2022.897936>

Martin Mena, A., Langlois, A., Specia, S., Schneider, L., Desreumaux, P., Dubuquoy, L., Bertin, B., 2017. The Expression of the Short Isoform of Thymic Stromal Lymphopoietin in the Colon Is Regulated by the Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma and Is Impaired during Ulcerative Colitis. *Front Immunol* 8, 1052.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01052>

Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6, 13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>

Martini, E., Krug, S.M., Siegmund, B., Neurath, M.F., Becker, C., 2017a. Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 4, 33–46.
<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.03.007>

Martini, E., Krug, S.M., Siegmund, B., Neurath, M.F., Becker, C., 2017b. The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 4, 33–46.
<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.03.007>

Mass, E., Ballesteros, I., Farlik, M., Halbritter, F., Günther, P., Crozet, L., Jacome-Galarza, C.E., Händler, K., Klughammer, J., Kobayashi, Y., Gomez-Perdiguerro, E., Schultze, J.L.,

Beyer, M., Bock, C., Geissmann, F., 2016. Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* 353, aaf4238. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4238>

Mass, E., Nimmerjahn, F., Kierdorf, K., Schlitzer, A., 2023. Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. *Nat Rev Immunol* 23, 563–579. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00848-y>

Matsushita, T., Maruyama, R., Ishikawa, N., Harada, Y., Araki, A., Chen, D., Tauchi-Nishi, P., Yuki, T., Kinoshita, Y., 2015. The number and distribution of eosinophils in the adult human gastrointestinal tract: a study and comparison of racial and environmental factors. *Am J Surg Pathol* 39, 521–527. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000370>

Maul, J., Loddenkemper, C., Mundt, P., Berg, E., Giese, T., Stallmach, A., Zeitz, M., Duchmann, R., 2005. Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 128, 1868–1878. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.043>

Maynard, C.L., Harrington, L.E., Janowski, K.M., Oliver, J.R., Zindl, C.L., Rudensky, A.Y., Weaver, C.T., 2007. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3⁺ and Foxp3⁻ precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol* 8, 931–941. <https://doi.org/10.1038/ni1504>

Mayne, C.G., Williams, C.B., 2013. Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 19, 1772–1788. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e318281f5a3>

Mazlam, M.Z., Hodgson, H.J., 1992. Peripheral blood monocyte cytokine production and acute phase response in inflammatory bowel disease. *Gut* 33, 773–778. <https://doi.org/10.1136/gut.33.6.773>

Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., Rescigno, M., 2014. Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1⁺ Macrophages to CD103⁺ Dendritic Cells. *Immunity* 40, 248–261. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.012>

McDole, J.R., Wheeler, L.W., McDonald, K.G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K.A., Newberry, R.D., Miller, M.J., 2012. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103⁺ dendritic cells in the small intestine. *Nature* 483, 345–349. <https://doi.org/10.1038/nature10863>

Merlo, L.M.F., Mandik-Nayak, L., 2013. Adaptive Immunity, in: *Cancer Immunotherapy*. Elsevier, pp. 25–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394296-8.00003-8>

Miranda-Bautista, J., Rodríguez-Feo, J.A., Puerto, M., López-Cauce, B., Lara, J.M., González-Novo, R., Martín-Hernández, D., Ferreiro-Iglesias, R., Bañares, R., Menchén, L., 2021. Liver X Receptor Exerts Anti-Inflammatory Effects in Colonic Epithelial Cells via *ABCA1* and Its Expression Is Decreased in Human and Experimental Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 27, 1661–1673. <https://doi.org/10.1093/ibd/izab034>

Mirkov, M.U., Verstockt, B., Cleynen, I., 2017. Genetics of inflammatory bowel disease: beyond NOD2. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2, 224–234. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30111-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30111-X)

- Miron, N., Cristea, V., 2012. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clin Exp Immunol* 167, 405–412. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04523.x>
- Mithal, A., Capilla, A., Heinze, D., Berical, A., Villacorta-Martin, C., Vedaie, M., Jacob, A., Abo, K., Szymaniak, A., Peasley, M., Stuffer, A., Mahoney, J., Kotton, D.N., Hawkins, F., Mostoslavsky, G., 2020. Generation of mesenchyme free intestinal organoids from human induced pluripotent stem cells. *Nature Communications* 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13916-6>
- Miyamoto, S., Shikata, K., Miyasaka, K., Okada, S., Sasaki, M., Kodera, R., Hirota, D., Kajitani, N., Takatsuka, T., Kataoka, H.U., Nishishita, S., Sato, C., Funakoshi, A., Nishimori, H., Uchida, H.A., Ogawa, D., Makino, H., 2012. Cholecystokinin plays a novel protective role in diabetic kidney through anti-inflammatory actions on macrophage: anti-inflammatory effect of cholecystokinin. *Diabetes* 61, 897–907. <https://doi.org/10.2337/db11-0402>
- Mizuno, S., Kanai, T., Mikami, Y., Sujino, T., Ono, Y., Hayashi, A., Handa, T., Matsumoto, A., Nakamoto, N., Matsuoka, K., Hisamatsu, T., Takaishi, H., Hibi, T., 2012. CCR9+ plasmacytoid dendritic cells in the small intestine suppress development of intestinal inflammation in mice. *Immunol Lett* 146, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.05.001>
- Mokry, M., Middendorp, S., Wiegerinck, C.L., Witte, M., Teunissen, H., Meddens, C.A., Cuppen, E., Clevers, H., Nieuwenhuis, E.E.S., 2014. Many Inflammatory Bowel Disease Risk Loci Include Regions That Regulate Gene Expression in Immune Cells and the Intestinal Epithelium. *Gastroenterology* 146, 1040–1047. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.12.003>
- Monick, M.M., Powers, L.S., Walters, K., Lovan, N., Zhang, M., Gerke, A., Hansdottir, S., Hunninghake, G.W., 2010. Identification of an autophagy defect in smokers' alveolar macrophages. *J Immunol* 185, 5425–5435. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001603>
- Moran, G.W., O'Neill, C., McLaughlin, J.T., 2012. GLP-2 enhances barrier formation and attenuates TNF α -induced changes in a Caco-2 cell model of the intestinal barrier. *Regul Pept* 178, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2012.07.002>
- Mörbe, U.M., Jørgensen, P.B., Fenton, T.M., Burg, N. von, Riis, L.B., Spencer, J., Agace, W.W., 2021. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunology* 14, 793–802. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00389-4>
- Mortha, A., Chudnovskiy, A., Hashimoto, D., Bogunovic, M., Spencer, S.P., Belkaid, Y., Merad, M., 2014. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* 343, 1249288. <https://doi.org/10.1126/science.1249288>
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Moussa, L., Lapière, A., Squiban, C., Demarquay, C., Milliat, F., Mathieu, N., 2020. BMP Antagonists Secreted by Mesenchymal Stromal Cells Improve Colonic Organoid Formation: Application for the Treatment of Radiation-induced Injury. *Cell Transplant* 29, 0963689720929683. <https://doi.org/10.1177/0963689720929683>
- Mowat, A.M., Agace, W.W., 2014. Regional specialization within the intestinal immune

system. *Nat Rev Immunol* 14, 667–685. <https://doi.org/10.1038/nri3738>

Mullins, L.J., Peter, A., Wrobel, N., McNeilly, J.R., McNeilly, A.S., Al-Dujaili, E.A.S., Brownstein, D.G., Mullins, J.J., Kenyon, C.J., 2009. Cyp11b1 null mouse, a model of congenital adrenal hyperplasia. *J Biol Chem* 284, 3925–3934. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805081200>

Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., Madan, R., Karp, C.L., Cheroutre, H., Kronenberg, M., 2009. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 10, 1178–1184. <https://doi.org/10.1038/ni.1791>

Murray, P.J., Wynn, T.A., 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11, 723–737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>

Na, Y.R., Stakenborg, M., Seok, S.H., Matteoli, G., 2019. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 531–543. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0172-4>

Naimi, S., Viennois, E., Gewirtz, A.T., Chassaing, B., 2021. Direct impact of commonly used dietary emulsifiers on human gut microbiota. *Microbiome* 9, 66. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00996-6>

Nanini, H.F., Bernardazzi, C., Castro, F., de Souza, H.S.P., 2018. Damage-associated molecular patterns in inflammatory bowel disease: From biomarkers to therapeutic targets. *World J Gastroenterol* 24, 4622–4634. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i41.4622>

Nejati Moharrami, N., Bjørkøy Tande, E., Ryan, L., Espevik, T., Boyartchuk, V., 2018. ROR α controls inflammatory state of human macrophages. *PLoS ONE* 13, e0207374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207374>

Ng, S.C., Shi, H.Y., Hamidi, N., Underwood, F.E., Tang, W., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., Kaplan, G.G., 2017. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet* 390, 2769–2778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)

Nielsen, O.H., Rogler, G., Hahnloser, D., Thomsen, O.Ø., 2009. Diagnosis and management of fistulizing Crohn's disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 6, 92–106. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep1340>

Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B.A., Vyas, J.M., Boes, M., Ploegh, H.L., Fox, J.G., Littman, D.R., Reinecker, H.-C., 2005. CX3CR1-Mediated Dendritic Cell Access to the Intestinal Lumen and Bacterial Clearance. *Science* 307, 254–258. <https://doi.org/10.1126/science.1102901>

Noel, G., Baetz, N.W., Staab, J.F., Donowitz, M., Kovbasnjuk, O., Pasetti, M.F., Zachos, N.C., 2017a. A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate mucosal gut physiology and host-pathogen interactions. *Sci Rep* 7, 45270. <https://doi.org/10.1038/srep45270>

Noel, G., Baetz, N.W., Staab, J.F., Donowitz, M., Kovbasnjuk, O., Pasetti, M.F., Zachos, N.C., 2017b. A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate mucosal gut physiology and host-pathogen interactions. *Sci Rep* 7, 45270. <https://doi.org/10.1038/srep45270>

Nyström, E.E.L., Birchenough, G.M.H., van der Post, S., Arike, L., Gruber, A.D., Hansson, G.C., Johansson, M.E.V., 2018. Calcium-activated Chloride Channel Regulator 1 (CLCA1) Controls Mucus Expansion in Colon by Proteolytic Activity. *EBioMedicine* 33, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.05.031>

Ochel, A., Tiegs, G., Neumann, K., 2019. Type 2 Innate Lymphoid Cells in Liver and Gut: From Current Knowledge to Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 20, 1896. <https://doi.org/10.3390/ijms20081896>

Ogino, T., Nishimura, J., Barman, S., Kayama, H., Uematsu, S., Okuzaki, D., Osawa, H., Haraguchi, N., Uemura, M., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Yamamoto, H., Takeda, K., Doki, Y., Mori, M., 2013. Increased Th17-inducing activity of CD14⁺ CD163 low myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 145, 1380–1391.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.08.049>

Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nuñez, G., Cho, J.H., 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603–606. <https://doi.org/10.1038/35079114>

Ohnmacht, C., Park, J.-H., Cording, S., Wing, J.B., Atarashi, K., Obata, Y., Gaboriau-Routhiau, V., Marques, R., Dulauroy, S., Fedoseeva, M., Busslinger, M., Cerf-Bensussan, N., Boneca, I.G., Voehringer, D., Hase, K., Honda, K., Sakaguchi, S., Eberl, G., 2015. MUCOSAL IMMUNOLOGY. The microbiota regulates type 2 immunity through RORγt⁺ T cells. *Science* 349, 989–993. <https://doi.org/10.1126/science.aac4263>

Ojo, B.A., VanDussen, K.L., Rosen, M.J., 2022. The Promise of Patient-Derived Colon Organoids to Model Ulcerative Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* 28, 299–308. <https://doi.org/10.1093/ibd/izab161>

O'Mahony, L., Akdis, M., Akdis, C.A., 2011. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *J Allergy Clin Immunol* 128, 1153–1162. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.06.051>

Ono, Y., Kanmura, S., Morinaga, Y., Oda, K., Kawabata, K., Arima, S., Sasaki, F., Nasu, Y., Tanoue, S., Hashimoto, S., Taguchi, H., Uto, H., Tsubouchi, H., Ido, A., 2017. The utility of apoptosis inhibitor of macrophages as a possible diagnostic marker in patients with Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* 17, 40. <https://doi.org/10.1186/s12876-017-0591-z>

Orholm, M., Binder, V., Sørensen, T.I., Rasmussen, L.P., Kyvik, K.O., 2000. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 35, 1075–1081. <https://doi.org/10.1080/003655200451207>

Ostrop, J., Zwiggelaar, R.T., Terndrup Pedersen, M., Gerbe, F., Bösl, K., Lindholm, H.T., Díez-Sánchez, A., Parmar, N., Radetzki, S., von Kries, J.P., Jay, P., Jensen, K.B.,

Arrowsmith, C., Oudhoff, M.J., 2021. A Semi-automated Organoid Screening Method Demonstrates Epigenetic Control of Intestinal Epithelial Differentiation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8.

Ouellette, A.J., 2010. Paneth cells and innate mucosal immunity. *Curr Opin Gastroenterol* 26, 547–553. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32833dcccde>

Owen, R.L., Jones, A.L., 1974. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* 66, 189–203.

Owen, R.L., Piazza, A.J., Ermak, T.H., 1991. Ultrastructural and cytoarchitectural features of lymphoreticular organs in the colon and rectum of adult BALB/c mice. *Am J Anat* 190, 10–18. <https://doi.org/10.1002/aja.1001900103>

Owens, B.M.J., Simmons, A., 2013. Intestinal stromal cells in mucosal immunity and homeostasis. *Mucosal Immunol* 6, 224–234. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.125>

Pamukcu, O., Kumral, Z.N.O., Ercan, F., Yegen, B.C., Ertem, D., 2013. Anti-inflammatory effect of obestatin and ghrelin in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 57, 211–218. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318294711e>

Panea, C., Farkas, A.M., Goto, Y., Abdollahi-Roodsaz, S., Lee, C., Koscsó, B., Gowda, K., Hohl, T.M., Bogunovic, M., Ivanov, I.I., 2015. Intestinal Monocyte-Derived Macrophages Control Commensal-Specific Th17 Responses. *Cell Rep* 12, 1314–1324. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.040>

Papadakis, K.A., Krempski, J., Svingen, P., Xiong, Y., Sarmiento, O.F., Lomberg, G.A., Urrutia, R.A., Faubion, W.A., 2015. Krüppel-like factor KLF10 deficiency predisposes to colitis through colonic macrophage dysregulation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 309, G900–G909. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00309.2015>

Parikh, K., Antanaviciute, A., Fawcner-Corbett, D., Jagielowicz, M., Aulicino, A., Lagerholm, C., Davis, S., Kinchen, J., Chen, H.H., Alham, N.K., Ashley, N., Johnson, E., Hublitz, P., Bao, L., Lukomska, J., Andev, R.S., Björklund, E., Kessler, B.M., Fischer, R., Goldin, R., Koohy, H., Simmons, A., 2019. Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease. *Nature* 567, 49–55. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0992-y>

Patente, T.A., Pinho, M.P., Oliveira, A.A., Evangelista, G.C.M., Bergami-Santos, P.C., Barbuto, J.A.M., 2019. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 9, 3176. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03176>

Peoc'h, K., Manceau, H., Joly, F., Treton, X., 2021. Iron deficiency in chronic inflammatory bowel diseases: an update. *Journal of Laboratory and Precision Medicine* 6. <https://doi.org/10.21037/jlpm-21-49>

Persson, E.K., Scott, C.L., Mowat, A.M., Agace, W.W., 2013. Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria: Ontogeny and function. *Eur J Immunol* 43, 3098–3107. <https://doi.org/10.1002/eji.201343740>

Peters, C.P., Mjösberg, J.M., Bernink, J.H., Spits, H., 2016. Innate lymphoid cells in inflammatory bowel diseases. *Immunol Lett* 172, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.10.004>

Peters, L.A., Perrigoue, J., Mortha, A., Iuga, A., Song, W.-M., Neiman, E.M., Llewellyn, S.R., Di Narzo, A., Kidd, B.A., Telesco, S.E., Zhao, Y., Stojmirovic, A., Sendekci, J., Shameer, K., Miotto, R., Losic, B., Shah, H., Lee, E., Wang, M., Faith, J.J., Kasarskis, A., Brodmerkel, C., Curran, M., Das, A., Friedman, J.R., Fukui, Y., Humphrey, M.B., Iritani, B.M., Sibinga, N., Tarrant, T.K., Argmann, C., Hao, K., Roussos, P., Zhu, J., Zhang, B., Dobrin, R., Mayer, L.F., Schadt, E.E., 2017. A functional genomics predictive network model identifies regulators of inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 49, 1437–1449. <https://doi.org/10.1038/ng.3947>

Peterson, L.W., Artis, D., 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14, 141–153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>

Petnicki-Ocwieja, T., Hrnčir, T., Liu, Y.-J., Biswas, A., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., Kobayashi, K.S., 2009. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15813–15818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907722106>

Powell, D.W., Pinchuk, I.V., Saada, J.I., Chen, X., Mifflin, R.C., 2011. Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol* 73, 213–237. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100646>

Pull, S.L., Doherty, J.M., Mills, J.C., Gordon, J.I., Stappenbeck, T.S., 2005. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 99–104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405979102>

Pullan, R.D., Thomas, G.A., Rhodes, M., Newcombe, R.G., Williams, G.T., Allen, A., Rhodes, J., 1994. Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* 35, 353–359. <https://doi.org/10.1136/gut.35.3.353>

Qu, M., Xiong, L., Lyu, Y., Zhang, X., Shen, J., Guan, J., Chai, P., Lin, Z., Nie, B., Li, C., Xu, J., Deng, H., 2021. Establishment of intestinal organoid cultures modeling injury-associated epithelial regeneration. *Cell Res* 31, 259–271. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00453-x>

Radwan, P., Radwan-Kwiatek, K., Tabarkiewicz, J., Radej, S., Rolinski, J., 2010. Enhanced phenotypic and functional maturation of monocyte-derived dendritic cells from patients with active Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Physiol Pharmacol* 61, 695–703.

Reynolds, A., Wharton, N., Parris, A., Mitchell, E., Sobolewski, A., Kam, C., Bigwood, L., Hadi, A.E., Münsterberg, A., Lewis, M., Speakman, C., Stebbings, W., Wharton, R., Sargen, K., Tighe, R., Jamieson, C., Hernon, J., Kapur, S., Oue, N., Yasui, W., Williams, M.R., 2014. Canonical Wnt signals combined with suppressed TGF β /BMP pathways promote renewal of the native human colonic epithelium. *Gut* 63, 610–621. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-304067>

Rieder, F., Fiocchi, C., Rogler, G., 2017. Mechanisms, Management, and Treatment of

Fibrosis in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 152, 340-350.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.047>

Roberts, C.L., Keita, A.V., Duncan, S.H., O’Kennedy, N., Söderholm, J.D., Rhodes, J.M., Campbell, B.J., 2010. Translocation of Crohn’s disease *Escherichia coli* across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. *Gut* 59, 1331–1339. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.195370>

Roda, G., Sartini, A., Zambon, E., Calafiore, A., Marocchi, M., Caponi, A., Belluzzi, A., Roda, E., 2010. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 16, 4264–4271. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i34.4264>

Rodríguez-Piñeiro, A.M., Bergström, J.H., Ermund, A., Gustafsson, J.K., Schütte, A., Johansson, M.E.V., Hansson, G.C., 2013. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. II. Gastrointestinal mucus proteome reveals Muc2 and Muc5ac accompanied by a set of core proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305, G348–356. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00047.2013>

Roulis, M., Flavell, R.A., 2016. Fibroblasts and myofibroblasts of the intestinal lamina propria in physiology and disease. *Differentiation, Fibroblast Differentiation* 92, 116–131. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.05.002>

Rovedatti, L., Kudo, T., Biancheri, P., Sarra, M., Knowles, C.H., Rampton, D.S., Corazza, G.R., Monteleone, G., Di Sabatino, A., Macdonald, T.T., 2009. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* 58, 1629–1636. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.182170>

Rugtveit, J., Bakka, A., Brandtzaeg, P., 1997. Differential distribution of B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) costimulatory molecules on mucosal macrophage subsets in human inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 110, 104–113. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1997.5071404.x>

Rugtveit, J., Nilsen, E., Bakka, A., Carlsen, H., Brandtzaeg, P., Scott, H., 1997. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 112, 1493–1505. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(97\)70030-1](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(97)70030-1)

Saez, A., Gomez-Bris, R., Herrero-Fernandez, B., Mingorance, C., Rius, C., Gonzalez-Granado, J.M., 2021. Innate Lymphoid Cells in Intestinal Homeostasis and Inflammatory Bowel Disease. *Int J Mol Sci* 22, 7618. <https://doi.org/10.3390/ijms22147618>

Sagaradze, G.D., Basalova, N.A., Efimenko, A.Yu., Tkachuk, V.A., 2020. Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration. *Front Cell Dev Biol* 8, 576176. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.576176>

Saha, S., Aranda, E., Hayakawa, Y., Bhanja, P., Atay, S., Brodin, N.P., Li, J., Asfaha, S., Liu, L., Tailor, Y., Zhang, J., Godwin, A.K., Tome, W.A., Wang, T.C., Guha, C., Pollard, J.W., 2016. Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and enhance survival after radiation injury. *Nat Commun* 7, 13096. <https://doi.org/10.1038/ncomms13096>

Saia, R.S., Mestriner, F.L., Bertozi, G., Cunha, F.Q., Cárnio, E.C., 2014. Cholecystokinin inhibits inducible nitric oxide synthase expression by lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages. *Mediators Inflamm* 2014, 896029. <https://doi.org/10.1155/2014/896029>

Sakuraba, A., Sato, T., Kamada, N., Kitazume, M., Sugita, A., Hibi, T., 2009. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology* 137, 1736–1745. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.07.049>

Salim, S., Soderholm, J., 2011. Salim, S.Y. & Soderholm, J.D. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 362–381. *Inflammatory Bowel Diseases* 17, 362–381. <https://doi.org/10.1002/ibd.21403>

Sanjurjo, L., Amézaga, N., Aran, G., Naranjo-Gómez, M., Arias, L., Armengol, C., Borràs, F.E., Sarrias, M.-R., 2015a. The human CD5L/AIM-CD36 axis: A novel autophagy inducer in macrophages that modulates inflammatory responses. *Autophagy* 11, 487–502. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017183>

Sanjurjo, L., Aran, G., Roher, N., Valledor, A.F., Sarrias, M.-R., 2015b. AIM/CD5L: a key protein in the control of immune homeostasis and inflammatory disease. *Journal of Leukocyte Biology* 98, 173–184. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0215-074R>

Sanjurjo, L., Aran, G., Téllez, É., Amézaga, N., Armengol, C., López, D., Prats, C., Sarrias, M.-R., 2018. CD5L Promotes M2 Macrophage Polarization through Autophagy-Mediated Upregulation of ID3. *Front. Immunol.* 9, 480. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00480>

Santos, A.J.M., Lo, Y.-H., Mah, A.T., Kuo, C.J., 2018. The Intestinal Stem Cell Niche: Homeostasis and Adaptations. *Trends Cell Biol* 28, 1062–1078. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.08.001>

Santos, M.P.C., Gomes, C., Torres, J., 2018. Familial and ethnic risk in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* 31, 14–23. <https://doi.org/10.20524/aog.2017.0208>

Sarrias, M.-R., Roselló, S., Sánchez-Barbero, F., Sierra, J.M., Vila, J., Yélamos, J., Vives, J., Casals, C., Lozano, F., 2005. A Role for Human SP α as a Pattern Recognition Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 280, 35391–35398. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505042200>

Sass, V., Schneider, T., Wilmes, M., Körner, C., Tossi, A., Novikova, N., Shamova, O., Sahl, H.-G., 2010. Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in Staphylococci. *Infect Immun* 78, 2793–2800. <https://doi.org/10.1128/IAI.00688-09>

Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J.J.C., Bickham, K.L., Lerner, H., Goldstein, M., Sykes, M., Kato, T., Farber, D.L., 2013. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* 38, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.020>

Sato, T., Stange, D.E., Ferrante, M., Vries, R.G.J., Es, J.H. van, Brink, S. van den, Houdt, W.J. van, Pronk, A., Gorp, J. van, Siersema, P.D., Clevers, H., 2011a. Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium. *Gastroenterology* 141, 1762–1772. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.050>

Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., Clevers, H., 2011b. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–418. <https://doi.org/10.1038/nature09637>

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., Clevers, H., 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>

Schneider, C., O’Leary, C.E., Locksley, R.M., 2019. Regulation of immune responses by tuft cells. *Nat Rev Immunol* 19, 584–593. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0176-x>

Schneider, T., Kruse, T., Wimmer, R., Wiedemann, I., Sass, V., Pag, U., Jansen, A., Nielsen, A.K., Mygind, P.H., Raventós, D.S., Neve, S., Ravn, B., Bonvin, A.M.J.J., De Maria, L., Andersen, A.S., Gammelgaard, L.K., Sahl, H.-G., Kristensen, H.-H., 2010. Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II. *Science* 328, 1168–1172. <https://doi.org/10.1126/science.1185723>

Schridde, A., Bain, C.C., Mayer, J.U., Montgomery, J., Pollet, E., Denecke, B., Milling, S.W.F., Jenkins, S.J., Dalod, M., Henri, S., Malissen, B., Pabst, O., Mcl Mowat, A., 2017. Tissue-specific differentiation of colonic macrophages requires TGF β receptor-mediated signaling. *Mucosal Immunology* 10, 1387–1399. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.142>

Schuijers, J., Clevers, H., 2012. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *EMBO J* 31, 2685–2696. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.149>

Schwarzmaier, D., Foell, D., Weinlage, T., Varga, G., Däbritz, J., 2013. Peripheral Monocyte Functions and Activation in Patients with Quiescent Crohn’s Disease. *PLOS ONE* 8, e62761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062761>

Sehgal, A., Donaldson, D.S., Pridans, C., Sauter, K.A., Hume, D.A., Mabbott, N.A., 2018. The role of CSF1R-dependent macrophages in control of the intestinal stem-cell niche. *Nat Commun* 9, 1272. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03638-6>

Senda, T., Dogra, P., Granot, T., Furuhashi, K., Snyder, M.E., Carpenter, D.J., Szabo, P.A., Thapa, P., Miron, M., Farber, D.L., 2019. Microanatomical dissection of human intestinal T-cell immunity reveals site-specific changes in gut-associated lymphoid tissues over life. *Mucosal Immunol* 12, 378–389. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0110-8>

Serbina, N.V., Pamer, E.G., 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7, 311–317. <https://doi.org/10.1038/ni1309>

Seyedian, S.S., Nokhostin, F., Malamir, M.D., 2019. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *J Med Life* 12, 113–122. <https://doi.org/10.25122/jml-2018-0075>

Shajib, M.S., Khan, W.I., 2015. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiologica* 213, 561–574. <https://doi.org/10.1111/apha.12430>

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaceli, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., Sahebkar, A., 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology* 233, 6425–6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>

Shaw, M.H., Kamada, N., Kim, Y.-G., Núñez, G., 2012. Microbiota-induced IL-1 β , but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *J Exp Med* 209, 251–258. <https://doi.org/10.1084/jem.20111703>

Shaw, T.N., Houston, S.A., Wemyss, K., Bridgeman, H.M., Barbera, T.A., Zangerle-Murray, T., Strangward, P., Ridley, A.J.L., Wang, P., Tamoutounour, S., Allen, J.E., Konkel, J.E., Grainger, J.R., 2018. Tissue-resident macrophages in the intestine are long lived and defined by Tim-4 and CD4 expression. *J Exp Med* 215, 1507–1518. <https://doi.org/10.1084/jem.20180019>

Shi, C., Pamer, E.G., 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11, 762–774. <https://doi.org/10.1038/nri3070>

Sica, A., Mantovani, A., 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122, 787–795. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>

Sidler, D., Renzulli, P., Schnoz, C., Berger, B., Schneider-Jakob, S., Flück, C., Inderbitzin, D., Corazza, N., Candinas, D., Brunner, T., 2011. Colon cancer cells produce immunoregulatory glucocorticoids. *Oncogene* 30, 2411–2419. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.629>

Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., Liu, Y.J., 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835–1837. <https://doi.org/10.1126/science.284.5421.1835>

Smit, J.J., Bol-Schoenmakers, M., Hassing, I., Fiechter, D., Boon, L., Bleumink, R., Pieters, R.H.H., 2011. The role of intestinal dendritic cells subsets in the establishment of food allergy. *Clin Exp Allergy* 41, 890–898. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03738.x>

Smythies, L.E., Sellers, M., Clements, R.H., Mosteller-Barnum, M., Meng, G., Benjamin, W.H., Orenstein, J.M., Smith, P.D., 2005. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 115, 66–75. <https://doi.org/10.1172/JCI19229>

Soltanieh, S., Salavatizadeh, M., Gaman, M.-A., Kord Varkaneh, H., Tan, S.C., Prabakar, K., Lozovanu, O.D., Santos, H.O., Hekmatdoost, A., 2024. Association between hepcidin levels and inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Food Science & Nutrition* 12, 4581–4593. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4146>

Sonnenberg, G.F., Monticelli, L.A., Alenghat, T., Fung, T.C., Hutnick, N.A., Kunisawa, J., Shibata, N., Grunberg, S., Sinha, R., Zahm, A.M., Tardif, M.R., Sathaliyawala, T., Kubota, M., Farber, D.L., Collman, R.G., Shaked, A., Fouser, L.A., Weiner, D.B., Tessier, P.A., Friedman, J.R., Kiyono, H., Bushman, F.D., Chang, K.-M., Artis, D., 2012. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science* 336, 1321–1325. <https://doi.org/10.1126/science.1222551>

Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., Kuhar, M.F., Vallance, J.E., Tolle, K., Hoskins, E.E., Kalinichenko, V.V., Wells, S.I., Zorn, A.M., Shroyer, N.F., Wells, J.M., 2011. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 470, 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature09691>

Spencer, J., Finn, T., Isaacson, P.G., 1986. Human Peyer's patches: an immunohistochemical study. *Gut* 27, 405–410. <https://doi.org/10.1136/gut.27.4.405>

Spencer, J., Sollid, L.M., 2016. The human intestinal B-cell response. *Mucosal Immunol* 9, 1113–1124. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.59>

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F., Vivier, E., 2013. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13, 145–149. <https://doi.org/10.1038/nri3365>

Stagg, A.J., 2018. Intestinal Dendritic Cells in Health and Gut Inflammation. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02883>

Stamos, J.L., Weis, W.I., 2013. The β -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a007898. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007898>

Steffensen, K.R., Jakobsson, T., Gustafsson, J.-Å., 2013. Targeting liver X receptors in inflammation. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 17, 977–990. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.806490>

Steinbach, E.C., Plevy, S.E., 2014. The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 20, 166–175. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e3182a69dca>

Stelzner, M., Helmrath, M., Dunn, J.C.Y., Henning, S.J., Houchen, C.W., Kuo, C., Lynch, J., Li, L., Magness, S.T., Martin, M.G., Wong, M.H., Yu, J., 2012. A nomenclature for intestinal in vitro cultures. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302, G1359–G1363. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00493.2011>

Strizova, Z., Benesova, I., Bartolini, R., Novysedlak, R., Cecrdlova, E., Foley, L.K., Striz, I., 2023. M1/M2 macrophages and their overlaps – myth or reality? *Clin Sci (Lond)* 137, 1067–1093. <https://doi.org/10.1042/CS20220531>

Sun, J., Druhan, L.J., Zweier, J.L., 2010. Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 494, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.11.019>

Sun, J., Shen, X., Li, Y., Guo, Z., Zhu, W., Zuo, L., Zhao, J., Gu, L., Gong, J., Li, J., 2016. Therapeutic Potential to Modify the Mucus Barrier in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients* 8, 44. <https://doi.org/10.3390/nu8010044>

Sun, L., Su, Y., Jiao, A., Wang, X., Zhang, B., 2023. T cells in health and disease. *Sig Transduct Target Ther* 8, 1–50. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01471-y>

Suzuki, T., 2013. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* 70, 631–659. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1070-x>

Taelman, J., Diaz, M., Guiu, J., 2022a. Human Intestinal Organoids: Promise and Challenge. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10.

Taelman, J., Diaz, M., Guiu, J., 2022b. Human Intestinal Organoids: Promise and Challenge. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10.

Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>

Thompson, N.P., Driscoll, R., Pounder, R.E., Wakefield, A.J., 1996. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 312, 95–96. <https://doi.org/10.1136/bmj.312.7023.95>

Torang, A., Gupta, P., Klinke, D., 2019. An elastic-net logistic regression approach to generate classifiers and gene signatures for types of immune cells and T helper cell subsets. *BMC Bioinformatics* 20. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2994-z>

Trepel, F., 1974. Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis. *Klin Wochenschr* 52, 511–515. <https://doi.org/10.1007/BF01468720>

Trus, E., Basta, S., Gee, K., 2020. Who's in charge here? Macrophage colony stimulating factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor: Competing factors in macrophage polarization. *Cytokine* 127, 154939. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154939>

Tumanov, A.V., Koroleva, E.P., Guo, X., Wang, Y., Kruglov, A., Nedospasov, S., Fu, Y.-X., 2011. Lymphotoxin controls the IL-22 protection pathway in gut innate lymphoid cells during mucosal pathogen challenge. *Cell Host Microbe* 10, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.06.002>

Tysk, C., Lindberg, E., Järnerot, G., Flodérus-Myrhed, B., 1988. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 29, 990–996. <https://doi.org/10.1136/gut.29.7.990>

Ueda, Y., Kayama, H., Jeon, S.G., Kusu, T., Isaka, Y., Rakugi, H., Yamamoto, M., Takeda, K., 2010. Commensal microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic macrophages via the production of IL-10. *Int Immunol* 22, 953–962. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxq449>

UK IBD Genetics Consortium, Barrett, J.C., Lee, J.C., Lees, C.W., Prescott, N.J., Anderson, C.A., Phillips, A., Wesley, E., Parnell, K., Zhang, H., Drummond, H., Nimmo, E.R., Massey, D., Blaszczyk, K., Elliott, T., Cotterill, L., Dallal, H., Lobo, A.J., Mowat, C., Sanderson, J.D., Jewell, D.P., Newman, W.G., Edwards, C., Ahmad, T., Mansfield, J.C., Satsangi, J., Parkes, M., Mathew, C.G., Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Donnelly, P., Peltonen, L., Blackwell, J.M., Bramon, E., Brown, M.A., Casas, J.P., Corvin, A., Craddock, N., Deloukas, P., Duncanson, A., Jankowski, J., Markus, H.S., Mathew, C.G., McCarthy, M.I., Palmer, C.N.A., Plomin, R., Rautanen, A., Sawcer, S.J., Samani, N., Trembath, R.C., Viswanathan, A.C., Wood, N., Spencer, C.C.A., Barrett, J.C., Bellenguez, C., Davison, D., Freeman, C., Strange, A., Donnelly, P., Langford, C., Hunt, S.E., Edkins, S., Gwilliam, R., Blackburn, H.,

Bumpstead, S.J., Dronov, S., Gillman, M., Gray, E., Hammond, N., Jayakumar, A., McCann, O.T., Liddle, J., Perez, M.L., Potter, S.C., Ravindrarajah, R., Ricketts, M., Waller, M., Weston, P., Widaa, S., Whittaker, P., Deloukas, P., Peltonen, L., Mathew, C.G., Blackwell, J.M., Brown, M.A., Corvin, A., McCarthy, M.I., Spencer, C.C.A., Attwood, A.P., Stephens, J., Sambrook, J., Ouwehand, W.H., McArdle, W.L., Ring, S.M., Strachan, D.P., 2009.

Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet* 41, 1330–1334. <https://doi.org/10.1038/ng.483>

Vaishnava, S., Behrendt, C.L., Ismail, A.S., Eckmann, L., Hooper, L.V., 2008. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 20858–20863.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0808723105>

van der Hee, B., Madsen, O., Vervoort, J., Smidt, H., Wells, J.M., 2020. Congruence of Transcription Programs in Adult Stem Cell-Derived Jejunum Organoids and Original Tissue During Long-Term Culture. *Front Cell Dev Biol* 8, 375.

<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00375>

van der Post, S., Jabbar, K.S., Birchenough, G., Arike, L., Akhtar, N., Sjovall, H., Johansson, M.E.V., Hansson, G.C., 2019. Structural weakening of the colonic mucus barrier is an early event in ulcerative colitis pathogenesis. *Gut* 68, 2142–2151. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317571>

Veenbergen, S., Samsom, J.N., 2012. Maintenance of small intestinal and colonic tolerance by IL-10-producing regulatory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 24, 269–276.

<https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.03.004>

Vemuri, K., Radi, S.H., Sladek, F.M., Verzi, M.P., 2023. Multiple roles and regulatory mechanisms of the transcription factor HNF4 in the intestine. *Front. Endocrinol.* 14.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1232569>

Vignais, P.V., 2002. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59, 1428–1459. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8520-9>

Villablanca, E.J., Selin, K., Hedin, C.R.H., 2022. Mechanisms of mucosal healing: treating inflammatory bowel disease without immunosuppression? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 19, 493–507. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00604-y>

Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F., Spits, H., 2018. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* 174, 1054–1066.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>

von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.-E., Locksley, R.M., 2016. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature* 529, 221–225.

<https://doi.org/10.1038/nature16161>

Vos, A.C.W., Wildenberg, M.E., Arijis, I., Duijvestein, M., Verhaar, A.P., de Hertogh, G., Vermeire, S., Rutgeerts, P., van den Brink, G.R., Hommes, D.W., 2012. Regulatory Macrophages Induced by Infliximab Are Involved in Healing In Vivo and In Vitro.

Inflammatory Bowel Diseases 18, 401–408. <https://doi.org/10.1002/ibd.21818>

Wacleche, V.S., Tremblay, C.L., Routy, J.-P., Ancuta, P., 2018. The Biology of Monocytes and Dendritic Cells: Contribution to HIV Pathogenesis. *Viruses* 10, 65. <https://doi.org/10.3390/v10020065>

Walker, W.A., Iyengar, R.S., 2015. Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatr Res* 77, 220–228. <https://doi.org/10.1038/pr.2014.160>

Wang, F., Feng, J., Gao, Q., Ma, M., Lin, X., Liu, J., Li, J., Zhao, Q., 2017. Carbohydrate and protein intake and risk of ulcerative colitis: Systematic review and dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Clin Nutr* 36, 1259–1265. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.10.009>

Wang, R., Li, Z., Liu, S., Zhang, D., 2023. Global, regional and national burden of inflammatory bowel disease in 204 countries and territories from 1990 to 2019: a systematic analysis based on the Global Burden of Disease Study 2019. *BMJ Open* 13, e065186. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2022-065186>

Wang, Y., Smith, W., Hao, D., He, B., Kong, L., 2019. M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. *Int Immunopharmacol* 70, 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.02.050>

Wehkamp, J., Koslowski, M., Wang, G., Stange, E.F., 2008. Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal Immunology* 1, S67–S74. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.48>

Wehkamp, J., Schaubert, J., Stange, E.F., 2007. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Curr Opin Gastroenterol* 23, 32–38. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32801182c2>

Wells, J.M., Spence, J.R., 2014. How to make an intestine. *Development* 141, 752–760. <https://doi.org/10.1242/dev.097386>

Wing, J.B., Tanaka, A., Sakaguchi, S., 2019. Human FOXP3+ Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity* 50, 302–316. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.020>

Wingender, G., Kronenberg, M., 2008. Role of NKT cells in the digestive system. IV. The role of canonical natural killer T cells in mucosal immunity and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294, G1–8. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00437.2007>

Wong, K.L., Tai, J.J.-Y., Wong, W.-C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.-H., Kourilsky, P., Wong, S.-C., 2011. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118, e16–31. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326355>

Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J.Y., Ong, S.M., Dang, T.M., Wong, S.C., 2012. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 53, 41–57. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8297-3>

Wu, Y., Shu, J., He, C., Li, M., Wang, Y., Ou, W., He, Y., 2016. ROCK inhibitor Y27632 promotes proliferation and diminishes apoptosis of marmoset induced pluripotent stem cells by suppressing expression and activity of caspase 3. *Theriogenology* 85, 302–314. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.020>

Wynn, T.A., 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214, 199–210. <https://doi.org/10.1002/path.2277>

Wynn, T.A., Vannella, K.M., 2016. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 44, 450–462. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>

Xie, S., Liu, B., Fu, S., Wang, W., Yin, Y., Li, N., Chen, W., Liu, J., Liu, D., 2014. GLP-2 suppresses LPS-induced inflammation in macrophages by inhibiting ERK phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell Physiol Biochem* 34, 590–602. <https://doi.org/10.1159/000363025>

Xu, L., Lochhead, P., Ko, Y., Claggett, B., Leong, R.W., Ananthakrishnan, A.N., 2017. Systematic review with meta-analysis: Breastfeeding and the risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 46, 780–789. <https://doi.org/10.1111/apt.14291>

Yamanaka, T., Straumfors, A., Morton, H., Fausa, O., Brandtzaeg, P., Farstad, I., 2001. M cell pockets of human Peyer's patches are specialized extensions of germinal centers. *Eur J Immunol* 31, 107–117. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200101\)31:1<107::aid-immu107>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200101)31:1<107::aid-immu107>3.0.co;2-4)

Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L.W., Oppenheim, J.J., 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 23, 291–296. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(02\)02246-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)02246-9)

Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S.N., Chen, Q., Buffo, M.J., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J.M., Wang, J.M., Howard, O.M., Oppenheim, J.J., 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286, 525–528. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.525>

Yang, H., Luo, Y., Lai, X., 2023. The comprehensive role of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) in pathological conditions. *Clinical and Experimental Immunology* 212, 184–198. <https://doi.org/10.1093/cei/uxac095>

Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., Wang, H., 2014. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research* 2, 1. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-2-1>

Ye, Y., Gaugler, B., Mohty, M., Malard, F., 2020. Plasmacytoid dendritic cell biology and its role in immune-mediated diseases. *Clin Transl Immunology* 9, e1139. <https://doi.org/10.1002/cti2.1139>

Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guillemins, M., Misharin, A., Hume, D.A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., Jung, S., 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>

Yu, L., Gao, Y., Aaron, N., Qiang, L., 2023. A glimpse of the connection between PPAR γ and macrophage. *Front. Pharmacol.* 14, 1254317. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1254317>

Yu, R., Zuo, F., Ma, H., Chen, S., 2019. Exopolysaccharide-Producing *Bifidobacterium adolescentis* Strains with Similar Adhesion Property Induce Differential Regulation of Inflammatory Immune Response in Treg/Th17 Axis of DSS-Colitis Mice. *Nutrients* 11, 782. <https://doi.org/10.3390/nu11040782>

Yuan, Z., Ye, J., Liu, B., Zhang, L., 2024. Unraveling the role of autophagy regulation in Crohn's disease: from genetic mechanisms to potential therapeutics. *Adv. Biotechnol.* 2, 14. <https://doi.org/10.1007/s44307-024-00021-z>

Yusta, B., Baggio, L.L., Koehler, J., Holland, D., Cao, X., Pinnell, L.J., Johnson-Henry, K.C., Yeung, W., Surette, M.G., Bang, K.W.A., Sherman, P.M., Drucker, D.J., 2015. GLP-1R Agonists Modulate Enteric Immune Responses Through the Intestinal Intraepithelial Lymphocyte GLP-1R. *Diabetes* 64, 2537–2549. <https://doi.org/10.2337/db14-1577>

Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>

Zeng, L., Hu, S., Chen, P., Wei, W., Tan, Y., 2017. Macronutrient Intake and Risk of Crohn's Disease: Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Epidemiological Studies. *Nutrients* 9, 500. <https://doi.org/10.3390/nu9050500>

Zhan, T., Rindtorff, N., Boutros, M., 2017. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 36, 1461–1473. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>

Zhang, F.-L., Hu, Z., Wang, Y.-F., Zhang, W.-J., Zhou, B.-W., Sun, Q.-S., Lin, Z.-B., Liu, K.-X., 2023. Organoids transplantation attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in mice through L-Malic acid-mediated M2 macrophage polarization. *Nat Commun* 14, 6779. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42502-0>

Zhang, J.-G., Liu, J.-X., Jia, X.-X., Geng, J., Yu, F., Cong, B., 2014. Cholecystokinin octapeptide regulates the differentiation and effector cytokine production of CD4(+) T cells in vitro. *Int Immunopharmacol* 20, 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.03.013>

Zhao, Y., Uduman, M., Siu, J.H.Y., Tull, T.J., Sanderson, J.D., Wu, Y.-C.B., Zhou, J.Q., Petrov, N., Ellis, R., Todd, K., Chavele, K.-M., Guesdon, W., Vossenkamper, A., Jassem, W., D'Cruz, D.P., Fear, D.J., John, S., Scheel-Toellner, D., Hopkins, C., Moreno, E., Woodman, N.L., Ciccarelli, F., Heck, S., Kleinstein, S.H., Bemark, M., Spencer, J., 2018. Spatiotemporal segregation of human marginal zone and memory B cell populations in lymphoid tissue. *Nat Commun* 9, 3857. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06089-1>

Zhou, L., Chu, C., Teng, F., Bessman, N.J., Goc, J., Santosa, E.K., Putzel, G.G., Kabata, H., Kelsen, J.R., Baldassano, R.N., Shah, M.A., Sockolow, R.E., Vivier, E., Eberl, G., Smith, K.A., Sonnenberg, G.F., 2019. Innate lymphoid cells support regulatory T cells in the intestine through interleukin-2. *Nature* 568, 405–409. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1082-x>

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman,

K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J.M., Lutz, M.B., 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74–e80. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>

Résumé

Le tractus gastro-intestinal est un exemple remarquable de biologie complexe, avec un dialogue constant entre l'épithélium intestinal, en contact étroit avec le microbiote, et les cellules immunitaires qui protègent l'intestin contre les infections. Les organoïdes ont révolutionné notre approche de la modélisation du compartiment cellulaire intestinal et ont ouvert de nouvelles voies pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'homéostasie intestinale et la pathogénèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. À ce jour, peu de modèles ont été établis pour explorer le rôle du côlon, qui est pourtant le principal site d'inflammation dans la rectocolite hémorragique (RCH). Dans cette étude, nous avons utilisé des milieux conditionnés produits par des organoïdes du côlon (OCM) de souris ou humains (patients contrôles et atteints de RCH) pour étudier la relation entre les macrophages et l'épithélium du côlon. Nous avons étudié les profils transcriptomiques des macrophages dérivés de la moelle osseuse stimulés par l'OCM et avons constaté que ces cellules présentaient une signature anti-inflammatoire unique, distincte de celle des macrophages M2 différenciés par IL-4/IL-13 in vitro. En outre, l'OCM a induit un effet immunorégulateur médié par CD5L, caractérisé par une réduction significative de l'expression d'iNOS induite par le LPS. De plus, l'OCM provenant de côlons humains a inhibé l'expression de cytokines inflammatoires dépendante du LPS dans les macrophages dérivés de monocytes humains. Il est intéressant de noter que le marqueur inflammatoire CD68 a été réduit par l'OCM de patients contrôles mais pas par celui de patients atteints de RCH, ce qui suggère un dysfonctionnement épithélial chez les patients atteints de RCH. Nos résultats font état de nouveaux mécanismes de régulation dans le côlon et soulignent l'importance de développer de nouveaux modèles in vitro pour mieux caractériser la relation entre l'épithélium intestinal et les cellules immunitaires de la muqueuse.

Mots-clés : Intestins – Côlon - Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin – Rectocolite hémorragique – Macrophages - Épithélium intestinal - Organoïdes