

1300 20 22 894

**A Domi**

**A mes parents**

**et nos familles**



A Madame le Professeur Geneviève Spik

*pour avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse.*

A mon directeur de thèse,

Madame le Professeur Monique Capron

*pour m'avoir éclairé sur l'importance des éosinophiles en immunologie  
et sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est.*

A Madame le Docteur Heide Müller-Alouf

*pour sa gentillesse et en souvenir des nombreuses heures passées  
à purifier des cellules ensemble.*

A Monsieur le Professeur Jacques Mizon

*pour avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse.*

A Monsieur le Professeur Jean-Frédéric Colombel

*pour m'avoir accueilli dans le "Service des Maladies de l'Appareil Digestif  
et de la Nutrition" du CHRU de Lille, et aussi pour m'avoir permis de découvrir  
l'univers de la recherche clinique.*

A Monsieur le Professeur Karel Geboes

*pour m'avoir gentiment accueilli à Louvain et pour son aide diligente  
dans les ultimes étapes de ma thèse.*

A Monsieur le Professeur André Capron

*pour m'avoir accueilli dans l'unité INSERM U167.*

Au Docteur Pierre Desreumaux

*qui m'a appris que l'important dans une thèse de sciences n'était pas le temps mis à l'écrire mais la qualité des articles qui la composent.*

Au Docteur Sylvain Dubucquoi,

*compagnon de galère de ma première année de thèse.*

A Caroline Bisiaux, Gaëtane Woerly, Sylvie Loiseau et Jean-Paul Papin

*pour leur aide et leurs conseils techniques.*

A Sophie Nutten, Gaëtane Woerly et Charlotte Hemar

*pour les heures passées à corriger, imprimer et relier cette thèse.*

*A tous les collègues et amis que j'ai pu me faire durant ces quatre années et qui, chacun à leur façon, ont participé à l'accouchement de cette thèse.*

Cette thèse a reçu le soutien :

- de l'Association François Aupetit
- de l'Institut Pasteur de Lille
- de l'INSERM (CRI 4U004B)

# Table des matières

Table des matières .....	1
Abréviations .....	6
INTRODUCTION GENERALE.....	8
Chapitre I : L'INTESTIN	
1. <u>Définitions et généralités</u> .....	9
1.1 <u>L'intestin : description générale</u> .....	9
A. Aspects morphologiques .....	9
B. Vascularisation et innervation.....	10
C. La paroi intestinale .....	10
1.2 <u>La double fonction de l'intestin</u> .....	11
A. Digestion et absorption des aliments .....	11
a) Les sucs et leurs enzymes	
b) La voie de dégradation des enterocytes	
c) Contribution de la flore colique	
B. Barrière contre l'invasion des agents pathogènes.....	13
a) Notion de barrière d'espèce	
b) Le rôle protecteur du mucus	
2. <u>Le système immunitaire muqueux associé à l'intestin</u> .....	14
Définitions: MALT, GALT, BALT...	
2.1 <u>Le système immunitaire organisé</u> .....	14
A. Structure et fonction.....	14
B. Aspect et localisation .....	15
C. L'épithélium associé aux follicules.....	16
a) Les cellules M	
b) Les enterocytes	
2.2 <u>Le système immunitaire diffus</u> .....	18
A. Les lymphocytes.....	18
a) Généralités	
b) Les lymphocytes intraépithéliaux (LIE)	
c) Les lymphocytes T de la <i>lamina propria</i> (LPL)	
d) Lymphocytes B et plasmocytes	
B. Les macrophages et cellules dendritiques.....	21
a) Les macrophages de la <i>lamina propria</i>	
b) Les cellules dendritiques	
C. Les mastocytes.....	23
D. Les granulocytes.....	23
a) Les neutrophiles	
b) Les éosinophiles	
c) Les basophiles	

## Chapitre II : LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN (MICI)

1. <u>Généralité sur les MICI</u> .....	27
1.1 <u>Définitions</u> .....	27
A. La maladie de Crohn (MC).....	27
B. Comparaison entre la MC et la RCH.....	28
1.2 <u>Diagnostic et traitements de la MC</u> .....	30
A. Diagnostic .....	30
B. Traitements actuels .....	30
a) Les médicaments	
b) Les thérapies nutritionnelles	
c) L'intervention chirurgicale	
2. <u>Théories sur l'origine et la chronicité des MICI</u> .....	31
2.1 <u>Les facteurs environnementaux</u> .....	31
A. Etudes épidémiologiques .....	31
B. Les facteurs non infectieux.....	33
a) Le tabac	
b) La pilule contraceptive	
c) L'alimentation	
C. Les facteurs infectieux.....	34
a) La flore intestinale	
b) Les bactéries pathogènes	
c) Le virus de la rougeole	
2.2 <u>Les facteurs génétiques</u> .....	35
A. Les données épidémiologiques	
B. Les études d'association	
C. Les études de liaison	
2.3 <u>Les facteurs immunologiques</u> .....	36
Dérégulation de la balance des cytokines inflammatoires et des cytokines immunorégulatrices	

## Chapitre III : ETUDE DES CYTOKINES

1. <u>Brève présentation de la familles des cytokines</u> .....	
1.1 <u>Définitions et terminologies</u> .....	37
Interleukines, Chimiokines...	
1.2 <u>Les différents types de cytokines</u> .....	37
A. Les facteurs de différenciation et de croissance.....	37
B. Les cytokines immunorégulatrices .....	39
C. Les cytokines de l'inflammation.....	40
a) Les cytokines pro-inflammatoires	
b) Les cytokines anti-inflammatoires	
D. Les chimiokines .....	41
1.3 <u>Les récepteurs de cytokines</u> .....	43
A. Les grandes familles de récepteurs .....	43

a) Les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines	
b) La superfamille des récepteurs de cytokines (classe I)	
c) La superfamille des récepteurs de cytokines (classe II)	
d) La superfamille des récepteurs du TNF	
e) La superfamille des récepteurs du TGFβ	
f) La superfamille des récepteurs à 7 hélices transmembranaires	
B. Structure et fonction des récepteurs de chimiokines.....	46
a) Une structure commune	
b) Les récepteurs de l'IL-8: CXCR1 et CXCR2	
c) VIH et récepteurs de chimiokines	
d) DARC : un récepteur pléiotropique	
2. <u>Cytokines et granulocytes</u> .....	50
2.1 <u>L'action des cytokines sur les granulocytes</u>	
A. Recrutement tissulaire.....	50
a) Les grandes étapes	
b) Rôle des CXC chimiokines dans le recrutement des neutrophiles	
c) Cytokines et éosinophilie	
B. "Priming" et activation.....	54
a) Définitions	
b) IL-8 et neutrophiles	
2.2 <u>Les cytokines produites par les granulocytes</u> .....	55
A. Considérations techniques.....	55
B. Production de cytokines par les granulocytes sanguins.....	55
C. Localisation intracellulaire des cytokines .....	56
D. Régulation de la production de cytokines.....	59
a) Les cytokines régulant la libération d'IL-8	
b) Les niveaux de régulation	
3. <u>Cytokines et muqueuse intestinale</u> .....	61
3.1 <u>Les modèles animaux développant des colites</u> .....	61
A. Les différents types de modèles animaux.....	61
B. Profil de cytokines dans les modèles animaux.....	62
a) Les cytokines pro et anti-inflammatoires	
b) Cytokines immunorégulatrices et lymphocytes CD4+	
3.2 <u>Les cytokines dans la maladie de Crohn</u> .....	63
A. Les cytokines de type 1/type 2.....	63
B. Les cytokines pro/anti-inflammatoires .....	65
a) Les cytokines pro-inflammatoires	
b) Les cytokines pro-inflammatoires comme marqueur d'activité	
c) Le rapport IL-1RA/IL-1	
d) Rôle anti-inflammatoire de l'IL-10, de l'IL-4 et de l'IL-13	
e) Le rôle du TGFβ	
C. Les chimiokines .....	68
a) L'interleukine-8	
b) Les autres CXC chimiokines	
c) MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1)	
d) Les autres C-C chimiokines	
BUT DU TRAVAIL.....	72

## MATERIEL & METHODES

1. <u>Les patients</u> .....	73
1.1 <u>Les différents types de prélèvements</u>	
1.2 <u>Choix des témoins et des malades</u>	
2. <u>Purification des cellules</u> .....	74
2.1 <u>Purification des cellules périphériques</u>	
2.2 <u>Purification des cellules de la lamina propria</u>	
3. <u>Les techniques de détection des cytokines</u> .....	74
3.1 <u>Avantages et inconvénients des différentes techniques</u> .....	74
A. Techniques de détection de l'ARNm.....	74
B. Techniques de détection des protéines .....	75
C. Choix des techniques .....	76
3.2 <u>La RT-PCR</u> .....	76
A. Extraction et préparation des prélèvements .....	76
B. La reverse transcription.....	77
C. La PCR semi-quantitative .....	77
a) La mise au point	
b) La PCR	
c) Southern blot	
D. La PCR quantitative.....	80
a) La construction du compétiteur	
b) La mise au point	
3.3 <u>Localisation muqueuse des cytokines</u> .....	86
A. Choix des anticorps	
B. L'immunohistochimie	
3.4 <u>Quantification des cytokines</u> .....	88
A. Mesure par ELISA de la libération des cytokines	
B. Détection des cytokines intracellulaires par FACS	
3.5 <u>Etude des récepteurs de chimiokines par FACS</u> .....	88
4. <u>Etude du chimiotactisme des neutrophiles</u> .....	88
4.1 <u>La chambre de Boyden</u>	
4.2 <u>Chimiotactisme des neutrophiles</u>	

## RESULTATS

### 1. Etude des profils de synthèse des cytokines immunorégulatrices au cours de l'évolution de la maladie de Crohn.

Introduction.....	90
1) L'étude préliminaire .....	90
Patients et procédure	
Résultats	
2) L'étude quantitative.....	93
Patients et procédure	
Résultats	

3) Etude de l'IL-4 par immunohistochimie.....	96
Discussion .....	97
Conclusions & perspectives .....	99
<b>2. Recrutement des éosinophiles dans les lésions naissantes de patients avec MC</b>	
Introduction.....	100
L'étude préliminaire.....	101
Patients et procédure	
Résultats histologiques	
Résultats qualitatifs IL-5/Eotaxine	
Discussion .....	104
Conclusions & perspectives .....	106
<b>3. L'IL-8 dans les lésions naissantes et chroniques de MC</b>	
Introduction.....	107
Résultats .....	108
Discussion .....	111
Conclusions & perspectives .....	113
<b>4. Importance respective de l'IL-8 et de <math>Gr\alpha</math> dans le recrutement des neutrophiles chez des patients atteints de MC</b>	
Introduction.....	114
Résultats .....	115
Discussion .....	123
Conclusions & perspectives .....	125
<b>5. Les cytokines immunorégulatrices produites par les granulocytes</b>	
Introduction.....	126
Résultats .....	126
1) Cytokines immunorégulatrices associées aux granulocytes .....	126
2) Production d'IL-4 par les neutrophiles.....	130
Discussion .....	132
Perspectives.....	134
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>135</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>136</b>
<b>PUBLICATIONS.....</b>	<b>152</b>



## Abréviations

Ac	Anticorps
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire (cDNA)
Ag	Antigène
ARNm	Acide ribonucléique messenger (mRNA)
CC/CXC	Cystéines caractérisant les $\alpha$ et $\beta$ chimiokines
C5a	Anaphylatoxine issue de la voie de dégradation du complément
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
CMH	Complexe Majeur d'histocompatibilité (Major Histo. Complex)
DARC	Duffy blood group antigen
EAF	Epithélium associé au follicule
ECP	Eosinophil Cationic Protein
EDN	Eosinophil Derived Neurotoxin
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Assay
ELC	Ebl1 ligand chemokine (=MIP-3 $\beta$ )
ELR	Glu-Leu-Arg (motif des CxC chimiokines agissant sur les neutrophiles)
ENA-78	Epithelial cell derived Neutrophil Activating protein 78
EPO	Erythropoietin <b>ou</b> Eosinophil Peroxydase
FL	Follicules lymphoïdes
fMLP	Formyl Met-Leu-Phe
GCP-2	Granulocyte Chemotactic Protein-2
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GRO $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	Growth-Related Oncogene alpha, bêta et gamma
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HCC-1...4	Hemofiltrate CC chemokine
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
ICE	IL-1 $\beta$ converting enzyme
IFN $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	Interferon alpha, bêta, gamma
Ig	Immunoglobuline
IL-1RA	Interleukin-1 Receptor Antagonist
IP-10	Interferon-induced peptide
LARC	Liver and activation-regulated chemokine (=MIP-3 $\alpha$ )
LFA-1	Lymphocyte function associated antigen-1
LIE	Lymphocytes intra-épithéliaux (Intra-Epithelial Lymphocyte)
LPS	Lipopolysaccharide
LTB4	Leucotriène B 4
MBP	Major Basis Protein
MC	Maladie de Crohn (Crohn's Disease)
MCP-1..4	Monocyte Chemoattractant Protein-1, 2, 3, 4
MICI	Maladie inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin
Mig	Monokine induced by interferon- $\gamma$
MIP-1..3	Macrophage inflammatory protein-1, 2
MIPF-1,2	Myeloid inhibitory factor-1, 2
NO	Monoxyde d'azote
pIgR	polymeric Immunoglobuline Receptor
PP	Plaques de Peyer (Peyer Patches)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PF-4	Platelet Factor 4
PHA	Phytohémaglutinine
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PWM	Pokeweed Mitogen
RANTES	Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
RCH	Rectocolite hémorragique (Ulcerative Colitis)
ROM	Reactive Oxygen Metabolite

SCF	Stem cell factor
SDF	Stromal cell-derived factor
STAT	Signal transduction and activation of transcription
TARC	Thymus and activation-regulated chemokine
TCR	T cell receptor
TGF $\alpha,\beta$	Transforming Growth Factor alpha, beta
TNF $\alpha,\beta$	Tumor Necrosis Factor alpha, beta = Lymphotoxine alpha
SVF	Sérum de veau foetal
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION GENERALE

Suite à une agression mettant à mal l'intégrité tissulaire, se développe toute une série de réactions qui constituent l'inflammation proprement dite. Ces agressions sont de différents ordres : les agressions liées à une blessure (brûlures, coupures, fractures, contusions...) ainsi que les agressions dues à des agents physiques (ultraviolet, radiations), chimiques (produits toxiques) ou biologiques (parasites, virus, bactéries pathogènes ou encore allergènes).

En fonction de la nature de l'agression, l'organisme déclenchera une réponse spécifique privilégiant la mobilisation de médiateurs moléculaires et cellulaires adaptés. Néanmoins, les grandes lignes du processus inflammatoire restent inchangées. Dans un premier temps, l'agression provoque des modifications biochimiques et morphologiques comme la dégradation du tissu conjonctif ou la nécrose cellulaire. L'environnement cellulaire immédiat réagit par l'émission de médiateurs favorisant la vasodilatation. Cette augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins permet à des substances chimioattractrices d'aller recruter les cellules périphériques nécessaires à l'éradication de l'agent responsable de l'agression. La phase aiguë de l'inflammation se caractérise donc par un important infiltrat de cellules spécialisées dans la phagocytose: d'abord essentiellement les neutrophiles, puis dans un second temps les monocytes-macrophages. Après quoi débute la réparation des tissus endommagés, avec l'évolution de l'infiltrat cellulaire vers une population à dominante fibroblastique. La formation d'un tissu conjonctif très fibreux et riche en collagène est caractéristique de la fibrose et précède la cicatrisation finale.

Les **maladies inflammatoires chroniques de l'intestin** (MICI) sont représentées par la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC). L'origine des MICI reste inconnue car multifactorielle (immunologique, génétique, infectieuse, environnementale). L'incidence de la MC dans la région Nord-Pas-de-Calais est de 5 pour 100.000 habitants. Elle a un pouvoir invalidant considérable, car elle débute tôt dans la vie (entre 15 et 30 ans) et évolue par poussées, entrecoupées de périodes de rémissions de durée variable. Les principaux symptômes sont des douleurs abdominales, de la fièvre, des diarrhées... Neuf malades sur dix subiront au moins une intervention chirurgicale au cours de leur vie et leur risque de récidiver dans l'année dépasse malheureusement les 50%.

Cette situation permet de comparer, chez un même individu et de manière prospective, les zones saines et les zones de lésions débutantes (inflammation aiguë) ainsi que les lésions constituées (inflammation chronique) qui sont accessibles aux prélèvements endoscopiques. Elle constitue une occasion privilégiée d'étudier les événements immunopathologiques à l'origine, dans un premier temps, de nouvelles lésions endoscopiques puis d'une récurrence clinique de la maladie. L'étude des événements immunologiques conduisant à la survenue et/ou la chronicité d'une MC, passe d'une part par la caractérisation des profils de synthèse de cytokines immunorégulatrices aux différents stades de la maladie, et d'autre part par une meilleure connaissance des mécanismes de recrutement des cellules présentes dans les infiltrats inflammatoires de MC.

L'objectif de notre travail a donc été d'étudier, au cours de l'évolution de la MC, les profils de cytokines immunorégulatrices, ainsi que l'expression de chimiokines impliquées dans le recrutement des granulocytes.

# Chapitre I : L'INTESTIN

## 1. Définitions et généralités

### 1.1 L'intestin : description générale

#### A. Aspects morphologiques

La partie intestinale du tube digestif, formée respectivement par l'intestin grêle et par le côlon ou gros intestin, s'étend de l'estomac au rectum. A partir de la sortie de l'estomac (pylore), on distingue l'intestin grêle formé du duodénum, du jéjunum et de l'iléon. Le duodénum forme une anse d'une vingtaine de centimètres dans laquelle viennent se jeter les canaux pancréatique et biliaire. Lorsqu'il émerge de derrière le péritoine, débute le jéjunum qui représente environ 40% de l'intestin grêle. Puis vient l'iléon qui s'étend jusqu'à la valvule iléocoecale. Le côlon quant à lui se compose du caecum, suivi des côlons ascendant, transverse, descendant et sigmoïde (figure 1).

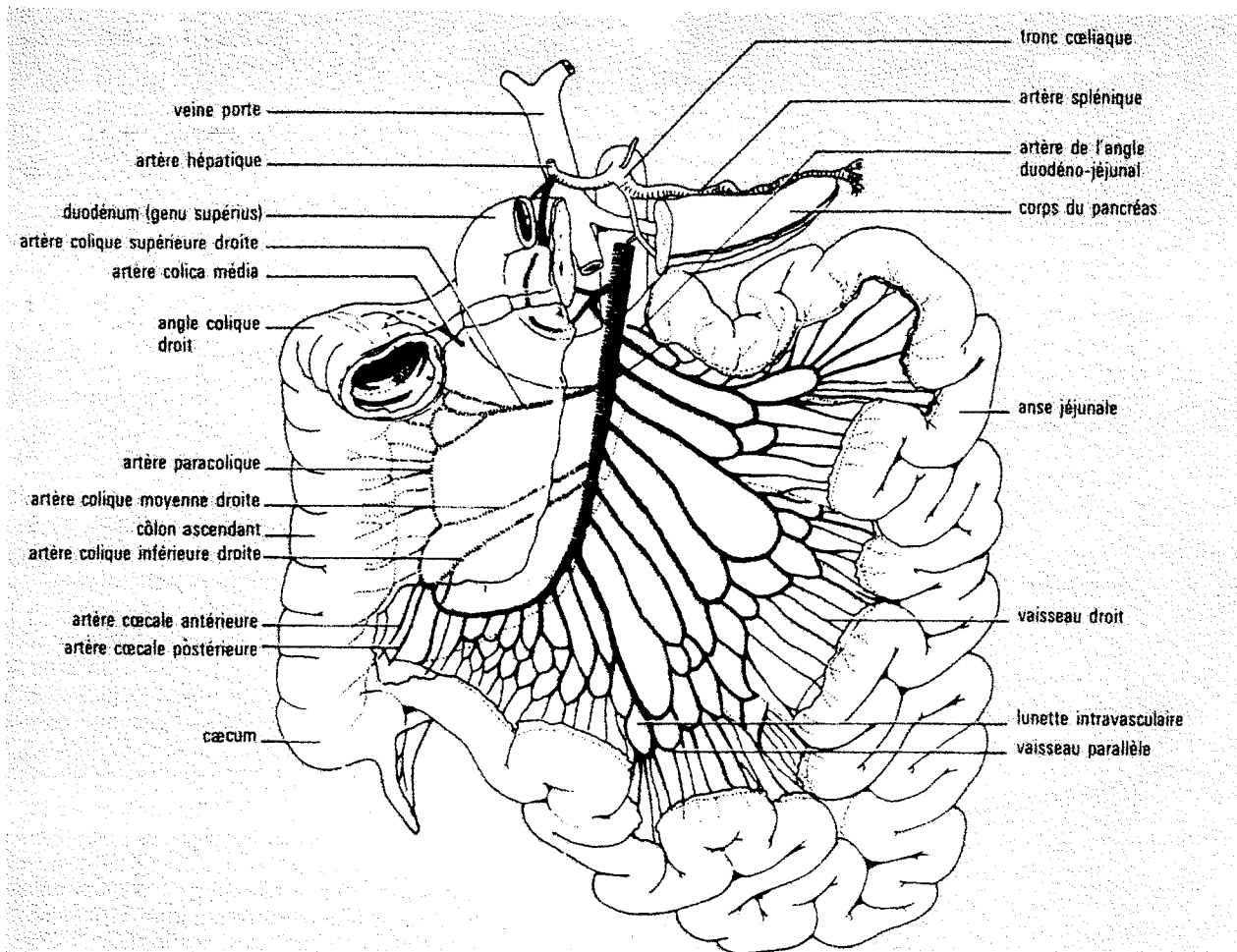


Figure 1 : **Vascularisation artérielle de l'intestin grêle et du côlon droit**  
(dans Hépatogastro-entérologie clinique de Frexinos et al. 1988).

L'intestin grêle, dont le rôle essentiel est la digestion et l'ingestion d'aliments, représente une surface estimée à 200 m<sup>2</sup>. Cet exploit s'explique par trois niveaux de repliement. Le premier est formé par des replis transversaux de la muqueuse appelés valvules conniventes. Ces replis,

due à la contraction des muscles longitudinaux, permettent d'expliquer pourquoi la taille de l'intestin grêle d'un individu vivant est de 3 mètres au lieu de 6 (taille réelle d'un intestin détendu). La muqueuse présente également de nombreuses excroissances en forme de doigt de gant: les villosités intestinales. Leur épithélium est composé majoritairement d'enterocytes qui à leur tour présentent des microvillosités. Le côlon, où réside l'essentiel de la flore bactérienne endogène, est dépourvu de villosités intestinales et ses microvillosités vont en s'amenuisant à l'approche du rectum.

## **B. Vascularisation et innervation**

Les systèmes vasculaires et nerveux ont tous deux une double fonction. Le sang permet de recueillir les nutriments et de les redistribuer à travers tout l'organisme, mais il véhicule également les cellules immunocompétentes du système immunitaire muqueux intestinal. Quant aux nerfs présents dans la paroi intestinale, ils servent à informer le système nerveux central ainsi qu'à diriger de manière autonome les contractions de l'intestin.

La vascularisation de l'intestin est assurée par l'artère coeliaque. Celle-ci alimente directement les artères gastro-duodénale et pancréatico-duodénale supérieure (figure 1). L'artère mésentérique supérieure prend naissance sous l'artère coeliaque avant d'être relayée respectivement par l'artère pancréatico-duodénale inférieure, les artères jéjunale et iléale, ainsi que les artères coliques droite et moyenne. L'artère colique gauche et l'artère rectale dérivent pour leur part de l'artère mésentérique inférieure. Situé parallèlement aux artères, le système veineux remonte le sang au cœur via les veines mésentériques supérieure et inférieure qui débouchent dans la veine porte, contrairement au système veineux rectal qui lui aboutit à la veine cave.

Le système nerveux de l'intestin est composé d'une innervation afférente intrinsèque dirigeant les contractions intestinales et qui est placée sous le contrôle d'une innervation extrinsèque qui transmet ses informations, via les fibres afférentes vagales et spinales au système nerveux central. L'innervation intrinsèque a un rôle local de communication entre muqueuse et musculature qui détermine l'autonomie partielle de l'intestin. Elle est composée des plexus myentériques à fonction sensorielle et motrice et des plexus sous-muqueux à fonction principalement sensorielle.

## **C. La paroi intestinale**

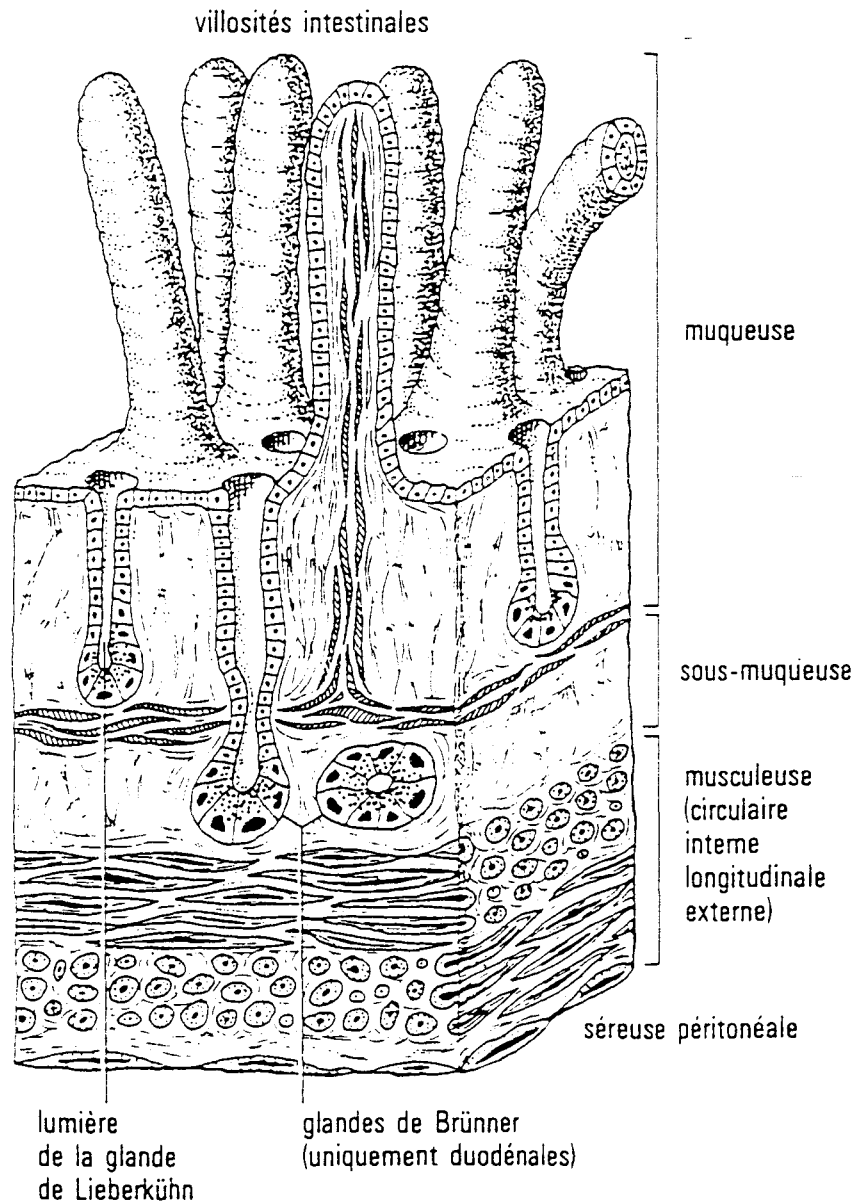
En partant de la lumière intestinale, on distingue (figure 2) :

- La **muqueuse** qui est constituée de :
  - l'épithélium s'étendant des cryptes aux sommets des villosités.
  - la *lamina propria* abrite les cellules du système immunitaire intestinal, ainsi que les vaisseaux sanguins et les canaux lymphatiques permettant leur recircularisation.
  - la *muscularis mucosa* qui forme une double couche de muscles lisses (l'une circulaire et l'autre longitudinale).
- La **sous-muqueuse** est formée d'un tissu conjonctif lâche permettant, lors des contractions intestinales, le glissement de la muqueuse par rapport aux couches musculaires. Elle abrite le plexus de Meissner et présente une vascularisation importante. Les glandes de Brunner,

spécifiques du duodénum, sont à l'origine de sécrétions mucosales destinées à protéger l'épithélium des sucs gastriques.

- La *muscularis externa*, est beaucoup plus épaisse que la *muscularis mucosa* mais, comme elle, se compose d'une couche circulaire de fibres musculaires lisses côté muqueux et d'une couche musculaire longitudinale côté séreuse. Elle abrite les plexus myentériques ou plexus d'Auerbach qui contrôlent les contractions intestinales.
- La *séreuse*, richement vascularisée, recouvre du tissu lâche.

Figure 2: Schéma représentant la paroi d'un intestin grêle (Frexinos 1988).



## 1.2 La double fonction de l'intestin

### A. Digestion et absorption des aliments

La fonction principale de l'intestin grêle est la digestion des aliments et leur absorption sous forme de nutriments et de minéraux essentiels (pour revue: Frexinos 1988; Hagiage 1994; Kaiserlian 1996).

### a) Les sucs et leurs enzymes

La digestion commence dans l'estomac sous l'action des sucs gastriques, particulièrement acides. Les sucs pancréatiques et biliaires prennent ensuite le relais. La majorité des glucides, protides, lipides, vitamines et électrolytes sont absorbés par l'intestin grêle. Le calcium et le fer sont absorbés au niveau du duodénum et du jéjunum supérieur. Les glucides sont dégradés, par des  $\alpha$  amylases salivaires et pancréatiques, en amidon puis en oligosaccharides et dextrans. Les protides, d'abord digérés par la pepsine et la cathepsine gastrique, sont ensuite hydrolysés par diverses protéases pancréatiques. La vitamine B12 d'origine protéique est essentiellement absorbée par l'iléon. Les lipides, principalement composés de triglycérides, sont solubilisés sous forme de micelles grâce aux sels biliaires, avant d'être transformés en acides gras par la lipase pancréatique. Le reste des lipides est formé par le cholestérol, les phospholipides et les vitamines liposolubles (A, D, E et K).

### b) La voie de dégradation des entérocytes

Au niveau de la bordure en brosse des entérocytes grêliques, les oligosaccharides sont réduits en monosaccharides. L'absorption du glucose et du galactose se fait par transport couplé au sodium, alors que le fructose peut également être absorbé par diffusion facilitée. Les oligopeptides sont dégradés en acides aminés par les enzymes lysosomiales libérées par les entérocytes et surtout par les cellules de Paneth au niveau des cryptes. Ces acides aminés, tout comme certains triglycérides à chaîne courte ( $\leq 10$  carbones), vont gagner le sang veineux, alors que la majorité des lipides rejoint le système lymphatique.

Les entérocytes du côlon ont un équipement enzymatique plus limité que ceux du grêle. Leur rôle dans la digestion et l'absorption des nutriments s'en trouve réduit. C'est la flore endogène qui prend le relais.

### c) Contribution de la flore colique

La flore intestinale se compose de plus de 400 espèces de bactéries différentes qui contribuent à la transformation des aliments en nutriments (pour revue: Hagiage 1994). La flore endogène de l'intestin grêle, trop peu nombreuse, ne joue qu'un rôle secondaire dans ce processus, contrairement à la flore colique qui métabolise l'essentiel des nutriments non absorbés par le grêle.

Ainsi, les sucres, essentiellement des fibres (cellulose, pectine...), sont pris en charge par la flore colique qui par **fermentation** va les transformer en acides organiques et en acides gras volatiles (acides acétique, butyrique et propionique) en partie réabsorbés par le côlon. Le butyrate représenterait jusqu'à 70% des ressources énergétiques des cellules coliques. De plus les acides gras volatiles, comme les sels biliaires, contribuent à la réabsorption sodium dépendante, de 90% de l'eau qui se déverse dans le côlon.

Les résidus protéiques, d'origine alimentaire ou endogène (bactéries mortes, enzymes intestinales, urée...), sont hydrolysés par les bactéries coliques : c'est la **putréfaction** (désamination + décarboxylation). Les acides aminés générés servent surtout au métabolisme des bactéries qui rejettent ensuite des amines (histamines, cadavérine, putrescine...), des alcools, des acides organiques et de l'ammoniac.

La flore colique est en outre capable de transformer les triglycérides non absorbés par le grêle, tout comme les stéroïdes (cholestérol...) et les acides biliaires résiduels. A noter également, la synthèse par les bactéries de vitamine K.



## B. Barrière contre l'invasion des agents pathogènes

L'intestin représente également une formidable voie d'invasion pour toute une série d'agents pathogènes : parasites, bactéries, virus et substances allergéniques. Représentant 250 à 300 m<sup>2</sup>, la surface muqueuse du tube digestif représente en effet la plus importante zone de contact entre l'organisme et le milieu extérieur.

### a) Notion de barrière d'espèce

On distingue une flore endogène colonisant le tube digestif et une flore de transit incluant des bactéries pathogènes. Leur nombre est régulé par l'intensité du flux intestinal et par les effets antibactéricides des sucs gastrique, pancréatique et biliaire. Les bactéries de la flore endogène arrivent à se multiplier dans cet écosystème et se montrent en outre capables d'empêcher toute implantation de bactéries exogènes. Ce phénomène de barrière d'espèce permet non seulement aux bactéries endogènes de lutter contre l'invasion d'espèces bactériennes concurrentes, mais conduit également à une protection de la muqueuse intestinale (pour revue: Hagiage 1994).

### b) Le rôle protecteur du mucus

Tout en permettant l'absorption des nutriments, le mucus participe à la défense de l'épithélium, en le protégeant des enzymes bactériennes et des sucs intestinaux d'une part et d'autre part en formant une barrière à l'invasion bactérienne (Sanderson 1994). La viscosité même du mucus forme déjà une barrière physique limitant la pénétration des micro-organismes. En outre, les carbohydrates formant la majorité de la structure muqueuse sont capables de lier les molécules d'adhérence des agents infectieux, les piégeant ainsi avant qu'ils n'atteignent l'épithélium. Puis les nombreuses substances antibactériennes (lysozyme, lactoferrine...) ainsi que les IgA sécrétées présents dans le mucus prennent le relai et contribuent à l'élimination de l'agent infectieux.

Le mucus est essentiellement composé d'eau. En effet, seul 1% du mucus est représenté par les mucines qui forment de longues chaînes de glycoprotéines fortement glycosylées. La composition et la taille des molécules de mucines est très variables. A ce jour, 7 espèces de mucines ont été caractérisées dont l'expression varie en fonction du type de muqueuses (tableau 1). Le mucus est sécrété par des cellules spécialisées : les **cellules caliciformes** (Goblet cells).

Tableau 1 : **Nature et localisation muqueuse des différents types de mucines.**

(d'après Van Klinken 1995)

Tissus	MUC 1	MUC 2	MUC 3	MUC 4	MUC5AC	MUC 5B	MUC 6	MUC 7
Glandes salivaires	+	-	-	-	-	++	-	++
Oesophage	+	-	-	?	-	+	-	?
Estomac	+	-	+	+	++	+	++	-
Intestin grêle	+	++	++	+	±	+	±	?
Côlon	+	++	+	+	±	+	±	?
Pancréas	+	±	-	?	?	?	-	?
Tractus respiratoire	+	+	-	++	-	++	±	?

## 2. Le système immunitaire muqueux associé à l'intestin

Le système immunitaire intestinal (**GALT** = gut associated lymphoid tissue) est l'un des composants principaux du système immunitaire muqueux (**MALT** = mucosa-associated lymphoid tissue) qui comporte également les systèmes immunitaires bronchique (**BALT** = bronchus associated lymphoid tissue) et nasal (**NALT** = nasopharyngeal associated lymphoid tissue), ainsi que les voies urogénitales et plusieurs glandes : les glandes mammaires et lacrymales ainsi que les amygdales (pour revue: Croitoru 1994; MacDonald 1994; Brandtzaeg 1995).

Les cellules immunocompétentes associées au tube digestif siègent essentiellement dans la muqueuse ou *lamina propria*, la sous-muqueuse et les ganglions mésentériques. Classiquement, 2 sous-compartiments composent le système immunitaire muqueux intestinal :

- un système immunitaire organisé (O-MALT), constitué par les **follicules lymphoïdes** (FL) isolés ou rassemblés en **plaques de Peyer** (PP) et les ganglions mésentériques. Ce système est dit inductible car la réponse immunitaire est induite à ce niveau.
- un système immunitaire diffus, dit effecteur, car il comporte les cellules effectrices de la réponse immune. Il est représenté par les différentes sous-populations cellulaires présentes dans la *lamina propria* et ainsi que par les **lymphocytes intraépithéliaux** (LIE).

### 2.1 Le système immunitaire organisé

#### A. Structure et fonction

La première barrière à l'invasion est formée par le système immunitaire diffus composé par les lymphocytes intraépithéliaux et les cellules de la *lamina propria*. Cette réponse primaire donne le temps au GALT de mettre en place une réponse spécifique de l'agent pathogène, via le système immunitaire muqueux organisé. Dans l'intestin, celui-ci est essentiellement localisé au niveau des follicules lymphoïdes isolés (FL) ou rassemblés en plaques de Peyer (PP), ou dans des structures comme les amygdales et l'appendice ou encore les ganglions mésentériques.

Les PP et les ganglions mésentériques sont composés de FL secondaires, caractérisés par un centre germinatif résultant en partie de la prolifération oligoclonale de lymphocytes B activés. Cette activation s'est déroulée dans les zones parafolliculaires par l'intermédiaire de lymphocytes T CD4+ et de cellules dendritiques interdigitées. Arrivées dans les FL, les cellules B prolifèrent, formant des centroblastes qui vont migrer vers la région apicale du centre germinatif afin d'interagir avec les cellules dendritiques folliculaires et les lymphocytes T avoisinants (Pulendran 1997).

La présence constante de ces centres germinatifs dans la muqueuse reflète une stimulation chronique de ces structures lymphoïdes (Tsiagbe 1996). En effet, les FL sont le lieu privilégié de la présentation des antigènes aux cellules immunocompétentes. Des cellules dendritiques folliculaires capturent des complexes antigéniques non dégradés s'infiltrant dans la *lamina propria*, avant de présenter ces antigènes apprêtés aux lymphocytes T et B naïfs. Les centrocytes sélectionnés poursuivent alors leur différenciation soit en cellules B mémoire, soit en plasmocytes à IgM ou IgA (Pulendran 1997). Ces lymphocytes vont ensuite poursuivre leur maturation dans les ganglions mésentériques voisins, avant de rejoindre, via la circulation sanguine, des muqueuses majoritairement intestinales.

La présence d'adressines à leur surface explique que les lymphocytes portant l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  migrent dans la *lamina propria* alors que ceux présentant  $\alpha E\beta 7$  gagnent l'épithélium (Brandtzaeg 1995). Les lymphocytes T présents dans la muqueuse intestinale représentent plus de 60% de l'ensemble des lymphocytes T humains, alors que les plasmocytes représentent 80% du nombre total des plasmocytes humains.

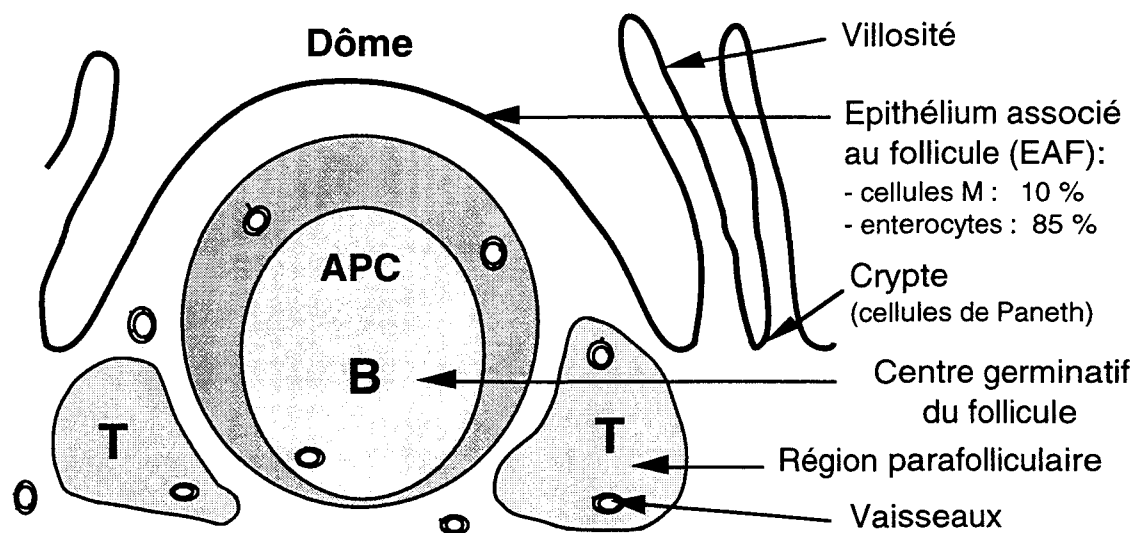


Figure 3 : **Follicule lymphoïde.** Les antigènes, capturés et apprêtés dans la région du dôme par les cellules présentatrices d'antigène (APC), sont présentés aux lymphocytes B naïfs au niveau du centre germinatif du follicule.

## B. Aspect et localisation

Les follicules isolés sont nombreux (environ 30.000) et disséminés tout le long du tube digestif entre la muqueuse et la sous-muqueuse alors que les PP ne sont présentes qu'au niveau de l'intestin grêle. Au niveau du côlon, les très nombreux FL passent de 8 FL/cm<sup>2</sup> chez l'enfant à 3 FL/cm<sup>2</sup> chez des personnes plus âgées. Alors que normalement seulement 1% de ces FL contiennent un centre germinatif, ce pourcentage croît considérablement lors d'inflammations muqueuses (MacDonald 1994).

Les PP sont visibles sur du tissu frais par transillumination ou après coloration par le bleu de méthylène. Une technique d'endoscopie récente, associant un objectif grossissant (x50 à 100) et la projection sur la muqueuse colique d'une solution d'indigocarmin à 0,2% a permis la visualisation de FL (Fujimura 1996).

L'aspect macroscopique des PP dépend du nombre de follicules lymphoïdes la composant. Les plus petites PP ne dépassent pas quelques centimètres de diamètre et rassemblent de 5 à 10 follicules. Les plus importantes comportent environ 300 follicules et présentent une forme allongée pouvant atteindre 10 cm de longueur. Les PP sont localisées tout au long de l'intestin grêle et prédominent sur le bord anti-mésentérique, sauf au niveau du duodénum et de l'iléon terminal où leur localisation est circonférentielle (Griebel 1996).

Leur taille et leur nombre est fonction de la localisation intestinale ainsi que de l'âge, du poids, de la taille et du sexe de l'individu. Si la densité des PP n'est guère plus importante dans l'iléon que dans le jéjunum, leur taille forme néanmoins un gradient croissant du duodénum à l'iléon terminal. De 150 PP de petites tailles à la naissance, leur taille et leur nombre croît jusqu'à

l'adolescence pour atteindre environ 350 PP. Présent durant toute la vie d'adulte, les PP finissent par décliner avec l'âge (MacDonald 1994).

### C. L'épithélium associé aux follicules

Les FL isolés et les PP sont situés sous la zone du dôme entre la muqueuse et la sous-muqueuse (figure 3). Ils sont séparés de la lumière intestinale par un épithélium spécialisé appelé "épithélium associé au follicule" (EAF). L'EAF est caractérisé par une architecture pauvre en villosités et en cryptes, par le faible nombre de cellules caliciformes (Goblet cells) et donc de mucus recouvrant cet épithélium, et surtout par la présence de cellules M (Gebert 1996; Neutra 1996). Il s'agit donc d'une structure destinée à favoriser l'entrée de corps étrangers provenant de la lumière intestinale.

#### a) Les cellules M

Les cellules M représentent environ 10% des cellules de l'EAF. Elles proviendraient d'un précurseur cellulaire commun avec les cellules épithéliales intestinales de l'EAF ou d'une lignée cellulaire épithéliale particulière située dans les cryptes (Kernéis 1996). Elles sont caractérisées par la perte des microvillosités et par une invagination de la membrane basale englobant des cellules immunocompétentes (Neutra 1996).

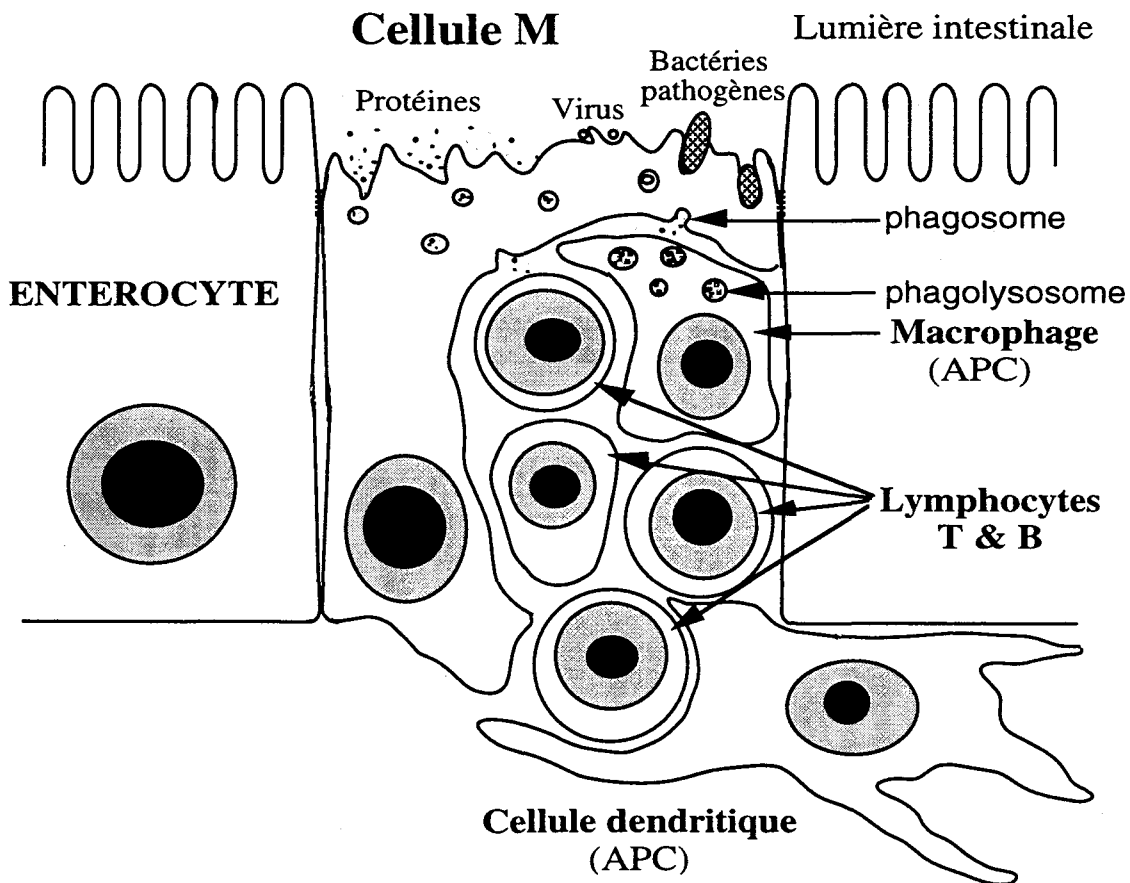


Figure 4 : La cellule M est une voie d'entrée privilégiée pour les corps étrangers dont les antigènes seront apprêtés par les cellules présentatrices d'antigène (APC) avant d'être présentés aux lymphocytes T (d'après Neutra 1996).

La capacité des cellules M à dégrader et à présenter des antigènes via des molécules de CMH de classe II reste très controversée, en raison notamment du faible développement des structures lysosomiales. Le rôle principal des cellules M serait plutôt de faciliter le passage de matériel luminal à travers la barrière intestinale, et tout particulièrement des micro-organismes composant la flore endogène et la flore de transit (Kato 1994; Neutra 1996). Les cellules M canaliserait donc l'entrée de ces micro-organismes, facilitant ainsi une prise en charge rapide des antigènes bactériens et viraux par les cellules immunocompétentes présentes dans leur "poche" basale. Après phagocytose des bactéries, les macrophages peuvent présenter les antigènes apprêtés aux lymphocytes T (CD4+ à 75%) qui contribueront à l'activation des lymphocytes B naïfs (CD45RA à 85%). Ces derniers expriment essentiellement des IgM de surface (Farstad 1994).

### b) Les entérocytes

Le nombre de cellules M ne représentant qu'une infime fraction de la surface intestinale par rapport aux microvillosités des entérocytes, il est naturel qu'un grand nombre de substances luminales de petite taille, comme les protéines, utilisent la voie conventionnelle des entérocytes pour pénétrer la muqueuse intestinale (Mowat 1997).

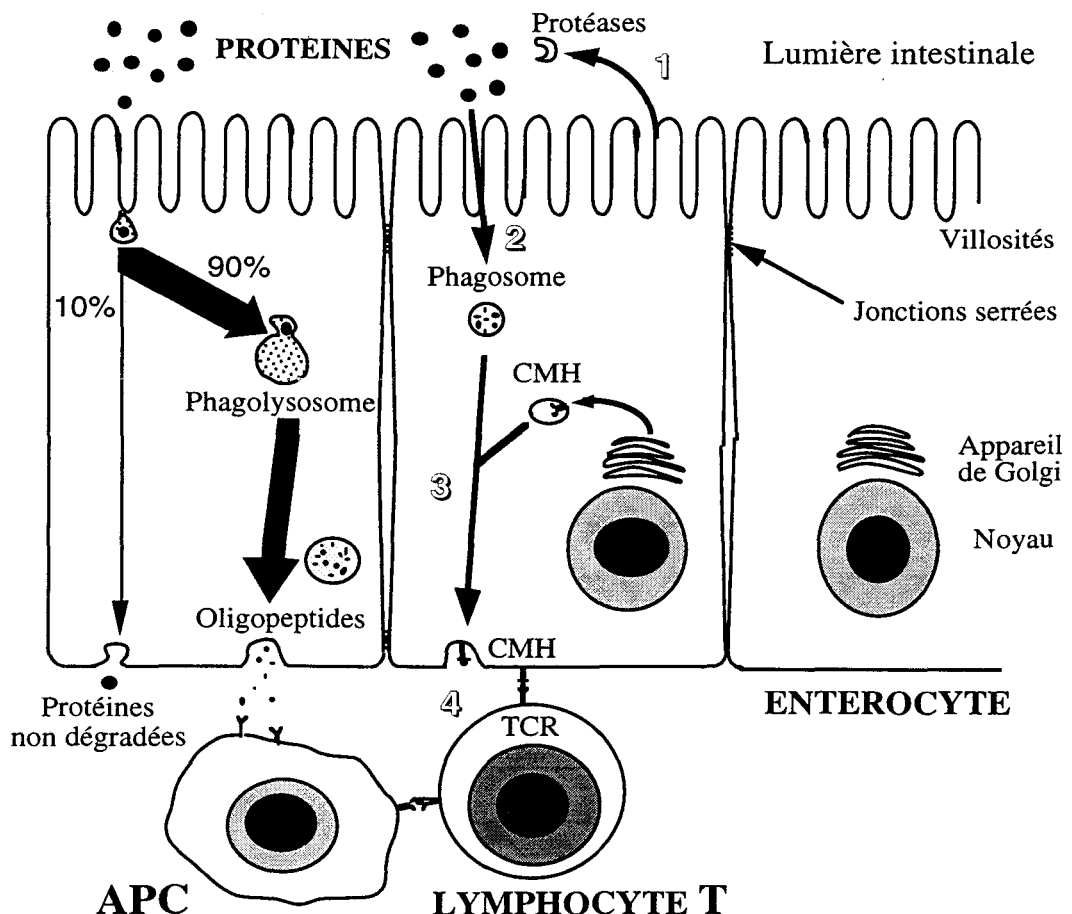


Figure 5 : **La voie de dégradation des entérocytes.** Les entérocytes sécrètent dans la lumière intestinale des protéases (1). Le processus de dégradation se poursuit dans des phagolysosomes (2). Les antigènes sont ensuite apprêtés, soit directement par l'entérocyte (3), soit par une cellule présentatrice d'antigène (APC) sous-jacente. La présentation de l'antigène au récepteur du lymphocyte T (TCR) se fait par l'intermédiaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Adapté de Heyman 1996).

Après capture des protéines luminales par les entérocytes, la grande majorité de ces protéines est dégradée avant d'être apprêtée et présentée aux lymphocytes T soit par des APC professionnelles, soit directement par les entérocytes (figure 5). Mais les cellules épithéliales intestinales représentent une population d'APC différente des macrophages et des cellules dendritiques de la *lamina propria*. En effet, les régions promotrices contrôlant l'expression de CMH de classe II diffèrent suivant que les entérocytes sont stimulés ou non par la présence d'une inflammation voisine. De même, les molécules costimulatrices ne sont exprimées qu'après stimulation (Kaiserlian 1996). Le rôle des entérocytes serait donc plutôt d'induire une anergie des lymphocytes T CD4+ entraînant un mécanisme de tolérance. Les entérocytes se montrent d'ailleurs incapables d'induire une prolifération lymphocytaire T (Kaiserlian 1996).

Les entérocytes sont également en contact avec les lymphocytes intraépithéliaux (LIE) majoritairement CD8+. La présentation des antigènes non conventionnels aux lymphocytes cytotoxiques se fait par l'intermédiaire de MHC non conventionnel de classe I, et plus particulièrement les molécules CD1d, constitutivement exprimées par les entérocytes (Blumberg 1996).

## **2.1 Le système immunitaire diffus**

En comparaison avec les cellules principalement "naïves" du système immunitaire muqueux organisé, d'autres cellules effectrices, majoritairement "mémoires", sont présentes de façon diffuse dans la *lamina propria* et l'épithélium. La *lamina propria* comporte un grand nombre de types cellulaires : les lymphocytes T et B, les macrophages et les cellules dendritiques, les mastocytes, les polynucléaires neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Les cellules immunocompétentes de l'épithélium intestinal sont essentiellement des lymphocytes, appelés du fait de leur situation entre les cellules épithéliales, lymphocytes intraépithéliaux (LIE).

### **A. Les lymphocytes**

#### **a) Généralités**

Les lymphocytes sont responsables de la réponse immunitaire spécifique, par l'intermédiaire de leurs récepteurs spécialisés. Classiquement, on distingue deux grands groupes de lymphocytes : les lymphocytes T et les lymphocytes B, producteurs d'anticorps.

Les **lymphocytes B** présentent à leur surface des immunoglobulines (Ig) qui sont susceptibles de reconnaître des antigènes de surface d'agents pathogènes. Après activation, les lymphocytes B prolifèrent avant de se différencier en plasmocytes producteurs d'anticorps spécifiques de l'antigène. En fonction de l'environnement cellulaire et de la présence de certaines cytokines, l'isotype des anticorps sécrétés sera A, E, G ou M.

Les récepteurs des **lymphocytes T** (TCR = T cell receptor) ne peuvent reconnaître l'antigène que si celui-ci a préalablement été dégradé par une autre cellule et présenté sous forme de peptide (apprêtement = processing) par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ainsi, les cellules infectées vont présenter les peptides viraux par l'intermédiaire d'un CMH de classe I à des lymphocytes T dont le récepteur est associée à une molécule de CD8. Activés, via le complexe CD3, ces **lymphocytes CD8<sup>+</sup>** vont détruire la cellule infectée. C'est pourquoi, ils sont appelés lymphocytes **cytotoxiques**.

Les antigènes du non-soi présents dans la matrice extracellulaire sont apprêtés par des cellules présentatrices d'antigènes (APC = Antigen Presenting Cells) comme les macrophages, les cellules dendritiques ou encore les cellules épithéliales. Les peptides antigéniques sont présentés par des CMH de classe II à des récepteurs de lymphocytes T  $CD4^+$  qui vont sécréter des cytokines. Ces **lymphocytes auxiliaires** (helper) doivent leur nom à leur rôle d'intermédiaire dans la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique de l'antigène.

### b) Les lymphocytes intraépithéliaux (LIE)

La défense de l'épithélium est assurée par les LIE, seules cellules immunocompétentes au contact de la lumière intestinale. Il existe en moyenne 2 LIE pour 10 cellules épithéliales. Le nombre absolu de LIE décroît du jéjunum vers l'iléon et, chez la souris, il est dix fois inférieur au niveau du colon par rapport à l'intestin grêle (Beagley 1995).

La synthèse par les cellules épithéliales de chimiokines, dont IL-8, contribue au recrutement épithélial des LIE (Ebert 1996; Brandtzaeg 1997). L'intégrine  $\alpha_E\beta_7$  (HML-1 ou CD103) permet l'adhérence des LIE à l'épithélium par l'intermédiaire de la E-cadhérine, facilitant ainsi les interactions lymphoépithéliales (Cepek 1994). Le rôle des IEL humains reste mal connu. Chez les souris, les IEL  $CD8^+$ , mais également  $CD4^+$ , sont susceptibles d'exercer une activité cytotoxique de type ADCC (Antibody-dependant cytotoxicity) (Lundquist 1996). Il a également été suggéré que les IEL pourraient reconnaître les antigènes présentés par les récepteurs CD1d des entérocytes, et contribuer ainsi à l'élimination des cellules épithéliales infectées (Mowat 1997).

L'ensemble des LIE humains, bien que constituant une population lymphocytaire hétérogène, partage un certain nombre de caractéristiques communes telles que : l'expression de l'intégrine  $\alpha_E\beta_7$  (Cerf-Bensussan 1987), d'une molécule costimulatrice nouvellement identifiée p126 ou CDw101 (Russell 1996) et de marqueurs d'activation tels que  $CD45RO^+$  (Lundquist 1996), sans oublier des propriétés cytotoxiques et la capacité à synthétiser de l' $IFN\gamma$ . La majorité des LIE possèdent un TCR  $\alpha\beta$  et ont reçu une éducation thymique. Les LIE  $\gamma\delta$  représentent 10% des LIE de l'intestin grêle et jusqu'à 40% des LIE du colon, alors que dans le sang ils ne correspondent qu'à 5% des lymphocytes périphériques (tableau 2).

Tableau 2: **Comparaison phénotypique entre IEL, LPL et PBL** (Abreu-Martin 1996).

Marqueurs membranaires	IEL	LPL	PBL
TCR $\alpha\beta$	80 %	95 %	95 %
$\gamma\delta$	15 %	3 %	3 %
$CD4^+$	20 %	65 %	65 %
$CD8^+$	80 %	35 %	35 %
$CD45 RO^+$	85 %	65-95 %	30-50 %
$CD45 RA^+$	15-20 %	10-20 %	60-90 %
$CD25 (IL-2R\alpha)$	15-30 %	15-30 %	5 %
HML-1 ( $\alpha_E\beta_7$ )	95 %	40 %	0 %

### c) Les lymphocytes T de la lamina propria (LPL)

Les lymphocytes T, présents au niveau de la *lamina propria*, proviennent de la recirculation de lymphocytes activés au niveau des FL ou des PP. Tous expriment l'intégrine  $\alpha_4\beta_7$ , qui joue un rôle déterminant dans le retour de lymphocytes dans l'intestin. Cette intégrine permet la liaison des lymphocytes à la molécule MadCAM-1 présente spécifiquement sur les veinules postcapillaires de la *lamina propria*, des PP et des ganglions mésentériques (Berlin 1993).

Les LPL et les lymphocytes périphériques (PBL) présentent des phénotypes semblables, majoritairement CD4+ (65 à 80%) et accompagné d'un TCR $\alpha$   $\beta$  (95%) (tableau 2). Mais, à la différence des PBL, les LPL sont activés et de type mémoire comme l'atteste l'expression de CD45RO+ (65 à 95%).

### d) Lymphocytes B et plasmocytes

Après activation des centrocytes dans les FL, les cellules B vont se multiplier et terminer leur différenciation en plasmocytes dans les ganglions mésentériques afférents. Puis, ces plasmocytes, majoritairement à IgA, iront recoloniser la muqueuse intestinale, où ils représentent 30 à 40% des cellules mononucléées de la *lamina propria* chez l'adulte (pour revue: Brandtzaeg 1994, 1995, 1997). La proportion des plasmocytes à IgA est plus importante dans le côlon que dans l'intestin grêle proximal (90% versus 79%), avec une augmentation croissante du pourcentage de plasmocytes à IgA2 de l'intestin grêle proximal vers le côlon (23% versus 64%). A l'inverse, des plasmocytes à IgM sont plus nombreux dans l'intestin grêle (18% contre 6%), alors que la proportion de plasmocytes à IgG est identique dans tout le tube digestif (4%). Il n'existe pas à l'état physiologique de plasmocytes à IgE ou IgD (Brandtzaeg 1994).

Les IgA et les IgM ont pour particularité d'exister sous forme sécrétoire (dimérique pour l'IgA et pentamérique pour l'IgM) et de pouvoir ainsi directement agir au niveau de la lumière intestinale. La prédominance de la forme IgA2 dans le côlon peut s'expliquer par une plus grande résistance de cette sous classe aux protéases bactériennes particulièrement nombreuses dans la lumière intestinale colique. Quant à la localisation privilégiée des plasmocytes au voisinage des cryptes, elle s'explique par le mode de sécrétion de ces anticorps.

La polymérisation des IgA et des IgM s'effectue, lors de la sécrétion des Ig par les plasmocytes, grâce à une glycoprotéine de 137 acides aminés : la **chaîne J**. Ces IgA et IgM polymériques seront ensuite transportées vers la lumière intestinale par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique : le **pIgR** (polymeric immunoglobulin receptor). Le pIgR est essentiellement présent à la membrane des glandes cryptiques et des cellules épithéliales voisines. Ce récepteur transmembranaire se caractérise une partie extracellulaire composée de 5 domaines (figure 6).

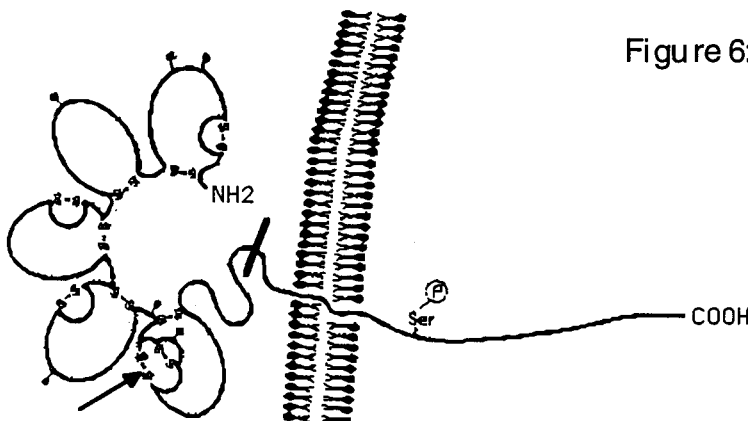


Figure 6: Représentation schématique du récepteur à pIg. Les résidus 15-37 situés coté N terminal sont impliqués dans la liaison non covalente aux Ig. Le signal de transcytose est médié par la sérine. Le site de clivage est marqué par /. La flèche indique les cystéines impliquées dans les ponts di-sulfures entre IgA et composant sécrétoire. (modifié d'après Brandtzaeg 1994).



Cette partie extracellulaire se lie de façon non covalente aux Ig polymériques grâce à la présence de la chaîne J et ce avec une constante d'affinité 50 fois supérieure pour l'IgM que pour l'IgA. Les complexes ainsi formés sont internalisés par la cellule épithéliale. Après migration vers le pôle apical de la cellule, un clivage au niveau de la partie membranaire du pIgR (figure 6) permet de libérer le domaine extracellulaire du pIgR également appelé **composant sécrétoire**.

Les anticorps sécrétoires libérés dans la lumière intestinale ont pour principale fonction de neutraliser les agents infectieux luminaux et d'empêcher leur passage dans la muqueuse intestinale. Cette reconnaissance entre l'antigène et l'anticorps peut également avoir lieu dans la cellule épithéliale ou dans la *lamina propria*. En plus de ce contact entre l'antigène et l'anticorps, les IgA et les IgM muqueuses peuvent se fixer par leur partie constante sur des récepteurs et activer de nombreuses cellules telles que les lymphocytes T, les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles. Ainsi, les IgA et surtout les IgA sécrétoires sont capables de se fixer aux éosinophiles et d'induire une activation cellulaire pouvant se traduire par une sécrétion d'IL-5 (Dubucquoi 1994).

## **B. Macrophages et cellules dendritiques**

### **a) Les macrophages de la lamina propria**

Après leur recrutement tissulaire, les monocytes se transforment en macrophages sous l'influence de médiateurs locaux. Les macrophages sont avant tout des phagocytes qui, contrairement aux neutrophiles, s'avèrent capables de digérer non seulement des débris cellulaires mais également des bactéries entières. Les macrophages activés présentent de très nombreuses vésicules lysosomiales et produisent également des radicaux oxygénés ainsi que toute une série de médiateurs de l'inflammation (pour revue: Gordon 1995). En effet, les macrophages représentent une source majeure de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. Par leur capacité à produire des cytokines, dont l'IL-12 notamment, ainsi que par leur rôle de cellule présentatrice d'antigène, les macrophages sont amenés à jouer un rôle central dans l'immunité muqueuse (Gordon 1995).

Alors que les monocytes nouvellement recrutés se caractérisent par l'expression de CD14, les macrophages de la *lamina propria* n'expriment que très faiblement CD14 (Grimm 1995). Lors d'inflammations, cette population résidente CD68<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> reçoit l'apport de macrophages non différenciés CD68<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>. Alors que les macrophages résidents expriment préférentiellement la molécule costimulatrice CD86 (B7.2), cette nouvelle population macrophagique voit son expression membranaire de CD80 (B7.1) augmentée (pour revue: Brandtzaeg 1997). En outre, elle est stimulable par le dérivé bactérien LPS via son récepteur CD14 et pourrait contribuer à la stimulation des lymphocytes T naïfs recrutés parallèlement. Un modèle du rôle hypothétique que pourrait jouer ces deux populations macrophagiques dans la muqueuse intestinale est présenté dans la figure suivante (Brandtzaeg 1997).

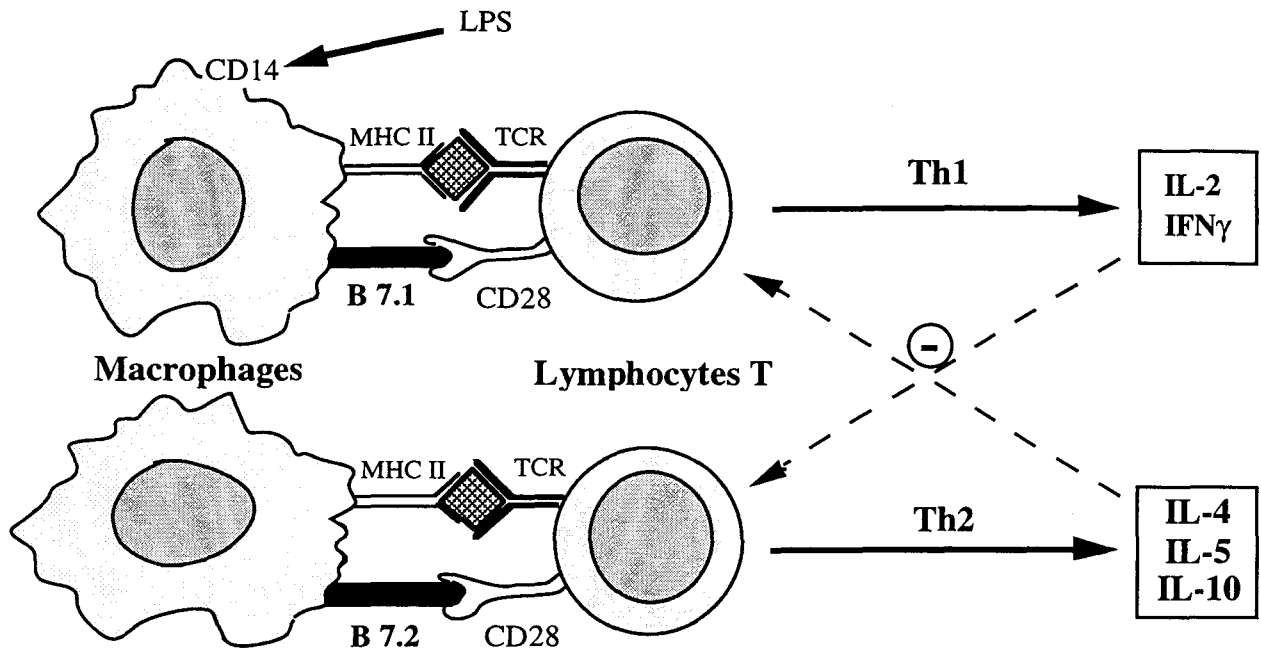


Figure 7: Schéma hypothétique, représentant les conditions de stimulation des macrophages muqueux et l'induction de profils de type 1 ou de type 2.

### b) Les cellules dendritiques

Les macrophages et les cellules dendritiques sont les principales cellules présentatrices d'antigènes de la muqueuse intestinale. Ils sont localisés directement sous l'épithélium ainsi qu'au niveau des FL. Ces 2 types cellulaires ont une origine commune et se différencient à partir d'un précurseur myéloïde commun (pour revue: Hart 1997). L'absence de marqueur spécifique des cellules dendritiques a longtemps été un obstacle à toute étude *in situ*.

La notion de cellules dendritiques regroupe toute une série de cellules ayant évoluées sous l'influence de facteurs locaux vers des cellules morphologiquement et phénotypiquement fort diverses. En fonction de leur localisation, on distingue ainsi : les cellules de Langerhans (peau), les cellules interdigitées (thymus), les cellules folliculaires dendritiques (FL)... Mais ces cellules se montrent toutes d'une grande efficacité en tant qu'APC. Il en va de même des cellules dendritiques de la *lamina propria* qui devraient donc jouer un rôle clé tant dans le maintien de la tolérance que dans la stimulation lymphocytaire, sans doute après expression membranaire de molécules de costimulation (Mowat 1997).

Les cellules folliculaires dendritiques ne semblent pas dériver de précurseurs myéloïdes (Hart 1997) et diffèrent phénotypiquement ( $CD3^- CD4^+ CD11c^+ HLA-DR^+$ ) des cellules dendritiques présentes dans la *lamina propria* (Grouard 1996). En outre, les cellules folliculaires dendritiques ont la capacité de présenter le même antigène pendant une longue période permettant ainsi une restimulation de certains lymphocytes folliculaires. Cette présentation doit s'accompagner d'une costimulation (ex : CD40 / CD40-ligand) qui va déterminer le devenir des centroblastes, qui vont se différencier soit en cellules B mémoires, soit en plasmocytes à IgA ou IgM (Pulendran 1997).

### C. Les mastocytes

Leur ressemblance et la présence d'histamine dans leurs granules a longtemps laissé croire que les mastocytes étaient des basophiles tissulaires. Il n'en est rien. Les granules des mastocytes s'avèrent dépourvus de cristaux de Charcot-Leyden (figure 7). En fonction des composés présents dans leurs granules, on distingue les mastocytes de la peau ayant de la tryptase et de la chymase ( $MC_{TC}$ ), des mastocytes muqueux dépourvus de chymase ( $MC_T$ ) (Aldenberg 1994).

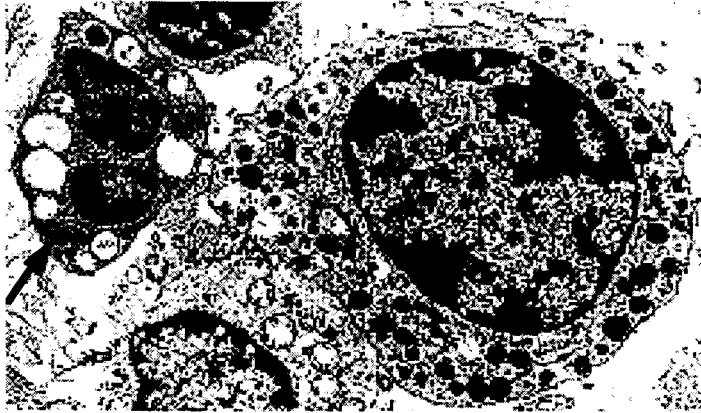


Figure 7: Comparaison entre un **basophile** partiellement dégranulé (à gauche) et un **mastocyte** (à droite). La flèche indique un cristal de Charcot-Leyden. Une image de microscopie électronique (grossissement x 7000), prise après une ileostomie sur un patient atteint d'une RCH (d'après Dvorak 1992).

Issus de la moelle osseuse, les  $MC_T$  sont constitutivement présents dans la paroi de l'intestin. Ils sont regroupés autour des vaisseaux ou sont en contact étroit avec les nerfs (McKay 1994). Sous l'influence de facteurs de croissance, les mastocytes continuent à se différencier localement. Ils sont capables de produire de nombreuses enzymes, des métabolites de l'acide arachidonique, des amines (histamine, héparine), des neuromédiateurs (Substance P, VIP, Somatostatine), des cytokines et des chimiokines (pour revue: Bradding 1996; Möller 1998).

Les mastocytes jouent un rôle clef dans le déclenchement de la réponse immunitaire, non seulement dans les réactions d'hypersensibilité immédiate puisqu'ils sont stimulables par l'IgE et synthétisent de l'IL-4 comme les éosinophiles et les basophiles, mais également comme premier rempart contre une invasion parasitaire ou bactérienne (Klaus 1996). En effet, les mastocytes sont à l'origine de chimiokines capables de recruter des phagocytes (neutrophiles et monocytes) ainsi que des lymphocytes (Rumsaeng 1997). En outre, en réponse à une activation, ils peuvent également modifier certaines fonctions de l'épithélium intestinal comme la sécrétion de mucus ou la réabsorption de l'eau et du chlore (Marshall 1994).

### D. Les granulocytes

Le terme couramment utilisé de polynucléaire prête à confusion, donnant à penser qu'il y aurait plusieurs noyaux, alors qu'en réalité le noyau est unique bien que polylobé. Nous lui préférons le terme de granulocytes. Comme leur nom l'indique, les granulocytes possèdent de nombreux granules permettant de les différencier. En fonction de la réaction de ces granules à divers colorants histologiques, on distingue : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles.

### a) Les neutrophiles

Les neutrophiles sont des phagocytes représentant 50 à 70% des leucocytes sanguins. Peu présents physiologiquement dans la muqueuse intestinale, les neutrophiles sont, lors de la phase aiguë de l'inflammation, massivement recrutés dans la *lamina propria* sous l'influence de chimiokines (IL-8, GRO, ENA-78), de composés issus de la dégradation de membranes bactériennes (fMLP) ou de l'action du complément (C5a). Le complément est surtout impliqué dans l'opsonisation des agents pathogènes phagocytés. Cette phagocytose entraîne souvent la mort cellulaire du neutrophile par apoptose. Les débris sont ensuite à leur tour phagocytés par des macrophages.

Les bactéries envahissant la muqueuse intestinale sont phagocytées par les neutrophiles avant d'être lysées par les nombreuses enzymes libérées lors de la dégranulation. En effet, chez les neutrophiles matures, quatre types de vésicules ont été décrits (pour revue: Borregaard 1997):

- Les granules primaires, aussi appelés **granules azurophiles** en raison de la coloration de l'acide mucopolysaccharidique par le colorant basique azure A. Ces granules renferment des hydrolases acides et des substances antibactériennes comme les défensines. La **myéloperoxidase** (MPO), utilisée comme marqueur de ces granules, est impliquée dans la transformation des radicaux libres oxygénés en anions hypochlorides à haut pouvoir bactéricide.
- Les granules secondaires, ou encore **granules spécifiques**, se caractérisent par la présence de **lactoferrine**, de collagénase et de lysosyme.
- Les granules tertiaires se distinguent par la présence importante de **gélatinase**.
- Les vésicules sécrétoires qui ne contiennent que des protéines plasmiques et qui servent de réservoir, rapidement mobilisable, de protéines membranaires (molécules d'adhérences, récepteurs du C3a et C5a, du LTB<sub>4</sub>, du fMLP, de certaines cytokines et CXC chimiokines...).

### b) Les éosinophiles

Aisément reconnaissables grâce à leur noyau bilobé ainsi que par leurs granules qui réagissent à l'éosine, les éosinophiles ne possèdent qu'un faible pouvoir de phagocytose. Mais comme les neutrophiles, ils peuvent libérer des radicaux libres oxygénés et relarguer le contenu de leurs granules dans le milieu extérieur, causant ainsi une partie des dégâts tissulaires concomitants à l'inflammation (Dvorak 1980).

Les granules primaires contiennent de la lysophospholipase qui forme le cristal de Charcot-Leyden. Les granules secondaires, majoritaires, sont caractéristiques de l'éosinophile et sont riches en protéines cationiques. La protéine basique majeure (**MBP**) est retrouvée associée au **crystalloïde** central, alors que la peroxydase (**EPO**), la protéine cationique (**ECP**) et la neurotoxine (**EDN**) sont localisées au niveau de la matrice environnante (Dvorak 1994). D'autres types de granules ont été décrits chez l'éosinophile : des petites vésicules riches en enzymes lysosomiales, et d'autres en composés lipidiques comme l'acide arachidonique, un composé essentiel à la formation des leukotriènes. Ces différents types de granules et de vésicules renferment également toute une panoplie de chimiokines et de cytokines inflammatoires et immunorégulatrices que les éosinophiles sont capables de produire (pour revue: Desreumaux et Capron 1996a; Hirai 1997; Dubucquoi et Capron 1998).

Produits dans la moelle osseuse, les éosinophiles sanguins ne représentent chez l'homme que 1% du pool total des éosinophiles. Après un bref séjour dans le sang où ils ne représentent que 1 à 5% des leucocytes circulants chez le sujet sain, les éosinophiles humains migrent vers les tissus et tout particulièrement les muqueuses. Contrairement aux neutrophiles, les éosinophiles sont normalement présents dans la *lamina propria* principalement autour des vaisseaux.

Les éosinophiles jouent un rôle dans les manifestations allergiques (Desreumaux et Capron 1996a), dans la défense antiparasitaire et dans certaines réponses inflammatoires chroniques. L'action antiparasitaire des éosinophiles passe notamment par des réactions cytotoxiques médiées par les anticorps (ADCC = antibody-dependent cytotoxicity). Dans le cas d'une infection par *Schistosoma mansoni*, les anticorps opsonisants sont principalement des IgE (pour revue: Capron 1986). Après fixation des anticorps sur le parasite, leur partie constante sera reconnue par les éosinophiles grâce à leurs récepteurs de faible (FcεRII) et de forte affinité (FcεRI) pour l'IgE (Soussi-Gounni 1994, 1998). Outre les macrophages (Capron 1975), les anticorps IgG activent également des éosinophiles (Butterworth 1975) tout comme les IgA (Capron 1988). Les éosinophiles activés libèrent alors les composés de leurs granules, hautement toxiques pour les schistosomules.

En dehors des pathologies parasitaires à helminthes et de la gastroentérite à éosinophiles (Desreumaux 1996b), les éosinophiles restent peu étudiés dans le tube digestif (pour revue: Desreumaux (thèse); Furuta 1995). Il n'est d'ailleurs pas exclu qu'une partie des gastroentérites à éosinophiles puisse avoir une origine parasitaire, comme le suggère une étude impliquant *Ancylostoma caninum* (Croese 1994).

Dans la maladie coeliaque, l'infiltrat en éosinophiles semble spécifique de la maladie comme en témoigne, lors de régime sans gluten, la diminution du nombre d'éosinophiles parallèlement à la régression des atrophies villositaires (Marsh 1985). Dans le cas des MICI, l'éosinophilie muqueuse est plus modérée et elle accompagne d'autres signes cliniques et histologiques qui eux sont caractéristiques de la maladie. Ceci dit, la présence d'amas d'éosinophiles au niveau de l'épithélium, de la sous-muqueuse, de la musculuse et de la séreuse est considérée comme pathologique (Furuta 1995; Wardlaw 1995). Or les éosinophiles semblent participer aux dégâts tissulaires observés dans ces pathologies par libération de certaines de leurs protéines cationiques : MBP, ECP, EPO, EDN (Wardlaw 1995). Dans le cas de la maladie coeliaque des dépôts extracellulaires d'ECP et de MBP ont été observés au niveau de la *lamina propria* (Hällgren 1989; Talley 1992). Des éosinophiles montrant des signes de dégranulation ont également été mis en évidence dans les MICI (Dvorak 1980, 1993). Des taux élevés de protéines cationiques ont d'ailleurs été mesurés dans les fluides intestinaux de patients atteints de MICI (Levy 1997).

### c) Les basophiles

Représentant moins de 0.5% des leucocytes sanguins, les basophiles jouent un rôle important dans les inflammations d'origine allergique (hypersensibilité immédiate) comme en témoigne la présence membranaire du récepteur de forte affinité de l'IgE ainsi que leur capacité de synthétiser différentes cytokines dont l'IL-4. Outre ces similitudes, les basophiles et les éosinophiles partagent un certain nombre d'autres caractéristiques (pour revue: Hirai 1997). Issue d'un précurseur hématopoïétique commun (Denburg 1985), ils présentent des ressemblances ultrastructurales comme la présence, au niveau de leur granules primaires, de

cristaux de Charcot-Leyden (Dvorak 1994). Mais en dehors de quelques protéines communes comme la MBP, les granules de basophiles renferment surtout de l'**histamine**, qui prend une coloration violacée en présence de colorants basiques.

Après sécrétion par les basophiles ou les mastocytes, l'histamine va agir sur les cellules environnantes par l'intermédiaire de 3 types de récepteurs (H1, H2 et H3). Si H3 participe au rétrocontrôle, en inhibant toute synthèse et sécrétion d'histamine, H2 contribue à la sécrétion de mucus mais aussi d'acides gastriques. Le récepteur H1 stimulent la contraction des muscles lisses et le chimiotactisme des leucocytes tout en augmentant la perméabilité des veinules postapillaires.

## Chapitre II : LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN (M.I.C.I.)

### 1. Généralités sur les MICI

#### 1.1 Définitions

Les maladies ne développant qu'une inflammation aiguë transitoire sont d'origine bactérienne, virale, parasitaire ou allergique. Leurs étiologies sont relativement bien caractérisées, contrairement aux **maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)**. Celles-ci évoluent par poussées successives entrecoupées de périodes de rémission. Les MICI regroupent deux grandes pathologies digestives : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH).

#### A. La maladie de Crohn (MC)

Bien qu'identifiée depuis plusieurs siècles (Kirsner 1997), c'est la publication en 1932, par Burril B. Crohn, L. Ginzburg et G.D. Oppenheimer, de la description d'une nouvelle pathologie digestive qui a conduit à la reconnaissance internationale de la maladie de Crohn en tant que telle (Crohn 1932). Son diagnostic clinique se basait déjà sur des symptômes comme la fièvre, des douleurs abdominales, de la diarrhée et une perte de poids.

Considérée à l'époque comme une maladie ne touchant que des patients jeunes, la MC peut se déclarer également chez des adultes plus âgés (figure 7). Bien qu'étant principalement une atteinte de l'iléon terminal, la MC peut toucher n'importe quelle partie du tube digestif, de la bouche à l'anus.

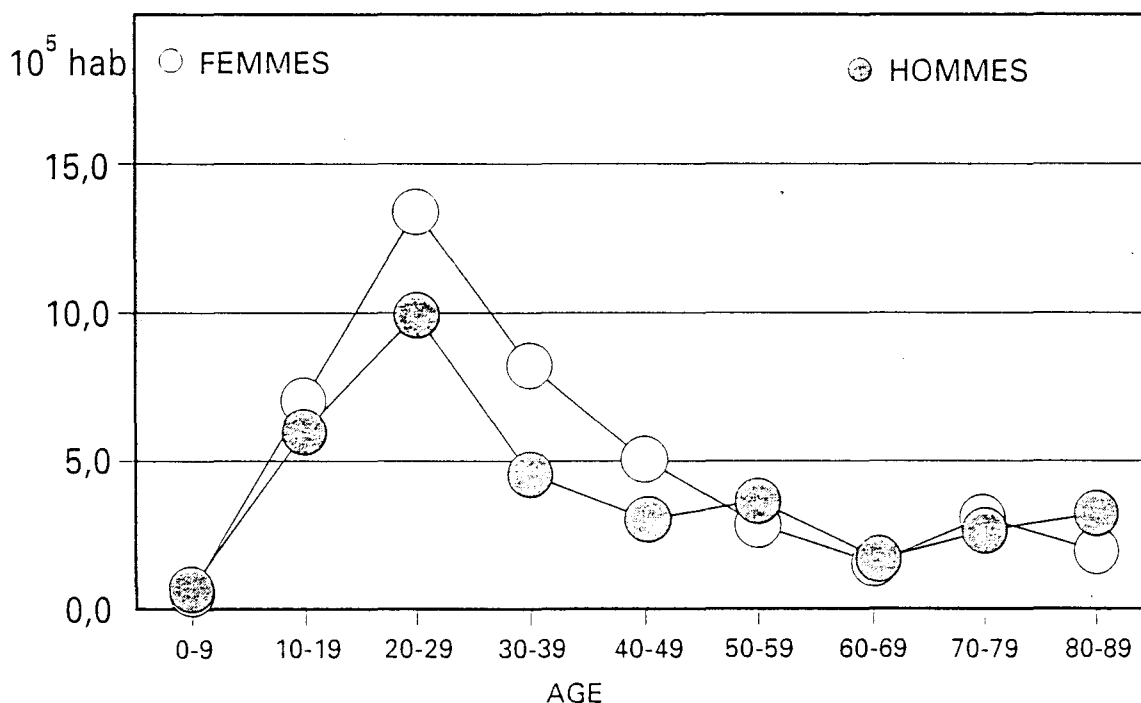


Figure 7: Incidence de la maladie de Crohn dans la Région Nord-Pas-de-Calais-Somme en fonction du sexe et de l'âge des patients (1988-1990) (d'après Colombel 1993).

**B. Comparaison entre la MC et la RCH** (tableau 3)

Décrite en 1935 par Busson, Rachet et Hillemand, la RCH progresse du rectum vers le côlon et s'accompagne d'hémorragies d'où son nom. Les atteintes de la RCH sont moins graves que dans la MC. Les ulcérations ne se rencontrent que dans les formes sévères. Une hypervascularisation, accompagnée d'abcès cryptiques et d'une altération de l'épithélium, conduisent à des saignements fréquents.

Contrairement à la RCH, les ulcérations dans la MC sont moins régulières et plus profondes débouchant sur une inflammation transmurale. Les ulcérations de la MC prennent souvent un aspect longitudinal. Les sténoses sont fréquentes et les fistules ne sont pas rares. Des granulomes tuberculoïdes sont souvent observés.

A



B



Figure 8: Photos de pièces opératoires de patients souffrant de la MC : (A) Atteinte iléale avec sténose longitudinale et épaissement pariétal, (B) Aspects en pavés des lésions coliques (d'après Colombel 1993).



Tableau 3: Maladie de Crohn et RCH : les signes distinctifs (d'après Colombel 1993).

	Maladie de Crohn	Rectocolite hémorragique
Données cliniques <ul style="list-style-type: none"> <li>- douleurs abdominales</li> <li>- rectorragies</li> <li>- masse abdominale</li> <li>- fièvre</li> </ul>	quasi constantes rares possible fréquente	rare quasi constantes non très rare
Données morphologiques et topographiques <ul style="list-style-type: none"> <li>- aspect macroscopique des lésions</li> <li>- intervalles de muqueuse saine</li> <li>- atteinte pariétale</li> <li>- fistules</li> <li>- localisations des lésions <ul style="list-style-type: none"> <li>- lésions rectales</li> <li>- lésions anopérinéales</li> <li>- lésions iléales</li> </ul> </li> <li>- lésions œso-gastro-duodénales</li> </ul>	polymorphe  oui  profonde, transmurale possible (10-15 %) de la bouche à l'anus, plurisegmentaire inconstantes (50 %) très fréquentes fréquentes (30 %)  possibles	monomorphe  non  superficielle  non rectocolique, d'un seul tenant  constantes très rares exceptionnelles (« iléite de reflux ») jamais
Données endoscopiques <ul style="list-style-type: none"> <li>- ulcérations aphtoïdes</li> <li>- ulcérations linéaires, serpiginieuses ou longitudinales</li> <li>- ulcérations superficielles</li> <li>- ulcérations larges</li> <li>- érythème muqueux</li> <li>- friabilité muqueuse</li> <li>- vascularisation muqueuse</li> <li>- pétéchies</li> <li>- saignement</li> <li>- aspect granuleux</li> <li>- aspect pavimenteux</li> <li>- sténose</li> </ul>	caractéristiques fréquentes  fréquentes fréquentes variable rare normale rares rare peu fréquent caractéristique fréquente	absentes rares  parfois formes sévères marqué fréquente anormale fréquentes fréquent fréquent absent rare
Données histologiques <ul style="list-style-type: none"> <li>- inflammation</li> <li>- hypervascularisation</li> <li>- œdème sous-muqueux</li> <li>- ulcérations fissuraires</li> <li>- abcès cryptiques</li> <li>- sécrétion de mucus</li> <li>- granulome tuberculoïde</li> </ul>	transmurale  non ou modérée marqué oui inconstants peu ou pas altérée fréquent	muqueuse et sous-muqueuse intense modéré non très fréquents très altérée jamais
Données évolutives <ul style="list-style-type: none"> <li>- récidives post-chirurgicales</li> </ul>	habituelles	jamais

## 1.2 Diagnostic et traitements de la MC

### A. Diagnostic

Grâce à un diagnostic de plus en plus précoce et à l'amélioration de la prise en charge, la mortalité est actuellement inférieure à 10 cas pour 1 million sur un an et touche surtout des patients âgés ou ayant mal supporté l'intervention chirurgicale. Certaines études suggèrent même que la mortalité des patients atteints de MC ne diffère guère de celle de la population générale (Ekblom 1992).

Malheureusement, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement spécifique de la RCH ou de la MC. Dans un premier temps, il a fallu établir des critères précis permettant d'évaluer la sévérité des atteintes, afin de pouvoir comparer l'efficacité des divers traitements palliatifs (Wood 1996). Dans le cas de la MC, la plupart des études s'appuient sur le **CDAI** (Crohn's Disease Activity Index) basé sur l'indice d'activité proposé par Best (Best 1976). Malgré une faible corrélation entre les observations endoscopiques et l'indice d'activité qui pêche par la subjectivité de certains de ses critères (sensation de bien-être du patient), un score inférieur à 150 est considéré comme synonyme de rémission.

### B. Les traitements actuels

Les traitements destinés à lutter contre les poussées inflammatoires de la MC sont de trois ordres (pour revue: Colombel 1993; Bonnet 1996; Wood 1996) :

- les médicaments immunosuppresseurs ou anti-inflammatoires
- l'assistance nutritionnelle
- la chirurgie (en dernier recours)

#### a ) Les médicaments

Parmi les nombreux médicaments utilisés pour combattre les poussées de la MC, on distingue principalement :

- les **corticoïdes**
- les **dérivés salicylés**
- les **immunosuppresseurs**

- les corticoïdes (prednisone, prednisolone, budésonide...) :

Ils constituent le traitement le plus efficace des poussées d'intensité moyenne à sévère et ce, quelle que soit la localisation de la maladie. La corticothérapie entraîne rapidement une rémission clinique et s'étale sur plusieurs mois en utilisant des doses décroissantes. Une corticodépendance apparaît chez 1 patient sur 5. En outre, la corticothérapie ne débouche pas sur une rémission prolongée.

- les dérivés salicylés (sulfasalazine, mésalazine...)

Moins efficaces mais mieux tolérés que les corticoïdes, les composés à base d'acide 5-aminosalicylique (**5-ASA**) ne sont utilisés que lors des poussées de faible intensité. L'effet le moins controversé de la mésalazine est sa capacité à réduire les récurrences endoscopiques postopératoires.

- les immunosuppresseurs (azathioprine, méthotrexate, cyclosporine)

En cas de corticodépendance, l'azathioprine permet de prolonger la rémission tout en arrêtant la corticothérapie. Agissant beaucoup plus rapidement que l'azathioprine (quelques jours au lieu de plusieurs mois), l'utilisation de la cyclosporine, en raison d'effets secondaires importants, est limitée aux formes sévères et corticorésistantes de MC.

Devant les résultats limités de ces médicaments, de nouvelles approches sont en cours d'investigation (Murthy 1997). Toutes ont pour objectif de limiter les effets indésirables d'une inflammation, en s'attaquant par exemple :

- aux cytokines pro-inflammatoires grâce à des anticorps (anti-TNF $\alpha$ ) ou par l'intermédiaire de cytokines anti-inflammatoires (IL-1RA, IL-10).
- aux molécules d'adhérence (anti ICAM-1) et aux chimiokines (anti IL-8)
- aux composés responsables des dégâts tissulaires (NO, ROM, protéases)
- aux neuropeptides locaux : bradykinines, tachykinines et neurokinines
- en amont :
  - aux facteurs de transcription (NF-KB)
  - aux bactéries (Antibiotiques : metronidazole + ciproflaxine)

### **b) Les thérapies nutritionnelles**

La nutrition artificielle par voie entérale ou parentérale permet surtout de traiter les effets de la dénutrition particulièrement sensible chez les adolescents. Bien qu'efficace et dépourvue d'effets secondaires, la lourdeur de la prise en charge restreint cette technique aux formes sévères et corticorésistantes de MC. Les bénéfices sont transitoires, mais ils permettent entre autres une bonne préparation des patients à l'intervention chirurgicale.

### **c) L'intervention chirurgicale**

Le recours à la chirurgie, bien que limité aux formes les plus graves, sera malheureusement nécessaire au moins une fois au cours de la vie de tout patient souffrant de MC (Quandalle 1996). Contrairement à la RCH et en raison d'une localisation des atteintes pouvant s'étendre à l'ensemble du tube digestif, la chirurgie ne peut espérer guérir la MC. En effet, les cas de récurrence endoscopique dépassent déjà les 50% après 3 mois (Rutgeerts 1990).

## **2. Théories sur l'origine et la chronicité des MICI**

Tout développement d'un vrai traitement des MICI, spécifique de la MC ou de la RCH, pose comme préalable la connaissance de l'étiologie de ces maladies. Or celle-ci est encore inconnue. La raison en incombe principalement à la multiplicité des facteurs qui sont susceptibles d'être impliqués dans le déclenchement et la chronicité des MICI. Ces facteurs peuvent être classés en trois grands groupes :

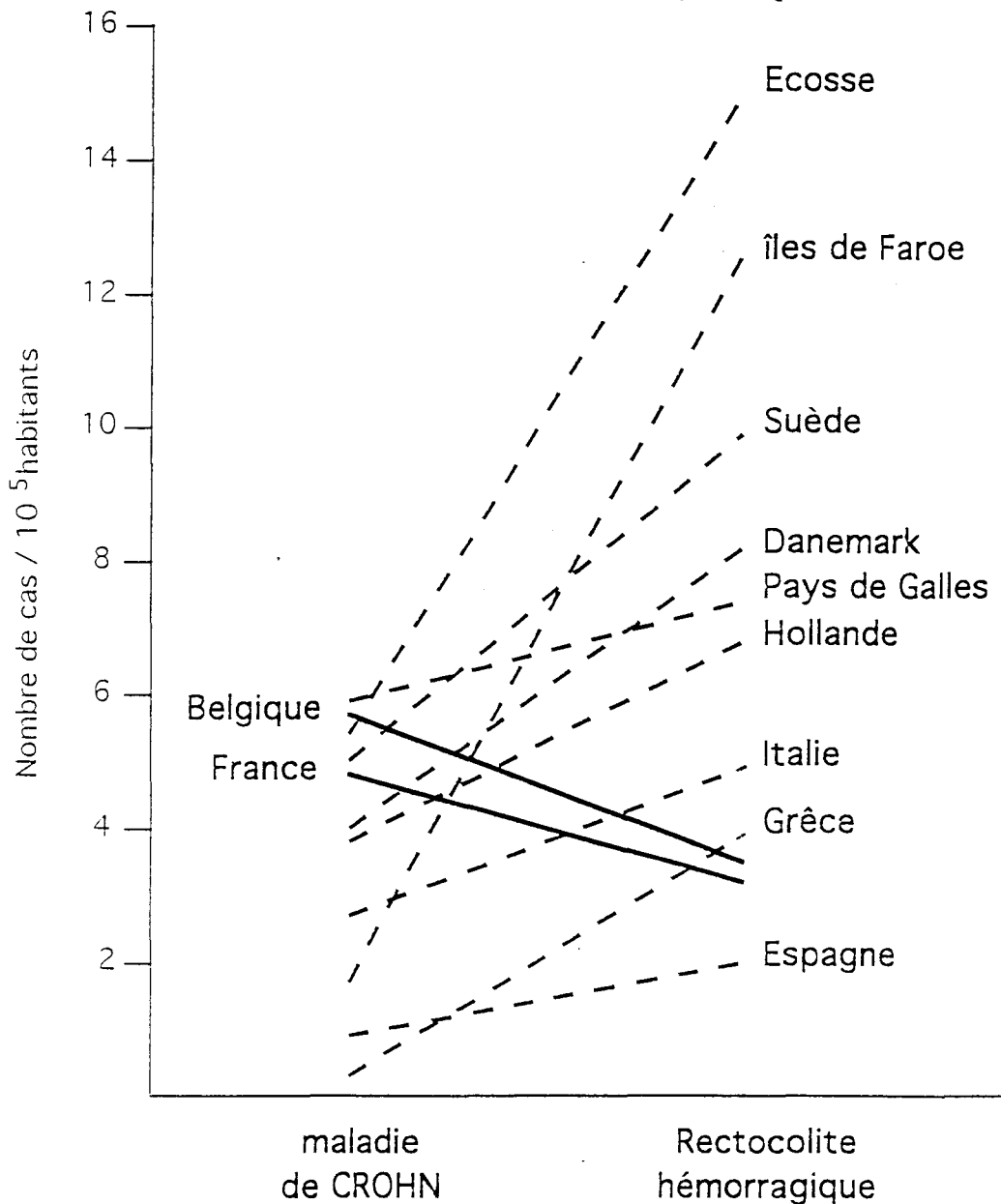
- les facteurs environnementaux
- les facteurs d'ordre génétique
- les facteurs immunologiques

## 2.1 Les facteurs environnementaux

### A. Etudes épidémiologiques

Les arguments en faveur de l'intervention de facteurs environnementaux dans la survenue des MICI sont basées sur des études épidémiologiques (Russel 1996; Colombel 1997). Ainsi, l'incidence des MICI est plus fréquente dans l'hémisphère Nord que dans l'hémisphère Sud (Mayberry 1980). De plus, tant en Amérique (Sonnenberg 1991) qu'en Europe (Shivananda 1996), cette incidence est plus forte dans les régions nordiques, suggérant l'existence d'un gradient Nord-Sud. Si l'incidence de la RCH n'a que peu évolué ces quarante dernières années, les cas de MC n'ont cessé de croître (Barton 1989, Russel 1996), dépassant même parfois le nombre de RCH (figure 9). Ainsi, contrairement aux autres pays européens, le nord de la France (Gower-Rousseau 1994) et la Belgique (VanGossum 1996) forment une région où la MC est plus fréquente que la RCH. Ainsi, il existe des variations géographiques de l'incidence des MICI, couplée à une évolution au cours du temps qui impliqueraient des facteurs environnementaux.

Figure 9 : Incidence de la MC et de la RCH en Europe (d'après Colombel 1997).



En outre, des cas où le conjoint d'un patient souffrant de MC développe également la maladie à quelques années d'intervalle ont été rapportés dans le nord de la France (Comes 1994). Avec le doublement des cas de MC dans la communauté indienne immigrée en Angleterre (Jayanthi 1992) et l'incidence accrue en Israël de la MC chez les juifs originaires d'Europe ou des Etats Unis (Rozen 1979), ces études s'accordent toutes à incriminer des facteurs environnementaux dans la survenue de la MC.

Les facteurs environnementaux peuvent être classés en deux groupes : les facteurs non infectieux liés au mode de vie (tabac, alimentation, stress, pilule contraceptive...) et les agents infectieux (viraux et bactériens).

## **B. Les facteurs non infectieux**

### **a) Le tabac**

Le rôle du tabac dans l'apparition et l'aggravation de la MC est maintenant bien établi (Cosnes 1996; Thomas 1998). Il augmente notamment la fréquence des poussées et le risque de réintervention après chirurgie (Sutherland 1990; Cottone 1994). Le rôle du tabagisme passif reste très discuté, tout comme le rôle protecteur du tabac dans la RCH. En effet, le tabagisme semble diminuer le risque de survenue de la maladie chez les fumeurs, alors que ce risque est maximal pour les ex-fumeurs dans les cinq ans suivant l'arrêt du tabac (Tysk 1992). Les mécanismes d'action du tabac sont encore mal connus. Parmi les milliers de composés chimiques présents dans la fumée de cigarette, la nicotine est à ce jour la substance la plus étudiée. Son accumulation est plus importante dans l'intestin que dans les poumons. Des études ont impliqué la nicotine dans des altérations de la synthèse du mucus, de la perméabilité intestinale, de la vascularisation ainsi que du système immunitaire intestinal. La nicotine inhibe la synthèse de cytokines proinflammatoires *in vitro* et *in vivo* dans la muqueuse intestinale colique de souris (VanDijk 1995). Une étude récente portant sur des patients atteints de MC a mis en évidence des niveaux d'IL-8 plus faibles chez les fumeurs (Sher 1996). A l'inverse, les fumeurs présentent une production accrue d'IL-4 par les PBMC, associée à une augmentation d'IgE sérique (Byron 1994).

### **b) La pilule contraceptive**

La légère prévalence des cas de MC chez les femmes (figure 7) a entraîné des études ces dernières années sur les effets des contraceptifs oraux (Katschinski 1993; Godet 1995). Or il ne semblerait pas que la prise d'oestrogénostatifs augmente le risque de MC. Pas plus que le déroulement d'une grossesse d'ailleurs, dont il est préférable néanmoins qu'elle débute lors d'une période de rémission de la MC (Bonnet 1996). Par contre, à l'instar du tabac, la prise de la pilule semble augmenter le risque de récurrence postopératoire dans la MC (Timmer 1998).

### **c) Alimentation et stress**

La plupart des études se révèlent contradictoires. Il semblerait néanmoins que la MC pourrait être liée à une alimentation riche en sucres et surtout en graisses (type « fast food ») et qu'à l'inverse une alimentation riche en fibres diminuerait le risque relatif (Russel 1996).

L'idée largement répandue que la survenue d'une MC serait liée à des événements de vie comme le stress a été invalidée ces dernières années par plusieurs études (Russel 1996).

## **C. Les agents infectieux**

### **a) La flore intestinale**

Plusieurs expériences ont mis en cause la flore bactérienne dans la survenue de lésions intestinales de MC (Colombel 1997). Les modèles de souris invalidées pour le gène de l'IL-2 ou de l'IL-10 développent spontanément une inflammation intestinale. Dans des conditions dites « germ free » c.à.d. dépourvues d'une flore propre, ces souris ne présentent plus ces lésions inflammatoires. Chez l'homme, après résection iléocolique, une récurrence endoscopique à un an est observée dans 7 cas sur 10 (Rutgeerts 84). Lorsque l'anastomose est protégée du flux fécal, suite à un pontage déviant le flux intestinal, aucune récurrence n'est observée. Par contre, des nouvelles lésions apparaissent peu après le rétablissement du flux normal.

La flore endogène (*Escherichia coli*, *Bacteroides vulgatus*) est soupçonnée. L'administration d'antibiotiques est d'ailleurs préconisée dans la MC, bien qu'aucune étude n'ait démontré une réelle efficacité (VanKruiningen 1995). A ce jour, aucune différence dans la composition de cette flore endogène n'a pu être mise en évidence entre patients et sujets contrôles.

L'hypothèse la plus séduisante est une réponse immunitaire anormale à des éléments de la flore endogène. Le rôle de la flore serait donc secondaire à un événement primitif entraînant une dérégulation du système immunitaire local.

### **b) Les bactéries pathogènes**

Certaines études ont impliqué des bactéries pathogènes (*Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes*). De nouvelles études n'ont pas confirmé la présence de *Mycobacterium paratuberculosis* dans les lésions de MC, à l'exception de quelques cas isolés (Colombel 1997). *Listeria monocytogenes* semble être un candidat plus prometteur. Dans une étude récente par immunohistochimie, *Listeria*, absente dans les tissus de témoins, a été détectée dans 75% des lésions de MC au niveau des follicules lymphoïdes, des ulcères, des fistules, des abcès et dans des granulomes (Liu 1995). Il est néanmoins peu probable qu'un seul agent infectieux, quel qu'il soit, puisse être à l'origine de la MC.

### **c) Le virus de la rougeole**

Une hypothèse originale présentant le virus de la rougeole comme agent causal de la MC est défendue depuis plusieurs années par l'équipe de Wakefield. Dans un premier temps, des anomalies vasculaires ont été décrites pouvant entraîner des lésions multifocales débouchant sur une MC (Wakefield 1995).

Or le virus de la rougeole a été détecté au niveau de granulomes ainsi que dans des cellules endothéliales de patients atteints de MC (Lewin 1995). Des études épidémiologiques ont suggéré qu'une exposition précoce au virus, périnatale voire même in utero (Ekbohm 1996), pouvait accroître le risque de développer une MC. Les campagnes de vaccination ont été également incriminées (Thompson 1995). Mais les résultats de cette équipe n'ont pu être confirmés, tant sur le plan de la détection du virus (Liu 95, Haga 96) qu'au niveau des études épidémiologiques (Jones 1997).

## **2.2 Les facteurs génétiques**

### **A. Les données épidémiologiques**

Les arguments en faveur de l'implication de facteurs génétiques dans la MC, reposent sur plusieurs observations. Ainsi les études épidémiologiques suggèrent que l'appartenance ethnique (ex: juifs askhénazes) pourrait influencer sur l'incidence de la maladie. Les cas d'agrégation familiale sont encore plus convaincants. En effet, le risque relatif de développer la MC est significativement plus important, si un parent du premier degré est déjà touché. En outre, dans les études portant sur des jumeaux mono et dizygotiques dont au moins l'un des deux souffrait de MC, 25 à 50% des vrai jumeaux étaient tous deux touchés, alors que le risque de développer une MC ne différait pas entre faux jumeaux et parents du premier degré. Ces résultats sont en faveur d'une composante génétique partielle dans la MC avec une transmission non mendélienne.

Après avoir écarté la possibilité que la MC soit causée par le déficit d'un seul gène, de nombreuses études se sont attachées à la mise en évidence de gènes susceptibles de jouer un rôle dans la survenue de la maladie. (Colombel 1997, Satsangi 1997).

### **B. Les études d'association**

Une première approche consiste à comparer les allèles d'un gène candidat chez des patients et des témoins sans considérer les liens familiaux éventuels. Les recherches d'un éventuel déséquilibre de liaison entre le marqueur génétique et le gène de prédisposition ont donné des résultats discordants (Colombel 1997). Ainsi, il est plus probable que les gènes HLA soient impliqués dans la survenue d'une RCH que d'une MC. Les résultats portant sur ICAM-1 sont négatifs et la possibilité que les gènes de TNF $\alpha$  ou IL-1RA puissent être impliqués reste controversée (Satsangi 1996a).

### **C. Les études de liaison**

Grâce aux progrès de la cartographie du génome humain et au concours d'un grand nombre de familles dont plusieurs membres souffrent de MC, des études de coségrégation entre marqueurs génétiques et gènes de susceptibilité ont pu être entreprises. Une première étude a permis l'identification d'une région située sur le **chromosome 16** (Hugot 1996). Ce locus de susceptibilité, nommé IBD1, a été confirmé par deux autres groupes (pour revue: Satsangi 1996b). Cette région comporte notamment les gènes du récepteur à l'IL-4, ainsi que l'intégrine CD-11. Mais ce locus n'interviendrait pas dans plus de 10% des cas de MC.

D'autres loci ont été identifiés sur les **chromosomes 3, 7 et 12** (Satsangi 1996b). Ils seraient impliqués dans la MC et la RCH, alors que le locus IBD1 est spécifique de la MC et les loci situés sur les chromosome 2 et 6 spécifiques de la RCH. La région du chromosome 7 comporte, entre autres, les gènes codant pour une mucine (MUC3), le facteur de croissance hépatocytaire (HGF) et le récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGF). Une cartographie précise de ces régions nécessite le recrutement d'un grand nombre de familles.

## 2.3 Les facteurs immunologiques

L'intestin est par nature un lieu important de contact entre l'organisme et les nombreux éléments du milieu extérieur susceptibles de peupler la lumière intestinale. Le système immunitaire muqueux intestinal (GALT) est donc constamment sollicité et une régulation fine s'avère nécessaire pour maintenir un équilibre entre la lutte contre les agents pathogènes et les effets inflammatoires indésirables. Dans la MC, cet équilibre est rompu. Cette dérégulation du système immunitaire muqueux implique toutes les populations cellulaires et plus fondamentalement la manière dont elles interagissent entre elles (Brandtzaeg 1997, Fiocchi 1997).

L'une des approches utilisées dans l'étude de la rupture de ces grands équilibres immunologiques, consiste à s'intéresser aux perturbations touchant à la synthèse des cytokines (Radford-Smith 1996). En effet, la dérégulation de la balance entre cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ) et anti-inflammatoires (IL-1RA, IL-10, TGF $\beta$ ) pourrait participer aux poussées inflammatoires ainsi que gérer leur intensité et leur durée. Tout comme les chimiokines d'ailleurs, directement impliquées dans le recrutement intestinal de nouvelles populations cellulaires (Rollin 1997).

L'expression de ces cytokines se trouve placée sous le contrôle des cytokines immunorégulatrices, classiquement divisées entre cytokines de type 1 (IFN $\gamma$ , IL-2) et cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-13). Celles-ci jouent un rôle important dans la susceptibilité aux agents infectieux (Lucey 1996). Par exemple, dans l'éventualité d'une infection par *Listeria monocytogenes* un profil de type 1 serait protecteur. D'autres types d'infection intestinale sont susceptibles d'être inhibées par un profil de type 2 (Lucey 1996), mais les limites de tels exemples seront explicités au chapitre suivant. En outre, les cytokines immunorégulatrices de type 2 sont également impliquées dans des mécanismes allergiques comme les allergies alimentaires. Ces cytokines jouent donc un rôle clé dans l'immunité muqueuse.



## Chapitre III : ETUDE DES CYTOKINES

### 1. Brève présentation de la famille des cytokines

#### 1.1 Définitions et terminologie

Les **cytokines** sont des molécules utilisées par les cellules pour communiquer entre elles (pour revue : Cavaillon 1996). Ce sont généralement des glycoprotéines qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaire, bien que certaines cytokines peuvent être ancrées dans la membrane (EGF, fractalkine...).

Au début des années 70, on parlait encore de lymphokines et de monokines en fonction de l'origine cellulaire de ces messagers moléculaires. Mais, cette distinction s'est rapidement montrée inexacte puisque des lymphocytes s'avéraient capable de produire des monokines et vice versa. Proposé en 1974, le terme de cytokine regroupait alors toute une série de substances biologiquement actives présentes dans des surnageants de culture. Après purification et caractérisation biochimique de ces cytokines, il s'est avéré que différentes activités biologiques étaient associées à chaque molécule. En 1979, l'appellation d'**interleukine** (IL-1 et IL-2) fut proposée afin de remettre un peu d'ordre dans la jungle des dénominations existantes. Mais toutes les ambiguïtés ne furent pas levées pour autant. C'est ainsi que le TNF $\alpha$  a gardé son nom d'origine, le présentant à tort comme une substance tumorale (tumor necrosis factor). Le développement des techniques de biologie moléculaire au cours des années 80 à permis de purifier, de cloner et de séquencer de nouvelles interleukines (au nombre de 18 actuellement).

Cette nouvelle nomenclature des interleukines n'est pas exempte de défauts non plus, puisque l'IL-8, isolée en 1988, est depuis devenue le premier membre d'une famille de petites cytokines caractérisée par leur pouvoir chimiotactique. En 1992, le terme de **chimiokine** (chemokine) fut adopté pour les désigner.

#### 1.2 Les différents types de cytokines

##### A. Les facteurs de différenciation et de croissance

Localisées dans la moelle osseuse chez l'adulte, les cellules souches hématopoïétiques sont la plupart du temps quiescentes. Sous l'influence de facteurs environnementaux, ces cellules souches totipotentes (SC-T) se différencieront en cellules souches pluripotentes (SC-P) caractérisées par l'expression membranaire du marqueur cellulaire CD34. Elles sont à l'origine des diverses lignées hématopoïétiques pouvant former des clones cellulaires et que l'on regroupe sous la dénomination *Colony Forming Unit* (CFU). Ces lignées cellulaires s'organisent en deux voies principales de différenciation (figure 10) :

- la **lignée lymphoïde**, qui va engendrer en présence d'IL-7 les lymphocytes B et T (CD4+/CD8+), ainsi que les cellules NK.
- la **lignée myéloïde** (CFU-GEMM), qui à partir d'un progéniteur mixte conduit aux mégacaryocytes/plaquettes, aux granulocytes/macrophages, ainsi qu'aux érythrocytes en présence d'Epo.

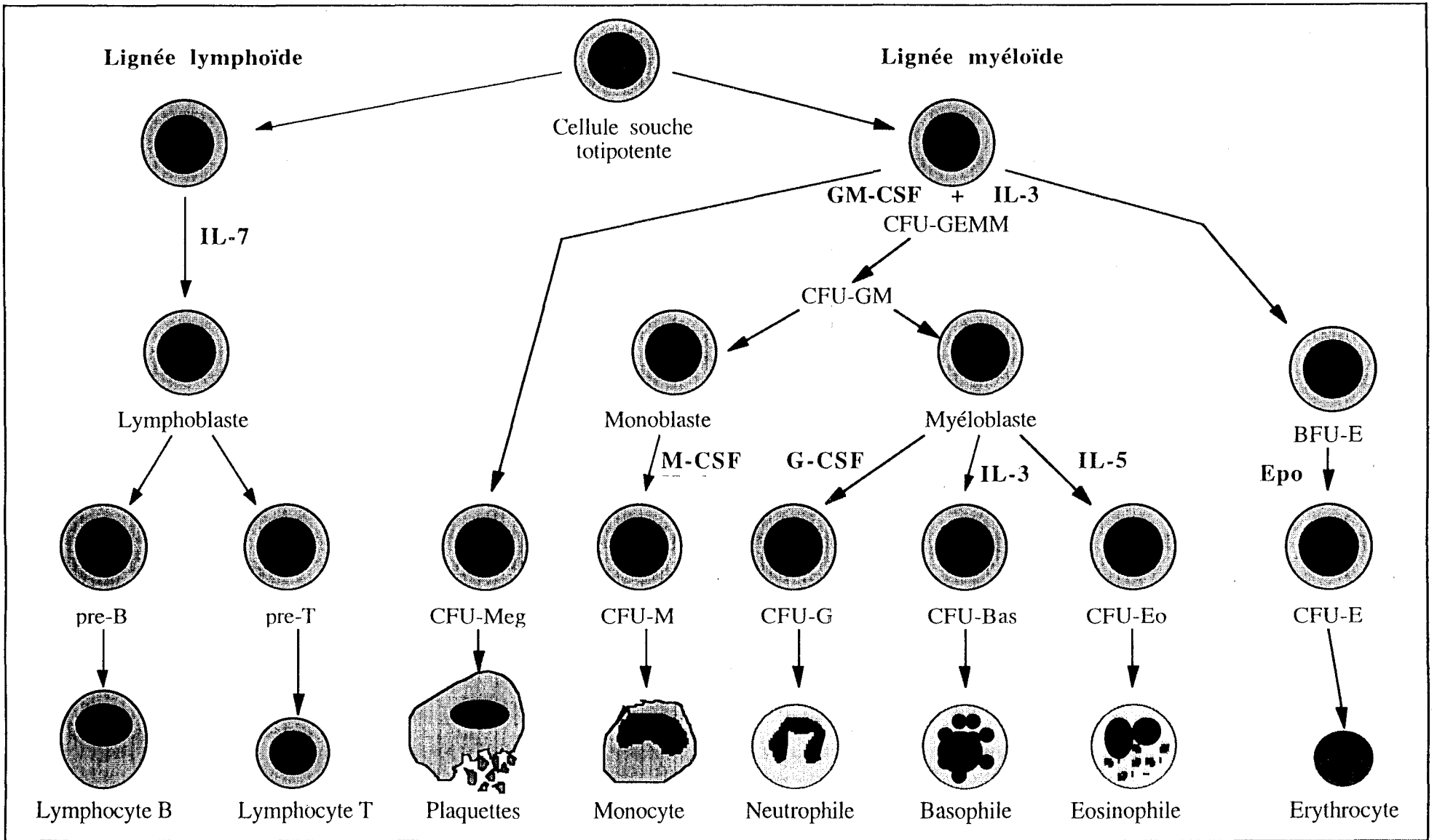


Figure 10 : **Les grandes étapes de l'hématopoïèse.** La croissance et la différenciation des cellules précurseurs se déroulent dans la moëlle osseuse, sous l'influence des cellules stromales et des facteurs de croissance environnants. (CFU et BFU = Colony / Burst forming units)

Le précurseur mixte granulocyte/macrophage (CFU-GM) peut se différencier soit en monoblaste aboutissant aux monocytes/macrophages, soit en myéloblaste conduisant aux granulocytes. Quatre CSFs ont été isolés et caractérisés: le Mix-CSF (IL-3), le GM-CSF (granulocyte/macrophage colony stimulating factor), le G-CSF et le M-CSF. Tous sont produits par des sources cellulaires multiples (lymphocytes T, macrophages, cellules endothéliales, éosinophiles...) et agissent de manière séquentielle sur les cellules pluripotentes. Le G-CSF et le M-CSF (produits par les fibroblastes) agissent sur les cellules plus matures en les soutenant respectivement dans leur différenciation en granulocytes et en monocytes/macrophages.

L'apport d'IL-5 semble spécifique et indispensable à la maturation des éosinophiles, tandis que l'IL-3 favoriserait la maturation des basophiles. Une co-culture de 7 à 10 semaines de cellules de sang de cordon avec des fibroblastes 3T3 aboutit à la formation de mastocytes tryptase<sup>+</sup> / chymase<sup>+</sup>, alors qu'en présence de c-kit ligand les mastocytes sont dépourvus de chymase (Ishizaka 1993).

## **B. Les cytokines immunorégulatrices**

La notion de profils de cytokines Th1 et Th2, établie pour la première fois sur des clones murins de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires (helper) en 1986 par Mosmann, a profondément modifié notre manière d'aborder la réponse immune. En effet lors d'agressions, le système immunitaire met en place une réponse spécifique à l'agent incriminé (parasites, bactéries, virus, allergènes...) par l'intermédiaire des lymphocytes T auxiliaires. Or les lymphocytes Th1, caractérisés par leur production d'IFN $\gamma$ , d'IL-2 et de lymphotoxine (TNF $\beta$ ), favorisent plutôt une réponse de type cellulaire, alors que les lymphocytes Th2, produisant de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-10 et de l'IL-13, favorisent eux une réponse humorale (tableau 4). C'est ainsi qu'une réponse de type 1, médiée essentiellement par les lymphocytes T cytotoxiques et les macrophages, est destinée à lutter contre les parasites intracellulaires et certains virus. La réponse de type 2, basée plutôt sur une production d'anticorps IgA, IgG4 et IgE, fait intervenir des cellules impliquées dans les phénomènes allergiques (éosinophiles, basophiles et mastocytes) et permet notamment de lutter contre des parasites extracellulaires comme les helminthes.

Toutes les pathologies inflammatoires ont donc été étudiées à la lumière de ce concept depuis dix ans (pour revue: Lucey 1996, Romagnani 1996 et Mosmann 1996). Mais beaucoup de pathologies ont une histoire complexe qui ne permet pas de les classer facilement dans une catégorie ou dans l'autre (Allen 1997). De plus, cette dichotomie Th1/Th2, initialement limitée aux cellules T CD4<sup>+</sup>, s'est rapidement étendue à d'autres populations cellulaires: les lymphocytes CD8<sup>+</sup> (Tc1/Tc2), les cellules NK... Pour tous ces types cellulaires nous parlerons donc de cytokines de type 1 ou de type 2 plutôt que de cytokines Th1/Th2.

Il est à noter que cette classification, si elle a permis de mieux comprendre un certain nombre de phénomènes immunologiques, n'en est pas moins très réductrice. Même en se limitant aux lymphocytes CD4<sup>+</sup>, des populations mixtes ont pu être mises en évidence. Tous rassemblés sous le terme Th0, ces lymphocytes sont supposés être les précurseurs des lymphocytes Th1 et Th2, mais ceci reste controversé (Kelso 1995). Une population de lymphocytes Th3, sécrétant du TGF $\beta$  et de l'IL-4, a même été décrite récemment (Correale 1995).

**Tableau 4 :** Cytokines et anticorps associés à un profil Th1 ou Th2 chez l'homme.

	Th1	Th2
<b>Cytokines</b>		
IFN $\gamma$	+++	-
IL-2	+++	+
TNF $\beta$	+++	-
TNF $\alpha$	+++	++
GM-CSF	++	++
IL-3	++	+++
IL-6	-	++
IL-4	-	+++
IL-5	-	+++
IL-10	++	+++
IL-13	++	+++
<b>Fonctions</b> Réponse cellulaire		
- cytotoxicité (CD8 <sup>+</sup> / NK)	+++	-
- hypersensibilité retardée	++	-
- prolifération des lymphocytes B	+	++
<b>Anticorps</b> Réponse humorale		
IgE	-	+++

Contrairement à la souris, chez l'homme, seule la production d'IgE est clairement associée à un profil particulier (Th2).

### C. Les cytokines de l'inflammation

Les cytokines de l'inflammation sont multiples et leurs rôles respectifs évoluent au cours du processus inflammatoire. La pénétration dans la muqueuse de corps étrangers déclenche, après reconnaissance antigénique, une cascade réactionnelle débouchant sur une production locale de cytokines pro-inflammatoires. L'activation de la voie du complément conduit ainsi à la formation d'anaphylatoxines (C5a, C3a) qui en synergie avec des dérivés de parois bactériennes comme le fMLP et le LPS, induit cette sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, essentielle pour aboutir à l'élimination du corps étranger.

#### a) Les cytokines pro-inflammatoires

Dans un premier temps les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-8 et TNF $\alpha$ ) vont essentiellement contribuer au recrutement des granulocytes et des monocytes/macrophages. L'attraction chimiotactique de ces phagocytes et la vasodilatation des capillaires sanguins sont d'abord l'apanage des chimiokines, dont le premier représentant cloné fut l'IL-8. Mais l'étude du rôle des chimiokines dans l'inflammation n'en est qu'à ses débuts et les très nombreuses homologues fonctionnelles observées prennent encore le pas sur les spécificités de chacune d'entre elles.

Le recrutement cellulaire est également favorisé par la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  par les macrophages présents constitutivement dans la muqueuse et qui, avec le LPS, contribuent à la stimulation des cellules endothéliales. Cette stimulation entraîne la production et la présentation

membranaire de chimiokines et surtout de toute une série de molécules d'adhérence qui vont permettre l'immobilisation des cellules circulantes suivie de leur migration transendothéliale.

Dans un deuxième temps, ces cytokines vont également activer les cellules de l'infiltrat inflammatoire, favorisant ainsi la phagocytose, mais également la dégranulation ainsi que la libération de NO et d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

### b) Les cytokines anti-inflammatoires

Afin de contrôler le développement de l'inflammation et favoriser sa résorption après élimination de l'agent pathogène, la synthèse et la sécrétion de ces chimiokines et cytokines pro-inflammatoires sont sous le contrôle d'un certain nombre de composés, entraînant un rétrocontrôle négatif (figure 11). Outre, l'induction d'hormones (ACTH) débouchant sur la libération de glucocorticoïdes par les surrénales, on distingue surtout les cytokines anti-inflammatoires: IL-1RA et TGF $\beta$ , mais aussi les cytokines de type 2 : IL-10, IL-4 et IL-13. A cette liste, peuvent être joints les récepteurs solubles de l'IL-1 et du TNF.

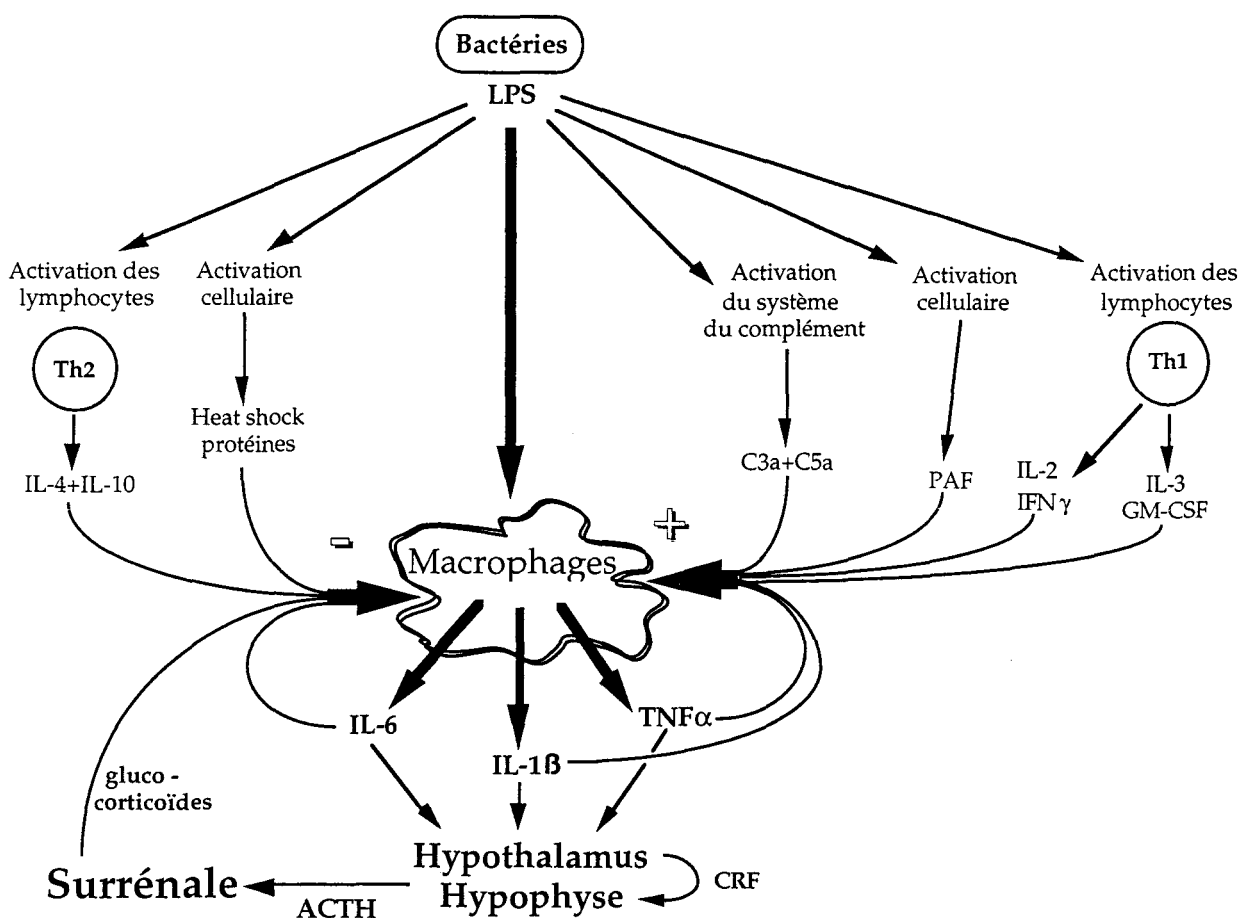


Figure 11 : Schéma illustrant les différents signaux pouvant amplifier ou réguler négativement la production par les monocytes/macrophages des cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6 et TNF $\alpha$  (d'après Cavaillon 1996).

## D. Les chimiokines

La famille des chimiokines, dont le nombre de membres est en constante progression, comporte aujourd'hui plus de 40 protéines, caractérisées par leur pouvoir chimiotactique et leur faible poids moléculaire (8 à 10 kDa). Leur structure tridimensionnelle est liée à la formation de

ponts disulfure entre les cystéines. Selon l'emplacement des deux premières cystéines, on distingue 4 sous-familles de chimiokines (pour revue: Rollins 1997, Baggiolini 1997 et Luster 1998).

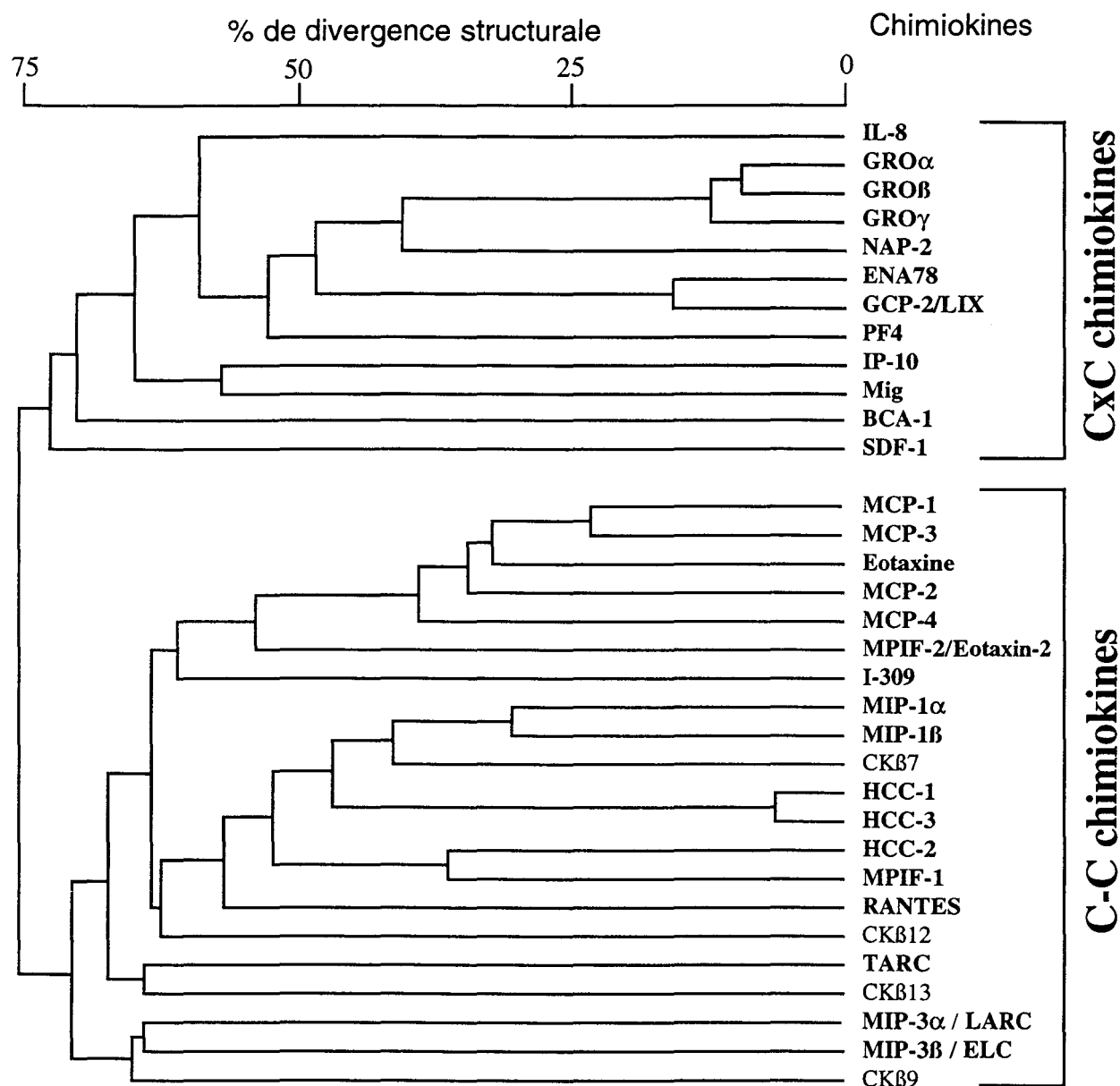


Figure 12 : **Homologie de séquence entre C-C chimiokines et CxC chimiokines.**  
(Modifié d'après Baggiolini 1997)

Les premières décrites furent les  $\alpha$  et  $\beta$ -chimiokines (figure 12), dont les gènes sont situés respectivement sur les chromosomes 4q13 et 17q11-12 et maintenant rebaptisées : C-x-C chimiokines (IL-8, GRO...) et C-C chimiokines (MCP-1, MIP-1, RANTES, Eotaxine...). Les C chimiokines (Lymphotactine) ne forment qu'un seul pont disulfure et semblent spécifiques des lymphocytes. Les plupart des C-x-C chimiokines, possèdent un motif ELR (Ac glutamique - Leucine - Arginine) et agissent sur les neutrophiles, alors que les C-C chimiokines, d'abord décrites comme spécifiques des monocytes, agissent également sur les lymphocytes, les éosinophiles, les basophiles... mais pas sur les neutrophiles. Plus récemment une nouvelle famille a vu le jour : les C-x<sub>3</sub>-C chimiokines. La fractalkine, seul représentant à ce jour, possède un

a vu le jour : les C-x<sub>3</sub>-C chimiokines. La fractalkine, seul représentant à ce jour, possède un domaine chimiokine clivable ancré sur une protéine transmembranaire présentant un motif de type mucine (Bazan 1997).

Les premières analyses structurales par résonance magnétique nucléaire (RMN) suggèrent que les chimiokines (IL-8, MCP-1...) existent essentiellement sous forme dimérique mais avec des structures très différentes (Rollins 1997). Or des études plus récentes affirment que la forme monomérique serait fonctionnellement tout aussi efficace sinon plus que la forme dimérique (figure 13). Celle-ci pourrait se former uniquement aux très fortes concentrations nécessaire à la cristallisation.

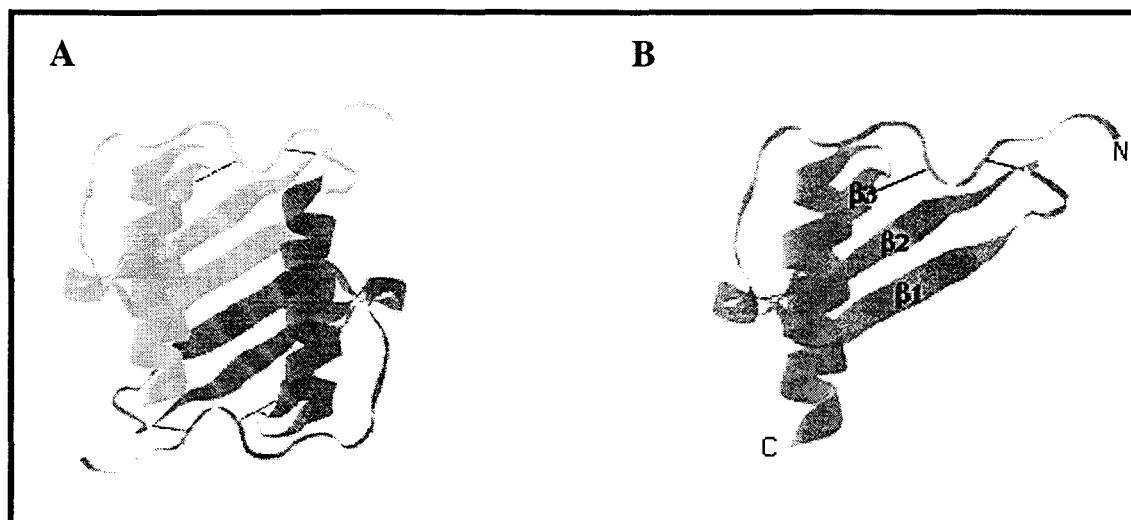


Figure 13 : **Structure tridimensionnelle de l'IL-8.** A) Forme dimérique. B) Forme monomérique : 1 hélice  $\alpha$ , 3 feuillets  $\beta$  reliés à la partie N terminale par 2 ponts disulfures (d'après Rollins 1997).

Mais le rôle des chimiokines ne se limite pas au seul recrutement cellulaire, ces cytokines sont également impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaire (hématopoïèse, angiogénèse...).

### 1.3 Les récepteurs de cytokines

#### A. Les grandes familles de récepteurs

Les récepteurs de cytokines peuvent être classés en fonction de leur structure. On peut ainsi distinguer plusieurs superfamilles (Callard 1994) :

##### a) Les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines (Ig)

Ils possèdent tous au moins 3 domaines Ig extracellulaires. En fonction de l'absence ou de la présence d'un domaine intracellulaire pour tyrosine kinase, on distingue respectivement : les **récepteurs à IL-1** (de type I et de type II) et les récepteurs à Tyrosine kinase, avec d'un côté les récepteurs Tyr kinase de classe III ayant 5 domaines Ig (récepteurs de: M-CSF, PDGF, c-kit...) et de l'autre les récepteurs de classe IV n'en ayant que 3 (les récepteurs du FGF).

### b) La superfamille des récepteurs de cytokines (classe I)

Ces récepteurs partagent 2 domaines extracellulaires: un domaine fibronectine de type III contenant un motif Trp-Ser-X-Try-Ser et, côté NH<sub>2</sub> terminal, un domaine caractéristique de cette famille comportant notamment 4 cystéines.

Les chaînes des récepteurs de l'IL-6 et du G-CSF possèdent en plus, côté NH<sub>2</sub> terminal, un motif de type immunoglobuline, alors que les chaînes  $\alpha$  de l'IL-3, de l'IL-5 et du GM-CSF présentent une duplication des motifs caractéristiques de cette famille. Ces trois cytokines partagent une chaîne  $\beta$  commune (Figure 14)

D'autres récepteurs de cytokines forment des complexes multimériques ayant des chaînes communes. Ainsi, la chaîne  $\gamma_c$  de l'IL-2 est partagée par les récepteurs de l'IL-15, de l'IL-7 et de l'IL-4. La chaîne de l'IL-4 est quant à elle commune aux récepteurs de l'IL-4 et de l'IL-13, tout comme l'IL-2 partage sa chaîne  $\alpha$  avec l'IL-15.

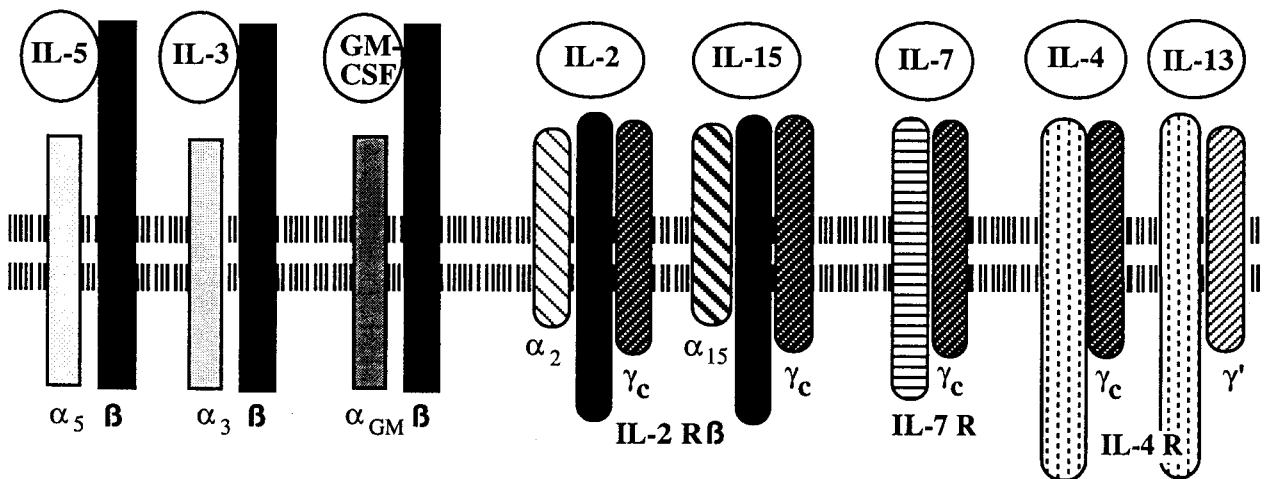


Figure 14 : **Homologies entre récepteurs de cytokines.**

### c) La superfamille des récepteurs de cytokines (classe II)

Classiquement appelée la superfamille des récepteurs à interféron, elle inclut non seulement les **récepteurs des IFN $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$** , mais également le **récepteur de l'IL-10**. La partie extracellulaire de ces récepteurs est formée de 2 domaines fibronectine de type III. Contrairement aux récepteurs de classe I, les domaines fibronectine ne contiennent pas le motif Trp-Ser-X-Try-Ser.

### d) La superfamille des récepteurs du TNF

Outre les deux récepteurs du TNF (R1/p55/CD120a et R2/p75/CD120b), cette superfamille comporte des corécepteurs impliqués dans l'activation (CD40, CD134, CD137) et/ou l'apoptose (Fas/APO-1, APO-3, CD27, LT- $\beta$ R, DR-4...).

### e) La superfamille des récepteurs du TGF $\beta$

Trois types de récepteurs du TGF $\beta$  ont été caractérisés. Les récepteurs de type I et de type II possèdent un domaine intracellulaire Serine/Thréonine, alors que le récepteur de type III est essentiellement extracellulaire et clivable.



**Tableau 5: Les différents récepteurs de chimiokines et la nature des cellules les exprimant majoritairement (adapté de Luster 1998).**

Type cellulaire	Récepteurs	Ligands principaux
Neutrophiles	CxCR1 (IL-8RA)	IL-8, GCP-2
	CxCR2 (IL-8RB)	IL-8, GRO- $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , NAP-2, ENA-78, GCP-2, LIX
Eosinophiles	CCR3	Eotaxin-1 et 2 (MIPF-2), RANTES, MCP-2, 3, 4
	CCR1	MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-2, 3
Basophiles	CCR3	Eotaxin-1 et 2 (MIPF-2), RANTES, MCP-2, 3, 4
	CCR2	MCP-1, 2, 3, 4
Monocytes	Cx <sub>3</sub> CR1	Fractalkine (neurotactine)
	CXCR4 (LESTR/fusin)	SDF-1
	CCR1	MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-2, 3
	CCR2	MCP-1, 2, 3, 4
	CCR5	RANTES, MIP-1 $\alpha$ et $\beta$
	CCR8	I-309
Cellules dendritiques	?	TECK, MDC, HCC-1
	CXCR4 (LESTR/fusin)	SDF-1
	CCR1	MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-2, 3
	CCR2	MCP-1, 2, 3, 4
	CCR3	Eotaxin-1 et 2 (MIPF-2), RANTES, MCP-2, 3, 4
	CCR4	TARC
	CCR5	RANTES, MIP-1 $\alpha$ et $\beta$
	CCR6	MIP-3 $\alpha$ (LARC/Exodus-1)
Lymphocytes T activés	?	TECK, MDC
	Cx <sub>3</sub> CR1	Fractalkine (neurotactine)
	CxCR3 (GPR9)	IP-10, MIG, I-TAC
	CCR1	MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-2, 3
	CCR2	MCP-1, 2, 3, 4
	CCR4	TARC
	CCR5	RANTES, MIP-1 $\alpha$ et $\beta$
	CCR7	MIP-3 $\beta$ (ELC)
Lymphocytes T au repos	?	PARC (CD-K1), SLC, Exodus-2 (6CKine)
	CXCR4 (LESTR/fusin)	SDF-1
	?	Lymphotactine (neurotactine)
Lymphocytes B	?	PARC (CD-K1)
	CXCR5 (BLR1)	BCA-1
Cellules NK	Cx <sub>3</sub> CR1	Fractalkine(neurotactine)
	CXCR3	IP-10, MIG, I-TAC
	CCR2	MCP-1, 2, 3, 4
	CCR5	RANTES, MIP-1 $\alpha$ et $\beta$

#### f) La superfamille des récepteurs à 7 hélices transmembranaires

Les récepteurs de chimiokines font partie de la famille des récepteurs à 7 hélices transmembranaires couplés à des protéines G (pour revue: Murphy 1994). Cette famille dont le leader est le récepteur de la rhodopsine, comporte également les récepteurs des neurotransmetteurs, des neuropeptides (Ulrich 1998) ainsi que les récepteurs de composés chimioattracteurs comme les chimiokines, le fMLP, le C5a... A ce jour, 4 récepteurs de C-x-C chimiokines, 8 récepteurs de C-C chimiokines, ainsi qu'un récepteur de C-x<sub>3</sub>-C chimiokines ont été caractérisés (tableau 5). Aucun récepteur n'a encore été identifié pour les C chimiokines.

## B. Structure et fonction des récepteurs de chimiokines

### a) Une structure commune

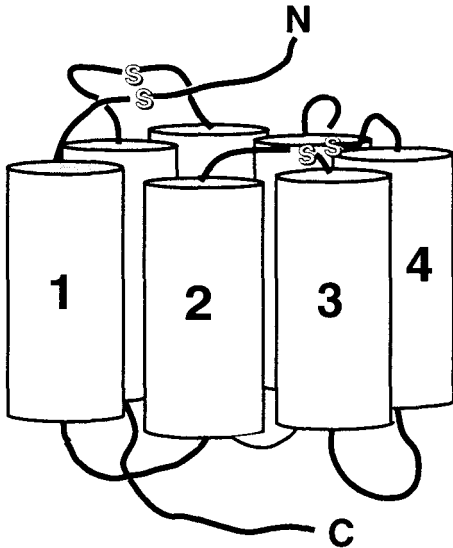


Figure 15 : Les sept hélices transmembranaires forment une sorte de barillet, grâce à des liaisons disulfure entre les cystéines des boucles extracellulaires 1 et 2, ainsi qu'entre la boucle extracellulaire 3 et la partie N terminale du récepteur. Les acides aminés Arg<sup>199</sup>, Arg<sup>203</sup> et Asp<sup>265</sup> semblent également nécessaires à un déploiement correct du récepteur.

Les récepteurs des chimiokines présentent de nombreuses régions très conservées, principalement au niveau des hélices transmembranaires, mais également au niveau de leur seconde boucle intracellulaire (séquence DRYLAIV). L'hétérogénéité la plus importante se situe côté N terminal. En effet, ce sont les acides aminés N terminaux qui déterminent la spécificité des récepteurs vis à vis des chimiokines (pour revue: Baggiolini 1997).

Mais les acides aminés impliqués dans la liaison aux chimiokines ne semblent pas indispensable à la transmission du signal, puisque des anticorps bloquant toute fixation d'une chimiokine à son récepteur n'empêchent pas pour autant une réponse cellulaire. Ce signal est médié par une protéine G qui interagit notamment avec la troisième boucle intracellulaire du récepteur.

### b) Les récepteurs de l'IL-8 : CXCR1 et CXCR2

Les récepteurs CXCR1 et CXCR2 présentent une homologie de 77% (figure 16B). Ils sont essentiellement présents sur les neutrophiles (environ 75.000 récepteurs/cellule), mais ils ont aussi été mis en évidence chez les monocytes (10.000 récepteurs/cellule; Bishayi 1996), les éosinophiles, les basophiles et dans une moindre mesure, les cellules NK et les lymphocytes CD26<sup>+</sup> (pour revue: Baggiolini 1997). Alors que le nombre de CXCR1 et de R2 est à peu près équivalent à la surface des neutrophiles, il semblerait qu'il y ait plus de CXCR2 à la surface des autres types cellulaires.

#### • Les acides aminés impliqués dans la liaison chimiokine-récepteur :

Le motif **ELR** (Glu<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Arg<sup>6</sup>), situé juste en amont de la première cystéine de l'IL-8, est nécessaire mais non suffisant pour la liaison aux récepteurs CXCR1 et CXCR2 (figure 16A). Ce motif est partagé par un grand nombre de CXC chimiokines, mais l'IL-8 est la seule chimiokine qui se lie au CXCR1 avec une affinité importante. Les autres ELR CXC chimiokines (GRO $\alpha$ , NAP-2, ENA78...), ne se fixent qu'au CXCR2 et ce, avec une affinité à peu près équivalente à celle de l'IL-8 (Ahuja 1996). Deux acides aminés NH<sub>2</sub> terminaux de l'IL-8 semblent indispensables: Tyr<sup>13</sup> et Lys<sup>15</sup>. D'ailleurs, si l'on remplace les résidus 12 à 18 et l'Ala<sup>50</sup> de GRO $\alpha$

par les résidus 10-17 et 48-49 de l'IL-8, les affinités respectives de l'IL-8 et de GRO $\alpha$  vis à vis du CXCR1 s'en trouvent inversées (Baggiolini 1997).

La construction de récepteurs chimères (homme/lapin) pour le CXCR1 et le CXCR2, a permis d'identifier les acides aminés de la région NH<sub>2</sub> terminale qui sont essentiels à la fixation sélective des CXC chimiokines: Asp<sup>11</sup>, Arg<sup>199</sup>, Arg<sup>203</sup> et Asp<sup>265</sup> (figure 16B).

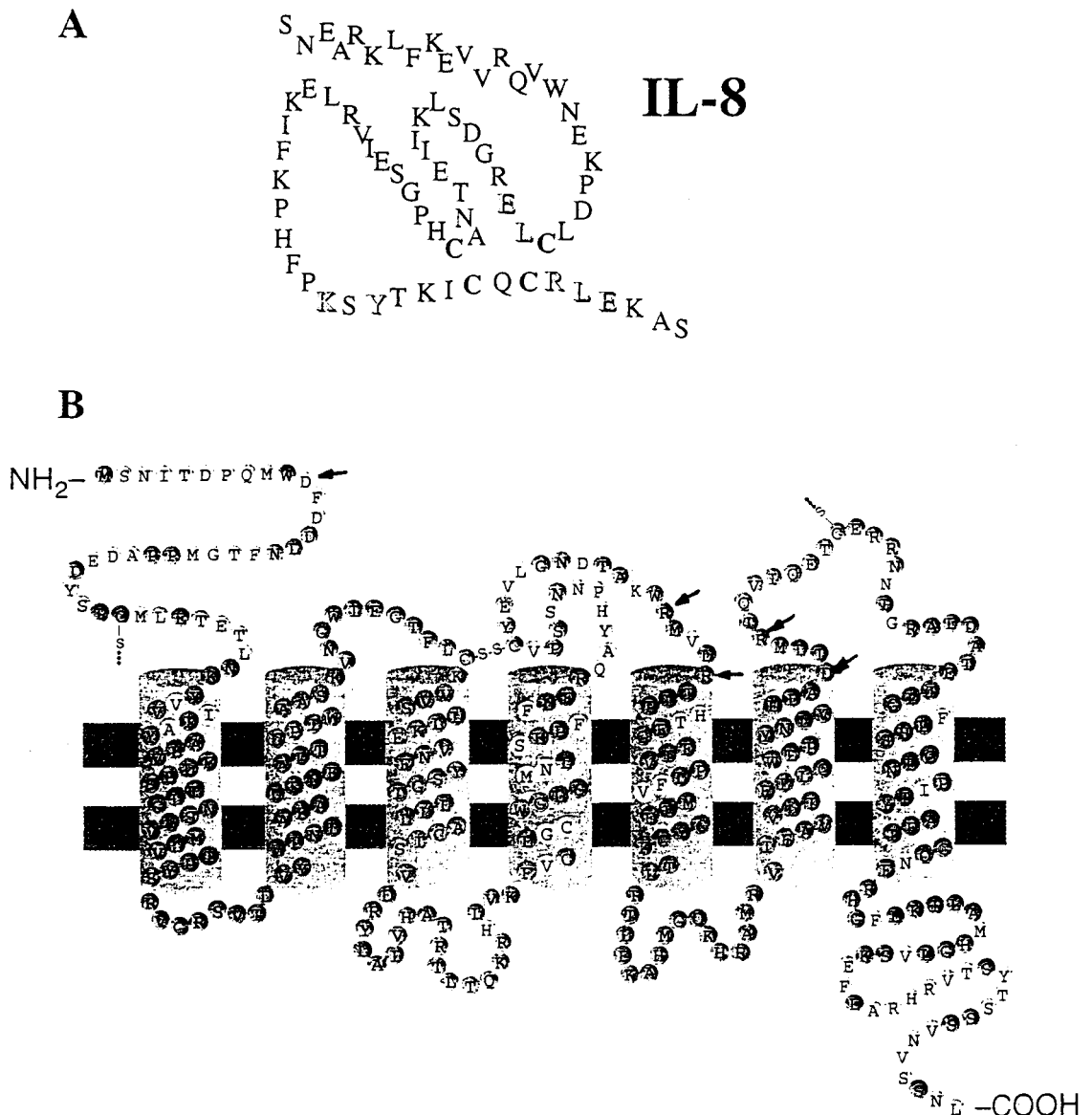


Figure 16 : **Structure de l'IL-8 (A) et de son récepteur CXCR1 (B).** Les acides aminés en gris clair diffèrent entre CXCR1 et CXCR2. Les flèches indiquent les acides aminés participant à l'interaction avec l'IL-8. (Modifié d'après Horuk 1994)

• Action des CXC chimiokines sur CXCR1 et CXCR2 :

Si seul l'IL-8 semble capable de se lier au CXCR1 avec une affinité élevée, cette affinité diminue au-delà d'une certaine concentration d'IL-8 (Ahuja 1996). Ainsi à des concentrations 100x plus importantes, GCP-2 (Wolf 1998) ainsi que Gro $\alpha$  ou NAP-2 se montrent capables de se fixer au CXCR1 plus efficacement que l'IL-8 (Ludwig 1998). Il semblerait donc que ces chimiokines agissent sur les neutrophiles, dans un premier temps via le CXCR2, puis suite à une augmentation de leur expression dans un contexte inflammatoire, via le CXCR1 (Ludwig 1998).

Mais le rôle de l'IL-8 reste déterminant. Ainsi, IL-8 va pouvoir limiter l'action de Gro $\alpha$ , par compétition directe pour le CXCR2, d'autant que la liaison de l'IL-8 au CXCR2 entraîne une internalisation plus rapide que pour GRO $\alpha$  (Sabroe 1997). Bien que ces internalisations soient plus rapides pour CXCR1 que pour CXCR2, la ré-expression de CXCR1 à la membrane est rapide et totale, contrairement aux CXCR2.

En outre, l'interaction entre l'IL-8 et le CXCR2 induit une désensibilisation du récepteur qui est plus importante que pour NAP-2, et ce en raison d'une phosphorylation accrue des sérine/thréonine C terminales du CXCR2 (Ben-Baruch 1997) (voir également figure 17).

- Cascade de transduction du signal

Comme le démontrent les expériences réalisées à l'aide de cellules embryonnaires transfectées par des CXCR2 tronqués dans leur extrémité C terminale (Ben-Baruch 1995), les 20 derniers acides aminés du récepteur CXCR2 ne semblent pas indispensables à la transmission du signal responsable du chimiotactisme, bien que cette région soit riche en sérine et thréonine. Une protéine multimérique de type G interagirait avec la 3<sup>ème</sup> boucle intracellulaire du récepteur et peut être également avec la 2<sup>ème</sup> boucle ainsi qu'avec les acides aminés situés en amont des 20 acides aminés C terminaux (figure 17). La dissociation des sous unités de la protéine G conduirait à l'activation de plusieurs voies de signalisation plus ou moins spécifiques des différentes réponses cellulaires.

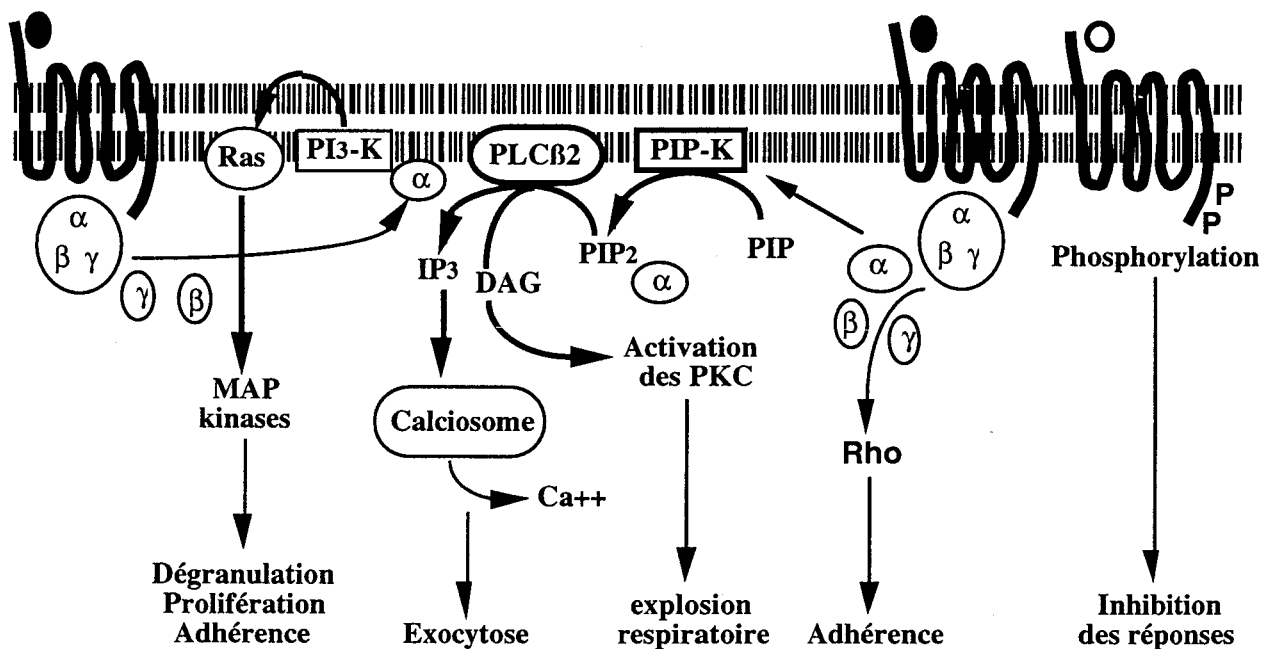


Figure 17 : Les voies de transduction activées par une liaison d'IL-8 à son récepteur. (Modifié d'après Mukaida 1997)

### c) VIH et récepteurs de chimiokines

Depuis près de dix ans, on savait que le récepteur CD4 était nécessaire mais non suffisant à l'infection d'une cellule par le VIH. La pénétration du virus dans la cellule semblait nécessiter un corécepteur. Parallèlement, différentes souches de VIH-1 ont pu être identifiées. D'un côté, on distingue les **souches M-tropiques** qui infectent les monocytes/macrophages et les cellules T primaires, et de l'autre, les **souches T-tropiques** qui n'infectent que les lignées de cellules T.

Ces souches virales montrent le même tropisme que les souches émergentes *in vivo* qui s'avèrent incapables d'infecter les monocytes ou les macrophages (Moore 1997).

La caractérisation de toute une série de récepteurs de chimiokines ces trois dernières années a entraîné des progrès considérables dans la connaissance des mécanismes d'infection par le VIH. Certaines études avaient déjà démontré que des chimiokines comme RANTES ou MIP-1 pouvaient inhiber la réplication virale. Ceci a conduit à l'identification de CCR5 comme étant le corécepteur du CD4 impliqué dans l'infection par les souches de VIH M-tropique. Les souches T-tropiques ont, pour leur part, besoin du récepteur CXCR4, dont le ligand naturel est SDF-1. Dans une moindre mesure, CCR3 et CCR2 pourraient également être impliquées dans l'infection par les souches T et M-tropiques (Moore 1997).

Parallèlement, l'existence d'une mutation du gène CCR5 ( $\Delta 32$ ) a été mise en évidence chez certains individus à haut risque mais toujours non infectés (Moore 1997; McNicholl 1997). Cette délétion de 32 acides aminés entraînerait la formation d'un récepteur auquel il manquerait les 3 dernières hélices transmembranaires, bloquant ainsi toute entrée du virus par cette voie (McNicholl 1997). En effet, il semblerait que parmi les 1% de la population européenne d'origine caucasienne qui sont homozygotes pour cette mutation, les cas de SIDA soient exceptionnels.

#### **d) DARC : un récepteur pléiotropique**

Le récepteur de chimiokine présent sur les globules rouges, DARC (Duffy blood group antigen), est remarquable à plus d'un titre (pour revue: Hadley 1997). Ce récepteur pléiotropique lie fortement des C-C chimiokines (MCP-1, RANTES...) ainsi que des CXC chimiokines (IL-8, GRO...). Les érythrocytes semblent incapables d'internaliser le complexe chimiokine-DARC, suggérant que la fonction principale de ce récepteur est de piéger les chimiokines circulantes.

Mais cette fonction ne semble pas vitale puisqu'une majorité d'africains et d'afro-américains sont dépourvus de DARC. Cette absence s'avère un avantage évolutif puisque ce récepteur sert de voie d'entrée au parasite responsable de la malaria: *Plasmodium vivax*. En outre, pour échapper aux fonctions anti-parasitaires du foie, *P. knowlesi* et *P. falciparum* utilisent également DARC. Ces parasites expriment à la membrane des globules rouges qu'ils ont investi une protéine-ligand qui va leur permettre d'adhérer à la paroi des veinules post-capillaires via DARC.

En effet, en dehors des érythrocytes, DARC n'a été détecté jusqu'à présent que dans les cellules de Purkinje du cervelet et au niveau des cellules endothéliales des veinules post-capillaires. Or s'est à ce niveau que se déroule le recrutement des leucocytes vers les sites inflammatoires, laissant supposer un rôle de DARC dans la migration des cellules à travers la paroi des veinules. DARC pourrait notamment permettre aux cellules endothéliales de présenter à leur surface toute une série de chimiokines d'origine muqueuse qui seraient susceptibles d'activer des leucocytes circulants (Middleton 1997).

## 2. Cytokines et granulocytes

Nous avons limité ce chapitre à la description des seuls granulocytes humains sachant qu'un certain nombre de divergences existe entre l'homme et les modèles animaux. Par exemple : chez la souris, des homologues de l'IL-8 et de Gro $\alpha$  n'ont pu être mis en évidence. Seuls ont été décrit des équivalents fonctionnels : MIP-2 pour l'IL-8 et KC pour Gro $\alpha$ .

Dans un premier temps, nous présenterons un bref résumé du rôle joué par les cytokines sur les différentes fonctions des granulocytes dont le recrutement tissulaire, avant de mettre l'accent sur la production de toute une série de cytokines par les granulocytes eux-mêmes.

### 2.1 L'action des cytokines sur les granulocytes

#### A. Recrutement tissulaire

##### a) Les grandes étapes

Suite à une agression tissulaire et à l'émission locale de divers médiateurs dont les cytokines pro-inflammatoires, les cellules endothéliales activées vont interagir avec les cellules périphériques et contribuer à la migration transendothéliales. Les 3 grandes étapes du recrutement des granulocytes dans les tissus ne diffèrent guère de celles des autres leucocytes (Butcher 1991). L'établissement d'une série de contacts transitoires, appelés « rolling », permettent aux cellules circulantes d'être reconnues par les récepteurs des cellules endothéliales. S'établit alors une liaison plus franche entraînant l'immobilisation de la cellule sur la paroi du capillaire malgré l'importance du flux sanguin. La cellule va ensuite migrer à travers la paroi du capillaire vers le tissu de destination. C'est la diapédèse (pour revue: Panes 1998).

##### b) Les molécules d'adhérence

Les molécules d'adhérence diffèrent en fonction du type cellulaire bien sûr, mais surtout de par la nature des 3 grandes étapes du recrutement cellulaires.

- Le "rolling":

Le rôle des sélectines dans ces contacts transitoires est essentiel. L'utilisation d'anticorps dirigés contre les sélectines ou encore les modèles de souris déficientes pour une ou plusieurs sélectines a permis d'évaluer l'importance de chacune d'entre elles (Panes 1998). La famille des sélectines compte trois membres: la L-Sélectine (CD62L, LECAM-1), la P-Sélectine (CD62P) et la E-Sélectine (ELAM-1, CD62E) (figure 18A). Les ligands des sélectines se caractérisent par une structure de type mucine, impliquant les tétrasaccharides **sialyl Lewis X** (sLe<sup>X</sup>) et sialyl Lewis A (pour revue: Rossiter 1997).

La **P-Sélectine** est constitutivement présente à la surface des plaquettes et des cellules endothéliales alors que la **E-Sélectine** n'est exprimée à la surface des cellules endothéliales qu'après stimulation par le LPS ou les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$  et ce uniquement durant les premières heures de l'inflammation. A l'inverse, CD34, une glycoprotéine endothéliale liant la L-Sélectine, voit son expression membranaire diminuer après stimulation.

La **L-Sélectine**, présente sur un grand nombre de leucocytes (cellules T et B, monocytes, neutrophiles, éosinophiles...), est un ligand des deux autres sélectines. Elle permet, en l'absence de toute activation, la formation de liaisons entre des leucocytes et les cellules endothéliales. En

outre, la L-Sélectine semble impliquée dans les liaisons entre neutrophiles au niveau des lieux de recrutement tissulaire.

L'observation de différences entre neutrophiles et éosinophiles quant à la structure des molécules sLeX exprimées à leur surface, pourrait contribuer à la spécificité du recrutement médié par la E-Sélectine lors du déclenchement d'une inflammation (Bochner 1994). De plus, les éosinophiles présentent à leur surface un isoforme de **PSGL-1** dont l'affinité pour la P-Sélectine est plus importante que l'isoforme exprimé par les neutrophiles (Symon 1996). Comme pour la L-Sélectine, l'expression membranaire de la PSGL-1 décroît après activation cellulaire.

• L'adhérence:

La sécrétion de médiateurs de l'inflammation conduit à l'activation des cellules endothéliales ainsi que des cellules périphériques en cours de "rolling". Ces leucocytes exprimeront alors à leur surface des quantités importantes d'intégrines, capables de lier les molécules d'adhérence surexprimées à la surface des cellules endothéliales. Ces interactions conduiront à une immobilisation de la cellule à recruter à la surface de la cellule endothéliale activée.

Les intégrines sont des dimères, composés d'une des 8 chaînes bêta et d'une des 15 chaînes alpha existantes. Sur les 8 chaînes  $\beta$ , 3 participent aux recrutements cellulaires. On distingue ainsi la famille des  $\beta 1$  intégrines (CD29),  $\beta 2$  intégrines (CD18) et des  $\beta 7$  intégrines.

Les  **$\beta 1$  intégrines** sont appelées "very late antigens" (VLA) en raison de leur expression tardive par les lymphocytes activés. Mais l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  (**VLA-4**) est exprimée sur les lymphocytes au repos, ainsi que sur les cellules NK, les monocytes et les éosinophiles. L'adhérence aux cellules endothéliales se fait par l'intermédiaire du 1<sup>er</sup> et 4<sup>ème</sup> domaine de type Ig de **VCAM-1** (figure 18B). Absent des cellules endothéliales quiescentes, l'expression de VCAM-1 est fortement augmentée après stimulation par du LPS ou des cytokines pro-inflammatoires.

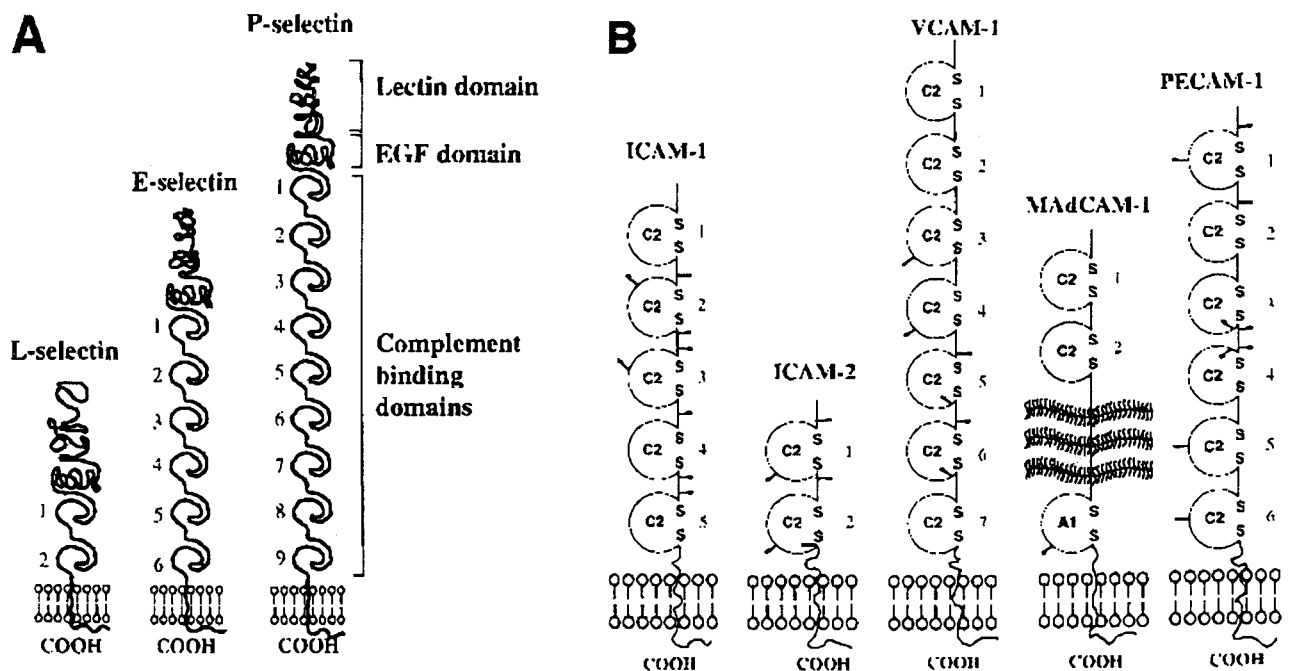


Figure 18 : Structures de 2 familles de molécules d'adhérence. A) Les trois types de sélectines et leur domaine lectine. B) Les ligands des intégrines sont tous de la famille des immunoglobulines. Noter le domaine de type mucine de MadCAM-1. (D'après Panes 1998)

L'expression des 3  $\beta 2$  intégrines, CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (Mac-1) et CD11c/CD18, varie en fonction du type cellulaire. LFA-1 est constitutivement présente à la surface de tous les leucocytes. Majoritaire sur les lymphocytes, LFA-1 partage la surface des cellules NK, des monocytes, des neutrophiles et des éosinophiles avec Mac-1 et CD11c/CD18. Ces intégrines, contrairement à LFA-1, voient leur expression membranaire augmentée après stimulation par des médiateurs de l'inflammation (PAF, LTB<sub>4</sub>, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ). Alors que le ligand de CD11c/CD18 reste inconnu, Mac-1 et LFA-1 se fixent à ICAM-1. Spécifique de LFA-1 mais avec une affinité moindre, ICAM-2 n'est pas inducible après activation des cellules endothéliales.

Les  $\beta 7$  intégrines semblent favoriser le recrutement des lymphocytes dans les muqueuses intestinales. Ainsi, les lymphocytes exprimant  $\alpha E\beta 7$  à leur surface sont recrutés au niveau de l'épithélium intestinal alors que les lymphocytes  $\alpha 4\beta 7$  vont se fixer aux cellules endothéliales intestinales via MadCAM-1 (figure 18B), qui est aussi capable d'interagir avec la L-Sélectine. Dans des conditions inflammatoires,  $\alpha 4\beta 7$  peut également se lier à VCAM-1. Il est intéressant de noter que les éosinophiles expriment des quantités comparables de  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) et de  $\alpha 4\beta 7$  (Walsh 1997).

- La migration transendothéliale:

Alors que l'adhérence à la cellule endothéliale conduit à l'immobilisation de la cellule circulante, la migration transendothéliale implique un déplacement du leucocyte qui doit néanmoins continuer à adhérer à la cellule endothéliale. Ce double objectif est atteint par des séries d'activation-désactivation des intégrines, par l'aplatissement de la cellule et la formation d'uropodes (del Pozo 1996).

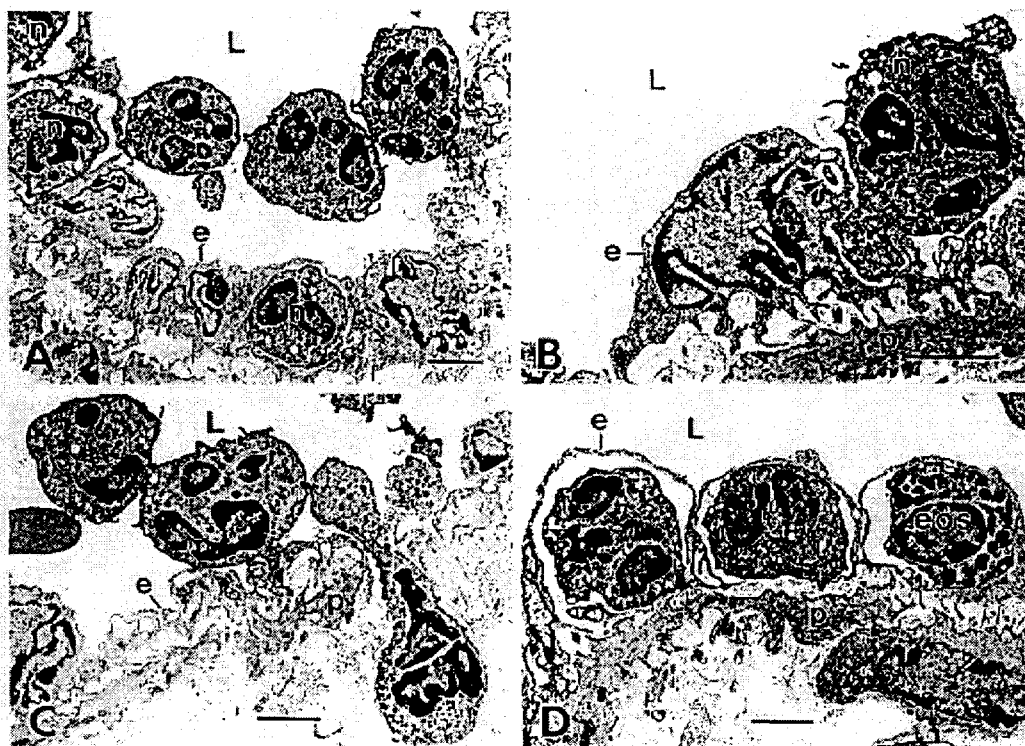


Figure 19: Migration transendothéliale de neutrophiles après injection intradermique de FMLP. A) Trois neutrophiles liés entre eux dans la lumière intestinale ainsi que 3 autres neutrophiles ayant déjà traversés la barrière endothéliale. B) Un neutrophile projetant deux pseudopodes (flèche) dans une cellule endothéliale. C) Une chaîne de trois neutrophiles dont le premier à traversé directement l'endothélium et le péricytes sous-jacent. D) Deux neutrophiles et un éosinophile entre endothélium et péricyte. (D'après Feng 1998). La barre = 3 $\mu$ m, n = neutrophile, eos = éosinophiles, L = lumière intestinale, p = péricyte, e = cellule endothéliale.



Sous l'action de LPS ou de fMLP, les intégrines membranaires des neutrophiles (Mac-1) vont subir un "turn over" rapide, accompagné d'une activation du cytosquelette cellulaire conduisant à l'étalement de la cellule et à la formation d'uropodes. Une accumulation de PSGL-1 au niveau des uropodes va contribuer à accélérer la migration des neutrophiles tout comme les interactions avec PECAM-1 (CD31) à la surface des cellules endothéliales (Rainger 1997).

La présence de PECAM-1 au niveau des jonctions endothéliales ainsi que plusieurs observations microscopiques, ont contribué à soutenir l'hypothèse que cette migration transendothéliale se déroulait entre les cellules endothéliales (Bianchi 1997). Or une étude récente de microscopie électronique, menée dans un modèle animal stimulé *in vivo* par du fMLP, montre de manière fort convaincante (figure 19) que les neutrophiles recrutés dans la peau passent à travers les cellules endothéliales, de même qu'à travers les péricytes sous-jacents (Feng 1998).

### c) Rôle des CxC chimiokines dans le recrutement des neutrophiles

Suite à des expériences de désensibilisation croisée, une hiérarchie des agents chimioattracteurs a été proposée (Kitayama 1997; Campbell 1997). Ainsi le dérivé bactérien fMLP paraît à ce jour le plus efficace, car il est capable d'inhiber l'action de C5a, de l'IL-8 et de Gro $\alpha$ , alors que C5a inhibe uniquement les deux récepteurs des CXC chimiokines. Si ces données *in vitro* sont transposables à la muqueuse intestinale, il en résulterait une absence d'action des CXC chimiokines au coeur des lésions. Il n'en demeure pas moins que ces chimiokines jouent un rôle majeur dans le recrutement des neutrophiles périphériques.

En effet, de par sa présentation à la surface des cellules endothéliales (Middleton 1997), l'IL-8 occupe une place privilégiée pour activer les neutrophiles au cours de leur "rolling". Cette activation conduit à l'élimination des L-Sélectine et à une forte augmentation de l'expression membranaire de Mac-1 (CD11b/CD18).

Les rôles respectifs de CXCR1 et CXCR2 dans cette activation cellulaire restent à déterminer. Pour l'instant, les études d'affinité démontrent que l'IL-8 se lie au CXCR1 et au CXCR2 avec une affinité élevée, alors que Gro $\alpha$  ne peut pour sa part se lier efficacement qu'au CXCR2 (Ahuja 1996). Par compétition directe pour ce second récepteur, IL-8 va donc pouvoir limiter l'action de Gro $\alpha$ , d'autant plus que les complexes IL-8/CXCR2 vont être internalisés et que la ré-expression des CXCR2 à la membrane n'est que partielle (Sabroe 1997).

D'autre part, les CXC chimiokines sécrétées par les cellules épithéliales (IL-8, ENA-78) semblent participer à la migration de neutrophiles vers la lumière intestinale (pour revue: Stenson 1998). Ce processus contribuerait à l'élimination des neutrophiles recrutés en excès et peut être même à la lutte contre les bactéries au niveau du mucus (Ebenfelt 1996).

### d) Cytokines et éosinophilie

L'IL-5 et les CC chimiokines se fixant au CCR-3 (Eotaxine-1, éotaxine-2, MCP-4...) jouent un rôle majeur dans le recrutement des éosinophiles. L'importance relative de ces deux voies dans l'induction d'éosinophilie périphérique et tissulaire a été explorée à l'aide de souris modifiées génétiquement. L'importance de l'IL-5 est illustrée par l'absence de toute éosinophilie dans des souris déficientes pour le gène de l'IL-5 et ce, suite à une infection parasitaire ou après injection d'un allergène (Mould 1997). A l'inverse, les souris Eotaxin<sup>-/-</sup> ne montrent qu'une légère réduction de l'éosinophilie (Rothenberg 1997) ce qui n'est pas surprenant si l'on tient compte de la présence

probable de MCP-4 et/ou d'éotaxin-2. A ce titre, un modèle de souris déficiente pour leur récepteur commun, CCR-3, serait très éclairant.

Néanmoins d'autres études indiquent, qu'en présence d'IL-5, une injection intradermique d'éotaxine induit une accumulation locale d'éosinophiles alors qu'une injection d'IL-5 se montre nettement moins efficace (Collins 1995; Rothenberg 1996). Le rôle tissulaire de l'IL-5 serait donc plutôt dirigé vers l'activation et le prolongement de la survie des éosinophiles, alors que l'éotaxine serait plus directement impliquée dans l'extravasation. Dans le sang, il semblerait que l'IL-5 permette une mobilisation importante d'éosinophiles à partir de la moelle osseuse. L'importance de cette éosinophilie sanguine est directement corrélée au nombre d'éosinophiles présents dans les infiltrats inflammatoires (Collins 1995; Mould 1997).

Cette augmentation tissulaire d'éotaxine ne semble pas être le fait de lymphocytes Th2; par contre, l'IL-4 se montre capable *in vitro* d'induire la libération des trois isoformes d'éotaxine par des fibroblastes de peau (Mochizuki 1998). Une injection intradermique d'IL-4 induit ainsi une forte éosinophilie suite à une néosynthèse d'éotaxine. Mais si la présence d'anticorps anti-éotaxine réduit l'accumulation tardive d'éosinophiles de moitié, elle reste sans effet sur les premières heures d'éosinophilie IL-4 dépendante (Sanz 1998). Dans un contexte allergique, l'IL-4 jouerait donc un rôle clé dans le déclenchement de l'éosinophilie.

La présence du récepteur de l'éotaxine sur des lymphocytes Th2 (Sallusto 1997) montre l'interdépendance entre la production d'IL-4 et d'IL-5 et le recrutement de cellules exprimant le CCR3 (éosinophiles, basophiles, lymphocytes Th2). Mais l'éotaxine peut également être synthétisée par des lymphocytes Th1 et une éosinophilie, indépendante d'une réponse de type Th2, peut se développer chez des souris infectées par *N. brasiliensis* (Gonzalo 1996).

## **B. Priming et activation**

### **a) Définitions**

Une **activation** cellulaire conduit à des changements qui sont mesurables: dégranulation, libération d'anions peroxydes, de cytokines... A l'inverse, le terme de "**priming**" recouvre un phénomène qui semble indépendant de toute synthèse protéique (Coffer 1997). En effet, ce type de préactivation induit une sensibilisation de la cellule qui entraîne une augmentation de sa réponse à une future activation. Cet état de préactivation serait donc une étape intermédiaire entre le repos et l'activation.

L'intensité et la durée de ce phénomène de préactivation varie en fonction du stimulus. Ainsi, si l'action du PAF semble transitoire, celle du LPS est durable (Coffer 1997). Tous ces voies de préactivation ont en commun l'induction de tyrosine kinase (Coffer 1997, Hallett 1995). L'activation, elle, augmenterait non seulement l'activité des Tyr kinases mais également celle des Ser/Thr kinases par l'intermédiaire d'une libération intracellulaire de Ca<sup>++</sup> (Hallett 1995).

Bien qu'encore très mal connus, ces phénomènes de préactivation semblent indispensables à la lutte contre les agents infectieux. Ainsi, en l'absence de toute préactivation, les granulocytes s'avèrent incapables de dégranuler ou de phagocyter des particules opsonisées. D'où l'importance des composés chimioattracteurs, impliqués non seulement dans le recrutement tissulaire, mais aussi dans la préactivation des granulocytes (Coffer 1997).

### **b) IL-8 et neutrophiles**

Les neutrophiles représentent la cible privilégiée de l'IL-8. Cette chimiokine est d'abord connue pour son rôle chimiotactique, mais l'IL-8 participe également au recrutement des neutrophiles en stimulation de la polymérisation d'actine, par la libération de PAF et d'IL-8, ainsi que par l'augmentation de l'adhérence aux cellules endothéliales et ce, par un accroissement de l'expression membranaire des intégrines à la surface des neutrophiles sanguins. Ces récepteurs sont également impliqués dans la phagocytose des agents pathogènes. L'IL-8 induit de surcroît une dégranulation des neutrophiles, dont les composés ont un rôle bactéricide. En outre, l'IL-8 est responsable du « priming » des neutrophiles recrutés et de l'amplification de la libération d'anions superoxyde et de leucotriènes, induite par le fMLP.

## **2.2 Cytokines produites par les granulocytes**

### **A. Considérations techniques**

En dehors des fonctions attribuées classiquement aux granulocytes (voir chapitre 1), de nombreuses études récentes mettent en lumière le rôle important qu'ils jouent dans la synthèse et la sécrétion de toutes une série de cytokines inflammatoires et immunorégulatrices. La sensibilité croissante des techniques de biologie moléculaire a en effet permis de montrer, d'abord *in vitro* et puis de plus en plus souvent *in vivo*, qu'un grand nombre de cellules pouvaient synthétiser, de manière constitutive ou après une stimulation appropriée, des cytokines. Connaissant la sensibilité de techniques comme l'ELISA ou la RT-PCR et sachant que, quelle que soit la technique de purification des granulocytes utilisée, une contamination résiduelle par des PBMC subsistera (<1%), une comparaison des résultats obtenus pour les granulocytes avec ceux obtenus pour les PBMC s'impose. Malheureusement, un certain nombre d'études citées au niveau des tableaux ne prennent pas en compte ce risque de faux positifs.

De plus, si de grandes quantités de cytokines sont associées aux granulocytes, les quantités de cytokines capables d'être sécrétées après stimulation restent faibles comparées aux PBMC. Ceci pourrait s'expliquer par de profondes différences au niveau des mécanismes d'activation cellulaire et de relargage des cytokines.

### **B. Production de cytokines par les granulocytes sanguins**

Avant tout, il est utile de garder en mémoire que les granulocytes représentent entre 50 et 70% des cellules circulant dans le sang. Les neutrophiles forment la grande majorité de ces granulocytes sanguins (95%). Donc même si, pour un nombre de cellules identiques, la quantité de cytokines produite *in vitro* par les neutrophiles est souvent inférieure à celles des PBMC (cf tableaux ELISA), le nombre de neutrophiles circulants est tel que leur production en cytokine est loin d'être négligeable. Ceci est moins vrai pour les éosinophiles (4%) et les basophiles (<1%), sauf dans des situations pathologiques où leur nombre augmente de manière importante.

De nombreux groupes ont mis en évidence toute une série de cytokines produites par les neutrophiles périphériques (Cassatella 1995 et 1996). Pour les éosinophiles et les basophiles circulants, nécessitant des techniques de purification plus poussées, il est normal qu'un nombre moins important de cytokines ai été identifié à ce jour (Wardlaw 1995; Hirai 1997). Les mastocytes différenciés, n'existant que sous forme tissulaire, nous en reparlerons plus loin.

Les cytokines produites par ces granulocytes sanguins peuvent être classées en quatre catégories (voir également tableau 6 pour les références).

- Les cytokines impliqués dans leur propre différenciation et prolifération. C'est ainsi que les neutrophiles peuvent produire du GM-CSF, du M-CSF, du G-CSF, de l'IL-3 et du SCF; alors que les éosinophiles sont impliqués dans la synthèse de GM-CSF, d'IL-3 et d'IL-5. Aucune de ces cytokines n'a été mise en évidence chez le basophile à ce jour.

- Les chimiokines. Les neutrophiles produisent des chimiokines impliquées dans leur propre recrutement (IL-8, Gro $\alpha$  et Gro $\beta$ ) mais également dans le recrutement d'autres types cellulaires: IP-10, MIP-1  $\alpha$  et  $\beta$  et MCP-1. Les éosinophiles, tout comme les basophiles, sont eux aussi à l'origine d'IL-8 et de MIP-1 $\alpha$ , mais ils produisent aussi l'éotaxine, MCP-1 et RANTES. A ces chimiokines sécrétées par les éosinophiles, peuvent s'ajouter deux autres cytokines exerçant un pouvoir chimioattracteur: l'IL-5 et l'IL-16.

- Les cytokines impliquées dans les processus inflammatoires : Les neutrophiles et les éosinophiles sont capable de sécréter les cytokines dites proinflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le TNF $\alpha$ . Chez les basophiles seuls l'IL-8 et le TNF $\alpha$  ont été décrits. Parmi les cytokines anti-inflammatoires, les neutrophiles sont une source d'IL-1RA et TGF $\beta$ , tandis que les éosinophiles produisent les TGF $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que l'IL-10.

- Les cytokines immunorégulatrices. Les éosinophiles et les basophiles sécrètent des cytokines de type 2 impliquées dans les phénomènes allergiques : l'IL-4 et l'IL-13 pour les basophiles et l'IL-4 et l'IL-5 pour les éosinophiles. Mais les éosinophiles sont également capables de produire des cytokines de type 1 comme l'IL-2 et l'IL-12 (Grewe 1998). L'IL-12 et l'IFN $\gamma$  sont les seules cytokines immunorégulatrices décrites chez le neutrophile (Cassatella 1996; Yeaman 1998).

### **C. Localisation intracellulaire des cytokines**

Nous n'aborderons ici que les cytokines mise en évidence en microscopie électronique par la technique d'immunogold. Plusieurs groupes ont pu mettre en évidence une localisation préférentielle des cytokines marquées au niveau des granules spécifiques des éosinophiles. C'est le cas des facteurs de croissance : l'IL-3 et le GM-CSF (Desreumaux 1996 et Levi-Schaffer 1995), mais aussi l'IL-5 (Dubucquoi 1994 et Möller 1996) ainsi que des cytokines immunorégulatrices comme l'IL-4 (Moqbel 1995) et l'IL-2 (Levi-Schaffer 1996). Non décrite chez les neutrophiles et les éosinophiles, l'IL-13 a été localisée au niveau des granules basophiliques (Li 1996).

Le TNF $\alpha$  est détecté au niveau des vésicules lipidiques d'un grand nombre de cellules muqueuses : les éosinophiles, les mastocytes et dans une moindre mesure les macrophages, les neutrophiles, les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules de Paneth (Beil 1995).

Chez les éosinophiles, contrairement aux basophiles où il est absent, le TGF $\alpha$  est majoritairement localisé aux niveau des granules spécifiques (Egesten 1996), alors que chez les neutrophiles, il est localisé dans des vésicules de nature différente des 4 types de granules décrits jusqu'à présent (Calafat 1997). Néanmoins de nombreuses petites vésicules d'éosinophiles, non lysosomiales ou sécrétrices, contiennent également du TGF $\alpha$ , souvent liée à la membrane. Ces observations suggèrent l'existence chez les éosinophiles de deux voies distinctes de sécrétion pour le TGF $\alpha$ , dont l'une serait indépendante du processus de dégranulation.

Tableaux 6 : **Capacité des granulocytes à produire des cytokines et des chimiokines.**  
 Comparaison par ELISA des niveaux de sécrétion des cellules mononucléées (MNC)  
 avec celles des éosinophiles et des neutrophiles (PMN).

Cytokine	Cellules	Stimulus		Concentration pour 10 <sup>6</sup> cellules	Références
		nature	concentration		
GM-CSF	PMN	Ionomycin+PMA	1µM+500pg/ml	< 20 pg/ml	Kato et al. 1990
	MNC			840 pg/ml	
	Eosinophile	Ionomycin+PMA	1µM+500pg/ml	179 pg/ml	Kita et al. 1991
	MNC			839 pg/ml	
Eosinophile	A23187	1µM	185 pg/ml	Braun et al. 1993	
Eosinophile	C5a+CytochalasineB	Ionomycin	0,1µM+5µg/ml	28,2 pg/ml	Miyamasu et al. 1995
				31,4 pg/ml	
IL-3	PMN	Ionomycin+PMA	1µM+500pg/ml	< 40 pg/ml	Kato et al. 1990
	MNC			425 pg/ml	
	Eosinophile	Ionomycin+PMA	1µM+500pg/ml	212 pg/ml	Kita et al. 1991
MNC			425 pg/ml		
Eosinophile	A23187	1µM	28 pg/ml	Braun et al. 1993	
IL-5	Eosinophile	sIgA		160 pg/ml	Dubucquoi et al. 1994
IL-4	Eosinophile	A23187	0,1µM	1389 pg/ml	Bjerke et al. 1996
	Eosinophile	sIgA/anti-IgA	15 µg/ml	47 pg/ml	Nonaka et al. 1995
	Eosinophile	Billes Sephadex coatées par du serum		34 pg/ml	Moqbel et al. 1995
IFN $\gamma$	PMN	LPS	50 ng/ml	25 pg/ml	Yeaman 1998
IL-2	Eosinophile	A23187	0,2µM	0	Bossé et al. 1996
		A23187+GM-CSF	0,2µM+100U/ml	210 pg/ml	
IL-12p70	Eosinophile	C5a	0,1µM	13 pg/ml	Grewe et al. 1998
		IL-5	10 ng/ml	55 pg/ml	
	PMN	LPS	1µg/ml	8 pg/ml	
		LPS+IFN $\gamma$	+ 100U/ml	40 pg/ml	Cassatella et al. 1995
IL-6	PMN	LPS	80 ng/ml	0 pg/ml	Wang et al. 1994
	MNC			14227 pg/ml	
Eosinophile	-			190 pg/ml	Hamid et al. 1992
TNF $\alpha$	PMN	Y-IgG		80 pg/ml	Bazazoni et al. 1991
	Monocytes			6000 pg/ml	
	PMN	LPS	80 ng/ml	31 pg/ml	Wang et al. 1994
	MNC			4300 pg/ml	
PMN	LPS	5 µg/ml	80 pg/ml	Dubravec et al. 1990	
Monocytes			450 pg/ml		
Eosinophile	-			122 pg/ml	Costa et al. 1993
MNC	-			987 pg/ml	
IL-1 $\beta$	PMN	LPS	10 µg/ml	400 pg/ml	Lord et al. 1991
	MNC			3600 pg/ml	
	PMN	LPS	10 µg/ml	100 pg/ml	Jenkins et al. 1994
	MNC			10 ng/ml	
PMN	LPS	80 ng/ml	14 pg/ml	Wang et al. 1994	
MNC			2223 pg/ml		
IL-1ra	PMN	LPS	10 µg/ml	300 pg/ml	Jenkins et al. 1994
	MNC			2700 pg/ml	
	PMN	LPS	100 ng/ml	5800 pg/ml	Marie et al. 1996
		IL-13	10 ng/ml	1500 pg/ml	
PMN	IL-13	20 ng/ml	1700 pg/ml	Muzio et al. 1994	
MNC			21500 pg/ml		
TGF $\beta$	PMN	LPS	1 µg/ml	45000 pg/ml	Grotendorst et al. 1989
Monocytes	45000 pg/ml				
TGF $\alpha$	Eosinophile	-	25 ng/ml	250 pg/ml	Brach et al. 1994
		IL-5		1500 pg/ml	
Eosinophile	-			80 pM	Wong et al. 1990

Chimio- -kines	Cellules	Stimulus		Concentration pour 10 <sup>6</sup> cellules	Références
		nature	concentration		
IL-8	PMN MNC (5.10 <sup>4</sup> )	LPS	100 ng/ml	300 pg/ml ND	Strieter et al. 1992
	PMN Monocytes	LPS	100 ng/ml	280 pg/ml 20000 pg/ml	Fujishima et al. 1993
	PMN	LPS	100 ng/ml	3800 pg/ml	Kasama et al. 1994
	PMN MNC	LPS	80 ng/ml	1974 pg/ml 30875 pg/ml	Wang et al. 1994
	PMN Monocytes	LPS	1000 ng/ml	580 pg/ml 36000 pg/ml	Cassatella et al. 1992
	PMN PBMC	LPS	1000 ng/ml	5000 pg/ml 500000 pg/ml	Altstaedt et al. 1996
	PMN MNC	C5a	50 nM	267 pg/ml 73000 pg/ml	Ember et al. 1994
	PMN Monocytes	GM-CSF	500 U/ml	500-1300 pg/ml 30-100000 pg/ml	Takahashi et al. 1993
	Eosinophile	LPS C5a+CytochalasineB Ionomycin	1µg/ml	1697 pg/ml 5755 pg/ml 2730 pg/ml	Izumi et al. 1997
			1µM	0	
	Monocytes	LPS C5a+CytochalasineB Ionomycin	1µg/ml	2517 pg/ml 923 pg/ml	
			1µM	76768 pg/ml	
	PMN Eosinophile	C5a+CytochalasineB Ionomycin	0,1µM+5µg/ml	13950 pg/ml 21705 pg/ml	Miyamasu et al. 1995
1µM			1800 pg/ml 7600 pg/ml		
Eosinophile	Ionomycin S IgA	1µM 20µg/ml	6,7 pg/ml 163 pg/ml	Nakajima et al. 1996	
Eosinophile	A23187	1µM	5335 pg/ml	Braun et al. 1993	
Gro α	PMN	LPS Y-IgG	1µg/ml	40 pg/ml 100 pg/ml	Gasperini et al. 1995
IP-10	PMN PBMC	IFNγ	100U/ml	26 pg/ml	Cassatella et al. 1997
		IFNγ+LPS	+1µg/ml	726 pg/ml	
		IFNγ+TNFα	+5ng/ml	1115 pg/ml	
MCP-1	PMN Eosinophile Monocytes	IFNγ	100U/ml	48000 pg/ml	
		IFNγ+LPS	+1µg/ml	5000 pg/ml	
		IFNγ+TNFα	+5ng/ml	41000 pg/ml	
MIP-1α	PMN Eosinophile Monocytes	LPS	1µg	0	Izumi et al. 1997
		C5a+CytochalasineB	0,1µM+5µg/ml	10 pg/ml	
		Ionomycin	1µM	197 pg/ml	
		LPS	1µg	0	
		C5a+CytochalasineB	0,1µM+5µg/ml	1315 pg/ml	
		Ionomycin	1µM	2978 pg/ml	
MIP-1β	PMN Monocytes	LPS	100 ng/ml	1700 pg/ml 8400 pg/ml	Kita et al. 1991
		LPS	100 ng/ml	1600 pg/ml	Kasama et al. 1994
MIP-1β	PMN	LPS	100 ng/ml	500 pg/ml	Kasama et al. 1994
RANTES	Eosinophile	Billes Sephadex coatées par du serum		1833 pg/ml	Ying et al. 1996
RANTES IL-16	Eosinophile	-		6,2 pg/ml < 50pg/ml	Lim et al. 1996

## **D. Régulation de la production de cytokines**

Les granulocytes semblent produire plus de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires que de cytokines immunorégulatrices (Tableau 6). Or l'IL-8 est la mieux décrite des chimiokines et de plus, elle est également considérée comme une cytokine pro-inflammatoire. Nous limiterons donc ce paragraphe à la régulation, chez les neutrophiles, de l'expression de l'IL-8.

Dans un premier temps, nous nous intéresserons aux composés stimulant ou inhibant la production d'IL-8, avant d'établir à quel niveau ces composés sont susceptibles d'agir (transcription, traduction, sécrétion).

### **a) Les cytokines régulant la libération d'IL-8**

La production d'IL-8 par les neutrophiles est stimulée par le GM-CSF, par des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), par des dérivés bactériens (fMLP, LPS, *C. albicans*) ou de levure (zymosan, Y-IgG) ainsi que par divers activateurs (C5a, LTB4, PAF, PMA, A23187). Ces voies d'activation sont très variées et susceptibles d'interagir de manière multiple (pour revue: Cassatella 1996). Ainsi, la synergie entre l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  se montre aussi efficace que le LPS pour stimuler la libération d'IL-8 par les neutrophiles. D'un autre côté, l'IFN $\gamma$  en synergie avec le LPS induit une augmentation de la sécrétion de l'IL-8, alors que l'IFN $\gamma$  seul semble jouer un rôle inhibiteur sur la libération d'IL-8 par les neutrophiles.

En outre, le rôle stimulateur du LPS, seul ou en synergie avec l'IFN $\gamma$ , se fait par l'intermédiaire d'une sécrétion accrue de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  (figure 19). En effet, des anticorps dirigés contre ces deux cytokines sont capables d'abroger toute augmentation de la sécrétion d'IL-8 par les neutrophiles. De manière similaire, l'action du zymosan ou encore du calcium ionophore (A23187) sur la sécrétion *in vitro* d'IL-8 par les neutrophiles peuvent être inhibés, au moins partiellement, par des anticorps dirigés contre le PAF.

La sécrétion par les neutrophiles d'IL-8 est négativement régulée par des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-4, IL-13, IL-1RA, TGF $\beta$ ) ou immuno-régulatrices (IFN $\gamma$ ), ainsi que par des glucocorticoïdes (dexaméthasone). Contrairement aux autres cytokines anti-inflammatoires, le TGF $\beta$  et l'IL-1RA peuvent être produits par les neutrophiles eux-mêmes, mais c'est l'IL-10 qui se montre la plus efficace pour inhiber la production d'IL-8 par les neutrophiles, même stimulés par le LPS. D'un côté, l'IL-10 stimule la production *in vitro* d'IL-1RA par les neutrophiles et de l'autre, elle inhibe la sécrétion du TNF $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  par ces mêmes neutrophiles (figure 20).

Les données ci-dessus ne tiennent pas compte du facteur temporel. Or lors des 5 premières heures, c'est le fMLP qui induit la plus forte libération d'IL-8 et non le LPS. Durant cette période, l'action du LPS et du fMLP ne peut être inhibée que par l'IFN $\gamma$ . Dans un second temps, le LPS contrairement au fMLP induit la sécrétion de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  par les neutrophiles. Ces cytokines seront responsables, en synergie avec le LPS, de la forte augmentation de l'IL-8, observée après 18h de culture, dans les surnageants de neutrophiles. C'est cette seconde étape de la production d'IL-8 qui est sensible à l'action inhibitrice de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10.

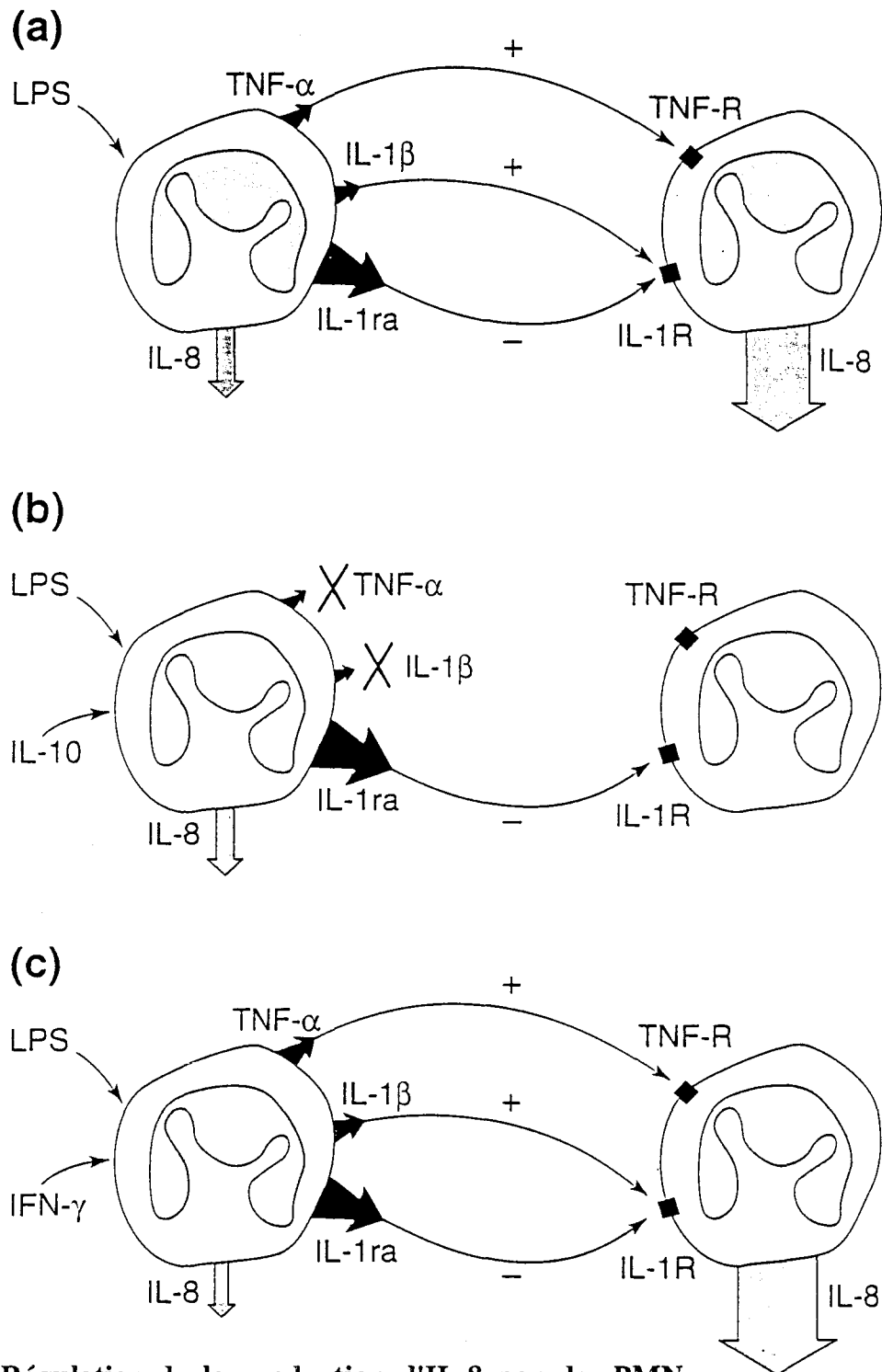


Figure 20 : Régulation de la production d'IL-8 par des PMN :  
 a) stimulés par du LPS, b) en présence d'IL-10 ou c) en présence d'IFN $\gamma$ .

### b) Les niveaux de régulation

L'utilisation d'un inhibiteur de transcription, l'Actinomycine D, permet d'inhiber l'augmentation chez les neutrophiles de l'ARNm codant pour IL-8 induite par le LPS. Le LPS agit donc au niveau transcriptionnel, en stimulant la synthèse de nouveaux ARNm (IL-8, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ...). C'est en bloquant ce mécanisme que l'IFN $\gamma$  et l'IL-10 inhibent la synthèse d'IL-8 par les neutrophiles stimulés au LPS. Mais il semblerait que l'IL-10 puisse en outre favoriser une dégradation rapide de l'ARNm de l'IL-8, généralement assez stable.



L'emploi de cycloheximide, un inhibiteur de synthèse protéique, entraîne une augmentation chez les neutrophiles de divers ARNm dont celui de l'IL-8, sans doute par inactivation de protéines impliquées dans la dégradation des ARNm. Cette augmentation de synthèse de l'IL-8 est abrogée en présence d'IFN $\gamma$ . Le fait que le cycloheximide augmente en plus la synthèse de l'IL-8 induite par le LPS indique que cette induction de synthèse ne nécessite pas de production de novo.

La régulation transcriptionnelle de l'IL-8 n'empêche pas l'existence d'autres niveaux de régulation. En effet, si l'essentiel de la production d'IL-8 est contrôlé au niveau de la transcription, l'accumulation d'IL-8 dans les neutrophiles lors des 2 premières heures n'est pas inhibée par l'Actinomycine D mais par le cycloheximide, suggérant que cette production précoce d'IL-8 est basée uniquement sur la traduction d'ARNm déjà présent dans la cellule. En outre, l'IL-8 produite par les neutrophiles n'est que partiellement sécrétée après stimulation par le LPS, alors qu'après stimulation par des levures opsonisées par des IgG (*S. cerevisiae*-IgG ou Y-IgG) la sécrétion d'IL-8 est beaucoup plus importante. A l'inverse, le LPS semble plus efficace que la phagocytose d'Y-IgG dans l'induction d'une synthèse accrue d'IL-8.

Ces quelques observations, réalisées *in vitro* avec des neutrophiles purifiés, permettent d'appréhender la complexité des événements susceptibles de réguler la synthèse et la sécrétion d'IL-8 par des neutrophiles sanguins et tissulaires. Il faut en outre garder en mémoire que le neutrophile peut dans certaines conditions libérer, en même temps que ces cytokines, des protéases susceptibles d'inactiver l'IL-8 sécrétée.

### 3) Cytokines et muqueuse intestinale

#### 3.1 Les modèles animaux développant des colites

##### A. Les différents types de modèles animaux

Deux grands groupes de modèles animaux développant des colites inflammatoires ont été décrits. On distingue d'un côté les colites spontanées se développant chez des animaux normaux ou génétiquement modifiés, et de l'autre les colites induites chimiquement ou par transfert cellulaire.

Les seuls modèles animaux présentant naturellement des colites spontanées sont le tamarin, un singe colombien (Madara 1985), et des souris de la lignée C3H/HeJ (Sundberg 1994). Pour intéressants qu'ils soient, ces modèles ont depuis été éclipsés par le nombre croissant d'animaux génétiquement modifiés qui développent, entre autres symptômes, une inflammation plus ou moins sévère de l'intestin (Podolsky 1997). Ces animaux ont été invalidés pour un gène donné (souris knockout) ou, au contraire, amenés à surexprimer artificiellement un gène (souris transgéniques).

Le second groupe comprend des animaux développant des colites induites soit par le transfert de cellules activées (transfert de lymphocytes T chez des souris SCID), soit par l'injection de substances chimiques (éthanol, formaldéhyde, acide acétique...) conduisant le plus souvent à une inflammation aiguë transitoire.

Afin d'induire une inflammation chronique ressemblant aux MICI, une approche associant une substance chimique à un composé destiné à créer une réaction inflammatoire soit à médiation humorale, soit à médiation cellulaire est nécessaire. L'une de ces approches consiste à activer le système immunitaire muqueux avec des anticorps sous forme de complexes immuns BSA-

antiBSA. Brièvement : les rats sont immunisés par un antigène d'*E.coli* (O14:K4:H<sup>-</sup>), avant que l'inflammation aiguë ne soit déclenchée par du formaldéhyde dilué. Cette inflammation est ensuite maintenue par l'injection intraveineuse du complexe immunitaire (Axelsson 1990). Une autre approche consiste à administrer un haptène chimique qui, après modification des protéines membranaires, entraînera une réaction inflammatoire à médiation cellulaire. Ainsi, l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) est généralement utilisé en association avec l'éthanol. Après injection rectale, on note l'apparition d'ulcérations accompagnées d'une importante nécrose. Ces ulcérations persistent pendant huit semaines mimant ainsi une inflammation chronique du côlon (Morris 1989).

Tableau 7: **Modèles animaux génétiquement modifiés et développant une inflammation intestinale** (adapté de Morales 1996).

Gènes	Animal	modification	Pathologie & perturbat° immunologiques	Références
TGFB1	souris	knockout	Inflammation généralisée Gastrite & colite diffuse	Kulkarni 1995
IL-10	souris	knockout	Colite diffuse, médiée par les CD4+ IFN $\gamma$ ↗ et IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ↗	Kühn 1993 Rennick 1997
IL-2	souris	knockout	Colites chroniques sévères dépendantes des lymphocytes T CD4+	Saddlack 1993 Simpson 1995 Ma 1995
IL-2R $\alpha$	souris	knockout	Anémie --> survivants : colite Lymphoprolifération	Willerford 1995
G $\alpha$ i2	souris	knockout	Colite + adénocarcinome	Rudolph 1995
TCR $\alpha$ ou $\beta$	souris	knockout	Colite	Mombaerts 1993
MHC II	souris	knockout	Colite sévère	Mombaerts 1993
CD45RB	souris	SCID reconstituées	Colite médiée par des CD4+/CD45RB <sup>high</sup> TNF $\alpha$ et IFN $\gamma$ ↗	Powrie 1993
CD3 $\epsilon$ 26	souris	transgénique	Transplantation de moëlle : colite	Holländer 1995
HLA-B27/ $\beta$ 2 $\mu$ globuline	rat	transgénique	Colite médiée par les CD4+ IFN $\gamma$ ↗	Taurog 1994
N-cadherine	souris	chimère transgénique	Désagrégation des cellules cryptiques	Hermiston 1995
IL-7	souris	transgénique	Colite médiée par les CD4+ (IL-7 protéique ↘ )	Watanabe 1998
IL-5	souris	transgénique	Colite médiée par les CD3+ et les éos.	Lee 1997
IL-4	souris	transgénique	Inflammation jéjunale avec infiltrat d'éos	Vallance 1996

## B. Profil de cytokines dans les modèles animaux

### a) Les cytokines pro- et anti-inflammatoires

Dans ces modèles animaux de colite induite, les lésions intestinales sont associées à une augmentation de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (Autenrieth 1997; Tateishi 1997). Par contre, les souris transgéniques pour les cytokines inflammatoires ne développent pas de colites spontanées. Il en est de même pour les souris KO pour l'une ou l'autre de ces cytokines (Morales 1996), mais toutes continuent à pouvoir développer des réactions inflammatoires induites par des agents chimiques. Aucune de ces cytokines pro-inflammatoires n'est donc nécessaire ou suffisante au développement d'une lésion inflammatoire.

Ce qui explique pourquoi, parmi les modèles animaux invalidés pour une cytokine anti-inflammatoire, les souris IL-1RA<sup>-/-</sup> (Podolsky 1997), sont les seules à ne pas développer une colite induite. En effet, l'IL-1RA inhibe spécifiquement l'IL-1 $\beta$ , alors que l'IL-10 et le TGF $\beta$  sont plus pléiotropiques. Leur capacité à contrebalancer les excès d'une inflammation étant sérieusement invalidé, les souris IL-10<sup>-/-</sup> (Rennick 1997) présentent une inflammation diffuse localisée au niveau du côlon et de l'intestin grêle, tandis que les souris TGF $\beta$ 1<sup>-/-</sup> subissent une inflammation plus généralisée entraînant une mortalité élevée.

### **b) Cytokines immunorégulatrices et lymphocytes CD4+**

Les inflammations intestinales des souris KO pour TCR $\alpha$  ou  $\beta$  suggèrent un rôle important des lymphocytes T, tout comme les souris transgéniques pour CD3 $\epsilon$ 26 ou HLA-B27/ $\beta$ 2-microglobuline (tableau 7). Ces observations sont en accord avec les modèles de souris déficientes pour les gènes de l'IL-2 ou de l'IL-10, dont les colites semblent médiées par les lymphocytes CD4+ (pour revue: Morales 1996). L'importance des lymphocytes CD4+ dans le développement d'une colite est clairement démontrée chez les souris SCID reconstituées par des lymphocytes T CD4+/CD45RB<sup>high</sup>.

Or ces lymphocytes T représentent la principale source de cytokines immunorégulatrices dans la muqueuse intestinale. Chez les souris SCID développant des colites, une augmentation intracellulaire des cytokines de type 1 a été mise en évidence (Bregenholtant 1998). Une augmentation de la production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes par plusieurs modèles souris transgéniques a également été rapportée (Morales 1996). En outre, chez les souris IL-10<sup>-/-</sup> les lymphocytes produisent surtout de l'IFN $\gamma$  (Rennick 1997), ainsi que chez les souris IL-2<sup>-/-</sup> et ce, malgré une importante synthèse d'IL-10 (Autenrieth 1997).

La majorité des modèles animaux développent donc des colites où les lymphocytes CD4+ jouent un rôle primordial par l'intermédiaire notamment d'une production accrue d'IFN $\gamma$ .

## **3.2 Les cytokines dans la maladie de Crohn (MC)**

Pendant ces dix dernières années, de très nombreux travaux ont visé à rechercher la présence de cytokines dans les lésions chroniques de MC (voir tableaux). En fonction de la nature et de la sensibilité des techniques utilisées, ainsi qu'en raison de la nature des prélèvements réalisés (périphériques/muqueux; cellulaires/tissulaires), les résultats sont plus ou moins faciles à interpréter. Il nous a semblé nécessaire de privilégier les études réalisées *in situ*, qualitatives et surtout quantitatives.

### **A. Les cytokines de type 1/type 2**

Plusieurs études associent un profil de type 1 aux muqueuses intestinales enflammées de patients atteints d'une MC (pour revue: Romagnani 1997; tableau 8). Ainsi une augmentation de l'ARNm codant pour l'IFN $\gamma$  et l'IL-2 par rapport aux muqueuses saines est observée au niveau de biopsies coliques de MC (Niessner 1995, Mullin 1996) alors que l'IL-4 et l'IL-5 ne sont que rarement détectées et ne permettent donc pas une évaluation des variations de leur synthèse.

Tableau 8:

## Expression des cytokines de type1 et de type2 dans les lésions chroniques de MC

Cytokine	Techniques	Source	Résultats	Références
IL-2	Essai biologique(CTLL)	LPMC LPMC+PHA PBMC+PHA	MC < T (p<0,03) MC > T (p<0,03) MC = T	Gurbindo et al. 1993
	Essai biologique(CTLL)	LPMC	Pas d'IL-2 détectable	Matsuura et al. 1993
	Northern blot	LPMC+PHA	MC < T (p<0,01)	
	Essai biologique(CTLL)	LPMC	MC < T (p< 0,01)	West et al. 1996
	Northern blot	LPMC+PHA PBMC+PHA	MC < T MC < T	
	Essai biologique(CTLL)	LP CD4+	MC < T (p<0,05)	Kusugami et al. 1991
	Northern blot	LPMC+PMA	MC < T	
	ELISA et ELISPOT après stimulation CD2/CD28	PB CD4+ LP CD4+	MC < T (p<0,01) MC < T (p<0,01)	Fuss et al. 1996
	Rév. hémolytic plaque	LPMC	MC > T (p<0,002)	Breese et al. 1993
	ELISA après sonication	Biopsies	MC > T (p<0,005)	Brynskov et al. 1992
	RT-PCR semi-quant	Biopsies	MC < T	Radford-Smith et al. 1994
RT-PCR quantitative	PBMC Biopsies	MC (5/14) = T (6/13) MC > T (p<0,001)	Mullin et al. 1992	
RT-PCR quantitative	Biopsies	MC >T (p<0,02)	Niessner et al. 1995	
RT-PCR quantitative	Biopsies	MC > T (p<0,05)	Mullin et al. 1996	
IFN $\gamma$	Essai biologique	LPMC	MC > T (p<0,01)	Fais et al. 1991
	Rév. hémolytic plaque	LPMC	MC > T (p<0,001)	Breese et al. 1993
	Northern		MC (5/6) > T (0/9)	
	ELISA	LPMC	MC < T (p< 0,01)	West et al. 1996
	Northern blot	LPMC+PHA PBMC+PHA	MC < T MC < T	
	ELISA et ELISPOT après stimulation CD2/CD28	PB CD4+ LP CD4+	MC < T (p<0,01) MC < T (p<0,01)	Fuss et al. 1996
	RT-PCR semi-quant	Biopsies	MC > T	Radford-Smith et al. 1994
RT-PCR quantitative	Biopsies	MC > T (p<0,05)	Niessner et al. 1995	
RT-PCR quantitative	Biopsies	MC > T (p<0,05)	Mullin et al. 1996	
IL-12	ELISA	PBMC LPMC p40 p35	p40 non détectable MC (11/13) > T (1/13) MC (12/13) > T (6/13)	Monteleone et al. 1997
	Immunohistochimie	Biopsies	Macrophages (MC>T)	Parronchi et al. 1997
IL-15	FACS intracellulaire	PBMC	MC $\geq$ T (n.s.)	Kirman et al. 1997
IL-4	ELISPOT	cellules CD3+	MC < T (p<0,02)	Karttunen et al. 1994
	ELISA et ELISPOT	cellules CD4+	MC < T (p<0,01)	Fuss et al. 1996
	ELISA	LPMC	MC < T (p<0,01)	West et al. 1996
	Northern blot	LPMC+PHA	MC < T	
	RT-PCR qualitative	Biopsies	MC(0%) < T(82%)	Nielsen et al. 1996
	RT-PCR quantitative	Biopsies	MC (2+/11) et T (6+/14)	Niessner et al. 1995
	RT-PCR quantitative	Biopsies	MC (4+/12) et T (7+/17)	Mullin et al. 1996
FACS intracellulaire	clones CD4+	91% IFN+/IL4- (MC>T)	Parronchi et al. 1997	
IL-5	ELISA et ELISPOT	cellules CD4+	MC $\leq$ T	Fuss et al. 1996
	RT-PCR quantitative	Biopsies	MC (3+/12) et T (2+/17)	Mullin et al. 1996
IL-13	RT-PCR semi-quant	Biopsies	RCH > MC = T	Radford-Smith et al. 1994

Les résultats contradictoires obtenus avec des cellules mononucléées extraites de la *lamina propria* (LPMC) illustrent les risques d'interprétation erronée inhérents aux expériences *in vitro* (tableau). En effet, les techniques d'extraction des LPMC sont assez agressives et peuvent altérer l'état d'activation existant *in situ* de ces cellules. Ceci dit, les cellules à l'origine des cytokines

immunorégulatrices semblent en majorité être représentés par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Kusugami 1991; Fuss 1996). Après stimulation de la voie CD2/CD28 et par rapport à la production de LPMC contrôles, les lymphocytes CD4<sup>+</sup> muqueux des patients atteints de MC présentait une augmentation significative de la sécrétion d'IFN $\gamma$ , accompagnée d'une diminution de la sécrétion d'IL-2, d'IL-4 et d'IL-5 (Fuss 1996).

## **B. Les cytokines pro/anti-inflammatoires**

### **a) Les cytokines pro-inflammatoires**

- Niveau d'expression :

Toutes les études réalisées à ce jour (tableau 9) rapportent une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ , IL-6 et IL-8) au niveau des lésions chroniques de MC (Beck 1997). Certains auteurs suggèrent même l'existence d'une élévation des niveaux de production ou de synthèse de ces cytokines dans les muqueuses intestinales macroscopiquement et histologiquement saines de MC par rapport à des muqueuses normales (Sher 1995; Reimund 1996b; Andus 1997). Ces résultats ont été confirmés par une libération spontanée accrue de TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , et d'IL-6 par les cellules mononucléées extraites de la *lamina propria* saine de patient atteints de MC (Reimund 1996a; Reinecker 1993).

- Origine cellulaire et localisation tissulaire :

L'origine cellulaire principale de l'IL-1 $\beta$  sont les macrophages CD68<sup>+</sup>, alors que pour le TNF $\alpha$  se sont les éosinophiles et les mastocytes et dans une moindre mesure les macrophages (Beil 1995). Les macrophages positifs pour l'IL-1 $\beta$  sont majoritairement sous épithéliaux, alors que des macrophages TNF $\alpha$  positifs peuvent être trouvés de l'épithélium à la séreuse (Capello 1992, Murch 1993). Parmi les cellules de la sous-muqueuse positives pour le TNF $\alpha$ , des cellules CD3<sup>+</sup> et des neutrophiles ont également été incriminées (Murch 1993; Beil 1995), mais ces résultats n'ont pas été confirmés (Olson 1993). Si Beil et al. observe un marquage positif pour le TNF $\alpha$  dans les fibroblastes, les cellules de Paneth et les cellules épithéliales, ces données sont infirmées par les autres études qui s'accordent pour exclure toute production d'IL-1 $\beta$  ou de TNF $\alpha$  par les cellules épithéliales.

Les enterocytes ont été identifiés comme importante source d'IL-6 par certains auteurs (Jones 1993; Woywodt 1994) alors que d'autres privilégient les macrophages (CD14<sup>+</sup>), ainsi que les lymphocytes T (CD3<sup>+</sup>) et B (CD22<sup>+</sup>), en excluant toute production par les cellules épithéliales (Stevens 1993).

Lors d'études *in vitro* utilisant des LPMC stimulés par PWM, une déplétion en macrophages CD68<sup>+</sup> s'est traduite par une réduction de sécrétion de 90% pour le TNF $\alpha$  et de plus de 50% pour l'IL-1 $\beta$ , alors que la libération d'IL-6 n'était que faiblement diminuée (Reinecker 1993). Une expérience similaire a été menée sur une population de LPMC déplétée en macrophages CD14<sup>+</sup>. Peu présents dans la muqueuse saine (Smith 1997), ces macrophages participent essentiellement à l'infiltrat inflammatoire. L'inhibition de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  est de 60%, alors que celle du TNF $\alpha$  ne représente plus que 40%, tout comme la réduction de l'IL-6 (Rugtveit 1997).

Tableau 9 : Expression des cytokines pro- et anti-inflammatoires dans les lésions chroniques de MC.

Cytokine	Techniques	Matériel	Résultats	Références
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	ELISA	LPMC	MC > T (p<0,001)	Reinecker et al. 1993
	RIA	LPMC	MC > T (n.s.)	Gröttrup-Wolfers et al.1996
	ELISA	Biopsies LPMC	MC > T (p<0,001) MC > T (p<0,01)	Reimund et al. 1996(a)
	ELISA	Biopsies Biopsies	MC lésé > T (p<0,01) MC sain > T (p<0,05)	Reimund et al. 1996(b)
	RT-PCR quantitative	LPMC	MC: lésé> sain	Andus et al. 1993
	RT-PCR quantitative	Biopsies	MC > T (p<0,05)	Dionne et al. 1997
<b>IL-6</b>	Essai biologique	LPMC	MC > T (p<0,001)	Gröttrup-Wolfers et al.1996
	ELISA	LPMC	MC > T (p<0,001)	Reinecker et al. 1993
	ELISA	Biopsies	MC > T (p<0,05)	Sher et al. 1995
	ELISA	Biopsies	MC > T (p<0,01)	Hyams et al. 1995
	ELISA	Biopsies LPMC	MC > T (p<0,001) MC > T (p<0,01)	Reimund et al. 1996(a)
	ELISA	Biopsies Biopsies	MC lésé > T (p<0,01) MC sain > T (p<0,01)	Reimund et al. 1996(b)
	RT-PCR semi-quant.	Biopsies	MC > T (p<0,05)	Stevens et al. 1992
	RT-PCR semi-quant.	Biopsies	MC > T	Gilberts et al. 1994
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	RIA	LPMC	MC > T (p<0,01)	Youngman et al. 1993
	RIA	LPMC	MC > T (p<0,01)	Gröttrup-Wolfers et al.1996
	ELISA	LPMC	MC > T (p<0,001)	Reinecker et al. 1993
	ELISA	Biopsies	MC > T (p<0,001)	Brynskov et al. 1992
	ELISA	Biopsies	MC > T (p<0,05)	Sher et al. 1995
	ELISA	Biopsies	MC > T (p<0,001)	Nishiyama et al. 1994
	ELISA	Biopsies	MC > T (p<0,001)	Hyams et al. 1995
	ELISA	Biopsies LPMC	MC > T (p<0,001) MC > T (p<0,001)	Reimund et al. 1996(a)
	ELISA	Biopsies Biopsies	MC lésé > T (p<0,01) MC sain > T (p<0,01)	Reimund et al. 1996(b)
	ELISA	Biopsies	MC > T (p<0,0001)	Andus et al. 1997
	ELISA	Biopsies	MC > T (p<0,005)	Dionne et al. 1998
	RIA	Biopsies LPMC	MC > T (p<0,001) MC > T (p<0,001)	Casini-Raggi et al. 1995
	RT-PCR semi-quant	Biopsies	MC non perforative > T	Gilberts et al. 1994.
	RT-PCR quantitative	Biopsies	MC > T (p<0,05)	Dionne et al. 1997
<b>IL-1RA</b>	ELISA	Biopsies	MC > T (p<0,05)	Nishiyama et al. 1994
	ELISA	Biopsies	MC $\geq$ T (n.s.)	Hyams et al. 1995
	ELISA	Biopsies LPMC	MC $\geq$ T (n.s.) MC > T (p<0,05)	Casini-Raggi et al. 1995
	ELISA	Biopsies	MC > T (p<0,0001)	Andus et al. 1997
	ELISA	Biopsies	MC = T (n.s.)	Dionne et al. 1998
	RT-PCR semi-quant	Biopsies	MC non perforative > T	Gilberts et al. 1994.
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Dot blot	LPMC	MC > T	McCabe et al. 1993
	Northern blot	Biopsies	MC > T (TGF $\alpha$ : MC=T)	Babyatsky et al. 1996
	ELISA	Biopsies	MC > T (TGF $\alpha$ : MC=T)	
<b>IL-10</b>	ELISA	Biopsies	MC = T	Schreiber et al. 1995(b)
	RT-PCR qualitative	Biopsies	MC(78%) et T(92%)	Nielsen et al. 1996
	RT-PCR semi-quant	Biopsies	MC > T	Radford-Smith et al. 1994
	RT-PCR quantitative	Biopsies	MC > T (p< 0.005)	Niessner et al. 1996

Ces données suggèrent que dans les lésions chroniques de MC : 1) Les cellules à l'origine du TNF $\alpha$  sont quasi-exclusivement des macrophages CD68+, incluant des macrophages constitutivement présents dans la *lamina propria* normale et des macrophages invasifs CD14+, 2) Les cellules productrices d'IL-1 $\beta$  sont en majorité des monocytes/macrophages invasifs CD14+, 3) Les cellules produisant de l'IL-6 sont principalement des lymphocytes T et B ainsi que des monocytes/macrophages invasifs.

### **b) Les cytokines pro-inflammatoires comme marqueur d'activité**

Malgré quelques rapports contradictoires, il est maintenant admis qu'il existe une corrélation entre l'expression muqueuse des cytokines pro-inflammatoires et le degré d'activité de la maladie (Beck 1997). Toujours à la recherche d'un meilleur marqueur d'activité que l'indice établi par Best (CDAI), certains auteurs ont cherché à quantifier les cytokines pro-inflammatoires dans le sérum des patients. Les concentrations sériques de l'IL-1 $\beta$  et du TNF $\alpha$  restent faibles quelque soit l'activité de la MC (Nielsen 1993). Par contre les concentrations d'IL-6 circulante (Holtkamp 1995), ainsi que les récepteurs solubles du TNF $\alpha$  (Nielsen 1993) et de l'IL-6 (Mitsuyama 1995) semblent corrélés avec le degré d'activité de la maladie. L'IL-6 sérique pourrait même servir à prédire les récurrences postopératoires (Louis 1995). Ces données méritent néanmoins d'être confirmées et leurs limites mieux définies.

### **c) Le rapport IL-1RA/IL-1**

La notion d'équilibre entre cytokines pro et anti-inflammatoires est parfaitement illustrée par le rapport IL-1RA/IL-1 $\beta$ . En effet, si au niveau des lésions de MC une augmentation importante de la production d'IL-1 $\beta$  est observée, elle ne s'accompagne pas d'une élévation équivalente de la production d'IL-1RA (Nishiyama 1994; Hyams 1995; Andus 1997). Or un excès d'IL-1RA de 100 à 1000 fois est nécessaire pour bloquer au moins 50% des récepteurs d'IL-1 $\beta$  (Dinarello 1991). Le rapport penche donc en faveur de la cytokine proinflammatoire, et plus les lésions étudiées sont sévères, plus ce rapport est en faveur de l'IL-1 $\beta$  (Casini-Raggi 1995; Dionne 1998).

Mais ce rapport ne reflète qu'imparfaitement la complexité des mécanismes de régulation mise en oeuvre (Dinarello 1991). En effet, l'IL-1 $\alpha$  contrairement à l'IL-1 $\beta$  reste essentiellement cantonnée au cytoplasme des cellules productrices. En outre, aucune étude publiée à ce jour ne porte sur ICE (Interleukin-1 $\beta$  converting enzyme), une enzyme pourtant essentielle dans la transformation de la forme inactive de l'IL-1 $\beta$  en forme active et soluble. De l'autre côté, trois isoformes de l'IL-1RA ont été décrites, dont une soluble (sIL-1RA), sécrétée essentiellement par les cellules mononucléées, et deux formes intracellulaires (icIL-1RA type I et II), présentes dans les cellules épithéliales, les kératinocytes, les fibroblastes... Ainsi la synthèse d'icIL-1RA serait augmentée lors de poussées inflammatoires de MC alors qu'elle était quasi-indétectable dans la muqueuse normale (Cominelli 1996). La forme soluble (sIL-1RA), présente constitutivement dans la muqueuse saine, ne serait significativement augmenté qu'au niveau de l'épithélium.

Bien que les études d'association entre MICI et polymorphisme du second intron d'IL-1RA soient contradictoires (Satsangi 1996a), une étude récente suggère l'existence pour IL-1RA d'une association entre un génotype 2 et une inhibition de la production d'IL-1RA au niveau des muqueuses coliques de MICI (Andus 1997).

#### d) Rôle anti-inflammatoire de l'IL-10, de l'IL-4 et de l'IL-13

Classiquement, l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 sont considérées toutes trois comme des cytokines immunorégulatrices de type 2. Outre leur action inhibitrice vis à vis des cytokines de type 1, elles sont capables d'inhiber l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Beck 1997).

L'IL-10 diminue de manière dose-dépendante la synthèse et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Dans le même temps, elle est capable d'augmenter la sécrétion d'IL-1RA jusqu'au rétablissement d'un rapport IL-1RA/IL-1 normal (Schreiber 1995). Or il semblerait que l'IL-10 circulante (Kucharzik 1995) ainsi que l'IL-10 muqueuse (Niessner 1996) soient augmentées chez les patients atteints de MC par rapport aux témoins. Mais cette augmentation, si elle est confirmée, ne semble pas suffire à contenir l'action des cytokines pro-inflammatoires. Une synergie entre les différentes cytokines anti-inflammatoires semble nécessaire (Kucharzik 1997).

Or *in vitro*, bien que l'efficacité de l'action anti-inflammatoire de l'IL-10 sur la production de cytokines pro-inflammatoires reste identique entre témoins et patients atteints de MC, une inhibition de la réponse des monocytes/macrophages vis à vis de l'IL-4 et de l'IL-13 est observée dans la MC (Schreiber 1995b; Kucharzik 1996). Or les récepteurs de l'IL-4 et de l'IL-13 ont en commun leur chaîne  $\alpha$  (Chomorat 1997), dont le gène est justement présent dans le locus de susceptibilité pour la MC, qui vient d'être identifié sur le chromosome 16 (Hugot 1997).

Mais l'inhibition de la réponse des monocytes à une stimulation par l'IL-4 ne paraît pas lié à une diminution du nombre de récepteurs présent à la membrane (Rückert 1996). La régulation négative pourrait impliquer des éléments de la cascade de transduction du signal de l'IL-4. Stat 6 ne semble pas impliqué (Rückert 1996) suggérant une inhibition plus en aval, peut-être directement au niveau de la transcription des gènes des cytokines pro-inflammatoires. En effet, des composés anti-inflammatoires, comme l'IL-10 ou les corticoïdes, empêche la phosphorylation et dissociation du complexe cytoplasmique I-KB/NF-KB, inhibant ainsi la migration de NF-KB vers le noyau où il participe à la transcription des gènes des cytokines pro-inflammatoires (Akira 1997).

#### e) Le rôle du TGF $\beta$

Une augmentation significative de la synthèse de TGF $\beta$  a été décrite dans la muqueuse lésée de MC (Babysky 1996). Or cette cytokine est impliquée non seulement dans les processus de cicatrisation, mais également dans la modulation de l'activité macrophagique et le recrutement cellulaire (Beck 1997). Tout comme l'IL-10, le TGF $\beta$  participe à l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires.

### C. Les chimiokines

Mis à part l'IL-8, la première chimiokine décrite, peu d'études ont été entreprises dans le cadre des MICI sur d'autres CxC chimiokines (Gro, ENA-78, NAP-2, IP-10...) ou sur les C-C chimiokines (MCP-1, 2, 3 et 4, MIP-1 $\alpha$  et  $\beta$ , Eotaxine 1 et 2...). La majorité de ces études offre des informations qualitatives (présence ou non de la cytokine et origine cellulaire) et non quantitatives (tableau 10). Or la plupart des chimiokines sont exprimées de façon constitutive dans l'intestin et le côlon normal. En effet le GALT est activé en permanence, entraînant une migration constante de leucocytes dans la muqueuse intestinale (pour revue: MacDermott 1998).



Tableau 10 : Expression des chimiokines dans les lésions chroniques de MICI.

Chimiokine	Techniques	Materiel	Résultats	Références
<b>IL-8</b>	RIA	Biopsies	MC > T (p<0,01)	Izzo et al. 1993
	ELISA	Biopsies	MC > T (p<0,05)	Sher et al. 1995
	ELISA	Biopsies	RCH > T (p<0,01)	Nielsen et al. 1996
	ELISA	Biopsies	MICI > T (p<0,001)	Mitsuyama et al. 1994
	ELISA	Biopsies PBMC	MICI > T (p<0,01) MICI > T (p<0,01)	Reimund et al. 1997
	ELISA	Biopsies	RCH > MC > T (p<0,05)	Ina et al. 1997
	ELISA	cell. cryptiques	MICI > T (p<0,05)	Gibson et al. 1995
	ELISA	Macrophages	MICI (20/24) > T (3/19)	Grimm et al. 1996 (a)
	ELISA	Biopsies	RCH > MC > T (p<0,01)	Daig et al. 1996
	Hybridation <i>in situ</i>	Biopsies	MICI > T	Mazzucchelli et al. 1994
	RT-PCR qualitative	Biopsies	RCH(7/8)>MC(3/6)≥T (1/12)	Isaacs et al. 1992
	RT-PCR semi-quant	Biopsies	RCH > MC = T (p<0,05)	McLaughlan et al. 1997
	RT-PCR quantitative	Biopsies cell. épithéliales	RCH > MC > T (p<0,01) RCH > MC > T (p<0,01)	Izutani et al. 1995
<b>Gro α</b>	RT-PCR qualitative	Biopsies	RCH (8/8) > T (1/12) MC (2/6)	Isaacs et al. 1992
<b>α, β et γ</b>	RT-PCR quantitative	Biopsies	RCH > T (p<0,05)	Yang et al. 1997 (a)
<b>ENA-78</b>	Hybridation <i>in situ</i>	Biopsies	MICI > T (p<0,01)	Z'Graggen et al. 1997
	RT-PCR semi-quant. ELISA	Biopsies	RCH > MC et T (p<0,01) RCH > MC et T (p<0,05)	Keates et al. 1997
	RT-PCR quantitative	Biopsies	RCH > T (p<0,05)	Yang et al. 1997 (a)
<b>IP-10</b>	Hybridation <i>in situ</i>	Biopsies	MICI > T (p<0,005)	Grimm et al. 1996 (c)
	RT-PCR quantitative	Biopsies	RCH > T (p<0,05)	Yang et al. 1997 (a)
<b>MCP-1</b>	Hybridation <i>in situ</i>	Biopsies	MICI > T (p<0,01)	Mazzucchelli et al. 1996
	RT-PCR quantitative	Biopsies	MICI > T (p<0,05)	Reinecker et al. 1995
	RT-PCR quantitative	Biopsies	RCH (32/34) > T (2/10)	Yang et al. 1997 (b)
<b>RANTES</b>	Hybridation <i>in situ</i>	Biopsies	MICI > T (p<0,05)	Mazzucchelli et al. 1996
	Hybridation <i>in situ</i>	Biopsies	MICI > T (p<0,005)	Grimm et al. 1996 (c)
	RT-PCR quantitative	Biopsies	RCH (31/34) = T (10/10)	Yang et al. 1997 (b)
<b>MIP-1α</b> <b>MIP-1β</b>	Hybridation <i>in situ</i>	Biopsies	MICI > T (p<0,005)	Grimm et al. 1996 (c)
<b>Eotaxin</b>	Northern blot	Biopsies	MICI > T	Garcia-Zepeda et al. 1996

### a) L'interleukine 8

Tant pour la RCH que pour la MC, tous les travaux récents (Mitsuyama 1994; Daig 1996; Reimund 1997) rapportent une augmentation de la production d'IL-8 dans les lésions chroniques par rapport aux muqueuses saines des témoins (pour revue: MacDermott 1998; tableau 1). Bien que les atteintes iléales soient majoritaires dans la MC, presque toutes ces études portent sur des biopsies coliques. Le choix de ces auteurs de privilégier le côlon dans leur étude de la MC peut se justifier par sa plus grande facilité d'accès et par le souci de réaliser des comparaisons entre RCH et MC sur le même type de muqueuse.

Seul le travail d'Izutani, réalisé par RT-PCR quantitative sur des prélèvements de pièces opératoires après résection, a donné lieu à des différences significatives entre RCH et MC (Izutani 1995). De plus, il s'agit de la seule étude portant sur l'ARNm codant pour l'IL-8 où des quantités significativement plus élevées d'IL-8 ont été mis en évidence chez les patients atteints de MC. En effet, ni les études par RT-PCR qualitative (Isaacs 1992) ni même les résultats obtenus par RT-PCR semi-quantitative (McLaughlan 1997) ne mettent en évidence une différence significative entre

patients atteints de MC et témoins, mais il est à noter que ces études utilisent des biopsies coliques beaucoup plus petites que les prélèvements effectués par Izutani sur les pièces opératoires de MC. Or contrairement à la RCH, l'IL-8 n'est pas localisée de manière homogène au niveau des lésions de MC (Mazzucchelli 1994).

Des études d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie sur coupes sériées suggèrent que la principale source cellulaire d'IL-8 serait les macrophages et les neutrophiles de l'infiltrat inflammatoire (Grimm 1996a; Mazzucchelli 1994). De plus, une synthèse d'IL-8 par des macrophages coliques purifiés a été mise en évidence chez 20 patients atteints de MICI sur 24, comparé à seulement 3 témoins sur 19 (Grimm 1996a). Les neutrophiles étant des cellules de courte durée de vie, leur purification à partir de la *lamina propria* s'avère malaisée ce qui rend leur étude *in vitro* aléatoire.

Des nombreux travaux utilisant des lignées de cellules épithéliales ont démontré que celles-ci pouvaient synthétiser et sécréter *in vitro* des cytokines proinflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6) et des chimiokines (IL-8, ENA-78, MCP-1). En outre certains auteurs ont affirmé avoir réussi à purifier des cellules épithéliales (Izutani 1995), voire même des cellules cryptiques (Gibson 1995), dont la production d'IL-8 était augmentée dans les MICI. Ces résultats n'ont pu être confirmés ni par hybridation *in situ*, ni par immunohistochimie (Grimm 1996a; Daig 1996)

### **b) Les autres CXC chimiokines**

Si de nombreuses études portent sur l'IL-8 dans les MICI, seuls quelques rares travaux se sont intéressés aux trois isoformes de Gro :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Leurs cibles principales sont les neutrophiles, via le récepteur CXCR-2. Mais Gro  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , comme l'IL-8 et RANTES, peuvent également faire preuve de pouvoirs chimiotactiques vis à vis des lymphocytes intraépithéliaux (Roberts 1997). La majorité des études est restreinte à la seule RCH où, à l'instar de l'IL-8, la détection de l'ARNm des CXC chimiokines est plus aisée. En effet, l'absence d'accroissement visible de la synthèse d'IL-8 lors d'études par RT-PCR pourrait provenir de la répartition non homogène des cellules productrices d'IL-8, comme le suggère une étude par hybridation *in situ* (Mazzucchelli 1994). Ainsi, lors d'une étude menée par RT-PCR qualitative (Isaacs 1992), tant pour Gro $\alpha$  et que pour l'IL-8, les ARNm furent détectés dans les RCH en poussée (respectivement 8/8 et 7/8) alors qu'ils étaient absents dans les formes quiescentes (0/8 et 1/8) et les témoins non inflammatoires (1/12 et 1/12), mais également de la majorité des MC quiescentes (3/13 et 4/13) ou en poussée (2/6 et 3/6). Une étude quantitative récente confirme l'augmentation de synthèse des 3 isoformes de GRO, ainsi que d'ENA-78 et d'IP-10, dans les muqueuses lésées de RCH (Yang 1997).

En outre, contrairement à l'IL-8 qui est indétectable dans le sérum des patients même lors des poussées (2 patients sur 102), Gro $\alpha$  est présente chez tous les sujets, même les contrôles (Mitsuyama 1996). Une augmentation significative est observée au niveau des sérums de patients atteints de RCH par rapport aux patients avec MC, et ces MICI présentent des niveaux de Gro $\alpha$  plus élevés lors des poussées que dans les formes quiescentes, les autres formes de colites ou les témoins sains. L'existence d'une corrélation entre les niveaux sériques de Gro $\alpha$  et de protéine C-réactive suggère que Gro $\alpha$  pourrait servir de marqueur d'activité pour les MICI (Mitsuyama 1996).

Si les cellules à l'origine de Gro $\alpha$  sont surtout des macrophages (Mitsuyama 1996), ENA-78 est majoritairement produite par les cellules épithéliales (Z'Graggen 1997; Keates 1997). La synthèse et la production d'ENA-78 par des biopsies coliques est accrue dans la RCH, mais aucune augmentation significative n'est observée pour la MC (Keates 1997), peut être en raison

d'une destruction importante de l'épithélium au niveau des lésions (Z'Graggen 1997). Si dans la RCH peu de cellules de la *lamina propria* synthétisent l'ENA-78, dans la MC le nombre de macrophages CD68+ impliqués dans cette synthèse augmente parallèlement à la sévérité des lésions (Z'Graggen 1997).

Contrairement aux autres CXC chimiokines, l'IP-10 (IFN $\gamma$ -inducible Protéine-10) ne possède pas de motif ELR et se lie au récepteur CXCR3, présent essentiellement sur les monocytes et les lymphocytes T. Surexprimé au niveau des lésions de MC, IP-10 est exprimé par les macrophages CD68+ et les lymphocytes T CD3+, ainsi que par des cellules endothéliales (Grimm 1996c).

### c) MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1)

La première C-C chimiokine mise en évidence fut MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1). Si sa cible principale est le monocyte/macrophage, elle montre également des pouvoirs chimiotactiques vis à vis des lymphocytes T et des cellules NK via les récepteurs CCR-2.

Comme bon nombre d'autres chimiokines, MCP-1 est exprimée de façon constitutive dans l'intestin et le côlon normal. Dans les MICI, cette faible expression de base se voit significativement augmentée dans les zones inflammatoires de MC et de RCH, mais également au niveau des diverticulites (Reinecker 1995). Cette expression élevée ne serait donc pas spécifique des MICI.

Dans la muqueuse normale, MCP-1 serait d'origine épithéliale, alors que dans les lésions de MICI, MCP-1 serait également produit par des cellules de la *lamina propria* (Reinecker 1995). Si la synthèse de MCP-1 par des cellules épithéliales n'a pu être confirmée, MCP-1 semble bien synthétisée et produite par des monocytes invasifs CD14+, ainsi que par des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales (Grimm 1996b; Mazzucchelli 1996).

### d) Les autres C-C chimiokines

RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted) ainsi que Macrophage Inflammatory Proteins 1 $\alpha$  et  $\beta$  (MIP-1 $\alpha$  et  $\beta$ ) sont essentiellement impliqués, par l'intermédiaire des récepteurs CCR1, CCR4 et CCR5, dans la migration des monocytes et des lymphocytes T activés. Alors que RANTES est connue pour son action sur les lymphocytes T mémoire CD45RO, MIP-1 $\alpha$  attire plutôt les lymphocytes CD8+ et MIP-1 $\beta$  les lymphocytes CD4+ (Rollins 1997). Dans les MICI, le nombre de cellules exprimant RANTES, MIP-1 $\alpha$  et  $\beta$  semble augmenter avec la sévérité des lésions (Grimm 1996c). Par contre, une étude menée par RT-PCR quantitative dans la RCH, ne parvient pas à confirmer cette augmentation de synthèse de RANTES (Yang 1997b).

Ces C-C chimiokines se retrouvent majoritairement près des ulcérations et au niveau des granulomes en formation. Elles sont synthétisées par des macrophages (CD68+) et des lymphocytes T (CD3+), ainsi que par des cellules endothéliales (Grimm 1996c). RANTES semble plus particulièrement synthétisé par les lymphocytes intraépithéliaux (Mazzucchelli 1996).

Mais RANTES, MIP-1 $\alpha$  et  $\beta$  agissent également sur les éosinophiles et les basophiles via les récepteurs CCR1 et CCR3. La principale chimiokine responsable du recrutement des éosinophiles est l'éotaxine qui agit par l'intermédiaire du récepteur CCR-3. L'éotaxine semble essentiellement présente dans l'intestin grêle et le côlon. En outre, la synthèse de l'éotaxine serait plus élevée dans les lésions coliques de MC et de RCH, par rapport aux muqueuses de patients atteints de cancer du côlon (Garcia-Zepeda 1996).

## BUTS DU TRAVAIL

A ce jour, toutes les études s'intéressant aux cytokines dans la maladie de Crohn ont été réalisées sur des lésions chroniques. De fait, les profils de cytokines observés risquent de ne pas être le reflet fidèle des événements immunologiques ayant conduit au développement de ces lésions. D'où l'intérêt et l'originalité du modèle de récurrence postopératoire, développé dans le "Service des Maladies de l'Appareil Digestif et de la Nutrition" du CHRU de Lille.

Trois mois après la résection chirurgicale, des biopsies endoscopiques sont prélevées en amont de l'anastomose afin de vérifier si des signes histologiques de récurrence sont perceptibles. C'est malheureusement le cas pour plus de 50% des patients opérés. Ces lésions naissantes vont permettre d'étudier les événements immunopathologiques à l'origine, dans un premier temps, de nouvelles lésions endoscopiques puis d'une récurrence clinique de la maladie.

Tous les prélèvements intestinaux ont été réalisés au niveau de l'iléon terminal, localisation privilégiée de la MC. Or, la majorité des études réalisées à ce jour n'utilisent que des biopsies du côlon plus faciles d'accès. Afin de vérifier la pertinence d'une telle distinction, des comparaisons ont été faites entre prélèvements iléaux et prélèvements coliques.

Le choix des cytokines étudiées s'est dans un premier temps porté sur les cytokines immunorégulatrices et leur profil de synthèse dans les muqueuses iléales de MC. Il s'agit de la première étude de cette envergure. En effet :

- elle permet de comparer, chez un même patient, les muqueuses iléales normales aux lésions iléales naissantes ainsi que chroniques.
- elle porte sur 5 cytokines immunorégulatrices : 2 de type 1 (IL-2 et IFN $\gamma$ ) et 3 de type 2 (IL-4, IL-5, IL-13).
- aucun des malades n'était sous traitement anti-inflammatoire lors de l'étude.
- tous les prélèvements ont été réalisés au niveau de l'iléon terminal, qui est la localisation privilégiée de la MC.

Les différences observées quant aux populations de granulocytes composant les infiltrats inflammatoires des lésions naissantes et chroniques, nous ont conduits à nous intéresser aux recrutements cellulaires dans les muqueuses intestinales des patients atteints de MC. En effet, les lésions naissantes sont particulièrement riches en éosinophiles alors que les lésions chroniques se caractérisent par un infiltrat riche en neutrophiles. Nous avons donc étudié, dans ces deux types de lésions :

- la synthèse de l'éotaxine et du MCP-4, et le recrutement tissulaire des éosinophiles.
- la synthèse et la production d'IL-8 et de Gro $\alpha$ , et le recrutement des neutrophiles.

Sachant que ces granulocytes invasifs étaient capables de produire des cytokines immunorégulatrices, nous avons voulu déterminer l'importance de ce phénomène. Dans un premier temps, en utilisant une technique intracellulaire de cytométrie en flux, nous avons tenté d'établir la liste des cytokines immunorégulatrices présentes dans les éosinophiles et les neutrophiles. Puis nous avons essayé de quantifier cette production afin de mesurer l'impact que cette production pouvait avoir sur l'immunité locale.

**MATERIEL**  
**&**  
**METHODES**

## **1. Les patients**

### **1.1 Les différents types de prélèvements**

On distingue d'une part les prélèvements sanguins et d'autre part les prélèvements tissulaires. Ces derniers se présentent soit sous forme de biopsies ( $4\pm 1\text{mg}$ ), soit sous forme de fragments de muqueuse ( $10\pm 2\text{mg}$ ) prélevés directement sur les pièces opératoires au niveau des zones lésées et macroscopiquement saines.

En effet, les lésions sévères nécessitent une résection chirurgicale. Au cours de cette intervention, une iléoscopie per-opératoire rétrograde est réalisée et des biopsies étagées sont prélevées en amont de la future cicatrice d'anastomose, en zone macroscopiquement saine. Ensuite ces biopsies, ainsi que les prélèvements réalisés sur la pièce opératoire, sont soit directement congelées dans de l'azote liquide puis stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  (RT-PCR qualitative et quantitative, immunohistochimie), soit fixées en paraformaldéhyde et incluses en paraffine (étude histologique, immunohistochimie, hybridation *in situ* et PCR *in situ*).

Douze semaines plus tard, les patients se soumettent à un examen clinique, biologique et morphologique complet, avec un premier contrôle endoscopique afin de juger de la récurrence ou non de la maladie. Cette récurrence iléale est appréciée selon les critères endoscopiques (Rutgeerts 1990). A cette occasion de nouvelles biopsies sont systématiquement prélevées en amont de l'anastomose chez tous les patients. Chaque lésion endoscopique détectée fait également l'objet d'une série de biopsies.

Ce programme a reçu l'accord du Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Lille.

### **1.2 Choix des témoins et des malades**

#### **A. Les patients atteints de MC**

##### **a) Critères d'inclusion des patients**

- Patients ayant donné leur consentement écrit, âgés de 18 à 70 ans, ayant une MC avec atteinte grêlique ou iléocolique nécessitant une résection chirurgicale.
- L'anastomose devra être accessible au coloscope.
- Les patients ne prendront aucun traitement de fond connu pour son efficacité dans la MC dans les 15 jours précédant l'intervention (hormis une éventuelle assistance nutritionnelle), ni durant les 3 mois suivant l'opération.

##### **b) Critères d'exclusion**

- Les patients ayant une iléostomie, une colostomie définitive ou une procto-colectomie.

#### **B. Les témoins**

- Patients devant passer une endoscopie de routine.
- Donneurs de sang du CRTS.

## **2. Purification des cellules**

### **2.1 Purification des cellules périphériques**

De 10 à 40 ml de sang ont été recueillis et placés sur héparine. Dans certains cas, 2 à 3 ml ont été placés 1 heure sur glace afin de récupérer le plasma après décantation. Les prélèvements ont été stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

Le reste du sang a été dilué au demi dans du PBS. Ensuite les PBMC ont été isolés par centrifugation (20min à 18000rpm) sur un gradient de Percoll (densité = 1,082) (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Après sédimentation des granulocytes, les érythrocytes sont lysés dans une solution (0,15M NH<sub>4</sub>Cl + 0,01M NaHCO<sub>3</sub> + 0,01M EDTA). Les polynucléaires sont ensuite lavés et resuspendus dans du RPMI 1640. Les cellules récupérées sont en moyenne à 95% des neutrophiles et à 4% des éosinophiles. La contamination par des PBMC est de l'ordre de 1%.

### **2.2 Purification des cellules de la lamina propria**

Au bloc opératoire, un fragment de plusieurs centimètres carré de paroi intestinale est prélevé. Ce fragment sera conservé dans un milieu de culture (RPMI 1640, HEPES, Glutamine (200mM), sérum de veau fœtal 10%). Les cellules seront ensuite purifiées selon une méthode validée (Davies 1981) comprenant les étapes suivantes :

- lavage de la pièce 15 min à 37°C en RPMI, DTT 1mM
- lavage en HBSS (Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> free, SVF 10%)
- récupération des lymphocytes intraépithéliaux par 6 x 30 min à 37°C en RPMI + SVF 2% + EDTA 1mM.

Après élimination de la couche épithéliale, dissection et élimination des couches musculuse et séreuse, la *lamina propria* est digérée pendant 90 minutes à 37°C par la collagénase (90U/ml de RPMI, sous agitation) avant d'être dilacérée mécaniquement à l'aide d'un potter.

Les cellules récupérées de l'épithélium et de la *lamina propria* seront ensuite filtrées sur membrane de nylon, lavées, puis finalement purifiées sur gradient de Ficoll. Les cellules mononucléées seront directement mises en culture ou conservées en milieu de culture à 4°C pour l'étude en cytométrie en flux ou la réalisation de lames de cyto-centrifugation.

## **3. Les techniques d'études des cytokines**

### **3.1 Avantages et inconvénients des différentes techniques**

#### **A. Techniques de détection de l'ARNm**

L'ARNm étant aisément dégradable, il est primordial que les prélèvements soient congelés le plus rapidement possible après l'opération. De plus, toutes les techniques destinées à étudier l'ARNm doivent impérativement être réalisées dans des conditions dites « RNase free » avec du matériel traité à cet usage.

En fonction de la réponse recherchée, diverses techniques sont à notre disposition: 1) pour savoir si une cytokine donnée est synthétisée ou non au moment du prélèvement (Northern blot,

Riboquant, RT-PCR qualitative), 2) pour identifier les cellules à l'origine de telle ou telle cytokine (hybridation *in situ*, PCR *in situ*), 3) pour quantifier l'ARNm synthétisé (RT-PCR semi-quantitative, RT-PCR compétitive, ELISA PCR).

La technique de **northern blot** permet la détection d'ARNm par transfert sur une membrane de nylon suivi d'une hybridation par des ribosondes marquées spécifiques de la cytokine recherchée. Cette technique bien établie pose des problèmes de sensibilité. En effet, pour détecter le peu d'ARNm de cytokines immunorégulatrices susceptible d'être synthétisé, il faut des quantités importantes d'ARN total (5-20µg). Ce qui pose problème lorsqu'on travaille avec des biopsies. De plus, le nombre de cytokines qu'on peut étudier avec une seule membrane est fortement limité car la sensibilité diminue à chaque hybridation/déhybridation.

Une nouvelle technique dérivée du Northern blot, le **Riboquant**, permet de s'affranchir de ce handicap. En effet, l'hybridation ne se fait plus avec une seule sonde à la fois, mais avec une multisonde qui permet la détection en une seule fois d'une dizaine de cytokines et de 2 standards. Mais le problème de la sensibilité et des quantités d'ARN total à utiliser demeure.

La technique de loin la plus sensible est la **RT-PCR**. Après rétrotranscription (RT) des ARN messenger (ARNm) en ADN complémentaire (ADNc), une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) va permettre l'amplification exponentielle et spécifique de l'ADNc de la cytokine étudiée. Le produit de cette amplification sera visible sur gel d'agarose en présence de BET. Du fait même de cette amplification, cette technique nécessite de nombreux contrôles afin d'exclure tout faux positif dû à des contaminations.

Aucune des techniques ci-dessus ne permet d'identifier le type cellulaire et la localisation tissulaire des cellules synthétisant la cytokine étudiée. L'**hybridation *in situ*** permet de répondre à cette demande. La détection de l'ARNm se fait par hybridation de ribosondes marquées à l'UTP S<sup>35</sup>. Les avantages de cette technique tiennent à sa grande sensibilité (due à l'utilisation de sondes chaudes et à des durées de révélation pouvant aller jusqu'à un mois) et à la possibilité d'identifier les cellules. Son inconvénient tient à la difficulté technique et à la longueur du temps de révélation.

La **RT-PCR *in situ*** est une nouvelle technique qui reste encore très controversée et qui nécessite l'achat d'un thermocycler spécialement conçu pour chauffer des lames. Elle allie les avantages (forte augmentation du signal) et les inconvénients (faux positifs) de la PCR classique, à la rapidité de l'immunohistochimie. Beaucoup plus sensible et rapide que l'hybridation *in situ*, elle rend en outre l'identification des cellules marquées plus facile.

## **B. Techniques de détection des protéines**

En fonction du résultat attendu, diverses techniques sont à notre disposition: 1) pour savoir si une cytokine donnée est produite ou non au moment du prélèvement (immunohistochimie, cytométrie de flux) 2) pour identifier les cellules à l'origine de telle ou telle cytokine (immunohistochimie, cytométrie de flux) 3) pour quantifier les cytokines sécrétées (ELISA), 4) pour vérifier la fonctionnalité d'une chimiokine (chimiotactisme).

L'**immunohistochimie (IHC)** vise à la mise en évidence de la forme protéique des cytokines à l'aide d'anticorps mono- ou polyclonaux. Cette technique permet essentiellement de localiser et d'identifier les cellules productrices de cytokines dans la muqueuse. L'identification peut être confirmée après extraction des cellules de la muqueuse intestinale et double marquage en **cytométrie en flux**. Cette technique permet de comparer les quantités de cytokines intracellulaires de chaque type cellulaire alors que l'IHC ne permet qu'un comptage grossier du nombre de cellules marquées par champ (x400).



Mais pour réellement quantifier les cytokines muqueuses, il faut avoir recours à la technique d'ELISA. Deux approches sont envisageables. L'une consiste à mesurer les quantités de cytokines sécrétées par une biopsie mise en culture, mais cette approche ne permet pas de détecter les cytokines agissant localement et ne quittant pas la biopsie. La meilleure approche consiste donc à broyer la biopsie et à quantifier les cytokines présentes dans le surnageant.

### **C. Choix des techniques**

Dans un premier temps, nous avons cherché à quantifier la production de cytokines immunorégulatrices au niveau des muqueuses intestinales de patients atteints de maladie de Crohn. Les quantités de cytokines attendues étant très faibles et les kit ELISA ultrasensibles n'existant pas encore, nous avons privilégié la RT-PCR semi-quantitative. Cette technique offre néanmoins des résultats plus délicats à interpréter que la RT-PCR quantitative qui utilise un compétiteur interne. Après les résultats préliminaires obtenus avec l'IFN $\gamma$  et l'IL-10, nous avons donc cherché et obtenu, par l'intermédiaire du Dr Emilie, des compétiteurs optimisés pour la quantification des cytokines immunorégulatrices et des cytokines inflammatoires (figure 3). Pour les chimiokines, nous avons dû modifier ces compétiteurs afin d'y inclure, par une série de clonage, les amorces de l'éotaxine, du MCP-4 et du CCR3 (figure 4).

Afin d'identifier les cellules de la muqueuse intestinale à l'origine des cytokines synthétisées, nous avons hésité un temps entre l'hybridation *in situ* et la RT-PCR *in situ*, avant de nous en tenir à l'immunohistochimie. En effet, c'est une technique offrant des résultats rapides et relativement simple à mettre en oeuvre. Les cellules positives sont plus faciles à identifier que dans la cas de l'hybridation *in situ*, où elles sont plus ou moins masquées par l'importance du marquage. Les risque de faux positifs sont nettement plus restreint que pour la PCR *in situ*. Cette technique est essentiellement utilisée pour la détection d'ADN ou d'ARN viral (O'Leary 1996).

Finalement, nous avons retenu pour l'étude des cytokines *in vivo* :

- la RT-PCR compétitive, pour la quantification des cytokines synthétisées.
- l'immunohistochimie, pour la localisation et l'identification des cellules responsables de cette synthèse.

Pour l'étude des cytokines *in vitro* :

- la cytométrie de flux, pour l'identification des cellules productrices et la quantification intracellulaire de cette production.
- l'ELISA, pour la quantification des cytokines sécrétées.
- l'étude du chimiotactisme en chambre de Boyden, pour la fonctionnalité.

## **3.2 La RT-PCR**

### **A. Extraction et préparations des prélèvements**

En raison de la grande l'hétérogénéité des biopsies, les prélèvements ont été réalisés par paires au niveau des lésions naissantes. Les biopsies congelées sont ensuite stockées à -80°C, jusqu'à l'extraction de l'ARN. Les biopsies seront alors directement placées dans le RNazol (Bioprobe, Montreuil, France), avant d'être homogénéisées par broyage mécanique. L'extraction de l'ARN total, réalisée selon le protocole du fabricant, est basée sur l'utilisation de guanidium isothiocyanate.

La seconde étape consiste à éliminer toute trace de contamination par de l'ADN par un traitement de l'ARN extrait, de 30 minutes à 37°C en présence de 20 à 50 unités de DNase I "RNase-free" (Boehringer, Mannheim, Allemagne). La Dnase est ensuite inactivée par un passage de 10 minutes à 70°C, suivi d'un phénol-chloroforme. La quantité et la pureté de l'ARN, récupérée après précipitation à l'isopropanol, est estimée par son absorbance à 260 et 280 nm.

## **B. La réverse transcription**

L'ARN total (5µg/ml) est rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) dans un volume final de 20µl. Les structures secondaires de l'ARN sont d'abord dénaturées à 70°C pendant 5 minutes dans 10µl d'eau, puis la transcription en ADNc est réalisée à 37°C pendant une heure en présence de 4µl de tampon (5x) (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France), 2µl de DTT, 1µl d'oligo-dT16 (0.8 mg/ml) (Pharmacia), 1 µl de dNTPs (10mM) (Pharmacia), 1µl de RNAsine (4000 U/ml) (Promega, Lyon, France) et 1µl de Moloney murine leukemia virus (MMLV) réverse transcriptase (200U/ml) (Gibco BRL). L'ADNc obtenu ainsi est dénaturé pendant 2 minutes à 100°C, pour être ensuite congelé à -20 °C jusqu'à utilisation.

## **C. La PCR semi-quantitative**

### **a) La mise au point**

La mise au point des conditions de PCR passe par une série d'étapes :

1. Vérification qualitative et quantitative de la réverse transcription par une PCR utilisant un standard : la  $\beta$ -Actine. Avec 25 cycles, les produits de PCR doivent être clairement visibles sur gel d'agarose. Dans le cas contraire, l'ARNm extrait et transcrit est insuffisant pour une analyse quantitative et écarté de l'étude. Parallèlement, les prélèvements donnant sur gel les bandes les plus importantes sont dilués (5x), afin d'offrir des résultats plus homogènes.

2. Détermination du nombre optimal de cycles pour chaque cytokine, ainsi que pour la  $\beta$ -Actine. En effet, le nombre de cycles nécessaires à rendre visible un produit de PCR (10ng) varie selon la quantité initiale d'ADNc correspondante à chaque cytokine. Si ce nombre est de l'ordre de 25 pour la  $\beta$ -Actine, il avoisine les 40 pour les cytokines immunorégulatrices. Mais lorsqu'un produit de PCR devient visible sur gel, le nombre de brin d'ADN est tel que la réaction de polymérisation n'est plus totalement linéaire: 1 cycle de PCR ne permet plus de doubler la quantité d'ADN amplifiée (figure 1). Plutôt que de diluer encore l'ADNc dont nous disposons, il est plus simple de réduire légèrement le nombre de cycles. Le produit de PCR n'est plus visible sur gel mais reste quantifiable après un Southern blot. Chaque sonde interne (Tableau 1) étant couplé à un P<sup>32</sup>, la quantité de radioactivité mesurée par le phosphor-Imager est représentative de la quantité de sonde hybridée et donc de la quantité l'ADN amplifié lors de la réaction de PCR. Lorsqu'on se place dans la phase linéaire de l'amplification, une différence de 10x entre 2 mesures du Phosphor-Imager correspond bien à une différence de synthèse muqueuse de 10x.

Le nombre optimal de cycles de PCR dans ces conditions est donc de :

- 21 cycles pour la  $\beta$ -Actine
- 36 cycles pour l'IFN $\gamma$
- 38 cycles pour l'IL-10

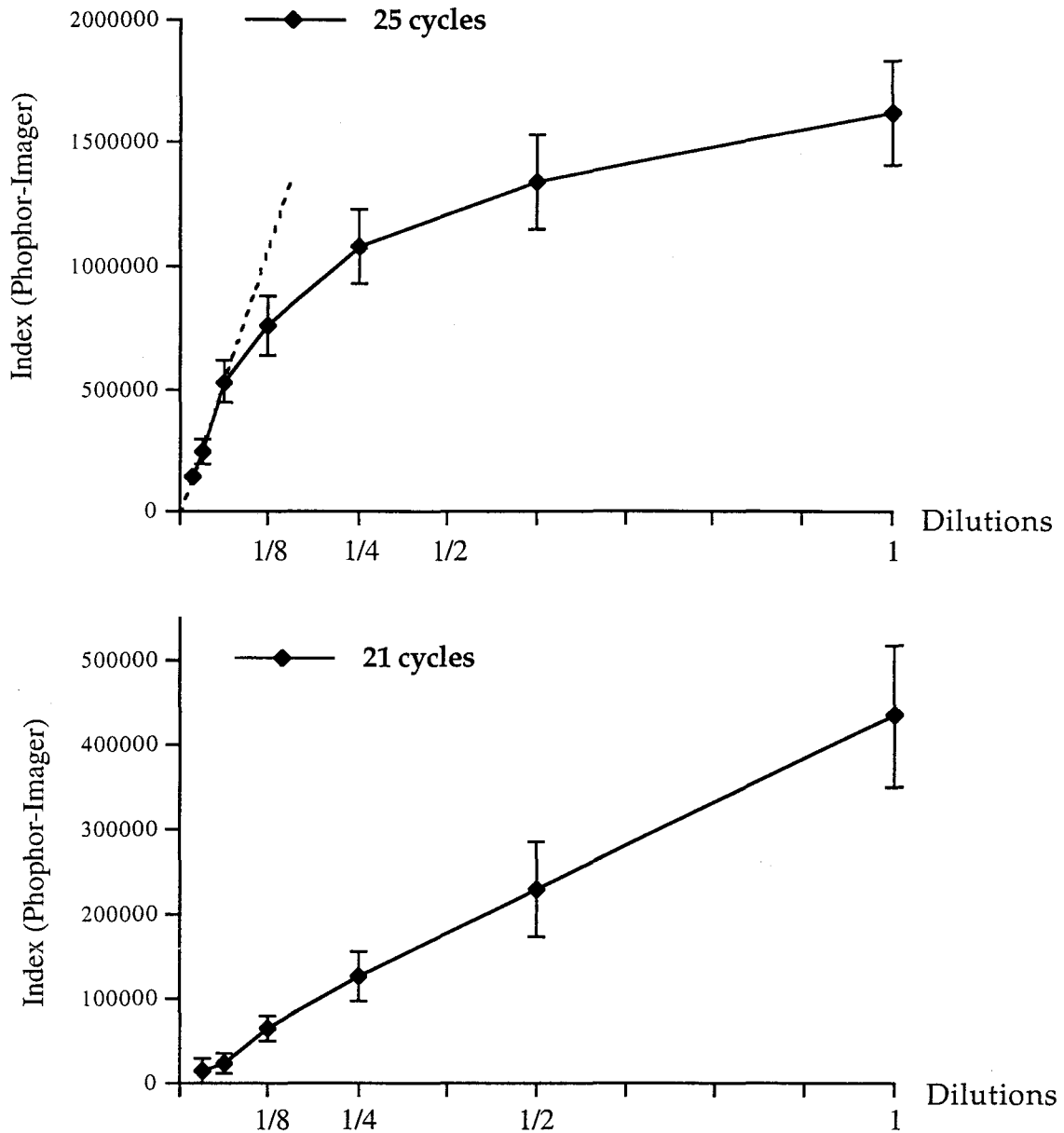


Figure 1 : Etablissement du nombre optimal de cycle permettant d'être dans la phase exponentielle de la réaction de PCR. Pour la  $\beta$ -Actine : A) Plateau à 25 cycles, B) Phase linéaire à 21 cycles.

3. Les résultats obtenus pour ces 2 cytokines doivent ensuite être rapportés aux résultats du standard. En effet, les quantités de  $\beta$ -Actine correspondent grossièrement aux nombre de cellules présentes dans chaque prélèvement muqueux. Ainsi une muqueuse normale, une muqueuse présentant une infiltrat inflammatoire et une muqueuse profondément lésée peuvent être comparées, sans que le nombre de cellules ne vienne fausser les résultats.

**b) La PCR**

L'amplification s'effectue à partir d'1µl d'ADNc placé dans un volume final de 25µl. Le mélange réactionnel est composé de 0.5µl de chaque amorce (20mM) (tableau 1), 2µl de dNTPs (10mM) (Pharmacia), 0.2µl de Taq polymérase (5U/ml) (Appligene) et 2.5µl de tampon x10 (Appligene). Ce mélange est ensuite couvert par de l'huile minérale afin d'éviter toute évaporation. Afin de dénaturer l'ADNc, les tubes subissent un chauffage à 95°C pendant 5 min avant d'enchaîner une succession de 40 cycles de PCR. Chaque cycle se décompose de la façon suivante: 2 min à 60°C, permettant aux amorces de se fixer sur les séquences d'ADN complémentaires, puis 3 min à 72°C, température d'action optimale de la polymérase et enfin 1 min à 94°C afin de dénaturer les brins d'ADN nouvellement synthétisés. La réaction se termine par un passage de 7 min à 72°C, permettant à la polymérase de terminer la synthèse de tous les fragments d'ADN amplifiés.

Tableau 1:

**Séquences des oligonucléotides utilisés lors de la RT-PCR semi-quantitative.**

<b>Cytokine</b>	<b>Oligonucléotides (18 ou 20 mer)</b>	
<b>β-Actine</b>	sens	5' CAG GCA CCA GGG CGT GAT 3'
	anti-sens	5' GCC AGC CAG GTC CAG ACG 3'
	interne	5' CCT CGG GAG CCA CAC GCA GC 3'
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	sens	5' TGG AAA GAG GAG AGT GAC 3'
	anti-sens	5' ATT GCT TTG CGT TGG ACA 3'
	interne	5' CTT GAT GGT CTC CAC ACT CT 3'
<b>IL-10</b>	sens	5' TGC CTG GTC CTC CTG ACT GG 3'
	anti-sens	5' GCC TTG CTC TTG TTT TCA CA 3'
	interne	5' CAA GGC TTG GCA ACC CAG GT 3'

**c) Southern blot**

Les produits de PCR sont finalement analysés sur gel d'agarose 1,5% afin de déterminer la taille des fragments amplifiés. Afin de rendre l'ADN amplifié visible, les produits de PCR sont analysés par Southern blot.

Après électrophorèse dans un tampon tris borate-EDTA, le gel d'agarose subit une série de traitements afin de faciliter le transfert des produits de PCR vers la membrane de nitrocellulose :

1. 30 minutes dans une solution de dénaturation (NaCl 1.5 mM + NaOH 1.5 M)
2. 30 minutes dans une solution de neutralisation (NaCl 1.5 mM + Tris 2 M pH=8)
3. 15 minutes dans du SSC 20x

Le transfert proprement dit se déroule sur une nuit selon le principe. La marque des puits et l'orientation du gel sont ensuite inscrits sur la membrane de Genescreen (NEN Research products, Boston, MA). L'ADN est définitivement fixé sur la membrane par un passage de 3 minutes aux U.V. La membrane est ensuite conservée, sous cellophane, à 4°C.

Avant l'hybridation, il est nécessaire de préparer la sonde. L'oligonucléotide interne va être marqué par du  $^{32}\text{P}$  (Amersham). Pendant ce temps, la membrane est préhybridée pendant 2 heures à 60°C dans la solution d'hybridation (Tampon phosphate 0,5M; SDS 7%; BSA 1%; EDTA 1mM).

L'hybridation se déroule à 60°C durant 16 heures. Ensuite, la membrane subit plusieurs lavages. Le premier lavage est réalisé dans une solution de SSC 2X additionnée de SDS 2%. Après 30 minutes à 60°C, la majorité des sondes non hybridée est ainsi récupérée. Les deux lavages

suisant, réalisés avec une solution de SDS 1% + SSC 0,2X, permettront d'éliminer la radioactivité non spécifique résiduelle.

La révélation se fait dans des cassettes spéciales permettant une lecture directe par le Phosphor-Imager (Molecular Dynamics, Every, France) des quantités de radioactivité ayant frappé l'écran de la cassette (voir exemple ci-dessous).

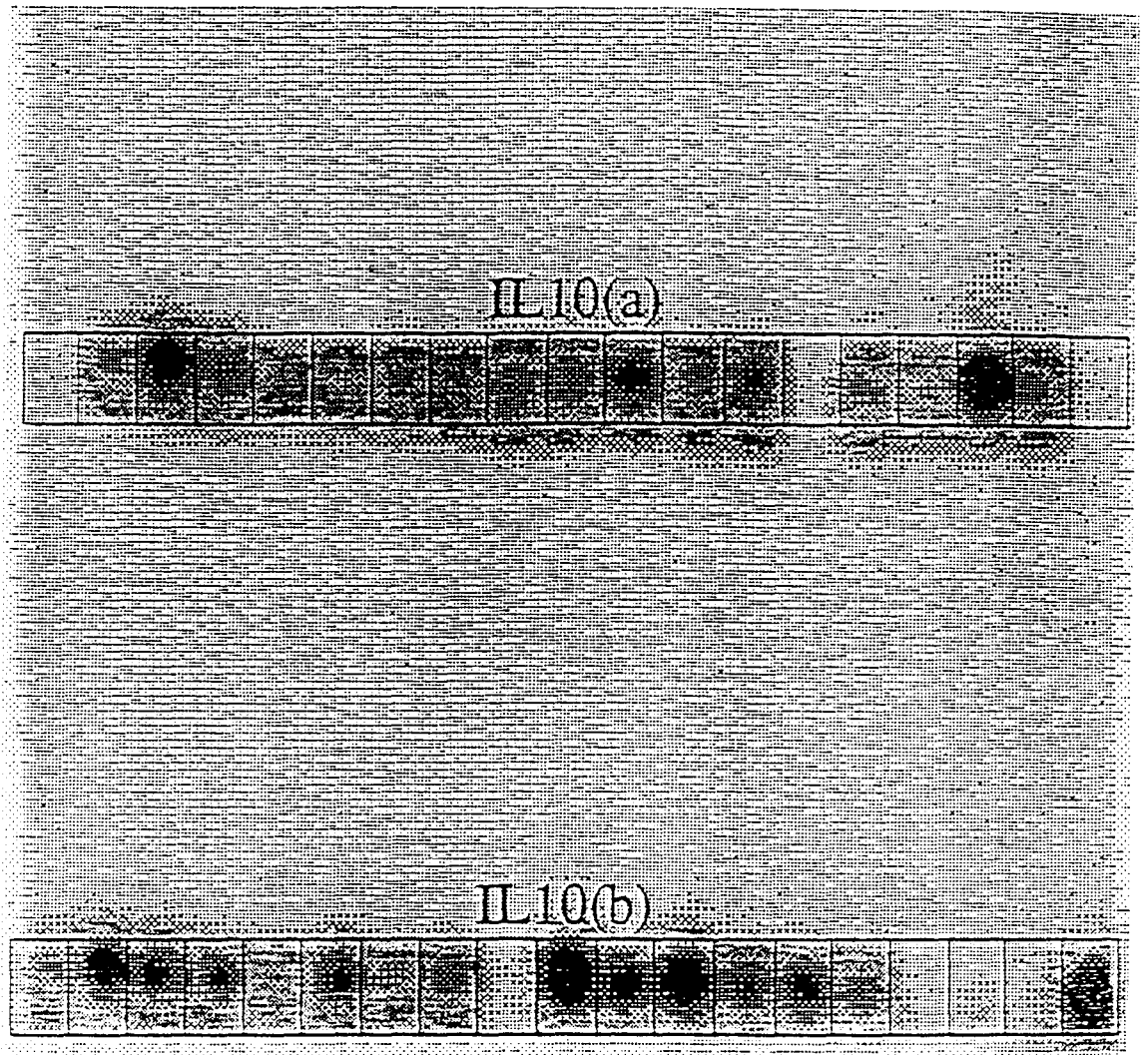


Figure 2 : Mesure par le phosphor-Imager des quantités d'IL-10 présentes dans les prélèvements de MC. La taille et l'intensité de chaque tache est proportionnelle au nombre de sondes radioactives hybridées.

#### **D. La RT-PCR quantitative**

La RT-PCR est réalisée en présence d'un compétiteur interne. Le plasmide compétiteur ne dispose que des séquences des primers et les produits de PCR présentent une taille différente des ARNm de cytokines, permettant ainsi leur séparation sur gel d'agarose.

Les plasmides que nous avons utilisés comme compétiteurs ont été élaborés et testés par l'équipe de David Shire (Shire 1993; Legoux 1992)

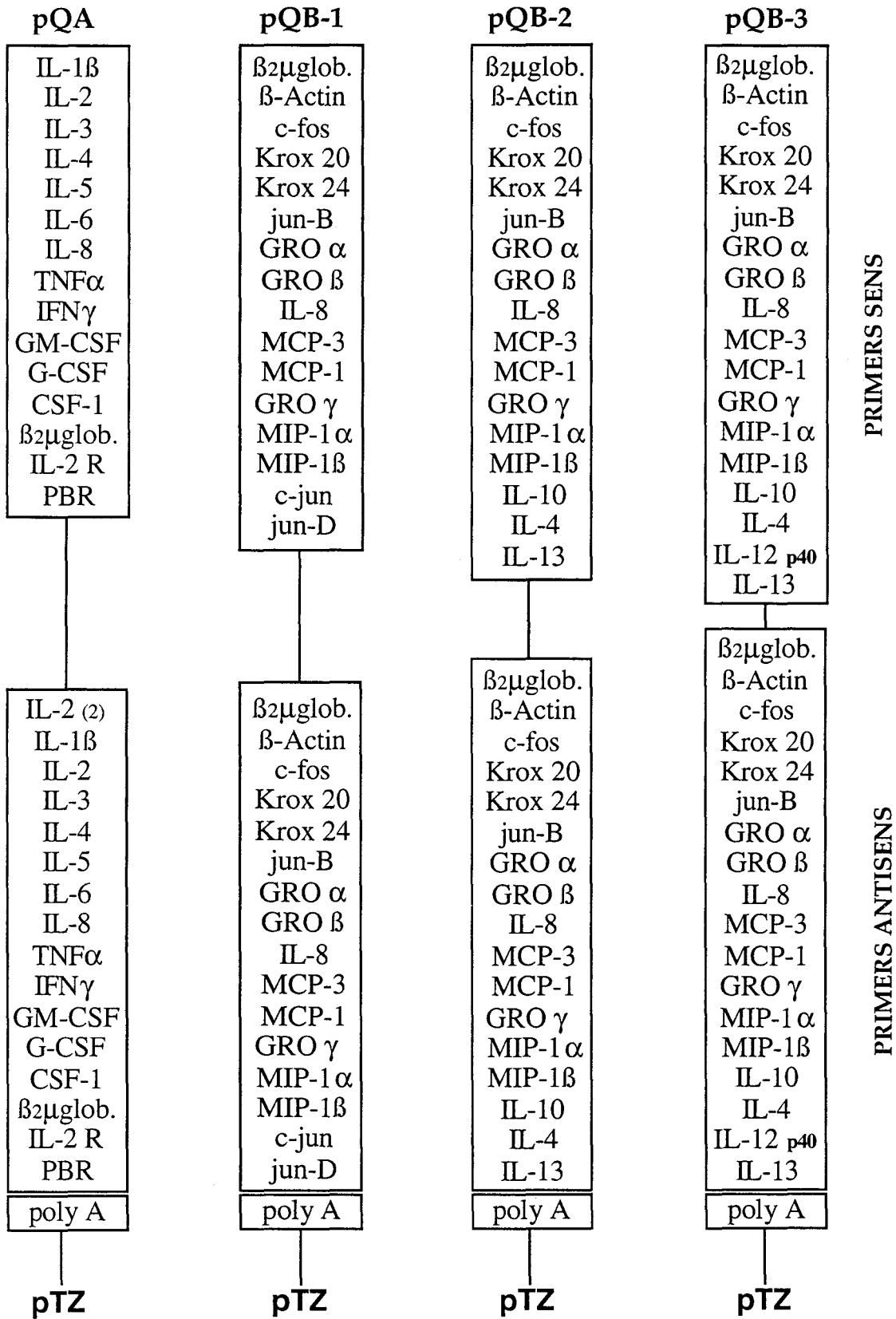


Figure 3 : Plasmides servant de compétiteur lors des RT-PCR quantitatives.

Ces plasmides dérivés du pTZ (2,9kb) comportent les primers sens et antisens de nombreuses cytokines et chimiokines (modifié d'après D. Shire 1993).

### a) Construction du compétiteur

L'originalité de notre approche a été de commander des séquences comportant déjà l'enchaînement de 4 primers (soit tous sens, soit tous anti-sens) permettant l'amplification de l'éotaxine, du MCP-4, de leur récepteur CCR-3 et du récepteur de l'IL-8, CXCR1 (Tableau 2). Ce qui a permis de réduire considérablement le nombre de sous-clonages à effectuer (Figure 4).

Tableau 2 : Nature des 2 oligonucléotides présentant les primers du MCP-4, de l'éotaxine, du CCR-3 et du CXCR1, ainsi que les primers permettant leur amplification.

Oligos	orientation	taille	clivage	séquence
MCP-4	sens	16	BamHI	5' CGG ATC CCA CAC CTT C 3'
CXCR1	antisens	16	XbaI	5' GTC TAG ATG ACA AAC A 3'
Insert 1	sens	92	Bam-Xba	5' CGG ATC CCA CAC CTT CAG CCT CCA AAT GAA GGT CTC CGC AGC ACT GTG AGC GGA CGA AGC ATC TGC ATC GTG CCG CTG TTT GTC ATC TAG AC 3'
MCP-4	antisens	16	KpnI	5' GGG TAC CAG GAG AAT C 3'
CXCR1	sens	16	EcoRI	5' GGA ATT CGC GTA GAT G 3'
Insert 2	antisens	91	Eco-Kpn	5' GGA ATT CGC GTA GAT GAT GGG GTT GAG ATC TCC TTG GTC CTT CCT CTT CTT CTT GGG GTC GGC ACA GGC CAC TGG TGA TTC TCC TGG TAC C 3'

Néanmoins, la construction nécessite un certain nombre d'étapes (Figure 4) :

1. Amplification des 2 séquences comportant, l'une les primers sens et l'autres les primers anti-sens. Puis purification de ces séquences à partir du gel d'agarose. Clonage des produits de PCR dans des vecteurs spécifiques (TA cloning).
2. Ouverture du plasmide pQB2 par digestion enzymatique d'un site de clivage, suivie d'une déphosphorylation afin d'empêcher toute religation du plasmide sur lui-même. Dépôt sur gel d'agarose et purification de la forme linéarisée du plasmide.
3. Utilisation de la même enzyme de clivage pour extraire le 1<sup>er</sup> fragment de son vecteur (pTAG) afin de l'intégrer dans le plasmide linéarisé. Purification sur gel d'agarose.
4. Ligation. Vérification de l'intégration et de la bonne orientation du premier insert par des digestions enzymatiques.
5. Idem pour le second fragment.
6. Vérifications finales :
  - séquençage de la partie du plasmide comportant les 2 inserts
  - PCR qualitative et établissement de la gamme de dilution
  - existence d'une compétition entre le plasmide et l'ADNc

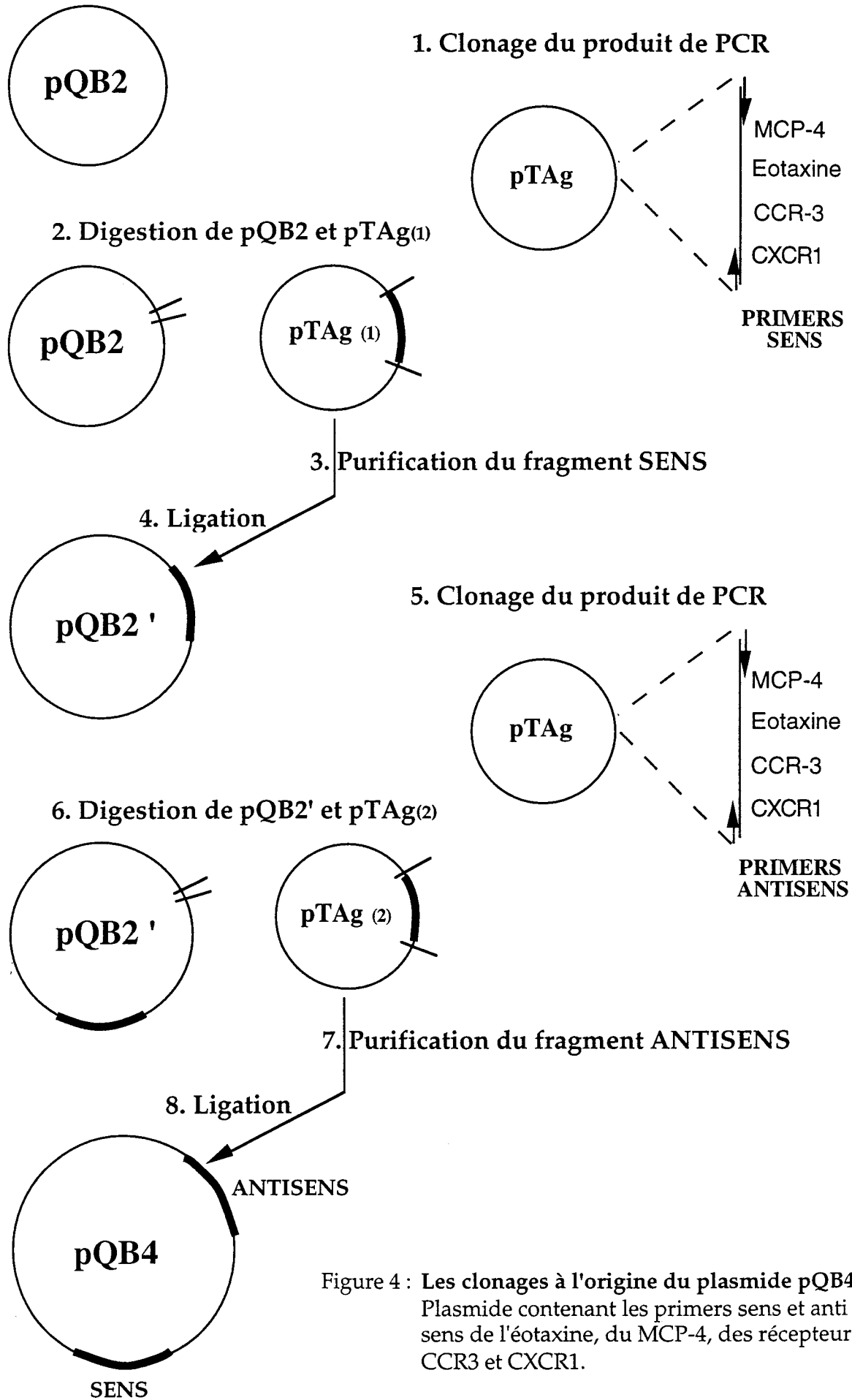


Figure 4 : Les clonages à l'origine du plasmide pQB4. Plasmide contenant les primers sens et anti-sens de l'éotaxine, du MCP-4, des récepteurs CCR3 et CXCR1.



### b) La PCR compétitive

Les premières étapes (extraction de l'ARN total, traitement par la DNase) sont identiques à celles de la RT-PCR semi-quantitative. Afin de limiter l'action d'éventuelles RNAses, la réverse transcription (RT) est réalisée à 42°C. En outre, avec les nouveaux appareils de PCR à couvercle chauffant, l'addition d'huile n'est plus nécessaire pour éviter les phénomènes d'évaporation.

La PCR compétitive est réalisée selon la technique décrite par Zou et al. (Zou 1995). Dans un premier temps, une PCR qualitative est réalisée, permettant ainsi d'estimer quels seront les dilutions de compétiteurs à utiliser afin d'encadrer les produits de PCR (figure 5). Etant donné qu'il s'agit d'une compétition directe entre l'ADN des cytokines et le plasmide compétiteur, la notion de plateau ne joue aucun rôle. Le nombre de cycles d'amplification est donc fixé à 40 cycles pour toutes les cytokines, ainsi que pour la  $\beta$ -Actine.

Afin de limiter les erreurs de pipetage qui peuvent être conséquentes lorsque l'on compare 1  $\mu$ l de compétiteur et 1  $\mu$ l d'ADNc, nous avons dilué les produits de RT et les compétiteurs afin de pouvoir prélever 5  $\mu$ l. En outre, afin d'éviter toute contamination des prélèvements par des compétiteurs sous forme d'aérosols, la préparation du mélange réactionnel est décomposée comme suit :

- Sous la hotte n°1: Addition dans les microtubes de PCR (barette de 8 tubes à 200  $\mu$ l) de 10  $\mu$ l d'un mélange contenant au final les primers sens et antisens de la cytokine étudiée (400nM), les dNTP (50  $\mu$ M) (Pharmacia), le MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM), le tampon 1x et 1 unité de Taq polymérase (Promega).
- Sous la hotte n°2: Addition des 5  $\mu$ l d'ADNc issu des biopsies intestinales.
- Sous la hotte n°3: Addition des 5  $\mu$ l de compétiteurs correspondant à la cytokine étudiée (Tableau 4). Brièvement: pQA pour l'IFN $\gamma$ , l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-5; pQB2 pour la  $\beta$ -Actine, l'IL-8, GRO $\alpha$ , l'IL-10 et l'IL-13; pQB3 pour l'IL-12; pQB4 pour l'éotaxine, MCP-4, CCR-3 et CXCR1.

Après 5 minutes de dénaturation à 94°C, l'amplification consiste en 40 cycles comportant 1 minute de dénaturation à 94°C, 1 minute d'hybridation des primers entre 50 et 62°C selon les cas, et 1 minute 30 d'élongation à 72°C. L'amplification, réalisée sur le Thermolyne Amplitron II (Barnstead Thermolyne, Dubuque, IA, USA), se termine par 5 minutes à 72°C.

Les produits de cette PCR compétitive sont ensuite déposés sur un gel d'agarose à 3% afin de bien séparer la bande correspondante au compétiteur de la bande représentant la cytokine à quantifier (figure 5). L'image du gel est enregistrée et l'intensité des bandes est analysée par ordinateur (Bio-Profil, Marne-la-vallée, France).

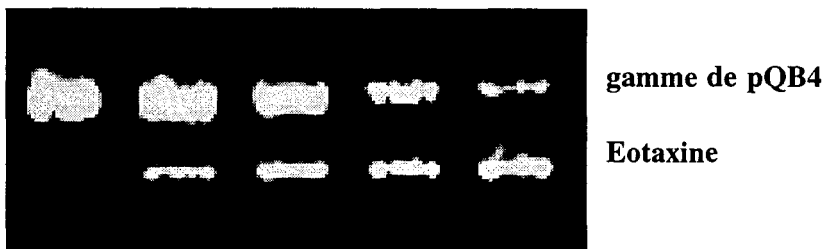


Figure 5 : Exemple de compétition entre des quantités décroissantes de pQB4 et une quantité inconnue d'ADNc d'éotaxine.

Tableau 3 : Oligonucléotides des cytokines/chimiokines et de leurs récepteurs

Cytokines	Les oligonucléotides (18 et 20 mers)	
<b>β-Actine</b>	sens	5' GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG 3'
	anti-sens	5' GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG 3'
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	sens	5' GCA GAG CCA AAT TGT CTC CT 3'
	anti-sens	5' ATG CTC TTC GAC CTC GAA AC 3'
<b>IL-2</b>	sens	5' GTC ACA AAC AGT GCA CCT AC 3'
	anti-sens	5' ATG GTT GCT GTC TCA TCA GC 3'
<b>IL-12</b>	sens	5' ATT GAG GTC ATG GTG GAT GC 3'
	anti-sens	5' AAT GCT GGC ATT TTT GCG GC 3'
<b>IL-13</b>	sens	5' GAG TGT GTT TGT CAC CGT TG 3'
	anti-sens	5' TAC TCG TTG GCT GAG AGC TG 3'
<b>IL-4</b>	sens	5' TGC CTC CAA GAA CAC AAC TG 3'
	anti-sens	5' AAC GTA CTC TGG TTG GCT TC 3'
<b>IL-5</b>	sens	5' CTT GGC ACT GCT TTC TAC TC 3'
	anti-sens	5' GCA GGT AGT CTA GGA ATT GG 3'
<b>IL-10</b>	sens	5' AAA TTT GGT TCT AGG CCG GG 3'
	anti-sens	5' GAG TAC AGG GGC ATG ATA TC 3'
<b>IL-8</b>	sens	5' TTG GCA GCC TTC CTG ATT TC 3'
	anti-sens	5' AAC TTC TCC ACA ACC CTC TG 3'
<b>GRO<math>\alpha</math></b>	sens	5' ACT CAA GAA TGG GCG GAA AG 3'
	anti-sens	5' AGA CTT CTC CTA AGC GAT GC 3'
<b>CXCR1</b>	sens	5' CAT CGT GCC GCT GTT TGT CA 3'
	anti-sens	5' GCG TAG ATG ATG GGG TTG AG 3'
<b>CCR-3</b>	sens	5' GTG AGC GGA CGA AGC ATC TG 3'
	anti-sens	5' ATC TCC TTG GTC CTT CCT CT 3'
<b>Eotaxine</b>	sens	5' ATG AAG GTC TCC GCA GCA CT 3'
	anti-sens	5' TCT TCT TGG GGT CGG CAC AG 3'
<b>MCP-4</b>	sens	5' CAC ACC TTC AGC CTC CAA 3'
	anti-sens	5' GCC ACT GGT GAT TCT CCT 3'

Tableau 4 : Conditions d'hybridation des oligos et tailles des produits de PCR

Cytokines et récepteurs	PCR		pQA 369 pb	pQB1 370 pb	pQB2 391 pb	pQB3 406 pb	pQB4
	hybridat°	Taille					
<b>β-Actine</b>	56°C	238 pb		<b>OK</b>	<b>OK</b>	<b>OK</b>	
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	51°C	290 pb	<b>OK</b>				
<b>IL-2</b>	50°C	353 pb	<b>OK</b>				
<b>IL-12</b>	55°C	297 pb				<b>OK</b>	
<b>IL-13</b>	57°C	253 pb			<b>OK</b>	<b>non</b>	
<b>IL-4</b>	56°C	225 pb	<b>OK</b>		<b>non</b>	<b>non</b>	
<b>IL-5</b>	51°C	260 pb	<b>OK</b>				
<b>IL-10</b>	54°C	264 pb			<b>OK</b>	<b>non</b>	
<b>IL-8</b>	53°C	248 pb	<b>OK</b>	<b>OK</b>	<b>OK</b>	<b>OK</b>	
<b>GRO<math>\alpha</math></b>	54°C	236 pb			<b>OK</b>		
<b>CXCR1</b>	57°C	285 pb					<b>OK</b>
<b>CCR-3</b>	55°C	293 pb					<b>OK</b>
<b>Eotaxine</b>	57°C	235 pb					<b>OK</b>
<b>MCP-4</b>	55°C	184 pb					<b>OK</b>

### **3.3 Localisation muqueuse des cytokines**

#### **A. L'analyse histologique**

Le diagnostic et l'évaluation de l'activité de la MC ont été réalisés sur des coupes en congélation colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (D'Haens 1998). Le score inflammatoire est basé sur des modifications architecturales et inflammatoires. L'échelle adoptée va de 0 pour une muqueuse normale à 10 pour une muqueuse très dégradée. Le nombre de neutrophiles invasifs a été évalué dans 5 champs (x400) présentant un infiltrat inflammatoire.

#### **B. L'immunohistochimie**

Le marquage des cellules positives pour l'IL-8 a été réalisé sur des coupes sériées en congélation (épaisseur : 5µm). A la sortie du cryostat, les coupes sont séchées à l'air libre avant d'être fixées à l'acétone pendant 10 minutes. Puis les coupes sont rincées et incubées une nuit durant à 4°C, en présence d'anti IL-8 (2µg/ml, IgG de rat, SanverTECH, Boechout, Belgique), dans une solution (PBS pH 7,2 + Saponine 0,1%). Les coupes sont ensuite incubées pendant 30 minutes avec le second anticorps qui est couplé à la biotine (lapin anti IgG de rat, Dako, Glostrup, Danemark). Afin de bloquer la peroxydase endogène, les coupes sont incubées pendant 30 minutes dans une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% (vol/vol). Après trois lavages au PBS, les coupes sont incubées pendant 30 minutes en présence du complexe avidine-biotine-peroxidase (Dako). Le produit de la réaction est révélé après 10 minutes dans une solution de tampon d'acétate (pH 4,9) contenant 0,05% de 3-amino-9-ethylcarbazole (Janssen, Beerse, Belgique) et 0,01% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les coupes sont finalement contrecolorées à l'hématoxyline (Sigma) et montées à l'aide de glycérol.

Les contrôles négatifs comprennent l'incubation des coupes avec un anticorps irrelevant ainsi que l'omission de l'anticorps primaire.

Les doubles marquages sont réalisés à l'aide des techniques utilisant la peroxydase (coloration brune) et la phosphatase alcaline (coloration bleue). La phosphatase alcaline endogène est bloquée par du levamisole. La coloration brune est obtenue en utilisant du DAB (diaminobenzidine, Sigma) et la bleue avec du Fast bleue (4-benzoylamino 2,5 Diethoxy Benzene-diazonium Chloride, Sigma). Les lymphocytes ont été identifiés à l'aide d'un anticorps anti CD3 (IgG1 de souris, clone UCHT1, Dako), et les monocytes-macrophages avec un anticorps anti CD68 (IgG1 de souris, clone KP1, Dako).

### **3.4 Quantification des protéines**

#### **A. Mesure des chimiokines libérées (ELISA)**

##### **a) Conditions de culture**

Placées dans 1ml de RPMI 1640 supplémenté avec de la L-Glutamine et du SVF 10%, les cellules périphériques des patients avec MC et des témoins sont mises en culture dans des plaques à 12 puits et stimulées ou non par 100ng/ml de LPS (sérotypage 0111:B4; SIGMA, St Quentin, France). Si les PBMC (2x10<sup>6</sup> cellules) sont cultivés pendant 24h, la durée de culture des neutrophiles (5x10<sup>6</sup> cellules) est réduite à 18h comme préconisé par Cassatella, et ce afin d'éviter

que l'entrée en apoptose des neutrophiles ne vienne perturber la production de cytokines. Ainsi, même après stimulation, la viabilité des cellules au bleu trypan reste supérieure à 90%.

Après élimination des cellules, les surnageants de culture sont stockés à -20°C dans l'attente d'une quantification des cytokines libérées, spontanément ou après stimulation par le LPS.

### **b) Quantification de GRO $\alpha$ et de l'IL-8**

Utilisé selon les recommandations du fabricant (Diacclone, Besançon, France), ce kit ELISA permet la détection de quantités d'IL-8 inférieures à 25pg/ml, alors que le kit ELISA de GRO $\alpha$  (R&D, Abingdon, UK) possède une sensibilité inférieure à 9 pg/ml. Après une série de mesures préliminaires, les surnageants de culture des neutrophiles non stimulés sont dilués 10x alors que la dilution est de 40x après stimulation. Pour les PBMC ces dilutions ont dû être portées à respectivement 250x et 1000x. Quant aux plasmas, ils sont dilués 2 fois pour une meilleure détection de GRO $\alpha$ . Pour l'IL-8 plasmatique, même lorsque les prélèvements ne sont pas dilués, l'IL-8 demeure quasiment indétectable.

## **B. Détection des cytokines intracellulaires (FACS)**

### **a) Matériel**

- Les solutions: la Bréfeldine A, le paraformaldéhyde et la Saponine proviennent de Sigma (St Louis, USA) et la BSA de Research Organics (Cleveland, OH, USA).
- Les anticorps monoclonaux de souris couplés au FITC (Diacclone): anticorps contrôle IgG1 et anticorps anti-IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-13 et IL-8. Ainsi que les anticorps couplés à la PE: anticorps contrôles IgG1 (Diacclone) et IgG2b (Pharmingen/Clini-Science, Montrouge, France), et anticorps anti-IL-4 (Pharmingen) et IL-5 (Biosource, Camarillo, CA, USA).

### **b) Méthode**

Remis en suspension dans du PBS, les neutrophiles ( $5 \times 10^6$  cellules/ml) sont ensuite fixés dans du paraformaldéhyde 2% final (1 volume de PBS/ 1 volume de PFA 4%) pendant 15 minutes à température ambiante. Après lavage dans le PBS, les cellules sont placées dans des plaques de culture 96 puits à fond rond à raison de 250 000 / puits. La centrifugation des plaques se fait à une vitesse avoisinant les 1200rpm. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 40 $\mu$ l de solution de perméabilisation (PBS-BSA1%-Saponine 0,5%). Après 10 minutes, les cellules perméabilisées sont préincubées pendant 10 autres minutes avec du sérum de souris (5 $\mu$ l) afin de limiter le marquage aspécifique. Le marquage des cytokines intracellulaires par des anticorps couplés soit au FITC soit à la PE se déroule suivant les conseils des fabricants (généralement: 5 $\mu$ g/ml pour  $10^6$  cellules). Suite à l'addition de 5 $\mu$ l d'anticorps spécifique ou d'isotype contrôle, une incubation minimum de 30 minutes à température ambiante est nécessaire. Ensuite, les cellules subissent une série de 3 lavages/centrifugations. Le premier lavage se fait avec la solution de perméabilisation, alors que les 2 autres se font en PBS seul. Pour finir, les cellules sont resuspendues dans du PBS-BSA 0,5%, avant d'être analysées en cytométrie de flux à l'aide d'un EPICS Profiles (Coultronics, Hialeah, FL, USA).

### **3.5 Etude des récepteurs membranaires**

#### **A. Les anticorps**

Anti-CD15/FITC, anti-CD62L/FITC, anti-LFA-1/FITC (Bender MedSystems Bioproducts, Gagny, France), anti-CD11b/PE (Becton-Dickinson, Le Pont-de-Claix, France), et leurs contrôles respectifs IgG1/FITC (Diacclone), IgM/FITC (Bender MedSystems), IgG1/PE (Diacclone), IgG2b/PE (Pharmingen).

#### **B. Les conditions de marquage**

Comme lors des études intracellulaires, le marquage se déroule dans des plaques avec 96 puits à fonds rond dans lesquels sont placées  $2 \times 10^5$  cellules/puit. Malgré quelques études favorisant l'utilisation de sang total, nous n'avons pas constaté de réelle différence entre cellules purifiées et sang total. Par contre, le rôle de la température a été confirmé et l'emploi de cellules fixées au PFA a été abandonnée en faveur de cellules directement placées sur glace après culture.

Après centrifugation, les cellules ( $2,5 \times 10^5$  cellules/puit) sont resuspendues dans du PBS-BSA 1% et préincubées pendant 10 minutes avec du sérum de souris (10%). Les anticorps monoclonaux, couplés au FITC ou à la PE, sont ajoutés suivant les instructions des fabricants, et les cellules incubées pendant 30 minutes dans un volume final de 50  $\mu$ l. Deux rinçages successifs permettent ensuite d'éliminer les anticorps non fixés. Les cellules sont finalement resuspendues dans une solution de PBS-BSA 0.5%. A ce stade, il est possible de fixer les cellules marquées afin de les analyser le lendemain seulement et ce sans que le résultat n'en soit modifié.

### **4. Etude du chimiotactisme des neutrophiles**

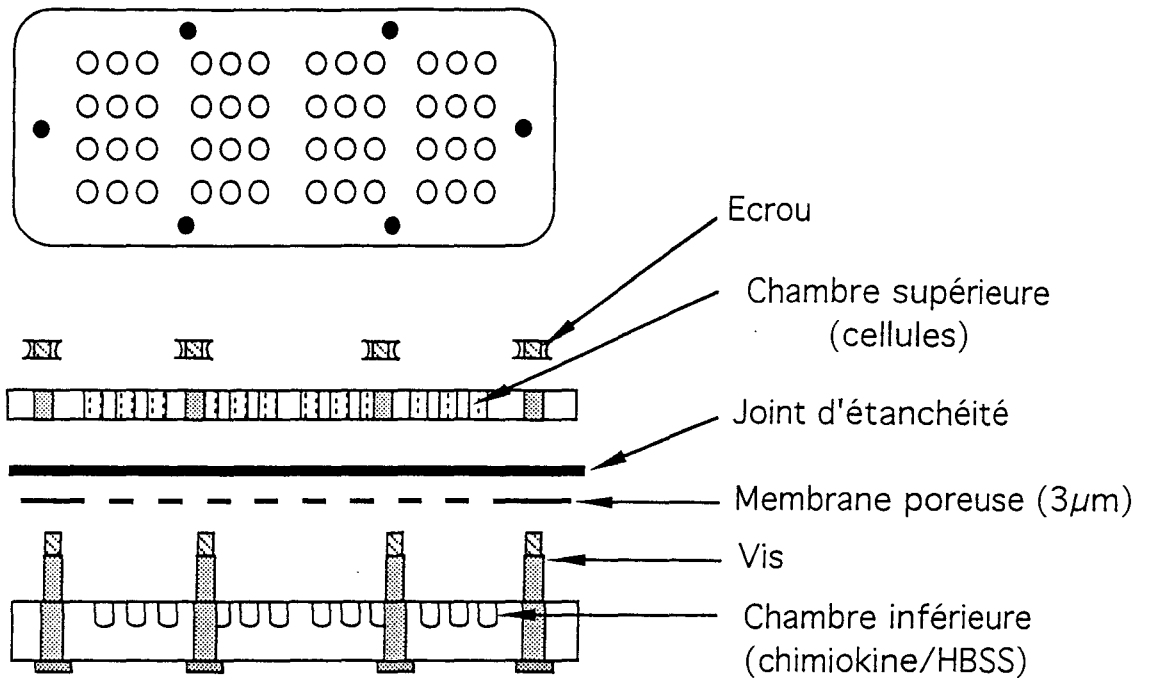
#### **4.1 Le matériel**

Nous avons choisi de travailler avec une chambre de Boyden (NeuroProbe, Cabin John, MD, US) pour sa simplicité d'utilisation et le grand nombre d'expériences simultanées possible : 16 expériences en triplicate dans 48 puits (figure 6A). Une membrane de polycarbonate "polyvinylpyrrolidone free" (Nucleopore, Pleasanton, CA, US) est utilisée par expérience de chimiotactisme. Les substances chimioattractrices utilisées sont l'IL-8 (Diacclone), GRO $\alpha$  (Diacclone) ainsi que le fMLP (N-formyl Met-Leu-Phe, SIGMA).

#### **4.2 Chimiotactisme**

Après purification, les neutrophiles sont remis en suspension dans du HBSS (Hanks' balanced salt solution) à la concentration de  $10^6$  cellules/ml. Des solutions de HBSS, d'IL-8 (50ng/ml), de GRO $\alpha$  (50ng/ml) ou de fMLP ( $10^{-7}$ M) sont placés au fond des puits, alors les neutrophiles des patients ou des témoins sont ajoutés dans les chambres supérieures (Figure 6). Après 45 min à 37°C, les neutrophiles ayant migré à travers les pores (3  $\mu$ m) d'une membrane de polycarbonate "polyvinyl-pyrrolidone free" sont fixés et colorés (RAL 555, Paris, France). Les expériences sont réalisées en triplicate et l'importance du chimiotactisme est estimée par le comptage des neutrophiles ayant migré dans 4 champs adjacents à l'aide d'un microscope à fort grossissement (x1000).

A. Présentation de la chambre commercialisée par Neuroprobe :



B. Principe :

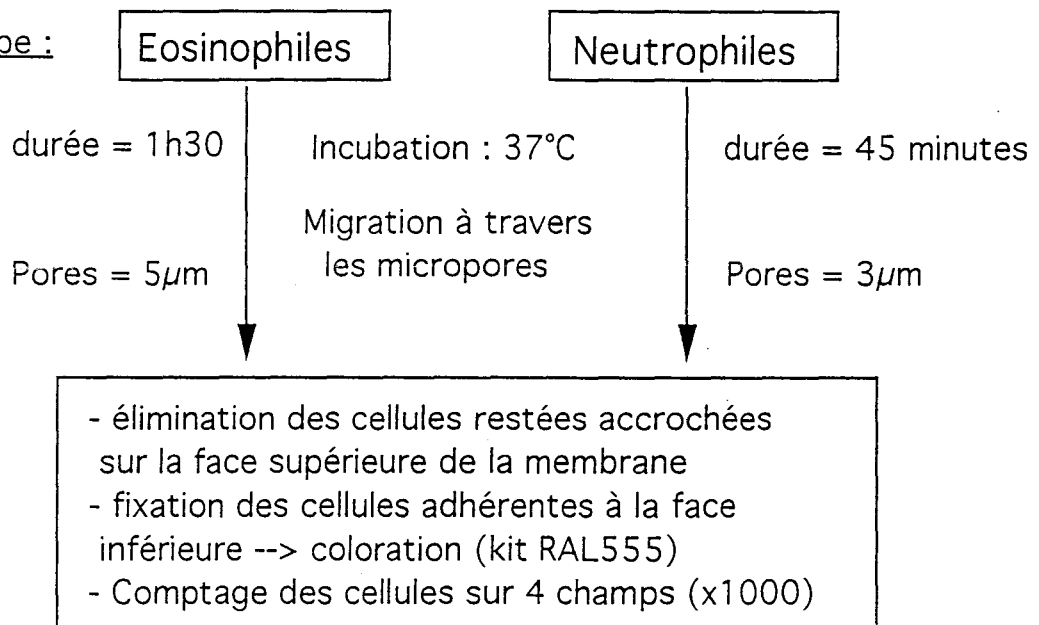


Figure 6 : **Chambre de Boyden.** Elle comporte 48 puits permettant de réaliser 16 expériences en triplicata. Attirés par les agents chimioattractants, les granulocytes ( $10^6$  cellules/ml) migrent à travers une membrane poreuse de polycarbonate. Adhérent à la face inférieure de la membrane, les cellules sont fixées, colorées et comptées.

Boyden S. (1962) *Journal of Experimental Medicine*, 115,453.

# **Résultats 1**

**Etude des profils de synthèse  
des cytokines immunorégulatrices  
au cours de l'évolution de la maladie de Crohn**

## **INTRODUCTION**

Bien que la physiopathologie de la maladie de Crohn (MC) reste inconnue, elle implique une dérégulation du système immunitaire muqueux. Ce système est sous le contrôle des cytokines immunorégulatrices dont l'équilibre entre cytokines de type 1 (IFN $\gamma$  et IL-2) et cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-13) est essentiel.

Réalisés par RT-PCR quantitative, deux travaux récents (Niessner 1995; Mullin 1996) montrent une augmentation de la synthèse des cytokines de type 1 au niveau de biopsies coliques de patients atteints de MC par rapport à des muqueuses intestinales non inflammatoires de MC et de témoins. Les cytokines de type 2 ne sont que rarement détectées et ne permettent donc pas une évaluation des variations de leur synthèse.

L'interprétation de ces résultats est rendue délicate par l'effet des traitements anti-inflammatoires auxquels une majorité de ces malades étaient soumis, ainsi que par l'hétérogénéité des patients quant au stade évolutif de leur maladie. En effet, la succession de poussées inflammatoires et de périodes de rémission risque de masquer les événements immunologiques impliqués uniquement dans le déclenchement de la maladie.

Afin d'obtenir des données claires, notre équipe a décidé de travailler sur un modèle de lésions naissantes original : les lésions endoscopiques observées après intervention chirurgicale et anastomose iléocolique. En effet, dans l'année qui suit l'intervention, chez une majorité de patients, une récurrence endoscopique sera malheureusement observée (Rutgeerts 1990). Les lésions naissantes étant détectables dès la 12<sup>ème</sup> semaine après l'opération et ce en dépit de divers traitements préventifs, nous avons entrepris de mener notre étude en absence de tout traitement anti-inflammatoire, en accord avec les malades.

### **1) L'étude préliminaire**

- **Patients et procédure**

Une première étude prospective par RT-PCR semi-quantitative a été entreprise sur 10 patients (5 femmes et 5 hommes, moyenne d'âge: 33,3 ans), et 5 témoins (une femme et 4 hommes, moyenne d'âge: 58,4 ans) ayant subi une endoscopie de routine. Toutes les interventions chirurgicales furent motivées par des complications sérieuses (Tableau 1).

Environ trois à quatre semaines avant l'intervention, tout traitement anti-inflammatoire fut suspendu. Durant l'opération, des biopsies iléales ont été systématiquement prélevées en amont de la future anastomose pour s'assurer de son intégrité. Après trois mois, bien qu'aucune récurrence clinique n'était observable, 4 des 10 malades montraient des signes d'une récurrence endoscopique (RE+). Sur l'échelle établie par Rutgeerts allant de i0 à i4, deux des patients étaient classés i2, un i3 et un i4. Le second groupe de 6 patients possédait une muqueuse iléale histologiquement saine (i0), donc sans signe de récurrence endoscopique (RE-).

Parmi les cytokines immunorégulatrices, les 2 cytokines les plus aisément détectables furent l'IL-10 et l'IFN $\gamma$ . Dans un premier temps, nous avons donc restreint notre étude à ces 2 cytokines, avec l'IFN $\gamma$  comme représentant des cytokines de type 1 et l'IL-10, classiquement considérée comme une cytokine de type 2 bien qu'elle soit plutôt une cytokine anti-inflammatoire.



Tableau 1 : Données cliniques sur les 10 patients, atteints de MC, inclus dans l'étude préliminaire.

PATIENTS				Traitement	Chirurgie		Type de MC		R.E.
Nom	Sexe	Age	Tabac	Nature	Date	Raison	Lieu	perforat°	3 mois
MC 1	H	23	NF	/	20/09/93	Fistules	Ileum	P	i 0
MC 2	H	38	F	Imurel	28/10/93	Fistules	I-Ca.	P	i 0
MC 3	F	19	NF	Imu/Pentasa	07/12/93	r.a.t.	Ileum	NP	i 0
MC 4	H	30	NF	/	08/12/93	Sténose	Ileum	NP	i 0
MC 5	F	68	NF	/	28/12/93	Fistules	Ileum	P	i 0
MC 6	H	27	NF	Pentasa	07/10/94	Fistules	I-C.D.	P	i 0
MC 7	H	30	NF	/	08/12/93	Sténose	Ileum	NP	i 2
MC 8	H	40	F	/	03/03/94	Sténose	Ileum	NP	i 2
MC 9	F	25	F	Pen/questran	28/09/94	Sténose	I-Ca.	NP	i 3
MC 10	F	30	F	Questran	01/12/94	r.a.t.	I-C.D.	NP	i 4

r.a.t. = résistance aux traitements anti-inflammatoires  
 I.C.D. = localisation iléocolique droite  
 I.Ca. = localisation iléo-caecale  
 F/NF = Fumeur/ Non fumeur

R.E. = récurrence endoscopique  
 P. = atteintes perforantes  
 N.P. = atteintes non perforatives

## RESULTATS

Les résultats de la RT-PCR semi-quantitative sont exprimés sous la forme d'un rapport entre les quantités d'ARNm mesurées pour l'IFN $\gamma$  ou l'IL-10 et les quantités d'ARNm de la  $\beta$ -Actine (Figure 1 et 2).

Pour les patients n'ayant pas récidivé (RE-), il n'y a aucune variation entre 0 et 3 mois quant aux niveaux de synthèse de l'IFN $\gamma$  ( $16,2 \pm 5,9$  et  $12,9 \pm 5,2$ ) ou de l'IL-10 ( $13,6 \pm 2,9$  et  $16,5 \pm 7,5$ ). Ces résultats ne diffèrent pas de manière significative avec les taux d'IFN $\gamma$  ( $11,8 \pm 6,1$ ) et d'IL-10 ( $14,5 \pm 7,1$ ) observés chez les témoins (Figure 1 et 2).

Pour les 4 malades montrant des signes de récurrence endoscopique (RE+), on observe, au niveau des muqueuses iléales macroscopiquement et histologiquement saines, des taux sensiblement plus élevés d'IFN $\gamma$  ( $25,8 \pm 7,5$ ) et d'IL-10 ( $24 \pm 5$ ) par rapport aux 11 patients RE- et témoins (IFN $\gamma$ :  $14,2 \pm 4,1$  et IL-10:  $14,1 \pm 3,6$ ). En raison de l'hétérogénéité des patients, ces différences n'atteignent pas des niveaux significatifs ( $p = 0,087$  pour l'IFN $\gamma$  et  $p = 0,079$  pour l'IL-10).

Si les taux d'IL-10 ne changent guère chez ces 4 malades après 3 mois ( $22,6 \pm 9,2$  versus  $24 \pm 5$ ), en revanche, pour l'IFN $\gamma$ , une diminution significative ( $p=0,014$ ) est observée au niveau des lésions naissantes ( $5,1 \pm 2,5$  par rapport à  $25,9 \pm 7,5$ ) (Figure 1). Cette baisse de synthèse de l'IFN $\gamma$  au niveau des lésions naissantes alors que les lésions chroniques sont associées à une augmentation de la synthèse d'IFN $\gamma$ , nous a conduit à émettre l'hypothèse d'un profil de cytokines

différant entre les lésions naissantes et les lésions chroniques. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons entrepris une étude quantitative par RT-PCR compétitive.

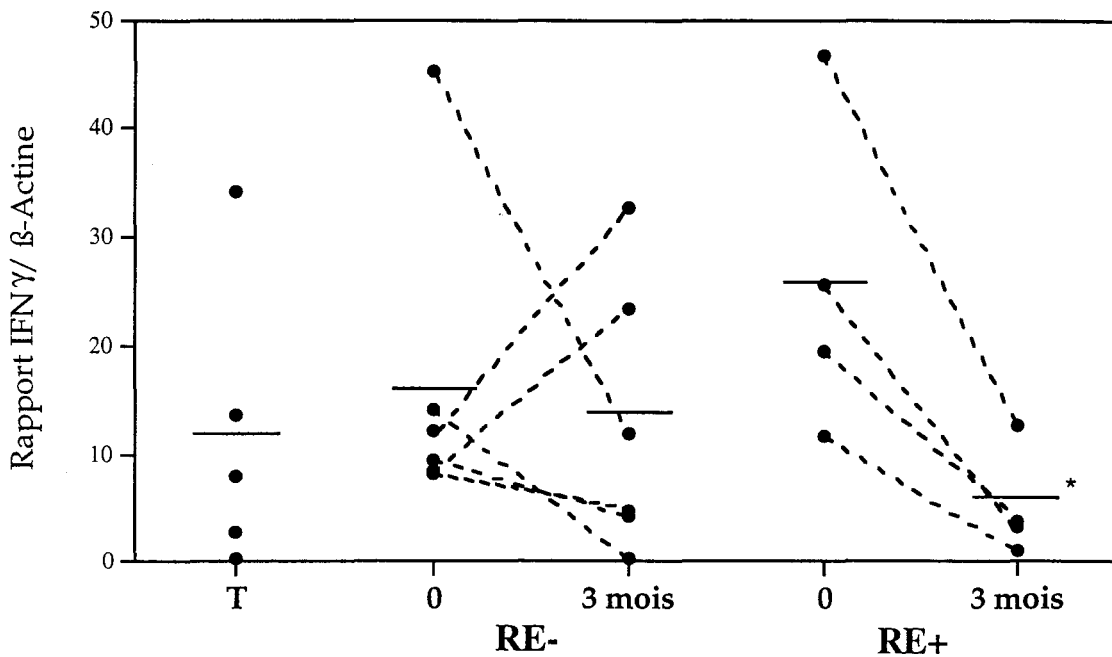


Figure 1 : Comparaison des quantités d'IFN synthétisés au niveau des biopsies iléales de témoins ainsi que patients atteints de MC présentant (RE+) ou non (RE-) des signes de récidence endoscopique. \* p < 0,05

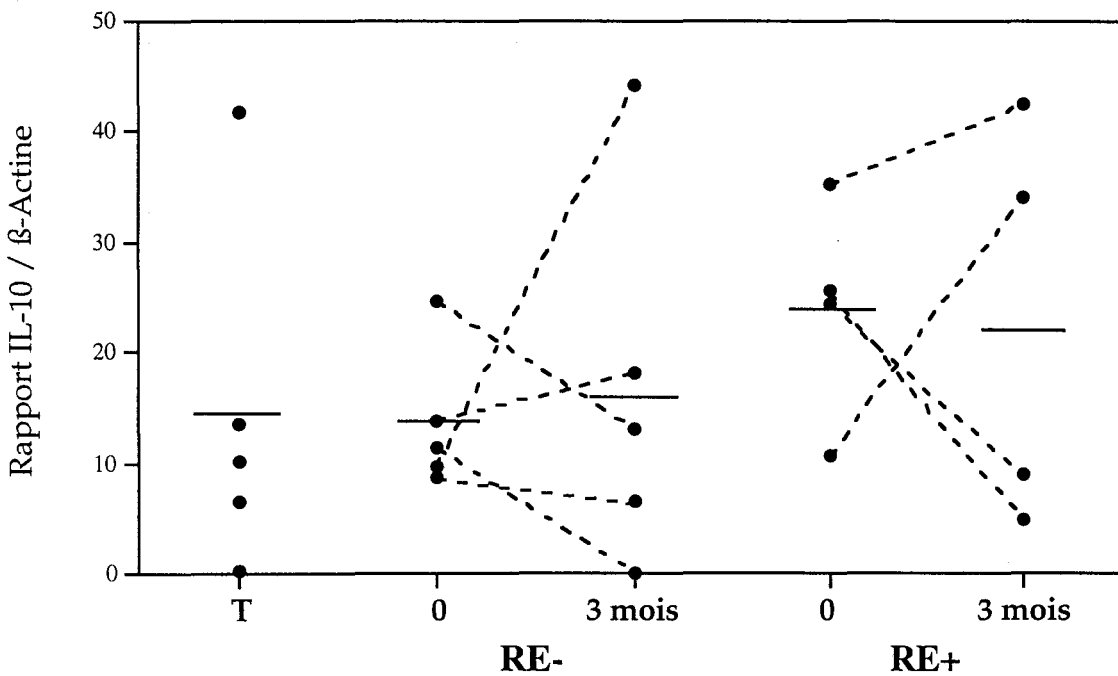


Figure 2 : Comparaison des quantités d'IL-10 synthétisés au niveau des biopsies iléales de témoins ainsi que patients atteints de MC présentant (RE+) ou non (RE-) des signes de récidence endoscopique.

## 2) L'étude quantitative

### • Patients et procédure

Parmi les 17 patients que nous avons inclus dans notre étude (8 femmes et 9 hommes de 20 à 37 ans, dont 10 fumeurs), 10 souffraient d'atteintes purement iléales alors que pour les 7 autres les atteintes étaient iléocoliques. Toutes les interventions chirurgicales furent motivées par des complications sérieuses (15 cas de sténose et 2 avec des fistules). Environ 3 à 4 semaines avant l'intervention, tout traitement anti-inflammatoire fut suspendu. Durant l'opération, des biopsies iléales ont été systématiquement prélevées en amont de la future anastomose pour s'assurer de son intégrité. Chez 8 des patients, des biopsies ont également été réalisées au niveau des lésions chroniques des pièces opératoires.

Après trois mois, une iléocolonoscopie a été pratiquée chez ces 17 patients. Bien qu'aucune récurrence clinique n'était observable, 9 des 17 malades montraient des signes d'une récurrence endoscopique sévère (RE+). Parmi ces 9 patients, 5 présentaient une iléite aphteuse (i3) et 4 une inflammation diffuse accompagnée de larges ulcères (i4) tandis que 5/9 avaient eu une atteinte purement iléale et 6/9 fumaient. Le second groupe de 8 patients était dépourvu de tout signe de récurrence endoscopique (RE-). Leurs muqueuses iléales étaient histologiquement saines comme celles des 11 témoins (4 femmes et 7 hommes, âge moyen : 58 ans).

Sur les 4 biopsies iléales prélevées sur chaque malade à 3 mois ainsi que sur les témoins, l'une sert immédiatement pour l'analyse histologique, alors que les 3 autres sont congelées et placées à -80°C jusqu'à utilisation. Deux de ces biopsies serviront pour l'extraction d'ARN et la RT-PCR compétitive tandis que la troisième pourra être utilisée pour une étude immunohistochimique.

### • Résultats de l'étude histologique

Toutes les biopsies iléales des témoins, ainsi que des patients ne montrant pas de signes de récurrence endoscopique à 3 mois, sont histologiquement normales. Le score inflammatoire reflète, sur une échelle de 1 à 9, l'importance des changements dus à l'inflammation, comme par exemple l'invasion de la *lamina propria* par des cellules mononucléées et polynucléées ou encore les atteintes épithéliales (abcès cryptiques) ou muqueuses (ulcérations). Les scores inflammatoires des lésions chroniques ( $6,7 \pm 1,7$ ) sont significativement ( $p=0,016$ ) plus élevés que ceux des lésions naissantes ( $3,8 \pm 1,1$ ). Ces scores sont plus importants ( $p=0,003$ ) que les scores des muqueuses témoins, histologiquement normales ( $1,3 \pm 0,55$ ).

### • Résultats de la RT-PCR compétitive

Les cytokines étudiées sont l'IFN $\gamma$  et l'IL-2 pour les cytokines de type 1 et l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 pour les cytokines de type 2. Les quantités d'ARNm sont exprimées en nombre de molécules de cytokines pour  $10^4$  molécules de  $\beta$ -Actine. Aucune différence significative n'a été observée entre les patients n'ayant pas récidivé (RE-) et les témoins (Figure 3). Les cytokines de type 2 sont indétectables dans les 2 cas ( $<0,01$  molécules d'IL-4, IL-5 ou IL-13). Toutes les cytokines de type 1 sont détectables mais ni les niveaux de synthèse d'IFN $\gamma$  ni ceux d'IL-2 ne diffèrent de façon significative entre témoins et patients RE-.

Dans le cas des patients présentant des signes de récurrence (RE+), si l'IL-13 reste indétectable, une importante synthèse d'IL-4 est observée chez 7 malades sur 9 et dans 3 sur 9 pour l'IL-5 (Figure 3).

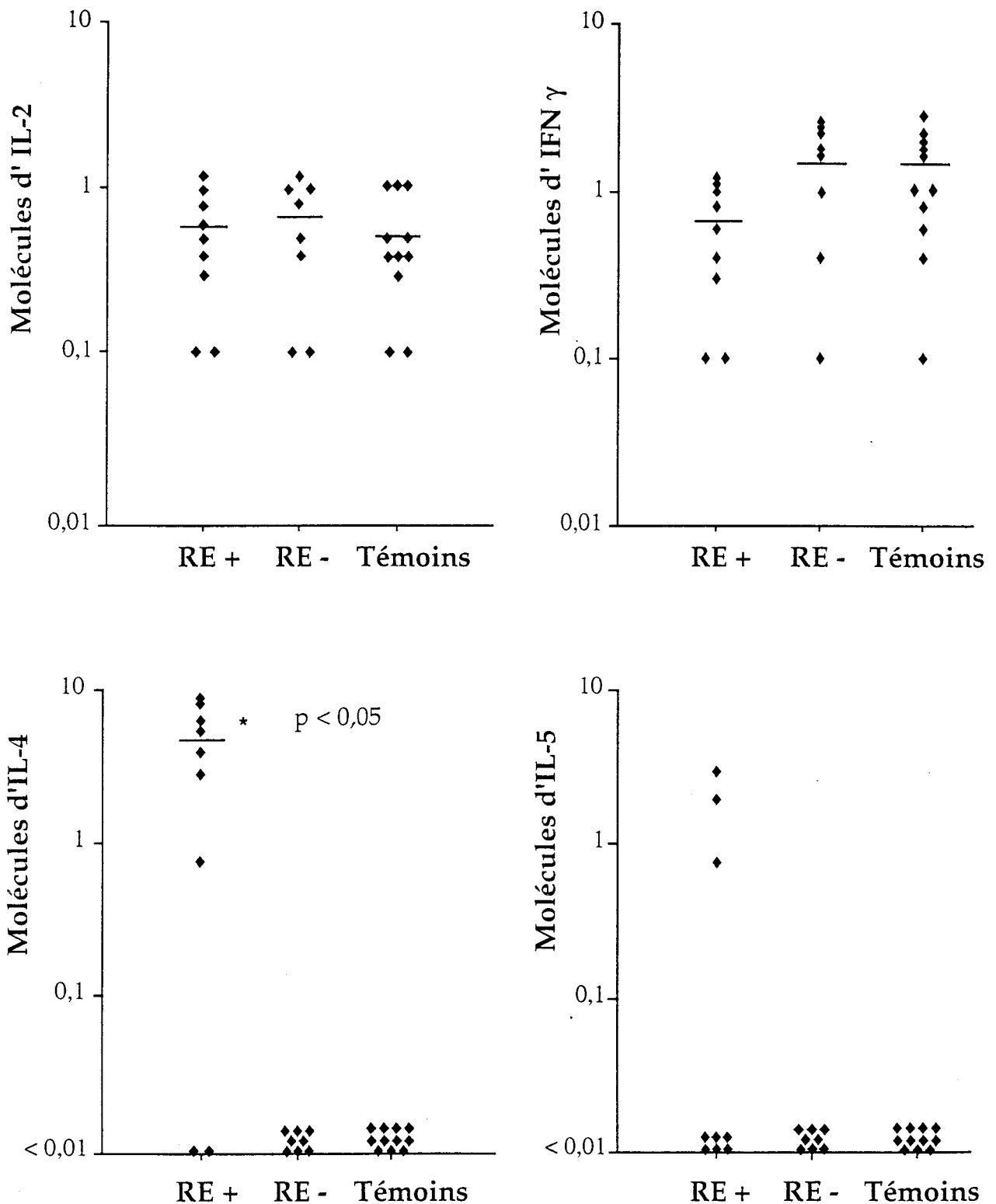


Figure 3 : Profils de synthèse dans les lésions naissantes de MC (9 RE+) par rapport aux muqueuses iléales histologiquement normales de témoins (11) et de patients avec MC (8 RE-). Les résultats sont exprimés en nombre de molécules d'ADNc pour 104 molécules de  $\beta$ -Actine. L'iléon sain se caractérise par un profil de type 1 (IFN $\gamma$ , IL-2) alors que lésions naissantes montrent une synthèse accrue d'IL-4 ( $p < 0,05$ ).

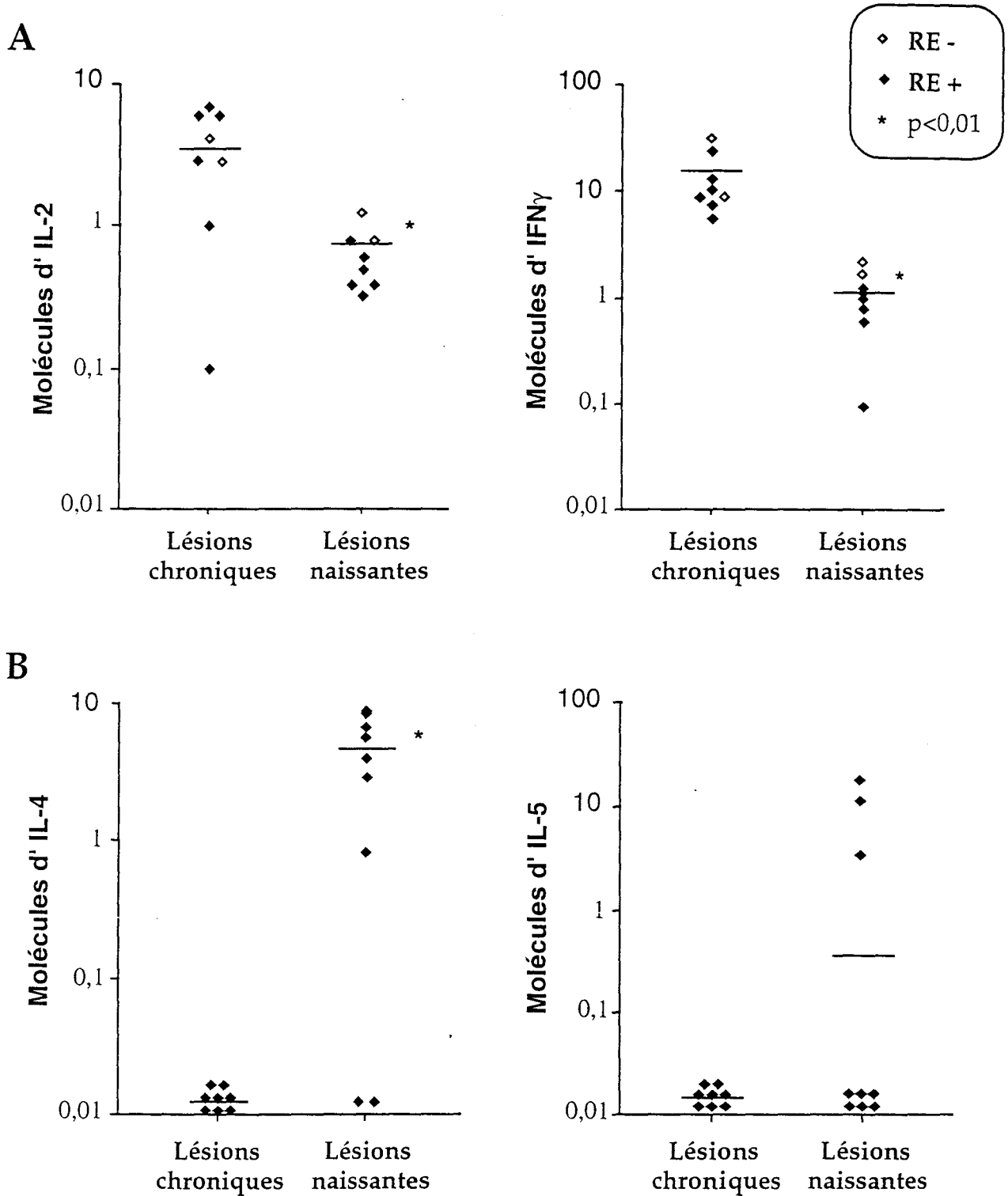


Figure 4 : Profils de synthèse dans les lésions chroniques des pièces opératoires (n=8) et dans les lésions naissantes de MC, 3mois après résection iléo-colique (n=9). Les résultats sont exprimés en nombre de molécules d'ADNc pour 104 molécules de  $\beta$ -Actine. **A**) Les lésions chroniques se caractérisent par un profil de type 1 (IFN $\gamma$ , IL-2). Une baisse de synthèse de l'IL-2 et de l' IFN $\gamma$  est observée 3 mois après chirurgie dans les lésions naissantes (RE+), mais également dans la muqueuse normale (RE-). **B**) Les lésions naissantes montrent une synthèse accrue d'IL-4 (p<0,05) et d'IL-5 .

Cette augmentation significative d'IL-4 au niveau iléal ( $p < 0,05$ ) et dans certains cas d'IL-5 s'accompagne d'une baisse d'IFN $\gamma$  par rapport aux patients RE- ( $p = 0,053$ ) et aux témoins ( $p = 0,079$ ). Les niveaux d'IL-2 restent équivalents à ceux observés pour les témoins et les patients RE- (Figure 3).

Afin de comparer chez un même patient, les lésions naissantes avec les lésions chroniques, 8 patients sur lesquels des biopsies ont été réalisées au niveau des pièces opératoires ont été étudiés. Parmi ces 8 patients atteints de MC, seuls 2 ne présentaient pas de signes de récurrence endoscopique 3 mois après chirurgie (Figure 4).

Dans ces 8 prélèvements réalisés au niveau de lésions iléales chroniques, les cytokines de type 2 n'étaient pas détectables ( $< 0,01$  molécules), alors que les cytokines de type 1 étaient toujours présentes. De plus, les niveaux d'ARNm codant pour l'IL-2 étaient significativement plus élevés dans les lésions chroniques (3,76 molécules d'IL-2 en moyenne) que dans les lésions naissantes ( $p = 0,01$ ), et les muqueuses saines des patients RE- ( $p = 0,015$ ) ou des témoins ( $p = 0,006$ ). De manière analogue, les niveaux d'IFN $\gamma$  (12,9 molécules en moyenne) étaient fortement augmentés dans les lésions chroniques par rapport aux lésions naissantes des 6 patients RE+ ( $p < 0,001$ ), ainsi que par rapport aux muqueuses iléales saines des 2 patients RE- ( $p < 0,001$ ) et des 11 témoins ( $p < 0,001$ ). Ces données sont confirmées lorsqu'on compare pour chacun des 8 patients, les taux de synthèse des cytokines de type 1 au niveau des lésions naissantes et des lésions chroniques. Tant pour l'IL-2 que pour l'IFN $\gamma$ , on observe une synthèse significativement accrue dans les lésions chroniques (respectivement :  $p = 0,046$  et  $p = 0,028$ ).

L'existence d'un profil de type 1 dans les lésions chroniques a ainsi été confirmé (Figure 4). Mais notre travail a surtout permis de mettre en évidence une forte synthèse d'IL-4 et, dans une moindre mesure, d'IL-5 dans les lésions naissantes. Ce travail a donné lieu à une publication dans *Gastroenterology* (Desreumaux et coll 1997).

### 3) Etude de l'IL-4 par immunohistochimie

Afin d'identifier les cellules à l'origine de cette production importante d'IL-4 dans les lésions endoscopiques 3 mois après chirurgie ainsi que pour confirmer au niveau protéique les résultats obtenus en ARN, des doubles immunomarquages en phase liquide sur des coupes tissulaires congelées ont été entrepris.

Seules les lésions naissantes présentaient au niveau de la *Lamina propria* des cellules marquées positivement par des anticorps monoclonaux dirigés contre l'IL-4 (Figure 5). Les cellules à l'origine de cette production d'IL-4 sont environ pour 50% des lymphocytes (CD-3 $^+$ ), pour 40% des mastocytes (tryptase+) et pour 10% des éosinophiles (ECP+ et MBP+).

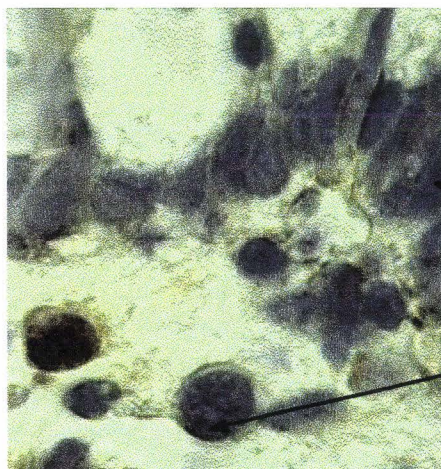


Figure 5 : Une coupe de muqueuse iléale de MC, avec deux cellules positives pour l'IL-4 (coloration marron) dont un lymphocyte (cytoplasme bleu ciel).

Cellules épithéliales

Lymphocyte positif

## DISCUSSION

Le principal résultat de cette étude est l'augmentation de la synthèse d'IL-4, couplée à une baisse de l'IFN $\gamma$ , au niveau des lésions naissantes par rapport aux muqueuses normales des témoins et des patients n'ayant pas subi de récurrence endoscopique 3 mois après résection iléocolique.

De récentes études ont démontré que les profils de cytokines peuvent être modifiés par les traitements que reçoivent les malades (Crotty 1992; Schwiebert 1996), ainsi par le stade d'évolution de la maladie (Yamada 1995, Thepen 1996). Or dans notre étude, aucun des patients n'était traité. De plus, le modèle de récurrence postopératoire permet de limiter l'âge des lésions naissantes à moins de 3 mois.

En utilisant une technique sensible et quantitative de RT-PCR compétitive (Legoux 1992), une augmentation significative de la synthèse d'IL-4 dans les lésions précoces a pu être établie. Ces résultats ont été confirmés par immunohistochimie sur des coupes en congélation. En effet, l'IL-4 n'a pu être détectée que chez les patients RE+. Des doubles marquages ont également permis de déterminer les cellules à l'origine de cette production d'IL-4. Il s'agit majoritairement de lymphocytes CD3<sup>+</sup> et de mastocytes. En accord avec une étude précédente, réalisée par hybridation *in situ* sur le même modèle de récurrence endoscopique et rapportant une augmentation de l'ARNm codant pour l'IL-5 (Dubucquoi 1995), cette augmentation d'IL-4 suggère que les lésions précoces sont associées à un profil de type 2.

La manière dont l'IL-4 pourrait intervenir dans l'établissement d'une lésion précoce reste à déterminer. L'IL-4 jouant un rôle primordial dans le maintien d'un équilibre entre cytokines de type 1 et de type 2, une surproduction d'IL-4 entraînerait une dérégulation du système immunitaire intestinal dont les répercussions multiples peuvent déboucher sur des altérations muqueuses.

En effet, la réponse immunitaire à une invasion bactérienne peut être modulée par des profils de type 1 ou de type 2 (Lucey 1996), et le rôle des bactéries lumineuses dans la récurrence iléale des patients atteints de MC après résection iléocolique est maintenant bien établi (Rutgeerts 1995). Dans le cas de pathologies causées par *Listeria sp.*, une des bactéries incriminée dans la MC (Liu 1995), les cytokines de type 1 exercent un effet protecteur débouchant sur une élimination de l'agent pathogène, alors que les cytokines de type 2 inhibent cette réponse (Iizawa 1993). De plus, l'IL-4 est capable d'atténuer les fonctions de la barrière épithéliale (Colgan 1994). Ces observations suggèrent un effet délétère de l'IL-4 à ce stade de la MC. L'IL-4 favoriserait la translocation bactérienne et inhiberait de surcroît les mécanismes conduisant l'élimination des bactéries.

Mais d'autres mécanismes impliquant l'IL-4 peuvent être envisagés. Tant *in vitro* qu'*in vivo*, l'IL-4 a été décrit comme inhibiteur de la production de cytokines proinflammatoires (Hart 1989, West 1996). De plus, l'IL-4 stimulerait la production d'IL-1 récepteur antagoniste, une autre cytokine anti-inflammatoire (Vannier 1992). Ceci dit, malgré ces fonctions anti-inflammatoires bien décrites, de récentes études suggèrent un rôle plus complexe pour l'IL-4. En effet, l'IL-4 serait capable *in vitro* de stimuler de nombreuses cellules, dont des lymphocytes B et T (Brown 1997), des cellules endothéliales et épithéliales (Bochner 1995, Colgan 1994), ainsi que des neutrophiles (Bober 1995), des monocytes/macrophages (deWaal 1993; Suk 1993), des mastocytes (Hamiguchi 1987) et des éosinophiles (Terada 1995; Favre 1990). De surcroît, chez la souris, l'IL-4 est une cytokine indispensable au développement des centres germinatifs des plaques

de Peyer et elle est impliquée dans les réponses muqueuses médiées par les lymphocytes B et T (Vajdy 1995; Kopf 1995).

Chez l'homme, des injections intraveineuses ou sous-cutanées d'IL-4 lors de thérapies anticancéreuses sont souvent associées à des effets secondaires touchant l'intestin : diarrhées et saignements, avec des ulcérations muqueuses chez certains patients (Margolin 1994; Puri 1993). Dans les modèles animaux, l'IL-4 joue sans doute un rôle primordial dans la survenue d'entéropathies lors de réactions de rejet de greffe au niveau de l'intestin (Mowat 1996). Les transferts de gène d'IL-4 chez la souris entraînent inflammation et fibrose, impliquant des mastocytes et un grand nombre d'éosinophiles (Vallance 1996).

Lors d'une précédente étude sur les lésions naissantes, un sous-groupe de patients atteints de MC présentait un important infiltrat en éosinophiles associé à la présence d'ARNm de l'IL-5 (Dubucquoi 1995). La présence d'éosinophiles à ce stade de la maladie pourrait contribuer à des dommages muqueux causé par la libération de protéines cationiques cytotoxiques (Gleich 1979; Dvorak 1980). En dehors de ces composés des granules, les éosinophiles, ainsi que les mastocytes, peuvent modifier la réponse immunitaire locale par la synthèse d'autres médiateurs, parmi lesquels des substances proinflammatoires, des neuropeptides, ou encore des cytokines immunorégulatrices (Hirai 1997; Bradding 1996).

Contrairement aux lésions naissantes, les lésions chroniques présentent un profil de type 1 avec une synthèse accrue d'IFN $\gamma$  et d'IL-2 par rapport aux muqueuses iléales normales. Ces résultats sont en accord avec deux autres études récentes rapportant des niveaux de synthèse élevés d'IFN $\gamma$  et d'IL-2 dans les lésions chroniques de patients en poussée (Niessner 1995; Mullin 1996). Les ARNm de l'IL-4 et de l'IL-5 n'étaient que rarement détectés. De plus, lors d'études sur la production des cytokines immunorégulatrices par les cellules mononucléées de la *lamina propria* de patients avec MC, une augmentation de la production d'IFN $\gamma$  après stimulation a été observée par rapport aux cellules intestinales de témoins (Fuss 1996). Parallèlement une baisse de la libération d'IL-2, d'IL-4 et d'IL-5 était mise en évidence.

Bien que dans la MC, la grande majorité des atteintes débutent par l'iléon terminal, toutes les études publiées portent sur des biopsies de côlon, plus faciles d'accès. Notre étude est donc la première à s'intéresser à la synthèse des cytokines immunorégulatrices dans l'iléon terminal, localisation privilégiée de la maladie. La similarité de nos résultats avec ceux, également réalisés par RT-PCR compétitive, de Niessner et Volk, ainsi que de Mullin et al., suggèrent que les profils de cytokines sont identiques entre iléon et côlon.

L'apport le plus intéressant de notre étude est l'observation chez un même patient de profils de cytokines différents entre les lésions naissantes et les lésions chroniques. Il y aurait donc au cours de l'évolution de la MC le passage d'un profil de type 2 vers un profil de type 1. Ces résultats pourraient expliquer les différences histologiques observées entre lésions précoces et lésions chroniques. De tels "switch" ont déjà été décrit dans d'autres pathologies. Dans la dermatite atopique par exemple, le profil de cytokine évolue aussi, à partir d'un type 2 initial, vers un type 1 (Yamada 1995; Thepen 1996).

Les mécanismes impliqués dans ce "switch" sont encore inconnus. Classiquement l'équilibre des profils est sous le contrôle de l'IL-4 et de l'IL-12, l'IL-12 favorisant un profil de type 1 et l'IL-4 un profil de type 2 (Trinchieri 1993). Ceci dit, une étude récente montre qu'une incubation prolongée de monocytes-macrophages en présence d'IL-4 induisait après stimulation par du LPS une forte production de TNF $\alpha$  et d'IL-12 (D'Andrea 1995). Les



monocytes/macrophages pourraient donc jouer un rôle important dans le passage d'un profil de type 2 vers un profil de type 1.

Les résultats de notre étude préliminaire laissaient espérer que de fortes quantités d'IFN $\gamma$  et/ou d'IL-10 pouvaient s'avérer prédictifs d'une récurrence endoscopique. Mais, les différences observées n'ont pu être confirmées et seraient essentiellement le fait du faible nombre de patients ainsi que de leur hétérogénéité. Une nouvelle étude suggérerait même que ce soit de très faibles quantités d'IL-10, qui pourraient servir à prédire une partie des récurrences endoscopiques à 3 mois. En effet parmi les patients développant des lésions précoces, un sous groupe de malades présente de très faibles quantités d'IL-10 (Meresse 1998). Ces observations sont en accord avec une étude récente qui rapporte un défaut de libération d'IL-10 dans des biopsies de MC mise en culture (Louis 1998b).

L'absence de différences dans les profils de synthèse de cytokines immunorégulatrices, entre muqueuses histologiquement normales de patients n'ayant pas récidivé et témoins, semble indiquer qu'il n'existe pas d'anomalie primitive quant à la synthèse des cytokines de type 1 et de type 2. En outre, ces résultats confirment les études précédentes qui montraient un profil de type 1 associé aux muqueuses intestinales normales.

Une récente étude génomique portant sur des familles dont plusieurs membres sont atteints de MC a permis d'identifier un locus de susceptibilité sur le chromosome 16 (Hugot 1996). Parmi les gènes candidats situés dans cette région, se trouve le gène codant pour le récepteur de l'IL-4. Une anomalie primitive de ce récepteur pourrait donc participer à l'établissement d'une forte production d'IL-4 dans les lésions naissantes.

## **Conclusions & perspectives**

Cette étude montre une évolution des profils de synthèse des cytokines immunorégulatrices au cours de la MC. La muqueuse histologiquement normale présente un profil de type 1 avec une synthèse élevée d'IL-2 et d'IFN $\gamma$  associée à une absence d'IL-4 et d'IL-5 détectable. Suite à une résection iléocolique, certains patients récidivent au bout de 3 mois et des lésions précoces sont visibles endoscopiquement. Ces lésions sont caractérisées par un profil de type 2 avec une augmentation importante d'IL-4 accompagnée d'une baisse d'IL-2 et d'IFN $\gamma$ . La surproduction d'IL-4 favoriserait non seulement les invasions bactériennes et l'inflammation aiguë qui en résulterait, mais également le basculement de la réponse immune vers un profil de type 1 caractéristique des lésions chroniques.

Ces résultats ont des répercussions importantes quant aux choix des thérapies destinées à prévenir la récurrence endoscopique. En effet, les anti-inflammatoires classiquement utilisés pour lutter contre les poussées chroniques de la maladie ne sont guère efficaces pour empêcher la survenue d'une récurrence. Des thérapies s'attaquant directement à l'IL-4 semblent bien plus prometteuses. En effet, dans des modèles animaux de rejet de greffe, les atteintes intestinales peuvent être combattues par des injections d'anticorps dirigés contre l'IL-4 ou par des récepteurs solubles de l'IL-4. De plus, l'effet inducteur de l'IL-4 sur la production d'IL-12 et de TNF $\alpha$  par des monocytes/macrophages est presque totalement abrogé en présence d'IL-10 (D'Andrea 1995). Cette observation, mise en parallèle avec le risque de récurrence des patients synthétisant trop peu d'IL-10, suggèrent que des traitements à base d'IL-10 recombinante pourraient s'avérer très bénéfiques dans la lutte contre les récurrences postopératoires dans la MC.

## **Résultats 2**

**Recrutement des éosinophiles  
dans les lésions naissantes  
de patients avec MC**

## INTRODUCTION

Les éosinophiles sont caractérisés par la composition de leurs granules et par leur distribution essentiellement tissulaire. Les éosinophiles sont essentiellement associés aux maladies allergiques (Desreumaux et Capron 1996a) et à la lutte anti-parasitaire via un mécanisme d'ADCC (Capron 1994). En dehors des pathologies parasitaires à helminthes et de la gastroentérite à éosinophiles, ces cellules restent peu étudiées dans le tube digestif (Desreumaux (Thèse 1997), Furuta 1995). Néanmoins, tant dans la maladie coeliaque, que dans les maladies inflammatoires du tube digestif, l'infiltrat inflammatoire comporte de nombreux éosinophiles.

Or les éosinophiles semblent participer aux dégâts tissulaires observés dans ces pathologies par dégranulation et libération de certaines de leurs protéines cationiques: MBP, ECP, EPO, EDN (Wardlaw 1995). Dans le cas de la maladie coeliaque des dépôts extracellulaires d'ECP et de MBP ont été observés au niveau de la *lamina propria* (Hällgren 1989; Talley 1992). Des éosinophiles montrant des signes de dégranulation ont également été mis en évidence dans les MICI (Dvorak 1980, 1993). Des taux élevés de protéines cationiques ont d'ailleurs été mesurés dans les fluides intestinaux de patients atteints de MICI (Levy 1997).

Après un bref séjour dans le sang, les éosinophiles quittent les capillaires sanguins pour gagner les muqueuses. Cette migration trans-endothéliale est induite par des médiateurs de l'inflammation (C5a, fMLP, PAF), des chimiokines (Eotaxine-1 et 2, MCP-3 et 4, RANTES) et la présence d'IL-5 (Desreumaux 1996). L'importance de l'IL-5 dans le recrutement tissulaire est illustrée par un modèle de souris déplété pour le gène de l'IL-5. Chez ces souris IL-5<sup>-/-</sup> aucune éosinophilie tissulaire ou sanguine n'était observable après stimulation parasitaire ou allergique (Mould 1997), alors que chez les souris Eotaxin<sup>+/+</sup>, seule une légère réduction de l'éosinophilie a pu être obtenue (Rothenberg 1997).

Dans la maladie coeliaque (Desreumaux 1992) comme dans la maladie de Crohn (Dubucquoi 1995; Hankard 1997), la source principale d'IL-5 dans la *lamina propria* semble être l'éosinophile lui-même. Or dans notre étude précédente, l'ARNm codant pour l'IL-5 n'a été détecté que chez 3 des 9 patients avec MC ayant récidivé endoscopiquement et présentant donc des lésions aiguës (cf. résultats 1). Afin d'expliquer la présence d'éosinophiles invasifs dans la *lamina propria* des patients dépourvus d'IL-5, nous avons donc recherché, par RT-PCR, la présence d'autres facteurs chimiotactiques des éosinophiles comme l'éotaxine (Ponath 1996) ou le MCP-4 (Ugucioni 1996). Ces chimiokines se lieraient préférentiellement au récepteur CCR-3, qui vient d'être caractérisé chez des éosinophiles humains (Daugherty 1996). Dans les MICI, l'éotaxine a été mise en évidence par Northern blot et paraît surexprimée dans les muqueuses de MC et RCH par rapport à des muqueuses de patients atteints de cancer du côlon (Garcia-Zepeda 1996a).

Dans ce contexte, nous avons tenté de confirmer l'existence d'une augmentation du nombre des éosinophiles dans les lésions de MC et d'établir une comparaison entre lésions naissantes et lésions chroniques. Etant donné la faible synthèse d'IL-5 dans les lésions naissantes et l'absence d'IL-5 dans les lésions chroniques (Résultats 1), nous avons dirigé nos efforts sur la mise en évidence d'une synthèse accrue de chimiokines impliquées dans le recrutement des éosinophiles: Eotaxine et MCP-4.

## 1) Les études préliminaires

### • Patients & prélèvements

Les biopsies et prélèvements sur pièce opératoire utilisés ici correspondent aux 17 patients atteints de MC qui ont été inclus dans l'étude par RT-PCR quantitative présentée dans les résultats 1. Nous nous sommes principalement intéressés aux prélèvements réalisés dans les lésions chroniques des 8 patients préalablement cités ainsi qu'aux lésions naissantes des 9 patients montrant des signes de récurrence endoscopiques (RE+) à 3 mois.

### • Résultats de l'étude histologique (figure 1)

Dans les lésions chroniques, le score inflammatoire est significativement plus élevé qu'au niveau des lésions naissantes ( $p=0,016$ ), elles-mêmes plus enflammées que la muqueuse saine ( $p<0,005$ ). Alors que le nombre absolu d'éosinophiles par champ ne diffère pas entre lésions naissantes ( $33\pm 6,5$ ) et lésions chroniques ( $32,8\pm 10,5$ ), il est significativement ( $p<0,005$ ) plus élevé que dans les muqueuses iléales normales ( $3,7\pm 0,5$ ). Par contre, en tenant compte du score inflammatoire et donc dans une certaine mesure du nombre de cellules invasives, le nombre d'éosinophiles (éosinophiles/score inflammatoire) est plus important ( $p<0,005$ ) dans les lésions naissantes ( $9,3\pm 2,2$ ) que dans les lésions chroniques ( $4,7\pm 0,8$ ). Bien sûr, la muqueuse normale ( $3,1\pm 1,2$ ) présente toujours significativement moins d'éosinophiles que celle des lésions naissantes et chroniques (respectivement  $p=0,001$  et  $p=0,023$ ).

### • Résultats de cytométrie en flux (figure 2)

A partir de pièces opératoires de patients avec MC, des cellules ont été extraites et purifiées sur gradient de percoll. Après lyse des globules rouges, les granulocytes présents dans les culots étaient limités aux seuls éosinophiles, beaucoup plus résistants que les neutrophiles aux traitements utilisés lors de l'extraction cellulaire. Des analyses par cytométrie de flux ont permis de séparer les éosinophiles des autres types cellulaires en fonction de leur taille (axe vertical) et de leur densité (axe horizontal) (figure 2).

En comparant ainsi le pourcentage d'éosinophiles présents dans les muqueuses histologiquement saines aux éosinophiles des lésions chroniques, une nette augmentation du nombre d'éosinophiles a été observée dans ces lésions qu'elles soient grêliques ou coliques, avec respectivement 24,3% au lieu de 14,6% et 20,4% au lieu de 8,5% (figure 2). Ces données ont été confirmées sur des lames de cytopspin.

### • Résultats de RT-PCR qualitative (figure 3)

En fonction des quantités de  $\beta$ -Actine mesurées pour chaque prélèvement lors de l'étude précédente (Résultats 1), nous avons dilué les différents ADNc afin qu'ils présentent des quantités de  $\beta$ -Actine identiques. Ainsi, même si cette étude n'est pas réellement quantitative, elle offre néanmoins une vision éclairante des différences de synthèse au cours de la MC.

Nous avons mis en évidence l'éotaxine dans 7 lésions naissantes sur 9 et MCP-4 dans 8 lésions naissantes sur 9 (Figure 3), alors dans les lésions chroniques de 8 de ces patients aucun signal n'a été détecté. De plus, l'éotaxine et/ou l'IL-5 étaient présentes chez 9 patients sur 9, offrant ainsi une explication pour l'importance du recrutement des éosinophiles au niveau des lésions naissantes.

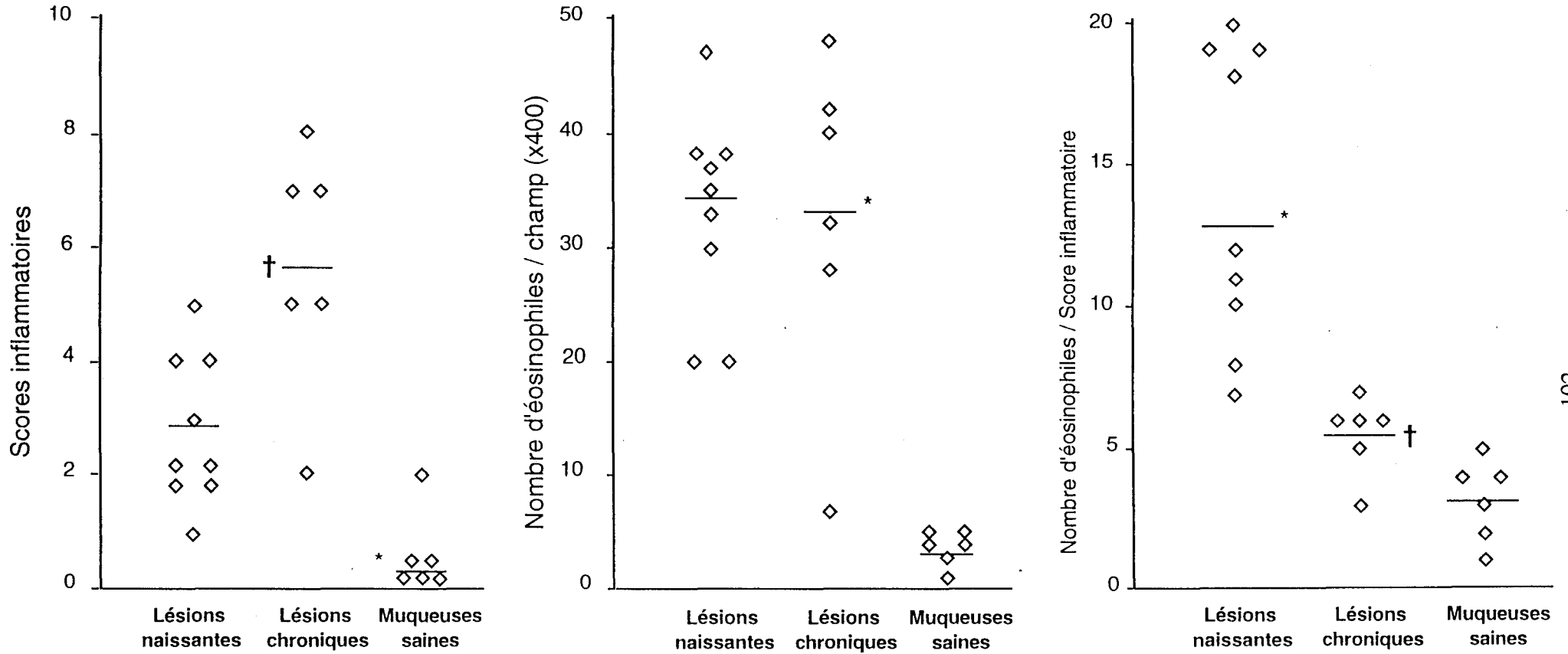


Figure 1 : Rapport entre le nombre d'éosinophiles et le score inflammatoire, dans les muqueuses saines ainsi que les lésions naissantes et chroniques de patients atteints de maladie de Crohn.

(\*  $p < 0,005$  ; †  $p < 0,05$  )

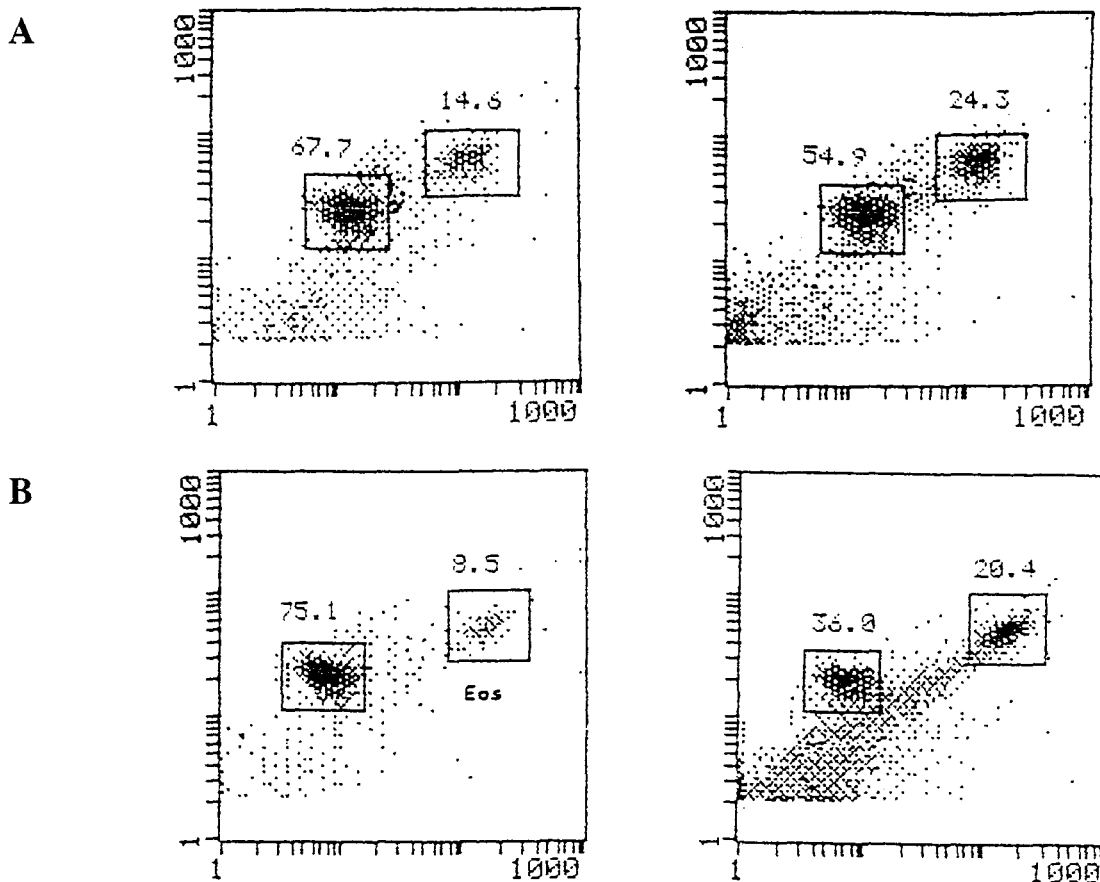


Figure 2: Comparaison, par cytométrie en flux, des pourcentages d'éosinophiles présents dans les muqueuses saines et lésées de MC. A) Grêle sain (14,6%) et lésé (24,3%). B) Côlon sain (8,5%) et lésé (20,4%).

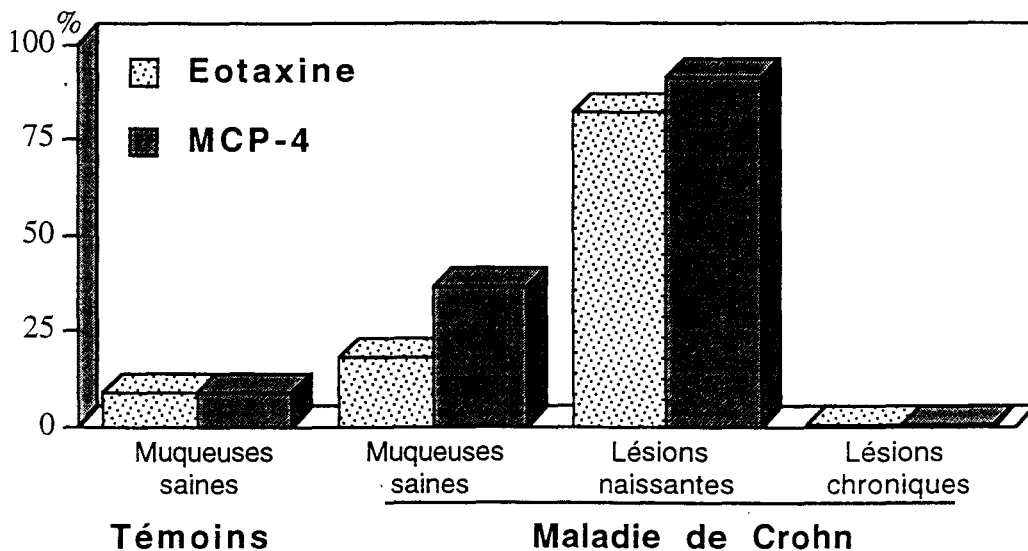


Figure 3: Pourcentage des prélèvements de muqueuse iléale qui expriment, pour une quantité de  $\beta$ -Actine donnée, l'éotaxine et le MCP-4.

Tableau 1: **Importance respective de l'éotaxine et de l'IL-5 dans les muqueuses saines ainsi que les lésions naissantes et chroniques de MC.**

Patients : prélèvements :	Témoins	MC sans récurrence	MC ayant récidivé à 3 mois	
	Muqueuse saine	Muqueuse saine	Lésions naissantes	Lésions chroniques
<b>IL-5</b>	0 / 11	0 / 8	3 / 9	0 / 8
<b>Eotaxine</b>	1 / 11	2 / 8	7 / 9	0 / 8
<b>IL-5 + éotaxine</b>	1 / 11	2 / 8	9 / 9	0 / 8

L'absence de synthèse d'IL-5, d'éotaxine et de MCP-4 dans les lésions chroniques n'est qu'apparente. En effet, si on utilise des prélèvements muqueux non dilués, les chimiokines MCP-4 et éotaxine sont détectables dans ces lésions. Or nos résultats sont exprimés en fonction des quantités de  $\beta$ -Actine par prélèvements; quantités qui sont grossièrement proportionnelles au nombre de cellules présentes dans la lamina propria. L'importance de l'infiltrat inflammatoire est en partie reflétée par le score inflammatoire (figure 1) et ce nombre est nettement supérieur dans les lésions chroniques.

## DISCUSSION

L'information principale de cette étude porte sur l'importance du nombre des éosinophiles qui participent à l'infiltrat inflammatoire des lésions naissantes. C'est sans doute la principale cellule invasive à ce stade précoce de la maladie. Le rôle des éosinophiles dans les MICI et même plus largement dans l'intestin normal, reste mal connu (Futura 1995). Si dans certaines pathologies particulières, comme la gastroenterite à éosinophiles, une corrélation entre le score inflammatoire et la présence massive d'éosinophiles a pu être établie, dans les MICI les données restent plus controversées (Futura 1995). Notre étude jette un regard neuf sur le rapport entre le nombre d'éosinophiles présents dans la *lamina propria* et le score inflammatoire. En effet, le nombre d'éosinophiles par champ est équivalent dans les lésions chroniques et dans les lésions naissantes alors que le score inflammatoire est plus important dans les lésions chroniques car les éosinophiles n'y représentent plus la population invasive majoritaire.

Les cytokines et les chimiokines responsables du recrutement intestinal des éosinophiles sont donc plus aisément identifiables dans les lésions naissantes. La présence d'IL-5 semble indispensable au recrutement des éosinophiles comme le démontrent les modèles de souris déficientes pour le gène de l'IL-5 (Mould 1997). Or si la présence d'IL-5 est bien démontrée dans les lésions naissantes de MC (Dubucquoi 1995), sa synthèse ne semble pas corrélée avec le nombre d'éosinophiles invasifs (Desreumaux 1997). Le rôle tissulaire de l'IL-5 serait donc plutôt dirigé vers l'activation et le prolongement de la survie des éosinophiles (Wardlaw 1995), alors que dans le sang, il semblerait que l'IL-5 permette surtout une mobilisation importante des éosinophiles à partir de la moelle osseuse (Collins 1995). L'importance de cette éosinophilie sanguine est directement corrélée au nombre d'éosinophiles présents dans les infiltrats inflammatoires (Collins 1995; Mould 1997).

Une injection intradermique d'IL-4 peut induire une forte éosinophilie. Si ce recrutement tissulaire a lieu, pour une grande part, suite à une néosynthèse d'éotaxine, il n'en demeure pas moins que, durant les premières heures, l'IL-4 seul semble capable de promouvoir le recrutement des éosinophiles (Sanz 1998). La coexistence de ces deux voies de recrutement par l'IL-4

expliquerait pourquoi aucune corrélation n'a pu être observée entre les quantités d'IL-4 synthétisées dans ces lésions précoces et le nombre d'éosinophiles invasifs (Desreumaux 1997).

L'induction de l'éotaxine par l'IL-4 (Mochizuki 1998; Sanz 1998) tout comme les résultats des injections intradermiques d'éotaxine dans les modèles animaux (Collins 1995; Rothenberg 1996), démontre l'importance de l'éotaxine dans le recrutement tissulaire des éosinophiles. Un modèle de souris knock out pour le gène de l'éotaxine suggère que cette chimiokine joue un rôle primordial dans l'établissement d'une éosinophilie basale dans l'intestin grêle (Matthews 1998). Il n'est donc pas certain que l'éotaxine soit la principale responsable du recrutement des éosinophiles dans les lésions naissantes et chroniques de MC. D'autres C-C chimiokines capables de se lier au CCR-3 sont sans doute également impliquées. Ainsi l'éotaxine-2, est fonctionnellement très proche de l'éotaxine mais elle nécessite des concentrations supérieures (Forssmann 1997). Les autres chimiokines (MCP-4, MCP-3 et RANTES), bien que se liant au CCR-3 (Heath 1997), agissent également, via d'autres récepteurs, sur des cellules comme les monocytes et lymphocytes T (Baggiolini 1997). Ainsi la présence de MCP-4 dans les lésions naissantes (figure 3) pourrait contribuer au futur recrutement des cellules mononuclées dans les lésions chroniques.

Des études récentes montre la présence du récepteur de l'éotaxine sur des lymphocytes Th2 (Sallusto 1997). Ces lymphocytes Th2, susceptibles de produire de l'IL-4 et de l'IL-5, associées à la présence d'éosinophiles ont été mis en évidence par immunohistochimie dans des tissus de patients atteints de dermatite de contact, de polypes nasaux ou de rectocolite hémorragique (Gerber 1997). Des similitudes semblent donc exister entre ces muqueuses très diverses. Ainsi, l'asthme partage avec les MICI un certain nombre de points communs dont une augmentation du nombre des éosinophiles (pour revue: Eliakim 1996). Cette relation entre différents systèmes immunitaires muqueux est illustrée par l'activation du GALT dans des pathologies comme l'asthme ou la dermatite herpétiforme. Activation qui s'illustre par une augmentation du nombre d'éosinophiles, de mastocyte et de cellules mononuclées recrutés dans la muqueuse intestinale, parallèlement à une augmentation de synthèse de l'IL-5, de l'IL-3 et du GM-CSF (Wallaert 1995; Desreumaux 1998). A l'inverse, dans la MC une éosinophilie bronchique a été observée (Louis 1998a). Les gènes des cytokines IL-5, IL-3 et GM-CSF étant situés dans la même région du chromosome 5 que l'IL-4 et l'IL-13, des homologues dans les mécanismes de transcription sont envisageables (Chomarat 1997). Malgré les controverses portant sur la spécificité des IgE détectés dans les sérum de MC (Huber 1998), la détection par RT-PCR d'ARNm codant pour l'IgE dans les seules lésions naissantes (Desreumaux, en préparation), suggère que les événements à l'origine de la MC pourraient être de type allergique.

Si les éosinophiles présents dans les lésions naissantes agissent dans un contexte immunologique favorisant un profil de type 2, l'évolution de la maladie conduit à l'établissement d'un profil de type 1 et à des poussées inflammatoires chroniques. L'action des éosinophiles ne peut donc être limitée à des pathologies présentant un profil de type 2. Ainsi, l'éotaxine peut également être synthétisée par des lymphocytes Th1 et une éosinophilie, indépendante d'une réponse de type Th2, peut se développer dans des souris infectée par *N. brasiliensis* (Gonzalo 1996). De même, l'IFN $\gamma$  comme l'IL-4 s'avère capable, en synergie avec le TNF $\alpha$ , d'induire une augmentation de synthèse du MCP-4 (Garcia-Zepeda 1996b).

L'augmentation du nombre d'éosinophiles dans les lésions chroniques de MC semble maintenant confirmée. Présent uniquement au niveau de la lamina propria dans les muqueuses intestinales normales, les éosinophiles sont observés de la séreuse à l'épithélium dans la MC



(Futura 1995; Bischoff 1996). Or, ces éosinophiles présentent des signes de dégranulation (Dvorak 1993) et les protéines cationiques libérées sont susceptibles d'induire des dégradations tissulaires (Gleich 1979). La dégradation de l'épithélium au niveau des lésions contribue aux quantités élevées de protéines cationiques mesurées dans la lumière intestinale de ces malades (Levy 1997). Donc, bien que dans les lésions chroniques les éosinophiles ne forment plus la population majoritaire, ils contribuent néanmoins aux dégâts tissulaires concomitant aux poussées inflammatoires, ainsi qu'à l'immunité locale par l'intermédiaire des nombreux médiateurs et cytokines qu'ils sont capables de produire (pour revue: Wardlaw 1995; Hirai 1997; Dubucquoi et Capron 1998).

## **Conclusions & perspectives**

Cette étude met en avant le rôle des éosinophiles dans les lésions naissantes de MC. Avec l'augmentation de synthèse de l'IL-4 et la présence d'ARNm codant pour l'IgE, ces observations nous conduisent à suggérer que la MC pourrait avoir pour origine un évènement de type allergique à moins qu'il s'agisse simplement d'un défaut de régulation de l'IL-4.

Nous avons développé une stratégie de clonage nous permettant d'obtenir rapidement des compétiteurs afin de réaliser des PCR quantitatives, au niveau des lésions aiguës et chroniques, à la recherche de l'éotaxine, de son récepteur (CCR-3) et d'un homologue de l'éotaxine: MCP-4.

Parmi les prélèvements sur pièce opératoire des 17 patients atteints de MC qui ont été inclus dans l'étude sur l'IL-8 (Résultats n°3), nous avons sélectionné 11 patients pour lesquels l'éotaxine était détectable en muqueuse saine comme en muqueuse lésée. Dans tous les cas, l'ADNc était trop dilué pour que le CCR3 puisse être détecté. D'autre part, nous disposons des coupes tissulaires en congélation de cette même étude (Résultats n°3), ainsi que des anticorps anti-éotaxine et anti-CCR3.

L'avancée de ces travaux reste tributaire malheureusement du nombre de malades opérés et acceptant de se soumettre aux différents prélèvements. Une étude sur l'utilité d'un traitement à base d'IL-10 pour lutter contre les récidives post-opératoires étant en cours, nous ne disposons pas pour l'instant de biopsies de lésions naissantes.

# **Résultats 3**

**L'IL-8**

**dans les lésions naissantes  
et chroniques de MC**

## **INTRODUCTION**

La présence de nombreux neutrophiles dans les infiltrats cellulaires est classiquement observée lors d'inflammations chroniques comme la maladie de Crohn (MC) ou la rectocolite hémorragique (RCH). Il est d'ailleurs probable que les dégâts tissulaires occasionnés lors des poussées inflammatoires, soient en partie le fait des composés toxiques libérés par les neutrophiles activés (Baggiolini 1994, Harada 1996). Or tant dans la MC en poussée que dans la RCH, le nombre de neutrophiles invasifs semble corrélér avec le degré d'activité de la maladie et les quantités d'IL-8 produites localement (Mitsuyama 1994; Mazzucchelli 1994). Cette CXC chimiokine fut la première chimiokine caractérisée. Elle joue un rôle prépondérant dans le recrutement des neutrophiles, mais également dans leur processus de stimulation, de dégranulation et de stress oxydatif (Baggiolini 1994). L'IL-8, présente dans les lésions chroniques des MICI, est essentiellement produite par des monocytes/macrophages et des neutrophiles invasifs (Mazzucchelli 1994; Grimm 1996; Daig 1996).

Si l'importance de l'IL-8 dans la RCH est bien documentée, des questions subsistent pour la MC. En effet, des divergences existent entre des études rapportant la sécrétion de quantités importantes d'IL-8 dans les lésions chroniques (Reimund 1996) voire même au niveau des muqueuses macroscopiquement saines de MC (Sher 1995), et des études s'intéressant plutôt à l'ARNm codant pour l'IL-8 (McLaughlan 1997). L'absence d'accroissement visible de la synthèse d'IL-8 lors d'études par RT-PCR pourrait provenir de la répartition non homogène des cellules productrices d'IL-8, comme le suggère une étude par hybridation *in situ* (Mazzucchelli 1994). L'utilisation d'au moins deux biopsies de la même région, préalablement homogénéisées, est donc indispensable dans les études par RT-PCR (Fukushima 1995). D'ailleurs, la seule étude véritablement quantitative portant sur la synthèse d'IL-8 dans la MC, a été réalisée à l'aide de prélèvements issus de pièce opératoire (Izutani 1995). Bien que l'augmentation de la synthèse d'IL-8 est moins importante que dans la RCH, les quantités mesurées s'avèrent significativement plus élevées que dans la muqueuse saine de MC ou de témoin. Malheureusement, comme dans la majorité des autres études portant sur l'IL-8 dans les MICI, une partie des patients était sous corticothérapie. De plus, afin de mieux comparer les résultats de RCH et MC, les biopsies sont recueillies au niveau du côlon, alors que les lésions inflammatoires de MC débutent généralement au niveau de l'iléon terminal (Rutgeerts 1990).

De nombreux modèles animaux développant des colites ont été décrits et la plupart semblent associés à un profil de cytokine de type 1 (pour revue: Morales 1996). Récemment des études utilisant des souris déficientes pour la chaîne alpha du récepteur des cellules T, ont révélé l'existence d'une modification de la balance des cytokines immunorégulatrices au cours de l'évolution de la maladie (Mizoguchi 1996; Takahashi 1997). En effet, les lésions naissantes présentent une élévation de la synthèse d'IL-4 associée à une production d'IgE, alors que les lésions plus anciennes montrent au contraire une présence accrue d'IL-2 et d'IFN $\gamma$ . Afin de mieux comprendre les événements immunologiques conduisant à la formation des lésions dans la MC, une étude menée par notre groupe a permis de comparer les quantités de cytokines de type 1 (IL-2, IFN $\gamma$ ) et de type 2 (IL-4, IL-5, IL-13) synthétisées dans les lésions chroniques iléales et dans les lésions naissantes, trois mois après chirurgie (Desreumaux 1997). Bien que les lésions chroniques présentent une augmentation de la synthèse d'IL-2 et d'IFN $\gamma$ , les lésions naissantes révèlent au contraire une diminution de la synthèse des cytokines de type 1 associée à une synthèse accrue d'IL-4 et dans une moindre mesure d'IL-5. De plus, dans ces lésions précoces, les granulocytes de

l'infiltrat inflammation sont majoritairement des éosinophiles et non des neutrophiles comme dans les lésions chroniques.

L'objectif principal de cette étude a donc été d'évaluer l'importance des neutrophiles dans les lésions naissantes de MC, en comparant les quantités d'IL-8 synthétisés avec les résultats d'immunohistochimie et d'histologie. En outre, afin de vérifier si l'emploi de biopsies exclusivement iléales plutôt que coliques était justifié, nous avons comparé les quantités d'IL-8 présentes dans l'iléon terminal et le côlon droit, tant au niveau des muqueuses saines que des lésions chroniques. Enfin, nous avons voulu clarifier les corrélations existantes entre le score inflammatoire, le nombre de neutrophiles et les quantités d'IL-8 synthétisées, à l'aide d'une technique de RT-PCR compétitive.

• **Les patients**

L'étude porte sur un groupe de 18 patients souffrant de MC (7 femmes et 11 hommes, entre 15 et 66 ans, âge moyen : 27 ans). Aucun n'était sous corticothérapie, au moment de leur ileocoliectomie. Ainsi chez les 18 malades, des biopsies (10 ± 1 mg) ont été prélevées sur les pièces opératoires, tant au niveau des muqueuses iléales et coliques macroscopiquement saines (18/18), qu'au niveau des lésions chroniques de l'iléon terminal (15/18) que du côlon droit (4/18).

En vue, d'étudier les évènements immunologiques conduisant à la formations des lésions de MC, 9 malades (6 femmes et 3 hommes, entre 20 et 37 ans, âge moyen : 27,4 ans) subissant une récurrence post-opératoire sévère à trois mois ont été inclus dans cette étude. Regroupées par paire, les biopsies endoscopiques (4 ± 1 mg) ont été directement congelées, avant d'être stockées à -80°C en compagnie des prélèvements réalisés sur pièces opératoires.

**RESULTATS**

• **Les résultats histologiques**

L'analyse histologique des prélèvements iléaux issus des lésions naissantes et chroniques ainsi que des muqueuses macroscopiquement et histologiquement normales de patients avec MC sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Score inflammatoire et nombre de neutrophiles présents dans les muqueuses, iléales et coloniques, saines et lésées de MC.

	Iléon terminal			Colon droit	
	Lésions naissantes n=14	Muqueuses saines n=13	Lésions chroniques n=10	Lésions chroniques n=4	Muqueuses saines n=15
Scores inflammatoires	3,3±1,3	0	6,4 ± 1,8	5,5±0,5	0
PMN / champ (x400)	2,9±0,9	0	10,4±1,5	15,7±1,25	0

Le nombre de neutrophiles a été évalué dans 5 champs présentant un infiltrat inflammatoire. Les scores inflammatoires vont de 0 à 10 en fonction de la sévérité de l'inflammation

Les scores inflammatoires sont significativement plus importants dans les lésions naissantes et chroniques par rapport aux muqueuses iléales ou coliques saines ( $p < 0,001$ ). Contrairement aux lésions précoces ou chroniques, les neutrophiles sont totalement absents des muqueuses intestinales saines. Dans les lésions chroniques de MC, aucune différence significative n'a pu être observée entre grêle et côlon, tant pour les scores inflammatoires que pour le nombre de neutrophiles par champ.

Les lésions naissantes iléales ( $3,3 \pm 1,3$ ) présentent un score inflammatoire significativement plus faible ( $p < 0,001$ ) que les lésions iléales chroniques ( $6,4 \pm 1,8$ ). Le nombre de neutrophiles par champ y est nettement plus faible ( $p < 0,001$ ), respectivement  $2,9 \pm 0,9$  et  $10,4 \pm 1,5$ .

- Quantités d'IL-8 synthétisées en fonction de la localisation intestinale

En raison du faible nombre de prélèvements réalisés chez les 18 patients souffrant de MC au niveau des lésions chroniques du côlon ( $n=4$ ), l'augmentation de la synthèse d'IL-8 observée dans les lésions chroniques de l'iléon par rapport au côlon droit (figure 1) ne s'est pas montrée significative.

Dans les prélèvements de muqueuses normales, le nombre de molécules d'ADNc d'IL-8 pour  $10^6$  molécules de  $\beta$ -Actine s'est avéré deux fois plus important dans l'iléon ( $225 \pm 181$ ) qu'au niveau du côlon ( $119 \pm 84$ ), mais la forte hétérogénéité des prélèvements ne nous a pas permis de conclure (figure 1).

Néanmoins, ces résultats justifient notre choix de privilégier l'utilisation de prélèvements iléaux au lieu des biopsies coliques généralement étudiées.

- Quantités d'IL-8 synthétisées en fonction de l'évolution de la maladie

Dans les lésions naissantes, survenues trois mois après chirurgie chez 9 malades, l'ARNm codant pour l'IL-8 s'est avéré indétectable après 40 cycles de PCR (figure 2). Le nombre de molécules d'ADNc d'IL-8 était inférieur à 1 molécule pour  $10^6$  molécules de  $\beta$ -Actine. Ainsi, comparée à une muqueuse iléale normale, la synthèse d'IL-8 est diminuée dans les lésions naissantes ( $p < 0,001$ ).

A l'inverse, dans les lésions iléales chroniques des 15 patients avec MC, les quantités d'IL-8 ont été multipliées par 7 par rapport à la muqueuse normale des mêmes malades (figure 2). Ainsi, le nombre de molécules d'IL-8 pour  $10^6$  molécules de  $\beta$ -Actine est passé de 225 molécules au niveau des muqueuses normales à 1562 molécules d'IL-8 au niveau des lésions iléales chroniques ( $p < 0,001$ ). Ces résultats sont en accord avec les scores inflammatoires (tableau 1) et les résultats de l'étude immunohistologique (tableau 2).

- Les résultats immunohistochimiques

Les cellules à l'origine de l'IL-8 sont principalement des cellules mononucléées, identifiées par double marquage (CD68/IL-8) comme étant des monocytes/macrophages. Des neutrophiles positifs pour l'IL-8 ont également été observés, alors qu'aucun marquage n'était présent au niveau des cellules épithéliales. Tous les résultats d'immunohistochimie sont en accord avec les quantités d'ARNm codant pour l'IL-8 qui ont été mesurées par RT-PCR compétitive, à l'exception des résultats concernant les 4 prélèvements réalisés au niveau des lésions chroniques du côlon droit (tableau 2).

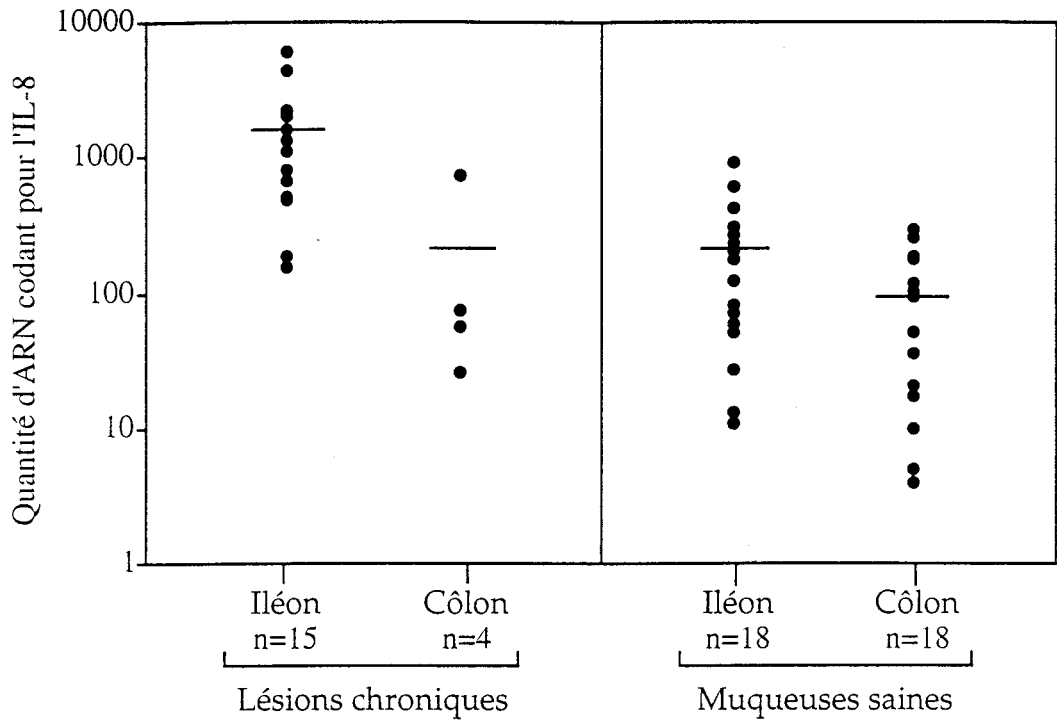


Figure 1: Synthèse mucosale d'IL-8 en fonction de la localisation intestinale. Les résultats sont exprimés en nombre de molécules d'ADNc codant pour de l'IL-8 pour  $10^6$  molécules d'ADNc de  $\beta$ -Actine.

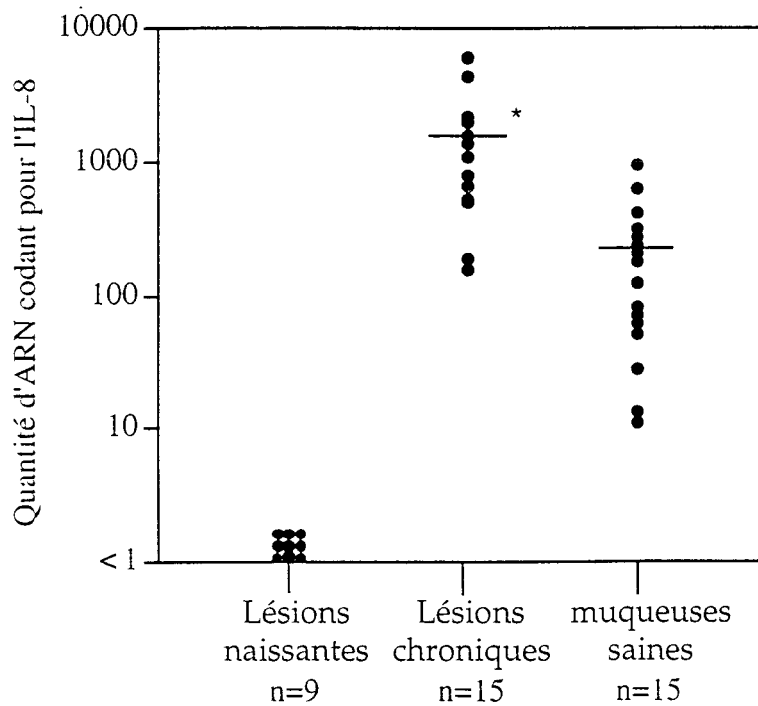


Figure 2: Synthèse mucosale d'IL-8 en fonction de l'évolution de la maladie. Les résultats sont exprimés en nombre de molécules d'ADNc codant pour de l'IL-8 pour  $10^6$  molécules d'ADNc de  $\beta$ -Actine. \*  $p < 0,01$

**Tableau 2:** Comparaison entre les quantités d'IL-8 synthétisées et le nombre de cellules productrices d'IL-8 au niveau des muqueuses iléales et coliques normales, ainsi qu'au niveau des lésions naissantes et chroniques de MC.

	ARNm		Protéines	
	molécules d'IL-8 / $\beta$ -Actine		cellules positives / champ	
	n	Moyenne $\pm$ SEM	n	Moyenne $\pm$ SEM
Lésions iléales naissantes	9	non détecté	14	2,9 $\pm$ 1,1
Muqueuses iléales normales	18	225 $\pm$ 181	13	4,8 $\pm$ 0,8
Lésions chroniques de l'iléon	15	1562 $\pm$	10	27 $\pm$ 2,7
Lésions chroniques du côlon	4	226 $\pm$ 207	4	30,7 $\pm$ 2,9
Muqueuses coliques normales	18	119 $\pm$ 84	15	3,7 $\pm$ 1,3

Ainsi dans les lésions iléales chroniques, le nombre de cellules positives pour l'IL-8 (27 $\pm$ 2,7) est significativement plus élevé ( $p < 0,001$ ) que dans les lésions naissantes (2,9 $\pm$ 1,1) ou les muqueuses iléales normales (4,8 $\pm$ 0,8). A noter qu'à l'absence d'ARNm de l'IL-8 dans les lésions naissantes (figure 1) correspond une diminution significative du nombre de cellules produisant de l'IL-8 dans ces lésions précoces par rapport aux muqueuses iléales normales des mêmes patients ( $p < 0,005$ ).

Aucune différence significative n'a pu être observée entre les prélèvements iléaux et les prélèvements coliques au niveau des lésions chroniques (respectivement 27 $\pm$ 2,7 et 30,7 $\pm$ 2,9), alors qu'en muqueuse saine une légère mais significative augmentation du nombre de cellules productrices d'IL-8 a pu être observée dans l'iléon terminal (4,8 $\pm$ 0,8) par rapport au côlon droit (3,7 $\pm$ 1,3) ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSION

Le résultat principal de cette étude est l'absence d'IL-8 et de neutrophiles au niveau des lésions naissantes de patients souffrant de MC. L'absence de quantités détectables d'ARNm codant pour l'IL-8 semble liée à une diminution du nombre de cellules productrices d'IL-8 au niveau de la *lamina propria*. Ni la présence d'IL-8, ni la présence de neutrophiles ne paraissent donc contribuer à la survenue des récidives post-opératoires. En fait, une étude récente de notre groupe révèle que ce sont majoritairement des éosinophiles qui sont recrutés dans ces lésions naissantes (Résultats 2). Associé à une augmentation de la synthèse d'IL-4 et d'IgE, ces résultats suggèrent qu'un phénomène de type allergique pourrait être impliqué dans la survenue des lésions naissantes de MC.

Ainsi si des modèles de souris transgéniques pour l'IL-4 développent des désordres de type allergique (Tepper 1990) voire même des inflammations intestinales (Vallance 1997), il n'en demeure pas moins que l'IL-4 est capable de jouer un rôle anti-inflammatoire (Chomarar 1997; Brown 1997). Ainsi dans un modèle de glomérulonéphrite induite par anticorps chez des souris IL-4<sup>+/+</sup> et IL-4<sup>-/-</sup>, la présence d'IL-4 endogène s'est montrée capable de supprimer le recrutement de neutrophiles et de réduire les dégâts tissulaires concomitants (Saleem 1998). De même, dans un modèle de colite induite par le TNB chez le rat, l'injection répétée d'un vecteur portant le gène de

l'IL-4 a permis de réduire les dommages tissulaires et d'inhiber l'activité myéloperoxidase des neutrophiles du côlon (Hogaboam 1997). Ces observations sont en accord avec la faible présence de neutrophiles dans les lésions iléales naissantes de patients souffrant de MC.

Mais une inhibition de l'action anti-inflammatoire de l'IL-4 dans les MICI, ainsi que dans l'arthrite rhumatoïde, est observée localement au niveau des monocytes (Chomarat 1997). En effet, l'activation des cellules mononucléées extraites de la *lamina propria* n'est plus inhibée aussi efficacement par l'IL-4 qu'avec les PBMC (Schreiber 1995). Ce phénomène est également observé avec l'IL-13, suggérant un rôle de leur récepteur dans cette inhibition (Kucharzik 1996). Aucune variation dans l'expression membranaire du récepteur de l'IL-4 n'étant observée, l'inhibition pourrait être due à un défaut dans la cascade de transduction du signal (Rückert 1996). Ainsi les premiers monocytes recrutés dans les lésions naissantes de MC, insensibles à l'action inhibitrice de l'IL-4, sont susceptibles d'être activés par le LPS. Ces monocytes pourraient alors être impliqués, par l'intermédiaire de l'IL-12 et de l'IL-18 qu'ils secrètent, dans le passage d'un profil de type 2 à un profil de type 1, caractéristique des lésions chroniques (Lamont 1996; Puren 1998). En outre, cette synthèse d'IL-18 dans les lésions chroniques pourrait, en synergie avec le TNF $\alpha$ , induire une libération accrue d'IL-8 par les monocytes invasifs (Puren 1998).

La présente étude, portant sur l'IL-8 dans les lésions chroniques, est la première qui montre clairement et de façon quantitative une augmentation de l'IL-8 au niveau de l'iléon terminal, la localisation privilégiée de la MC. Cette accumulation iléale d'IL-8 semble corrélérer avec l'augmentation du nombre de neutrophiles dans les lésions chroniques ainsi qu'avec le score inflammatoire. Ces observations suggèrent une participation des neutrophiles dans les dégâts tissulaires, soit par dégranulation de composés toxiques soit par libération de radicaux oxygénés (Baggiolini 1994; Harada 1996). Cette augmentation de l'ARNm de l'IL-8 aurait pour origine un plus grand nombre de cellules productrices. En effet, la source majeure de l'IL-8 semble être représentée par les monocytes-macrophages CD14<sup>+</sup>/CD68<sup>+</sup> invasifs (Grimm 1996a).

L'absence du récepteur CD14 sur les macrophages résidents dans les muqueuses normales, pourrait expliquer pourquoi ces cellules n'expriment pas des quantités accrues d'IL-8 en présence de LPS (Grimm 1996a). Ainsi dans les lésions naissantes, les macrophages ne produisent pas plus d'IL-8 que dans les muqueuses normales. En outre, l'importance de l'infiltrat inflammatoire, majoritairement composé d'éosinophiles qui ne produisent pas d'IL-8, entraîne une diminution du pourcentage de cellules positives pour l'IL-8. Il en va de même du rapport entre l'ARNm de l'IL-8 et l'ARNm de la  $\beta$ -Actine.

Alors que la majorité des études portent sur le côlon, nos résultats suggèrent qu'une synthèse accrue d'IL-8 a lieu dans l'iléon terminal. Cette augmentation de la synthèse est liée à la présence d'un plus grand nombre de cellules mononucléées dans la *lamina propria* iléale des malades. Une caractérisation plus fine des différences immunologiques existant entre l'iléon terminal et le côlon droit contribuerait à une meilleure connaissance des raisons conduisant à une localisation primordialement iléale de la MC.

Peu d'études ont comparé les monocytes/macrophages présents dans l'iléon et le côlon. Lors d'une étude récente sur les lésions iléales de MC, 75% des macrophages étaient également marqués par l'anticorps RFD-7, un marqueur de cellules dendritiques (D'Haens 1998). Dans l'iléon normal humain, la majorité des cellules HLA-DR<sup>+</sup> ne sont que faiblement estérase et phosphatase acide positives, alors que dans le côlon normal la plus part de ces cellules sont fortement positives, révélant une importante activité de phagocytose (Selby 1983). En effet, la flore



endogène est majoritairement présente dans le côlon où les macrophages muqueux CD68<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> sont donc constitutivement activés. A l'inverse, dans l'iléon terminal la majorité des macrophages de la lamina propria ont plutôt une activité de cellule présentatrice d'antigènes. Ces macrophages iléaux ne semblent pas totalement différenciés en macrophages matures et pourraient continuer à exprimer le CD14, favorisant ainsi leur activation. Ce qui conduirait à la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines comme l'IL-8 responsable du recrutement des neutrophiles ou le MCP-1, impliqué dans le recrutement intestinal des monocytes (Grimm 1996b).

## **Conclusions & perspectives**

Cette étude a permis de mettre en lumière l'importance de la localisation et du stade évolutif de la maladie lors d'études portant sur l'expression de cytokines ou de chimiokines dans la MC.

La comparaison entre lésions naissantes et chroniques confirme que les lésions post-opératoires à 3 mois ne sont pas le résultat d'une inflammation aiguë impliquant la sécrétion d'IL-8 et le recrutement de neutrophiles. La synthèse accrue d'IL-4 et la présence de quantités importantes d'éosinophiles dans ces lésions naissantes suggèrent au contraire qu'un évènement de type allergique pourrait être à l'origine des récurrences de la MC.

Ceci expliquerait pourquoi les traitements anti-inflammatoires classiquement utilisés ne sont pas très efficaces pour lutter contre la survenue des récurrences post-opératoires. C'est pourquoi des traitements à base d'IL-10 recombinante sont actuellement testés. En effet l'IL-10 ne va pas seulement inhiber la synthèse des cytokines pro-inflammatoires mais également des cytokines immunorégulatrices de type 1 (IL-2, IFN $\gamma$ ) et de type 2 (IL-4).

## **Résultats 4**

**Importance respective de l'IL-8 et de Gro $\alpha$   
dans le recrutement des neutrophiles  
chez des patients atteints de MC**

## INTRODUCTION

Le recrutement tissulaire des polynucléaires neutrophiles (PMN) ne diffère guère de celui des autres leucocytes. Il se déroule en trois étapes (Butcher 1991). Tout d'abord s'établit une série de contacts transitoires, appelés « rolling », entre les sélectines des cellules périphériques (L-Sélectine) et des cellules endothéliales (P et E sélectines). Puis, suite à l'émission de médiateurs inflammatoires, les cellules endothéliales vont surexprimer ICAM-1, permettant l'adhésion des intégrines Mac-1 (CD11b/CD18) et LFA-1 (CD11a/CD18) présentes à la surface des PMN activés (pour revue: Panes 1998). Finalement, les PMN vont migrer à travers les cellules endothéliales vers le site de l'inflammation (Feng 1998). Cette extravasation des PMN est stimulée par l'émission locale de facteurs chimiotactiques (pour revue: Baggiolini 1994, 1997).

Plusieurs études récentes ont comparé l'importance relative de divers chimioattracteurs (fMLP, C5a, IL-8, et Gro $\alpha$ ) dans le recrutement tissulaire des neutrophiles. Suite à des expériences de désensibilisation croisée, une hiérarchie des agents chimioattracteurs a été proposée (Kitayama 1997; Campbell 1997). Ainsi le dérivé bactérien fMLP paraît à ce jour le plus efficace, car il est capable d'inhiber l'action de C5a, de l'IL-8 et de Gro $\alpha$ , alors que C5a inhibe uniquement les deux récepteurs des CXC chimiokines. Si l'affinité de l'IL-8 pour CXCR1 et CXCR2 est élevée, Gro $\alpha$  ne peut pour sa part se lier efficacement qu'au CXCR2 (Ahuja 1996). Par compétition directe pour ce second récepteur, IL-8 va donc pouvoir limiter l'action de Gro $\alpha$ , d'autant plus que les complexes IL-8/CXCR2 vont être internalisés et que la réexpression des CXCR2 à la membrane n'est que partielle (Sabroe 1997). Ces résultats suggèrent que l'ultime étape du recrutement tissulaire des neutrophiles est essentiellement sous le contrôle du fMLP et de C5a, alors que les CXC chimiokines seraient plutôt impliquées dans l'activation des neutrophiles périphériques et dans leur migration transendothéliale.

Dans la MC, une augmentation de l'IL-8 muqueuse a été rapportée qui semble corrélée avec le nombre de neutrophiles invasifs et d'une manière plus générale avec le degré de l'inflammation (Mitsuyama 1994; Mazzucchelli 1994). D'ailleurs les monocytes/macrophages et les neutrophiles de l'infiltrat inflammatoire représentent la source majeure de l'IL-8 muqueuse (Grimm 1996a; Mazzucchelli 1994). A l'inverse, cette présence importante d'IL-8 dans les muqueuses intestinales de MICI ne se traduit pas par une élévation de l'IL-8 périphérique (Mahida 1992; Jones 1993; Mitsuyama 1996). En effet même lors des poussées, l'IL-8 circulante reste indétectable, ce qui suggère que l'IL-8 n'est pas directement impliquée dans le « priming » des neutrophiles périphériques (Roberts 1993) mais plutôt dans l'adhésion aux cellules endothéliales (Middleton 1997).

Si de nombreuses études portent sur l'IL-8 dans les MICI, seuls quelques rares travaux se sont intéressés à GRO. Trois isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , partageant une homologie de séquence de 90%, ont été identifiés. Leurs cibles principales sont les neutrophiles, via le récepteur CXCR2 (Ahuja 1996). Or tout comme l'IL-8, la synthèse des trois isoformes de GRO ainsi que de deux autres CXC chimiokines (IP-10 et ENA-78) est augmentée dans les lésions de RCH (Yang 1997). Mais comme le pouvoir chimioattractant de GRO $\alpha$  peut être inhibé par l'IL-8, il est peu probable que GRO $\alpha$  joue un rôle majeur dans le recrutement tissulaire des neutrophiles dans les MICI. Par contre, GRO $\alpha$  est susceptible de participer à l'activation des neutrophiles périphériques.

Afin d'établir l'état d'activation des neutrophiles sanguins dans la MC, nous avons d'abord étudié les variations d'expression membranaire des molécules d'adhésion impliquées dans le « rolling » (L-Selectine, CD15) et l'adhésion aux cellules endothéliales (Mac-1 et LFA-1).

Parallèlement, la réponse des neutrophiles de patients et de témoins à des agents chimioattractants, tels le fMLP et l'IL-8, a été comparée. En outre, la présence d'IL-8 et de GRO $\alpha$  dans les plasmas, ainsi que les surnageants de culture des PBMC et des neutrophiles de patients et de témoins a été évaluée.

La présente étude suggère que les neutrophiles périphériques de patients atteints de MC sont dans un état d'activation chronique, comme le montre l'augmentation du pouvoir chimioattractant du fMLP et de l'IL-8 ainsi que la surexpression membranaire du CD11b (Mac-1) à la surface des neutrophiles sanguins. L'augmentation du chimiotactisme des neutrophiles de malade vis à vis de l'IL-8 pourrait être liée à une préactivation par GRO $\alpha$ , dont la présence dans les plasmas des patients avec MC est plus élevée que chez les témoins.

### • Les patients

Notre étude porte sur 10 patients (Tableau 1) hospitalisés avec une MC en poussée (CDAI>150) et sur 10 donneurs sains. Les prélèvements sanguins ont été effectués avec le consentement éclairé des patients. Le sang des donneurs provient du CRTS.

Tableau 1 :

Patients	Date	Sexe	Age	CDAI
MC 1	25.3.97	M	16	210
MC 2	13.5.97	F	43	185
MC 3	13.5.97	F	34	165
MC 4	30.9.97	F	24	190
MC 5	30.9.97	M	30	225
MC 6	30.9.97	F	54	260
MC 7	17.10.97	F	23	175
MC 8	17.10.97	F	53	155
MC 9	28.10.97	F	21	178
MC 10	28.10.97	M	49	220

Trois malades (2 femmes et 1 homme de 19 à 28 ans) ayant subi une résection iléocolique ont également été inclus dans cette étude. Des prélèvements grêliques et coliques ont été réalisés sur les pièces opératoires de ces trois patients avec MC tant en zone macroscopiquement normale qu'au niveau des lésions chroniques.

## RESULTATS

### • Expression des molécules d'adhésion à la surface des neutrophiles

L'expression membranaire des molécules d'adhésion impliquées dans le « rolling » (CD62L, CD15) et l'adhésion aux cellules endothéliales (CD11b et LFA-1) a été étudiée par cytométrie en flux (Figure 1). Approchant les 100% pour le CD15, le CD11b et le LFA-1, le pourcentage de cellules positives pour la L-Sélectine (CD62L) n'est que d'environ 84% avec des variations allant de 48% à 99%. Mais aucune différence significative entre neutrophiles de patients et de témoins n'a pu être observée quant au pourcentage de cellules positives. Par contre, la fluorescence moyenne du CD11b qui reflète la densité de cette molécule d'adhésion à la surface des neutrophiles, est significativement plus élevée chez les patients atteints de MC que chez les témoins ( $p<0,05$ ). Mais aucune corrélation n'a pu être observée entre ces expressions membranaires et l'activité de la maladie (CDAI).

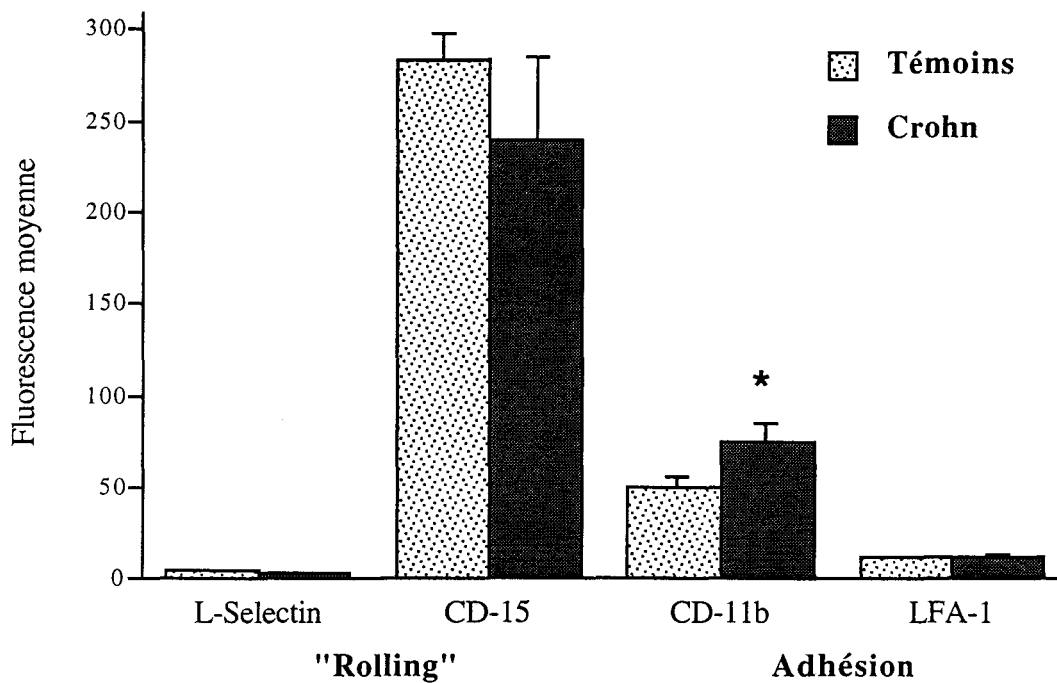


Figure 1 : Comparaison par cytométrie en flux de l'expression membranaire des molécules d'adhésion chez des neutrophiles sanguins de témoins et de patients avec MC. Pour CD-15, CD11b et LFA-1 (CD11a/CD-18), le pourcentage de cellules positives est de l'ordre de 98% et ne varie pas. La fluorescence moyenne est le reflet de la densité membranaire des molécules d'adhésion. \*  $p < 0,05$ .

- Réponse chimiotactique des neutrophiles

Le pouvoir chimiotactique du fMLP ( $10^{-7}$ ) et de l'IL-8 (50ng/ml) a été évalué en chambre de Boyden sur les neutrophiles de 10 patients souffrant de MC et de 10 donneurs sains (Figure 2). Tant pour le fMLP que pour l'IL-8, une augmentation significative de la migration des neutrophiles de malades a été constatée ( $p < 0,05$ ). Pour  $GRO\alpha$ , cette augmentation n'est pas significative en raison d'un trop faible nombre de prélèvements ( $n=4$ ).

- Expression de CXCR1 et R2 à la surface des neutrophiles

Afin de vérifier si l'augmentation du recrutement des neutrophiles de malade par l'IL-8 pouvait être lié à des variations de l'expression membranaire de ses récepteurs, nous avons comparé par cytométrie en flux l'expression membranaire de CXCR1 et CXCR2 à la surface des neutrophiles de témoins et de patients avec MC (Figure 3). Aucune différence significative n'a pu être observée entre témoins et malades quant au nombre de CXCR1 ou CXCR2 présent à la surface de leurs neutrophiles périphériques.

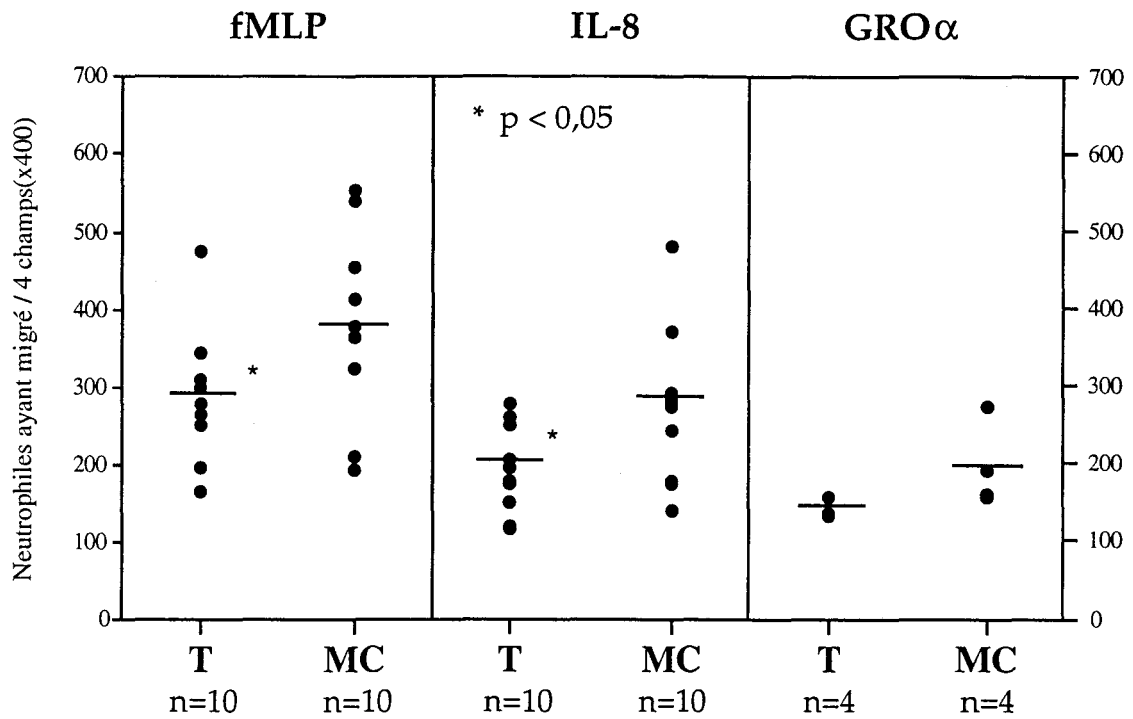


Figure 2 : Etude en chambre de Boyden du chimiotactisme des neutrophiles de témoins sains (T) et de patients atteints de maladie de Crohn (MC) vis à vis du fMLP (10<sup>-7</sup>), de l'IL-8 (50ng/ml) et de GRO $\alpha$  (50ng/ml).

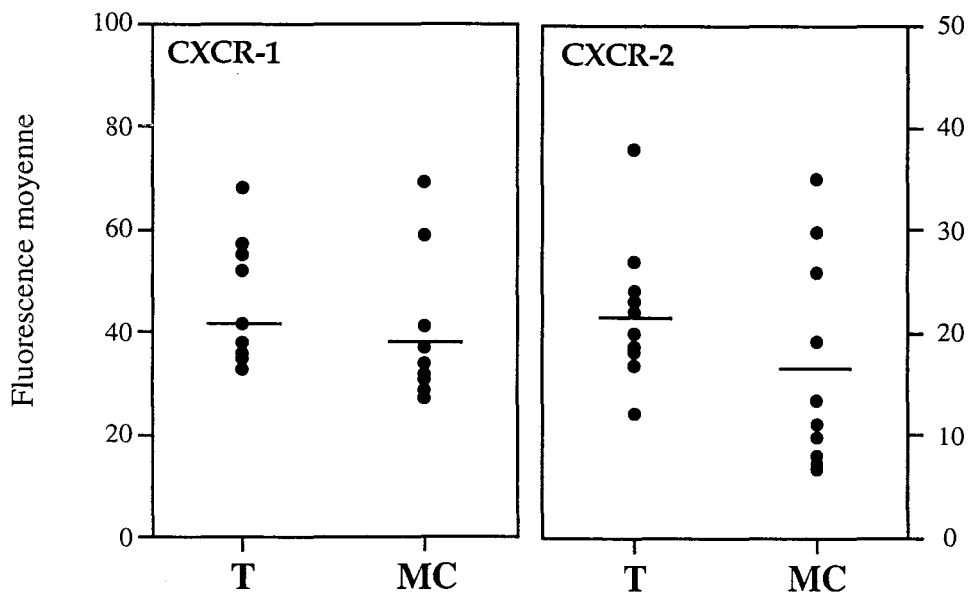


Figure 3 : Expression membranaire des récepteurs CXCR1 et CXCR2 à la surfaces des neutrophiles de témoins (n=10) et de malades (n=10). Les neutrophiles sont tous positifs, mais ils diffèrent par le nombre de récepteurs exprimés à leur surface.

• Production d'IL-8 par neutrophiles

La libération d'IL-8 par des neutrophiles, stimulés ou non par du LPS (100ng/ml), a été mesurée par ELISA après 18h de culture. Aucune différence significative n'a pu être observée (Figure 4 A). Par contre, la mesure de l'IL-8 intracellulaire par cytométrie de flux a révélée une différence significative après stimulation par le LPS ( $p < 0,05$ ). En effet, après 18h de stimulation les neutrophiles témoins présentaient une accumulation d'IL-8 intracellulaire qui n'était pas observée chez les neutrophiles des malades (Figure 4 B). Ce qui suggère que les neutrophiles de patients atteints de MC pourraient avoir sécrété l'IL-8 néosynthétisée durant la culture.

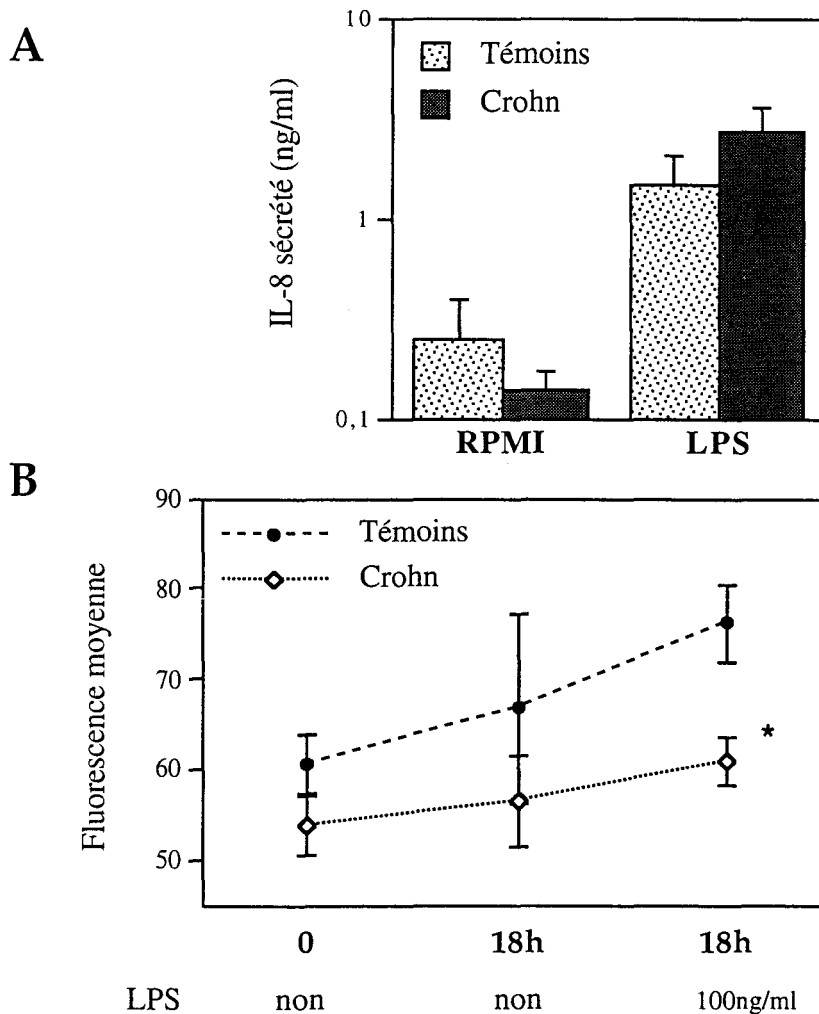


Figure 4 : Comparaison des neutrophiles de patients avec MC et des neutrophiles de témoins. **A**) Comparaison par ELISA de l'IL-8 sécrétée dans le milieu de culture, et **(B)** comparaison de l'IL-8 intracellulaire par cytométrie en flux. L'absence d'accumulation de l'IL-8 dans les neutrophiles des malades suggère une libération accrue d'IL-8. \*  $p < 0,05$

- Mesure de l'IL-8 et de GRO $\alpha$  dans les plasmas et les surnageants de culture

Les niveaux d'IL-8 et de GRO $\alpha$  circulants ont été relevés non seulement dans les prélèvements plasmatiques des témoins et des patients avec MC, mais également dans les surnageants de culture des PBMC et neutrophiles sanguins :

Tableau 2 : n.d.= non détecté * p < 0.005	IL-8 (ng/ml)		GRO $\alpha$ (pg/ml)	
	Contrôle	Crohn	Contrôle	Crohn
	moyenne $\pm$ sem	moyenne $\pm$ sem	moyenne $\pm$ sem	moyenne $\pm$ sem
<b>Plasma</b>	n.d.	n.d.	101.7 $\pm$ 13.2	235.3 $\pm$ 50.3 *
<b>PBMC</b> (10 <sup>6</sup> cells/ml)	47.4 $\pm$ 8	45.1 $\pm$ 6.3	2 996 $\pm$ 1537	2 898 $\pm$ 858
<b>PBMC+LPS</b> (100ng/ml)	134.3 $\pm$ 23.8	157.6 $\pm$ 29.1	14 160 $\pm$ 2924	14 817 $\pm$ 3199
<b>PMN</b> (10 <sup>6</sup> cells/ml)	0.25 $\pm$ 0.15	0.14 $\pm$ 0.04	1 408 $\pm$ 1067	687 $\pm$ 204
<b>PMN+LPS</b> (100ng/ml)	1.47 $\pm$ 0.60	2.71 $\pm$ 0.87	522 $\pm$ 380	447 $\pm$ 169

Même avec un kit ELISA dont la sensibilité était inférieure à 25pg/ml, dans aucun des 20 prélèvements de plasma de l'IL-8 circulante n'a pu être détectée, alors que GRO $\alpha$  était présente dans chacun de ces prélèvements. En outre, dans le plasma des 10 patients avec MC des quantités significativement plus importantes de GRO $\alpha$  ont été mesurées (p<0,005). Mais cette augmentation ne semble pas liée aux cellules périphériques puisque qu'aucune différence d'expression n'a pu être observée ni chez les neutrophiles en culture ni même chez les PBMC, qu'ils soient stimulés ou non (Tableau 2). Une légère baisse des quantités de GRO $\alpha$  présentes dans les surnageants de neutrophiles, tant chez témoins que chez les malades, a même été observée après stimulation.

- Sources cellulaires de GRO $\alpha$  et d'IL-8

Afin de mieux comprendre les différences observées entre IL-8 et GRO $\alpha$ , nous avons déterminé leur importance respective dans les surnageants de PBMC et de neutrophiles en culture (Figure 5). Vu qu'aucune différence n'était observée entre témoins et malades, les résultats ont été analysés comme faisant partie du même groupe. Pour un nombre de cellules équivalent, les PBMC libèrent spontanément 5000 fois plus d'IL-8 que les neutrophiles, mais ces PBMC ne sécrètent que 3 fois plus de GRO $\alpha$  (Figure 5A). Si la libération spontanée d'IL-8 par les PBMC est 15 à 20 fois plus importante que celle de GRO $\alpha$ , les neutrophiles à l'inverse en sécrètent 10 fois moins. Après stimulation par du LPS (Figure 5B), les PBMC libèrent significativement plus d'IL-8 et de GRO $\alpha$  (p<0,001). Par contre, si les neutrophiles sécrètent nettement plus d'IL-8 après stimulation par le LPS (p<0,001), il semblerait que pour GRO $\alpha$ , la stimulation entraînerait une légère baisse de sécrétion.



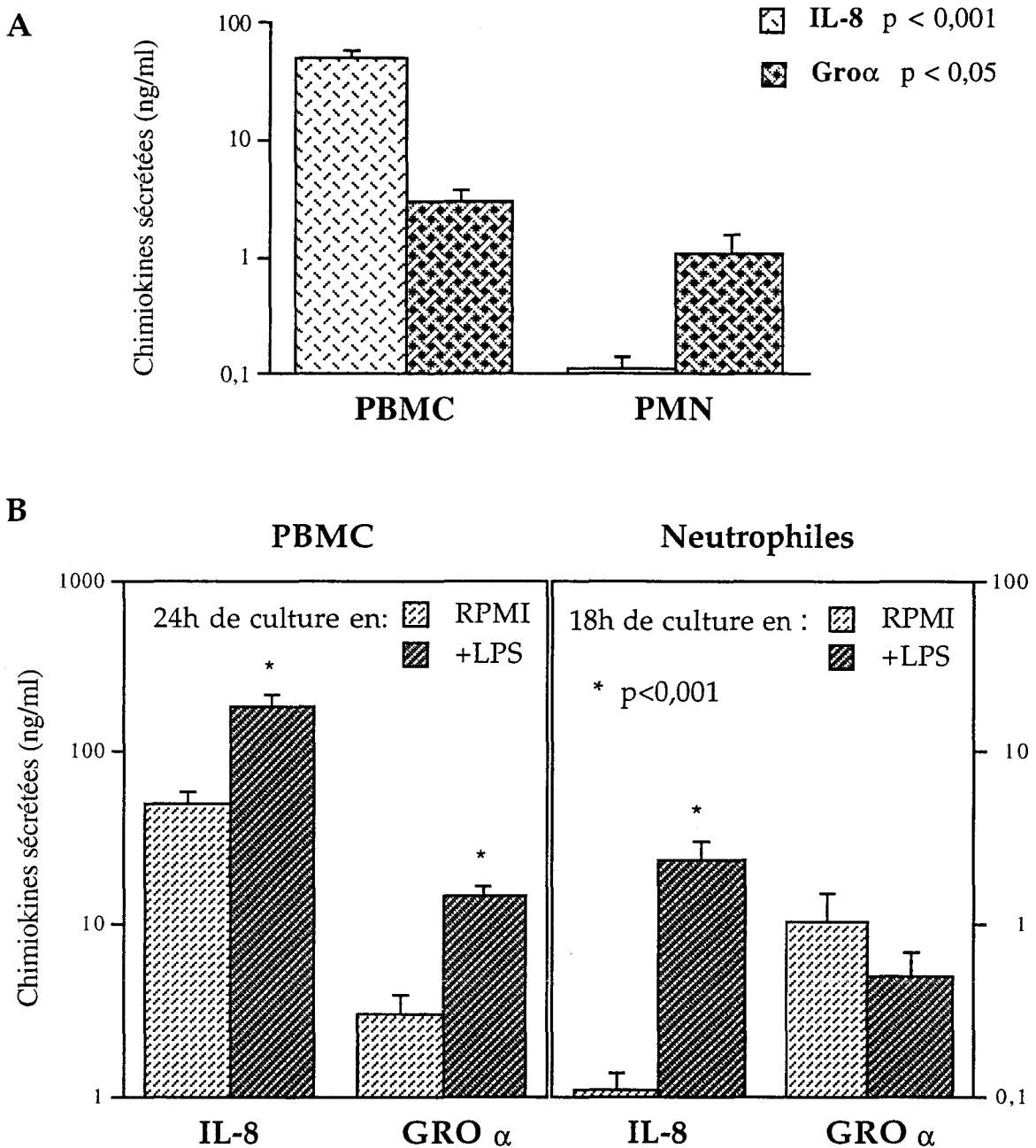


Figure 5 : Comparaison des quantités respectives d'IL-8 et de GRO $\alpha$  sécrétées par les PBMC et les neutrophiles. Mesure par ELISA: **A)** Des quantités d'IL-8 et de GRO $\alpha$  libérées spontanément par les PBMC et les neutrophiles; **B)** Des quantités d'IL-8 et de GRO $\alpha$  libérées après stimulation par du LPS (100ng/ml).

• Synthèse de GRO $\alpha$  et d'IL-8 dans la muqueuse intestinale de patient avec MC

Afin de mieux comprendre la raison pour laquelle seule GRO $\alpha$  et non l'IL-8 était détectable dans le sang périphérique alors qu'*in vitro* les cellules sanguines sécrétaient plus d'IL-8, nous avons comparé les quantités d'ARNm de GRO $\alpha$  et d'IL-8 présentes dans la muqueuse intestinale des malades (Figure 6).

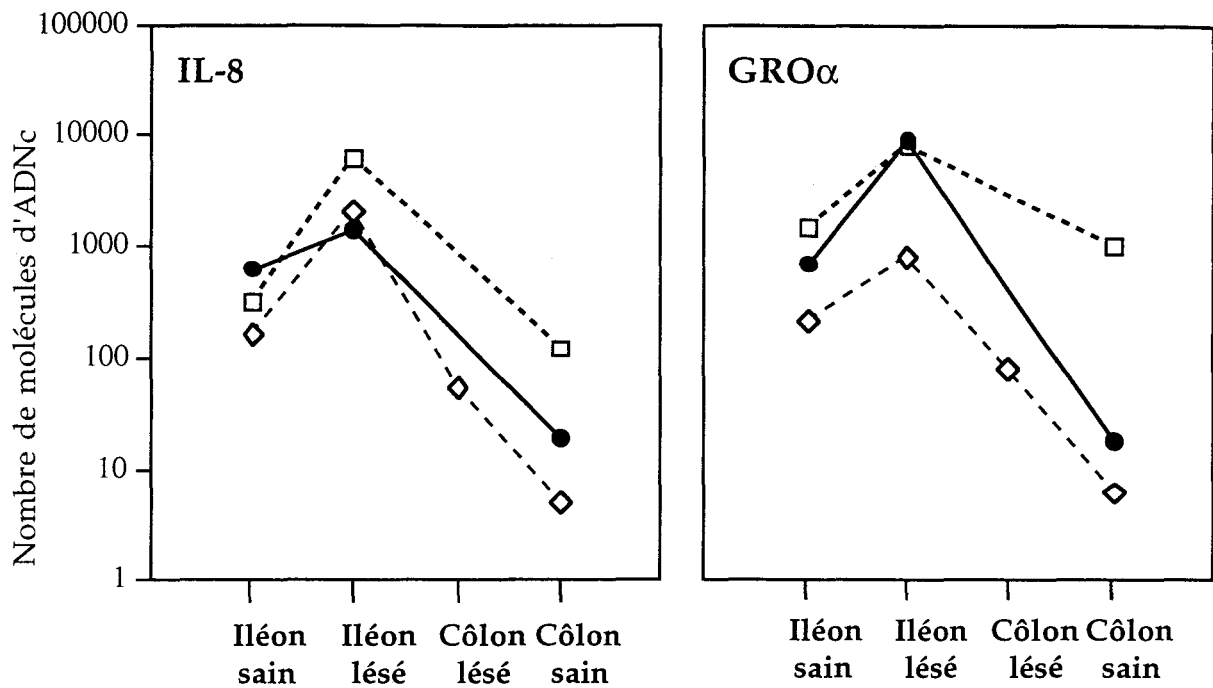
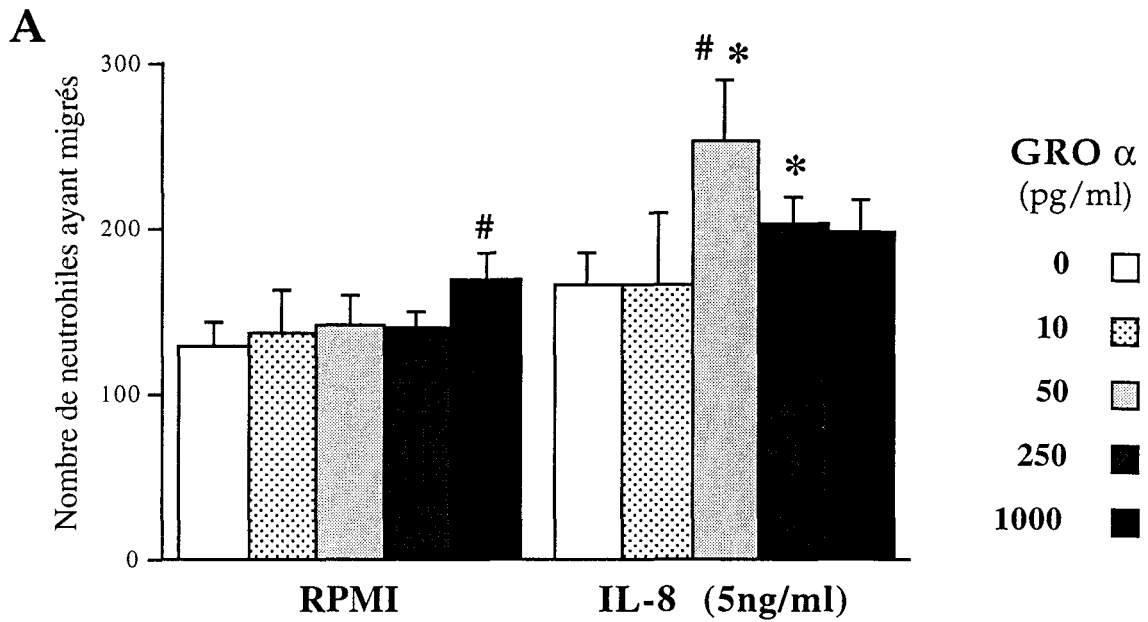


Figure 6 : Comparaison des quantités d'ARNm d'IL8 et de GRO $\alpha$  synthétisées dans la muqueuse intestinale de patients avec MC. Résultats exprimés en nombre de molécules d'ADN complémentaire pour 10<sup>6</sup> molécules de  $\beta$ -Actine.

- Influence d'une préstimulation des neutrophiles par GRO $\alpha$

A défaut de pouvoir activer les neutrophiles, vu les faibles concentrations de GRO $\alpha$  mesurées dans le plasma (Tableau 2), les quantités circulantes de GRO $\alpha$  pourraient participer au "priming" des neutrophiles. Ainsi, après des tests de dose-réponse, une concentration de 50pg/ml de GRO $\alpha$  a été jugée optimale pour induire une augmentation du chimiotactisme des neutrophiles vis à vis de 5ng/ml d'IL-8 (Figure 7 A). Après une préstimulation de 20min, les neutrophiles, toujours en présence de GRO $\alpha$ , sont placés en chambre de Boyden pendant 45 min à 37°C. Le nombre de neutrophiles, attirés par l'IL-8 et ayant réussi à traverser la membrane poreuse, est évalué dans 4 champs adjacents ( $\times 1000$ ). Un effet synergique entre IL-8 et GRO $\alpha$  est observé pour des concentrations faibles d'IL-8, avoisinants les 5ng/ml (Figure 7 B).



#  $p < 0,05$  : Avec/Sans GRO $\alpha$  ; \*  $p < 0,05$  : IL-8 versus RPMI

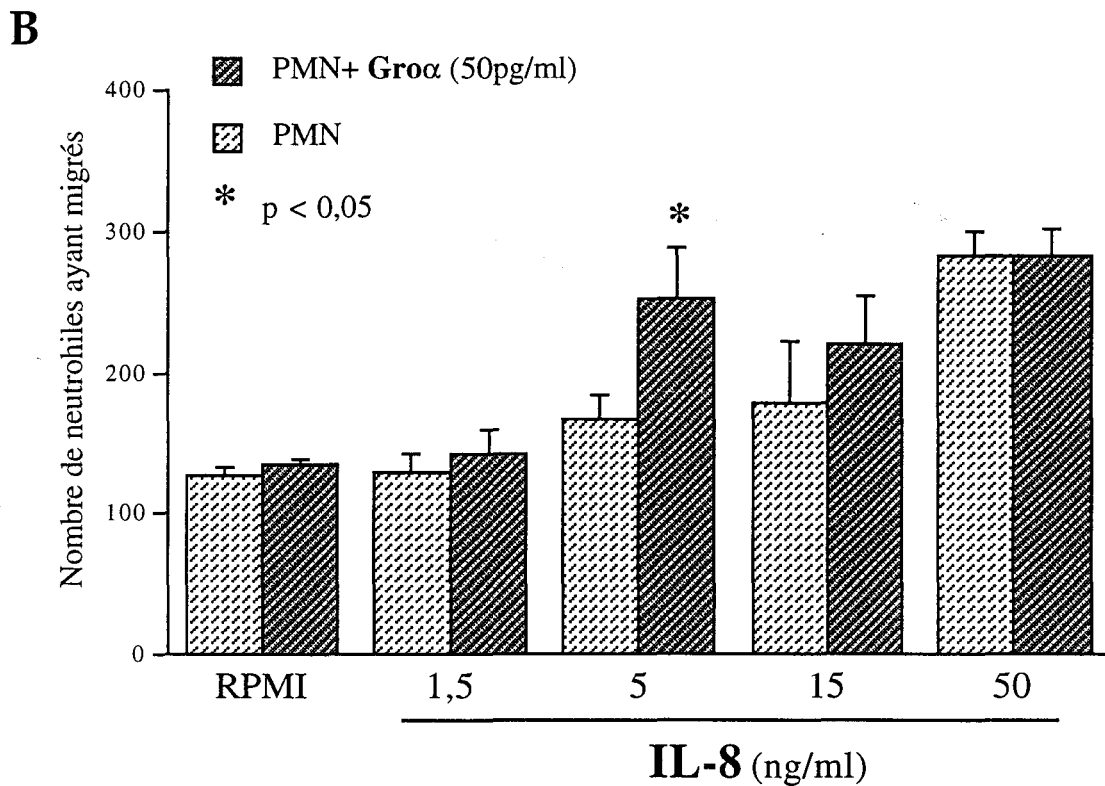


Figure 7 : Effet synergétique d'une préincubation des neutrophiles avec GRO $\alpha$  sur leur pouvoir chimiotactique vis à vis de l'IL-8. **A**) Réactions doses-dépendantes montrant qu'une préincubation de 20min avec 50pg/ml de GRO $\alpha$  semble optimale. **B**) La synergie n'est visible que pour des concentrations faibles d'IL-8, avoisinant les 5ng/ml. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences réalisées en triplicate.

## **DISCUSSION**

Cette étude a permis de mettre en lumière un certain nombre de points concernant le recrutement tissulaire des neutrophiles, notamment dans le cadre de la maladie de Crohn. En résumé:

- 1) Les neutrophiles sanguins des patients avec CD sont dans un état d'activation chronique favorisant leur migration, comme le montre la surexpression de CD11b, ainsi que l'augmentation de la réponse chimiotactique des PMN vis à vis du fMLP et de Cx<sub>2</sub>C chimioquinas comme l'IL-8.
- 2) Dans les plasmas des malades comme des témoins l'IL-8 est indétectable, alors que les quantités de GRO $\alpha$  circulantes sont significativement augmentées chez les patients par rapport aux témoins.
- 3) De faibles quantités de GRO $\alpha$  semblent capables de préstimuler les PMN, augmentant ainsi leur chimiotactisme IL-8 dépendant.

Alors que Mac-1 (CD11b/CD18) et LFA-1 (CD11a/CD18) sont tous deux impliqués dans l'extravasation des PMN (Vainer 1997; Plow 1997), seule l'expression de Mac-1 semble augmentée à la surface des PMN sanguins de patients avec MC. Cette surexpression de CD11b a également été observée par un autre groupe étudiant l'expression membranaire de CD11a, CD11b, CD11c et CD18 à la surface de granulocytes et de monocytes du sang total (Résumé de Collins 1996). En comparant témoins et patients souffrant de MICI, aucune différence significative n'a pu être observée quant aux pourcentages de cellules positives. Par contre, la fluorescence moyenne qui reflète la densité de marquage par cellule, était significativement accrue dans les MICI pour CD11b et CD18. Cependant, aucune corrélation ne semble exister entre cette augmentation de l'expression de CD11b et CD18 à la surface des granulocytes et des monocytes et le degré d'activité de la maladie (Collins 1996).

Des expériences réalisées sur des souris déplétées pour le gène de LFA-1 ou de Mac-1, suggèrent que LFA-1 joue un rôle majeur dans l'extravasation des PMN (pour revue: Plow 1997). Mais le degré d'activation cellulaire doit également être pris en compte. Ainsi, si la déficience de Mac-1 ne semble pas affecter le "rolling" des neutrophiles, elle diminue de manière importante toute adhésion induite par le LTB<sub>4</sub> à la paroi des microvaisseaux (Coxon 1996). Dans un autre modèle expérimental, l'adhésion des neutrophiles, induite par le PMA, fut significativement réduite par la présence d'anticorps anti Mac-1 et non pas par l'addition d'anticorps anti LFA-1 (Plow 1997). Ces observations sont en accord avec nos résultats lors de poussées inflammatoires dans la MC.

Les cytokines pro-inflammatoires sont capables d'augmenter l'expression membranaire d'ICAM-1 (Haraldsen 1996) ainsi que d'induire la libération d'IL-8 par les cellules endothéliales des capillaires intestinaux (Binion 1997). Or, l'IL-8, seul ou en synergie avec le TNF $\alpha$ , stimule l'expression membranaire de CD11b (Roberts 1993). Ainsi, soit directement par production d'IL-8, soit par une transcytose de l'IL-8 muqueux (Middleton 1997), les cellules endothéliales sont à même de stimuler la surexpression de CD11b à la surface des PMN au cours du "rolling".

L'absence d'IL-8 circulante, tant chez les témoins que chez les malades en poussée, semble en contradiction avec les quantités libérées spontanément par les PBMC en culture. Plusieurs explications peuvent être envisagées. L'IL-8 circulante peut être capturée puis internalisée par des cellules périphériques présentant à leur surface les récepteurs CXCR1 et CXCR2 comme les

neutrophiles, mais aussi les monocytes, les éosinophiles, les basophiles, les cellules NK et certaines sous-populations lymphocytaires (pour revue: Baggiolini 1994,1997). Mais ni les PBMC ni même les neutrophiles en culture ne paraissent capables de réabsorber tout l'IL-8 qu'ils sécrètent *in vitro* (Figure 5B). D'un autre côté, la population sanguine majeure est formée par les plaquettes qui expriment également les récepteurs de l'IL-8 (Schaufelberger 1994). En outre, une étude récente rapporte dans les MICI des quantités accrues d'IL-8 liées aux érythrocytes (Résumé de Meenan 1996). Cette capture de l'IL-8 pourrait se faire par l'intermédiaire du récepteur pléiotropique des chimiokines, DARC qui semble également impliqué dans la présentation de l'IL-8 par les cellules endothéliales (Middleton 1997). Ces hypothèses sont également applicables à GRO $\alpha$ .

Mais à l'inverse de l'IL-8, GRO $\alpha$  est détectable dans l'ensemble de nos prélèvements sanguins et les quantités circulantes de GRO $\alpha$  s'avèrent significativement plus élevées chez les patients atteints de MC par rapport aux témoins (Tableau 2). Une étude récente vient d'ailleurs confirmer nos résultats puisqu'elle trouve des quantités de GRO $\alpha$  sérique plus élevées dans la RCH que dans la MC, et que dans ces MICI en poussées circulent des quantités de GRO $\alpha$  plus importantes que dans les MICI en phase quiescente ou toute autre forme de colite (Résumé de Mitsuyama 1996). Les quantités de GRO $\alpha$  circulantes corrélent même avec le degré d'activation de la RCH, alors que pour la MC, en accord avec nos observations, aucune corrélation n'a pu être obtenue.

Cette absence de corrélation n'est pas surprenante. En effet, malgré quelques études dans les MICI qui suggèrent l'existence d'une corrélation entre le degré d'activité de la maladie et les quantités circulantes d'IL-6 (Holtkamp 1995), la majorité des études n'observent pas de telles corrélations entre les cytokines pro-inflammatoires présentes dans le sang et l'activité de la maladie. En fait, les quantités de cytokines circulantes ne semblent pas refléter fidèlement les événements se déroulant dans la muqueuse intestinale (Marinaro 1997). Les quantités de GRO $\alpha$  synthétisées dans les muqueuses de MC, qui sont du même ordre que celles de l'IL-8, ne peuvent donc expliquer pourquoi seul GRO $\alpha$  est détectable dans le plasma.

Cette surprenante observation pourrait venir du fait que l'IL-8 se lie non seulement à CXCR1 mais également à CXCR2, entrant donc en compétition avec GRO $\alpha$  (Ahuja 1996). De plus, après internalisation du complexe, chimiokine-récepteur, une fraction seulement des récepteurs CXCR2 est réexprimée à la membrane (Sabroe 1997), expliquant ainsi la légère baisse observée à la surface des neutrophiles de malades par rapport aux neutrophiles témoins (Figure 3). Ainsi, l'augmentation des quantités circulantes de GRO $\alpha$  dans la MC serait en partie liée à une diminution du nombre de récepteurs susceptibles de la piéger. Cependant, *in vitro*, il n'en est rien (Tableau 2). Mais, les conditions de culture des PMN ou des PBMC qui libèrent simultanément de l'IL-8 et du GRO $\alpha$ , sont difficilement comparables à des plasmas où l'IL-8 est indétectable.

Dans la MC, l'existence d'un "priming" des neutrophiles est suggérée par une étude récente portant sur la production de cytokines inflammatoires par les PMN (Nikolaus 1998). Ainsi, si la libération spontanée de TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-1RA ne diffère guère entre PMN de MC et PMN contrôles, après stimulation par du LPS, une augmentation nettement plus importante des cytokines libérées par les PMN est observée dans la MC par rapport aux contrôles. Les auteurs affirment donc que cette libération accrue de TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-1RA est liée à un "priming" des neutrophiles périphériques dans la MC et la RCH (Nikolaus 1998).

Les concentrations de GRO $\alpha$  mesurées dans le plasma sont trop faibles pour stimuler directement la surexpression de CD11b à la surface des PMN de MC, ainsi que pour induire un

quelconque chimiotactisme de ces PMN. Mais des concentrations autour de 50pg/ml de GRO $\alpha$  s'avèrent capables de préstimuler les PMN afin d'induire une augmentation du chimiotactisme vis à vis de faibles concentrations d'IL-8 (Figure 7). Le fait que les concentrations de GRO $\alpha$  mesurées dans le plasma soient supérieures à 100pg/ml, tant chez les malades que chez les témoins, alors que la concentration optimale de "priming" semble être 50pg/ml, ne doit pas faire oublier que les quantités de cytokines présentes dans le plasma sont deux à trois fois plus élevées que dans le sang total.

### **Conclusion & perspectives**

La préstimulation des PMN par GRO $\alpha$  joue donc bien un rôle de première importance dans l'extravasation accrue des PMN dans la MC. Pour autant, un traitement dirigé spécifiquement contre GRO $\alpha$  a peu de chance de représenter une solution pour lutter contre les poussées inflammatoires dans la MC. Même si *in vitro* des traitements utilisant des anticorps anti IL-8 se sont montrés efficaces pour empêcher la migration transendothéliale des PMN (Harada 1996; Murthy 1997), des traitements visant à bloquer CXCR1 et CXCR2 seront sans doute plus prometteurs (Baggiolini 1997). Mais, il reste beaucoup à apprendre sur leurs fonctions respectives et leurs interactions. En outre, la majorité des études actuelles ne prennent pas en compte les effets de synergie et de "priming", notamment en présence de concentrations faibles de chimiokine. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer précisément le rôle de chaque CXC chimiokine et la manière dont elles interagissent, tant dans les muqueuses enflammées que dans les muqueuses normales.

# **Résultats 5**

**Les cytokines  
immunorégulatrices  
associées aux neutrophiles  
et aux éosinophiles**

## **INTRODUCTION**

En dehors des fonctions attribuées classiquement aux granulocytes (phagocytose, dégranulation), de nombreuses études récentes mettent en lumière le rôle important que ces cellules jouent dans la synthèse et la sécrétion de toute une série de médiateurs, dont des facteurs de différenciation et de croissance, des cytokines immunorégulatrices, des cytokines pro- et anti-inflammatoires ainsi qu'un nombre croissant de chimiokines (revues sur les neutrophiles: Cassatella 1995 et 1996; revues sur les éosinophiles: Wardlaw 1995; Dubucquoi et Capron 1998).

L'étude des cytokines produites par les granulocytes soulève un certain nombre de problèmes. En effet, toutes les techniques utilisées à ce jour ont été développées à partir de culture *in vitro* de PBMC ou de lymphocytes purifiés. Des stimuli, tels que PMA, PHA et LPS, ont souvent été sélectionnés pour leur capacité à induire la sécrétion de cytokines par les PBMC. Or dans ces conditions, les lymphocytes secrètent la quasi totalité des cytokines qu'ils synthétisent, alors que les granulocytes n'en secrètent qu'une partie seulement. La grande majorité des cytokines reste donc associée aux granulocytes. L'IL-10 est même uniquement associée aux éosinophiles et indétectable dans les surnageants de culture malgré une stimulation par des anticorps (sIgA ou IgG) ou par du TNF $\alpha$  (Nakajima 1996). Malgré l'inadéquation des stimuli généralement employés, un certain nombre de cytokines immunorégulatrices a pu être mis en évidence. Ainsi, les éosinophiles secrètent des cytokines de type 2, l'IL-4 (Moqbel 1995; Bjerke 1996) et l'IL-5 (Desreumaux 1992; Dubucquoi 1994), mais ils sont également capables de produire des cytokines de type 1 comme l'IL-2 (Bossé 1996) et l'IFN $\gamma$  (Lamkhioued 1996). L'IL-12, non décrite chez les éosinophiles, semble être la seule cytokine immunorégulatrice sécrétée par les neutrophiles avec l'IFN $\gamma$  (Cassatella 1995a; Yeaman 1998).

Afin d'établir s'il existe effectivement des éosinophiles de type 1 et de type 2 (Lamkhioued 1996) et si les neutrophiles présentent uniquement un profil de type 1 (Cassatella 1995a; Yeaman 1998), nous avons recherché des cytokines de type 1 (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-12: p35 et p40) ainsi que des cytokines de type 2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) chez des éosinophiles et des neutrophiles purifiés à partir de donneurs sains. Pour ce faire, nous avons opté pour une technique de cytométrie en flux nous permettant de mesurer de très faibles quantités intracellulaires de cytokines immunorégulatrices (Metcalf 1995).

Dans un second temps, nous avons comparé les quantités de cytokines immunorégulatrices mesurées chez des granulocytes de donneurs normaux aux quantités détectées chez des granulocytes périphériques de patients atteints de maladie de Crohn. Et pour finir, nous avons cherché à faire sécréter par les neutrophiles ces cytokines et tout particulièrement l'IL-4.

## **RESULTATS**

### **1) Cytokines immunorégulatrices associées aux granulocytes**

#### **Détection de cytokines intracellulaires chez les granulocytes par cytométrie en flux :**

Le pourcentage d'éosinophiles fraîchement purifiés qui expriment l'IFN $\gamma$ , l'IL-2, l'IL-10 et l'IL-12 (p40 et p35) est de l'ordre de 100%, alors que pour l'IL-13, l'IL-5 et l'IL-4 les pourcentages sont respectivement 80, 50 et 8%.



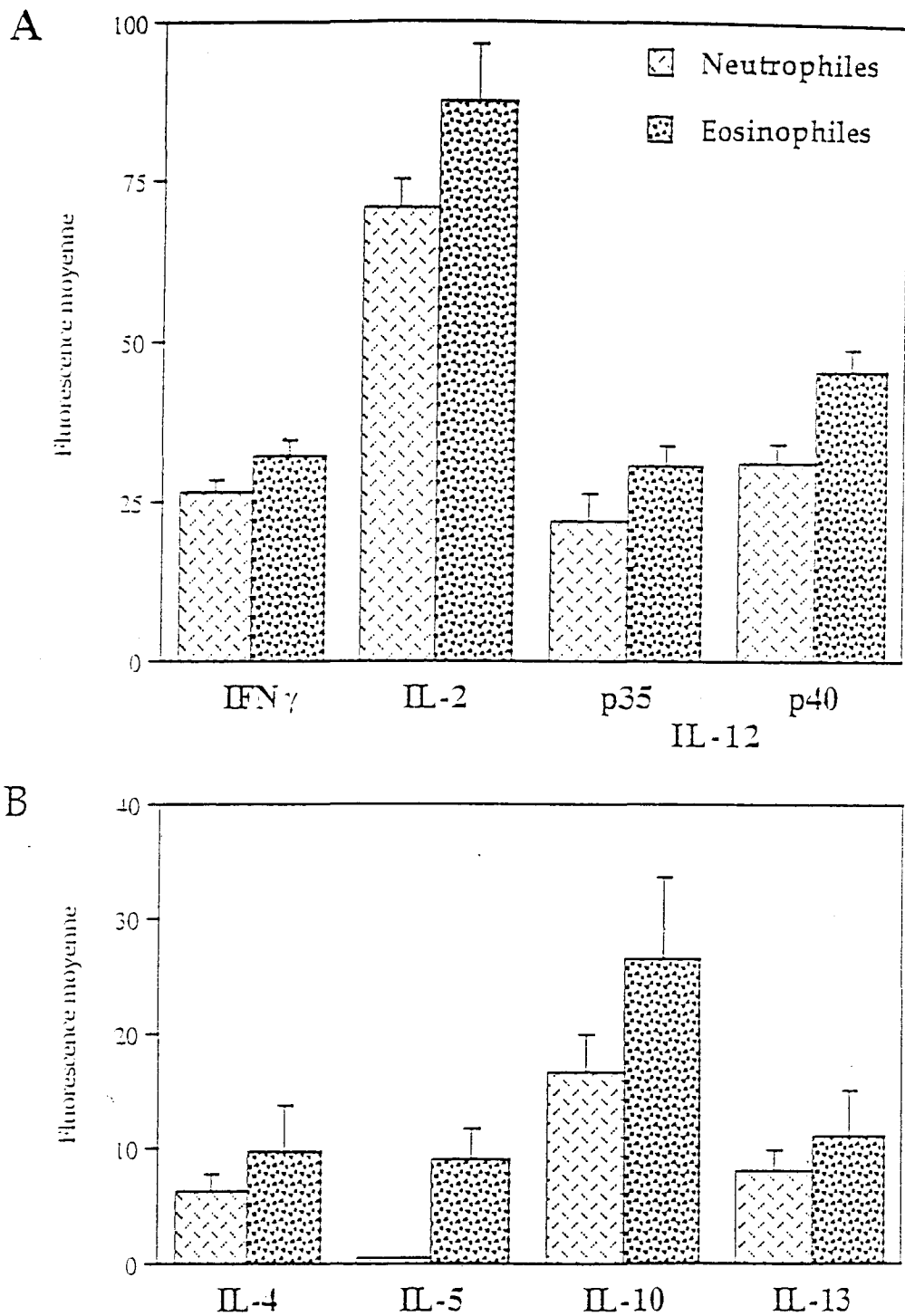


Figure 1 : Présence de cytokines de type Th1 (A) et de type Th2 (B) dans des éosinophiles et des neutrophiles fraîchement purifiés à partir de donneurs sains. Tous les résultats sont exprimés en intensité moyenne de fluorescence (MFI), représentative de la quantité de cytokines intracellulaires. Toutes les cytokines testées sont plus représentées dans les éosinophiles que dans les neutrophiles.

Mise à part l'IL-5, toutes les cytokines recherchées ont été détectées chez les neutrophiles. Comme pour les éosinophiles, près de 100% des neutrophiles renferment de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-2, de l'IL-10 et de l'IL-12, tandis que l'IL-4 est quasi indétectable et l'IL-13 présente chez environ 45 à 80% des neutrophiles témoins.

Les neutrophiles et les éosinophiles offrent donc des résultats similaires, sachant que pour toutes les cytokines testées, les éosinophiles stockent plus de cytokines immunorégulatrices que les neutrophiles (Figure 1). La fluorescence moyenne est en effet le reflet du nombre d'anticorps, spécifiques d'une cytokine donnée, présents dans chaque cellule.

Si cette technique permet des comparaisons quantitatives entre éosinophiles et neutrophiles pour chacune des cytokines étudiées, elle ne donne pas en revanche une image fidèle de l'importance respective des cytokines entre elles. En effet, si pour l'IL-12, il semble qu'il y ait plus de p40 que de p35 présentes dans les granulocytes, ces différences peuvent en partie provenir de l'efficacité du couplage entre les anticorps et leur fluorophore. Ainsi des anticorps anti-p40, dont seulement 85% sont effectivement couplés au FITC, entraînent une sous évaluation du nombre de sous-unités p40 de l'ordre de 15%.

- Spécificité du marquage intracellulaire :

Le fait que toutes les cytokines immunorégulatrices soient présentes, tant chez les éosinophiles que chez les neutrophiles où seules l'IL-12 et l'IFN $\gamma$  ont été décrites jusqu'à présent, nous a conduit à vérifier la spécificité des marquages intracellulaires. Pour ce faire les anticorps ont été préincubés, soit avec une cytokine recombinante irrelevante (50 $\mu$ g/ml de GM-CSF) soit avec la cytokine spécifique de l'anticorps (Figure 2). L'inhibition du marquage est dose dépendante. Mais, dans le cas de l'IL-2, des concentrations atteignant 50 $\mu$ g/ml se sont avérées insuffisantes pour inhiber complètement le marquage, alors que pour les autres cytokines des concentrations inférieures étaient suffisantes. Ceci suggère que l'IL-2 est la cytokine la plus représentée dans les granulocytes.

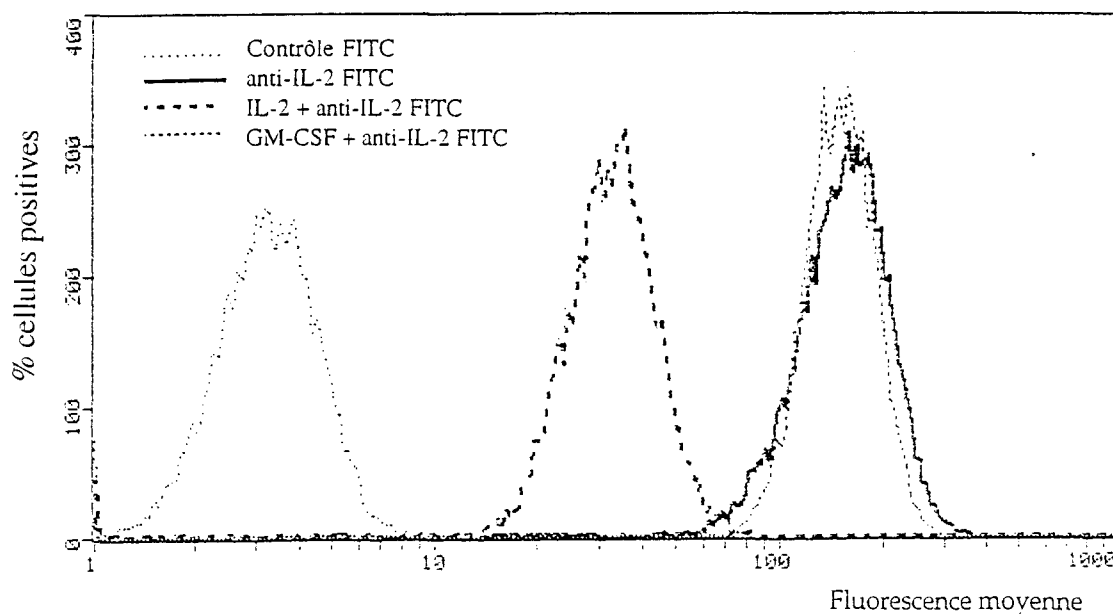


Figure 2 : Vérification de la spécificité du marquage de l'IL-2, à l'aide de trois séries d'incubation : 1) Incubation avec l'anti-IL-2 FITC seul, 2) Incubation avec l'anti-IL-2 FITC et des doses croissantes d'IL-2, 3) Incubation avec l'anti-IL-2 FITC et une cytokine irrelevante : le GM-CSF.

• Comparaison entre granulocytes périphériques issus de MC et de témoins

Aucune différence n'a été constatée entre les neutrophiles périphériques de MC et de témoins quant à la quantité de cytokines immunorégulatrices intracellulaires (Figure 3). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez les PMN pour l'IL-8 et GRO $\alpha$  (Résultats 4).

Comme pour les neutrophiles, les cytokines immunorégulatrices associées aux éosinophiles ne diffèrent guère entre MC et témoins.

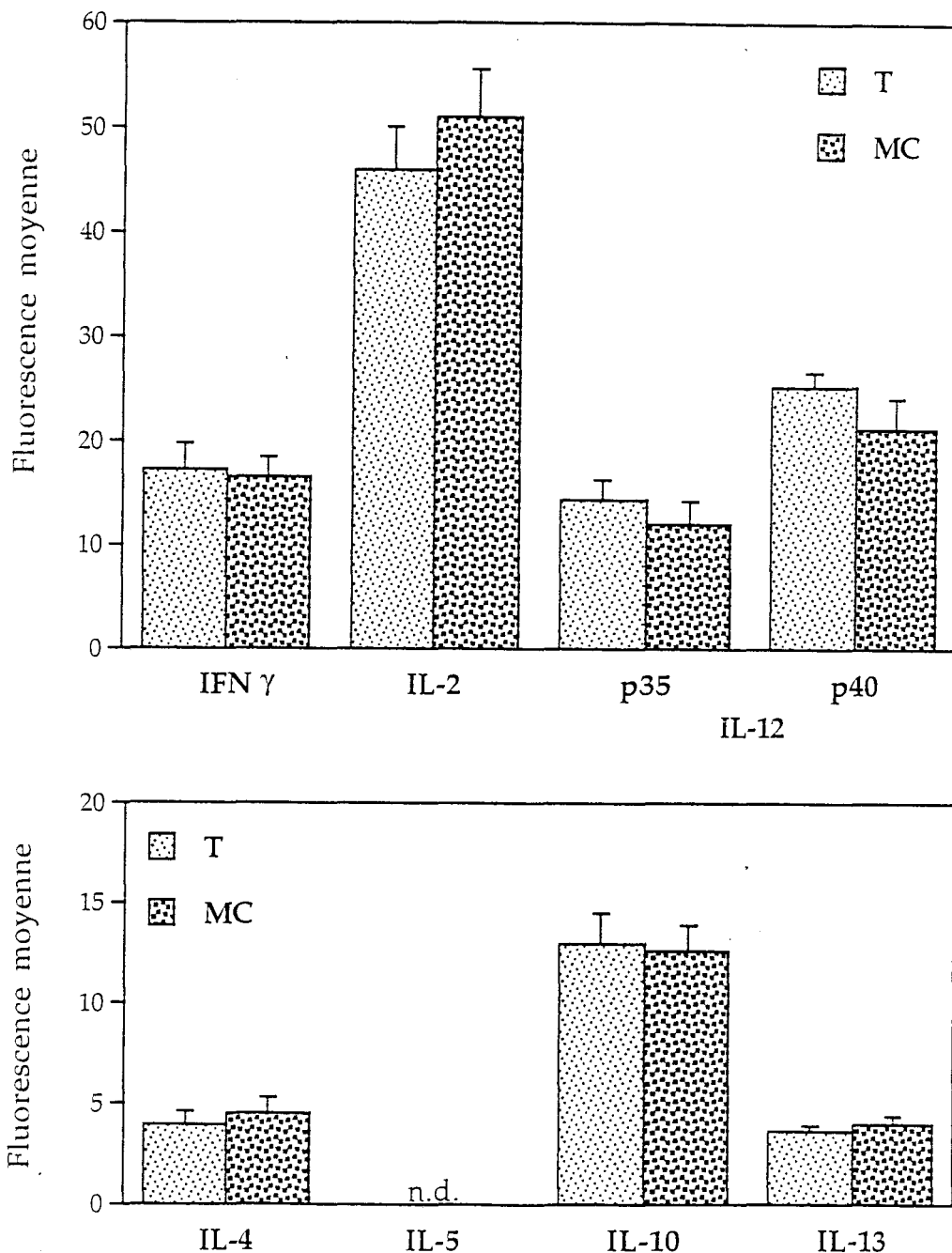


Figure 3 : Quantités intracellulaires de cytokines immunorégulatrices présentes chez des neutrophiles témoins et des neutrophiles de patients atteints de MC.

## 2) Production d'IL-4 par les neutrophiles

### • Cinétique d'accumulation de l'IL-4 dans les neutrophiles en culture

Parmi les cytokines étudiées, l'IL-4 représente un cas particulier. En effet, il semble que cette cytokine, présente en très faible quantité chez des éosinophiles et des neutrophiles fraîchement purifiés, s'accumule de manière significative après culture *in vitro*. Cette accumulation d'IL-4, perceptible dès 10 heures par cytométrie en flux, semble maximale vers 18 heures (Figure 4). Entre 18 et 24 heures de culture, les populations de neutrophiles faiblement et fortement chargés en IL-4 se stabilisent.

Afin de vérifier si ce phénomène ne traduit pas une libération faible et continue d'IL-4, de la brefeldine A (substance qui inhibe le transport intracellulaire et la sécrétion) a été ajoutée à la culture afin d'inhiber toute libération de cytokines. Dans ces conditions, on note un accroissement constant de la population de neutrophiles riches en IL-4 au détriment de celle renfermant de faibles quantités d'IL-4 (Figure 4B).

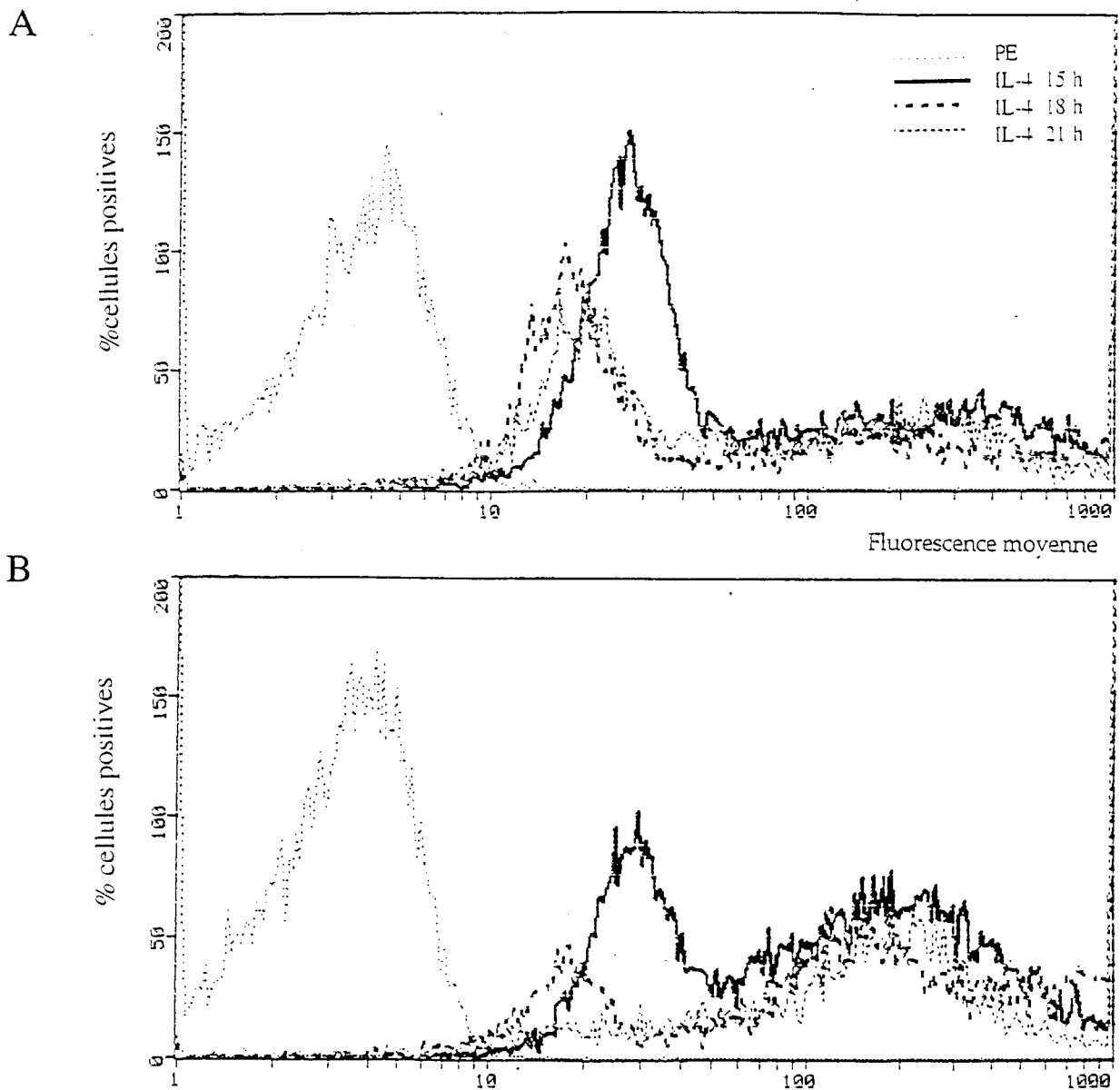


Figure 4 : Cinétique d'accumulation de l'IL-4 après 15, 18 et 21 heures de culture, en absence de brefeldine (A), ou en présence de brefeldine (B).

• Vérification de la spécificité du marquage

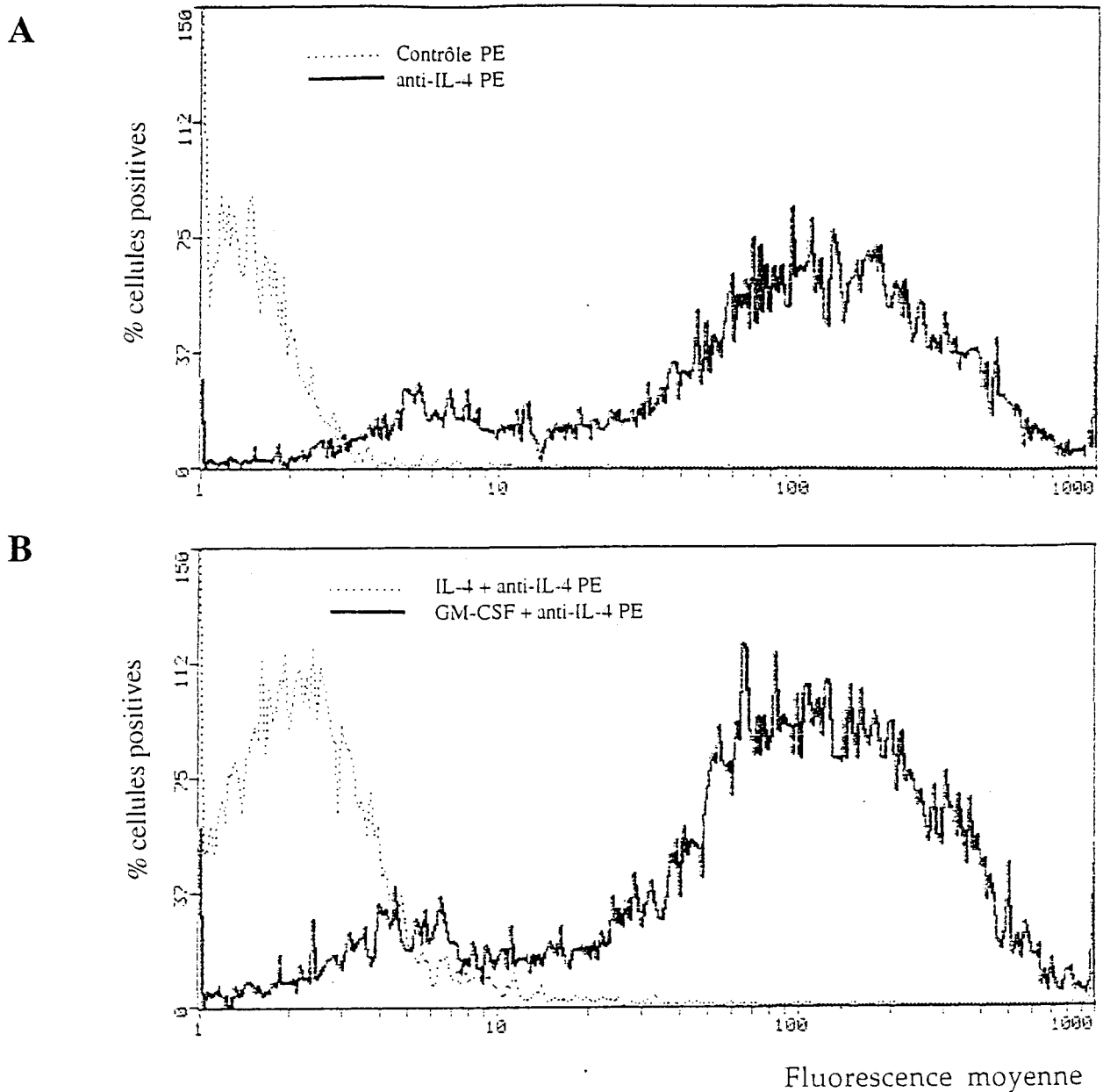


Figure 5 : Spécificité du marquage de l'IL-4. A) Accumulation d'IL-4 après 18h de culture en présence de brefeldine. B) Compétition du marquage anti-IL-4 PE avec l'IL-4 ou le GM-CSF.

• Accumulation d'IL-4 par les neutrophiles en culture

Techniques		J0	18h	Brefeldine	Brefeldine+LPS
FACS	%	18	35	61	72
	MFI	7	75	138	70
Extraits (pg/10 <sup>8</sup> cellules)		n.d.	146	482	228

Cette expérience réalisée à la fois par cytométrie en flux et par ELISA sur des extraits cellulaires de neutrophiles est représentative de l'action de la brefeldine et du LPS sur, respectivement, l'accumulation et la sécrétion d'IL-4 par les neutrophiles.

- Sécrétion d'IL-4 par les neutrophiles

Le stimulant le plus efficace pour induire une libération d'IL-4 par les neutrophiles semble être le calcium ionophore (A23187: 1 $\mu$ M). Mais même dans ces conditions, l'utilisation d'un kit ELISA ultrasensible est indispensable.

Bien que les neutrophiles soient purs à 99% avec des éosinophiles comme contamination majoritaire, des PBMC dilués ont été inclus dans l'étude. Si en l'absence de toute stimulation une participation des PBMC dans la libération d'IL-4 n'est pas à exclure, en présence de calcium ionophore l'IL-4 détectée dans les neutrophiles (de l'ordre de 1,3 pg/ml) provient essentiellement de l'IL-4 stockée dans les neutrophiles.

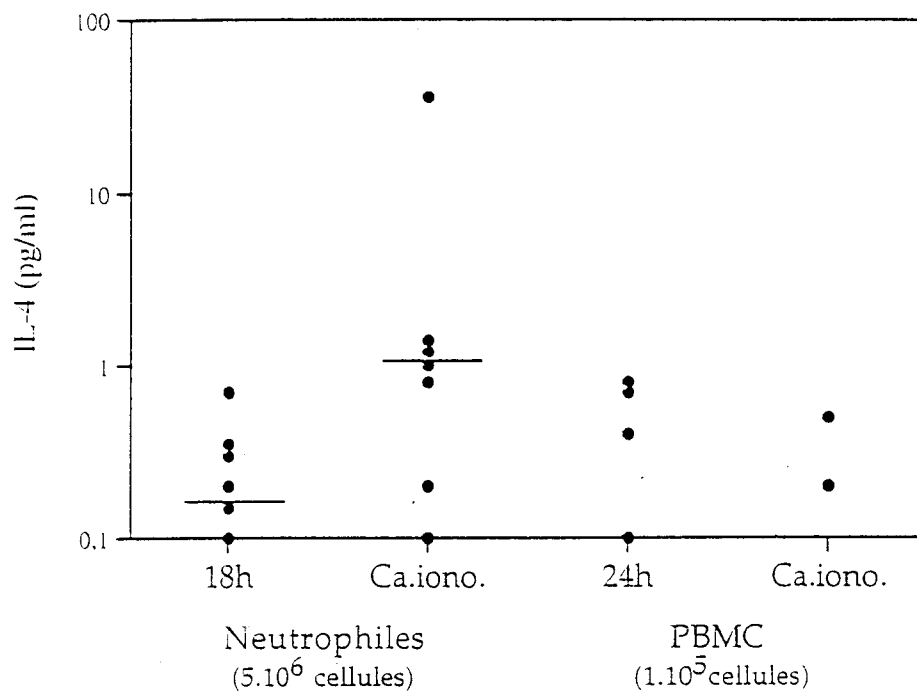


Figure 6 : Libération d'IL-4, spontanément ou après stimulation avec du calcium ionophore, par des neutrophiles (5.10<sup>6</sup> cellules/ml) et des PBMC (1.10<sup>5</sup> cellules/ml) en culture. Vu la sensibilité du test ELISA (0,2 à 3pg/ml) les surnageants de PBMC ont été dilués 10x.

## DISCUSSION

Nos résultats ont permis de mettre en lumière les points suivants :

- Les éosinophiles et les neutrophiles stockent des cytokines immunorégulatrices de type Th1 et de type Th2 dans leur cytoplasme.
- Par rapport aux neutrophiles, les éosinophiles renferment des quantités plus élevées de chacune des cytokines immunorégulatrices recherchées.
- Dans des éosinophiles ou des neutrophiles fraîchement purifiés, les cytokines de type 1 paraissent plus nombreuses que les cytokines de type 2.
- Les mécanismes de sécrétion des granulocytes sont différents de ceux des PBMC.

La notion la plus importante que soulève nos résultats est la présence de cytokines immunorégulatrices à la fois de type 1 (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-12) et de type 2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) dans les éosinophiles et les neutrophiles. Si pour les éosinophiles, la présence de la majorité d'entre elles est déjà connue à l'exception de l'IL-12 et de l'IL-13 (pour revue: Dubucquoi et Capron 1998), pour les neutrophiles, seuls l'IFN $\gamma$  et l'IL-12 ont été décrits jusqu'à présent (Yeaman 1998; Cassetella 1996).

Les problèmes rencontrés afin d'induire une libération de ces cytokines en quantités suffisantes pour être détectées dans les surnageants de culture permet d'expliquer le faible nombre de publications confirmant nos résultats. De plus, en raison de problèmes de contamination par des PBMC, un certain nombre de ces publications est sujet à caution. Ainsi dans le cas de l'IL-4, nos résultats montrent que 2% de PBMC sont capables de libérer spontanément autant d'IL-4 que 99% de neutrophiles. Il est donc primordial, autant pour les études sur les éosinophiles que pour celles sur les neutrophiles que la contamination par les PBMC soit strictement inférieure à 1%.

Si ces granulocytes stockent des cytokines de type 1 comme des cytokines de type 2, il n'en demeure pas moins que la nature des cytokines sécrétées est étroitement liée aux stimulants utilisés. Ainsi en présence de LPS et d'IFN $\gamma$  les neutrophiles libèrent de l'IL-12 et du TNF $\alpha$  et en présence de LPS, ou de TNF $\alpha$  et d'IL-12, ils libèrent de l'IFN $\gamma$  (Cassetella 1996; Yeaman 1998). Dans ces conditions, aucune libération d'IL-10 ou d'IL-13 n'est observée (Reglier 1998). Mais placés dans un environnement de type Th2, les neutrophiles stimulés par le TNF $\alpha$  libèrent de l'IL-1RA (Marie 1996), une des cytokines anti-inflammatoires, avec l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et le TGF $\beta$ . Pour les éosinophiles de telles expériences n'ont pas été réalisées.

Mais même si ces granulocytes libèrent tout leur stock de cytokines immunorégulatrices, il est peu probable que les quantités de cytokines sécrétées atteignent le niveau des cytokines de type Th1/Th2 sécrétées par les lymphocytes activés. Dans ce contexte, on peut se poser la question de la relevance de tels résultats.

D'une part, lors d'inflammations tissulaires, une forte concentration de neutrophiles est détectée aux abords des lésions, ce qui pourrait en partie compenser le faible niveau de sécrétion. D'autre part, le rôle de ces cellules n'est pas comparable à celui des lymphocytes. Il est envisageable que cette production de cytokines soit dédiée à des mécanismes de régulation paracrine ou juxtacrine (Bosenberg 1993). Dans le premier cas, il pourrait s'agir d'une fonction destinée à éviter toute dégranulation lors de la migration, avant d'arriver au contact de l'agent pathogène. Ceci permettrait de limiter les dégâts tissulaires occasionnés par ces substances cytotoxiques. De plus, ces composés peuvent avoir un rôle néfaste sur la migration elle-même. Ainsi, l'élastase est capable d'inhiber le chimiotactisme IL-8 dépendant des neutrophiles (Leavell 1997). Dans ce contexte, des mécanismes juxtacrines sont également envisageables puisque lors de la migration transendothéliale des contacts étroits ont été observés entre neutrophiles (Feng 1998).

Dans le cas des éosinophiles, des interactions éosinophiles-cellules T ont été signalées (Mawhorter 1994, Corrigan 1996). L'éosinophile pourrait même faire office de cellule présentatrice d'antigène. Dans ce cas, la sécrétion simultanée de cytokines, soit de type Th1 soit de type Th2, pourrait avoir un rôle non négligeable sur le profil de synthèse des lymphocytes ainsi stimulés par les éosinophiles.

## **PERSPECTIVES**

Dans un premier temps, nous allons établir le fait que ces cytokines peuvent être libérées par les neutrophiles et dans quelles conditions de stimulation. Puis, nous étudierons la possibilité de favoriser la libération d'un profil particulier de cytokines. Et finalement, nous nous pencherons sur le rôle des interactions cellule-cellule sur la libération de cytokines immunorégulatrices. Il sera également intéressant de savoir si *in vivo*, et dans des situations pathologiques différentes, les neutrophiles sont capables de libérer tout ou partie de leur contenu en cytokines.



**CONCLUSION  
GENERALE**

## CONCLUSION GENERALE

Les résultats acquis au cours de ce travail, principalement obtenus chez des patients atteints de maladie de Crohn, nous ont permis de montrer que la participation des 2 populations majeures de granulocytes, les éosinophiles et les neutrophiles, variait selon le stade clinique de la maladie.

Au cours de l'étude des lésions naissantes de MC et des événements conduisant à la survenue d'une récidive endoscopique puis clinique de la maladie, la présence d'un fort infiltrat en éosinophiles associée à une forte synthèse d'IL-4, contrastant avec une faible présence d'IL-8 et de neutrophiles, nous a conduit à envisager la possibilité qu'un mécanisme de type allergique participe à la survenue des récidives. Dans ce contexte, sont également en cours d'étude, la recherche d'anticorps d'isotype IgE ainsi que la caractérisation du ou des antigènes ("allergènes") potentiellement impliqués. Cette étude est réalisée dans des liquides de lavage intestinaux. La mise en évidence, dans les lésions naissantes, de la synthèse d'IL-4 par des cellules inflammatoires (éosinophiles, mastocytes) nous a également conduit à étudier la différence de comportement d'animaux génétiquement modifiés (exprimant le récepteur de forte affinité pour l'IgE ; surexprimant l'IL-4 ou l'IL-5 ; invalidés pour le gène c-kit nécessaire à la différenciation mastocytaire) vis à vis de la translocation de la flore bactérienne endogène.

D'autre part, il semblerait intéressant d'identifier les mécanismes expliquant la commutation d'un profil de type Th2 dans les lésions précoces vers un profil de type Th1 dans les lésions chroniques. Si l'IL-12 n'a pas été détectée dans les lésions naissantes, la présence d'IFN $\gamma$  et d'IL-18 semble impliquer les monocytes-macrophages. La nature des monocytes invasifs, leur devenir (cellules dendritiques ou macrophages) ainsi que l'origine des chimiokines impliquées dans leur recrutement semblent d'un réel intérêt.

La découverte de la présence de cytokines de type Th1 et Th2 non seulement dans les éosinophiles, mais aussi dans les neutrophiles, dépasse largement le cadre de la maladie de Crohn. Elle permet de suggérer que ces populations de granulocytes longtemps cantonnés dans des fonctions peu spécifiques de phagocytose et d'inflammation peuvent jouer un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire. Ces résultats doivent bien sûr être confortés par la démonstration claire de la synthèse et des voies de sécrétions des différentes cytokines par les granulocytes eux-mêmes (expériences actuellement en cours). Mais ils suggèrent d'ores et déjà un rôle inattendu de ces granulocytes, dont la participation au cours de divers processus infectieux et inflammatoires n'a pas été jusqu'ici totalement élucidée.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## - A -

- **Abreu-Martin MT, Targan SR. 1996.** Regulation of immune responses of the intestinal mucosa. *Crit Rev Immunol* 16:277-309.
- **Akira S, Kishimoto. 1997.** TNF, IL-6 and NF- $\kappa$ B in cytokine gene regulation. *Adv Immunol* 65:1-46.
- **Aldenberg F, Enerback L. 1994.** The immunohistochemical demonstration of chymase and tryptase in human intestinal mast cells. *Histochem J* 26:587-596.
- **Allen JE, and Maizels RM. 1997.** Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma ? *Immunol Today* 8:387-392.
- **Altstaedt J, Kirchner H, Rink L. 1996.** Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology* 89:563-568.
- **Andus T, Daig R, Vogl D, Aschenbrenner, Lock G, Hollerbach S, Köllinger M, Schölmerich, Gross V. 1997.** Imbalance of the interleukin-1 system in colonic mucosa association with intestinal inflammation and interleukin-1 receptor antagonist genotype 2. *Gut* 41:651-657.
- **Autenrieth IB, Bucheler N, Bohn E, Heinze G, Horak I. 1997.** Cytokine mRNA expression in intestinal tissue of interleukin-2 deficient mice with bowel inflammation. *Gut* 41:793-800.
- **Axelsson LG, Ahlstedt S. 1990.** Characteristics of immune-complex-induced chronic experimental colitis in rats with a therapeutic effect of sulphasalazine. *Scand J Gastroenterol* 25:203-209.
- **Beagley KW, Fujihashi K, Lagoo AS, Deenadaylan S, Black CA, Murray AM, Sharmanov AT, Yamamoto M, McGhee JR, Elson CO, Kiyono H. 1995.** Differences in intraepithelial lymphocytes T cell subset isolated from murine small versus large intestine. *J Immunol* 154:5611-5619.
- **Beck PL, Wallace JL. 1997.** Cytokines in inflammatory bowel disease. *Mediators of Inflammation* 6: 95-103.
- **Beil WJ, Weller PF, Peppercorn MA, Galli SJ, Dvorak AM. 1995.** Ultrastructural immunogold localization of subcellular sites of TNF $\alpha$  in colonic Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 58:284-298.
- **Best WR, Bechtel JM, Singleton JW, Kern Fjr. 1976.** Development of a Crohn's disease activity index: National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 70:439-444.
- **Bianchi E, Bender JR, Blasi F, Pardi R. 1997.** Through and beyond the wall : late steps in leukocyte transendothelial migration. *Immunol Today* 18:586-591.
- **Binion DG, Kugathasan S, Wilbur CJ, West GA, Miller KA, Ziats NP, Levine AD, Fiocchi C. 1997.** Differential production of chemokines MCP-1 and IL-8 between human intestinal microvascular (HIMEC) and large vessel endothelial cells (HUVEC). *Gastroenterology* 112:A936.
- **Bischoff SC, Wedemeyer J, Herrmann A, Meier P N, Trautwein C, Cetin Y, Maschek H, Stolte M, Gebel M, Manns MP. 1996.** Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 28:1-13.

## - B -

- **Babyatsky MW, Rossiter G, Podolsky D. 1996.** Expression of Transforming growth Factors  $\alpha$  and  $\beta$  in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 110:975-984.
- **Baggiolini M, Dewald B and Moser B. 1994.** Interleukin-8 and related chemotactic cytokines CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 35:97-179.
- **Baggiolini M, Dewald B and Moser B. 1997.** Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15:675-705.
- **Barton JR, Gillon S, Ferguson A. 1989.** Incidence of inflammatory bowel disease in Scottish children between 1968 and 1983; marginal fall in ulcerative colitis, threefold rise in Crohn's disease. *Gut* 30:618-622.
- **Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. 1997.** A new class of membrane-bound chemokine with a Cx<sub>3</sub>C motif. *Nature* 385:640-644.
- **Björke T, Gaustadnest M, Nielsen S, Nielsen LP, Schlotz PO, Rudiger N, Reimert CM, Dahl R, Christensen I, Poulsen LK. 1996.** Human blood eosinophils produce and secrete interleukin-4. *Resp Med* 90:271-277.
- **Blumberg RS, Colgan SP, Morales V, Kim H, Balk SP. 1996.** Nonclassical MHC class I molecules on human intestinal epithelial cells and their role in IEL function. In: *Antigen presentation by intestinal epithelial cells*, Heidelberg, Springer-Verlag, 39-51.
- **Bober LA, Waters TA, Pugliese Sivo CC, Sullivan LM, Narula SK, Grace MJ. 1995.** IL-4 induces

- neutrophilic maturation of HL-60 cells and activation of human peripheral blood neutrophils. *Clin Exp Immunol* 99:129-136.
- **Bochner BS, Klunk DA, Sterbinsky SA, Coffman RL, Schleimer RP. 1995.** IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *J Immunol* 154:799-803.
  - **Bochner BS, Sterbinsky SA, Bickel CA, Werfel S, Wein M, Newman W. 1994.** Differences between human eosinophils and neutrophils in the function and expression of sialic acid-containing counter-ligands for E-Selectin. *J Immunol* 152:774-782.
  - **Boismenu R, Feng L, Xia YY, Chang JCC, Havran WL. 1996.** Chemokine expression by intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells. *J Immunol* 157:985-992.
  - **Bonnet J, Modigliani R. 1996.** Traitement médical de la maladie de Crohn. *Médecine thérapeutique* 2:762-767.
  - **Borregaard N. and Cowland JB. 1997.** Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89:3503-3521.
  - **Bossé M, Audett M, Ferland C, Pelletier G, Chu HW, Dakhama A, Lavigne S, Boulet L-P, Laviolette M. 1996.** Gene expression of interleukin-2 in purified human peripheral blood eosinophils. *Immunology* 87:149-154.
  - **Bosenberg MW, Massague J. 1993.** Juxtacrine cell signaling molecules. *Curr Opin Cell Biol* 9:573.
  - **Brach MA, Scott C, Kiehnopf M, Herrmann F. 1994.** Expression of the Transforming Growth Factor- $\alpha$  gene by human eosinophils is regulated by interleukin-3, interleukin-5, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Eur J Immunol* 24:646-650.
  - **Bradding P. 1996.** Human mast cell cytokines. *Clin Exp Allergy* 26:13-19.
  - **Brandtzaeg P. 1995.** Basic mechanisms of mucosal immunity. *The Immunologist* 3:89-96.
  - **Brandtzaeg P, Haraldsen G, Rugtveit J. 1997.** Immunopathology of human inflammatory bowel disease. *Springer Semin Immunopathol* 18:555-589.
  - **Braun RK, Franchini M, Erard F, Rihs S, DeVries IJM, Blaser K, Hansel TT and Walker C. 1993.** Human peripheral blood eosinophils produce and release interleukin-8 on stimulation with calcium ionophore. *Eur J Immunol* 23:956-960.
  - **Breese E, Breaggar CP, Corrigan CJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. 1993.** Interleukin-2 and Interferon- $\gamma$  secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* 78:127-131.
  - **Bregenholt S, Claesson MH. 1998.** Increased intracellular Th1 cytokines in scid mice with inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol* 28:379-389.
  - **Brown MA, Hural J. 1997.** Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol* 17:1-32.
  - **Brynskov J, Tvede N, Anderson CB, Vilien M. 1992.** Increased concentrations of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-2, and soluble interleukin-2 receptors in endoscopic mucosal biopsy specimens with active inflammatory bowel disease. *Gut* 33:55-58.
  - **Butcher EC. 1991.** Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67:1033-1036.
  - **Butterworth AE, Sturrock RF, Houba V, Mahmoud AAF, Sher A and Rees PH. 1975** Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature* 256:727-729.
  - **Byron KA. 1994.** IL-4 production is increased in cigarette smokers. *Clin Exp Immunol* 95:333-336.
- C -
- **Calafat J, Janssen H, Stähle-Bäckdahl, Zuurbier AEM, Knol EF, Egesten A. 1997.** Human monocytes and neutrophils store Transforming Growth Factor- $\alpha$  in a subpopulation of cytoplasmic granules. *Blood* 90:1255-1266.
  - **Callard R, Gearing A. 1994.** The cytokine facts book. Ed Academic Press inc, San Diego.
  - **Campbell JJ, Foxman EF, Butcher EC. 1997.** Chemoattractant receptor cross talk as regulatory mechanism in leukocyte adhesion and migration. *Eur J Immunol* 27:2571-2578.
  - **Cappello M, Keshav, Prince C, Jewell DP, Gordon S. 1992.** Detection of mRNAs for macrophage products in inflammatory bowel disease by in situ hybridation. *Gut* 33:1214-1219.
  - **Capron A, Dessaint JP, Capron M and Bazin H. 1975.** Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature* 253:474-475.
  - **Capron A, Dessaint JP, Capron M, Joseph M, Ameisen JC and Tonnel AB. 1986.** From parasites to allergy: the second receptor for IgE (Fc $\epsilon$ RII). *Immunol Today* 7:15-18.
  - **Capron M, Desreumaux P, Soussi-Gouni A, Lamkhioed B, Capron A. 1994.** L'éosinophile,

- bénéfique ou néfaste : une cellule à part entière dans la réponse immunitaire. *C R Soc Biol* 188:39-46.
- **Capron M, Tomassini M, Van der Vorst E, Kusnier JP, Papin JP, Capron A. 1988.** Existence et fonctions d'un récepteur pour l'immunoglobuline A sur les éosinophiles humains. *C R Acad Sc/Immunol* 307:397-402.
  - **Carol M, Lambrechts A, Van Gossum A, Libin M, Goldman M, Mascart-Lemone. 1998.** Spontaneous secretion of interferon  $\gamma$  and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes. *Gut* 42:643-649.
  - **Casini-Raggi V, Kam L, Chong Y J T, Fiocchi C, Pizarro TT, Cominelli F. 1995.** Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 154:2434-2440.
  - **Cassatella MA, Meda L, Gasperini S, D'Andrea A, Ma X, Trinchieri G. 1995(a).** Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol* 25:1-5.
  - **Cassatella MA. 1995(b).** The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 16:21-26.
  - **Cassatella MA. 1996.** Cytokines produced by polymorphonuclear neutrophils: molecular and biological aspects. Molecular Biology Intelligence Unit, Springer-Verlag, Heidelberg.
  - **Cassatella MA, Gasperini S, Calzetti F, Bertagnin A, Luster AD, McDonald PP. 1997.** Regulated production of the interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils. *Eur J Immunol* 27:111-115.
  - **Cavaillon JM. 1996.** Les cytokines. Masson 2<sup>nd</sup> édition, Paris.
  - **Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DR, Brenner MB. 1994.** Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and an integrin,  $\alpha$ EB7. *Nature* 372:190-193.
  - **Cerf-Bensussan N, Jarry A, Brousse N, Lisowska-Groszpiere B, Guy-Grand D, Griscelli C. 1987.** A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *Eur J Immunol* 17:1279-1285.
  - **Chomarat P, Bancereau J. 1997.** An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw* 8:333-344.
  - **Coffer P, Koenderman L. 1997.** Granulocyte signal transduction and priming: cause without effect ? *Immunol lett* 57: 27-31.
  - **Colgan SP, Resnick MB, Parkos CA, Delp-Archer C, McGuirk D, Bacarra AE, Weller PF, Madara JL. 1994.** IL-4 directly modulates function of a model human intestinal epithelium. *J Immunol* 153:2122-2129.
  - **Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ. 1995.** Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med* 182:1169-1174.
  - **Colombel J-F, Mesnard B. 1993.** Maladie de Crohn. In: Ed Techniques, Encycl. Méd. Chir. (Paris-France), Gastroenterologie, 9-057-G-10, 1-15.
  - **Colombel J-F, Louvet B, Müller-Alouf H, Desreumaux P. 1997.** Recent advances in the etiology of Crohn's disease : environment and genetics. In: Recent advances in the pathophysiology of gastrointestinal and liver diseases, John Libbey Eurotext, Paris, 109-131.
  - **Comes MC, Gower-Rousseau C, Colombel JF, Belaïche J, VanKruiningen HJ, Nuttens MC, Cortot A. 1994.** Inflammatory bowel disease in married couples: 10 cases in Nord Pas-de-Calais region of France and Liège county of Belgium. *Gut* 35:1316-1318.
  - **Cominelli F, Pizarro TT. 1996.** Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 10(suppl 2):49-53.
  - **Connolly AR, Cleland LG, Kirkham BW. 1995.** Mathematical considerations of competitive polymerase chain reaction. *J Immunol Methods* 187:201-211.
  - **Correale J, Gilmore W, McMillan M, Li S, McCarthy K, Le T and Weiner LP. 1995.** Patterns of cytokine secretion by autoractive proteolipid protein-specific T cell clones during the course of multiple sclerosis. *J Immunol* 154:2959-2968.
  - **Corrigan CJ, Kay AB. 1996.** T-cell/eosinophil interactions in the induction of asthma. *Eur respir J.* 9(suppl 22):72-78.
  - **Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, LeQuintrec Y, Gendre JP. 1996.** Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 110:424-431.
  - **Costa JJ, Matossian K, Resnick MB, Beil WJ, Wong DTW, Gordon JR, Dvorak AM, Weller PF, Galli SJ. 1993.** Human eosinophils can express the cytokines Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$ . *J Clin Invest* 91:2673-2684.

- **Cottone M, Rosselli M, Orlando A et al. 1994.** Smoking habits and recurrence in Crohn's disease. *Gastroenterology* 106:643-648.
- **Croese J, Loukas A, Opdebeeck J, Prociw P. 1994.** Occult enteric infection by *Ancylostoma caninum*: a previously unrecognized zoonosis. *Gastroenterology* 106:3-12.
- **Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. 1932.** Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *JAMA* 99:1323-1329.
- **Croituru K, Bienenstock J. 1994.** Characteristics and functions of mucosa-associated lymphoid tissue. In: *Handbook of mucosal immunology*, San Diego, Academic Press Inc, 141-149.
- **Crotty B, Hoang P, Dalton HR, Jewel DP. 1992.** Salicylates used in inflammatory bowel disease and colchicine impair interferon-gamma induced HLA-DR expression. *Gut* 33:59-64.
- **Interleukin-5 in Eosinophilic Gastroenteritis.** *Gastroenterology* 110:768-774.
- **Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L, Emilie D, Geboes K, Klein O, Ectors N, Cortot A, Capron M, Colombel J-F. 1997.** Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology* 113:118-126.
- **Desreumaux P. 1997.** Etude des cytokines dans les maladies inflammatoires intestinales. Thèse de doctorat en immunologie, Lille II, faculté de médecine Henri Warembourg.
- **Desreumaux P, Delaporte E, Colombel J-F, Capron M, Cortot A, Janin A. 1998.** Similar IL-5, IL-3 and GM-CSF synthesis by eosinophils in the jejunal mucosa of patients with coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Clin Immunol Immunopathol* (in press).
- **Dinarello CA. 1991.** Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77:1627-1652.
- **Dionne S, Hiscott J, D'Agata I, Duhaime A, Seidman EG. 1997.** Quantitative PCR analysis of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA levels in pediatric IBD mucosal biopsies. *Dig Dis Sci* 42:1557-1566.
- **Dionne S, d'Agata ID, Hiscott J, Vanounou T, Seidman EG. 1998.** Colonic explant production of IL-1 and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 112:435-442.
- **Dubucquoi S, Capron M. 1998.** L'éosinophile, une cellule à deux visages dans la réponse inflammatoire. In: *L'inflammation*, John Libbey Eurotext Paris, Chap II, 55-68.
- **Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, Goldman M, Tavernier J, Capron A, Capron M. 1994.** Synthesis of interleukin-5 by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J Exp Med* 179:703-708.
- **Dubucquoi S, Janin A, Klein O, Desreumaux P, Quandalle P, Cortot A, Capron M, Colombel J-F. 1995.** Activated eosinophils and interleukin-5 expression in early recurrence of Crohn's disease. *Gut* 37:242-246.
- **Dvorak AM. 1980.** Ultrastructural evidence for release of major basic protein-containing crystalline cores of eosinophil granules in vivo: cytotoxic potential in Crohn's disease. *J Immunol* 125:460-462.
- **Dvorak AM. 1994.** Similarities in the ultrastructural morphology and developmental and secretory mechanisms of human basophils and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 94:1103-1134.

- D -

- **D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G. 1995.** Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor  $\alpha$  production. *J Exp Med* 181:537-546.
- **Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Scholmerich J, Gross V. 1996.** Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 38:216-222.
- **Daugherty BL, Siciliano SJ, DeMartino JA, Malkowitz L, Sirotna A, Springer MS. 1996.** Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J Exp Med* 183:2349-2354.
- **Davies MD, Parrott DM. 1981.** Preparation and purification of lymphocytes from epithelium and lamina propria of murine small intestine. *Gut* 22:481-488.
- **Desreumaux P, Janin A, Colombel J-F, Prin L, Plumas J, Emilie D, Torpier G, Capron A, Capron M. 1992.** Interleukin 5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J Exp Med* 175:293-296.
- **Desreumaux P, Capron M. 1996(a).** Eosinophils in allergic reactions. *Curr Opin Immunol* 8:790-795.
- **Desreumaux P, Bloget F, Seguy D, Capron M, Cortot A, Colombel J-F, Janin A. 1996(B).** Interleukin-3, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, and

- **Dvorak AM, Onderdonk AB, McLeod RS, Earley-Monahan RA, Antonioli DA, Cullen J, Blair JE, Cisneros R, Letourneau L, Morgan E, Silen W, Cohen Z. 1993.** Ultrastructural identification of exocytosis of granules from human gut eosinophils in vivo. *Int Arch Allergy Immunol* 102:23-45.

- E -

- **Ebenfelt A, Lundqvist H, Dahlgren C, Lundberg C. 1996.** Neutrophils in mucosal secretion are functionally active. *Clin Exp Immunol* 106:404-409.
- **Ebert EC, Roberts AI. 1996.** The promiscuity of interleukin-8 receptors on human intraepithelial lymphocytes (IEL). *Gastroenterology* 110:A901.
- **Egensten A, Calafat J, Knol EF, Janssen H, Walz TM. 1996.** Subcellular localization of Transforming Growth Factor- $\alpha$  in human eosinophil granulocytes. *Blood* 87:3910-3918.
- **Eliakim R, Rachmilewitz D. 1996.** Inflammatory bowel disease: the asthma of the intestine? *Inflamm Bowel Dis* 2:122-132.
- **Ekbom A, Daszak P, Kraaz W, Wakefield AJ. 1996.** Crohn's disease after in utero measles virus exposure. *Lancet* 348:515-517.

- F -

- **Fais S, Capobianchi MR, Pallone F, DiMarco P, Boirivant M, Dianzani F, Torsoli A. 1991.** Spontaneous release of interferon- $\gamma$  by intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. Kinetics of in vitro response to interferon- $\gamma$  inducers. *Gut* 32:403-407.
- **Farstad IN, Halstensen TS, Fausa O, Brandtzaeg P. 1994.** Heterogeneity of M-cell associated B and T cells in human Peyer's patches. *Immunology* 83:457-464.
- **Favre C, Saeland S, Caux C, Duvert V, De Vries JE. 1990.** Interleukin-4 has basophilic and eosinophilic cell growth-promoting activity on cord blood cells. *Blood* 75:67-73.
- **Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM. 1998.** Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to fMLP. *J Exp Med* 187:903-915.
- **Fiocchi C. 1997.** The immune system in inflammatory bowel disease. *Acta Gastro-Enterologica Belgica* 60:156-162.
- **Forssmann U, Ugucioni M, Loetscher P, Dahinden CA, Langen H, Thelen M, Baggiolini M. 1997.**

Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. *J Exp Med* 185:2171-2176.

- **Frexinos J, Escourou J, Lazorthes F, Pascal JP, Balas D, Duffaut M, Fourtanier G, Bommelaer G, Suduca P, Lemozy J, Seguela JP, Voigt JJ. 1988.** Hépatogastro-entérologie clinique. 3<sup>ème</sup> édition, Simep, Paris, France.
- **Fujimura Y, Kaloi R, Iida M. 1996.** Pathogenesis of aphthoid ulcers in Crohn's disease: correlative findings by magnifying colonoscopy, electron microscopy, and immunohistochemistry. *Gut* 38:724-732.
- **Fujishima S, Hoffman AR, Vu T, Jin Kim K, Zheng H, Daniel D, Kim Y, Wallace EF, Larrick JW, Raffin TA. 1993.** Regulation of neutrophil interleukin-8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ . *J Cell Physiol* 154:478-485.
- **Fukushima K, West G, Fiocchi C. 1995.** Adequacy of mucosal biopsies for evaluation of intestinal cytokine-specific mRNA. *Dig Dis Sci* 40:1498-1505.
- **Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. 1996.** Disparate CD4+ lamina propria lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 157:1261-1270.
- **Furuta GT, Ackerman SJ, Wershil BK. 1995.** The role of the eosinophil in gastrointestinal diseases. *Curr Opin Gastroenterol* 11:541-547.

- G -

- **Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Ownbey RT, Celestin J, Leder P, Luster AD. 1996(a).** Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med* 2:449-456.
- **Garcia-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME, Sarafi MN, Lavigne F, Hamid Q, Murphy PM, Luster AD. 1996(b).** Human Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils and basophils induced in allergic and non allergic inflammation that signals through the CC Chemokine Receptor (CCR)-2 and -3. *J Immunol* 157:5613-5626.
- **Gasparini S, Russo MPR, De Gironcoli M, Cassatella MA. 1995.** Regulation of GRO $\alpha$  production in human granulocytes. *J Inflamm* 45:143-151.
- **Gerbert BO, Zanni MP, Ugucioni M, Loetscher M, Mackay CR, Pichler WJ, Yawalkar N, Baggiolini M, Moser B. 1997.** Functional expression of the eotaxin



- receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. *Curr Biol* 7:836-843.
- **Gebert PJ, Rothkötter HJ, Pabst R. 1996.** M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int Rev Cytol* 167:91-159.
  - **Gibson P, Rosella O. 1995.** Interleukin 8 secretion by colonic crypt cells in vitro: response to injury suppressed by butyrate and enhanced in inflammatory bowel disease. *Gut* 37:536-543.
  - **Gleich GJ, Frigas E, Loegering DA, Wassom DL, Steinmuller D. 1979.** Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J Immunol* 123:2925-2927.
  - **Godet PG, May GR, Sutherland LR. 1995.** Meta-analysis of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut* 37:668-673.
  - **Gonzalo JA, Jia GQ, Aguirre V, Friend D, Coyle AJ, Jenkins NA, Lin G-S, Katz H, Lichtman A, Copeland N, Kopf M, Gutierrez-Ramos J-C. 1996.** Mouse eotaxin expression parallels eosinophil accumulation during lung allergic inflammation but is not restricted to a Th2-type response. *Immunity* 4:1-14.
  - **Gower-Rousseau C, Salomez J-L, Dupas J-L, Marti R, Nuttens M-C, Votte A, Lemahieu M, Lemaire B, Colombel J-F, Cortot A. 1994.** Incidence of inflammatory bowel disease in northern France (1988-1990). *Gut* 35:1433-1438.
  - **Grewe M, Czech W, Morita A, Werfel T, Klammer M, Kapp A, Ruzicka T, Schöpf E, Krutmann J. 1998.** Human eosinophils produce biologically active IL-12: implications for control of T cell responses. *J Immunol* 161:415-420.
  - **Griebel PJ, Hein WR. 1996.** Expanding the role of Peyer patches in B-cell ontogeny. *Immunol Today* 17:30-38.
  - **Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, Doe WF. 1996(a).** Interleukin 8: cells of origin in inflammatory bowel disease. *Gut* 38:90-98.
  - **Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, Doe WF. 1996(b).** Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa. *J Leukoc Biol* 59:804-812.
  - **Grimm MC, Doe WF. 1996(c).** Chemokines in inflammatory bowel disease mucosa: expression of RANTES, Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  and  $\gamma$ -Interferon-Inducible Protein-10 by macrophages, lymphocytes, endothelial cells and granulomas. *Inflam Bowel Dis* 2:88-96.
  - **Grouard G, Durand I, Filgueira L, Bancherau J, Liu YJ. 1996.** Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centers. *Nature* 384:364-367.
  - **Grotendorst GR, Smale G, Pancev D. 1989.** Production of Transforming Growth Factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J Cell Physiol* 140:396-402.
  - **Gröttrup-Wolfers E, Moeller J, Karbach U, Müller-Lissner S, Enders S. 1996.** Elevated cell-associated levels of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 in inflamed mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Investigation* 26:115-122.
  - **Gurbindo C, Sabbah S, Menezes J, Justinich C, Marchand R, Seidman EG. 1993.** Interleukin-2 production in pediatric inflammatory bowel disease: evidence for dissimilar mononuclear cell function in Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 17:247-253.
- H -
- **Hagiage M. 1994.** La flore intestinale. Ed Vigot.
  - **Hadley TJ and Peiper SC. 1997.** From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the duffy blood group antigen. *Blood* 89:3077-3091.
  - **Hagga Y, Funakoshi O, Kuroe K et al. 1996.** Absence of measles viral genomic sequence in intestinal tissues from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction. *Gut* 38:211-215.
  - **Hallett MB, lloyds D. 1995.** Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'. *Immunol Today* 16:264-268.
  - **Hällgren R, Colombel J-F, Dahl R, Fredens K, Kruse A, Jacobsen NO, Venge P, Rambaud JC. 1989.** Neutrophil and eosinophil involvement of the small bowel in patients with celiac disease and Crohn's disease: studies on the secretion rate and immunohistochemical localization of granule constituents. *Am J Med* 86:56-64.
  - **Hamid Q, Barkans, Meng Q, Ying S, Abrahams JS, Kay AB and Moqbel R. 1992.** Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6 in vitro. *Blood* 80:1496-1501.
  - **Hamiguchi Y, Kanakura Y, Fujita J, Takeda SI, Nakano T, Tarui S, Honjo T, Kitamura Y. 1987.** Interleukin-4 is an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue type mast cells. *J Exp Med* 165:268-273.
  - **Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang J-P, Taurog JD. 1990.** Spontaneous inflammatory disease

- in transgenic rats expressing HLA-B27 and human  $\beta 2m$ : an animal model of HLA-B27 associated human disorders. *Cell* 63:1099-1112.
- **Hankard GF, Brousse N, Cézard JP, Emilie D, Peuchmaur M. 1997.** In situ interleukin 5 gene expression in pediatric Crohn's disease. *J P G N* 24:568-572.
  - **Harada A, Mukaida N, Matsushima K. 1996.** Interleukin-8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory bowel diseases. *Mol Med Today* 11:482-489.
  - **Hart DNJ. 1997.** Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245-3287.
  - **Hart PH, Vitti GF, Burges DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA. 1989.** Potential anti-inflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3803-3807.
  - **Heath H, Quin S, Rao P, Wu L, LaRosa G, Kassam N, Ponath PD, Mackay CR. 1997.** Chemokine receptor usage by human eosinophils. *J Clin Invest* 99:178-184.
  - **Hermiston M L, Gordon J I. 1995.** Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 270:1203-1207.
  - **Heyman M, Desjeux J-F. 1996.** Antigen handling by intestinal epithelial cells. In: *Antigen presentation by intestinal epithelial cells*, Heidelberg, Springer-Verlag, 39-51.
  - **Hirai K., Miyamasu M., Takaishi T. and Morita Y. 1997.** Regulation of the function of eosinophils and basophils. *Crit Rev Immunol* 17:325-352.
  - **Hoang P, Dehennin JP, Li L, Sibille C, Geubel A, Vaerman JP. 1997.** Human colonic intraepithelial lymphocytes regulate the cytokines produced by lamina propria mononuclear cells. *Mediators of Inflammation* 6:105-109.
  - **Hogaboam CM, Vallance BA, Kumar A, Addison CL, Graham FL, Gauldie J, Collins SM. 1997.** Therapeutic effects of interleukin-4 gene transfer in experimental inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 100:2766-2776.
  - **Holländer GA, Simpson SJ, Mizoguchi E, Nichogiannopoulos A, She J, Gutierrez-Ramos J-C, Ban AK, Burakoff SJ, Wang B, Terhorst C. 1995.** Severe colitis in mice with aberrant thymic selection. *Immunity* 3:27-38.
  - **Holtkamp W, Stollberg T, Reis HE. 1995.** Serum interleukin-6 is related to disease activity but not specificity in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 20:123-126.
  - **Horuk R. 1994.** The interleukin-8 receptor family: from chemokines to malaria. *Immunol Today* 15:169-174.
  - **Huber A, Genser D, Spitzauer S, Scheiner O, Jensen-Jarolim E. 1998.** IgE/anti-IgE immune complexes in sera from patients with Crohn's disease do not contain food-specific IgE. *Int Arch Allergy Immunol* 115:67-72.
  - **Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, GETAID, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. 1996.** Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379:821-823.
  - **Hyams JS, Fitzgerald JE, Wyzga N, Muller R, Treem WR, Justinich CJ, Kreutzer DL. 1995.** Relationship of interleukin-1 receptor antagonist to mucosal inflammation in inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 21:419-425.
- I -
- **Iizawa Y, Wagner D, Czuprynski CJ. 1993.** Analysis of cytokine mRNA expression in *Listeria*-resistant C57B1/6 and *Listeria*-susceptible A/J mice during *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 61:3739-3744.
  - **Ishizaka T, Mitsui H, Yanagida M, Miura T, Dvorak AM. 1993.** Development of human mast cells from their progenitors. *Cur Opin Immunol* 5:937-943.
  - **Izumi S, Hirai K, Miyamasu M, Takahashi Y, Misaki Y, Takaishi T, Morita Y, Matsushima K, Ida N, Nakamura h, Kasahara T, Ito K. 1997.** Expression and regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human eosinophils. *Eur J Immunol* 27:816-824.
  - **Izutani R, Ohyanagi H, MacDermott RP. 1994.** Quantitative PCR for detection of femtogram quantities of interleukin-8 mRNA expression. *Microbiol Immunol* 38:233-237.
  - **Izutani R, Loh EY, Reinecker HC, Ohno Y, Fusunyan RD, Lichtenstein GR, Rombeau JL, MacDermott RP. 1995.** Increased expression of interleukin-8 mRNA in ulcerative colitis and Crohn's disease mucosa and epithelial cells. *Inflam Bowel Dis* 1:37-47.
  - **Izzo RS, Witkon K, Chen AI, Hadjiyane C, Weinstein MI, Pellecchia C. 1993.** Neutrophil-activating peptide (interleukin-8) in colonic mucosa from patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 28:296-300.

## - J -

- **Jayanthi V**, Probert CSJ, Pinder DJ, Wicks ACB, Mayberry JF. **1992**. Epidemiology of Crohn's disease in Indian migrants and the indigenous population in Leicestershire. *Q J Med* 82:125-138.
- **Jenkins JK**, Malyak M, Arend WP. **1994**. The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-18 production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine and cytokine research* 13:47-54.
- **Jones SC**, Trejdosiewicz LK, Banks RE, Howdle PD, Axon ATR, Dixon MF, Whicher JT. **1993**. Expression of interleukin-6 by intestinal enterocytes. *J Clin Pathol* 46:1097-1100.
- **Jung HC**, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. **1995**. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 95:55-65.
- **Kirman I**, Nielsen OH. **1996**. Increased numbers of interleukin-15 expressing cells in active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 91:1789-1794.
- **Kirsner J B**. **1997**. Crohn's disease: yesterday, today and tomorrow. *Gastroenterology* 112:1028-1030.
- **Kita H**, Ohnishi T, Okubo Y, Weiler D, Abrams JS, Gleich GJ. **1991**. Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor and Interleukin-3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J Exp Med* 174:745-748.
- **Klaus J E**, Holloway J W and Le Gros G. **1996**. Innate immunity: Mast cells in the front line. *Curr Biology* 8:941-942.
- **Kopf M**, Le Gros G, Coyle AJ, Kosco-Vilbois MH, Brombacher F. **1995**. Immune responses of IL-4, IL-5, IL-6 deficient mice. *Immunol Rev* 148:45-69.
- **Kucharzik T**, Stoll R, Lügering N, Domschke W. **1995**. Circulating anti-inflammatory IL-10 in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 100:452-456.
- **Kucharzik T**, Lügering N, Weigeld H, Adolf M, Domschke W, Stoll R. **1996**. Immunoregulatory properties of IL-13 in patients with inflammatory bowel disease; comparison with IL-4 and IL-10. *Clin Exp Immunol* 104:483-490.
- **Kucharzik T**, Lügering N, Adolf M, Domschke W, Stoll R. **1997**. Synergistic effect of immunoregulatory cytokines on peripheral blood monocytes from patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 42:805-812.
- **Karttunen R**, Breese EJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. **1994**. Decreased mucosal (IL-4) interleukin-4 production in gut inflammation. *J Clin pathol* 47:1015-1018.
- **Kasama T**, Strieter RM, Lukacs NW, Burdick MD, Kunkel SL. **1994**. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol* 152:3559-3569.
- **Kato T**, Owen RL. **1994**. Structure and function of intestinal mucosal epithelium. In: *Handbook of mucosal immunology*, San Diego, Academic Press Inc, 11-26.
- **Katschinski B**, Fingerle D, Scherbaum B, Goebell H. **1993**. Oral contraceptive use and cigarette smoking in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 38:1596-1600.
- **Keates S**, Keates AC, Mizoguchi E, Bhan A, Kelly CP. **1997**. Enterocytes are the primary source of the chemokine ENA-78 in normal colon and ulcerative colitis. *Am J Physiol* 273:G75-82.
- **Kernéis S**, Bogdanova A, Kraehenbuhl J-P, Pringault E. **1997**. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* 277:949-952.

## - K -

- **Kaiserlian D**. **1996**. Intestinal epithelial cells are nonconventional antigen presenting cells. In: *Antigen presentation by intestinal epithelial cells*, Heidelberg, Springer-Verlag, 39-51.
- **Kulkarni AB**, Ward JM, Yaswen L, Mackall CL, Bauer SR, Huh C-G, Gress RE, Karlsson S. **1995**. Transforming growth factor- $\beta$  null mice: an animal model for inflammatory disorders. *Am J Pathol* 146:264-275.
- **Kühn R**, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. **1993**. Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75:263-274.

## - L -

- **Leavell KJ**, Peterson MW, Gross TJ. **1997**. Human neutrophil elastase abolishes interleukin-8 chemotactic activity. *J Leukoc Biol* 61:361-366.
- **Lee KM**, Jung HC, Yang SK, Song IS, Kim CY. **1997**. Expression of mRNA for CXC and C-C chemokines in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis according to disease activity. *Gastroenterology* 112:A1024.

- **Lee NA, McGarry MP, Larson KA, Horton MA, Kristensen AB, Lee JJ. 1997.** Expression of IL-5 in thymocytes / T cells leads to the development of a massive eosinophilia, extramedullary eosinophilopoiesis, and unique histopathologies. *J Immunol* 158:1332-1344.
- **Legoux P, Minty C, Delpuch B, Minty AJ, Shire D. 1992.** Simultaneous quantitation of cytokine mRNAs in interleukin-1 $\beta$  stimulated U373 human astrocytoma cells by a polymerisation chain reaction method involving co-amplification with an internal multispecific control. *Eur Cytokine Netw* 3:553-563.
- **Levi-Schaffer F, Lacy P, Severs NJ, Newman TM, North J, Gomperts B, Kay B, Moqbel R. 1995.** Association of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor with the crystalloid granules of human eosinophils. *Blood* 1995:2579-2586.
- **Levi-Schaffer F, Barkans J, Newman TM, Ying S, Wakelin M, Hohenstein R, Barak V, Lacy P, Kay B, Moqbel R. 1996.** Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils. *Immunology* 87:155-161.
- **Levy AM, Gleich GJ, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Steiner BL, Phillips SF. 1997.** Increased eosinophil granule proteins in gut lavage fluid from patients with inflammatory bowel disease. *Mayo Clin Proc* 72:117-123.
- **Lewin J, Dhillon AP, Sim R, Mazure G, Pounder RE, Wakefield AJ. 1995.** Persistent measles virus infection of the intestine: confirmation by immunogold electronmicroscopy. *Gut* 36:564-569.
- **Li H, Sim TC, Alam R. 1996.** IL-13 released by and localized in human basophils. *J Immunol* 156:4833-4838.
- **Lim KG, Wan HC, Bozza PT, Resnick MB, Wong DTW, Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM, Weller PF. 1996.** Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants: IL-16 and RANTES. *J Immunol* 156:2566-2570.
- **Liu Y, VanKruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Colombel J-F, Cortot A. 1995.** Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli* and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* 108:1396-1404.
- **Louis E, Belaiche J, Van Kemseke C, DeGrootte D. 1995.** Crohn's disease relapse prediction by interleukin-6 serum level. *Gastroenterology* 108:A865.
- **Louis E, Louis R, Shute J, Lau L, Franchimont D, Drion V, Lamproye A, Radermecker M, Djukano-vic R, Belaiche J. 1998(a).** Bronchial eosinophilic infiltration in Crohn's disease. *Gastroenterology* 114:A1027 (G4204).
- **Louis E, Dupont P, Depauw A, Croes F, Demolin G, Franchimont D, Belaiche J. 1998(b).** Relative defect in IL-10 production by colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 114:A1027 (G4207).
- **Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. 1996.** Type 1 and Type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 9:532-562.
- **Ludwig A, Petersen F, Zahn S, Götze O, Schröder J-M, Flad H-D, Brandt E. 1997.** The CXC-Chemokine Neutrophil-Activating Peptide-2 induces two distinct optima of neutrophil chemotaxis by differential interaction with Interleukin-8 receptors CXCR-1 and CXCR-2. *Blood* 90:4588-4597.
- **Lundqvist C, Melgar S, Yeung MM, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. 1996.** Intraepithelial lymphocytes in human gut have lytic potential and a cytokine profile that suggest T helper 1 and cytotoxic functions. *J Immunol* 157:1926-1934.
- **Luster AD. 1998.** Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338:436-445.

- M -

- **Ma A, Datta M, Margosian E, Chen J, Horak I. 1995.** T cells, but not B cells, are required for bowel inflammation in interleukin-2 deficient mice. *J Exp Med* 182:1567-1572.
- **McCabe RP, Secrist H, Botney M, Egan M, Peters MG. 1993.** Cytokine mRNA expression in intestine from normal and inflammatory bowel disease patients. *Clin Immunol Immunopathol* 66:52-58.
- **MacDermott RP, Sanderson IR, Reinecker H-C. 1998.** The central role of chemokines (chemotactic cytokines) in the immunopathogenesis of Ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 4:54-67.
- **MacDonald TT, Spencer J. 1994.** Gut-Associated lymphoid tissue. In: *Handbook of mucosal immunology*, San Diego, Academic Press Inc, 415-424.
- **McKay DM, Bienenstock J. 1994.** The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol Today* 15:533-538.
- **McLaughlan JM, Seth R, Vautier G, Robins RA, Scott BB, Hawkey CJ, Jenkins D. 1997.** Interleukin-8

- and inducible nitric oxide synthase mRNA levels in inflammatory bowel disease at first presentation. *J Pathol* 181:87-92.
- **McNicholl JM, Smith DK, Qari SH, Hodge T. 1997.** Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele ( $\Delta 32$  CCR5). *Emerging Infectious Diseases* 3:261-271.
  - **Madara JL, Podolsky DK, King NW, Sehgal PK, Moore R, Winter HS. 1985.** Characterisation of spontaneous colitis in cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*) and its response to sulfasalazine. *Gastroenterology* 88:113-119.
  - **Marie C, Pitton C, Fitting C, Cavaillon J-M. 1996(a).** Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, TGF $\beta$ ) of interleukin-8 production by LPS and/or TNF $\alpha$  activated human polymorphonuclear cells. *Med Inflamm* 5:334-340.
  - **Marie C, Pitton C, Fitting C, Cavaillon J-M. 1996(b).** IL-10 and IL-4 synergize with TNF $\alpha$  to induce IL-1RA production by human neutrophils. *Cytokine* 8:147-151.
  - **Margolin K, Aronson FR, Sznol M, Atkins MB, Gucalp R, Fisher RI, Sunderland M, Doroshow JH, Ernest ML, Mier JW, Dutcher JP, Gaynor ER, Weiss GR. 1994.** Phase II studies of recombinant human interleukin-4 in advanced renal cancer and malignant melanoma. *J Immunother* 15: 147-153.
  - **Marsh MN, Hinde J. 1985.** Inflammatory component of celiac sprue mucosa. 1) Mast cells, basophils and eosinophils. *Gastroenterology* 89:92-101.
  - **Marshall JS, Bienenstock J. 1994.** The role of mast cells in inflammatory reactions of the airways, skin and intestine. *Curr Opin Immunol* 6:853-859.
  - **Matsuura T, West GA, Youngman KR, Klein JS, Fiocchi C. 1993.** Immune activation genes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 104: 448-458.
  - **Matthews AN, Friends DS, Zimmermann N, Sarafi MN, Luster AD, Pearlman E, Werst SE, Rothenberg ME. 1998.** Eotaxin is required for the baseline level of tissue eosinophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6273-6278.
  - **Mawhorter SD, Kazura JW, Boom WH. 1994.** Human eosinophils as antigen-presenting cells: relative efficiency for superantigen- and antigen-induced CD4+ T-cell proliferation. *Immunology* 81:584-591.
  - **Mayberry JF. 1980.** Crohn's disease in developing countries. *Ital J Gastroenterol* 12:324-326.
  - **Mazzucchelli L, Hauser C, Zraggen K, Wagner H, Hess M, Laissie JA, Mueller C. 1994.** Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. *Am J Pathol* 144:997-1007.
  - **Mazzucchelli L, Hauser C, Zraggen K, Wagner H, Hess M, Laissie JA, Mueller C. 1996.** Differential in situ expression of the genes encoding the chemokines MCP-1 and RANTES in human inflammatory bowel disease. *J Pathol* 178:201-206.
  - **Meenan J, Spaans J, Grool T, Lammers K, Tytgat G, Van Deventer SJH. 1996.** Erythrocyte bound chemokine levels are raised in IBD. *Gastroenterology* 110:A965.
  - **Meresse B, Desreumaux P, Dubucquoi S, Gambiez L, Geboes K, Emilie D, Ectors N, Dessaint JP, Cortot A, Colombel JF. 1998.** Low ileal IL-10 mRNA levels may predict endoscopic recurrence after surgery in a subgroup of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 114:A1027 (G4249).
  - **Metcalf DD, Prussin C. 1995.** Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods* 188:117-128.
  - **Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Auer M, Hub E, Rot A. 1997.** Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 91: 385-395.
  - **Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Watanabe K, Tateishi H, Nishiyama T, Saiki T, Ikeda H, Tsuruta O, Tanikawa K. 1994.** IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 96:432-436.
  - **Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Ishida O, Ikeda H, Tsuruta O, Harada K, Tateishi H, Nishiyama T, Tanikawa K. 1995.** Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut* 36:45-49.
  - **Mitsuyama K, Toyonaga A, Tanikawa K. 1996.** Role of chemokine Gro $\alpha$  in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 110:A971.
  - **Miyamasu M, Hirai K, Takahashi Y, Iida M, Yamaguchi M, Koshino T, Takaishi T, Morita Y, Matsushima K, Ohta K, Kasahara T, Ito K. 1995.** Chemotactic agonists induce cytokine generation in eosinophils. *J Immunol* 154:1339-1349.
  - **Mochizuki M, Bartels J, Mallet AI, Christophers E, Schröder JM. 1998.** IL-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. *J Immunol* 160:60-68.

- **Möller GM, DeJong TAW, Overbeek SE, Van der Kwast TH, Postma DS, Hoogsteden HC. 1996.** Ultrastructural immunogold localization of interleukin-5 to the crystalloid core compartment of eosinophil secondary granules in patients with aztopic asthma. *J Histochem Cytochem* 44:67-69.
- **Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. 1993.** Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 75:275-282.
- **Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Luzzo F, Pallone F. 1997.** Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 112:1169-1178.
- **Moore JP, Trkola A, Dragic T. 1997.** Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr Opin Immunol* 9:551-562.
- **Moqbel R, Ying S, Barkans J, Newman TM, Kimmitt P, Wakelin M, Taborda-Barata L, Meng Q, Corrigan CJ, Durham SR, Kay AB. 1995.** Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. *J Immunol* 155:4939-4947.
- **Morales VM, Snapper SB, Blumberg RS. 1996.** Probing the gastrointestinal immune function using transgenic and knockout technology. *Curr Opin Gastroenterol* 12:577-583.
- **Morris GP, Beck PL, Herrige MS, Depew W, Szewczuk MR, Wallace JL. 1989.** Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 98:694-702.
- **Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA and Coffman RL. 1986.** Two types of murine helper T cell clones. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357.
- **Mosmann TR, Subash Sad. 1996.** The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17:138-146.
- **Mould AW, Matthaei KI, Young IG, Foster PS. 1997.** Relationship between interleukin-5 and eosinophilia in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. *J Clin Invest* 99:1064-1071.
- **Mukaida N, Matsushima K. 1997.** Chemokines and chemokine receptor signaling pathway. *Mucosal Immunology Update* 5(3):47-49.
- **Mullin GE, Lazenby AJ, Harris ML, Bayless TM, James SP. 1992.** Increased Interleukin-2 messenger RNA in the intestinal mucosal lesions of Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gastroenterology* 102:1620-1627.
- **Mowat AM, Viney JL. 1997.** The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 156:145-166.
- **Mowat AMCI, Widmer MB. 1995.** A role for IL-4 in immunologically mediated enteropathy. *Clin Exp Immunol* 99:65-69.
- **Mullin GE, Maycon ZR, Braun-Elwert L, Cerchia R, James SP, Katz S, Weissman GS, McKinley MJ, Fisher SE. 1996.** Inflammatory bowel disease mucosal biopsies have specialized lymphokine mRNA profiles. *Inflamm Bowel Dis* 2:16-26.
- **Murch S H, Braegger C P, Walker-Smith J A, MacDonald TT. 1993.** Location of tumor necrosis factor  $\alpha$  by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 34:1705-1709.
- **Murphy P M. 1996.** Chemokines receptors: Structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine & growth factor reviews* 7:47-64.
- **Murthy S, Flanigan A. 1997.** Recent developments in inflammatory bowel disease therapy. *Exp Opin Ther Patents* 7:695-715.

- N -

- **Nakajima H, Gleich G J and Kita H. 1996.** Constitutive production of IL-4 and IL-10 and stimulated production of IL-8 by normal peripheral blood eosinophils. *J Immunol* 156:4859-4866.
- **Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl J-P. 1996.** Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 86:345-348.
- **Nielsen OH, Brynskov J, Bendtzen K. 1993.** Circulating and mucosal concentrations of tumor necrosis factor and inhibitor(s) in chronic inflammatory bowel disease. *Dan Med Bull* 40:247-249.
- **Nielsen OH, Koppen T, Horn T, Eriksen J, Kirman I. 1996.** Involvement of Interleukin-4 and -10 in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 41:1786-1793.
- **Niessner M, Volk BA. 1995.** Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin Exp Immunol* 101:428-435.
- **Nikolaus S, Bauditz J, Gionchetti P, Witt C, Lochs H, Schreiber S. 1998.** Increased secretion of proinflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by

interleukin 10 during intestinal inflammation. Gut 42:470-476.

- **Nonaka M, Nonaka R, Woolley K, Adelroth E, Miura K, Okhawara Y, Glibetic M, Nakano K, O'Byrne P, Dolovich J, Jordana M. 1995.** Distinct immunohistochemical localization of IL-4 in human inflamed airway tissues. J Immunol 155:3224-3244.

- O -

- **O'Leary JJ, chetty R, graham AK, McGee J.O'D. 1996.** In situ PCR: pathologist's dream or nightmare ? J Pathol 178:11-20.
- **Olson AD, Ayass M, Chensue S. 1993.** Tumor necrosis factor and IL-1 $\beta$  expression in pediatric patients with inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 16:241-246.

- P -

- **Panes J, Granger DN. 1998.** Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. Gastroenterology 114:1066-1090.
- **Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. 1997.** Type 1 T-helper cell predominance and Interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. Am J Pathol 150:823-832.
- **Podolsky DK. 1997.** Lessons from genetic models of inflammatory bowel disease. Acta gastroenterol belg 60:163-165.
- **Ponath PD, Qin S, Ringler DJ, Clark Lewis I, Wang J, Kassam N, Smith H, Shi X, Gonzalo JA, Newman W, Gutierrez Ramos JC and Mackay CR. 1996.** Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. J Clin Invest 97:604-612.
- **Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. 1993.** Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C.B-17 scid mice. Int Immunol 5:1461-1471.
- **del Pozo MA, Sanchez-Mateos P, Shanchez-Madrid F. 1996.** Cellular polarization induced by chemokines: a mechanism for leukocyte recruitment ? Immunol Today 17:127-131.

- **Pulendran B, van Driel R, Nossal GJV. 1997.** Immunological tolerance in germinal centres. Immunol Today 18:27-31.
- **Puri RK, Siegel JP. 1993.** Interleukin-4 and cancer therapy. Cancer invest 11:473-86.

- Q -

- **Quandalle P. 1996.** Traitement chirurgical de la maladie de Crohn. Médecine thérapeutique 2:769-776.

- R -

- **Radford-Smith G, Jewell DJ. 1996.** Cytokines and inflammatory bowel disease. Baillière's Clinical Gastroenterology 10:151-164.
- **Radford-Smith G, McGowan I, Jewell DJ. 1994.** Th1 and Th2 cytokine gene expression in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 106:A757.
- **Rainger GE, Buckley C, Simmons DL, Nash GB. 1997.** Cross-talk between cell adhesion molecules regulates the migration velocity of neutrophils. Curr Biology 7:316-325.
- **Reglier H, Arce-Vicioso M, Fay M, Gourgerot-Pocidallo MA, Chollet-Martin S. 1998.** Lack of IL-10 and IL-13 production by polymorphonuclear neutrophils. Cytokine 10:192-198.
- **Reimund J-M, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, Duclos B. 1996(a).** Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. J Clin Immunol 16:144-150.
- **Reimund J-M, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Baumann R, Poindron P, Duclos B. 1996(b).** Increased production of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , and Interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. Gut 39:684-689.
- **Reimund JM, Duclos B, Dumont S, Muller C, Baumann R, Poindron P. 1997.** L'interleukine-8 est un médiateur inflammatoire important au cours de la rectocolite hémorragique et de la maladie de Crohn. Gastroenterol Clin Biol 21:131-137.
- **Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A. 1993.** Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 $\beta$  by isolated lamina propria cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. Clin Exp Immunol 94:174-181.

- **Reinecker HC, Loh EY, Ringler DJ, Mehta A, Rombeau JL, MacDermott RP. 1995.** Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology* 108:40-50.
- **Rennick DM, Fort MM, Davidson NJ. 1997.** Studies with IL-10<sup>-/-</sup> mice: an overview. *J Leukoc Biol* 61:389-396.
- **Roberts AI, Bilencker M, Ebert EC. 1997.** Intestinal intraepithelial lymphocytes have a promiscuous interleukin-8 receptor. *Gut* 40:333-338.
- **Romagnani P, Annunziato F, Baccari MC, Parronchi P. 1997.** T cells and cytokines in Crohn's disease. *Curr Opin Immunol* 9:793-799.
- **Romagnani S. 1996.** Short analytical review: Th1 and Th2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 80:225-235.
- **Rollins BJ. 1997.** Chemokines. *Blood* 90:909-928.
- **Rothenberg ME, Ownbey R, Mehlhop PD, Loisselle PM, van de Rijn M, Bonventre JV, Oettgen HC, Leder P, Luster AD. 1996.** Eotaxin triggers eosinophil-selective chemotaxis and calcium flux via a distinct receptor and induces pulmonary eosinophilia in the presence of interleukin-5 in mice. *Mol Med* 2:334-348.
- **Rothenberg ME, MacLean JA, Pearlman E, Luster AD, Leder P. 1997.** Targeted disruption of the chemokine Eotaxin partially reduces antigen induced tissue eosinophilia. *J Exp Med* 185:785-790.
- **Rozen P, Zonis J, Yekutiel P, Gilat T. 1979.** Crohn's disease in the Jewish population of Tel-Aviv-Yafo. *Gastroenterology* 76:25-30.
- **Rückert Y, Schindler U, Heinig T, Nikolaus S, Raedler A, Schreiber S. 1996.** IL-4 signaling mechanisms in inflammatory bowel disease mononuclear phagocytes. *Inflamm Bowel Dis* 2:244-252.
- **Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS, Harriman GR, Srinivasan Y, Brabet P, Boulay G, Bradley A, Birnbaumer L. 1995.** Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G $\alpha_{12}$ -deficient mice. *Nat Genet* 10:143-150.
- **Rugtveit J, Nilsen EM, 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.
- **Rumsaeng V, Vliagoftis H, Oh CK, Metcalfe DD. 1997.** Lymphotoxin gene expression in mast cells following Fc-epsilon receptor aggregation. *J Immunol* 158:1353-1360.
- **Russel M G V, Stockbrügger R W. 1996.** Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: an update. *Scand J Gastroenterol* 31:417-427.
- **Russel GJ, Parker CM, Sood A, Mizoguchi E, Ebert EC, Bhan AK, Brenner MB. 1996.** P126 (Cdw101), a costimulatory molecule preferentially expressed on mucosal T lymphocytes. *J Immunol* 157:3366-3374.
- **Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. 1990.** Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 99:956-963.
- **Rutgeerts P, Hiele M, Geboes K, Peeters M, Penninck F, Aerts R, Kerremans R. 1995.** Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology* 108:1617-1621.

- S -

- **Saddlack B, Merz H, Schorle H, Schimpi A, Feller A, Horak I. 1993.** Interleukin-2 receptor  $\alpha$  chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3:521-530.
- **Saleem S, Dai Z, Coelho SN, Konieczny BT, Assmann KJM, Baddoura FK, Lakkis FG. 1998.** IL-4 is an endogenous inhibitor of neutrophil influx and subsequent pathology in acute antibody-mediated inflammation. *J Immunol* 160:979-984.
- **Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia. 1997.** Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T Helper 2 cells. *Science* 227:2005-2007.
- **Sanderson IR, Walker WA. 1994.** Mucosal barrier. In: *Handbook of mucosal immunology*, San Diego, Academic Press Inc, 41-51.
- **Sanz M-J, Ponath PD, Mackay CR, Newman W, Miyasaka TJ, Tamatani T, Flanagan BF, Lobb RR, Williams TJ, Nourshargh S, Jose PJ. 1998.** Human eotaxin induces  $\alpha 4$  and  $\beta 2$  integrin-dependant eosinophil accumulation in rat skin in vivo: delayed generation of eotaxin in response to IL-4. *J Immunol* 160:3569-3576.
- **Sartor RB. 1995.** Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 24:475-507.
- **Satsangi J, Jewell DP. 1996(A).** Are cytokine gene polymorphisms important in the pathogenesis of inflammatory bowel disease ? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 6:413-416.
- **Satsangi J, Parkes M, Louis E, Lathrop M, Bell J, Jewell DP. 1996(b).** Two stage genome-wide search in



- inflammatory bowel disease: evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 14:199-202.
- **Satsangi J, Jewell DP, Bell JI. 1997.** The genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 40:572-574.
  - **Schreiber S, Heinig T, Panzer U, Reinking R, Bouchard A, Stahl P D, Raedler A. 1995(a).** Impaired response of activated mononuclear phagocytes to interleukin-4 in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 108:21-33.
  - **Schreiber S, Heinig T, Thiele H-G, Raedler A. 1995(b).** Immunoregulatory role of interleukin-10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 108:1434-1444.
  - **Schwiebert LA, Beck LA, Stellato C, Bickel CA, Bochner BS, Schleimer RP. 1996.** Glucocorticosteroid inhibition of cytokine production: relevance to antiallergic actions. *J Allergy Clin Immunol* 97:143-152.
  - **Sher ME, D'Angelo AJ, Stein TA, Bailey B, Burns G, Wise L. 1995.** Cytokines in Crohn's colitis. *Am J Surg* 169:133-136.
  - **Sher ME, Bank S, Greenberg R, Sardinha TC, Weissman S, Bailey B, Gilliland R, Wexner SD. 1996.** The influence of cigarette smoking on cytokine levels in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 91:378.
  - **Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R et al. 1996.** Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south ? Results of the European collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD). *Gut* 39:690-697.
  - **Simpson SJ, Mizuguchi E, Allen D, Bhan AK, Terhorst C. 1995.** Evidence that CD4+, but not CD8+ T cells are responsible for the murine interleukin-2 deficient colitis. *Eur J Immunol* 25:2618-2625.
  - **Smith PD, Meng G. 1997.** Mucosal macrophages in infection and immunity. *Mucosal Immunology Update* 5(2):32-34.
  - **Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. 1991.** Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* 100:143-149.
  - **Soussi-Gounni A, Lamkhioued B, Morita M, Aldebert D, Marika S, Capron A, Capron M. 1998.** Molecular characterization of the low-affinity IgE receptor FcεRII/CD23 expressed by human eosinophils. *Int Immunol* 10:395-404.
  - **Soussi-Gounni A, Lamkhioued B, Ochiai K, Tanaka Y, Delaporte E, Capron A, Kinet JP, Capron M. 1994.** High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 367:183-186.
  - **Stenson WF, Alpers DH. 1998.** Gene induction in intestinal epithelial cells in response to injury. *Curr Opin Gastroenterol* 14:83-89.
  - **Stevens C, Walz G, Singram C, Lipman ML, Zanker B, Muggia A, Antonioli D, Peppercorn MA, Strom TB. 1992.** *Dig Dis Sci* 37:818-826.
  - **Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhart R, Neurath M. 1997.** Reciprocal IFNγ and TGFβ responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today* 18:61-64.
  - **Suk K, Somers SD, Erickson KL. 1993.** Regulation of murine macrophage function by IL-4: IL-4 and IFNγ differentially regulate macrophage tumoricidal activation. *Immunology* 80:617-624.
  - **Sundberg JP, Elson CO, Bedigian H, Birkenmeier EH. 1994.** Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* 109:1344-1367.
  - **Sutherland LR, Rachmara S, Bryant H, Fick G. 1990.** Effect of cigarette smoking on recurrence of Crohn's disease. *Gastroenterology* 106:643-648.
  - **Symon FA, Lawrence MB, Williamson ML, Walsh GM, Watson SR, Wardlaw AJ. 1996.** Functional and structural characterisation of the eosinophil P-selectin ligand. *J Immunol* 157:1711-1719.

- T -

- **Talley NJ, Kephart GM, McGovern TW, Carpenter HA, Gleich GJ. 1992.** Deposition of eosinophil granule major basic protein in eosinophilic gastroenteritis and celiac disease. *Gastroenterology* 102:137-145.
- **Tani K, Su SB, Utsunomiya I, Oppenheim JJ, Wang JM. 1998.** Interferon-γ maintains the binding and functional capacity of receptors for IL-8 on cultured human T cells. *Eur J Immunol* 28:502-507.
- **Tateishi H, Mitsuyama K, Toyonaga A, Tomoyose M, Tanikawa K. 1997.** Role of cytokines in experimental colitis: relation to intestinal permeability. *Digestion* 58:271-281.
- **Taugog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, FernandezSueiro JL, Balish E, Hammer RE. 1994.** The germ free state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* 180:2359-2364.
- **Tepper RL, Levinson DA, Stanger BZ, Campos-Torres J, Abbas AK, Leder P. 1990.** IL-4 induces allergic-like

- inflammatory disease and alters T cell development in transgenic mice. *Cell* 62:457-467.
- **Terada N, Konno A, Terada Y, Fukuda S, Yamashita T, Abe T, Shimada H, Ishida K, Yoshimura K, Tanaka Y, Ra C, Ishikawa K, Togawa K. 1995.** IL-4 upregulates FcεRI α-chain messenger RNA in eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 96:1161-1169.
  - **Thepen T, Langeveld-Wildschut EG, Bihari IC, van Wichem DF, van Reijssen FC, Mudde GC, Bruijnzeel-Koomen CAF. 1996.** Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from an initial Th2 response to a Th1 response in situ: an immunocytochemical study. *J Allergy Clin Immunol* 97:828-837.
  - **Thomas GAO, Rhodes J, Green JT. 1998.** Inflammatory bowel disease and smoking: a review. *Am J Gastroenterol* 93:144-149.
  - **Thompson N, Montgomery S, Pounder R E, Wakefield AJ. 1995.** Is measles vaccination a risk factor for Crohn's disease? *Lancet* 345:1071-1074.
  - **Timmer A, Sutherland LR, Martin F et al. 1998.** Oral contraceptive use and smoking are risk factors for relapse in Crohn's disease. *Gastroenterology* 114:1143-1150.
  - **Trinchieri G. 1993.** Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. *Immunol Today* 14:335-338.
  - **Tsiagbe VK, Inghirami G, Thorbecke GJ. 1996.** The physiology of germinal centers. *Crit Rev Immunol* 16:381-421.
  - **Tysk C, Jarnerot G. 1992.** Has smoking changed the epidemiology of ulcerative colitis? *Scand J Gastroenterol* 27:508-512.
  - **Vallance BA, Hogaboam CM, Addison CL, Gauldie J, Collins SM. 1996.** Interleukin-4 gene transfer to the intestine causes inflammation and muscle dysfunction in the mouse. *Gastroenterology* 110:A1034.
  - **VanDeventer SJH. 1997.** Tumor necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* 40:443-448.
  - **VanDijk JPM, Madretsma S, Keuskamp ZJ, Zijlstra FJ. 1995.** Nicotine inhibits cytokine synthesis by mouse colonic mucosa. *Eur J Pharmacol* 278:R11-R12.
  - **VanGossum A, Adler M, DeReuck M et al. 1996.** Epidemiology of inflammatory bowel disease in Brussel's area (1992-1993). *Acta Gastroenterol Belg* 59:7-9.
  - **VanKlinken J-W, Dekker J, Büller HA, Einerhand AWC. 1995.** Mucin gene structure and expression: protection vs adhesion. *American Physiological Society* G613.
  - **VanKruiningen HJ. 1995.** On the use of antibiotics in Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 20:310-316.
  - **Vannier E, Miller LC, Dinarello CA. 1992.** Coordinated anti-inflammatory effect of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but upregulates gene expression and synthesis of interleukin-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4076-4080.
  - **VanRees EP, Palmen MJ, van de Goot FR, Macher BA, Dielman LA. 1997.** Leukocyte migration in experimental inflammatory bowel disease. *Mediators of Inflammation* 6:85-93.

- W -

- **de Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, Culpepper J, Dang W, Zurawski G, de Vries JE. 1993.** Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. *J Immunol* 151:6370-6381.
- **Wakefield AJ, Ekblom A, Dhillon AP, Pittilo RM, Pounder RE. 1995.** Crohn's disease: pathogenesis and persistent measles virus infection. *Gastroenterology* 108:911-916.
- **Wallaert B, Desreumaux P, Copin MC, Tillie I, Bernard A, Colombel J-F, Gosselin B, Tonnel AB, Janin A. 1995.** Immunoreactivity for Interleukin 3 and 5 and Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor of intestinal mucosa in bronchial asthma. *J Exp Med* 182:1897-1904.

- V -

- U -
- **Ugucioni M, Loetscher P, Forssmann U, Dewald B, Li H, Lima SH, Li Y, Kreider B, Garotta G, Thelen M, Baggiolini M. 1996.** Monocyte chemoattractant protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin. *J Exp Med* 183:2379-2384.
  - **Ulrich CD, Holtmann M, Miller LJ. 1998.** Secretin and Vasoactive Intestinal Peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors. *Gastroenterology* 114:382-397.
  - **Vajdy M, Kosco-Vilbois MH, Kopf M, Köhler G, Lycke N. 1995.** Impaired mucosal immune response in interleukin 4-targeted mice. *J Exp Med* 181:41-53.

- **Walsh GM. 1997.** Human eosinophils: their accumulation, activation and fate. *British Journal of Haematology* 97:701-709.
- **Wang P, Wu P, Anthes JC, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. 1994.** Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood* 83:2678-2683.
- **Wardlaw AJ, Moqbel R, Kay AB. 1995.** Eosinophils: Biology and role in disease. *Adv Immunol* 60:151-266.
- **Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Okamoto S, Hayashi T, Yamazaki M, Iwao Y, Ishii H, Habu S, Uehira M, Nishimoto H, Ishikawa H, Hata J, Hibi T. 1998.** Interleukin-7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin-7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J Exp Med* 187:389-402.
- **Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. 1995.** Interleukin-2 receptor  $\alpha$  chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3:521-530.
- **West GA, Matsuura T, Levine AD, Klein JS, Fiocchi C. 1996.** Interleukin-4 in inflammatory bowel disease and mucosal immune reactivity. *Gastroenterology* 110:1683-1695.
- **Wolf M, Delgado MB, Jones SA, Dewald B, Clark-Lewis I, Baggiolini M. 1998.** Granulocyte chemotactic protein 2 acts via both IL-8 receptors, CXCR1 and CXCR2. *Eur J Immunol* 28:164-170.
- **Wood AJJ. 1996.** Drug therapy. *N Engl J Med* 334:841-848.
- **Woywodt A, Neustock P, Kruse A, Schwarting K, Ludwig D, Stange EF, Kirchner H. 1994.** Cytokine expression in intestinal mucosal biopsies. In situ hybridization of the mRNA for interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and tumour necrosis factor- $\alpha$  in inflammatory bowel disease. *Eur Cytokine Netw* 5:387-395.
- **Walsh GM. 1997.** Human eosinophils: their accumulation, activation and fate. *British Journal of Haematology* 97:701-709.
- **Wang P, Wu P, Anthes JC, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. 1994.** Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood* 83:2678-2683.
- **Ying S, Meng Q, Taborda-Barata, Corrigan CJ, Barkans J, Assoufi B, Moqbel R, Durham SR, Kay AB. 1996.** Human eosinophils express messenger RNA encoding RANTES and store and release biologically active RANTES protein. *Eur J Immunol* 26:70-76.
- **Youngman KR, Simon PL, West GA, Cominelli F, Rachmilewitz D, Klein JS, Fiocchi C. 1993.** Localization of intestinal Interleukin-1 activity and protein and gene expression to Lamina propria cells. *Gastroenterology* 104:749-758.

- Z -

- **Z'Graggen K, Walz A, Mazzucchelli L, Strieter RM, Mueller C. 1997.** The CXC chemokine ENA-78 is preferentially expressed in intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 113:808-813.
- **Zou W, Durand-Gasselini I, Dulioust A, Maillot MC, Galanaud P, Emilie D. 1995.** Quantification of cytokine gene expression by competitive PCR using a colorimetric assay. *Eur Cytokine Netw* 6:257-264.

- Y -

- **Yamada N, Wakugawa M, Kuwata S, Yoshida T, Nakagawa H. 1995.** Chronologic analysis of in situ cytokine expression in mite allergen-induced dermatitis in atopic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 96:1069-1075.
- **Yang S-K, Kim OH, Lee MH, Song K, Jung HC, Hong W-C, Min YI. 1997.** Expression of chemokines genes in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 112:A1126.
- **Yeaman GR, Collins JE, Currie JK, Guyre PM, Wira CR, Fanger MW. 1998.** IFN $\gamma$  is produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine

# **PUBLICATIONS**

## ARTICLES & COMMUNICATIONS

- Laurent Kremer, Jérôme Estaquier, Eric Brandt, Jean-Claude Ameisen and Camille Locht. *Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guérin infection prevents apoptosis of resting human monocytes*. *Eur J Immunol* 1997; 27: 2450-2456.
- Pierre Desreumaux, Eric Brandt, Luc Gambiez, Dominique Emilie, Karel Geboes, Olivier Klein, Nadine Ectors, Antoine Cortot, Monique Capron and Jean-Frédéric Colombel. *Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease*. *Gastroenterology* 1997; 113: 118-126.
  - P Desreumaux, E Brandt, Luc Gambiez, D Emilie, O Klein, C Leportier, A Cortot, M Capron et J-F Colombel. *Etude cinétique des profils de synthèse de cytokines muqueuses au cours de l'évolution de la maladie de Crohn*. Présentation aux Journées des Jeunes Chercheurs de l'Institut Pasteur de Lille, le 18 Novembre 1996.
  - P Desreumaux, E Brandt, L Gambiez, D Emilie, O Klein, C Leportier, A Cortot, M Capron et J-F Colombel. *Etude cinétique des profils de synthèse de cytokines muqueuses au cours de l'évolution de la maladie de Crohn*. Présentation lors du Colloque Lille-ULB, Bruxelles, le 9 janvier 1997.
  - P Desreumaux, E Brandt, L Gambiez, D Emilie, O Klein, C Leportier, A Cortot, M Capron et J-F Colombel. *Les lésions iléales précoces et chroniques de la maladie de Crohn sont associées à des profils de synthèse de cytokines différents*. Présentation aux 21<sup>èmes</sup> Journées Francophones d'Hépatologie et de Gastroentérologie, Strasbourg. *Gastroenterol Clin Biol* 1997; 21: A172.
  - P Desreumaux, E Brandt, L Gambiez, D Emilie, O Klein, C Leportier, A Cortot, M Capron and J-F Colombel. *No abnormality of immunoregulatory cytokines in the uninvolved mucosa in Crohn's disease*. Présentation lors de la réunion annuelle de l'American Gastroenterological Association, Washington. *Gastroenterology* 1997; 112: A958.
- Eric Brandt, Pierre Desreumaux, Nadine Ectors, Luc Gambiez, Olivier Klein, Dominique Emilie, Karel Geboes, Jean-Frédéric Colombel and Monique Capron. *A quantitative study of IL-8 in early and chronic lesions of Crohn's disease patients*. (soumis à *J Immunol*).
  - E Brandt, P Desreumaux, D Emilie, J-F Colombel et M Capron. *Exploration locale et fonctionnelle de l'IL-8 dans la maladie de Crohn*. Présentation orale lors du congrès annuel de la Société Française d'Immunologie, Marseille, Novembre 1997.
  - E Brandt, P Desreumaux, D Emilie, J-F Colombel et M Capron. *Exploration locale et fonctionnelle de l'IL-8 dans la maladie de Crohn*. Présentation lors des 22<sup>èmes</sup> Journées Francophones d'Hépatologie et de Gastroentérologie, Paris. *Gastroenterol Clin Biol* 1998; 22: A61.
  - E Brandt, P Desreumaux, D Emilie, J-F Colombel and M Capron. *IL-8 in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease*. Résumé soumis à l'American Gastroenterological Association, New Orleans. *Gastroenterology* 1998; 114: A941 (G3854).

- Eric Brandt, Heide Müller-Alouf, Pierre Desreumaux, Gaëtane Woerly, Jean-Frédéric Colombel et Monique Capron. *Circulating G $\alpha$  levels contribute to neutrophil priming and IL-8 directed mucosal recruitment into chronic lesions of patients with Crohn disease.* **Eur Cytokine Netw** 1998 (in press).
- Eric Brandt, Gaëtane Woerly, Sylvie Loiseau et Monique Capron. *IL-4 production by polymorphonuclear neutrophils.* (en préparation)
- Gaetane Woerly, Eric Brandt, Freddy Lengrand, Nadine Roger, Delphine Aldebert, Sylvie Loiseau, Emmanuel Delaporte and Monique Capron. *Expression of Th1- and Th2-type immunoregulatory cytokines by human eosinophils.* (en préparation)

Laurent Kremer<sup>1</sup>,  
Jérôme Estaquier<sup>2</sup>,  
Eric Brandt<sup>3</sup>,  
Jean-Claude Ameisen<sup>2</sup> and  
Camille Locht<sup>1</sup>

## *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin infection prevents apoptosis of resting human monocytes

<sup>1</sup> Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire INSERM U447, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

<sup>2</sup> Groupe Hospitalier Claude Bernard-Bichat INSERM U13, Paris, France

<sup>3</sup> Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire INSERM U167, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

Apoptosis plays an essential role in the development and homeostasis of multicellular organisms. Some infectious agents interfere with this programmed cell death to their own benefit. Here, we show that infection of resting human monocytes with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin (BCG) increases monocyte viability by preventing them from undergoing apoptosis. Heat-killed BCG also prevented apoptosis, indicating that replication of BCG is not required to prevent cell death. Analysis of BCG-infected monocytes revealed an up-regulation of the *A1* mRNA, whereas the *bcl-2* mRNA was not up-regulated. Interestingly, preinfection with BCG renders the cells resistant to interleukin (IL)-10-induced apoptosis which may be one of the mechanisms mycobacteria use to modulate immune responses. BCG infection was also accompanied by an impairment of the capacity of monocytes to secrete IL-10 and by an induction of the capacity to secrete tumor necrosis factor- $\alpha$ , two cytokines known to induce and prevent human monocyte apoptosis, respectively. Since it has been reported that apoptosis is involved in killing of intracellular mycobacteria, the prevention of apoptosis may represent a strategy for mycobacterial survival in the infected host.

### 1 Introduction

Circulating monocytes play a key role in the immune defense against infections by migrating into infected tissues and differentiating into macrophages capable of destroying the invading pathogen. To establish a successful infection, microbial pathogens must circumvent the microbicidal mechanisms of the host. It is therefore not surprising that the subversion of monocyte/macrophage activities constitutes some of the preferred virulence mechanisms of pathogenic microorganisms. In recent years, several pathogens have been shown to even cause the destruction of macrophages. These include *Shigella flexneri* [1], *Bordetella pertussis* [2], *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [3], *Listeria monocytogenes* [4, 5] and *Salmonella typhimurium* [6, 7]. In each case, these organisms induced macrophages to undergo apoptosis. Killing of macrophages may allow microorganisms that reside within these cells to escape from the phagocyte, to infect neighbouring cells and to thereby disseminate to other tissues. Those pathogens for which macrophages are not the preferred habitat may benefit from the induction of apoptosis because it may help them to evade the first line of immune defense.

[I 17015]

Received May 2, 1997; in revised form June 23, 1997; accepted June 27, 1997.

L. Kremer and J. Estaquier contributed equally to this work.

**Correspondence:** Camille Locht, Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire INSERM U447, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Prof. Calmette, F-59019 Lille Cedex  
Fax: +33-3 30 87 11 58; e-mail: camille.locht@pasteur-lille.fr

**Abbreviations:** GFP: Green fluorescent protein LAM: Lipoarabinomannan MOI: Multiplicity of infection RT-PCR: Reverse transcriptase-PCR

**Key words:** Apoptosis / Bacillus Calmette Guérin / Monocyte / Cytokine / Bcl-2

Pathogenic mycobacteria, such as the members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, the etiologic agents of the world's most frequent cause of death [8], invade pulmonary macrophages as one of the initial steps in the pathogenesis (for a recent review see [9]). In contrast to the strictly localized infections caused by *B. pertussis* and *S. flexneri*, mycobacteria frequently disseminate to extrapulmonary sites [10]. Infected monocytes or macrophages most probably play an important role in extrapulmonary dissemination of mycobacteria. Killing of these cells would result in strict localization of the infection. Moreover, apoptosis, but not necrosis of mycobacteria-infected monocytes may cause death of the intracellular microorganisms [11]. These observations suggest that it would not be to the advantage of mycobacteria to trigger apoptosis of their host cell.

Non-differentiated circulating monocytes progressively undergo programmed cell death which can be overcome by the addition of macrophage-CSF or LPS [12]. Here we show that infection with *Mycobacterium bovis* BCG at a low multiplicity of infection (MOI) or incubation with killed BCG prevents resting human monocytes from undergoing apoptosis. This effect was accompanied by the induction of the *A1* anti-apoptotic gene expression. Furthermore, BCG infection renders monocytes resistant to IL-10-induced apoptosis and modulates their capacity to secrete IL-10 and TNF- $\alpha$ .

### 2 Materials and methods

#### 2.1 Reagents and cytokines

Lipoarabinomannan (LAM) from the *M. tuberculosis* Erdman strain was kindly provided by P. Brennan and G. Besra (Fort Collins, CO). Acridine orange and Hoechst 33342 (bisbenzimidazole) nuclear dye were purchased from Immunotech (Luminy, France) and Sigma (La Verpill-

## Distinct Cytokine Patterns in Early and Chronic Ileal Lesions of Crohn's Disease

PIERRE DESREUMAUX,\*<sup>†</sup> ERIC BRANDT,\* LUC GAMBIEZ,<sup>§</sup> DOMINIQUE EMILIE,<sup>‡</sup> KAREL GEBOES,<sup>¶</sup> OLIVIER KLEIN,<sup>†</sup> NADINE ECTORS,<sup>¶</sup> ANTOINE CORTOT,<sup>†</sup> MONIQUE CAPRON,\* and JEAN-FRÉDÉRIC COLOMBEL<sup>†</sup>

\*Centre d'Immunologie et Biologie Parasitaire, INSERM Unité U167, Institut Pasteur, Lille, France; †Clinique des Maladies de l'Appareil Digestif, Hôpital Claude Huriez, Centre Hospitalier Universitaire, Lille, France; ‡Service de Chirurgie Adulte Ouest, Hôpital Huriez, Centre Hospitalier Universitaire, Lille, France; §INSERM Unité U131, Institut Paris Sud sur les Cytokines, Clamart, France; and †Department of Pathology, University of Leuven, Leuven, Belgium

**Background & Aims:** Chronic intestinal lesions of patients with Crohn's disease (CD) are associated with a T helper (Th) 1-type cytokine profile, including high levels of interleukin 2 (IL-2) and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). However, the mechanisms involved in the pathogenesis of the early mucosal lesions are poorly known. The aim of this study was to examine the pattern of Th1- and Th2-type (IL-4, IL-5, and IL-13) cytokines in the early ileal lesions occurring in patients with CD 3 months after ileal resection and ileocolonic anastomosis. Cytokines were also examined in the chronic ileal lesions to look for cytokine patterns related to disease progression. **Methods:** Ileal biopsy specimens were obtained from 17 patients with CD and 11 controls. Mucosal IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, and IL-13 messenger RNA (mRNA) was evaluated by competitive reverse-transcription polymerase chain reaction. **Results:** The early ileal lesions of patients with CD were associated with a significant increase of IL-4 mRNA and a decrease of IFN- $\gamma$  mRNA compared with the normal mucosa of patients with CD or controls. A Th1-type pattern was observed in the chronic ileal lesions. **Conclusions:** Divergent cytokine patterns are observed during different clinical stages of CD. These observations need to be considered in the development of newer specific therapeutic agents to prevent CD recurrences.

Crohn's disease (CD) is a chronic intestinal inflammatory disease characterized by multiple recurrences that may be endoscopic or clinical. The primary mechanisms leading to the initiation and perpetuation of the inflammatory processes in CD are poorly known. However, it is widely believed that disease initiation and pathogenesis are multifactorial, involving genetic predisposition, environmental factors such as bacterial agents, and dysregulation of the intestinal immune system.

One of the major regulatory mechanisms of the immune system is the control of the balance of cytokines. In the mouse, the T helper (Th) 1–Th2 model of immune

regulation was originally described among CD4<sup>+</sup> T-cell clones.<sup>1</sup> Mouse Th1 cells produce interleukin (IL)-2 and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), whereas Th2 cells produce IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13. The same dichotomy was subsequently applied to human T cells.<sup>2</sup> However, because these immunoregulatory cytokines can be produced by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> polyclonal T cells and also by non-T cells, a more simple classification into type 1 and type 2 has been proposed to refer to either of the full cytokine patterns defined by mouse T-cell clones.<sup>3</sup>

In the inflamed colonic mucosa of patients with CD, high levels of IL-2 and IFN- $\gamma$  consistent with a type-1 pattern have been demonstrated.<sup>4,5</sup> However, interpretation of the results of these studies is difficult for two main reasons: (1) the majority of patients received medical therapy, including 5-aminosalicylate, steroids, or azathioprine; and (2) the evolutive stage of the disease was unknown. To provide more definitive data about the cytokine synthesis in the intestinal mucosa of patients with CD, careful consideration of the medical treatment, the anatomic location of biopsy specimens, especially the stage of the disease, should be taken into account. The multiple gut involvement in patients with CD who have not undergone surgery makes it difficult to easily analyze the early pathological events leading to the inflammatory process. Endoscopic recurrences after radical surgery for CD is one of the best situations for studying the pathogenesis of initial lesions of CD. In a series of 89 patients studied 1 year after ileal resection and ileocolic anastomosis, Rutgeerts et al.<sup>6</sup> found a 73% rate of endoscopic ileal recurrences. The mechanisms involved in the induction and the pathogenesis of these early ileal lesions are poorly known, but it has been pointed out that eosinophilic

**Abbreviations used in this paper:** dNTP, deoxynucleoside triphosphate; IFN- $\gamma$ , interferon gamma; IL, interleukin; PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcription; Th, T helper.

© 1997 by the American Gastroenterological Association  
0016-5085/97/S3.00



Circulating GRO $\alpha$  contributes to neutrophil priming and IL-8 directed mucosal recruitment into chronic lesions of patients with Crohn's disease.

Eric Brandt<sup>1</sup>, Heide Müller-Alouf<sup>1</sup>, Pierre Desreumaux<sup>1,2</sup>, Gaëtane Woerly<sup>1</sup>, Jean-Frédéric Colombel<sup>2</sup> and Monique Capron<sup>1</sup>.

1: Unité INSERM U167, Institut Pasteur de Lille, France

2: Laboratoire de Recherche sur les Maladies Inflammatoires Intestinales (CRI 4U004B), CHRU de Lille, France

SHORT TITLE : Neutrophil priming in Crohn's disease.

Keywords : Crohn's disease, Interleukin-8, GRO alpha, Chemotaxis, Neutrophil, Priming.

Correspondence: Dr Monique Capron, Unité INSERM U167, Institut Pasteur de Lille,  
BP 245, 59019 Lille Cedex, France.

E-mail : monique.capron@pasteur-lille.fr

Fax: (33).03.20.87.78.88.

## ABSTRACT

Crohn's disease (CD) lesions are characterized by an important neutrophilic infiltrate associated with enhanced mucosal IL-8, contrasting with low serum IL-8 levels. The aim of this study was to investigate the effects of circulating GRO $\alpha$  and IL-8 on neutrophil priming and migration. The expression of surface molecules involved in rolling (CD62L, CD15) and firm adhesion (Mac-1 and LFA-1) to endothelial cells were assessed by flow cytometry, while the chemotactic response of PMN to IL-8 and to fMLP was investigated in a Boyden chamber assay. In addition, IL-8 and GRO $\alpha$  levels were determined by ELISA in plasma samples and in culture supernatants of purified polymorphonuclear neutrophils (PMN) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with CD or healthy blood donors.

This study reveals an upregulation of CD11b (Mac-1) membrane expression on circulating PMN from patients with CD, as assessed by the mean fluorescence intensity which reflects antigen density. Furthermore, towards both fMLP and IL-8 an enhanced chemotactic response of PMN from CD patients was observed. Despite often undetectable levels of circulating IL-8, all plasma samples were positive for GRO $\alpha$ , with a significant increase in CD patients when compared to donors. In vitro, equivalent concentrations of GRO $\alpha$  were able to increase the IL-8 driven chemotaxis of PMN.

In conclusion, blood PMN of patients with CD showed an enhanced capacity to be recruited into inflamed intestinal mucosa, which could be due to an increased expression of CD11b (Mac-1) as well as an increased chemotactic response toward fMLP or IL-8. This priming effect of PMN in CD may partly occur through elevated circulating GRO $\alpha$  levels.

