



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**  
**Claire Rolland-Fourcade**

le 3 Novembre 2017

**Titre :**

Les protéases et leurs inhibiteurs sécrétés par la cellule épithéliale :  
acteurs de l'inflammation et de la douleur

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Physiopathologie

**Unité de recherche :**

IRSD - U1220

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Dr Céline Deraison  
Dr Nathalie Vergnolle

**Jury :**

Dr Emmanuelle Maguin - Rapporteur  
Dr Michel Chignard - Rapporteur  
Dr Christophe Altier - Examinateur  
Pr Denis Hudrisier - Président



## RESUMES :

Les protéases sont impliquées dans de nombreux processus biologiques et ont des origines très variées (cellules immunitaires, cellules épithéliales...). Leur activité est régulée par des inhibiteurs de protéases. Cette étude s'intéresse à la balance entre les protéases épithéliales et leurs inhibiteurs dans le contexte de pathologies affectant l'intégrité de l'épithélium intestinal. Les conséquences d'un déséquilibre de la balance protéolytique ont été étudiées dans deux maladies chroniques aux composantes différentes, les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) (cycles de poussées inflammatoires) et le Syndrome du Côlon Irritable (SCI) (cycles de douleur).

La muqueuse colique de patients atteints de SCI sécrète une activité de type trypsine dont l'origine et les fonctions sont mal définies. Cette étude s'intéresse à la source de cette activité trypsique dans le côlon des patients atteints de SCI, sa nature et son rôle dans l'activation neuronale. L'activité trypsique chez les patients atteints de SCI est augmentée majoritairement dans les cellules épithéliales (CEI). La stimulation de monocouches de cellules épithéliales avec du LPS ou de l'épinéphrine induit une augmentation de la quantité de trypsine-3 et de sa sécrétion au pôle basal de la cellule épithéliale stimulée, en corrélation avec une augmentation de l'activité trypsique. L'hyperactivité de la trypsine-3 au pôle basal entraîne une perte de la fonction barrière de l'épithélium, anomalie retrouvée aussi chez les patients atteints de SCI. De plus, nous avons mis en évidence que la trypsine-3 est capable d'activer les neurones humains myentériques et les neurones sensitifs murins. *In vivo*, son administration intra-rectale à des souris induit une hypersensibilité viscérale dépendante du récepteur PAR2 (Protease Activated Receptor-2). Ainsi, les cellules épithéliales intestinales des patients atteints de SCI produisent et sécrètent de la trypsine-3 spécifiquement au pôle basal. Cette activité trypsique active des neurones sensitifs, participant à l'hypersensibilité viscérale, symptôme majeur dont souffrent les patients atteints de SCI.

Les pathologies inflammatoires peuvent aussi être source d'un dérèglement protéolytique. Les patients atteints de MICI présentent une dérégulation de la balance élastolytique colique. Notre équipe a montré que l'apport d'ELAFINE (un inhibiteur d'élastase) par la bactérie génétiquement modifiée *L.lactis* au contact de la muqueuse inflammatoire protège les souris traitées en réduisant l'inflammation intestinale. Cependant les mécanismes protecteurs médiés par L'Elafine restent encore à déterminer. L'ELAFINE est un inhibiteur d'élastases mais possède aussi des propriétés antimicrobiennes. Afin de mettre en lumière quelles fonctions de L'Elafine portent les propriétés anti-inflammatoires des mutants de L'Elafine ont été générés et insérés dans la bactérie *L.lactis*: une mutation pour annuler sa fonction inhibiteur de protéase, un second mutant de son domaine antimicrobien et un dernier mutant ayant perdu ces 2 fonctions. Dans des monocouches de cellules intestinales épithéliales, l'apport d'ELAFINE protège de l'inflammation médiée par un déséquilibre de l'activité élastolytique : on observe une restauration de la fonction barrière de l'épithélium et une diminution des cytokines pro-inflammatoires (CXCL8 et IP10). La mutation du domaine antimicrobien n'affecte pas ces propriétés. Cependant, l'absence de la boucle inhibitrice annihile les propriétés anti-inflammatoires de L'Elafine.

Ces travaux ont pu mettre en évidence l'importance de l'équilibre protéolytique au sein de la cellule épithéliale dans les pathologies intestinales. La balance entre les protéases et leurs inhibiteurs joue donc un rôle dans l'homéostasie épithéliale et les pathologies inflammatoires.

Proteases are involved in some biologic processes and their origins are variable (immune cells, epithelial cells...). Their activity is regulated by antiproteases. This study investigates the balance between proteases and their inhibitors in pathologies which modify epithelium integrity. Consequences of an unbalance in proteolytic activity was studied in two chronic pathologies with different components: Inflammatory Bowel Disease (IBD) (cycles of inflammatory boost) and Irritable Bowel Syndrome (IBS) (cycles of pain symptoms).

Colonic mucosa from IBS patients releases trypsin activity. The origin and the functions of this activity are not well defined. This study investigated the source of this trypsin activity in the colon of IBS patients, its nature and its role in neuronal activation. Trypsin activity from IBS patients is increased mostly in epithelial cells. Stimulation of epithelial cell monolayers with LPS or epinephrine induces an increase of trypsin-3 quantity and its secretion specifically in the basal side of epithelial cells. This is in correlation with the increase of trypsin activity. Trypsin-3 hyperactivity at the basal side provokes a loss of epithelium barrier function, which is also found in colons of IBS patients. Then, we have highlighted that trypsin-3 is able to activate human myenteric neurons and murine sensitive neurons. *In vivo*, its intra-rectal administration to mice induces a visceral hypersensitivity dependent of PAR2 (Protease Activated Receptors 2). Thus, intestinal epithelial cells from IBS patients produce and release trypsin-3 specifically on their basal side. This trypsin activity activates sensitive neurons which participate to visceral hypersensitivity, a major symptom of IBS patients.

Inflammatory pathologies could be a source of proteolytic malfunction. IBD patients have a dysregulation of elastolytic balance in the colon. Our team has shown that ELAFIN (an elastase inhibitor) delivered by the bacteria genetically modified *L.lactis* near the inflamed mucosa, protects mice from intestinal inflammation. However, the protective mechanisms induced by ELAFIN need to be investigate. ELAFIN is an elastase inhibitor but have also antimicrobial properties. With the aim to highlight what function of ELAFIN owns anti-inflammatory properties, mutants of ELAFIN have been generated and were inserted into *L.lactis*: a first mutant lacked its antiprotease function, a second lacked antimicrobial properties and a last mutant lacked both properties. In intestinal epithelial monolayers, ELAFIN delivered by *L.lactis* protects against inflammation: a restauration of epithelial barrier function and a decrease of pro-inflammatory cytokines (CXCL8 and IP10) are observed. Mutation of antimicrobial domain doesn't affected these properties. Nevertheless, the absence of inhibitory loop annihilates anti-inflammatory functions of ELAFIN.

This work highlights the importance of proteolytic balance inside the epithelial cell in intestinal pathologies. The balance between proteases and antiproteases plays an important role in epithelial homeostasis.



« On ne voit bien qu'avec le cœur. L'essentiel est invisible pour les yeux. »  
*Le Petit Prince* (1943), Antoine de Saint-Exupéry



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes 2 encadrantes de thèse. Merci Nathalie de m'avoir accueillie dans ton équipe et de m'avoir donné l'opportunité de faire une thèse. Tu m'as montré ce qu'était la vraie recherche scientifique. Merci Céline d'avoir été une encadrante toujours présente et à l'écoute.

Merci Afi de m'avoir donné ma chance en M1, et de m'avoir donné le goût de la recherche.

Merci à tous les membres de l'équipe, passé et présent de votre disponibilité, de votre aide et de m'avoir tant appris pendant ces 4 années. Hélène, Emilie, Anissa, Guylène, Cathy, Tereza, Perrine et Céline, pour tout ce que vous m'avez appris tant scientifiquement que humainement. Cléo, Morgane, Alex, Erick, Raph, Julien, pour votre bonne humeur.

A la M2 Team, merci pour tous ces supers moments partagés pendant ces 4 années de thèse, enfin mon tour de soutenir !

A ma stagiaire (oui Audrey, même quand tu auras ton prix Nobel, tu seras toujours ma petite stagiaire), merci d'avoir été une étudiante aussi brillante et de m'avoir permis d'apprendre à encadrer, et merci d'être à présent une amie.

Nuria, Carla, thank you for being present for this end of thesis, for having supported me so much in recent months. Carla, thank you making me laugh with your grasshopper, your fish and your capillary habits. Nuria, courage for the rest, the end has never been so close. You will soon find your way.

A ma famille, ma belle-famille et mes amis, merci pour votre soutien qui m'a permis d'avancer et de faire mes choix.

A ma fille, mon mari et MiniNous qui arrive, vous êtes ma vie, je vous aime.



## Table des matières

<b>ABREVIATIONS</b> .....	13
<b>Index des figures et tables</b> .....	17
<b>INTRODUCTION</b> .....	19
<b>CHAPITRE 1</b> :.....	21
<b>Composition et fonctions de l'intestin</b> .....	21
1- L'intestin .....	22
- L'intestin grêle.....	22
- Le côlon .....	22
2- L'épithélium intestinal .....	24
a) Composition et organisation de l'épithélium intestinal .....	24
- Les cellules souches.....	25
- Les cellules différenciées.....	26
b) La fonction barrière de l'épithélium intestinal.....	28
- Les jonctions cellulaires.....	29
- Le mucus .....	30
c) Sa fonction d'absorption.....	32
d) Sa fonction de sécrétion.....	32
3- Le microbiote intestinal.....	34
a) La composition du microbiote intestinal .....	34
b) Fonctions de la flore intestinale .....	35
- Digestion .....	35
- Intégrité de la barrière intestinale .....	36
- Education du système immunitaire .....	36
c) Notion de bactéries probiotiques .....	37
- Probiotiques et cellules épithéliales .....	39
- Les bactéries lactiques .....	40
4- Le système nerveux entérique .....	40
a) L'innervation intrinsèque .....	41
b) L'innervation extrinsèque.....	42
c) Rôles .....	44
d) Communication avec la cellule épithéliale .....	44
<b>CHAPITRE 2</b> :.....	46
<b>L'inflammation et la douleur dans l'intestin</b> .....	46
1- Le système immunitaire de l'intestin .....	46

a)	L'épithélium intestinal : première barrière de l'immunité .....	46
-	La barrière épithéliale .....	46
-	Les sécrétions des cellules épithéliales .....	49
b)	Le « Gut Associated Lymphoid Tissue » .....	51
c)	Les cellules immunitaires intestinales résidentes.....	53
-	Les lymphocytes T intraépithéliaux.....	53
-	Les cellules lymphoïdes innées.....	54
-	Les cellules dendritiques.....	54
-	Les macrophages résidents .....	54
d)	Les cellules immunitaires intestinales inflammatoires circulantes .....	55
-	Les neutrophiles .....	55
-	Les macrophages .....	55
-	Les basophiles, mastocytes et éosinophiles.....	56
-	Les lymphocytes .....	56
2-	La réponse inflammatoire intestinale .....	57
a)	Le rôle central de l'épithélium intestinal .....	57
-	La reconnaissance des antigènes luminaux.....	57
-	Régulation des cellules immunitaires .....	61
-	Le facteur de transcription NFkB.....	62
b)	La réponse inflammatoire.....	64
-	La phase vasculaire.....	64
-	La phase cellulaire .....	66
-	La phase de résolution .....	67
3-	La douleur viscérale .....	68
a)	Définition.....	68
b)	Les nocicepteurs de la douleur viscérale .....	70
-	Les récepteurs impliqués dans la douleur viscérale.....	70
-	L'activation des nocicepteurs .....	71
-	Les fibres afférentes .....	72
-	Transmission d'informations .....	73
-	Communication des nocicepteurs avec le SNC .....	73
c)	Les médiateurs de la douleur .....	74
d)	Mesure de la douleur viscérale .....	75
	<b>CHAPITRE 3 :</b> .....	<b>77</b>
	<b>MICI et SCI : pathologies intestinales impliquant inflammation et douleur</b> .....	<b>77</b>
1-	Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin .....	77

a)	Aspects cliniques .....	77
-	La Maladie de Crohn.....	77
-	La rectocolite hémorragique.....	78
-	Manifestations extra-intestinales .....	80
b)	La physiopathologie .....	81
-	La rupture de la barrière épithéliale.....	81
-	Les facteurs immunologiques.....	81
-	La dysbiose .....	82
-	La douleur .....	83
c)	Etiologies .....	84
-	Age/sexe/localisation.....	84
-	Facteurs génétiques .....	85
-	Facteurs environnementaux .....	87
d)	Les modèles animaux.....	88
-	Colite induite par le Dextran Sodium Sulfate .....	88
-	Colite induite par le trinitrobenzène sulfonique.....	89
e)	Les thérapies .....	90
-	5-Aminosalicylates .....	90
-	Les corticostéroïdes .....	91
-	Les antibiotiques .....	91
-	Les thiopurines.....	91
-	Methotrexate.....	92
-	Les inhibiteurs de calcineurine.....	92
-	Les anticorps dirigés contre le TNF $\alpha$ .....	92
-	La chirurgie.....	93
-	Autres thérapies .....	93
2-	Le Syndrome du Côlon Irritable.....	97
a)	Aspect clinique .....	97
b)	Physiopathologie .....	97
-	Rupture de la barrière épithéliale .....	98
-	Modification de la motricité intestinale.....	99
-	Hypersensibilité viscérale.....	100
-	Altération de l'axe cerveau-intestin : rôle du stress ?.....	100
-	Inflammation de bas grade.....	101
-	Dysbiose.....	102
c)	Etiologie .....	103

- Sexe et localisation.....	103
- - Facteurs génétiques.....	103
- Stress.....	104
- Hypersensibilité et intolérance alimentaire .....	104
d) Modèles animaux.....	105
- Les modèles de SCI post infectieux.....	105
- Le stress d'évitement passif de l'eau ou WAS .....	108
- L'injection de cortagine.....	108
e) Thérapies.....	109
- Les antispasmodiques .....	109
- Les antidépresseurs .....	109
- Les anti-diarrhéiques.....	110
- Laxatifs et accélérateurs de transit .....	110
- Modification du microbiote.....	111
- Psychothérapies.....	112
- Régimes et approches nutritionnelles .....	113
<b>CHAPITRE 4 :</b> .....	114
<b>Les protéases :</b> .....	114
<b>leur implication dans le SCI et les MICI</b> .....	114
1- Les protéases à sérine.....	114
a) Les élastases.....	115
- L'élastase du neutrophile .....	115
- L'élastase épithéliale.....	115
b) Les trypsines .....	116
- Les trypsines digestives : PRSS1 et PRSS2 .....	116
- La trypsine-3 : PRSS3.....	116
- Les trypsines dans les pathologies intestinales.....	118
c) La thrombine.....	119
d) Les tryptases, chymase et trypsines-like .....	120
e) La protéinase-3 .....	120
f) Les cathepsines .....	121
g) Les kallikréines .....	121
h) Les granzymes .....	122
i) Les Matriptases.....	122
j) Expression des protéases à sérine .....	123
k) Les protéases microbiennes.....	124



2-	Les inhibiteurs endogènes .....	125
a)	Les serpines .....	125
b)	Les inhibiteurs de type Kazal.....	127
c)	Les chélonianines .....	127
-	Le SLPI .....	127
-	L'ELAFINE .....	127
-	Structure .....	128
-	Fonctions .....	129
d)	Les inhibiteurs de protéases bactériennes.....	131
3-	Implication des protéases à sérine dans l'inflammation et la douleur .....	133
a)	Les récepteurs activés par les protéases (PARs) .....	133
-	Structure et classification.....	133
-	Le clivage des PARs .....	135
b)	Rôle dans la perméabilité épithéliale .....	138
-	Clivages des jonctions cellulaires.....	140
-	Modification de la barrière de mucus.....	140
-	Activation des PARs.....	140
c)	Rôle dans l'inflammation.....	141
-	Clivage des cytokines et chimiokines .....	141
-	Induction d'apoptose .....	141
-	Activation des PARs.....	141
d)	Rôle dans la douleur.....	143
	<b>HYPOTHESE GENERALE et</b> .....	147
	<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....	147
	<b>RESULTATS</b> .....	149
	PARTIE 1 :.....	151
	La trypsine-3 épithéliale :.....	151
	expression et fonction dans le SCI et les MICI .....	151
	<b>Contexte scientifique :</b> .....	151
	<b>Article:</b> Epithelial expression and function of Trypsin-3 in Irritable Bowel Syndrome .....	152
	<b>Résultats complémentaires</b> .....	153
	L'activité trypsique épithéliale des patients atteints de MICI est augmentée et plus particulièrement la trypsine-3 chez les patients atteints de RCH .....	153
	<b>Introduction</b> .....	153
	<b>Matériels et méthode</b> .....	153
	<b>Résultats</b> .....	154

<b>Discussion</b> .....	156
Partie 2 : .....	159
L'ELAFINE : molécule anti-inflammatoire au rôle pléiotropique .....	159
<b>Contexte scientifique</b> : .....	159
La fonction inhibitrice de protéase de L'Elafine est nécessaire à son rôle anti-inflammatoire dans la cellule épithéliale.....	161
<b>Introduction</b> .....	161
<b>Matériels et méthode</b> .....	163
<b>Résultats</b> .....	167
<b>Discussion</b> .....	177
<b>Bibliographies</b> .....	182
<b>DISCUSSION</b> .....	185
1- La cellule épithéliale au cœur des pathologies intestinales.....	188
a) Régulation fine de l'activité protéolytique .....	188
b) Actions directes des protéases et de leur inhibiteur sur les cellules épithéliales	189
2- Les protéases et leurs inhibiteurs sont en interaction perpétuelle avec leur environnement .....	193
a) Les cellules immunitaires.....	193
b) Les cellules neuronales .....	195
c) Le microbiote .....	196
d) Les cellules endothéliales.....	197
3- Les inhibiteurs de protéases : vers un développement de nouvelles thérapeutiques ?.....	201
a) Le potentiel thérapeutique de L'ELAFINE dans la bactérie probiotique <i>L.lactis</i>	202
b) Développement d'un inhibiteur spécifique de la trypsine-3 .....	203
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	205
<b>ANNEXE</b> .....	206
<b>REFERENCES</b> .....	209

# ABREVIATIONS

5-ASA : 5-AminoSalicylate

6-MP : 6-MercaptoPurine

Ac : Anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

Ag : Antigène

AGCC : Acide Gras à Chaine Courte

AIEC : *E. coli* adhérente et Invasive

AP-1 : Activator Protein 1

ARN : acide ribonucléique

ATCH : hormone adrénocorticotropine

AZA : Azathiopurine

BAFF : B-cell activating Protein

hBD : human Beta Defensine

BCR : B- Cell Receptor

BSA: Bovine Serum Albumin

CBA: Cytometric Bead Assay

CBC : Crypt Base Columnar

CD : Cellules Dendritiques

CEI : Cellules Epithéliales Intestinales

CGRP : Calcitonin Gene Related Peptide

CLI : Cellules Lymphoïdes Innées

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

COX : Cyclo-OXygénase

CRF : Corticotropin Release Factor

CXCL : C-X-C motif ligand

DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole

DO: Densité Optique

DPI : Dipeptidyl peptidase I

DRG : Dorsal Root Ganglia

DSS : Dextran Sodium Sulfate

EAEC : *E. coli* EntéroAgrégative

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor  
EN : Elastase du Neutrophile  
EpCAM : Epithelial cell adhesion molecule  
IFN $\gamma$  : Interféron  $\gamma$   
FITC : isothiocyanate de fluorescéine  
FLI : Follicules Lymphoïdes Isolés  
GLP-2 : Glucagon Like Peptide 2  
HR : Histamine Receptors  
HPA : Hypothalamo-Pytuitaire-Adrénérrique  
HV : Hypersensibilité Viscérale  
Ig : Immunoglobuline  
IL : Interleukine  
IPAN : Intrinsic Primary Afferent Neuron  
GALT : Gut Associated Lymphoid Tissues  
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein  
GM-CSF : Macrophage Colony Stimulating Factor  
GRAS : Generally Recognized As Safe  
GSNO : Glial derived S-Nitrosoglutathione  
GWAS : Genome Wide Association Study  
*L. lactis* : *Lactococcus lactis*  
LPS : LipoPolySaccharide  
LRC : Labels Retaining cells  
LTi: Lymphocytes T intraépithéliaux  
MC: Maladie de Crohn  
MDP: MuramylDiPeptide  
MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin  
MLCK : Myosine Like Chain Kinase  
MPO : MyeloPérOxidase  
NF $\kappa$ B : Nuclear Factor kappa B  
NGF: Nerve Growth Factor  
NK : Natural Killer  
NLR : NOD Like Receptor  
NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain

PAM : Peptides AntiMicrobiens  
PAMP's : Pathogen Associated Molecular Patterns  
PAR : Proteases Activated Receptors  
PGE2 : ProstaGlandine E2  
PLA<sub>2</sub> : PhosphoLipase A2  
PR-3 : Protéinase-3  
PP : Plaque de Peyer  
PRR : Pattern Recognition Receptors  
PSTI : Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor  
RANTES : Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted  
RCH : RectoColite Hémorragique  
RELM $\beta$  : Resistin Like Molecule  $\beta$   
ROS : Reactive Oxygen Species  
RVM : Réponse Viscéro-Motrice  
SBTI : SoyBean Trypsin Inhibitor  
SCI : Syndrome du Côlon Irritable  
SCI PI : Syndrome du Côlon Irritable Post-Infectieux  
SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency  
SLPI : Secretory Leukocyte Protease Inhibitor  
SNC : Système Nerveux Central  
SNE : Système Nerveux Entérique  
SPINK1 : Serine Protease Inhibitor Kazal type 1  
SPRP2A : Small Proline Rich Protein 2A  
TCR: T- Cell Receptor  
TFF : TreFoil Factor  
TGF $\beta$  : Transforming Growth Factor  $\beta$   
Th : T helper  
TLR : Toll Like Receptors  
TNBS: acide 2, 4, 6 TriNitroBenzène Sulfonique  
TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
Treg: T régulateur  
TRP: Transient Receptor Potencial  
TSLP: Thymic Stromal LymphoPoeitin

VIH: Virus d'Immunodéficience Humaine

WAP: Whey Acid Protein

WAS: Water Avoidance Stress

ZO-1: Zonula Occludens 1

# **Index des figures et tables**

Figure 1 : **Le système digestif humain**

Figure 2 : **Le tube digestif est composé de différentes couches**

Figure 3 : **Représentation schématique de l'axe crypte-villosité**

Figure 4 : **Représentation schématique de l'épithélium et des cellules immunitaires**

Figure 5 : **Anatomie de la barrière épithéliale : les jonctions cellulaires**

Figure 6 : **La barrière de mucus**

Figure 7 : **Distribution du microbiote intestinal**

Figure 8 : **Mécanisme d'actions des probiotiques dans l'intestin**

Figure 9 : **Organisation du SNE**

Figure 10 : **Innervation extrinsèque du tractus gastro-intestinal**

Figure 11 : **Représentation du complexe jonctionnel apical à la surface intracellulaire de 2 cellules épithéliales**

Figure 12 : **Les principaux peptides antimicrobiens humains**

Figure 13 : **Le GALT**

Figure 14 : **La reconnaissance des motifs antimicrobiens induit une réponse adaptée des CEI**

Figure 15 : **La voie d'activation de NFκB**

Figure 16 : **Recrutement des leucocytes au site d'infection**

Figure 17 : **Innervation spinale du tractus gastro-intestinal**

Figure 18 : **Anatomie de la voie de la douleur**

Figure 19 : **Examen anatomopathologique de colon de patients atteints de MICI**

Figure 20 : **Manifestations extra-intestinales fréquentes des MICI**

Figure 21 : **Carte de l'incidence des MICI dans le monde**

Figure 22 : **Loci spécifiques de la MC et de la RCH**

Figure 23 : **Mécanismes inflammatoires mis en jeu lors de colites induites chez la souris**

Figure 24 : **Algorithme des traitements pour la MC**

Figure 25 : **Algorithme des traitements pour la RCH**

Figure 26 : **La physiopathologie du SCI**

Figure 27 : **Mécanisme d'actions des traitements utilisés pour améliorer les symptômes des patients atteints de SCI**

Figure 28 : **Structure du site actif de la Trypsine-3**

Figure 29 : **Les protéases à sérine du neutrophile dans l'inflammation**

Figure 30 : **Description et fonctions associées aux principales serpins humaines**

Figure 31 : **Représentation de la Trappin-2**

Figure 32 : **Effets pléiotropiques de L'Elafine**

Figure 33 : **Activation des PARs, peptides activateurs, localisation et phénotype des souris déficientes**

Figure 34 : **Mécanismes de signalisation des PARs**

Figure 35 : **Les voies de signalisation cellulaire après l'activation du récepteur PAR1**

Figure 36 : **Activation de PAR2 dans les cellules immunitaires et ses différents effets**

Figure 37 : **Rôle des PARs dans la nociception**

Table 1 : **Modulation par les probiotiques des voies de signalisation dans les cellules épithéliales intestinales**

Table 2 : **Rôle des PRR dans la régulation des CEI et dans l'homéostasie tissulaire**

Table 3 : **Force et faiblesse des modèles animaux du SCI PI**

Table 4 : **Localisation et conditions d'expression des protéases à sérine**

Table 5 : **Inhibiteur de protéases à sérine d'origine microbienne**

Table 6 : **Les protéases à sérine affectent la barrière épithéliale**



# **INTRODUCTION**



# CHAPITRE 1 :

## Composition et fonctions de l'intestin

Le système digestif inclut le tractus gastro-intestinal et les organes de la digestion (les glandes salivaires, le foie, le pancréas et la vésicule biliaire) (Figure 1). Sa fonction essentielle est d'ingérer et de digérer les aliments, absorber l'eau et les nutriments (protéines, vitamines, acides gras, minéraux et carbohydrates) et d'éliminer les déchets.

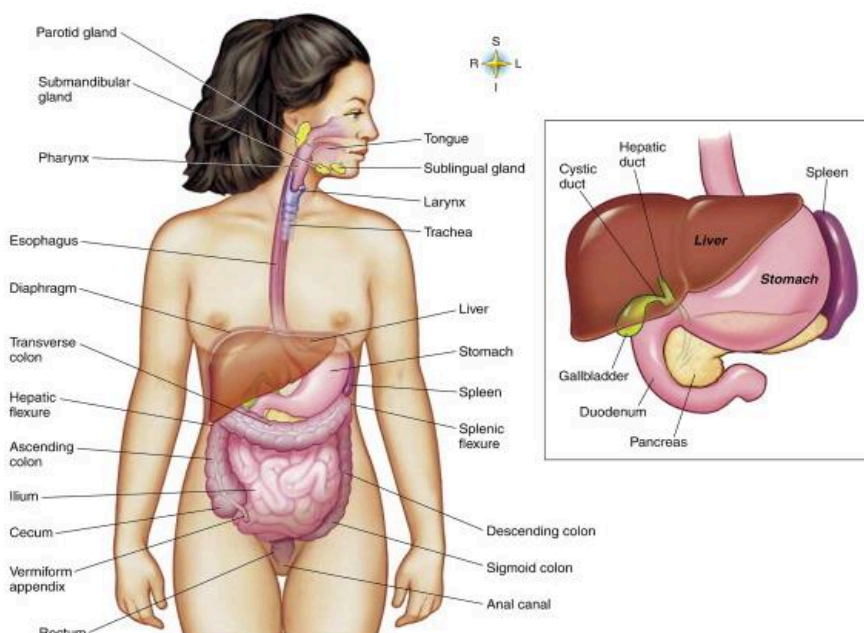


Figure 1. The location of organs of the digestive system. (Reprinted with permission.<sup>1</sup>)

Figure 1 : **Le système digestif** (Reed and Wickham, 2009)

Le tractus gastro-intestinal est en contact constant avec le milieu extérieur via l'alimentation que nous ingérons chaque jour. Cet apport extérieur contient de nombreuses bactéries inoffensives mais aussi des organismes pathogènes ainsi que des allergènes. Afin d'éviter la pénétration de ces micro-organismes dans la muqueuse, les organes digestifs et notamment le tube digestif ont mis en place différentes barrières biologiques (mucus, épithélium imperméable), mais aussi différents moyens de détecter

et de lutter contre les agressions du milieu extérieur (système immunitaire, système nerveux) (Schulze, 2015).

Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous focaliser sur une partie de ce système digestif : l'intestin, sujet de notre étude

## 1- L'intestin

### - L'intestin grêle

La digestion et la majorité de l'absorption des nutriments se fait dans l'intestin grêle. L'intestin grêle (ou petit intestin), se compose du duodénum, jéjunum et de l'iléon et mesure environ 730 cm de long. Le duodénum débute par la valve pylorique se termine par la valve iléo-caecale qui contrôle le flux du chyme depuis l'iléon vers le côlon.

Après son passage dans l'estomac, le chyme entre en contact avec les enzymes pancréatiques et intestinales, les sels biliaires et continue sa digestion dans le duodénum. Le chyme est ralenti par les plis intestinaux (villosités) ce qui augmente le temps d'absorption. Les villosités (structures macroscopiques) et microvillosités présentes sur les entérocytes (cellules absorbantes de l'épithélium intestinal) permettent une importante augmentation de la surface d'absorption. Chaque vilus possède une artériole, une veinule et un canal lymphatique qui absorbent et transportent les nutriments.

Le sang qui irrigue l'intestin grêle provient des artères mésentériques supérieures et gastroduodénales. Une fois chargé des nutriments apportés par la digestion, le sang est transporté de l'intestin vers le foie par la veine porte hépatique.

### - Le côlon

Le côlon (ou gros intestin) mesure environ 152 cm chez l'Homme et se compose du caecum, de l'appendice, du côlon, du rectum et du canal anal. Le chyme passe de l'iléon au caecum, par la valve iléocæcale puis dans le côlon. L'appendice est une projection attachée au caecum. Le côlon est composé de 4 sections : le côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde. Le rectum constitue les 20 derniers centimètres du côlon puis se termine par le canal anal qui s'ouvre sur l'extérieur sur l'anus. Deux sphincters (volontaire externe et involontaire interne) contrôlent la libération des fèces par l'anus.

La principale fonction du côlon est de réabsorber l'eau. Le péristaltisme est ralenti afin d'augmenter la réabsorption.

- Organisation tissulaire du tube digestif

Le tube digestif est organisé en différentes couches (Figure 2), ayant chacune une composition cellulaire et une fonction différente.

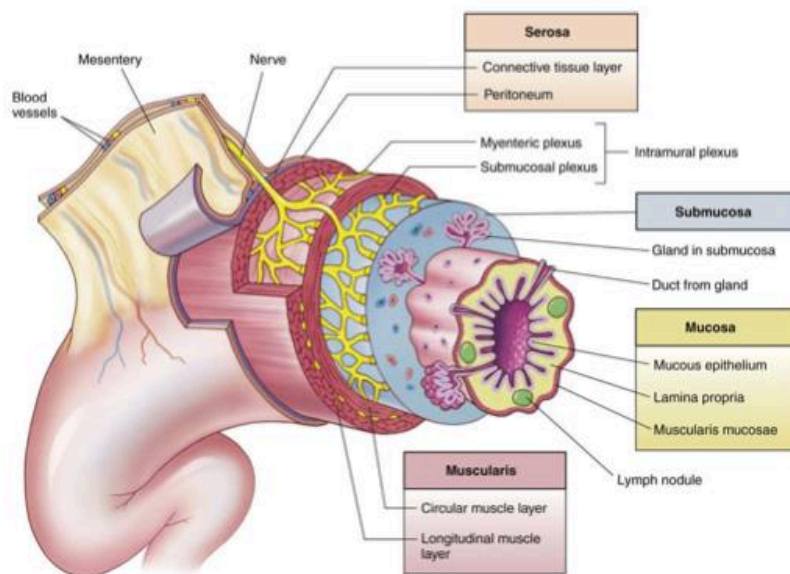


Figure 2 : **L'intestin est composé de différentes couches** (Reed and Wickham, 2009)

La composition du tube digestif en séreuse, musculuse, sous-muqueuse, et muqueuse

**La séreuse** : couche externe de l'intestin, est composée d'un épithélium squameux. La séreuse est reliée à la musculuse par le plexus myentérique.

**La musculuse** : possède 2 types de muscles lisses, des muscles circulaires et longitudinaux. Ils permettent la contraction du tube digestif. La musculuse est reliée à la sous-muqueuse par le plexus sous-muqueux. Les deux plexi forment un réseau de nerfs permettant principalement la contraction musculaire et le péristaltisme intestinal.

**La sous-muqueuse** : contient les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

**La muqueuse** : se compose de la musculature-muqueuse, de la *lamina propria* et de l'épithélium. L'épithélium intestinal est organisé par des structures de type villosités et crypte. La *lamina propria* possède des vaisseaux sanguins et lymphatiques qui transportent les produits de digestion, les hormones sécrétées par l'épithélium et les cellules immunitaires en cas d'inflammation. La *lamina propria* est aussi composée d'un système immunitaire très développé permettant une protection de l'organisme contre les pathogènes de la lumière intestinale.

La suite de ce chapitre se focalise sur l'épithélium intestinal, le microbiote ainsi que sur l'innervation du côlon qui constituent les éléments abordés dans le cadre de notre étude.

## 2- L'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal couvre une surface d'environ 400 m<sup>2</sup> et requiert 40% de l'énergie produite par le corps. La barrière épithéliale permet de prévenir les pertes d'eau, d'électrolytes et l'entrée des pathogènes (parasites ou microorganismes) dans l'organisme. L'épithélium a aussi pour fonction d'absorber les nutriments du bol alimentaire et d'échanger de nombreuses molécules avec le microbiote. De plus, l'épithélium est en perpétuel renouvellement afin de maintenir son intégrité et ses propriétés, cela évite aussi l'accumulation de mutations. En effet, des mutations qui surviendraient dans des cellules en cours de différenciation ne seraient pas maintenues car ces cellules ne se divisent plus et deviennent apoptotiques en haut de la crypte. Toutes ces fonctions sont possibles grâce à une organisation et des fonctions spécifiques de l'épithélium intestinal.

### a) Composition et organisation de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est formé d'une succession de cryptes et de villosités. Cette architecture particulière est mise en place lors du développement embryonnaire. Dans l'intestin grêle, l'épithélium forme des invaginations appelées cryptes contenant les cellules souches et des villosités formées par les cellules différenciées. Au niveau du côlon, on observe toujours des cryptes contenant des cellules souches mais la surface de l'épithélium différencié est plate et ne présente pas de villosités.

Il y a un renouvellement permanent de l'épithélium (toutes les 3 à 5 jours environ), qui est possible grâce à la présence de cellules multipotentes capables de proliférer (Wright, 2000) et de cellules apoptotiques en haut de la villosité (intestin grêle) et de la cryptes (côlon). Il existe donc un compartiment de cellules proliférantes dans le fond de la crypte (à l'exception de quelques cellules différenciées produisant des peptides antimicrobiens) et un autre compartiment de cellules différenciées sur le haut de la crypte (côlon) et dans la villosité (intestin grêle).

- Les cellules souches

Il existe différentes populations de cellules « souches » intestinales au fond des cryptes comme on peut le voir sur la Figure 3. Les cellules les plus immatures sont en position 1 à 4 du fond de la crypte et sont nommées CBC (pour Crypt Base Columnar) (Cheng and Leblond, 1974). Ce sont des cellules multipotentes, possédant le marqueur LGR5, et capables de générer toutes les cellules différenciées de l'épithélium (Barker et al., 2007) (Sato et al., 2009). Au niveau +4 de la crypte, on trouve les cellules LRC (Labels Retaining cells) qui sont quiescentes et auraient un rôle de réservoir (Scoville et al., 2008). Elles possèdent le marqueur BMI1 et sont capables de reconstituer le pool de cellules Lgr5<sup>+</sup> (Tian et al., 2011). Au-dessus de ces cellules se trouvent des cellules en cours de différenciation qui remontent l'axe crypto-villositaire.

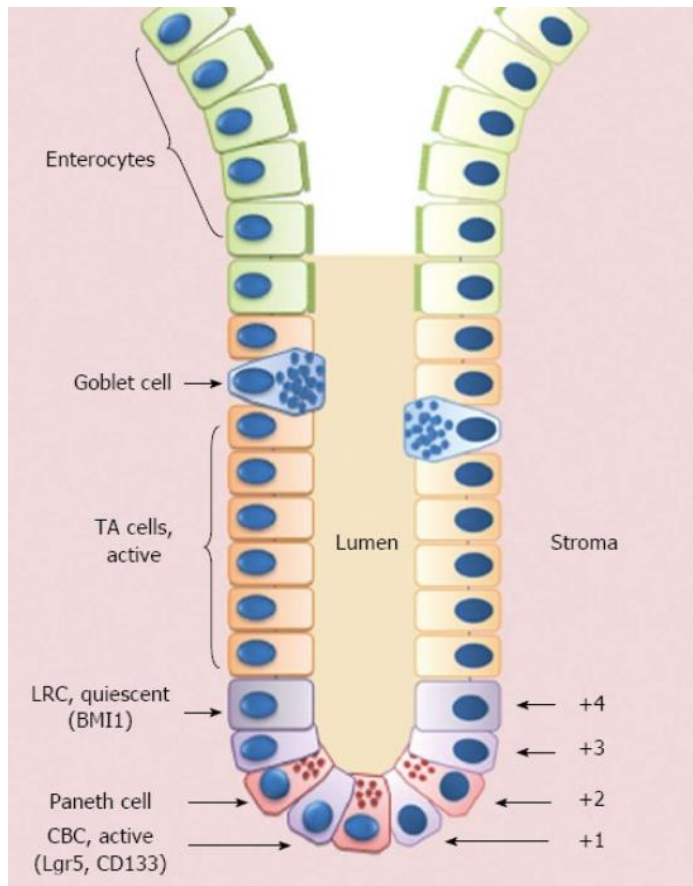


Figure 3 : **Représentation schématique de l'axe crypte-villosité** (Piscaglia, 2014).

Les cellules épithéliales intestinales résident à la base des cryptes, entre les cellules de Paneth, comme CBC ou en position +4 comme LRC. Les cellules souches deviennent des cellules amplificatrices, capables de migrer et de mûrir progressivement le long de la crypte, perdant leur capacité proliférative afin de devenir des cellules différenciées de l'épithélium

- Les cellules différenciées

Les cellules se différencient le long de l'axe crypto-villositaire. Il existe principalement 2 types de cellules, les cellules absorbantes et des cellules sécrétrices. La diversité des cellules épithéliales est représentée dans la Figure 4.



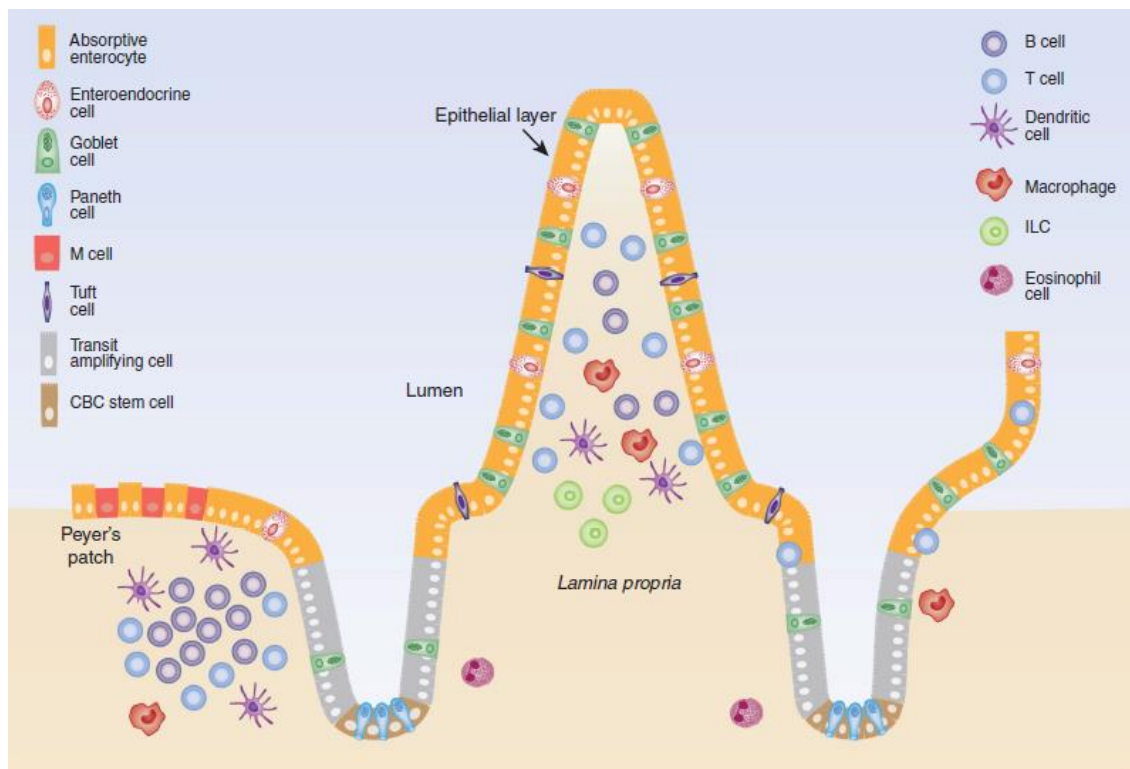


Figure 4: **Représentation schématique de l'épithélium et des cellules immunitaires.**  
(Gerbe and Jay, 2016)

Les cellules des cryptes contiennent les cellules souches et des progéniteurs qui migrent dans le compartiment de cellules amplificatrices. Les villosités de l'épithélium contiennent uniquement des cellules différenciées comprenant les entérocytes, les cellules à mucus, les cellules entéroendocrines et les cellules Tuft. Le compartiment de la *lamina propria* contient les différents types de cellules hématopoïétiques.

**Les entérocytes :** ce sont les cellules les plus abondantes de l'épithélium. Leur principale fonction est d'absorber les nutriments du bol alimentaire à partir de leur pôle apical et de les transporter vers la circulation sanguine. Elles sont polarisées, leur noyau est en position basale, et elles possèdent des microvillosités à leur pôle apical permettant d'augmenter leur surface d'absorption (bordure en brosse). Ces cellules possèdent de nombreux senseurs (récepteurs couplés aux protéines G, Toll Like Receptors...) et transporteurs (au glucose par exemple), afin de détecter toutes les informations de la lumière et d'y répondre de manière efficace.

**Les cellules caliciformes :** (ou cellules à mucus) composent 10 à 15% de l'épithélium dans l'intestin grêle et jusqu'à 50% des cellules épithéliales coliques. Elles produisent et sécrètent du mucus dans la lumière intestinale.

**Les cellules entéro-endocrines** : ces sont des cellules rares dans l'épithélium (environ 1% des cellules épithéliales) et elles sont plutôt isolées. Elles permettent la production et la sécrétion d'une vingtaine d'hormones. Ces cellules peuvent produire de la sérotonine (Crowell, 2004), de l'histamine (Peterson and Artis, 2014) ou encore du CRF (Corticotropin-Releasing Factor) (Kawahito et al., 1994) qui permettent une communication avec les cellules nerveuses.

**Les cellules Tufts** : ce sont des cellules très rares dans l'épithélium. Elles possèdent une morphologie unique, caractérisée par de longs microfilaments à leur pôle apical projetés vers la lumière intestinale (Höfer and Drenckhahn, 1996). Des récepteurs du goût sont présents à leur surface (Bezençon et al., 2007). Elles sont impliquées dans la réponse à l'infection parasitaire grâce à la production d'IL25 permettant la mise en place d'une réponse pro-Th2 par le système immunitaire (Gerbe and Jay, 2016).

**Les cellules M** : ce sont des cellules associées aux plaques de Peyers et aux follicules lymphoïdes isolées. Ces cellules présentes uniquement dans l'intestin grêle sont spécialisées dans la reconnaissance et la présentation des antigènes de la lumière, aux cellules de l'immunité (Kraehenbuhl and Neutra, 1992).

**Les cellules de Paneth** : ces cellules sont présentes au fond des cryptes de Lieberkühn dans l'intestin grêle, entre les cellules Lgr5<sup>+</sup>. Ce sont les seules à suivre une trajectoire antérograde lorsqu'elles se différencient (Ireland et al., 2005). Elles produisent des peptides antimicrobiens (comme les  $\alpha$  ou  $\beta$ -défensines), le lysozyme, et permettent une régulation de la population antimicrobienne. Elles constituent une niche pour les cellules Lgr5<sup>+</sup>(Sato et al., 2009).

## b) La fonction barrière de l'épithélium intestinal

La fonction de barrière de l'épithélium intestinal est nécessaire pour la protection de l'organisme contre les pathogènes de la lumière. Elle est possible grâce à un réseau important de jonctions cellulaires et une couche de mucus permettant une séparation de l'épithélium du contenu de la lumière. Un défaut dans la perméabilité intestinale est souvent associé à des pathologies comme les MICI (Maladie Inflammatoire Chronique de

l'Intestin), la maladie de Coeliaque ou le SCI (Syndrome du Côlon Irritable). Cependant cette barrière doit aussi être permissive afin d'assurer ses fonctions d'échange. De plus, la perméabilité intestinale peut aussi être régulée par des stimuli extracellulaires comme les nutriments, les cytokines ou encore les bactéries.

#### - Les jonctions cellulaires

Le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale est possible grâce à un réseau bien établi de jonctions (figure 5). Ces jonctions cellulaires participent à la communication intracellulaire, l'homéostasie, la prolifération cellulaire, la différenciation et la migration (Garcia-Hernandez et al., 2017).

Au niveau apical de la cellule épithéliale intestinale, on trouve les jonctions serrées (Figure 5). Elles se composent de protéines transmembranaires, de protéines périphériques de membrane et de molécules régulatrices comme les kinases. Les protéines de la famille des claudines sont des protéines transmembranaires et sont associées aux protéines occludines avec lesquels elles forment des pores.

L'occludine est en interaction avec l'actine (Visser et al., 2009). Les protéines zonula occludens (ZO)-1 sont des protéines périphériques. Elles ont un rôle important dans l'assemblage et le maintien des jonctions de par leur forte interaction avec les autres protéines (claudines, occludines et actine). Les jonctions serrées sont impliquées dans le transport transépithélial et sont importantes pour la perméabilité épithéliale. Elles régulent le transport paracellulaire suivant la taille (Bohórquez et al., 2015) (Van Itallie et al., 2008) mais aussi la charge des molécules (Amasheh et al., 2002). La protéine Claudine-2 est capable d'augmenter la perméabilité paracellulaire à l'eau et au sodium (Rosenthal et al., 2010).

Les jonctions serrées peuvent être régulées par de nombreux facteurs comme le voltage, des ligands extracellulaires, intracellulaires ou encore des signaux intra-membranaires (Günzel and Yu, 2013). Par exemple, ce flux peut être modulé par des cytokines comme l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  (Watson et al., 2005). L'assemblage des jonctions serrées requiert la présence des jonctions adhérentes.

Les jonctions adhérentes sont composées des cadhérines, protéines transmembranaires. La queue cytoplasmique de la E-cadhérine interagit avec la caténine- $\delta$ 1 et la  $\beta$ -caténine. L'interaction entre la  $\beta$ -caténine et la  $\alpha$ -caténine 1 permet la régulation de l'anneau de myosine perijonctionnel. Les jonctions adhérentes et les desmosomes permettent le

maintien de la proximité cellules-cellules et sont impliquées dans la communication cellulaire. La perte de ses jonctions va induire un défaut de contact cellulaire, de polarisation et de différenciation puis va aboutir à l'apoptose de la cellule (Hermiston and Gordon, 1995).

Ces jonctions sont liées à un anneau d'actine et de myosine qui permet de réguler la barrière épithéliale.

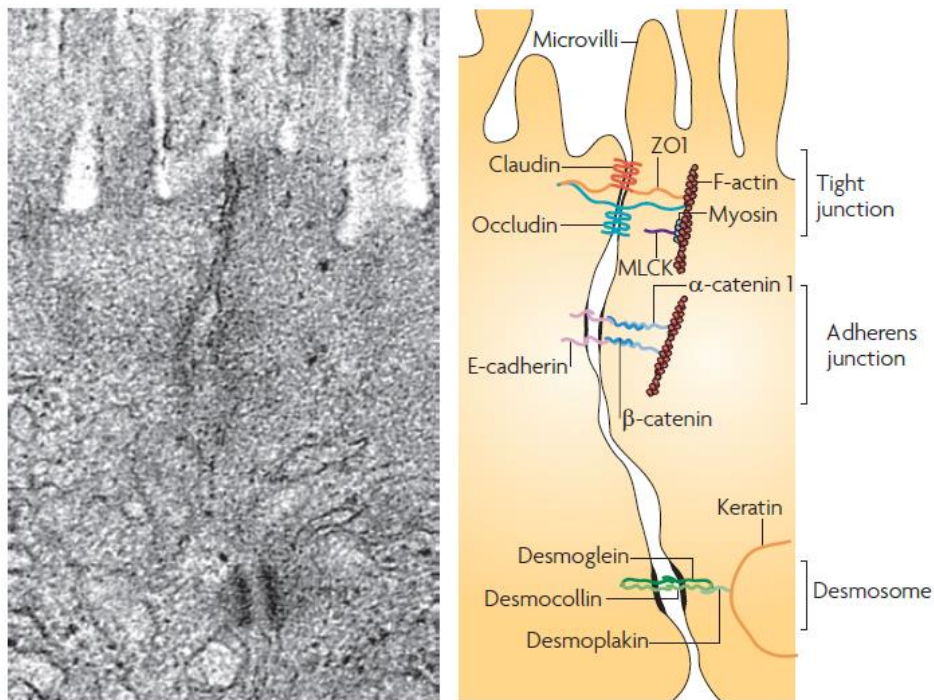


Figure 5 : **Anatomie de la barrière épithéliale : les jonctions cellulaires** (Turner, 2009).

Photos de microscopie électronique et schémas correspondant du complexe de jonctions de l'épithélium intestinal. Juste sous la base des microvillosités, les membranes plasmiques des cellules semblent fusionnées au niveau des jonctions serrées ou les claudines, ZO-1, l'occludine et l'actine interagissent. L'E-cadhérine, la caténine  $\delta 1$  et l'actine interagissent pour former les jonctions adhérentes. La MLCK est associée à l'anneau perijonctionnel d'actomyosine. Les desmosomes, qui sont localisés sous le complexe apical jonctionnel sont formés par des interactions entre desmogleine, desmoplakine et filaments de kératine.

#### - Le mucus

Le mucus est produit par les cellules caliciformes de l'épithélium intestinal. C'est un gel polymérique hydraté d'une épaisseur de 50 à 800  $\mu\text{m}$ . Cette épaisseur dépend de sa localisation dans l'intestin (une épaisseur fine dans l'intestin grêle et une épaisseur plus importante dans le côlon). Il est composé de 2 couches, une couche très dense contre la

muqueuse intestinale qui est stérile, et une plus lâche au contact du microbiote (figure 6).

Le mucus se compose à 65% d'eau, des protéines de type mucine et du TFF (Trefoil Factor), ainsi que des quantités importantes de galactose, d'hexosamines et de fructose présente sur les mucines (Boltin et al., 2013). Les protéines de mucine sont des glycoprotéines caractérisées par un haut poids moléculaire, une proportion importante de O-glycosylation liées par un carbohydrate (environ 50 à 80%) et par leur capacité à former un gel viscoélastique. Elles forment un maillage plus ou moins dense (Corfield et al., 2001). Les peptides TFF sont des protéines hautement conservées. Dans le tube digestif, on trouve le TFF2 et le TFF3. Ces protéines sont capables d'interagir avec les protéines de mucus et pourraient influencer les propriétés viscoélastique du mucus (Thim et al., 2002) ou encore la sécrétion des mucines (Torres et al., 2002). Le TFF joue un rôle important dans les défenses du tractus gastro-intestinal et sa réparation.

La couche de mucus contient aussi des peptides antimicrobiens, et des immunoglobulines (Figure 6). Le mucus forme une barrière contre les pathogènes de la lumière (voir chapitre 2).

Des souris déficientes pour MUC2 développent spontanément une colite, ce qui montre l'importance du mucus dans la symbiose avec le microbiote intestinal (Hansson and Johansson, 2010).

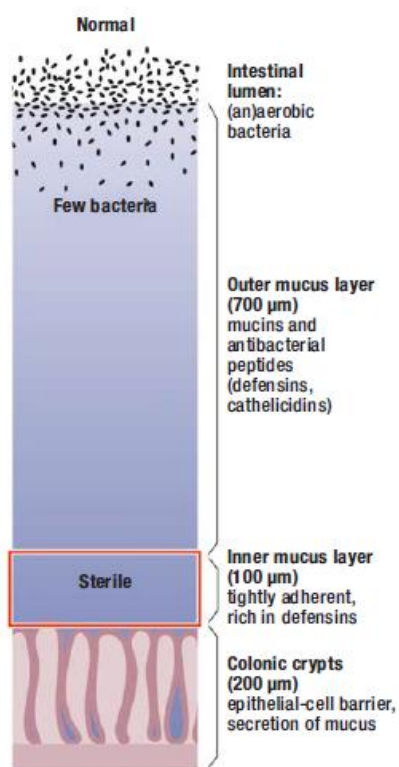


Figure 6 : **La barrière de mucus** (Adapté de (Wehkamp et al., 2016))

### c) Sa fonction d'absorption

L'épithélium intestinal a pour principale fonction d'absorber les nutriments contenus dans l'alimentation qui ont été digérés par l'estomac. C'est au niveau de l'intestin grêle que la majorité des nutriments vont être absorbés par l'organisme. Le côlon aura pour principale fonction digestive de réabsorber l'eau. Les entérocytes sont des cellules spécialisées dans l'absorption des nutriments. Elles permettent le passage du glucose via des récepteurs spécialisés (SLGT-1 et GLUT-2), des acides gras au niveau de la bordure en brosse, des vitamines et de l'eau qui diffusent de manière passive en suivant les mouvement d'ions. Une partie de ces différentes molécules sera utilisée directement par la cellule afin de maintenir ses fonctions. L'autre partie sera ensuite dirigée jusqu'à la circulation sanguine ou elle sera redistribuée à tout l'organisme afin de fournir l'énergie nécessaire au métabolisme.

### d) Sa fonction de sécrétion

Certaines cellules de l'épithélium intestinal sont spécialisées dans la sécrétion. Nous l'avons vu précédemment, les cellules à mucus produisent une épaisse couche de mucus

permettant la lubrification de l'intestin mais aussi de maintenir la barrière épithéliale (voir aussi chapitre 2).

Les peptides antimicrobiens (PAM) sont produits par les cellules de Paneth présentes dans l'intestin grêle, au fond des cryptes (Wehkamp et al., 2005). Dans le côlon, il n'y a pas ou peu de cellules de Paneth mais les entérocytes sont capables de produire certains PAM comme les lectines de types C. La production de PAM varie le long du tractus gastro-intestinal (Darmoul and Ouellette, 1996). Les PAM sont de petites molécules de 15 à 50 acides aminés. Les bactéries sont très sensibles à ces PAM et il existe peu de résistance (Huang and Chen, 2016). Dix pourcents de ces peptides sont anioniques et la majorité est cationique. Les principales familles de PAM sont les défensines ( $\alpha$  et  $\beta$ -défensine, la cathélicidine (hCAP-18 /LL-37), les lectines de type-C (RegIII), les ribonucléases (RNases) et les protéines S100 (calprotectine). Le rôle et la fonction des peptides antimicrobiens sont traités dans le chapitre 2.

Les cellules entéroendocrines de l'épithélium intestinal sécrètent plus de 20 peptides et hormones le long de la muqueuse intestinale. Ces molécules agissent de manière paracrine activant des différents types cellulaires de la muqueuse intestinale, passent dans la circulation sanguine ou activent des terminaisons nerveuses proche de l'épithélium (Psichas et al., 2015) (Bohórquez et al., 2015). Leur rôle principal est de coordonner la réponse de l'intestin après l'ingestion d'aliments (modulation de la motricité, de l'absorption, et signalisation via l'axe intestin-cerveau) (Furness et al., 2013). Par exemple, la cholécystokinine est sécrétée en réponse aux acides gras et aux protéines et transmettent un signal de satiété (Dockray, 2003).

La majorité de la sérotonine est sécrétée et stockée par les cellules entéroendocrines, elle est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques comme l'humeur, l'appétit, la mémoire, l'apprentissage ou l'homéostasie (Gershon, 1999). La concentration en sérotonine dans la muqueuse intestinale de certains patients atteints de SCI-D est augmentée et pourrait induire une altération de la motricité intestinale, et une hypersensibilité viscérale (Crowell, 2004). Ces cellules peuvent aussi produire du CRF qui est le principale médiateur de la réponse au stress dans l'axe intestin-cerveau (Lembo et al., 1996). Ces cellules ont donc une importante fonction de régulation des fonctions physiologiques du tractus gastro-intestinal.

En condition inflammatoire, la cellule épithéliale est capable de détecter les agressions et d'y répondre de manière spécifique via la sécrétion de très nombreux médiateurs comme les cytokines, les protéases. Cette sécrétion sera détaillée dans le chapitre 2.

### 3- Le microbiote intestinal

Le microbiote présent dans le tractus gastro-intestinal y réside en parfaite symbiose avec son hôte. L'hôte fournit des niches environnementales aux bactéries qui à leur tour aident l'intestin dans ses fonctions de digestion (Bäckhed et al., 2005). Les différentes espèces présentes sont le résultat de pression de sélection de l'hôte mais aussi du microbiote lui-même.

#### a) La composition du microbiote intestinal

Le nombre et la diversité bactérienne varient le long de l'intestin avec  $10^1$  bactéries par gramme de fèces dans le duodénum jusqu'à  $10^{12}$  dans le côlon (O'Hara and Shanahan, 2006). Cette communauté de micro-organismes est stable dans le temps. La flore bactérienne est composée d'environ 35000 espèces (Frank et al., 2007). Chez un individu sain, la flore intestinale est constituée principalement des phyla Firmicutes et Bacteroidetes, puis des Actinobacteries et des Verrucomicrobiotes. La figure 7 montre la diversité bactérienne dans l'intestin : dans l'œsophage, duodénum, et le jéjunum, *Streptococcus* est prédominant (Pei et al., 2004). Le côlon constitue une réserve d'environ 70% des bactéries présentes dans l'organisme. Les principaux phyla présents sont les Firmicutes et les Bacteroidetes. Le ratio entre ces 2 phyla est impliqué dans de nombreuses pathologies comme les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (voir chap 3 partie MICI). On retrouve dans la lumière du côlon, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* et *Ruminococcus*, qui peuvent être identifiés dans les fèces. *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Akkermansia* sont présents dans le réseau supérieur du mucus (Swidsinski et al., 2005). Le côlon est aussi colonisé par des bactéries pathogènes comme *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholera* mais leur abondance est très faible (aux alentours de 0,1%) (Gillespie et al., 2011).



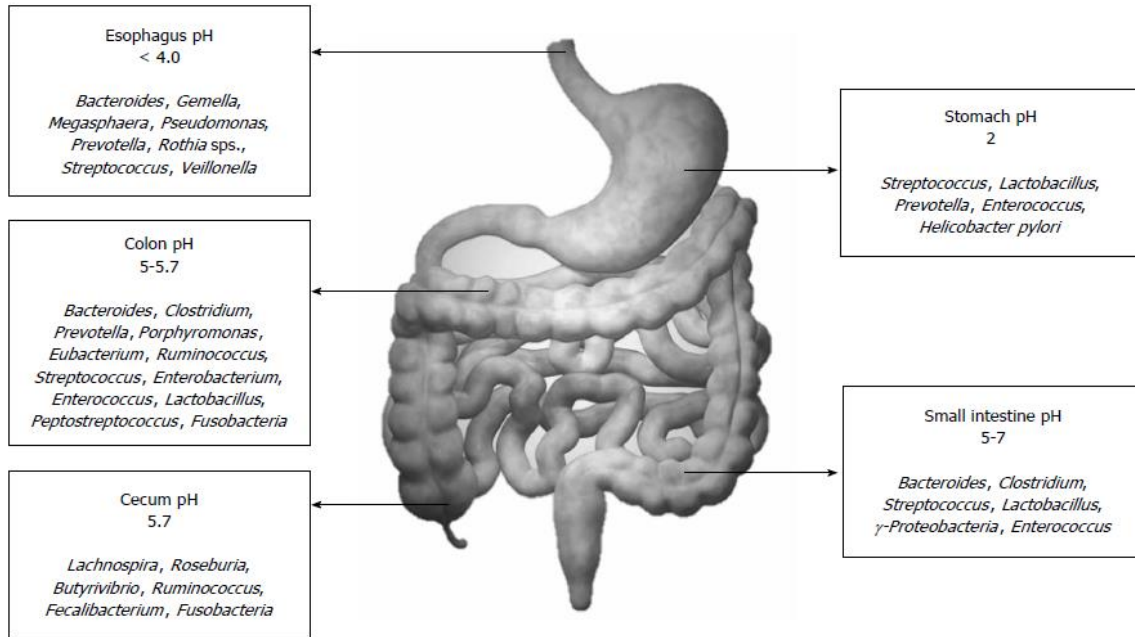


Figure 7 : **Distribution du microbiote intestinal** (Jandhyala et al., 2015)

## b) Fonctions de la flore intestinale

### - Digestion

Les bactéries intestinales telles que *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium* et *Enterobacteria*, sont capables de transformer les carbohydrates qui n'ont pas été digérés en amont et les oligosaccharides indigestibles en acide gras à chaîne courte (AGCC) comme le butyrate, le propionate et l'acétate (Macfarlane and Macfarlane, 2003). Ces molécules sont des sources d'énergie pour l'hôte via leur interaction avec le récepteur Gpr41 (Samuel et al., 2008). Le butyrate prévient l'accumulation du D-lactate qui est un métabolite toxique grâce à sa fermentation par la flore humaine (Bourriaud et al., 2005). La flore intestinale a aussi un effet bénéfique sur le métabolisme des lipides via la suppression de l'inhibition de l'activité de la lipoprotéine lipase dans les adipocytes. Cette lipase joue un rôle important dans le métabolisme et le transport des lipides grâce à l'hydrolyse des triacylglycérol (Mead JR et al., 2002). *Bacteroides thetaiotaomicron* aide à la digestion des lipides via l'augmentation de l'expression de la colipase (Hooper LV et al., 2001). Une autre fonction métabolique assurée par le microbiote est la synthèse de vitamine K et de composants de la vitamine B. Les *Bacteroides* sont capables de synthétiser l'acide linoléique qui a des

propriétés antidiabétiques et immuno-modulatrices (Wallace et al., 2007). De récentes études montrent que le microbiote pourrait aussi avoir un rôle dans la dégradation de phénols ingérés dans l'alimentation (Marín et al., 2015).

- Intégrité de la barrière intestinale

Le microbiote joue un rôle dans le maintien de la barrière épithéliale. D'une part grâce à son action sur les jonctions cellulaires : *Bacteroides thetaiotaomicron* induit l'expression de SPRP2A (small proline rich protein 2A) qui est requis pour l'expression des desmosomes dans les villi (Lutgendorff F et al., 2008). La signalisation du TLR2 (Toll Like Receptor 2) via le peptidoglycan permet le maintien des jonctions serrées (Cario et al., 2007). D'autre part, le microbiote est impliqué dans la survie cellulaire : *Lactobacillus rhamnosus GG* produit p40 et p75, 2 protéines impliquées dans la réduction de cytokines pro-apoptotiques (Yan et al., 2011). De plus, le microbiote contribue au développement structural de la muqueuse intestinale grâce à l'induction du facteur de transcription de l'angiogénine-3, impliqué dans le développement de la vascularisation (Stappenbeck et al., 2002).

L'étude des souris axéniques (sans flore intestinale) permet d'illustrer ces différents points. Ces animaux présentent une faible surface d'échange intestinale, une réduction des villi, du péristaltisme et des cycles cellulaires augmentés. Ces animaux ont un réseau de vascularisation intestinale réduit, le taux du facteur de transcription angiogénine-3 est diminué dû à l'absence de microbiote (Gordon and Bruckner-Kardoss, 1961) (Banasaz et al., 2002).

- Education du système immunitaire

Le microbiote est impliqué dans la formation des plaques de Peyers et des GALT (Gut Associated Lymphoid Tissues) ainsi que des follicules lymphoïdes isolés (voir chapitre 2) (Chung et al., 2012). Il a aussi un rôle dans le développement des lymphocytes T régulateurs (Treg). Cependant le mécanisme n'est pas encore bien défini. *Bacillus fragilis* produit du polysaccharide A qui va être reconnu par le TLR2 des Treg et induire leur prolifération (Round et al., 2011). Les acides gras à chaîne courte (AGCC) et notamment le butyrate sont impliqués dans le développement et les fonctions des Treg. Ces AGCC sécrétés par les cellules épithéliales activent un récepteur sur les Treg qui va induire des régulations épigénétiques (Smith et al., 2013).

De plus, la flore, via l'activation de My-D88 sur les cellules dendritiques (CD) va induire la sécrétion par ces cellules de TGF $\beta$ , CXCL13 et de BAFF (B-cell activating protein). Ces cytokines pourraient provoquer la production d'IgA par les lymphocytes B (Arpaia et al., 2013). Les cellules lymphoïdes innées (CLI) sont capables de répondre à des signaux cytokiniques des cellules épithéliales très rapidement. Le microbiote pourrait avoir un rôle dans la régulation de ces CLI. Le métabolite bactérien aldéhyde indole-3 stimule les CLI via le récepteur à l'aryl hydrocarbure et provoque la sécrétion d'IL22 par ces cellules (Zelante et al., 2013).

### c) Notion de bactéries probiotiques

D'après l'organisation mondiale de la santé et l'organisation des nations unies de l'alimentation et de l'agriculture, un probiotique est « un organisme vivant, qui lorsqu'il est administré dans des proportions adéquates, confère un bénéfice sur la santé de l'hôte ». Les probiotiques sont largement utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et consommés par le grand public dans leur nourriture ou en compléments alimentaires. Leurs mécanismes d'actions sont regroupés dans la figure 8. Ils peuvent agir sur la suppression de pathogènes, l'immuno-modulation, la fortification de la barrière intestinale via l'augmentation de la prolifération et de différenciation des cellules épithéliales.

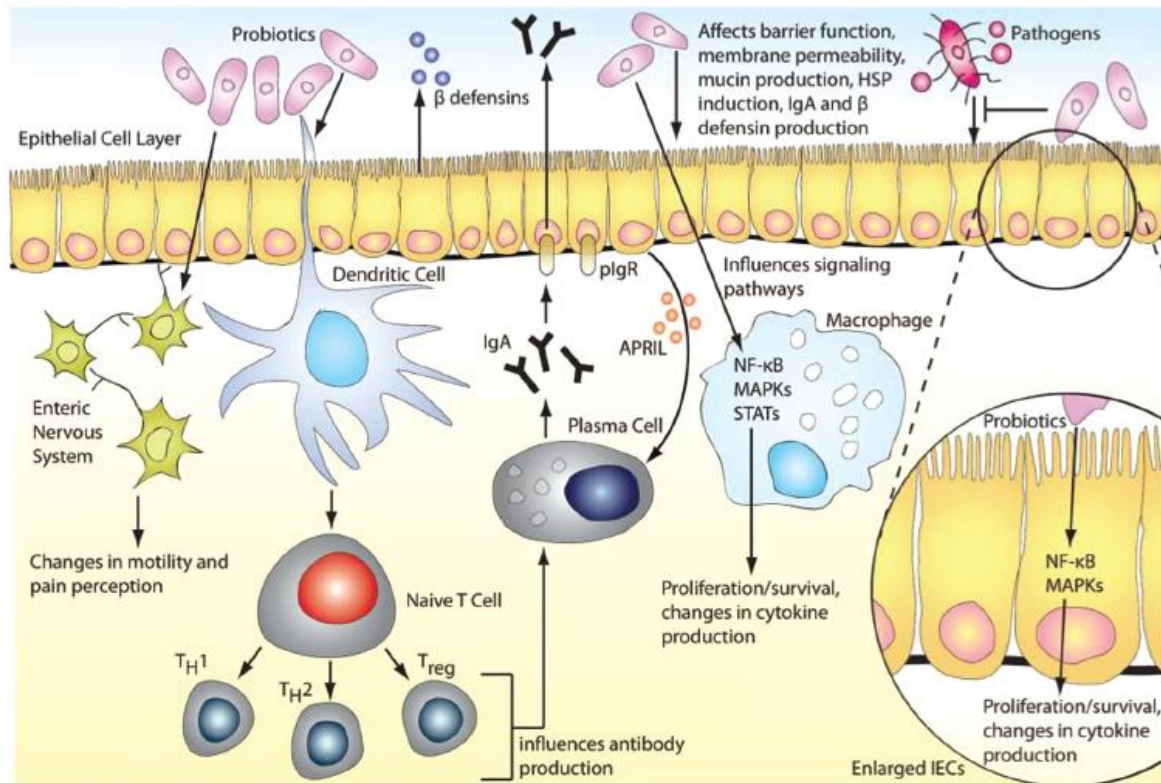


Figure 8: **Mécanismes d'action des probiotiques dans l'intestin** (Thomas and Versalovic, 2010).

Bénéfices des probiotiques sur l'hôte grâce à la communication avec de nombreux types cellulaires. La fonction barrière des cellules épithéliales intestinales est augmentée grâce à la modulation des jonctions serrées et l'augmentation de la production de mucines. Les probiotiques interfèrent avec les pathogènes en augmentant la sécrétion des  $\beta$ -défensines par les CEI et des IgA par les cellules plasmatiques en bloquant les signaux de détournement des pathogènes. La sécrétion de cytokines par les CEI, les macrophages, les cellules dendritiques est régulée par les probiotiques grâce à la modulation de signaux clés comme NF $\kappa$ B et MAPK. Des changements dans ces voies peuvent aussi influencer sur la prolifération et la survie des cellules cibles. Grâce à leur interaction avec les cellules dendritiques, les probiotiques peuvent influencer les sous population de lymphocytes T. les probiotiques peuvent aussi modifier la motricité et la perception de la douleur en modifiant l'expression des récepteur à la douleur et par l'induction de sécrétion de neurotransmetteur comme APRIL.

Par exemple, la bactérie *Faecalibacterium prausnitzii*, est associée au microbiote des personnes en bonne santé. En effet, le profiling de cette bactérie dans les fèces d'individus sains et dans ceux atteints de MICI révèle que *F. prausnitzii* peut être un biomarqueur d'un intestin en bonne santé comparé au microbiote de patients atteints de MICI où la quantité de cette bactérie sera fortement diminué (Sokol et al., 2008). *F. prausnitzii* est une des bactéries produisant le plus de butyrate du tractus gastro-

intestinal (Flint et al., 2012). Le butyrate a des effets pléiotropiques sur la muqueuse intestinale : protection contre l'invasion de pathogène, modulation du système immunitaire, réduction de la progression du cancer (Macfarlane and Macfarlane, 2011) effet anti-inflammatoire (Hudcovic et al., 2012).

- Probiotiques et cellules épithéliales

Les cellules épithéliales intestinales sont le point de contact initial entre l'hôte et le microbiote. Elles sont la première ligne de défense contre les bactéries pathogènes et communiquent de manière importante avec le microbiote commensal et les probiotiques. Les bactéries probiotiques peuvent interrompre les interactions précoces entre les bactéries pathogènes et les cellules de l'épithélium (Gopal et al., 2001). Les probiotiques *L. plantarum* et *L. ramosus* induisent la production de mucus par les cellules à mucus ce qui réduit l'adhérence de *E. coli* entéro-pathogénique (Mack et al., 1999). *E.coli* Nissle 1917, souche de coli probiotique, restaure l'intégrité de la barrière épithéliale via une augmentation de l'expression de ZO-2, lors d'une infection avec *E. coli* entéro-pathogénique (Zyrek et al., 2007). Cette même souche probiotique induit la production de PAM ( $\beta$ -defensine 2) par la cellule épithéliale via l'activation des facteurs de transcription NFkB et AP-1 (Wehkamp et al., 2004). Les probiotiques interfèrent avec de nombreux signaux cellulaires afin de prodiguer leur effets bénéfiques (Tableau 1).

<b>Espèces probiotiques</b>	<b>Voie de signalisation</b>	<b>Effets</b>
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	NFkB	Augmente l'export nucléaire de RelA via PPAR $\gamma$
<i>Bacteroides vulgatus</i>	NFkB	Augmente la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$
<i>Bifidobactérium lactis</i> BB12	NFkB	Active RelA
<i>Bifidobactérium lactis</i> BB12	MAPKs	Augmente la phosphorylation de p38
<i>Bifidobacterium longum</i>	NFkB	Diminue la translocation de p65
<i>Enterococcus faecalis</i> EC1/EC3/EC15/EC16	PPAR $\gamma$	Induit la phosphorylation de PPAR $\gamma$
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> DSM17677	NFkB	Inhibe l'activation de NFkB

<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	NFkB	Diminue la phosphorylation de IκBα
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	NFkB	Diminue la translocation de p65
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	NFkB	Prévient la dégradation de IκBα
<i>Lactobacillus casei</i>	PPARγ	Augmente l'ARNm de PPARγ
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	MAPKs	Augmente la phosphorylation de p38 et de JNK
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	NFkB	Prévient l'ubiquitination et la dégradation de IκBα
<i>Saccharomyces boulardii</i>	apoptosis	Prévient l'activation de la caspase 3

**Table 1 : Modulation par les probiotiques des voies de signalisation dans les cellules épithéliales intestinales** (adapté de (Thomas and Versalovic, 2010)).

- Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes, qui possèdent un statut GRAS (Generally reconized As Safe) et qui sont très largement utilisées par l'industrie agro-alimentaire. Elles ont de nombreuses propriétés bénéfiques pour l'organisme très largement décrites dans la littérature (voir table 1). *Lactococcus lactis* est une bactérie lactique anaérobie aérotolérante, gram positive, qui est considérée comme neutre vis-à-vis de l'hôte. Cependant lors d'une inflammation, elle peut être protectrice et donc avoir un effet probiotique (Grimoud et al., 2010). *Lactococcus lactis* a été utilisée dans des études comme vecteur de molécules anti-inflammatoires et montre une efficacité importante, notamment dans des modèles d'inflammation intestinale (Steidler et al., 2000)(Foligne et al., 2007). Au laboratoire, *L.lactis* recombinante pour L'Elafine (un inhibiteur de protéases) délivre cette protéine directement sur le site inflammatoire ce qui a pour effet de protéger les animaux de la colite et *in vitro*, en réduisant l'inflammation intestinale (Motta et al., 2012).

#### 4- Le système nerveux entérique

L'intestin possède une innervation qui lui est propre : le système nerveux entérique (SNE). Ce SNE est un système reflexe semi-autonome composé d'une

innervation extrinsèque et intrinsèque. L'innervation intrinsèque est composée de neurones dont les corps cellulaires sont situés dans l'intestin lui-même et a pour fonction de contrôler les processus digestifs (motricité et sécrétion intestinale). L'innervation extrinsèque présente des fibres nerveuses dont les corps neuronaux sont en dehors du SNE et permet la transmission des sensations de la périphérie vers le système nerveux central (SNC).

### a) L'innervation intrinsèque

Le SNE est composé d'environ 400 à 600 millions de neurones ce qui correspond à six fois le nombre de neurones de la moelle épinière (Brehmer, 2006).

La figure 9 montre l'organisation de ce SNE. Il est constitué de 2 plexi, le plexus myentérique et le plexus sous-muqueux. Ils innervent les muscles longitudinaux et circulaires, la musculature muqueuse, les artères et la muqueuse. Un réseau interconnecté de neurones afférents primaires intrinsèques permet la détection des stimuli physiologiques et d'induction d'une réponse appropriée : distorsions mécaniques, mouvement des villi, contractions des muscles intestinaux ou encore des changements chimiques de la lumière (Furness et al., 2004).

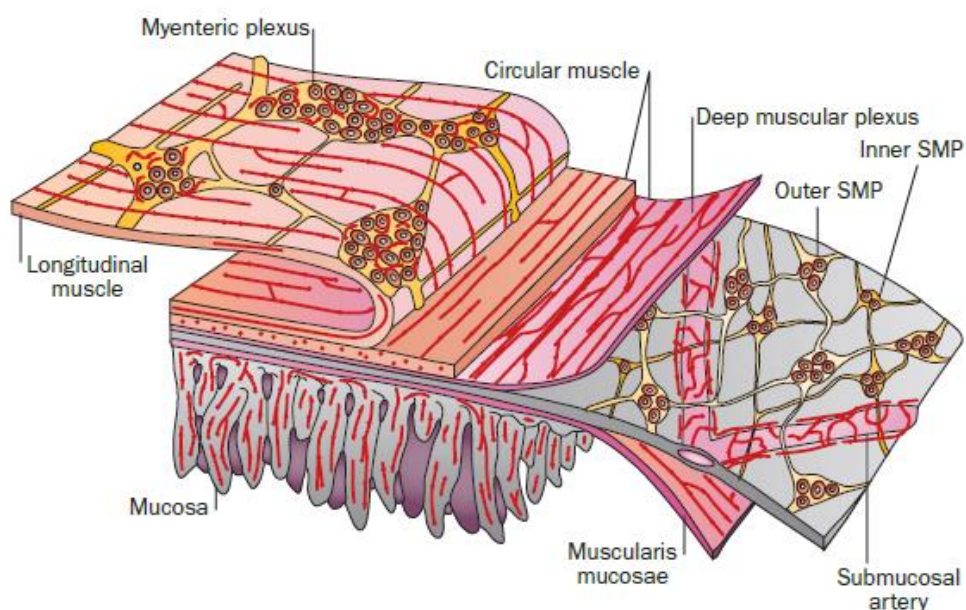


Figure 9 : **Organisation du SNE** (Furness, 2012)

Le SNE est un plexus ganglionné. Il se compose du plexus myentérique, entre les couches de muscles longitudinaux et circulaires de la musculature externe et le plexus sous muqueux qui a des composantes afférentes et efférentes. Les faisceaux des fibres nerveuses relient les ganglions et forment également des plexus qui innervent les muscles longitudinaux, circulaire, la musculature muqueuse et la muqueuse.

Ces plexi ont une organisation neuronale sous forme de ganglions qui sont constitués de corps neuronaux entériques et de cellules gliales. Les neurones entériques des 2 plexi sont fortement interconnectés et dialoguent en permanence afin d'assurer leurs fonctions dans l'intestin (Cooke et al., 1993).

Principaux types de neurones composant le SNE :

Les Neurones Intrinsèques Primaires Afférents (IPANs) sont situés dans les plexi sous-muqueux et myentériques. Leurs dendrites vont innerver la muqueuse intestinale. Leur axone se projette sur les interneurones et les motoneurones des 2 plexi. Ces neurones vont pouvoir détecter des informations de la muqueuse intestinale et les relayer aux autres neurones du SNE. Ils sont donc en lien étroit avec l'environnement de la muqueuse intestinale et notamment les cellules de l'épithélium. Ils sont sensibles aux stimulations mécaniques de l'intestin comme les distensions intestinales (Clerc and Furness, 2004).

Les interneurones sont fortement connectés entre eux et forment une chaîne d'excitation qui peut être descendante ou ascendante. Ils sont régulés par les IPANs. Ils permettent la régulation des fonctions intestinales (Furness, 2000).

Les motoneurones sont des neurones efférents connectés aux effecteurs. Ils sont présents en majorité dans le plexus myentérique. Ils sont soit excitateurs, soit inhibiteurs des muscles lisses de l'intestin provoquant ainsi respectivement la contraction ou la relaxation des muscles (Brookes et al., 2013).

## b) L'innervation extrinsèque

L'innervation extrinsèque de l'intestin est assurée par des nerfs spinaux et vagues, des axones du système parasympathique (vague et sacré) et du système sympathique (ganglions prévertébraux) (Blackshaw et al., 2007). Elle est impliquée dans la satiété, les nausées, le contrôle des sphincters, de la détection des douleurs et plus généralement de l'homéostasie. Les nerfs extrinsèques peuvent aussi moduler la motricité gastro-



intestinale. Près de 75% des afférences vagales qui innervent l'intestin transmettent des informations sensibles de l'intestin vers le cerveau (Powley and Phillips, 2002). L'information sensitive provenant de l'intestin est envoyée au SNC par 2 voies : via les ganglions nodoses directement au cerveau ou par les ganglions de la racine dorsale par l'intermédiaire de la moelle épinière comme le montre la figure 10.

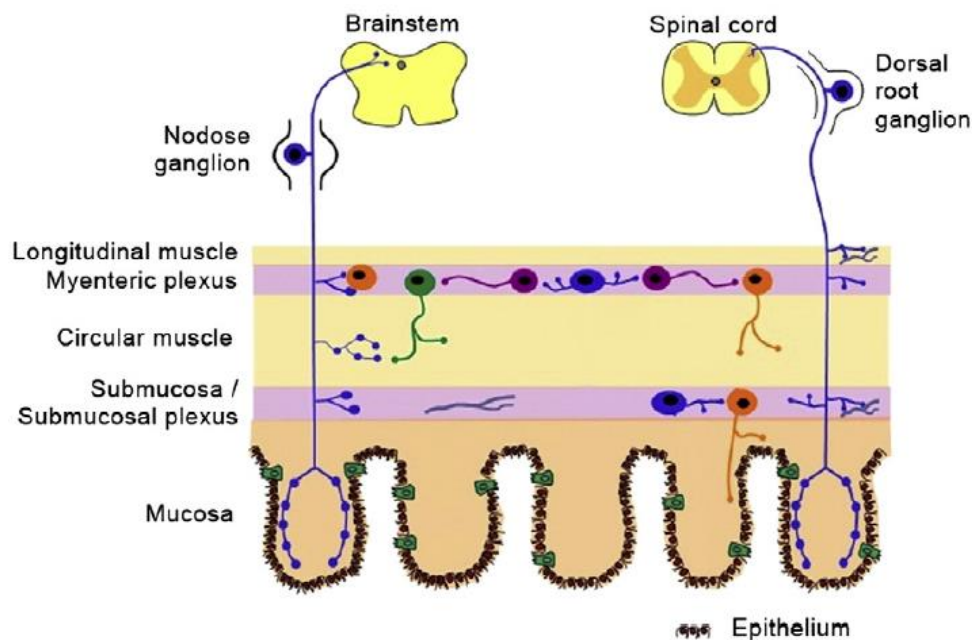


Figure 10 : **Innervation extrinsèque du tractus gastro-intestinal** (Ratcliffe, 2011)

Les IPANs sont multipolaires et leurs terminaisons projettent dans l'intestin. Les neurones vagues des afférences primaires ont leur corps cellulaire dans les ganglions nodoses et projettent dans le cerveau. Les corps cellulaires des neurones afférent primaires sont dans les ganglions de la racine dorsale, leurs terminaisons se trouvent dans la corne dorsale de la moelle épinière et leur axone passe par le ganglion sympathique pour innerver l'intestin.

Ces neurones sensitifs permettent de percevoir le remplissage de l'estomac et de l'intestin, des sensations douloureuses (comme des crampes, des coliques ou des douleurs aiguës). Ces perceptions sont dépendantes de facteurs psychologiques, elles augmentent avec l'attention et à l'inverse diminuent avec le manque d'attention. Ces sensations peuvent aussi être réduites lorsqu'une autre douleur est détectée. D'autres informations non directement liées à un organe peuvent être ressenties comme la satiété après un repas (Furness et al., 1999).

Les fibres des afférences vagales répondent à de nombreux stimuli comme des distensions mécaniques de l'œsophage ou de l'intestin, des contractions des muscles, au changement de l'osmolarité et de la température, ainsi qu'au contenu luminal.

### c) Rôles

L'innervation des muscles intestinaux permet la propulsion du bol alimentaire, son brassage, la modulation de la capacité de réservoir de l'estomac et l'expulsion des pathogènes et des substances nocives. L'œsophage et l'estomac sont en majorité contrôlés par le SNC, l'intestin grêle et le côlon sont régulés par le SNE à l'exception du sphincter anal, modulé par la moelle épinière (de Groat et al., 1981). Le SNE peut induire des mouvements rapides de propulsion (péristaltisme), de mixage (segmentation) et de rétropropulsion (expulsion des substances nocives).

Les mouvements des fluides entre le lumen et la muqueuse intestinale sont finement régulés. Plus de 2 fois le volume sanguin passe à travers la muqueuse intestinale chaque jour, l'interruption de ce flux peut entraîner des ischémies et être délétère pour la muqueuse (Wright and Loo, 2000). L'activation de neurones sécréto-moteurs par le SNE permet un transport de l'eau et des électrolytes de la *lamina propria* vers la lumière intestinale afin de maintenir un équilibre dans les fluides du corps (Sjövall et al., 1986).

### d) Communication avec la cellule épithéliale

Les neurones du SNE expriment de nombreux récepteurs facilitant leur communication avec les cellules de leur environnement proche. Ils expriment par exemple des récepteurs activés par les protéases, les PARs (Protease Activated Receptors), leur activation entraîne une stimulation neuronale et une mobilisation de calcium (Gao et al., 2002). Or de récents articles montrent que les cellules épithéliales intestinales, notamment en conditions pathologiques, sont une source importante de protéases (Motta et al., 2012) (Rolland-Fourcade et al., 2017)(voir chapitre 4).

Le SNE aurait aussi un rôle dans le maintien de la barrière intestinale via une action des neurones sous-muqueux dans la régulation de la prolifération des cellules épithéliales (Toumi et al., 2003). Il existe une communication importante entre les cellules épithéliales et les neurones. En effet, le GLP-2 (glucagon-like peptide-2), impliqué dans des fonctions de prolifération et de réparation cellulaire, est produit par la cellule épithéliale mais celle-ci ne possède pas le récepteur à cette molécule. Les neurones du SNE vont répondre au GLP-2 et, en retour, permettre l'expression du facteur de transcription c-Fos dans les cellules épithéliales intestinales (Bjerknes and Cheng, 2001). Les neurones entériques sont donc impliqués dans la prolifération et la réparation de l'épithélium. De plus, l'acétylcholine, médiateur produit par les neurones,

est impliqué dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale dans le côlon de cochons (Lesko et al., 2013). Les neurones myentériques modulerait les jonctions serrées, de manière comparable au SNC dans son maintien de la barrière hématoencéphalique. La délétion des neurones myentériques chez des souris entraîne une perte de la barrière intestinale et un développement inflammatoire. Les neurones et les cellules gliales du plexus myentérique sécrètent du GSNO (Glial-derived s-nitrosoglutathione) qui régulerait la barrière épithéliale via l'augmentation de l'expression des jonctions serrées (Savidge et al., 2007).

La digestion du bol alimentaire apporte de nombreuses molécules et micro-organismes délétères pour l'organisme. Le tube digestif est un tissu hautement différencié et spécialisé qui a mis en place nombreuses protections (barrière épithéliale, sécrétion de mucus...) et contrôle activement son intégrité (senseurs, innervations...). La cellule épithéliale est au cœur de ces processus de détection et de réponses à ses agressions extérieures. Elle assure ces fonctions de senseur en entretenant des communications étroites et fournies avec les autres cellules de son environnement et en particulier avec les cellules immunitaires et les cellules neuronales. Ces communications de la cellule épithéliale avec les cellules de son environnement constituent le cœur thématique de cette thèse.

## CHAPITRE 2 :

# L'inflammation et la douleur dans l'intestin

### 1- Le système immunitaire de l'intestin

L'intestin est en contact continu avec le milieu extérieur à travers le chyme. Les bactéries du microbiote ainsi que les pathogènes présents dans le bol alimentaire présentent un risque infectieux important. L'organisme a développé un arsenal cellulaire afin de prévenir, reconnaître et lutter contre les infections et les stress (cancérogénèse, présence de corps étranger). Cette partie a pour but de décrire l'immunité mucoale de l'intestin de manière focalisé sur l'épithélium intestinal.

#### a) L'épithélium intestinal : première barrière de l'immunité

Le tube digestif présente une surface de contact très importante avec le milieu extérieur, et donc avec les pathogènes. L'épithélium intestinal, le mucus ainsi que le système immunitaire inné forment une barrière permettant de prévenir les infections. Le système immunitaire intestinal est très développé, il détecte et induit une réponse appropriée afin d'éliminer les pathogènes.

##### - La barrière épithéliale

L'épithélium intestinal forme une barrière physique permettant la ségrégation des bactéries pathogènes de la lumière, du tissu stérile (Turner, 2009). Les jonctions cellulaires aident au maintien de l'intégrité de cette barrière.

En condition inflammatoire ou de stress, on peut observer une augmentation de la perméabilité paracellulaire. Celle-ci résulte de l'ouverture des jonctions cellulaires. Cette ouverture est possible grâce à la contraction des microfilaments d'actomyosine. La contraction est un phénomène mécano-chimique qui requiert la phosphorylation de la chaîne légère de myosine par la MLCK (Myosine Light Chain Kinase) en réponse à la fixation de la calmoduline et du calcium. La phosphorylation de la chaîne légère de myosine va induire un changement de structure tertiaire de la myosine qui va

« marcher » le long du filament d'actine. Cela va augmenter la tension du cytosquelette de la cellule et induire une migration cytosolique des protéines de jonctions serrées. Ce phénomène va permettre l'augmentation de l'espace intracellulaire et donc de la perméabilité épithéliale permettant le passage de molécules de la lumière dans la muqueuse (Van Spaendonk et al., 2017). (Figure 11).

D'autres signaux intracellulaires, comme l'activation des différentes voies de signalisation (PI3K, ERK, ROCK) induites par des médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ ) vont être capable d'activer la MLCK (Mankertz et al., 2009). D'autres cytokines telles que l'IL4 et l'IL13 augmentent la perméabilité paracellulaire via l'induction d'expression de la claudine 2 et à l'activation des voies pro-apoptotiques. D'autres médiateurs inflammatoires comme les protéases peuvent aboutir à l'ouverture des jonctions cellulaires et à l'augmentation de la perméabilité épithéliale (voir chapitre 4)

Chez les patients atteints de RCH (Rectocolite hémorragique) on observe une diminution de l'expression des claudines 1, 2 et une augmentation des claudines 3, 4 et 7. Dans la MC (Maladie de Crohn), l'expression des claudines 1 et 2 sont augmentées alors que celle des claudines 3, 5 et 8 est diminuée (Prasad et al., 2005) (Weber et al., 2008).

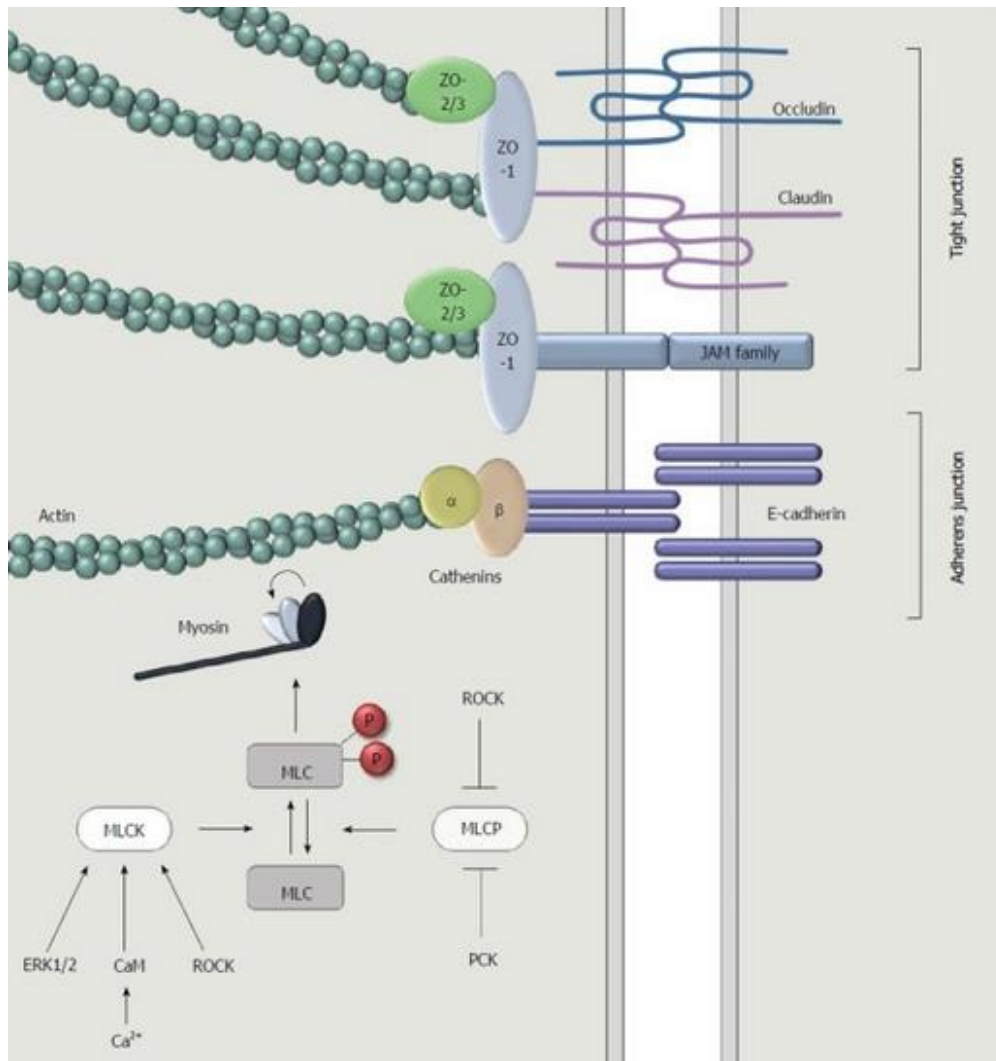


Figure 11: Représentation du complexe jonctionnel apical à la surface intracellulaire de 2 cellules épithéliales (Van Spaendonk et al., 2017).

Les jonctions serrées sont constituées de 3 types de protéines membranaires : l'occludine, les claudines et les molécules d'adhésion de jonctions (JAM). Les protéines adaptatrices telles que ZO-1 relient les protéines transmembranaires à l'actine filamenteuse. Ce composant du cytosquelette interagit avec la myosine pour induire une contraction, suivie de l'ouverture de l'espace intercellulaire. La chaîne légère de myosine (MLC) est le principal régulateur de cette machinerie contractile. La contraction se produit lorsque MLC est phosphorylé. Ceci est régulé par l'activité de la MLCK et de la MLCP qui sont à leur tour régulées par des voies de signalisation intracellulaire impliquant par exemple les kinases extracellulaires régulées par le signal ERK1/2, le calcium, la calmoduline, la PKC ou ROCK.

Les cellules épithéliales sont sources de mucines et de peptides antimicrobiens qui sont une part majeure des défenses innées contre les pathogènes (Bevins and Salzman, 2011). Elles présentent des PRR (Pattern Recognition Receptors) à leur surface qui leur permettent de détecter les pathogènes et d'induire une réponse appropriée

- Les sécrétions des cellules épithéliales

La sécrétion d'un mucus hautement glycosylé par les cellules à mucus crée une barrière contre l'attachement des bactéries sur l'épithélium. Ces cellules produisent TFF3 (Trefoil Factor 3) et RELM $\beta$  (Resistin-Like Molecule  $\beta$ ) qui contribuent à la régulation de la fonction barrière de l'épithélium (voir chapitre 1). Lors de l'inflammation, RELM $\beta$  provoque la sécrétion de MUC2 et régule les macrophages et les lymphocytes T (Lee et al., 2008). Le TFF est surexprimé au niveau des lésions inflammatoires et des ulcérations chez les patients atteints de MICI (Hoffmann, 2004).

Cette fonction barrière est renforcée par la sécrétion des peptides antimicrobiens.

Les PAM sont des composantes importantes de l'immunité innée. Ils induisent de multiples dommages aux bactéries comme l'inhibition de l'ADN, de l'ARN, de la synthèse protéique. Ils sont aussi capables de déstabiliser les membranes via la formation de canaux ioniques, de pores transmembranaires et de rupture de portions de la membrane (Brogden, 2005). Ces différents mécanismes d'actions vont induire une lyse bactérienne. Les principaux PAM, leur origine ainsi que leur mode d'action sont résumés dans la figure 12.

	Cellular source	Special characteristics
<b><math>\alpha</math>-Defensins</b>		
HNP1–HNP4	Neutrophils	Broad spectrum of antimicrobial activity- including antiviral activity' Chemo-attracts monocytes, T-cells and dendritic cells Inhibition of complement activation Activation of mast cells'
HD-5	Intestinal tract	Released as propeptide by Paneth cells and processed to the active form by trypsin'
<b><math>\beta</math>-Defensins</b>		
hBD-1	Keratinocytes, airway epithelia, urogenital tract	Weak antimicrobial activity compared to other $\beta$ -defensins Potential role as a tumor suppressor gene'
hBD-2	Keratinocytes, airway epithelia, intestinal tract	Mainly active against Gram-negative bacteria and fungi Chemo-attracts dendritic and T-cells' as well as human neutrophils' and mast cells
hBD-3	Keratinocytes, airway epithelia	Potent broad spectrum of antimicrobial activity'
hBD-4	Airway epithelia, keratinocytes (mRNA)	Potent activity against <i>P. aeruginosa</i> , less activity against <i>E. coli</i> and Gram-positive bacteria
<b>Cathelicidin</b>		
LL-37	Leukocytes, airway epithelia, urogenital tract, keratinocytes	Antimicrobial activity against bacteria and viruses Processed to antimicrobial active forms by proteinase 3 and kallikreins 5 and 7 Many immunomodulatory functions
<b>Ribonucleases</b>		
Eosinophil cationic protein (ECP)	Eosinophilic leukocytes	Antibacterial and antiviral activity
Eosinophil-derived neurotoxin (EDN)	Eosinophilic leukocytes	Antiviral activity Chemo-attracts and activates dendritic cells
Angiogenin (RNase 5)	Leukocytes, epithelial cells, fibroblasts	Antimicrobial activity Angiogenic activity
RNase 7	Keratinocytes, airway epithelia	Broad-spectrum antimicrobial activity
RNase 8	Placenta	Broad-spectrum antimicrobial activity
<b>S-100 proteins</b>		
Psoriasin (S100A7)	Keratinocytes, sebocytes, airway epithelia, urogenital tract	High antibacterial activity against <i>E. coli</i>
Calprotectin (S100A8/A9)	Leukocytes, skin	Active at high concentrations against <i>C. albicans</i>
Calcitermin (C-terminal fragment of S100A12)	Airway secretions	Active against Gram-negative bacteria'

Figure 12 : Les principaux peptides antimicrobiens humains (Harder et al., 2007).

Ils présentent une activité à large spectre ciblant les membranes dans lesquelles les défensines et la cathelicidine forment des pores qui conduisent à la mort bactérienne (Gallo and Hooper, 2012). La production de REGIIy permet la ségrégation du microbiote



intestinal de la surface épithéliale. Sa sécrétion dépend de la reconnaissance intrinsèque de signaux bactériens par les CEI (Vaishnava et al., 2011).

Les immunoglobulines A sécrétées (IgA S) sont les principales Ig sécrétées dans la lumière intestinale. Les IgA proviennent des lymphocytes B présents dans les plaques de Peyer ou dans les follicules lymphoïdes isolés. Les lymphocytes B activés vont débiter la commutation de classe et ainsi changer le type de leurs IgM en IgA. Ces lymphocytes devenus des cellules plasmiques migrent dans la *lamina propria* où ils produisent les IgA principalement de manière dimérique. Ils sont pris en charge par le récepteur IgR à la surface de la cellule épithéliale, puis transportés à travers l'épithélium intestinal jusqu'à la lumière (Pabst et al., 2016). Des cytokines comme l'IL4, le TGF $\beta$ , l'IL5, et l'IL10 peuvent induire la production d'IgA (Newberry and Lorenz, 2005).

Leur rôle est multiple et encore pas totalement décrit. Les IgA peuvent empêcher les pathogènes et les toxines d'adhérer aux cellules épithéliales (Mantis et al., 2006), mais aussi piéger des bactéries dans le mucus (Kraehenbuhl and Neutra, 1992) évitant ainsi leur contact avec l'épithélium. Les IgA ont aussi un rôle dans l'homéostasie intestinale, notamment dans les premiers jours de la vie d'un enfant, où les IgA du lait maternel protègent l'intestin du nouveau-né et permettraient aussi de contrôler la mise en place du microbiote intestinal (Sekirov et al., 2010).

Les cellules épithéliales intestinales transportent les IgA de la muqueuse vers la lumière. La collaboration entre les lymphocytes B sécréteurs d'IgA et les cellules épithéliales intestinales démontre une composante immunitaire aux CEI qui permet de réguler les populations de bactéries commensales et de participer au maintien de l'homéostasie intestinale (Shulzhenko et al., 2011).

Les interactions entre les PAM, les mucines et les IgA permettent de concentrer l'activité antimicrobienne à la surface de l'épithélium, limitant la quantité et la diversité du microbiote.

## b) Le « Gut Associated Lymphoid Tissue »

Les plaques de Peyers, les ganglions mésentériques, la *lamina propria* et les follicules lymphoïdes isolés forment le GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue) (Figure 13). Son rôle est d'induire une réponse immunitaire lors des infections par des pathogènes mais

aussi de tolérer les antigènes de l'alimentation et de la flore commensale (Weiner et al., 2005).

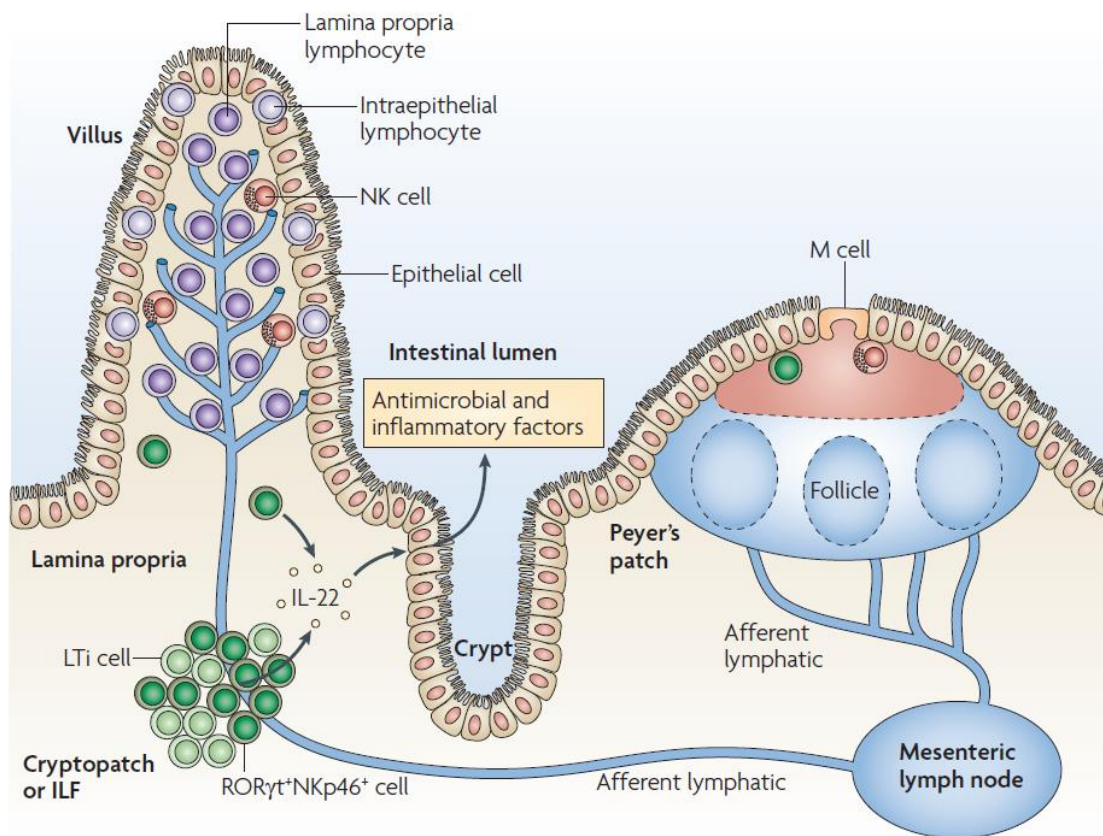


Figure 13 : Le GALT (Vivier et al., 2009).

L'immunité de la muqueuse intestinale est médiée par des cellules immunitaires qui sont réparties dans l'épithélium et la *lamina propria* sous-jacente, ainsi que par des cellules immunitaires qui sont organisées dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses tels que les plaques de Peyers et les ganglions lymphatiques mésentériques.

Les plaques de Peyer (PP) se situent le long de l'intestin grêle et se comptent au nombre de 100-200 chez l'être humain (Heel et al., 1997). Elles sont organisées en 3 régions : des follicules contenant des cellules B, une zone de lymphocytes T et des cellules épithéliales composées de cellules M qui sont spécialisées dans la fixation et le transport d'antigènes luminaux dans les PP. Elles contiennent aussi de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques afin de permettre le recrutement de cellules immunitaires naïves. Après leur activation et leur expansion, ces cellules maintenant maturées, rejoignent le site inflammatoire. Les PP sont en contact permanent avec les antigènes (Ag) de la lumière, induisant une sélection et une activation des lymphocytes B dans les centres germinatifs

(Victora and Nussenzweig, 2012). Le microbiote intestinal est nécessaire au développement de PP car chez les souris axéniques les PP sont atrophiées (Pickard and Chervonsky, 2010).

Les follicules lymphoïdes isolés (FLI) sont présents dans le côlon avec une densité d'environ un tous les 0,04 mm de muqueuse. Ces structures sont indépendantes des cellules T mais sont compatibles avec leur présence avant l'induction des IgA par les lymphocytes B (Yamamoto et al., 2004).

### c) Les cellules immunitaires intestinales résidentes

De nombreux mécanismes sont donc mis en place pour prévenir la pénétration de bactéries dans la muqueuse intestinale. Cependant lorsque des pathogènes échappent aux premières défenses de l'organisme, des cellules présentes dans la muqueuse (résidentes) permettent de lutter contre l'organisme étranger avant même la mise en place de la réponse inflammatoire.

#### - Les lymphocytes T intraépithéliaux

Les lymphocytes T intraépithéliaux (LTi) peuvent être divisés suivant l'expression de leur T-cell receptor (TCR)  $\alpha\beta$  ou du TCR de type  $\gamma\delta$ . Ces derniers sont présents aux alentours des 10% dans l'intestin humain mais peuvent être augmentés en condition inflammatoire (Spencer et al., 1991). Les LT  $\alpha\beta$  possèdent un corécepteur CD8 $\alpha\alpha$ , et les LT  $\gamma\delta$  expriment soit un CD4CD8 soit comme les LT  $\alpha\beta$ , un corécepteur CD8 $\alpha\alpha$ . Ces lymphocytes sont indépendants des molécules classiques de CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) pour leur activation mais celle-ci requiert un CMH non classique. Ces cellules ont des propriétés cytotoxiques faisant intervenir les systèmes de granzymes/perforine, Fas/FasL. L'activation ou la lésion épithéliale déclenchent l'expression de ligands co-stimulateurs (MICA, MICB, ULBP) à leur surface qui induisent l'action effectrice des LTi (Hayday et al., 2001). Leur emplacement dans l'épithélium intestinal leur permet de détecter l'entrée de pathogènes et d'induire la destruction de la cellule infectée. Des souris déficientes en LTi, sont incapables de limiter l'entrée et la propagation de pathogènes lors d'infections (Sheridan and Lefrançois, 2010).

#### - Les cellules lymphoïdes innées

Récemment décrites, les cellules lymphoïdes innées (CLI) sont des effecteurs de la réponse innée. Elles sont présentes dans les tissus intestinaux, en proche contact de l'épithélium intestinal, ce qui leur permet une réponse rapide contre les pathogènes. Elles ne possèdent pas de récepteurs spécifiques aux antigènes, ce qui les affranchit de toute activation/expansion et leur permet de réaliser leurs fonctions effectrices dès la détection du pathogène (Cherrier, 2014). Les CLI sont différenciées en 3 catégories suivant leur facteur de transcription et la sécrétion d'interleukines. Les CLI de type 1 comprennent les populations productrices d'IFN $\gamma$ , de TNF $\alpha$  et exprimant le facteur de transcription T-bet. Les représentants majeurs de ces cellules sont les cellules NK qui sont impliquées dans la réponse aux infections virales et à la surveillance tumorale (Waldhauer and Steinle, 2008). Les CLI de type 2 anciennement nommées nuocytes ou « natural helper cells » produisent des cytokines de type 2 (IL4, IL5, et IL13). Elles répondent aux cytokines IL22, IL33 et au TSLP et sont impliquées dans les réponses antiparasitaires et lors de l'inflammation allergique (Neill et al., 2010). Les CLI de type 3 sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription de ROR $\gamma$ T et la production de cytokines IL17A et IL22 (Vivier et al., 2009). Elles ont un rôle dans l'immunité antibactérienne et la protection de la barrière épithéliale (Buonocore et al., 2010).

#### - Les cellules dendritiques

Leur principal rôle est l'induction de l'immunité acquise. Elles participent à la surveillance du tissu sous forme de cellules dendritiques immatures. Elles opèrent comme des phagocytes en internalisant les microorganismes, non pas pour les détruire mais pour les présenter à leur surface aux lymphocytes. Les cellules dendritiques immatures se différencient ensuite en cellule dendritiques matures, perdent leur capacités phagocytaires et migrent dans les ganglions mésentériques où elles rencontrent les lymphocytes T auxquels elles présenteront l'antigène afin de les activer (Banchereau and Steinman, 1998).

#### - Les macrophages résidents

Les macrophages résidents sont les cellules immunitaires les plus abondantes dans le côlon (Platt et al., 2010). Ces macrophages coliques ont un phénotype tolérogène, anti-

inflammatoire. Ils sont de type M2. Ils produisent de l'IL10 en réponse à une stimulation au LPS, et conduisent à la régénération et à la prolifération épithéliale. En réponse à la flore bactérienne, les macrophages produisent de l'IL1 $\beta$  qui active les CLI de type 3 induisant leur sécrétion de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor). Le GM-CSF permet la sécrétion par les macrophages et les cellules dendritiques de l'IL10 qui va promouvoir la différenciation des lymphocytes T régulateurs (Mortha et al., 2014). La sécrétion de l'IL1 $\beta$  est sous la dépendance de NLRC4 qui permet de distinguer entre les bactéries commensales ou pathogéniques (Franchi et al., 2012).

#### d) Les cellules immunitaires intestinales inflammatoires circulantes

Lorsque le pathogène est reconnu par le système immunitaire et par les cellules de l'épithélium intestinal, celles-ci sécrètent des cytokines et des chimiokines permettant le recrutement des cellules inflammatoires circulantes.

##### - Les neutrophiles

Ce sont des cellules effectrices de première ligne. Elles sont rapidement recrutées sur le site de l'inflammation, elles ingèrent et détruisent les pathogènes grâce notamment à des granules azurophiles. Ces granules sont riches en myéloperoxydase (MPO), en hydrolases et en protéase à sérine (élastase du neutrophile et protéinase-3). Ces cellules ont une durée de vie courte (2 à 3 jours) (Borregaard et al., 1995).

##### - Les macrophages

Ces cellules assurent la surveillance du tissu et jouent un rôle important d'entretien. Ils dérivent des monocytes circulants et se différencient en quittant la circulation lorsqu'ils sont attirés sur le site inflammatoire. Comme les neutrophiles, ils ingèrent et détruisent les pathogènes mais sécrètent aussi des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL8, IL6 et IL23). Ils ont par contre une durée de vie beaucoup plus longue. Les macrophages participent aussi à la réponse adaptative en tant que cellules effectrices lorsqu'ils sont activés par les lymphocytes T ou par les anticorps sécrétés par les lymphocytes B (Auffray et al., 2009).

- Les basophiles, mastocytes et éosinophiles

Ces cellules sont impliquées dans la protection des surfaces épithéliales et plus particulièrement du tractus gastro-intestinal. Ils peuvent être activés directement, ou par l'intermédiaire de cytokines sécrétées par les lymphocytes. Ces cellules possèdent des granules qui contiennent des médiateurs cytotoxiques. Ils sont majoritairement impliqués dans la défense contre les organismes trop grands pour être phagocytés par les macrophages. Lorsqu'ils sont activés, ils libèrent le contenu de leurs granules afin de créer un environnement inflammatoire, hostile pour les parasites. Les basophiles et les mastocytes relarguent aussi de l'histamine, médiateurs importants dans la réponse allergique et dans l'inflammation pathologique. Dans le côlon sain, on retrouve peu de mastocytes dans le tissu intestinal. De même pour les éosinophiles, qui pourraient jouer un rôle dans l'homéostasie intestinale grâce à la modulation des IgA (Chu et al., 2014).

- Les lymphocytes

Les 2 types majeurs de lymphocytes sont les lymphocytes B qui arrivent à maturité dans la moelle osseuse et les lymphocytes T qui mûrissent dans le thymus. La fonction principale des lymphocytes B est la sécrétion d'anticorps. Les lymphocytes T se différencient en 2 classes : les lymphocytes T cytotoxiques, possédant une molécule de co-stimulation de type CD8 et capables de tuer une cellule infectée par des virus ou des bactéries, et les lymphocytes T auxiliaires, ayant une molécule de co-stimulation CD4, qui sécrètent des cytokines et permettent l'activation d'autres cellules du système immunitaire.

Les lymphocytes reconnaissent les antigènes grâce à des récepteurs spécialisés (BCR pour les lymphocytes B et TCR pour les lymphocytes T). Chaque lymphocyte reconnaît un antigène unique mais les recombinaisons génétiques à l'origine de la mise en place de leurs récepteurs leur permettent de reconnaître spécifiquement un nombre presque illimité d'antigènes. Les lymphocytes matures n'ayant pas encore rencontré l'antigène sont appelés lymphocytes naïfs. Ces lymphocytes vont se différencier en cellule effectrice grâce à leur activation par les cellules dendritiques dans les ganglions mésentériques, puis migrer sur le site inflammatoire.

## 2- La réponse inflammatoire intestinale

L'organisme a développé un arsenal cellulaire afin de prévenir, reconnaître et lutter contre les infections et les stress dont la cellule épithéliale joue un rôle majeur.

### a) Le rôle central de l'épithélium intestinal

#### - La reconnaissance des antigènes luminaux

Les capacités immunorégulatrices des cellules épithéliales intestinales (CEI) peuvent être mises en place grâce à une détection efficace des pathogènes de la lumière mais aussi des antigènes endogènes. Cette reconnaissance est possible grâce à la présence à la surface des CEI de nombreux senseurs dynamiques.

Les PRR (ou Pattern Recognition Receptors) reconnaissent des motifs bactériens très conservés les PAMP's (Pathogen Associated Molecular Patterns). Ils sont essentiels à la survie des microorganismes et donc difficilement modifiables. Les PRR sont exprimés dès les premières étapes de la vie et sont présents sur de nombreux types cellulaires (cellules immunitaires, cellules épithéliales). Il existe différents types de PRR qui réagissent à des PAMPs spécifiques en activant des voies de signalisation particulières afin d'éliminer le pathogène reconnu (Fearon and Locksley, 1996). Les membres les plus connus sont les TLR (Toll Like Receptors) et les NLR (NOD Like Receptors). Ils permettent la reconnaissance des motifs microbiens (le TLR4 reconnaît le LPS, le TLR5 reconnaît la flagelline bactérienne) ou de signaux endogènes (le TLR9 reconnaît l'ADN, NOD2 reconnaît le MDP bactérien intracellulaire). L'activation de ces récepteurs va mobiliser des voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire (comme la voie de NFκB ou des MAPK) pour aboutir à la transcription de gènes pro ou anti-inflammatoires.

Le rôle de ces PRR présents sur la cellule épithéliale est décrit dans le tableau suivant :

**- PRR et signalisations dans les CEI**

Type de PRR	PRR	Effets in vivo sur les CEI
TLRs	TLR1	ND
	TLR2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protège les CEI des blessures</li> <li>- Augmente le transport des cellules M</li> <li>- Promeut la communication par es jonctions gap</li> <li>- Augmente la production de TFF3</li> <li>- Promeut l'intégrité des jonctions serrées</li> </ul>
	TLR4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protège les CEI des blessures</li> <li>- Augmente le transport des cellules M</li> <li>- Favorise le développement des tumeurs et leur croissance</li> <li>- Augmente la production de prostaglandine</li> <li>- Favorise le développement des entérocolites nécrosantes chez les nourrissons</li> </ul>
	TLR5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Promeut la production de cytokines et de chimiokines</li> <li>- Protège de l'apoptose</li> <li>- Limite l'inflammation médiée par l'IL1</li> <li>- Protège de la forte croissance bactérienne</li> </ul>
	TLR9	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibe l'activation de NFkB et favorise la tolérance aux signaux TLR</li> <li>- Promeut la dégranulation des cellules de Paneth</li> <li>- Favorise la production de PAM</li> <li>- Protège les CEI des blessures</li> </ul>
	TRIF	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Favorise l'apoptose</li> </ul>
	Myd88	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Favorise la production de PAM</li> <li>- Protège les CEI des blessures</li> <li>- Augmente la sécrétion de mucines</li> <li>- Favorise la production de prostaglandine</li> <li>- Aide à la production des IgA par les cellules B</li> <li>- Promeut l'autophagie dans les CEI et aide à la défense contre les bactéries intracellulaires</li> </ul>
NLRs	NOD1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protège les CEI des dommages</li> <li>- Inhibe le développement tumorale</li> <li>- Induit la formation de tissus lymphoïdes</li> <li>- recrute des protéines d'autophagie</li> </ul>
	NOD2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recrute des protéines d'autophagie</li> <li>- Favorise la production de PAM</li> <li>- Promeut la production de ROS</li> </ul>



	NLRP3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibe le développement tumoral</li> <li>- Favorise ou limite le développement de colites (dépend du contexte)</li> <li>- Favorise la production de PAM</li> <li>- Régule la composition du microbiote</li> </ul>
--	-------	--

**- Voie de signalisation des PRR dans les CEI**

Voie de signalisation	Acteurs impliqués dans cette voie	Effets in vivo sur les CEI
<i>NFκB</i>	IKK1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibe l'apoptose</li> <li>- Favorise la production de PAM</li> <li>- Protège des dommages tissulaires</li> <li>- Promeut le développement tumorale</li> </ul>
	IKK2	
	NEMO	
	RelA	
<i>MAP kinase</i>	p38alpha	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Favorise la différenciation des cellules à mucus</li> <li>- Inhibe la prolifération</li> </ul>

**- Régulateurs négatifs des voies de signalisation des PRR dans les CEI**

	Molécules régulatrices	Effets in vivo sur les CEI
	SIGIRR	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibe les signaux des TLR</li> <li>- Limite la prolifération</li> <li>- Protège les CEI des dommages</li> <li>- Inhibe le développement et la progression tumorale</li> </ul>
	A20	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibe l'apoptose</li> <li>- Protège les CEI des dommages</li> <li>- Inhibe l'activation de NFκB par les PRR et les récepteurs aux cytokines</li> </ul>
	miR-146a	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibe les signaux des TLR durant la période néonatale</li> </ul>

**Table 2 : Rôle des PRR dans la régulation des CEI et dans l'homéostasie tissulaire**

(adapté de (Peterson and Artis, 2014))

APRIL : A Proliferation-Inducing Ligand ; BAFF : B cell activating Factor ; CEI : Cellules Epithéliales Intestinales ; ND : Non Déterminé ; PAM : Peptides Antimicrobiens ; ROS : Reactive Oxygen Species ; SIGIRR : Single Ig IL1 Related Receptor ; TFF3 : TreFoil Factor ; TLR : Toll Like Receptor

L'abondance du microbiote à proximité des cellules épithéliales nécessite la mise en place par les cellules épithéliales intestinales de mécanismes visant à limiter les stimuli induits par ces bactéries commensales (Figure 14). Les CEI expriment des régulateurs négatifs des signaux pro-inflammatoires médiés par les PRR. Par exemple, l'activation du TLR1 déclenche l'activation du facteur de transcription NFκB qui va aboutir à la

transcription de gènes pro-inflammatoires. La protéine SIGIRR peut interférer avec cette voie de signalisation et inhiber la production d'IL1 $\beta$  (voir table 2) (Wald et al., 2003). De plus, les CEI doivent aussi être capables de différencier des signaux de bactéries commensales de ceux de bactéries pathogènes afin de mettre en place une réponse inflammatoire appropriée. La polarisation des CEI leur permet d'exprimer certains PRR sur leur pôle basal et d'autres sur le pôle apical. Cette ségrégation des PRR a pu être montrée *in vivo* et *in vitro*. La stimulation baso-latérale du TLR9 entraîne une forte activation de NF $\kappa$ B alors qu'une reconnaissance apicale par le TLR9 provoque une inhibition de ce même facteur de transcription (Lee et al., 2006) (Figure 15). FRMPD2 (FERM and PDZ domain containing 2) est un régulateur positif de NOD2. Il agit comme une protéine chaperonne qui favorise la localisation baso-latérale de NOD2 et son activation par un motif riche en répétition de leucine (LRR). Dans la maladie de Crohn, des mutations du gène codant NOD2 sont associées au développement de la pathologie (voir chapitre 3). Ces mutants de NOD2 ont perdu leur capacité à interagir avec FRMPD2, à co-localiser à la membrane baso-latérale de la CEI et donc de pouvoir répondre à une stimulation (Ogura et al., 2001).

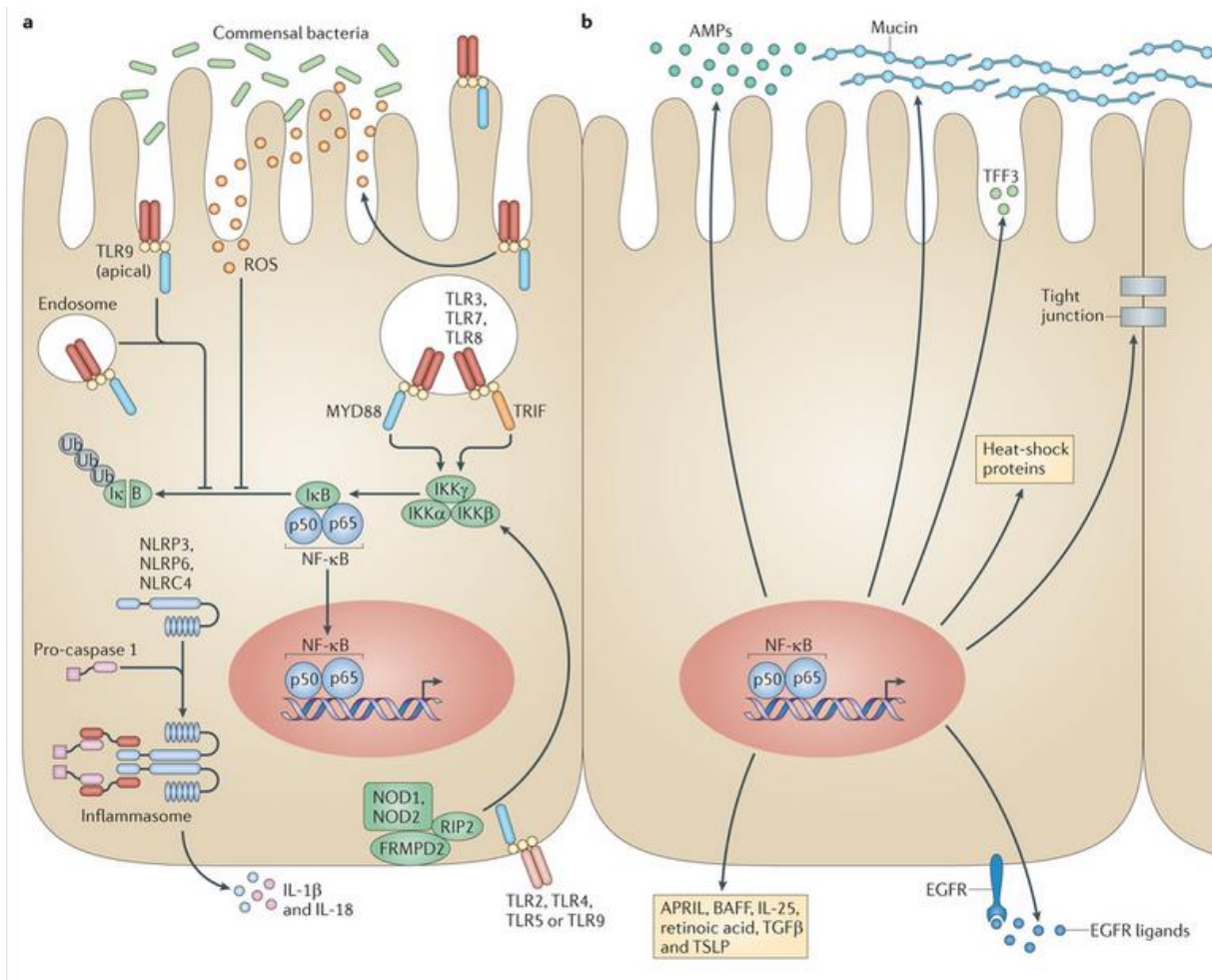


Figure 14 : **La reconnaissance des motifs microbiens induit une réponse adaptée des CEI** (Peterson and Artis, 2014).

(a) Les PRR reconnaissent des motifs bactériens conservés et induisent une réponse adaptée par différentes voies de signalisation. (b) La reconnaissance microbienne par les CEI promeut la survie et la réparation cellulaire.

Les sécrétions de la barrière épithéliale jouent un rôle important dans l'homéostasie des CEI. Chez des souris axéniques, la très fine couche de mucus présente dans le côlon peut être augmentée par un traitement avec des ligands des TLRs ce qui montre le rôle des bactéries commensales dans la production de mucus par les cellules à mucus (Kim and Ho, 2010). La capacité des CEI à détecter leur environnement microbien joue un rôle important dans la régulation de leur fonction barrière.

#### - Régulation des cellules immunitaires

Les CEI produisent de nombreux signaux immunorégulateurs nécessaires à la tolérance des cellules immunitaires, à l'induction de la réponse inflammatoire innée ou adaptative.

Ils dépendent de la reconnaissance de la cellule épithéliale et de sa capacité à produire des cytokines comme le TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) (Rimoldi et al., 2005), le TGF $\beta$  (Zeuthen et al., 2008) et de l'IL25 (Zaph et al., 2008).

La sécrétion de TSLP, de TGF $\beta$  et d'acide rétinoïque produite en réponse aux bactéries commensales induit le développement de cellules dendritiques et de macrophages aux propriétés tolérogènes (production d'IL10 et d'acide rétinoïque) (Zeuthen et al., 2008). Après interaction avec les CEI, ces cellules dendritiques CD103<sup>+</sup> vont dans les tissus lymphoïdes où elles permettent une différenciation des lymphocytes T tolérogènes exprimant le facteur de transcription Foxp3 (Coombes et al., 2007). Les macrophages CX3CR1<sup>hi</sup> perdent leur propriété migratoire, restent en contact étroit avec les cellules épithéliales intestinales et possèdent une activité phagocytaire importante afin de lutter contre les pathogènes qui auraient pu traverser la barrière épithéliale. Ils expriment des protéines de jonctions serrées qui permettent la formation de dendrites transépithéliales qui pénètrent dans le lumen pour détecter les antigènes exogènes (Niess et al., 2005). Ces macrophages peuvent être aussi tolérogènes via la sécrétion d'IL10 (Kang et al., 2012).

Les cellules lymphoïdes innées (CLI) jouent un rôle crucial dans l'homéostasie intestinale, l'inflammation et dans les réponses précoces à l'infection (Tait Wojno and Artis, 2012). Elles sont régulées par des signaux provenant des CEI. Ces signaux dépendent de la stimulation microbienne : les bactéries pathogènes vont induire la production d'IL25 par les CEI. Cette sécrétion d'IL25 par les CEI diminue la sécrétion d'IL22 par les CLI (Sawa et al., 2011). L'IL22 a un rôle protecteur du tissu intestinal. A l'inverse, les bactéries commensales induisent la production d'IL7 par les CEI. Cette cytokine est reconnue par les CLI ce qui induit leur sécrétion d'IL22 ainsi que l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ T (Vonarbourg et al., 2010). Ces cellules ainsi activées ont un rôle important dans la protection de l'épithélium intestinal des blessures et des infections par des pathogènes bactériens.

#### - Le facteur de transcription NF $\kappa$ B

Le facteur de transcription NF $\kappa$ B joue un rôle central dans la réponse inflammatoire. Il peut être activé par l'immunité innée (via les TLR), les voies de réponses au stress et par l'immunité adaptative. Il contrôle l'expression de nombreux acteurs de la réponse inflammatoire comme les cytokines (TNF $\alpha$ , IL1, IL6, IFN $\gamma$ ), les chimiokines (IL8, MCP1),

les molécules d'adhérence (ICAM, selectine E), les molécules immunitaires effectrices (Fas-L, COX2), et des molécules de survie (Bcl-X, A1). Il a aussi un effet sur la survie cellulaire en faisant obstacle aux signaux d'apoptose provenant de TNFR1 (récepteur au TNF) (Bonizzi and Karin, 2004). La délétion de NF $\kappa$ B est létale chez la souris durant le développement embryonnaire dû à son rôle dans la survie cellulaire. Les mutations du gène codant pour NF $\kappa$ B entraînent des immunodéficiences chez les patients (Hoffmann et al., 2003). NF $\kappa$ B est le produit de 5 gènes codant des protéines ayant toutes un domaine Rel de liaison à l'ADN. C-Rel, RelA et RelB possèdent un domaine qui stimule la transcription, p50 et p52 n'ont pas de domaine de transactivation. Ces 5 molécules s'associent en homo ou en hétéro dimère pour former des complexes régulateurs aux propriétés activatrices ou répressives (Figure 15). Ces dimères sont maintenus à l'état inactif par un inhibiteur de NF $\kappa$ B (I- $\kappa$ B). La stimulation de cette voie induit l'activation du complexe multimérique kinase d'I $\kappa$ B (IKK) qui va phosphoryler 2 sérines sur I $\kappa$ B. Cela va entraîner la dégradation de I $\kappa$ B par la voie de l'ubiquitine. Le dimère de NF $\kappa$ B est libéré et peut ainsi accéder au noyau et avoir des propriétés de facteur de transcription. NF $\kappa$ B contrôle l'expression de I $\kappa$ B $\alpha$ , qui une fois synthétisé se lie à NF $\kappa$ B et l'exporte vers le cytoplasme ce qui permet un contrôle négatif des processus inflammatoires médiés par NF $\kappa$ B (Ghosh et al., 2002).

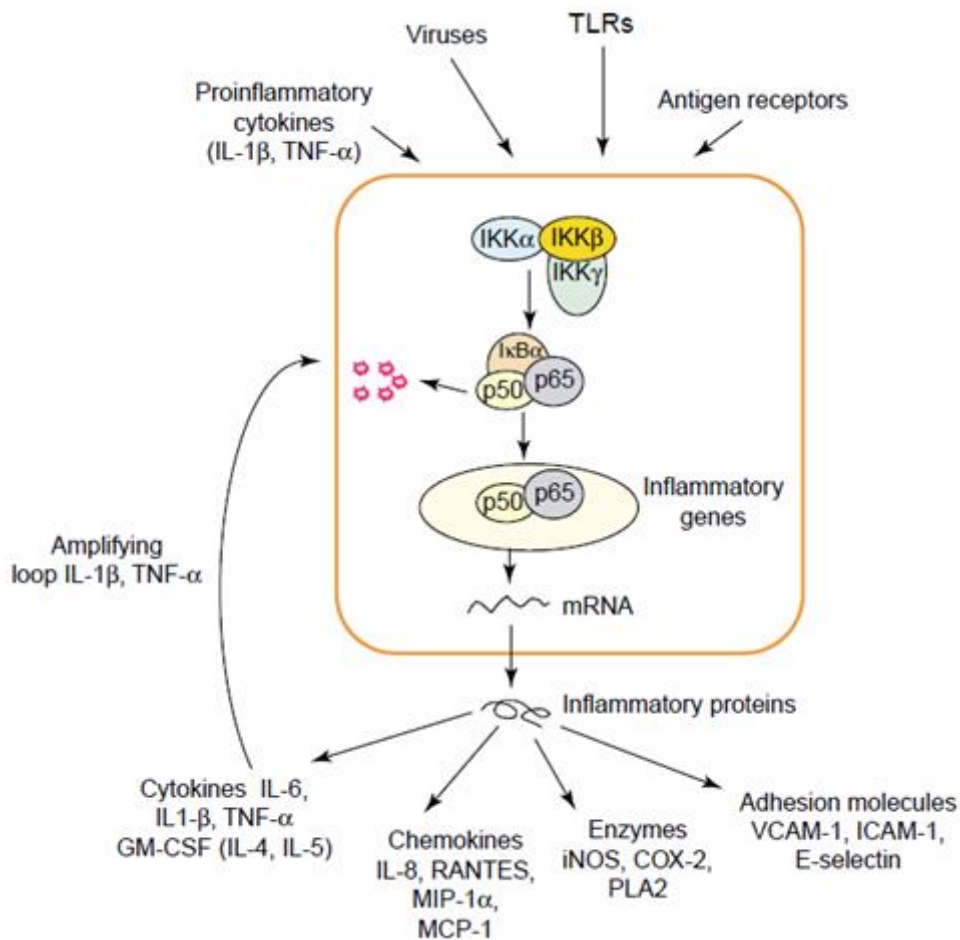


Figure 15 : **La voie d'activation de NF $\kappa$ B** (Bonizzi and Karin, 2004).

La voie de NF $\kappa$ B est activée par une variété de signaux inflammatoires, entraînant une expression coordonnée de multiples gènes inflammatoires et de l'immunité innée. Les cytokines pro-inflammatoires IL1 $\beta$  et TNF $\alpha$  activent NF $\kappa$ B et leur expression est induite en réponse à l'activation de NF $\kappa$ B formant ainsi une boucle d'amplification.

## b) La réponse inflammatoire

Lorsque qu'une agression est détectée (infection, lésion tissulaire) la réponse inflammatoire se met en place afin de palier à ce phénomène et permet l'élimination du stimulus nocif et un retour à une situation d'homéostasie. Cette réponse inflammatoire se décompose dans une phase de détection de l'agression (décrite de manière centrée sur la cellule épithéliale dans le chapitre précédent, en raison de l'objet de notre étude), une phase vasculaire, une phase cellulaire et une dernière phase de résolution.

### - La phase vasculaire

Dès qu'un pathogène pénètre dans l'organisme ou qu'un signal endogène dangereux est détecté, il est immédiatement reconnu grâce aux PRR présent sur les cellules résidentes

de l'intestin comme les cellules épithéliales, les macrophages, les lymphocytes intraépithéliaux ou encore les CLI. Ces cellules vont produire d'importantes quantités de médiateurs lipidiques, de cytokines et de chimiokines afin d'induire une réponse coordonnée de la part des vaisseaux sanguins et des leucocytes. Ces médiateurs inflammatoires permettent d'augmenter la perméabilité vasculaire et d'augmenter l'adhérence des cellules de l'endothélium afin de favoriser le passage des leucocytes de la circulation sanguine vers le site inflammatoire. Ils permettent aussi d'activer les cellules phagocytaires comme les macrophages afin de favoriser leur activité microbicide et d'activer les cellules NK (CLI). Pour cela, les médiateurs inflammatoires augmentent la cytotoxicité de ces 2 types cellulaires et induisent la production de cytokines complémentaires (Medzhitov, 2008). L'activation des cellules endothéliales déclenche la cascade protéolytique des kinines et de la coagulation. La bradykinine de la cascade des kinines augmente encore la perméabilité endothéliale tandis que la coagulation va entraîner la formation de caillots afin de limiter la propagation des pathogènes (Nathan, 2002).

Les médiateurs de l'inflammation sont nombreux et divers. Les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1 $\beta$  ou le TNF $\alpha$  activent les macrophages et les mastocytes et jouent un rôle important dans l'induction de l'inflammation. Les médiateurs lipidiques comme les prostaglandines et les leucotriènes sont produits à partir de l'acide arachidonique qui est généré à partir de phospholipides de la membrane cellulaire par la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). L'acide arachidonique est ensuite converti en prostaglandine par la cyclo-oxygénase (COX-1 et COX-2) ou en leucotriène. Les stimuli inflammatoires activent la PLA<sub>2</sub> et induisent la synthèse de COX-2 (Dubois et al., 1998). Ces COX produisent la prostaglandine H<sub>2</sub> qui sera ensuite convertie en d'autres prostaglandines (comme la prostaglandine E<sub>2</sub>). Elles ont des récepteurs spécifiques permettant par exemple l'augmentation de la perméabilité vasculaire conduisant à la formation d'un œdème (Tilley et al., 2001). Ces médiateurs lipidiques peuvent aussi agir sur les fibres nerveuses sensibles et provoquer un message douloureux.

La phase vasculaire de l'inflammation est ainsi mise en place induisant les 4 signes cardinaux de l'inflammation : rougeur, chaleur, douleur et gonflement.

- La phase cellulaire

Une fois les cellules résidentes activées par l'agression tissulaire, la production massive de cytokines et de chimiokines va permettre le recrutement de cellules inflammatoires depuis la circulation sanguine (Muller, 2013).

Le  $TNF\alpha$  et l' $IL1\beta$  activent les cellules endothéliales : elles vont exprimer la sélectine P et la sélectine E à leur surface (Rosen et al., 2004). Lorsque les leucocytes circulants rencontrent ces molécules, ils interagissent avec elles par l'intermédiaire de protéines soufrées exprimées constitutivement et sont ralentis. Ils roulent à la surface des cellules endothéliales, formant de plus en plus de liaisons avec les sélectines (Figure 16). La détection des chimiokines liées aux cellules endothéliales induit un aplatissement des cellules immunitaires et leur liaison avec des intégrines de hautes affinités qui reconnaissent ICAM1 et VCAM (exprimés sur les cellules endothéliales grâce aux cytokines pro-inflammatoires). Cette adhérence devient irréversible. Les leucocytes font ensuite la diapédèse : ils migrent entre 2 cellules endothéliales et quittent la circulation sanguine pour rejoindre le site de l'inflammation (Mempel et al., 2004).

Des gradients de chimiokines et de chimioattractants dirigent les leucocytes vers le tissu lésé. Les leucocytes recrutés dépendent des chimiokines sécrétées au niveau du site inflammatoire. Les premières cellules infiltrées sont les neutrophiles, attirés notamment par CXCL8 produit en réponse à l' $IL1\beta$  et le  $TNF\alpha$ . Les monocytes, qui se différencient en macrophages sont ensuite attirés sur le site inflammatoire par l' $IL6$  (Rot and von Andrian, 2004).

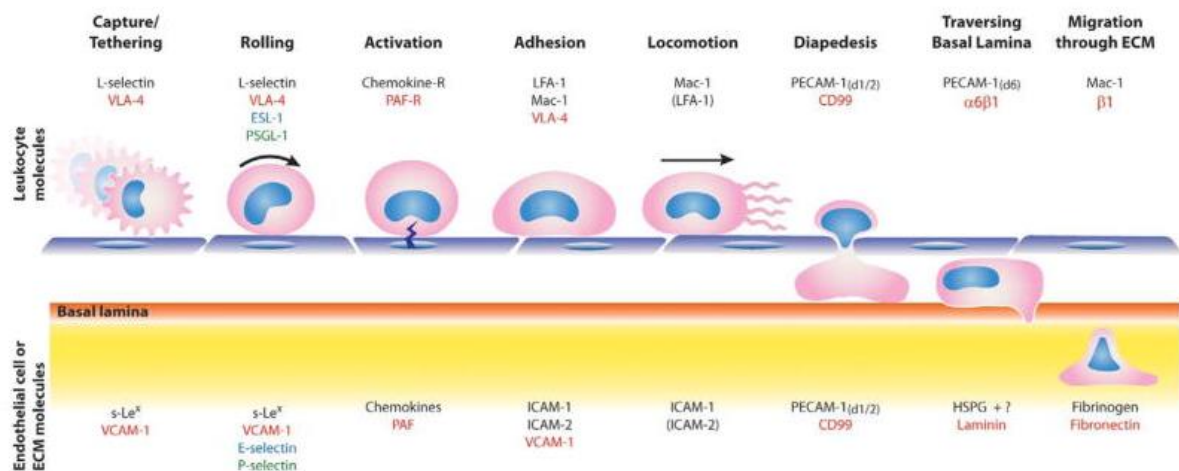


Figure 16 : **Recrutement des leucocytes au site d'infection** (Muller, 2013).



Les étapes séquentielles dans la migration des leucocytes sont contrôlées par l'interaction entre des molécules spécifiques sur les leucocytes et leurs contre-récepteurs sur les cellules endothéliales.

- La phase de résolution

Cette phase correspond à une diminution de la réponse inflammatoire jusqu'à un retour à une situation d'homéostasie du tissu.

Les neutrophiles, après avoir réalisés leurs actions effectrices inflammatoires au sein du tissu, entrent en apoptose (Fox et al., 2010). Les macrophages phagocytent ces neutrophiles apoptotiques. La clairance des neutrophiles en apoptose induit un changement des macrophages d'un phénotype de pro inflammatoire vers un phénotype antiinflammatoire (Michlewska et al., 2009). Les macrophages anti-inflammatoires (M2) sont capables de produire des métalloprotéases (MMP12) qui inactive par clivage les chimiokines comme CCL7, connus pour attirer les cellules pro-inflammatoires (McQuibban et al., 2002). Les chimiokines permettent d'orchestrer la migration des leucocytes sur le site de l'inflammation, leur inactivation stoppe l'afflux des cellules inflammatoires. De plus, les neutrophiles pro-apoptotiques relarguent des molécules comme l'annexine A1 qui réduit le recrutement des neutrophiles en diminuant leur adhésion et leur migration (Dalli et al., 2008). Le changement de phénotype des macrophages leur permet de produire des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL10 et le TGF $\beta$  (Fadok et al., 1998). Les médiateurs lipidiques tels que les lipoxines, les resolvines et les protectines sont importants pour la phase de résolution (Serhan et al., 2008). Les Tregs jouent un rôle important dans cette résolution et font le lien entre l'immunité innée et adaptative. Ils peuvent inhiber les fonctions des lymphocytes pro-inflammatoires via une reconnaissance spécifique de l'antigène, mais ils sont aussi capables d'effectuer leurs actions antiinflammatoires en l'absence de stimulation antigénique (D'Alessio et al., 2009).

Le retour à l'homéostasie tissulaire après une lésion inflammatoire nécessite la réparation du tissu intestinal et le rétablissement de ses fonctions. Les macrophages produisent des facteurs de croissances afin de promouvoir la prolifération et la différenciation des cellules, ainsi que des protéases et leurs inhibiteurs pour le remodelage de la matrice extracellulaire. Le TGF $\beta$  produit par les macrophages et les Treg va favoriser la régénération et la cicatrisation de l'épithélium intestinal en activant la prolifération des cellules de la crypte, leur différenciation ainsi que la migration

cellulaire afin de combler l'épithélium lésé (Iizuka and Konno, 2011). Les macrophages sécrètent aussi du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) afin de promouvoir l'angiogenèse et l'oxygénation du tissu (Knighton et al., 1983).

### 3- La douleur viscérale

La douleur nous permet de détecter et d'être alerter de la présence d'un stimulus dangereux (pouvant causer des dommages ou être nocif). Cette douleur est générée par la détection par le système nerveux périphérique de stimuli dans les tissus ou les organes, puis par l'interprétation par le système nerveux central de ces messages. Dans le cas de douleur d'origine viscérale, contrairement à la douleur somatique, la douleur est diffuse, et l'on ne peut identifier précisément l'organe qui en est l'origine. En cela, la douleur viscérale diffère de la douleur somatique, ceci s'expliquant par des mécanismes neurobiologiques et psychologiques différents.

Dans le cadre de nos travaux nous nous intéresserons uniquement à la douleur viscérale et plus particulièrement à la douleur viscéro-colique.

#### a) Définition

La douleur viscérale est un terme générique utilisé pour décrire une douleur provenant des organes internes, qui est distincte de la douleur somatique. Il existe une étiologie multiple de ces douleurs comme l'inflammation (aigüe ou chronique), l'interruption des processus mécaniques normaux, l'altération de neurotransmetteurs viscéraux et l'ischémie (Larauche et al., 2012) (Stoney and Reilly, 1983). La douleur viscérale possède des caractéristiques particulières, en dehors de toutes autres modalités de la douleur (*adapté de* (Moloney et al., 2015)) :

- 1- Toutes les viscères ne possèdent pas d'innervation sensorielle
- 2- La douleur viscérale ne peut pas être liée à des dommages viscéraux
- 3- La douleur viscérale est diffuse et difficilement localisable
- 4- La douleur viscérale est accompagnée de réflexes moteurs et autonomes

La douleur viscérale est associée à de nombreux désordres comme la pancréatite, l'appendicite aigue, le SCI, les MICI, les reflux gastro-œsophagiens, la cystite (Farmer and Aziz, 2013).

Les voies de la sensation douloureuse passent par la périphérie et le SNC. La communication des informations sensorielles de l'intestin vers le système nerveux central passe par les nerfs vagues, pelviens et splanchniques (Figure 17). Les afférences vagales innervent le tractus gastro-intestinal depuis l'œsophage jusqu'au côlon transverse. Les nerfs pelviens innervent le restant du côlon et le rectum. Un petit groupe d'afférences appelées afférences splanchniques dont les corps cellulaires proviennent de la région thoracolombaire de la moelle épinière innerve tout le tractus gastro-intestinal (Larauche et al., 2012).

Les fibres nerveuses afférentes primaires innervant les viscères se projettent dans le SNC par 3 voies principales : le nerf vague, les voies sympathiques et le nerf pelvien (voies parasympathique). Les afférences primaires qui signalent au SNC résident principalement dans les ganglions nodoses vagues qui projettent au niveau du noyau du tractus solitaire situé dans la moelle du tronc cérébral et dans les ganglions dorsaux T2-L2 et S1-5 (Vermeulen et al., 2014).

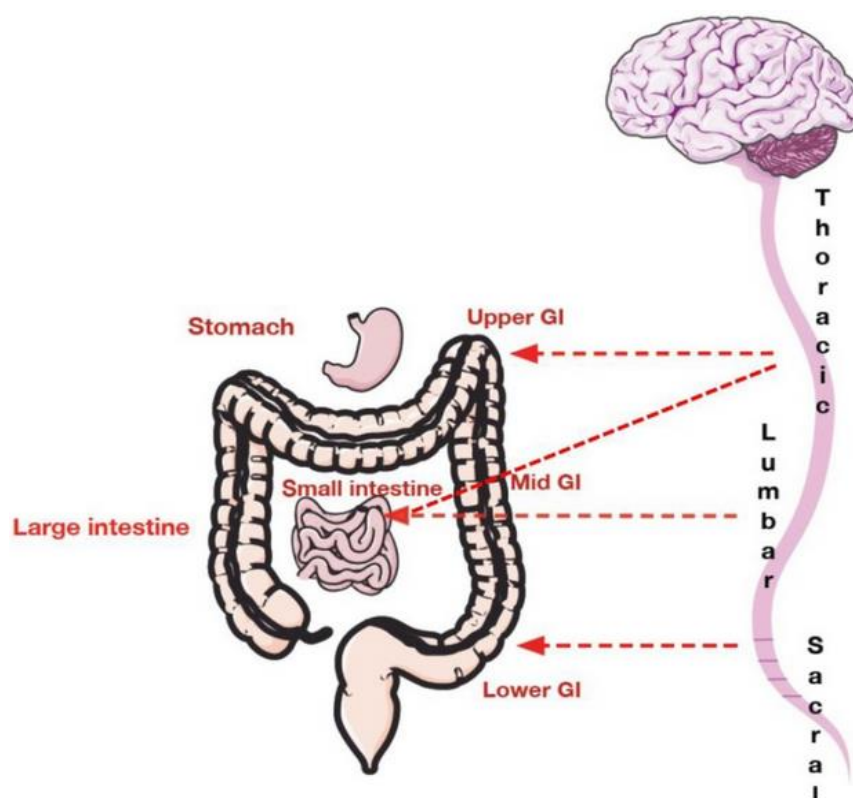


Figure 17 : **Innervation spinale du tractus gastro-intestinal** (Moloney et al., 2015).

Le tractus intestinal supérieur (y compris l'œsophage et l'estomac) est innervé par les afférences thoraciques et lombaires. L'intestin grêle est innervé par les afférences thoraciques et lombaires. Les tractus moyen à inférieur, comprenant le côlon, est innervé par des afférences lombaires inférieures et des afférences sacrées supérieures. La région pelvienne est innervée par des afférences sacrées.

## b) Les nocicepteurs de la douleur viscérale

La transmission du message douleur est possible grâce à l'activation de nocicepteurs. Le terme nocicepteur est utilisé pour définir les récepteurs de la douleur mais est aussi étendu aux fibres afférentes sensibles.

L'excitation des nocicepteurs doit dépasser un certain seuil (seuil de sensibilité) pour induire une signalisation (Dubin and Patapoutian, 2010).

### - Les récepteurs impliqués dans la douleur viscérale

Il existe de nombreux récepteurs impliqués dans la signalisation de la douleur viscérale. Ces récepteurs sont présents sur les fibres afférentes primaires innervant l'intestin. Nous nous intéresserons uniquement aux récepteurs impliqués dans la douleur viscérale associée au SCI.

Les récepteurs tachykinergiques comptent 3 principaux membres sont NK1, NK2 et NK3. Leurs agonistes principaux sont la substance P, la neurokinine A et la neurokinine B (Almeida et al., 2004). Ce sont des récepteurs couplés aux protéines G. Chez la souris, le blocage de NK1 (par un antagoniste ou chez un animal déficient) entraîne une diminution de l'hypersensibilité viscérale (Laird et al., 2001a) (Julia et al., 1994). Chez l'Homme, un antagoniste du NK2 (l'iboduant) réduit la douleur viscérale chez les patients atteints de SCI (Tack et al., 2006).

Les récepteurs à la sérotonine sont activés par la sérotonine provenant en majorité des mastocytes et des cellules entérochromaffines dans l'intestin. Le récepteur 5-HT<sub>3</sub> est un canal ionique. Son activation est corrélée à une augmentation de l'hypersensibilité viscérale (Stasi et al., 2014). Le récepteur 5-HT<sub>4</sub> est un récepteur couplé aux protéines G, son activation devrait augmenter l'activation neuronale, pourtant, elle diminue l'excitabilité neuronale (Grundy, 2002). L'activation de 5HT<sub>4</sub> entrainerait la libération d'opioïdes ce qui provoquerait une analgésie (Sengupta et al., 2014).

Les récepteurs à l'histamine (HR1 à 4) sont des récepteurs couplés aux protéines G. HR1 et HR2 sont des récepteurs activateurs alors que HR3 et HR4 sont des récepteurs inhibiteurs (Nieto-Alamilla et al., 2016). Dans l'intestin, les mastocytes sont la source majeure d'histamine. Des souris déficientes pour HR1 présentent une diminution de la sensibilité viscérale. Ces récepteurs ont donc un rôle dans l'hypersensibilité viscérale. L'antagoniste de HR1 a été utilisé pour réduire la sensibilité viscérale des patients atteints de SCI (Wouters et al., 2016).

L'activation des récepteurs gabaergiques (GABA<sub>B</sub>) entraîne une réduction de l'activité neuronale. GABA<sub>B</sub> est un récepteur couplé aux protéines G qui possède un rôle inhibiteur de la douleur viscérale (Hara et al., 1999). Un antagoniste de ce récepteur (la gabapentine) est utilisé chez les patients atteints de SCI afin de réduire l'hypersensibilité viscérale (Lee et al., 2005).

Les récepteurs aux opioïdes sont couplés aux protéines G et inhibent l'activation neuronale. Chez la souris, l'activation de ces récepteurs diminue l'hypersensibilité viscérale en réponse à la distension colrectale (Sengupta et al., 1996). Leur activation par des opioïdes est utilisée pour soulager les douleurs viscérales des patients atteints de SCI (Vera and Júdez, 2017).

Les TRPs (Transient Receptor Potencial) sont des canaux ioniques activés par des stimuli chimique, thermique et mécanique notamment en condition inflammatoire ou nociceptive. Ils sont impliqués dans la nociception. Ils sont exprimés sur les afférences des nerfs viscéraux (Julius, 2013) et sont impliqués dans la douleur viscérale. Par exemple, l'AITC (isothiocyanate d'allyle), molécule responsable du piquant de la moutarde, active le TRPA1 sur les neurones sensitifs induisant des douleurs abdominales (Bautista et al., 2006).

Ces récepteurs peuvent être potentialisés par l'activation des PARs (Amadesi et al., 2004). Les PARs ont un rôle important dans la douleur (voir chapitre 4).

#### - L'activation des nocicepteurs

Après l'activation du neurone par un stimulus au niveau d'un nocicepteur, la propagation du message douloureux jusqu'à la moelle épinière se fait grâce à des potentiels d'actions générés par des canaux sodiques et potassique voltage-dépendants. Les canaux calciques vont permettre la libération de neurotransmetteurs dans la

synapse ce qui va permettre de poursuivre la transmission de l'information douloureuse jusqu'en central.

Dans certaines pathologies, notamment le SCI, une forte activation des neurones sensitifs peut augmenter leur sensibilité. Lorsque cette sensibilisation se produit, le seuil d'activation du nocicepteur est réduit et son excitabilité augmente. Le changement de signalisation peut être médié par les canaux ioniques neuronaux déclenchés par le processus d'inflammation neurogénique (impliquant la libération de médiateurs sensoriels afférents), une lésion nerveuse, des mécanismes immunologiques ou après des dommages cellulaires. Le processus inflammatoire peut sensibiliser ces nocicepteurs en modifiant l'expression de plusieurs canaux ioniques (Akbar et al., 2009).

**Les canaux sodiques** : ces canaux sont exprimés sur les fibres des neurones sensitifs. Ils peuvent être sensibles à la tetrodotoxine comme Nav 1.1, 1.6 et 1.7 ou résistant comme Nav 1.8 et 1.9. Le canal Nav 1.7 est impliqué dans de nombreuses pathologies sensitives (Cox et al., 2006). La délétion de ce gène chez les patients entraîne une perte du réflexe nociceptif dû à une perte de détection des stimuli douloureux. Chez les patients ayant une hypersensibilité rectale, les canaux Nav1.7 des fibres nerveuses immunoreactives sont augmentés (Yiangou et al., 2007).

Des analgésiques ciblant spécifiquement ces canaux sont développés afin de réduire les douleurs inflammatoires.

**Les canaux calciques** : les canaux calciques humains sont regroupés en 3 familles : les canaux  $Ca_v1$  (1.1-1.4) qui conduisent des courants de type L, les canaux  $Ca_v2$  (2.1-2.3) qui conduisent des courants de type N, P/Q et R et les canaux  $Ca_v3$  (3.1-3.3) qui conduisent des courants de type T (Cribbs, 2006).

L'inhibition pharmacologique ou génétique de  $Ca_v3.2$  diminue l'hypersensibilité viscérale chez le rat dans un modèle de SCI (Marger et al., 2011).

#### - Les fibres afférentes

Dans l'intestin, les fibres afférentes sont constituées principalement des fibres C non myélinisées et dans une moindre mesure, des fibres  $A\delta$ .

Les fibres afférentes myélinisées  $A\delta$  sont de diamètre moyen (1 à 5  $\mu\text{m}$ ) et transmettent des signaux de douleurs aiguës et rapides. Elles diffèrent beaucoup des fibres  $A\beta$  de gros diamètre, impliquées dans les réponses aux stimuli non nociceptif. Les fibres C non

myélinisées ont un petit diamètre (0,3 à 1,5 $\mu$ m) et véhiculent des douleurs plutôt lentes. Elles sont très hétérogènes. Dans l'intestin, ces fibres innervent les muscles intestinaux, la séreuse et le mésentère (Sengupta et al., 1996). Elles sont activées par des stimuli chimiques lors de la distension de l'intestin ou de la réponse inflammatoire.

Les fibres C ont aussi une grande hétérogénéité dans les peptides qu'elles produisent. Elles peuvent être divisées en une population peptidergique qui relargue de la substance P, des neuropeptides et du CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) (Snider and McMahon, 1998), et des fibres non peptidergiques qui expriment le récepteur à la neutrophine c-Ret activé par le GDNF (Gial-Derived Neutrophic factor), la neurine et l'artémicine.

#### - Transmission d'informations

Les nocicepteurs n'ont pas une transmission d'informations unipolaire. Ils possèdent une morphologie particulière ou les terminaisons centrales et périphériques proviennent d'un axone commun. Les protéines synthétisées par les DRG sont donc envoyées aux terminaisons centrales mais aussi périphériques. Ils peuvent donc envoyer et recevoir des messages de toutes leurs terminaisons. Lors d'un stimulus, seules les terminaisons périphériques signalent mais les nocicepteurs répondent en central et en périphérique. Cela permet de réguler finement la sensibilité (Basbaum et al., 2009).

Les fibres des nocicepteurs projettent dans la corne dorsale de la moelle épinière qui est organisée en différentes lamina. Les neurones présents dans la lamina I répondent aux stimuli douloureux (fibres A $\delta$  et C), ceux présents dans la lamina III et la IV sont impliqués dans la réponse aux stimuli inoffensifs (fibres A $\beta$ ) et les neurones de la lamina V répondent à des signaux douloureux et non douloureux par les fibres A $\delta$ , A $\beta$  et C (Braz et al., 2005).

#### - Communication des nocicepteurs avec le SNC

Les projections des nocicepteurs dans la lamina I et V de la corne dorsale de la moelle épinière permettent une communication spinothalamique et spinoreticulothalamique. Le message douloureux est envoyé au thalamus qui permet une discrimination des aspects sensoriels de l'expérience de douleur (intensité du stimulus), et au tronc cérébral (localisation de la douleur) (Figure 18). Il n'existe pas une aire spécifique de la douleur, mais celle-ci résulte de l'activation de différentes structures comme le cortex

somatosensoriel (associé à des propriétés sensorio-discriminatives), le gyrus cingulaire ou le cortex insulaire (impliqués dans les aspects sensoriels) (Apkarian et al., 2005).

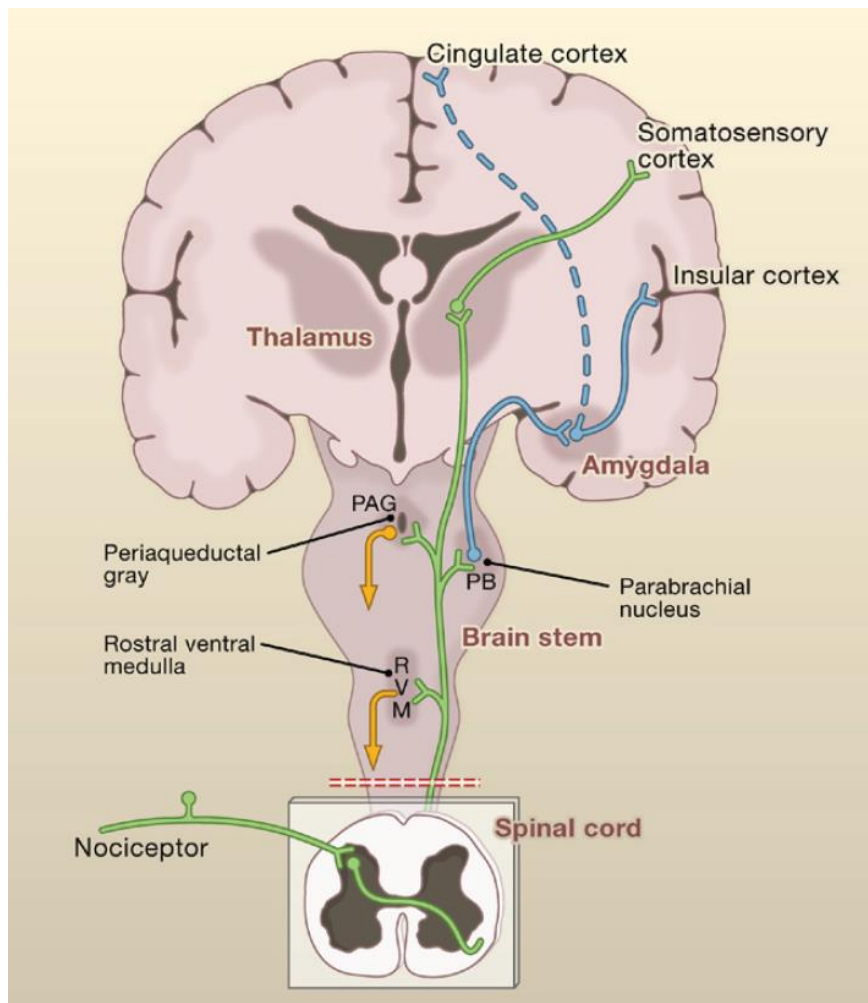


Figure 18 : **Anatomie de la voie de la douleur.** (Basbaum et al., 2009).

Les nocicepteurs afférents primaires transmettent des informations nociceptives aux neurones via des projections dans la corne dorsale de la moelle épinière. Un sous ensemble de ces projections neuronales transmet l'information du cortex somatosensoriel via le thalamus, en fournissant des informations sur l'emplacement et l'intensité du stimulus douloureux. D'autres neurones projettent dans les cortex cingulaires et insulaires via des connexions dans le tronc cérébral (noyau parabrachiale) et l'amygdale, contribuant à la composante affective de l'expérience de la douleur.

### c) Les médiateurs de la douleur

Les fibres nerveuses peuvent être sensibilisées par de nombreux médiateurs de l'environnement cellulaire. Les lésions tissulaires ou les inflammations induisent la



sécrétion par les cellules de l'environnement (cellules épithéliales, immunitaires...) de médiateurs endogènes capables d'activer les neurones sensitifs. Ces médiateurs peuvent être de différentes natures comme des neurotransmetteurs (substance P, CGRP, bradykinine), des lipides (prostaglandines, thromboxanes, leukotriènes, endocanabinoïdes), protéases (voir chapitre 4), cytokines, chimiokines et le NGF (Nerve Growth Factor). Ils peuvent être sécrétés par un grand nombre de cellules comme les neutrophiles, les mastocytes, les plaquettes, les cellules endothéliales, épithéliales et les fibroblastes. Les neurones possèdent les récepteurs pour reconnaître et répondre à ces facteurs. Ces activations augmentent l'excitabilité des fibres et entraînent une sensibilité plus importante (McMahon et al., 2005).

Le NGF, produit lors de lésions, peut interagir directement avec les fibres C peptidergiques qui expriment le récepteur au NGF, TrkA (tyrosine kinase NGF receptor), et induire une hypersensibilité à la chaleur et aux stimuli mécaniques (Chao, 2003). Les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1, l'IL6 et le TNF $\alpha$  potentialisent l'hypersensibilité des fibres nociceptives en entretenant l'inflammation et en induisant la production d'agents pro-algésiques comme les prostaglandines ou le NGF (Staud, 2015).

Cette activation constante des fibres nociceptives peut conduire à une hypersensibilité qui pourra entraîner une hyperalgésie. L'hyperalgésie se caractérise par une réponse nociceptive disproportionnée à un stimulus douloureux.

#### d) Mesure de la douleur viscérale

Les patients atteints de douleurs viscérales comme les patients atteints de SCI ont une perception de la distension colorectale altérée et augmentée par rapport à des individus sains (Mertz et al., 1995) (Mayer and Gebhart, 1994). La distension colorectale est la méthode la plus utilisée pour mesurer la réponse nociceptive à l'aide du réflexe abdominal. Cette technique consiste à l'insertion d'un ballon dans la cavité colorectale d'un patient. A l'aide d'un barostat, le côlon est distendu avec différentes pressions ascendantes. On mesure les variations de pressions du côlon en réponse à la distension ainsi que le nombre de réflexe abdominal (O'Mahony et al., 2012). Ces données reflètent la sensibilité viscérale des patients.

Cette technique peut aussi être appliquée chez l'animal (Larauche et al., 2011). Une autre méthode utilise la mesure des signaux électromyographiques. Cette procédure consiste à implanter des électrodes dans les muscles abdominaux de souris, de les faire passer sous la peau afin de les externaliser et de mesurer la contraction de ces muscles en réponse à la distension du côlon (Bradesi et al., 2005a). L'hypersensibilité viscérale induit des contractions de l'abdomen appelées réponse viséromotrice (RVM) (Morteau et al., 1994). La RVM est corrélée avec l'intensité du stimulus.

L'organisme a mis en place une réponse inflammatoire organisée afin de lutter contre les pathogènes et les stress cellulaires. La douleur en fait partie, elle permet à l'individu d'être alerté des potentiels dommages dus à une agression tissulaire. Cependant, dans le cas de pathologies, la réaction inflammatoire comme les sensations douloureuses peuvent être incontrôlées et devenir chronique.

## CHAPITRE 3 :

# MICI et SCI : pathologies intestinales impliquant inflammation et douleur

### 1- Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (ou MICI) comprennent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces pathologies sont répandues avec une personne sur 198 touchées pour la rectocolite hémorragique et une sur 310 atteintes pour la maladie de Crohn (Molodecky et al., 2012).

#### a) Aspects cliniques

##### - La Maladie de Crohn

La maladie de Crohn (ou MC) affecte l'ensemble du tractus gastro-intestinal de la bouche à l'anus. L'inflammation est présente dans le tractus de manière discontinue et affecte l'ensemble de la muqueuse intestinale (ou de manière transmurale). Certaines complications comme des fistules, des strictures ou des abcès peuvent apparaître. Lors du premier diagnostic, la maladie est présente chez 47% des patients dans l'iléon terminal, pour 28% dans le côlon, 21% dans l'iléo-côlon et pour 3% dans la partie supérieure du tractus (Louis et al., 2001). Les symptômes incluent des diarrhées, des douleurs abdominales, de la fièvre, des signes d'obstruction intestinale ou encore des saignements et/ou du mucus dans les selles.

Le diagnostic de la MC est réalisé après un examen physique, un suivi de l'histoire du patient, ainsi qu'une endoscopie et un suivi histologique. On peut observer sur la figure 19, une endoscopie du côlon d'un patient MC présentant des érythèmes, une hyperplasie et des ulcères, ainsi qu'une coupe histologique de biopsie de la muqueuse avec un granulome.

Un indice d'activité de la maladie est réalisé afin de diagnostiquer la sévérité de la pathologie :

moyen à modéré	le patient tolère les aliments sans déshydratation, toxicité ou sensibilité abdominale ni perte de poids supérieure à 10%
modéré à sévère	absence de réponse aux traitements, fièvre, perte de poids, douleur ou sensibilité abdominale, nausée et vomissement sans anémie
sévère à fulminant	persistance des symptômes malgré un traitement par corticoïdes, forte fièvre, vomissement, obstruction intestinale, abcès et douleurs abdominales

(D'après (Hanauer et al., 2001)).

Les phases de remissions chez les patients correspondent à des phases asymptomatiques ou sans séquelle inflammatoire (patients répondant aux traitements médicamenteux ou à la chirurgie). Dans la première année après le diagnostic de la pathologie, 10 à 30% des patients ont une exacerbation de la maladie, 15 à 25% une faible activité de la maladie et 55 à 65% sont en rémission. Dans les 20 années qui suivent le diagnostic, de nombreux patients auront recours à la chirurgie (Loftus et al., 2002).

- La rectocolite hémorragique

La rectocolite hémorragique (ou RCH) s'étend à partir de l'anus et remonte vers le caecum. L'inflammation est continue et restreinte à la muqueuse intestinale. Les patients sont classifiés suivant la localisation de l'inflammation : proctite (inflammation du côlon distal), colite du côté gauche (inflammation du côlon sigmoïde et (ou non) du côlon descendant) et pancolite (inflammation jusqu'au côlon proximal). Un petit nombre de patients peut développer une inflammation iléale qui peut devenir une iléocolite.

Les patients présentent des diarrhées sanglantes (nocturne ou post-prandiale), avec une présence importante de pus et/ou de mucus ainsi que des crampes abdominales dues aux mouvements intestinaux.

Le diagnostic clinique de cette pathologie se fait par endoscopie et étude histologique afin de confirmer la présence de colite et l'absence d'infection. Certains changements de la muqueuse sont caractéristiques de la RCH comme la perte de vascularisation, la granularité, la friabilité de la muqueuse et des ulcérations. D'un point de vue microscopique, on observe une distorsion et une atrophie des cryptes et une infiltration de cellules immunitaires dans la *lamina propria* (Nostrant et al., 1987). On observe sur la figure 19, des lésions macroscopiques du tube digestif (ulcération et hémorragie



**Figure 19 : Examen anatomopathologique de côlon de patients atteints de MICI** (Baumgart and Carding, 2007).

Endoscopie et coupes histologiques de biopsie de côlon de patients atteints de MICI colorées par de l'hémalum- éosine

- Manifestations extra-intestinales

Environ 25% des patients atteints de MICI (MC et RCH confondues) développent des manifestations et des complications extra-intestinales. Celles-ci sont résumées sur la figure 20.

Les atteintes les plus connues sont articulaires (spondylarthrite ankylosante, arthrite périphérique), cutanées (pyoderma gangrenosum, érythème noueux), oculaires (uvéïte) et biliaire (cholangite sclérosante primitive). Elles peuvent être ou non liées aux traitements, notamment à l'immunodépression induit par les immunosuppresseurs, ou à l'évolutivité des MICI. On retrouve aussi des atteintes neurologiques comme une augmentation du risque de démyélinisation ainsi que des atteintes pulmonaires (Roblin and Bonaz, 2007).

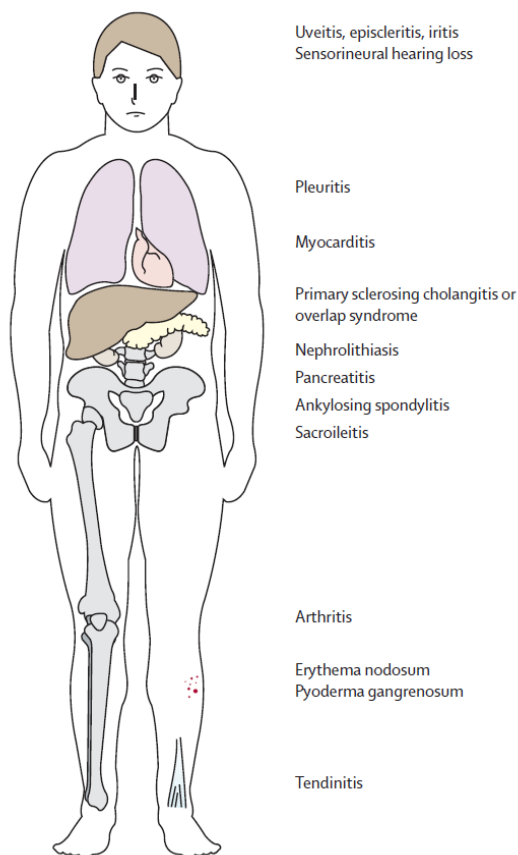


Figure 20 : **Manifestations extra-intestinales fréquentes des MICI** (Baumgart and Carding, 2007)

## b) La physiopathologie

### - La rupture de la barrière épithéliale

Chez les patients atteints de MICI, l'augmentation de la perméabilité épithéliale est un facteur de la pathologie (Capaldo et al., 2017). Les causes sont multiples. En condition inflammatoire la barrière épithéliale est soumise à des nombreux facteurs comme les cytokines pro-inflammatoires qui favorisent son affaiblissement, comme décrit au chapitre 2.

L'architecture des jonctions serrées est modifiée chez les patients atteints de MICI. Le gène HNF4a est impliqué dans la pathologie. HNF4a est un facteur de transcription qui régule l'expression des claudines. Les patients atteints de MICI présentent une importante diminution des claudines 1 à 4 (Hering et al., 2012). De plus, une corrélation entre le niveau d'expression de la MLCK et l'activité de la pathologie a été montrée (Blair et al., 2006).

Chez les patients atteints de RCH, le nombre de cellules à mucus ainsi que leur sécrétion de MUC2 sont diminués (Sun et al., 2016). A l'inverse, les patients atteints de MC présentent un taux de mucus plus important mais celui-ci ne parvient pas à contenir les bactéries du microbiote (Johansson et al., 2014). Ces données suggèrent que d'autres modifications structurelles des mucines doivent avoir lieu impliquant d'autres médiateurs inflammatoires. Les protéases et notamment l'élastase pourraient être capables de dégrader les protéines de mucines favorisant ainsi le relâchement de la barrière de mucus (voir chapitre 4).

L'augmentation de la perméabilité épithéliale favorise la translocation bactérienne ce qui entretient l'inflammation intestinale.

### - Les facteurs immunologiques

Les cellules épithéliales intestinales (CEI) participent à la pathologie des MICI. Les CEI de ces patients ont leurs capacités suppressives de LT CD8<sup>+</sup> réduites (Mayer and Eisenhardt, 1990). De plus, elles possèdent une expression de PPAR $\gamma$  fortement

diminuée chez les patients atteints de RCH (Dubuquoy et al., 2003). Ce récepteur nucléaire est capable de supprimer la production de molécules pro-inflammatoires.

Les cellules épithéliales sécrètent de très faibles quantités de TSLP qui pourraient conditionner les cellules dendritiques à promouvoir l'inflammation (Rimoldi et al., 2005). Les CD expriment un niveau important de TLR2 et de TLR4, mais aussi de CD40, chez les patients atteints de MC et de RCH. Elles produisent plus d'IL12 et d'IL6 que des individus sains (Hart et al., 2005). Chez les patients atteints de MC, elles expriment plus le récepteur aux chimiokines CCR7 qui contribue à l'attraction des CD sur le site inflammatoire (Middel et al., 2006).

La MC a longtemps été considérée comme une pathologie pro-Th1 à cause de l'importante production d'IL12 et d'IFN $\gamma$  alors que la RCH était plutôt pro-Th2 car on observait une importante quantité d'IL5 et d'IL13 mais de faible concentration d'IL4 (Weaver and Hatton, 2009). Ce paradigme a été remis en cause avec la découverte des lymphocytes Th17. Le profil lymphocytaire est donc plus complexe et associe des réponses Th1 et Th17. Les lymphocytes des patients atteints de MC produisent de l'IL17 et de l'IFN $\gamma$  (Annunziato et al., 2007), et plus particulièrement, les Th17 de ces patients produisent d'importantes quantités d'IL21 qui promeut la différenciation des lymphocytes T en Th1 avec production d'IFN $\gamma$  (Monteleone et al., 2005).

En l'absence d'une régulation fine de la réponse immunitaire, l'inflammation peut s'intensifier et devenir chronique. Le rôle des lymphocytes Treg dans cette pathologie est peu connu actuellement. Le nombre de LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> dans le sang et la *lamina propria* des patients est augmenté dans les phases actives de la maladie (Maul et al., 2005). Ceci suggère que leurs capacités immunosuppressives ne sont peut-être pas suffisantes pour réguler l'inflammation intestinale des patients atteints de MICI (Huibregtse et al., 2007). Il serait donc intéressant d'augmenter l'activité des Treg. Or le blocage du TNF $\alpha$  restaure les fonctions immunosuppressives des Treg (Valencia et al., 2006). Le traitement aux anticorps dirigés contre le TNF $\alpha$  augmente le nombre de Treg dans la muqueuse d'enfants atteints de MC (Ricciardelli et al., 2008) et diminue l'apoptose de ces mêmes cellules chez l'adulte (Veltkamp et al., 2011).

#### - La dysbiose

Les patients atteints de MICI ont un microbiote altéré : on parle ainsi de dysbiose. Ce microbiote est modifié tant qualitativement que quantitativement. Chez les patients



atteints de MC, il y a une augmentation des Bacteroidetes et des Proteobacteries et une diminution des Firmicutes (Man et al., 2011), accompagnées d'une diminution de la diversité bactérienne (Hansen et al., 2012). La modification du microbiote de patients atteints de RCH est aussi bien documentée mais moins établie que chez ceux atteints de MC (Andoh et al., 2011). Certaines bactéries sont diminuées chez les patients atteints de MC comme *Bacteroides fragilis* qui produit le polysaccharide A qui est capable d'inhiber l'IL17 et protège de la colite (Mazmanian et al., 2008), mais aussi *Faecalibacterium prausnitzii* qui a des propriétés anti-inflammatoires (Quévrain et al., 2016). L'exposition aux antibiotiques renforce cette dysbiose. De plus chez les patients atteints de MICI, la couche de mucus présente sur l'épithélium intestinal n'est plus aussi imperméable (ou est très fortement réduite chez les patients atteints de RCH) que chez des individus sains. Les bactéries intestinales sont donc au contact des cellules épithéliales (Darfeuille-Michaud et al., 2004). De plus, on retrouve une diminution des peptides antimicrobiens chez les patients atteints de MC en comparaison des patients atteints de RCH (Wehkamp et al., 2005).

On retrouve dans le sérum des patients atteints de MC des anticorps contre des bactéries intestinales telles que *Saccharomyces cerevisiae* (Quinton et al., 1998), *Escherichia coli* (Lodes et al., 2004) ou encore *Pseudomonas fluorescens* (Murdoch et al., 2012).

Dans des modèles de MICI chez le rongeur, le microbiote est indispensable. Des souris axéniques ne développent pas de colite après un traitement au DSS (Neill et al., 2010). Cependant, la transplantation de microbiote humain de patients atteints de MICI n'est pas suffisante pour induire une colite chez la souris (Damman et al., 2012).

L'altération du microbiote a donc un rôle très important dans la physiopathologie des MICI mais elle ne semble pas suffisante pour induire la pathologie.

#### - La douleur

La douleur est l'une des premières causes de consultation chez un gastroentérologue pour les patients atteints de MICI (Siegel and MacDermott, 2009). C'est un problème qui a un impact important sur la qualité de vie de ces patients. Environ 50% des patients atteints de MC et 37% des patients atteints de RCH ont des épisodes de douleurs

viscérales de manière indépendante de la phase de leur pathologie (active ou en rémission) (Carter et al., 2004).

L'origine de cette douleur est inconnue mais de nombreux facteurs physiques et psychologiques ont été identifiés. Les médiateurs inflammatoires qui ont pu être identifiés sont une sensibilisation inflammatoire des fibres viscérales, une prolifération importante des bactéries de l'intestin grêle, des dommages cliniques comme des strictures, des sténoses et des adhésions, et des intolérances alimentaires (Deberry et al., 2014). Une étude a pu montrer une sensibilisation à long terme des fibres nerveuses de certains patients atteints de MICI en rémission qui développent des symptômes de SCI (Bielefeldt et al., 2009).

### c) Etiologies

L'étiologie et la pathogénicité des MICI sont encore mal comprises. L'hypothèse admise est que le développement de cette pathologie implique des facteurs génétiques (près de 100 gènes ont été identifiés comme facteurs de susceptibilités) et environnementaux (Barrett et al., 2008). Cependant ces 2 causes ne peuvent pas expliquer les fortes incidences des MICI dans les pays industrialisés. Une altération du système immunitaire ainsi que du microbiote ont aussi un rôle dans le développement des MICI.

#### - Age/sexe/localisation

Environ 25% des personnes atteintes de MICI sont diagnostiquées dans les vingt premières années de leur vie, la plupart entre 13 et 18 ans (Benchimol et al., 2011). 30% des malades MICI sont des enfants ou des adolescents (Hait et al., 2005). Le pic d'occurrence pour la MC est entre 20 et 30 ans alors que pour la RCH celui-ci est entre 30 et 40 ans.

La RCH se développe plus fréquemment chez les hommes (60%). La MC est présente de 20 à 30% plus souvent chez les femmes, et plus particulièrement dans les zones à forte incidence (Bernstein et al., 2006), (Molinié et al., 2004). Cependant dans les zones à faible incidence, la MC affecte plus d'hommes (Devlin et al., 1980). Chez les adolescents (entre 14 et 17 ans) cette tendance est inversée : les jeunes garçons sont plus affectés par la MC et ce sont les filles qui présentent le plus de RCH (Auvin et al., 2005).

La prévalence des MICI est plus importante dans le nord de l'Europe, le Royaume-Uni et le nord de l'Amérique alors qu'elle reste faible dans le sud de l'Europe, en Asie et dans

de nombreux pays développés (Figure 21). Aux Etats-Unis, la prévalence est plus importante pour les caucasiens (43,6 pour 100 000) et pour les afro-américains (29,8 pour 100 000) que pour les hispaniques (4,1 pour 100 000) et les asiatiques (5,6 pour 100 000) (Kurata et al., 1992). L'origine ethnique est un facteur important dans l'étiologie des MICI. En effet, les personnes d'origine juive ont une prévalence 3 à 5 fois plus élevée pour développer une RCH. De plus il existe d'importantes différences épidémiologiques entre les juifs d'Israël et ceux ayant immigrés dans d'autres pays. Les personnes de confession juive ayant immigrés dans un pays à faible prévalence pour les MICI voient l'incidence de la pathologie diminuer jusqu'à être proche de celle de leur pays d'adoption (Niv Y et al., 2000). Ces données suggèrent un rôle de facteurs génétiques mais aussi environnementaux dans le développement de cette pathologie.

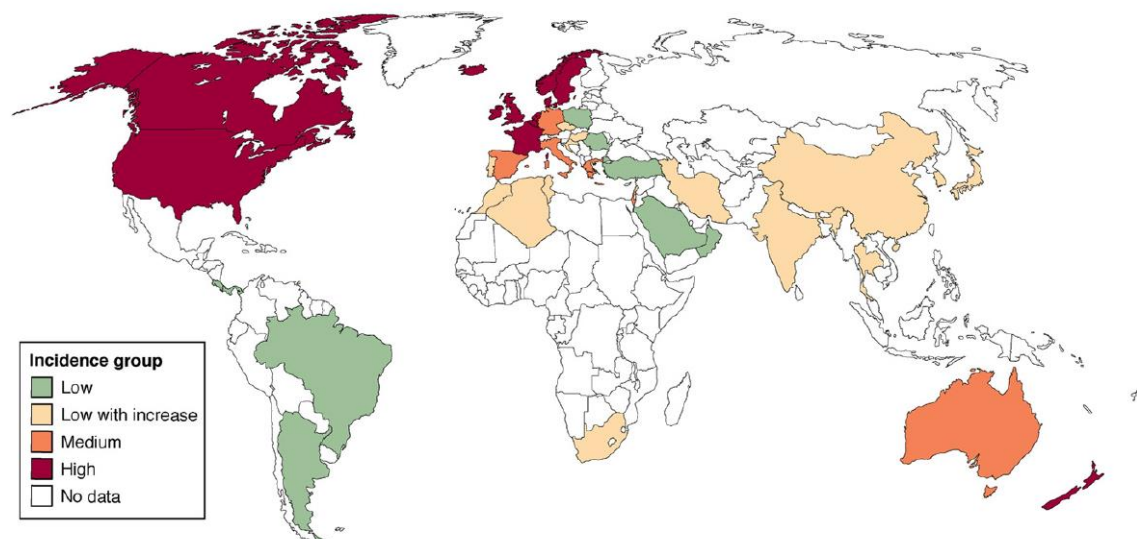


Figure 21 : **Carte de l'incidence des MICI dans le monde** : en rouge pour une incidence supérieure à  $10/10^5$ , en orange pour  $5-10/10^5$ , en vert pour une incidence inférieure à  $4/10^5$ , et en jaune pour une faible incidence. L'absence de couleur traduit une absence de données. (Cosnes et al., 2011)

#### - Facteurs génétiques

La génération d'une base de données du génome de patients atteints de MICI (Genome Wide Association Study ou GWAS) a permis de confirmer les marqueurs génétiques de susceptibilité mis en jeu dans le développement des MICI déjà établis et d'en découvrir de nouveaux (Rivas et al., 2011). 163 loci associés aux MICI ont pu ainsi être mis en évidence : 30 spécifiques à la MC et 23 à la RCH (Figure 22) (Jostins et al., 2012). La

plupart de ces gènes sont impliqués dans l'immunité : fonction des lymphocytes T, et modulation des cytokines.

Crohn's disease				Ulcerative colitis			
Chr.	Position (Mb)	SNP	Key genes (+ no. of additional genes in locus)	Chr.	Position (Mb)	SNP	Key genes (+ no. of additional genes in locus)
1	78.62	rs17391694	(5)	1	2.5	rs10797432	<b>TNFRSF14</b> (10)
1	114.3	<b>rs6679677</b>	<b>PTPN22</b> † (8)	1	20.15†	<b>rs6426833</b>	(9)
1	120.45	rs3897478	ADAM30 (5)	1	200.09	<b>rs2816958</b>	(3)
1	172.85	<b>rs9286879</b>	<b>FASLG, TNFSF18</b> (0)	2	198.65	rs1016883	RFTN2, PLCL1 (7)
2	27.63	<b>rs1728918</b>	UCN (23)	2	199.70*	<b>rs17229285</b>	0
2	62.55	rs10865331	(3)	3	53.05	rs9847710	PRKCD, ITIH4 (8)
2	231.09	<b>rs6716753</b>	SP140 (5)	4	103.51	rs3774959	<b>NFKB1, MANBA</b> (2)
2	234.15	<b>rs12994997</b>	<b>ATG16L1</b> † (8)	5	0.59	rs11739663	SLC9A3 (8)
4	48.36	rs6837335	(6)	5	134.44	rs254560	(6)
4	102.86	rs13126505	(1)	6	32.595	<b>rs6927022</b>	(15)
5	55.43	rs10065637	<b>IL6ST, IL31RA</b> (1)	7	2.78	<b>rs798502</b>	<b>CARD11, GNA12</b> (5)
5	72.54	rs7702331	(4)	7	27.22†	rs4722672	(14)
5	173.34	rs17695092	CPEB4 (2)	7	107.45*	<b>rs4380874</b>	DLD (9)
6	21.42	rs12663356	(3)	7	128.57	<b>rs4728142</b>	<b>IRF5</b> † (13)
6	31.27	<b>rs9264942</b>	(22)	11	96.02	rs483905	JRKL, MAML2 (2)
6	127.45	rs9491697	(3)	11	114.38	<b>rs561722</b>	NXPE1, NXPE4 (5)
6	128.24	<b>rs13204742</b>	(2)	15	41.55	rs28374715	(11)
6	159.49	<b>rs212388</b>	TAGAP (5)	16	30.47	rs11150589	<b>ITGAL</b> (20)
7	26.88†	rs10486483	(2)	16	68.58	rs1728785	ZFP90 (6)
7	28.17	rs864745	CREB5, JAZF1 (1)	17	70.64	rs7210086	(3)
8	90.87	rs7015630	RIPK2 (4)	19	47.12†	rs1126510	CALM3 (14)
8	129.56	<b>rs6651252</b>	0	20	33.8	rs6088765	(11)
13	44.45	<b>rs3764147</b>	LACC1 (3)	20	43.06	<b>rs6017342</b>	ADA, HNF4A (9)
15	38.89	rs16967103	<b>RASGRP1, SPRED1</b> (2)				
16	50.66†	<b>rs2066847</b>	<b>NOD2</b> † (6)				
17	25.84	<b>rs2945412</b>	<b>LGALS9, NOS2</b> (3)				
19	1.12	<b>rs2024092</b>	GPX4, HMHA1 (20)				
19	46.85†	rs4802307	(9)				
19	49.2	<b>rs516246</b>	FUT2, (25)				
21	34.77	<b>rs2284553</b>	<b>IFNGR2, IFNAR1</b> (10)				

Figure 22: Loci spécifiques de la MC et de RCH (Jostins et al., 2012)

*NOD2* est un de ces gènes de l'immunité associé aux MICI. *NOD2* fait partie de la famille des récepteurs NOD-like (NLR), et reconnaît le muramyl dipeptide (MDP), retrouvé dans les bactéries (Gram+ et Gram-) intestinales. *NOD2* a un rôle clé dans la reconnaissance des motifs bactériens et donc dans l'immunité et la tolérance du microbiote. Les patients atteints de MC présentent des mutations de ce gène qui pourraient être impliquées dans une augmentation de l'inflammation due à la réduction de la clairance bactérienne. De plus certains mutants de *NOD2* sont capables d'inhiber la transcription de l'IL10 (cytokine anti-inflammatoire) (Noguchi et al., 2009).

Des variants des gènes *ATG16L1* et *IRGM*, impliqués dans l'autophagie jouent un rôle dans la MC. L'autophagie régule les processus de réponse immunitaire et de réponse contre les micro-organismes (Levine et al., 2011). L'activation de *NOD2* par le MDP dans les cellules épithéliales augmente l'autophagie, de manière dépendante de *ATG16L1*, permettant la destruction des bactéries (Homer et al., 2010).

D'autres gènes ont pu être mis en évidence comme ayant une relevance dans les MICI : *MDR1* ou *ABCB1*, codant une protéine exprimée dans la cellule épithéliale et permettant de protéger l'épithélium contre les xénobiotiques (Schwab et al., 2003). La substitution

d'une glycine en position 299 du gène du TLR4 (Franchimont et al., 2004) et des mutations du gène *XBP1* (code un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique) (Kaser et al., 2008) jouent un rôle dans la RCH et la MC.

- Facteurs environnementaux

L'alimentation est un des premiers facteurs qui a été mis en cause dans les MICI. En effet les différents régimes alimentaires pourraient expliquer le gradient Nord/Sud dans le développement des MICI. La consommation de sucre ne semble pas avoir un effet sur la MC (Riordan et al., 1998), alors que la consommation d'acides gras polyinsaturés notamment dans la margarine augmente le risque de MICI (Geerling et al., 2000). L'allaitement maternel est associé à un faible développement de MICI (Klement et al., 2004).

L'hypothèse hygiéniste soutient le fait qu'une hygiène excessive limiterait l'exposition aux antigènes environnementaux et réduirait la maturation du système immunitaire et la tolérance ayant pour conséquence une réponse immunitaire non appropriée lors de la rencontre à l'âge adulte de ces mêmes antigènes (Hampe et al., 2003).

Le stress, et la dépression augmentent les rechutes des patients en phase de rémission (Mawdsley and Rampton, 2005).

La cigarette a un rôle antinomique dans la pathologie des MICI. En effet chez les patients atteints de MC, fumer est associé à une exacerbation de la maladie. Celle-ci se traduit par une augmentation du risque de développer des fistules et des strictures, le recours aux corticostéroïdes et à l'intervention chirurgicale. La nicotine induirait l'afflux de neutrophiles dans la muqueuse intestinale (Cosnes, 2004). L'arrêt de la cigarette aurait un effet thérapeutique chez ces patients. Pour la RCH, la cigarette aurait un effet plutôt protecteur et est associée à une diminution de l'exacerbation de la pathologie. Cependant les patchs contenant de la nicotine n'ont pas montré d'efficacité pour cette pathologie (McGrath et al., 2004). Les effets bénéfiques de la cigarette seraient dus à une augmentation de la production de mucus, une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et d'acide nitrique et une restauration de la barrière épithéliale (Cosnes, 2004).

Des études épidémiologiques suggèrent que l'appendicectomie aurait un effet protecteur vis-à-vis de la RCH. L'intervention induirait une altération du système

immunitaire mucosal qui affecterait la pathogénicité de la RCH (Koutroubakis et al., 2002), alors que pour le développement de la MC, l'appendicectomie est un facteur aggravant (Andersson et al., 2003).

#### d) Les modèles animaux

La mise en place de nouvelles thérapies n'est possible que par l'étude approfondie d'une pathologie. Cette étude passe par le développement de modèles animaux. Il n'existe pas de modèle animal reproduisant toute la physiopathologie des MICI, mais de nombreux modèles nous permettent de mimer certains paramètres de l'inflammation intestinale et donc des MICI (Figure 23). Nous présenterons dans cette partie uniquement les modèles qui ont été utilisés pour ces travaux de recherche.

##### - Colite induite par le Dextran Sodium Sulfate

Le modèle de colite chimiquement induit par l'ajout de Dextran Sodium Sulfate (ou DSS) dans l'eau de boisson des animaux durant 7 jours à 5% est un modèle de colite aigue. Ce modèle est le plus classiquement utilisé et est très bien décrit dans la littérature (Wirtz et al., 2007). L'animal perd du poids et développe rapidement des diarrhées qui peuvent devenir sanglantes dès le 4<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> jour (données du laboratoire) et (Egger et al., 2000). Lors du sacrifice après 7 jours de colite, le côlon présente des signes macroscopiques d'inflammation comme des œdèmes, des érythèmes, une hémorragie dans la lumière du côlon, un épaissement du tissu et un raccourcissement de la taille du côlon. D'un point de vue microscopique, la muqueuse intestinale est endommagée (perte de l'architecture des cryptes). On observe une infiltration massive de cellules immunitaires et des abcès. Au niveau de la *lamina propria*, l'activité myéloperoxidase (ou MPO : reflet de l'infiltration des neutrophiles), ainsi que des cytokines pro-inflammatoires (IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ ) sont nettement augmentées (Kim et al., 2012).

Le DSS est toxique pour les cellules épithéliales et rompt l'intégrité de la barrière formée par l'épithélium. Le contenu luminal et notamment le microbiote va donc pénétrer dans la muqueuse et induire une inflammation. Ce modèle est dépendant du microbiote intestinal car l'administration de DSS à des souris axéniques n'induit pas de colite. Il met en jeu principalement le système inné car le DSS provoque des colites à des animaux déficients en lymphocytes T et B (Axelsson et al., 1996).

Ce modèle nécessite quelques mises au point car le taux de mortalité est très dépendant de l'environnement mais est très reproductible (Hans et al., 2000).

- Colite induite par le trinitrobenzène sulfonique

Ce type de colite chronique repose sur l'utilisation d'un composé chimique non immunogène par lui-même appelé l'acide 2,4,6 TriNitroBenzène Sulfonique (ou TNBS). Cette molécule est un haptène. Le TNBS est instillé par voie intra-rectale dissous dans de l'éthanol. L'éthanol a pour but de rompre la barrière épithéliale permettant ainsi à l'haptène de pénétrer dans la muqueuse (Morris et al., 1989). Le TNBS va former des complexes antigéniques avec certains acides aminés (comme les lysines) des protéines de la muqueuse ce qui va entraîner une réponse immunitaire. L'instillation est répétée 7 jours après la première, puis une fois par semaine durant 6 semaines, et va provoquer une inflammation colique transmurale. Les complexes antigéniques formés par les haptènes vont être reconnus par les lymphocytes générés lors de la première exposition ce qui va induire une forte réponse immunitaire dans la muqueuse intestinale avec recrutement de lymphocytes T spécifiques du complexe antigénique. Les lymphocytes T CD4 ont un profil Th1 avec production d'IL12.

Ce modèle de colite induit chez l'animal une forte diarrhée dès la seconde instillation, de la déshydratation et du sang dans les fèces. Le côlon est très fortement enflammé avec la présence d'œdème, d'érythème, d'ulcère ainsi que de nombreuses adhésions. D'un point de vue microscopique, on observe une très forte infiltration transmurale de lymphocytes, et une perte de l'architecture des cryptes (Scheiffele and Fuss, 2002).



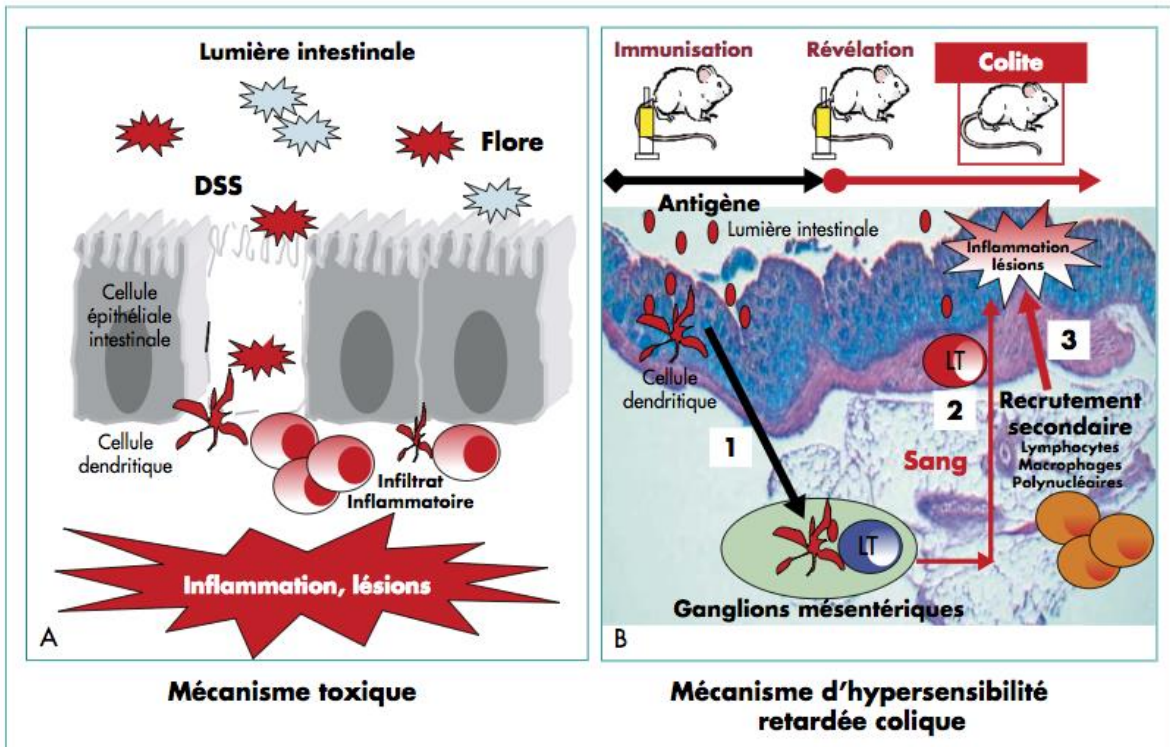


Figure 23 : **Mécanismes inflammatoires mis en jeu lors de colite induites chez la souris** (Valatas et al., 2013).

Colite induite par un mécanisme toxique (A) ou colite immunologique induite par une hypersensibilité retardée colique aux haptènes (B)

### e) Les thérapies

Le traitement des MICI doit toujours être adapté à la phase de la pathologie, aux antécédents du patient et nécessitera de nombreuses adaptations en fonction des réponses cliniques. Ces traitements sont symptomatiques et visent à provoquer et maintenir les phases de rémission. Ils consistent principalement à la prescription d'aminosalicylates, d'immuno-modulateurs et de corticoïdes. Dans les cas les plus graves du développement de la pathologie, une intervention chirurgicale peut être envisagée.

Suivant la pathologie (MC ou RCH) différentes stratégies sont mises en œuvre.

#### - 5-Aminosalicylates

Le 5-aminosalicylates (ou 5-ASA) est utilisé chez les patients atteints de RCH pour induire et maintenir les phases de rémission. Le 5-ASA possède des propriétés anti-



inflammatoires via l'inhibition de voies du métabolisme de l'acide arachidonique (thromboxanes, prostaglandines, leukotriènes), de la réduction de l'IL1, du recrutement de lymphocytes et de la protection du stress oxydatif (Greenfield et al., 1993). Il inhibe le facteur de transcription NFκB (Wahl et al., 1998).

Les effets secondaires d'un traitement au 5-ASA peuvent être fréquents et nombreux comme des nausées, maux de têtes, allergies, et anorexie (Ransford and Langman, 2002).

#### - Les corticostéroïdes

Les corticostéroïdes sont assez efficaces les patients atteints de MC et de RCH. Ils sont utilisés dans les formes modérées à sévères de la maladie. Les corticostéroïdes agissent sur l'inflammation par de nombreux mécanismes comme la diminution de facteurs de transcription de gènes inflammatoires (cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion) et augmentent la transcription de gènes anti-inflammatoires (Barnes, 1998).

Les corticostéroïdes sont un traitement efficace dans les phases actives de la maladie mais pas pour un maintien des phases de remissions.

#### - Les antibiotiques

Les antibiotiques sont utilisés en prophylaxie dans les phases actives de MC et de RCH pour traiter la translocation des toxines bactériennes lors de mégacolon (côlon très dilaté qui entraîne un gonflement de l'abdomen, des douleurs abdominales et de la fièvre). Une étude montre l'efficacité d'un traitement aux antibiotiques (thérapie antimycobactéries, macrolides, fluoroquinolones, 5-nitroimidazoles et rifaximine), qu'ils soient administrés seuls ou en combinaison (Khan et al., 2011). Le metronidazole est un des antibiotiques le plus étudié pour traiter la MC dont l'efficacité est proche de celle du sulfasalazine (Ursing et al., 1982). Les antibiotiques aident à alléger les symptômes des patients atteints de MICI mais ne suffisent pas à eux seuls à induire une phase de rémission.

#### - Les thiopurines

Les thiopurines comme le 6-mercaptopurine (6-MP) et l'azathioprine (AZA) sont efficaces pour induire et maintenir la rémission chez les patients atteints de MC et RCH (Khan et al., 2011). Elles peuvent être utilisées conjointement avec des corticostéroïdes dans le traitement de la MC (Sandborn et al., 2000). Leur administration simultanée avec

un traitement à l'anticorps anti-TNF $\alpha$  augmente l'efficacité de la thérapie grâce à leurs propriétés immuno-modulatrices (Cosnes et al., 2013). Ils agissent en diminuant la synthèse d'ADN, ce qui est fortement toxique pour les lymphocytes T et B (Nielsen et al., 2001). Ces traitements sont associés à des risques de lymphomes et de cancer de la peau (Goldenberg et al., 2004).

- Methotrexate

Le methotrexate est un agent qui, comme les thiopurines, interfère avec la synthèse d'ADN et est très utilisé pour traiter les maladies immunes. Il permet l'induction de phases de rémission chez les patients atteints de MC (Feagan et al., 1995) et prévient la rechute. Les bénéfices pour les patients atteints de RCH sont moins évidents (Oren et al., 1996). C'est un inhibiteur de la dihydrofolate reductase qui a des effets anti-inflammatoires, via la diminution de l'IL1, du chimiotactisme des neutrophiles et diminue la production d'eicosanoïdes (Egan and Sandborn, 1996).

- Les inhibiteurs de calcineurine

Ces inhibiteurs comprennent la cyclosporine et le tacrolimus. Ils inhibent l'activation lymphocytaire (Flanagan et al., 1991). Ils sont utilisés pour traiter les formes modérées à sévères de RCH active, notamment chez les patients réfractaires aux traitements par corticostéroïdes (Lichtiger et al., 1994). Ces traitements sont efficaces lors des phases de poussées mais ne permettent pas une maintenance de phase de rémission (Feagan et al., 1994). Cependant ces inhibiteurs sont toxiques et associés à des colectomies sur une utilisation à long terme.

- Les anticorps dirigés contre le TNF $\alpha$

Ce sont des anticorps monoclonaux dirigés contre le TNF $\alpha$  de type. Elle fixe et neutralise le TNF $\alpha$  soluble et provoque la lyse des cellules TNF $\alpha$ <sup>+</sup> (lymphocytes T activés) (Van Deventer, 2000). Les 2 principaux traitements sur le marché sont l'Infliximab et l'Adalimumab. Il existe peu de différence entre les 2 pour le traitement de la MC (Peyrin-Biroulet et al., 2008) mais pour la RCH, l'infliximab semble être plus efficace (Danese et al., 2014). Ce traitement est très efficace chez les patients atteints de MC et de RCH et permet le maintien en rémission.

Le problème majeur avec ce type de thérapie est que le patient peut devenir résistant (Sandborn et al., 2007).

- La chirurgie

40% des patients atteints de MC auront une intervention chirurgicale dans les 5 années suivant leur diagnostic et 70% dans les 10 ans. Cette intervention consiste à retirer la zone inflammatoire, à drainer les abcès et/ou à exciser les fistules en essayant de préserver au maximum le tissu sain (Fichera and Michelassi, 2007).

Les patients atteints de RCH ont moins besoin de chirurgie que ceux atteints de MC avec une probabilité globale d'environ 35%. La méthode est une colectomie totale sans anastomose intestinale avec une transition iléo-stoma, une protéctomie et la création d'un pouch.

- Autres thérapies

**L'héparine** : elle affecte les cellules inflammatoires et promeut la réparation cellulaire. Son efficacité a été montrée dans quelques études chez des patients atteints de RCH (Gaffney et al., 1995) (Zezos et al., 2006).

**La cigarette** : elle a un effet protecteur chez les patients atteints de RCH et délétère chez ceux atteints de MC. Chez les patients atteints de RCH, son action est néanmoins moins efficace qu'un traitement aux corticostéroïdes (Thomas et al., 1996). Fumer pourrait cependant avoir un rôle bénéfique en supplément des thérapies conventionnelles.

**Les probiotiques** : le microbiote ayant un rôle important dans la physiopathologie des MICI, de nombreuses études ont été réalisées avec l'administration de probiotiques (Fujiya et al., 2014). La bactérie *Escherichia coli* Nissle 1917 permet le maintien de la rémission et le traitement par un produit multi-espèces (composé de plusieurs sortes de bactéries lactiques et de levures probiotiques) prévient la pouchite (inflammation de la partie iléo-caecal) chez des patients atteints de RCH (Gionchetti et al., 2000) (Matthes et al., 2010). Le traitement avec *Lactobacillus reuteri* aide au passage en phase de rémission chez des enfants atteints de RCH (Oliva et al., 2012). Cependant d'autres études menées chez des patients atteints de MC ou de RCH ayant été traités avec des bactéries probiotiques (*B.longum* et *Synergy*, *Lactobacillus GG*) ne donnent pas des résultats

significatifs en comparaison aux placebo (Steed et al., 2010) (Prantera et al., 2002). Il est donc difficile de conclure sur la réelle efficacité des probiotiques dans les MICI.

**Les régimes alimentaires :** certains régimes alimentaires peuvent être conseillés aux patients atteints de MICI. En effet, ces traitements partent de l'hypothèse que modifier son alimentation peut moduler la flore bactérienne et leur production de métabolites absorbés qui sont des facteurs impliqués dans la pathologie des MICI (Lee, 2015). Des études ont montré une association entre la consommation de viande rouge (prise de n-6PUFA) avec l'incidence de la pathologie (IBD in EPIC Study Investigators et al., 2009). Un régime semi-végétarien avec une forte consommation de fibres est associé avec une maintenance des phases de rémission (Andoh et al., 2003).

L'ensemble de ces traitements diffèrent suivant le type de MICI (MC ou RCH) et sont adaptés en fonction de la réponse de chaque patient à ces thérapies. Les stratégies employées pour soulager les patients atteints de MC et de RCH sont résumées dans les figures 24 et 25 respectivement.

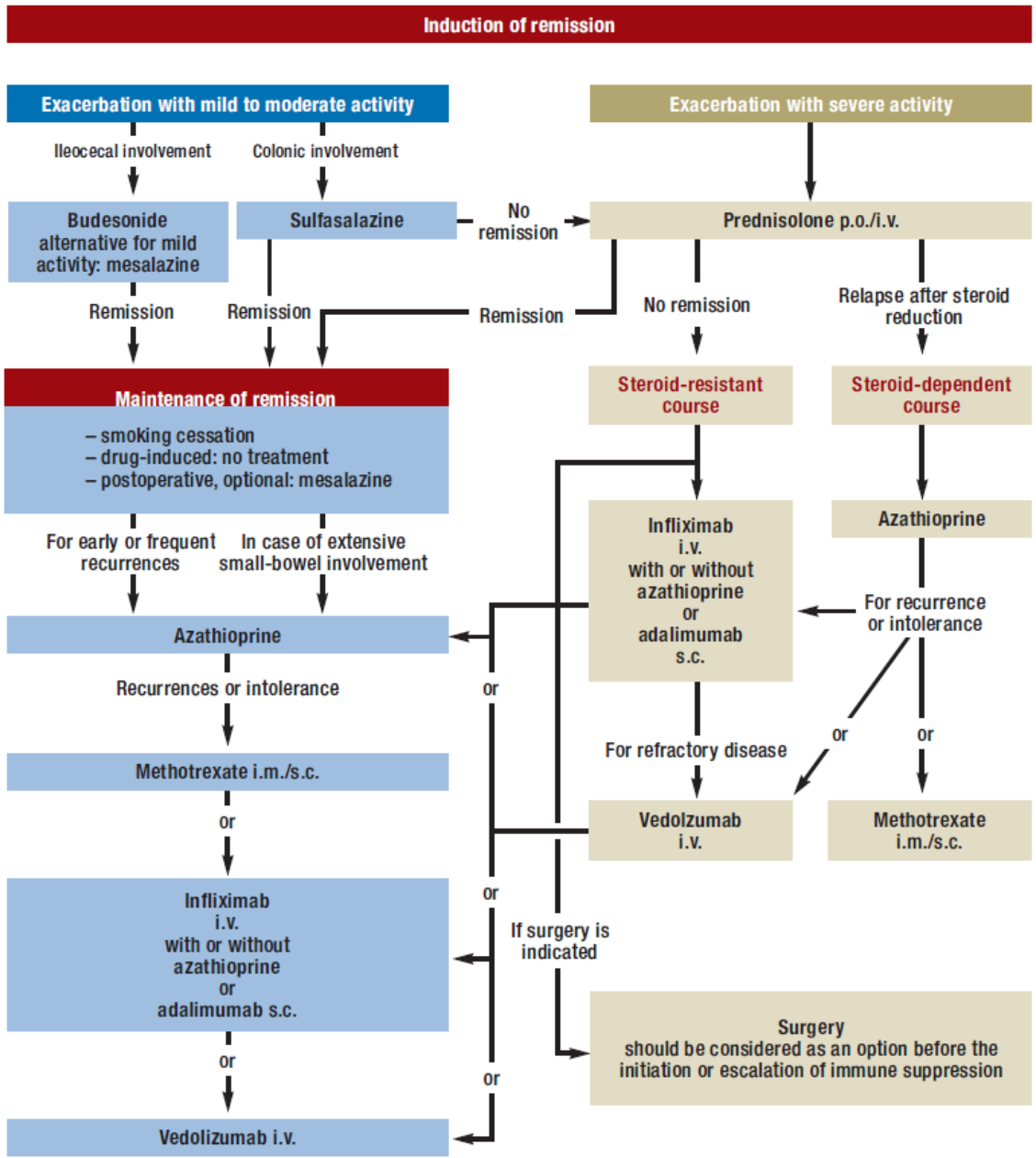


Figure 24 : **Algorithme des traitements pour la MC** (Wehkamp et al., 2016)

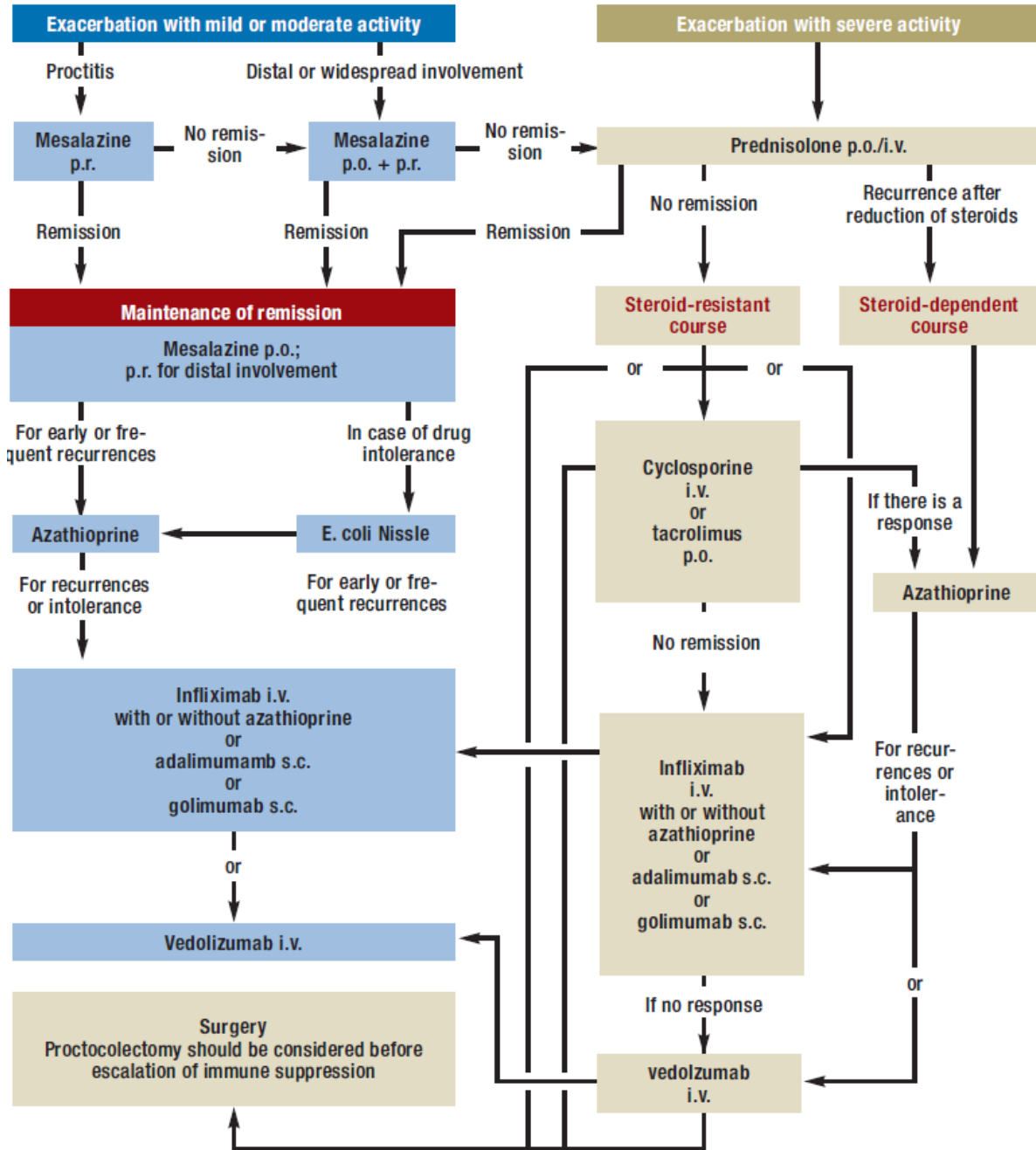


Figure 25 : Algorithme des traitements pour la RCH (Wehkamp et al., 2016)

## 2- Le Syndrome du Côlon Irritable

### a) Aspect clinique

Le Syndrome du Côlon Irritable (ou SCI) est un désordre gastro-intestinal qui se caractérise par une modification de la motricité intestinale, des douleurs ou un inconfort abdominal, fréquent et qui perdure dans le temps (plus de 3 jours et qui s'étend sur au moins 3 mois). A l'heure actuelle, il n'existe aucun biomarqueur, ni aucune anomalie structurale ou biochimique permettant de diagnostiquer efficacement cette pathologie. Les symptômes du SCI sont communs à d'autres pathologies, ce qui rend le diagnostic difficile. La fondation Rome a établi des critères afin de définir cette maladie et aider à son diagnostic. Les critères de Rome IV, publiés en février 2016, régissent actuellement le diagnostic du SCI. Ils définissent 4 catégories de patients.

- SCI-Constipé : patients présentant de la douleur et à prédominance constipée,
- SCI-Diarrhéique : patients à prédominance diarrhéique,
- SCI-Mixte : patients présentant des diarrhées et de la constipation en alternance,
- SCI-Unclassified : patients atteints de SCI ne pouvant pas être classés dans l'un de ces 3 sous-types.

Certains patients développent des symptômes de types SCI (motricité altérée, douleur ou inconfort intestinal) après un épisode d'infection gastro-intestinale. Ces patients sont nommés SCI post-infectieux. Le développement de cette pathologie peut survenir entre 4 à 36% après une infection bactérienne (*Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* O157:H7), virale (Norovirus) ou protozoaire (*Giardia lamblia*) (Beatty et al., 2014).

### b) Physiopathologie

Les mécanismes physiopathologiques du SCI sont très nombreux et pas encore totalement compris. Le microbiote, la perméabilité intestinale, la réponse immunitaire, l'altération de l'axe intestin-cerveau ainsi que l'hypersensibilité intestinale sont des

facteurs impliqués dans cette pathologie. Ces différents facteurs interagissent très fortement entre eux comme le montre la figure 26 et seront décrits ci-dessous.

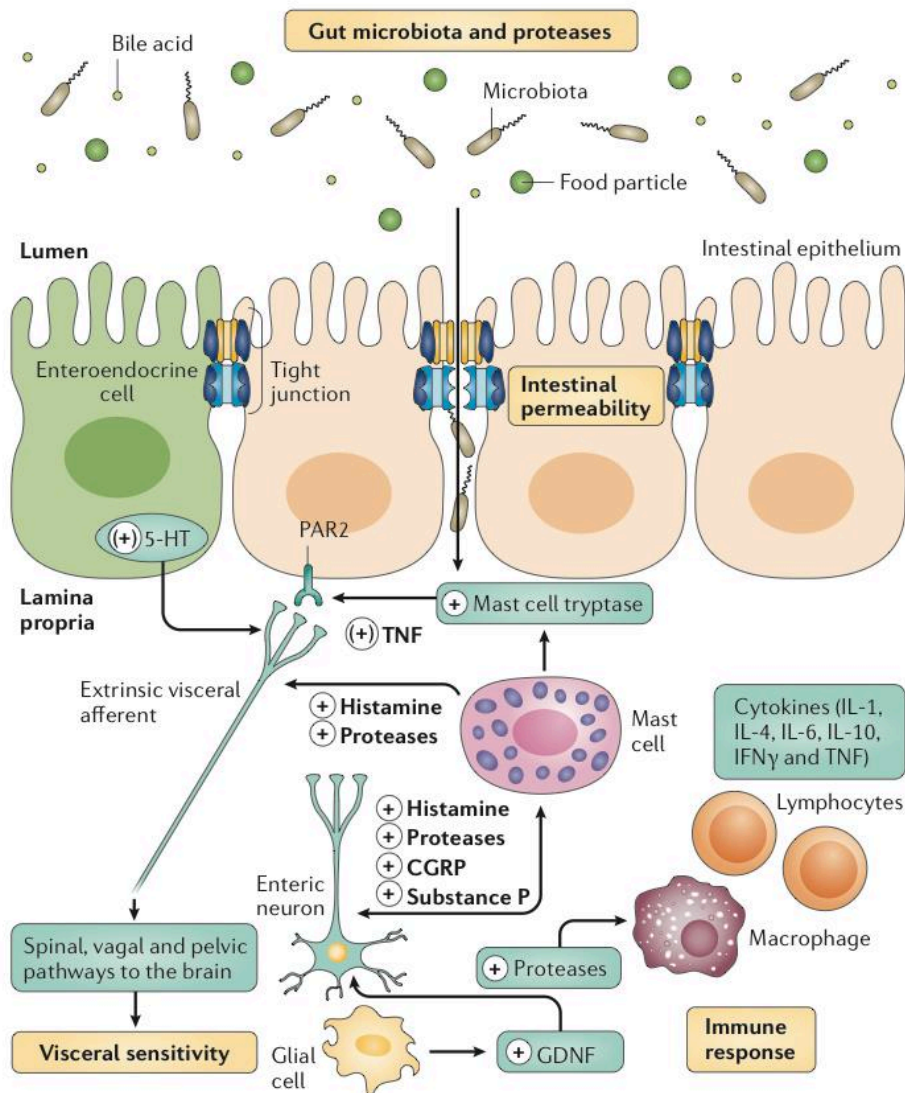


Figure 26 : **La physiopathologie du SCI** (Enck et al., 2016)

Bien que l'étiologie du SCI n'a pas encore été complètement élucidée, divers facteurs ont un rôle, comme le microbiote, la perméabilité intestinale, la réactivité des cellules immunitaires et la sensibilité du système nerveux entérique, l'axe cerveau-intestin ou le cerveau. Cette figure souligne les médiateurs probablement peptidnergiques.

- Rupture de la barrière épithéliale

L'épithélium intestinal forme une barrière étanche, première protection de l'organisme contre les pathogènes luminaux. Une altération de la barrière épithéliale est décrite chez les patients atteints de SCI et plus particulièrement chez les patients atteints de SCI-D. Cette rupture de barrière épithéliale peut être associée avec des symptômes gastro-



intestinaux comme la diarrhée et les douleurs abdominales (Dunlop et al., 2006). Cette rupture de barrière permet le passage des antigènes luminaux dans la muqueuse ce qui contribue à l'inflammation de bas-grade de la muqueuse intestinale et à une augmentation de la sensibilité viscérale. Cette perte de barrière est un évènement précoce dans le développement du SCI.

L'augmentation de la perméabilité est en partie due à une expression anormale des gènes et des protéines de jonctions claudines, occludines et Zonula Occludens 1 (ZO-1). L'altération des protéines de jonctions est particulièrement marquée chez les patients atteints de SCI-D et SCI-C (Bertiaux-Vandaële et al., 2011). Cette dégradation résulte de processus inflammatoires impliquant probablement le protéasome et le microbiote (Coëffier et al., 2010).

La perte de barrière facilite le passage des antigènes luminaux dans la *lamina propria*, notamment des composés bactériens comme le *Lypopolysaccharide* (LPS), composant majeur des parois bactériennes des Gram négative. Il participe à l'augmentation de la perméabilité lors de la stimulation apicale ou basale de la cellule épithéliale. Du LPS est retrouvé dans la circulation systémique des patients atteints de SCI-D comparé à des patients contrôles (Ludidi et al., 2015). La pénétration des antigènes bactériens participe à l'inflammation de bas-grade de la muqueuse intestinale des patients atteints de SCI.

L'augmentation de la perméabilité épithéliale est donc liée à l'inflammation de bas-grade, mais aussi à l'hypersensibilité viscérale et à la douleur chez les patients atteints de SCI.

#### - Modification de la motricité intestinale

Chez les patients atteints de SCI, la motricité intestinale est perturbée. L'activité électrique du côlon de ces patients est supérieure à celle d'individus sains et cela est associé avec des symptômes de diarrhée (Snape et al., 1976). Le stress a aussi un rôle majeur dans la motricité intestinale de ces patients. Leur contractilité intestinale est augmentée lors d'une situation de stress (Narducci et al., 1985). Le CRF (Corticotropin Release Factor, molécule impliquée dans la voie du stress) augmente la motricité intestinale chez la souris (Larauche et al., 2009). L'utilisation d'un antagoniste du récepteur au CRF permet de diminuer la sensibilité viscérale et de restaurer la motricité de l'intestin des patients atteints de SCI (Coss-Adame and Rao, 2014).

#### - Hypersensibilité viscérale

La contraction et la distension de l'intestin, en condition non pathologique, n'induit aucune douleur. Une sensation douloureuse en réponse à un stimulus physiologique est appelée hypersensibilité viscérale (HV). Le patient ressent une douleur ou un inconfort lors de la distension de son intestin. Les 2 composants majeurs de l'HV sont l'allodynie (réponse douloureuse à un stimulus physiologique) et l'hyperalgésie (douleur supérieure à celle d'un individu contrôle, en réponse à un stimulus douloureux). Le seuil de perception douloureuse chez les patients atteints de SCI est abaissé par rapport à un individu sain. L'HV est présente principalement chez les patients diarrhéiques et plus particulièrement chez ceux ayant une perméabilité intestinale augmentée (Ludidi et al., 2014). La diminution du seuil nociceptif de ces patients est présente dans le côlon et le rectum mais aussi dans l'intestin grêle et l'estomac. Les complications liées à la pathologie du SCI sont plus importantes chez ces patients (Posserud et al., 2007).

L'HV est un processus multifactoriel qui met en jeu de nombreux facteurs comme le microbiote, des facteurs psychologiques, immunologiques et inflammatoires, et un défaut de communication entre le cerveau et l'intestin. Une altération du système immunitaire, dans les interactions endocrines ou neurologiques modifie la transmission nociceptive de la périphérie vers le cerveau chez de nombreux patients atteints de SCI (Barbara et al., 2011). Le microbiote peut aussi influencer sur l'HV via l'altération des afférences viscérales ou par la déstabilisation de la barrière épithéliale (Distrutti et al., 2013). Le système neuroendocrine est donc important dans l'altération de la perception nociceptive.

#### - Altération de l'axe cerveau-intestin : rôle du stress ?

Il existe une communication complexe, bidirectionnelle entre le système nerveux central (SNC) et le système nerveux entérique (SNE) qui assure non seulement les fonctions de digestion et d'homéostasie mais peut aussi avoir des effets sur la motivation, et les fonctions cognitives.

Chez les patients atteints de SCI, cet axe cerveau-intestin peut être dérégulé. On observe chez les patients atteints de SCI-D, une augmentation de l'activation vagale et une diminution des niveaux de cortisol (Mayer, 2000). Ces patients ont aussi une augmentation de l'activation du système parasympathique et une altération des

fonctions adrénérquiques comparées aux patients atteints de SCI-C (Heitkemper et al., 2001). Ces changements pourraient influencer les activités motrices coliques de ces patients.

L'axe hypothalamo-pytuitaire-adrénérquique (HPA) est l'axe mis en jeu lors du stress. Le CRF (Cortico Releasing Factor) est sécrété par l'hypothalamus en réponse au stress. Sa fixation sur ses récepteurs (CRF<sub>1</sub> et CRF<sub>2</sub>) présents sur la glande pituitaire, induit la production d'hormone adrenocorticotropine (ATCH) qui entraîne la sécrétion de cortisol par le cortex surrénal (Fish et al., 2004). L'anxiété et la dépression peuvent moduler cet axe CRF-HPA. Chez les patients atteints de SCI, la littérature suggère une augmentation de l'activité basale de l'axe HPA ainsi qu'un manque de réponse à des stressseurs alimentaires ou mentaux (Chang et al., 2009). Le stress est impliqué dans la mise en place des symptômes du SCI et est associé à des réponses erronées ou à un manque d'adaptabilité (Drossman, 2006). Cette incapacité à réagir au stress est étroitement liée à des comorbidités psychiatriques (voir partie Etiologie et stress).

#### - Inflammation de bas grade

La muqueuse intestinale des patients atteints de SCI ne possède aucun dommage macroscopique comme on peut le voir dans d'autres pathologies intestinales (comme les MICI). Malgré l'absence d'une inflammation développée, les patients atteints de SCI montrent une réponse immune systémique anormale. L'inflammation est dite de bas grade. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de ces patients sont augmentés dans la *lamina propria* ainsi que dans l'épithélium (intra-épithéliaux). De plus, leurs lymphocytes T CD8<sup>+</sup> circulants expriment plus fortement l'intégrine de homing intestinale  $\alpha 4\beta 7$  (Öhman et al., 2005). Cependant, le nombre de T régulateurs (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) n'est pas modifié comparée à celui des patients contrôles (Holmén et al., 2007). Le rôle des lymphocytes B est plus controversé. Une étude montre que le nombre de lymphocytes B dans la muqueuse intestinale des patients atteints de SCI n'est pas modifié (Cremon et al., 2009) tandis qu'une autre démontre l'augmentation de cellules IgG<sup>+</sup> systémiques (Schoepfer et al., 2008). On observe une augmentation de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-8) dans le plasma de ces patients (Dinan et al., 2008).

Au niveau de la muqueuse intestinale, la littérature rapporte une infiltration de cellules immunitaires comme des mastocytes et des lymphocytes intraépithéliaux dans le rectum et dans le côlon mais aussi dans l'iléon et dans le duodénum. Une augmentation

de médiateurs inflammatoires comme les protéases (tryptase, trypsine), l'histamine et les prostaglandines est observée au niveau de la muqueuse intestinale. Le taux de cytokines mucosales et systémiques est augmenté chez ces patients (Macsharry et al., 2008) (Bashashati et al., 2014a). Les mastocytes présents dans la *lamina propria* des patients atteints de SCI sont plus activés et relarguent d'avantage de médiateurs que chez des individus sains. Leur proximité spatiale avec les cellules nerveuses de la muqueuse intestinale est un point clé dans le dialogue entre le système immunitaire et le système nerveux (Barbara et al., 2007). Ces médiateurs (protéases, acide gras, histamine...), relargués par des biopsies de côlon de patients atteints de SCI peuvent induire une hyperalgésie et une allodynie viscérale lorsqu'ils sont administrés à des souris (Cenac N. et al., 2007).

Les causes de cette inflammation de bas-grade sont encore inconnues. De nombreux mécanismes sont soupçonnés comme des allergies alimentaires non détectées, le stress, des infections passées (SCI post-infectieux), un microbiote anormal, une malabsorption de la bile ou encore une perméabilité intestinale augmentée.

#### - Dysbiose

L'altération du microbiote des patients atteints de SCI est un facteur impliqué dans cette pathologie mais son rôle reste encore à clarifier. Malgré un consensus sur l'altération de ce microbiote, aucun marqueur microbiotique n'a pu être défini. En effet, de nombreuses études montrent la modification de certains phyla mais le manque de détails quant à la caractérisation des patients, ou encore les cohortes de patients trop petites ne permettent pas de reproduire ces observations sur d'autres cohortes. De plus des facteurs exogènes comme l'alimentation influent sur ces observations.

De nombreuses études montrent une augmentation du ratio *Firmicute* (*Clostridium* cluster XIVa et *Ruminococcacea*) sur *Bacteroidetes* (Rajilić-Stojanović et al., 2011) (Krogus-Kurikka et al., 2009). La colonisation d'animaux axéniques avec le microbiote de patients atteints de SCI induit une hypersensibilité viscérale (Crouzet et al., 2013), ainsi qu'une augmentation de la perméabilité intestinale, et de la motricité, une activation immunitaire et un comportement anxieux (De Palma et al., 2017).

Un des rôles importants du microbiote est de dégrader des composants non digestibles du bol alimentaire. La fermentation des carbohydrates produit des acides gras à chaînes courtes (AGCC) qui ont des effets bénéfiques (anti-inflammatoire et amélioration de la

barrière épithéliale). La quantité et la composition de ces AGCC sont différentes chez les patients atteints de SCI. Ils possèdent des carbohydrates résistant à la fermentation qui induiraient des symptômes de types SCI (Shepherd et al., 2008a). De plus, les AGCC affectent le système immunitaire (balance entre lymphocytes pro et anti inflammatoires), ce qui suggère qu'une mauvaise quantité d'AGCC pourrait participer à l'inflammation de bas-grade des patients atteints de SCI.

### c) Etiologie

#### - Sexe et localisation

La prévalence de cette pathologie varie de 7% (Sud de l'Asie) à 45 % (Amérique du Sud). L'analyse de 80 études séparées montre une prévalence d'environ 11,2%, plus élevée chez les femmes (14%) que chez les hommes (8,9%)(Lovell and Ford, 2012). Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer l'augmentation de la prévalence du SCI dans les pays dit développés. Une exposition dans l'enfance à de nombreuses infections intestinales, induit une grande variété de microorganismes dans la flore intestinale. Ce microbiote va favoriser le développement d'une bonne tolérance immunitaire et d'un épithélium intestinal qui répondra mieux aux challenges antigéniques. A l'inverse, dans les sociétés plus développées, l'environnement surprotégé et plus hygiénique laisse le système immunitaire plus naïf. Les infections intestinales plus tardives vont engendrer des perturbations inflammatoires plus importantes. Ces données, associées à des facteurs comportementaux et psychologiques pourraient expliquer les différences de prévalence du SCI (Gwee, 2005).

Le SCI peut être associé dans 20% des cas à d'autres pathologies, intestinales comme les brûlures d'estomac, des reflux gastro-œsophagiens, de l'incontinence, des intolérances alimentaires (Whitehead et al., 2007).

#### - - Facteurs génétiques

Des études cliniques montrent que les patients atteints de SCI ont plus souvent un historique familial de cette pathologie (33,9%) que des individus contrôles (12,6%) (Kanazawa et al., 2004). L'étude de jumeaux confirme cette part de génétique dans cette pathologie. En effet, des études chez des jumeaux Australiens, Américains, Scandinaves montrent que les jumeaux monozygotes développent trois fois plus le SCI que ceux

dizygotes (Levy et al., 2001; Morris-Yates et al., 1998).

De nombreuses études génétiques ont été réalisées afin de déterminer des gènes de susceptibilité au SCI. Elles se sont intéressées à des gènes impliqués dans l'inflammation, la barrière intestinale ou le cerveau. Néanmoins, aucune n'a été capable de démontrer une corrélation entre certaines mutations génétiques et le développement de la pathologie. Cependant, quelques études ont pu mettre en évidence certains gènes de susceptibilité comme *HTR3A* (gène codant le récepteur de la sérotonine) de génotype -42C>T C/T commun aux patients atteints de SCI-D. De plus, des variants des gènes *TLR9*, *IL6* et *CDHI* (codant des protéines de jonctions) semblent être des facteurs de risque pour le SCI post-infectieux (Enck et al., 2016). D'autres gènes comme *TNFSF15* (tumor necrosis factor superfamily 15), ou encore *KDELR2* (codant des récepteurs impliqués dans le transport de protéines dans le reticulum) et *GRID2IP* (protéine exprimée sur les fibres nerveuses de Purkinje dans le cerveau) ont fait l'objet de résultats controversés et ne sont pas validés par la communauté scientifique (Villani et al., 2010). Ces études contradictoires pourraient s'expliquer par des associations de gènes difficiles à détecter dans la population globale. La combinaison de facteurs génétiques et environnementaux pourrait expliquer l'hétérogénéité clinique du SCI.

#### - Stress

Le stress est un facteur impliqué dans la pathologie du SCI. Des événements traumatisants (maladie grave, mort d'un parent, abus sexuel) survenus dans l'enfance peuvent altérer la réponse au stress et favoriser le risque de développer des problèmes de santé, sociaux et comportementaux. Des études ont montré une corrélation entre le développement du SCI et des expériences d'abus (physique, psychologique ou sexuel) (Salmon et al., 2003). Vingt à 30% des patients atteints de SCI ont des problèmes d'anxiété et de dépression et 32% d'entre eux ont vécu des abus physiques ou sexuels (Delvaux et al., 1997).

#### - Hypersensibilité et intolérance alimentaire

De nombreux patients atteints de SCI rapportent une exacerbation des symptômes lorsqu'ils consomment un certain type de nourriture comme des aliments riches en gluten, en acides gras polyinsaturés ou du lait. L'équipe de Biesiekierski et al., a montré qu'il existait une corrélation entre les patients atteints de SCI-D et une intolérance au

gluten. Dans cette étude, les patients sous régime sans gluten ont une amélioration des symptômes de douleur viscérale, des saignements et de la consistance de leurs fèces. Cependant les auteurs n'ont pas réussi à mettre en évidence de biomarqueurs pouvant expliquer ces améliorations dans les symptômes des patients (Biesiekierski et al., 2011). De récentes études se sont intéressées à ces paramètres (Eswaran et al., 2013; Niec et al., 1998; Saito et al., 2005). Leurs auteurs émettent l'hypothèse que la perte de barrière épithéliale chez ces patients permettrait aux antigènes de l'alimentation de pénétrer plus facilement et de participer à l'inflammation de bas-grade de la muqueuse intestinale (Vivinus-Nébot et al., 2012).

De plus, les FODMAPs (Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides and Polyols) semblent pouvoir exacerber certains symptômes de la pathologie (Nanayakkara et al., 2016). Ces FODMAPs sont difficilement absorbés ce qui va provoquer un excès de ces composés dans l'intestin. Ces FODMAPS en excès vont augmenter la pression osmotique, et augmenter l'eau présente dans la lumière ce qui aura pour conséquence de distendre l'intestin et de favoriser les douleurs abdominales (Undseth et al., 2014). De plus, ils sont rapidement fermentés par le microbiote ce qui engendre des gaz. Ces gaz vont distendre le côlon ce qui est associé avec une augmentation des ballonnements et de la douleur. Un régime pauvre en FODMAPs réduit la douleur intestinale des patients atteints de SCI (Ong et al., 2010).

#### d) Modèles animaux

L'utilisation des modèles animaux est indispensable pour l'étude des pathologies. Le SCI étant une pathologie multifactorielle et dont la physiopathologie est complexe, différents modèles animaux reproduisant un certain nombre de facteurs de la pathologie ont pu être envisagés. Il existe un grand nombre de ces modèles, , nous aborderons les modèles de SCI post-infectieux et décriront plus particulièrement 2 modèles de SCI utilisés dans notre étude qui mettent en jeu une augmentation de l'hypersensibilité viscérale.

##### - Les modèles de SCI post infectieux

Il existe un grand nombre de modèles animaux de SCI post-infectieux (SCI-PI) : une partie de ces modèles s'intéresse à la composante infectieuse de cette pathologie. La seconde partie de ces modèles se focalise sur le paramètre inflammatoire grâce à

l'induction d'inflammation par un agent chimique. Ces différents modèles vont mimer un certain nombre de paramètres du SCI-PI.

Environ un patient sur dix développe des symptômes de SCI PI suite à une infection bactérienne de type *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *salmonella* et *shigella* (Giorgio and Barbara, 2008; Smith and Bayles, 2007; Spiller and Garsed, 2009; Spiller et al., 2000). Aucun modèle animal n'a pas eu être développé permettant de reproduire l'ensemble des symptômes des patients atteints de SCI PI. L'infection de souris avec *Campylobacter jejuni* induit une gastroentérite, suivit une modification de la consistance des fèces et d'une augmentation de la population bactérienne de 27% (Pimentel et al., 2008). Ces éléments coïncident avec l'augmentation de la population bactérienne retrouvée chez les patients atteints de SCI PI. L'infection avec *Salmonella enterica* modifie le microbiote et induit une forte inflammation chez la souris (Barman et al., 2008). Cependant d'autres paramètres comme l'hypersensibilité viscérale ainsi que la motricité intestinale ne sont pas modifiés dans ces modèles.

L'infection de souris et de rats avec le parasite *Trichinella spiralis* induit une modification fonctionnelle des nerfs sensitifs, des muscles lisses du *jejunum* et des sécrétions des cellules intestinales (Barbara et al., 2001; Chen et al., 2004; Venkova and Greenwood-van Meerveld, 2006; Yang et al., 2009). *Trichinella spiralis* provoque une importante hypersensibilité et une hypercontractilité du colon chez les animaux infectés. *Nippostrongylus brasiliensis* induit chez la souris et le rat une altération de la motricité intestinale et une hypersensibilité viscérale dépendant des mastocytes et des nocicepteurs à la kinine (Aerssens et al., 2007; Gay et al., 2000; McLean et al., 1998). Chez le rat, l'infection avec *Cryptosporidium parvum* est associée avec une hypersensibilité *jéjunale* à la distension et à une accumulation de mastocytes (Khaldi et al., 2009).

D'autres modèles induits par des agents chimiques peuvent être utilisés comme modèle du SCI PI. Une administration intra-colique d'acide acétique (0,5%) à des rats ou des souris nouveau-nés induit une inflammation modérée, qui sera suivi d'une hypersensibilité viscérale à l'âge adulte sans marqueur histologique d'inflammation (Winston et al., 2007). L'utilisation d'acide déoxycholique (instillation colique) ou de dextran sodium sulfate (DSS) (dans l'eau de boisson) induit une hypersensibilité viscérale et une hyperalgésie (Okayasu et al., 1990; Spiller, 2006, 2003). L'huile de



moutarde est un important irritant. Son administration en intra-colique induit une inflammation, des dommages tissulaires et une stimulation neuronale importante (Laird et al., 2001b). Administré chez des nouveau-nés, elle induit un changement de motricité intestinale et une hypersensibilité viscérale à l'âge adulte (Al-Chaer et al., 2000).

Le SCI PI peut être induit chez l'animal par des infections bactériennes ou parasitaires ainsi que par des agents chimiques. Dans chacun de ces modèles, après la phase aigüe d'infection/inflammation, les animaux développent des symptômes similaires à ceux des patients. Cependant chacun de ces modèles à ces avantages et ces inconvénients qui sont résumés dans le tableau suivant :

	<b>Modèle de SCI PI</b>	<b>Force du modèle</b>	<b>Faiblesse du modèle</b>
Agents chimiques	Acide acétique	Hypersensibilité viscérale sur le long terme (8 à 12 semaines)	Absence de M, S et P
	Huile de moutarde	Modification de la motricité intestinale et Hypersensibilité viscérale sur le long terme (9 semaines)	Absence de S et P
	DSS	Hypersensibilité viscérale sur le long terme (7 semaines)	Absence de M, S et P
	Acide déoxycholique	Hypersensibilité viscérale	Absence de M, S et P
Infection parasitaire	<i>Trichinella spiralis</i>	Changement des sécrétions intestinales (10 semaines), hypersensibilité viscérale et modification de la motricité intestinale	Dépendant de la souche animale
	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	Modification de la motricité intestinale et Hypersensibilité viscérale Hyperplasie des mastocytes	Absence de S et P
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Hypersensibilité viscérale et hyperplasie des mastocytes	Absence de M, S et P
Infection bactérienne	<i>Campylobacter jejuni</i>	Infection bactérienne semblable à celle des patients SCI PI, prolifération bactérienne	Faible taux de réussite du modèle (27%), absence de H, M, S et P

	<i>Salmonella enterica</i>	Infection bactérienne semblable à celle des patients SCI PI, modification du microbiote	Absence de H, M, S et P
--	----------------------------	---	-------------------------

Table 3: Forces et faiblesse des modèles animaux du SCI PI (adapté de (Qin et al., 2011)). H : hypersensibilité viscérale, M : modification de la motricité intestinale, S : altération des sécrétions intestinales, P : altération de la perméabilité intestinale.

- Le stress d'évitement passif de l'eau ou WAS

Le stress d'évitement passif de l'eau (ou WAS pour Water Avoidance Stress) est un modèle de stress chronique qui consiste à déposer l'animal (rat ou souris) sur une petite plateforme (juste assez grande pour contenir l'animal) au centre d'un grand baquet rempli d'eau froide. Cette expérience est réalisée durant une heure, tous les jours pendant 10 jours. Ce stress psychologique induit une augmentation de la signalisation périphérique et centrale par le CRF ce qui altère la motricité gastro-intestinale des animaux (Maillot et al., 2000). Le WAS induit aussi une augmentation de l'éjection de fèces, une augmentation de la perméabilité épithéliale (Larauche et al., 2011), le développement de comportements anxieux, ainsi qu'une importante hypersensibilité viscérale (hyperalgésie et une allodynie) (Bradesi et al., 2005b).

Le WAS entraîne une activation du système immunitaire intestinal après les 10 jours de stress : une augmentation de l'activation des mastocytes, de l'infiltration des neutrophiles (augmentation de l'activité myeloperoxydase) et des cellules mononuclées a pu être observée dans la muqueuse intestinale ainsi qu'une modification structurelle des cellules épithéliales (Söderholm et al., 2002).

L'induction du stress par le WAS est un très bon modèle d'étude du SCI car il reproduit des facteurs clés de la pathologie : l'hypersensibilité viscérale, l'inflammation de bas-grade, l'augmentation de la perméabilité intestinale et l'anxiété.

- L'injection de cortagine

L'injection de cortagine (10µg/kg dans la cavité intra-péritonéale) entraîne une hyperalgésie chez le rat, des diarrhées (augmentation du transit de 45%) et aucune inflammation visible de l'intestin. La cortagine est un peptide agoniste du CRF qui possède une haute affinité pour le récepteur CRF<sub>1</sub> en comparaison avec le récepteur

CRF<sub>2</sub>. Le récepteur CRF<sub>1</sub> est exprimé dans les neurones et les fibres myentériques du côlon proximal et distal chez le rat (Chatzaki et al., 2004). Le CRF peut activer ces neurones et ainsi modifier la contractilité intestinale (Maillot et al., 2000).

Ce modèle animal mime les symptômes d'hypersensibilité viscérale et d'augmentation du transit présent chez les patients atteints de SCI.

## e) Thérapies

Le SCI est une pathologie complexe. Les traitements sont symptomatiques et permettent uniquement de soulager les patients lors des phases de poussées. Ils consistent principalement à contrôler le transit intestinal.

### - Les antispasmodiques

Les spasmes des muscles lisses peuvent être responsables de douleurs abdominales. Les antispasmodiques agissent via l'antagonisme de l'acétylcholine sur les récepteurs muscariniques au niveau des jonctions neuromusculaires ce qui induit une relaxation des muscles lisses. L'Otilonium bromide et l'hyoscine sont des antispasmodiques efficaces chez certains patients (Ford et al., 2011). Un des effets indésirables de ces antagonistes est de provoquer de la constipation à cause de la forte inhibition des sécrétions des fluides intraluminaux. Ce traitement est donc prescrit à des patients n'étant pas constipés et doit être pris 20 minutes avant le repas. L'huile de poivre mentholé inhibe les contractions des muscles lisses via le blocage des canaux calciques. Une nouvelle formulation de cette huile, ayant des effets dans l'intestin grêle, a donné de très bon résultats chez les patients atteints de SCI-D et de SCI-M (Cash et al., 2016).

### - Les antidépresseurs

Les mécanismes antidouleur des antidépresseurs sont totalement inconnus. Cependant, on considère qu'ils agissent au niveau du SNC par la modulation de la transmission et des afférences sensibles viscérales et en périphérie dans le tractus, par l'altération des transmissions cholinergiques et histaminergiques (Moret and Briley, 2006). L'antidépresseur tricyclique ou l'inhibiteur sélectif de la recapture de sérotonine peuvent être prescrits en traitement de la douleur chez les patients atteints de SCI-D. Les effets indésirables peuvent être de la constipation, une bouche sèche et de la fatigue.

- Les anti-diarrhéiques

Les traitements les plus utilisés sont les agonistes des récepteurs  $\mu$  des opioïdes comme le loperamide. Ils prolongent le transit intestinal en réduisant le péristaltisme permettant ainsi de réduire la fréquence et d'améliorer la consistance des fèces. Ils ont peu d'effets secondaires car ils ne passent pas la barrière hématoencéphalique (Efskind et al., 1996). Les antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> (alosetron, ramosetron et ondansetron) peuvent être donnés aux patients atteints de SCI-D. Leurs mécanismes d'action sont peu connus mais on suppose qu'ils inhibent la partie ascendante du réflexe de péristaltisme et que la forte amplitude de ces contractions se propage au tractus gastro-intestinal (Clavé et al., 2011).

- Laxatifs et accélérateurs de transit

Pour les patients atteints de SCI-C, des laxatifs comme le senna ou le docusate sont donnés en première instance. Si ces derniers n'ont plus d'effets, le linaclotide (absorbeur de peptide agoniste de la guanylyl cyclase C) peut être conseillé aux patients ayant développé des symptômes depuis plus d'un an. Le linaclotide augmente la sécrétion de fluides intraluminaux mais a aussi un effet analgésique par la modulation des nocicepteurs coliques. Il va donc réduire la douleur et les saignements (Chey et al., 2012). Le lubiprostone peut aussi être utilisé (acide gras bicyclique dérivé des prostaglandines E1) pour améliorer les symptômes gastro-intestinaux des patients atteints de SCI-C. Il active les canaux calciques de type 2 sur la membrane apicale des entérocytes, stimulant ainsi la production de fluides (Drossman, 2006). Pour promouvoir les mouvements intestinaux chez les patients atteints de SCI-C, les cliniciens peuvent donner des agonistes aux récepteurs 5-HT<sub>4</sub> (prucalopride) qui vont activer les voies sérotoninergiques. (Tack et al., 2009) (Figure 27).

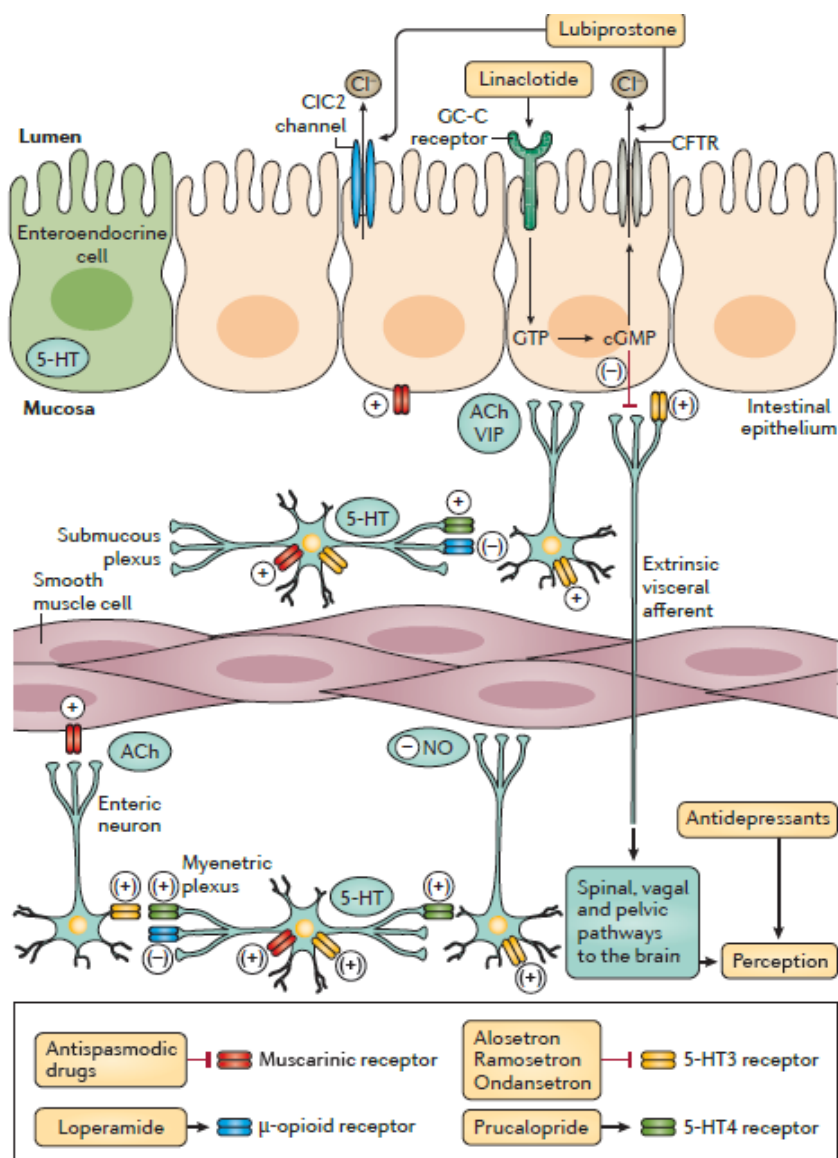


Figure 27 : **Mécanismes d'action des traitements utilisés pour améliorer les symptômes des patients atteints de SCI** (Enck et al., 2016)

Les médicaments actuellement utilisés pour le traitement du SCI visent l'activité nerveuse, les fonctions épithéliales ou l'état contractile des couches musculaires lisses. Plusieurs médicaments agissent en améliorant l'activité des canaux chlorure pour augmenter la sécrétion de fluide dans la lumière intestinale. D'autres mécanismes d'actions ciblent la modulation de la sensibilité viscérale au niveau central ou périphérique. Enfin les certains traitements agissent pour moduler la transduction du signal à la jonction neuromusculaire ou modifier la motricité par des actions myogéniques directes.

- Modification du microbiote

De nombreuses études ont montré le rôle du microbiote dans les symptômes du SCI. Le traitement des patients aux antibiotiques et au probiotiques a donc été envisagé. L'utilisation de rifaximine diminue les symptômes des patients (Pimentel et al., 2010).

Les mécanismes ne sont pas entièrement connus mais incluent une modification du microbiote ainsi que des effets directs sur la micro-inflammation. Le traitement du SCI par la rifaximine est autorisé aux Etats-Unis mais pas en Europe. Les probiotiques réduisent la douleur mais leur mode d'action potentiel sur le microbiote ou le système immunitaires est inconnue (Didari et al., 2015). Cependant l'effet de ces traitements avec différentes bactéries probiotiques est très controversé. Plusieurs études ne montrent pas d'amélioration des symptômes des patients atteints de SCI après l'utilisation de probiotiques (Hod et al., 2017; Ludidi et al., 2014).

De nouvelles études s'intéressent à la transplantation de flore fécale d'individus sains afin de rétablir un microbiote « le plus normal possible » et de réduire la dysbiose des patients atteints de SCI. Quelques études ont été réalisées chez l'Homme et le rongeur et révèlent une amélioration des symptômes gastriques (De Palma et al., 2017; Zoller et al., 2015).

#### - Psychothérapies

Les personnes atteintes de SCI vivent mal leurs symptômes, ils se sentent honteux et embarrassés devant leur famille et leurs amis qui comprennent mal cette maladie (Drossman et al., 2009). L'institut national de la santé conseille aux patients dont les traitements ne sont pas efficaces depuis plus de 12 mois de commencer une psychothérapie. Il existe 4 principales psychothérapies pour les patients atteints de SCI. La thérapie cognitive comportementale est basée sur le fait que les symptômes SCI sont dus à des évènements stressant de la vie et à des comportements mal adaptés. Le patient identifie les facteurs psychologiques (émotions et actions) qui interfèrent avec ces symptômes physiques puis avec l'aide du psychologue, met en place une thérapie comportementale (Henrich et al., 2015). La thérapie psychodynamique aide les patients dont le développement des symptômes est dû à des conflits ou des difficultés dans leur relation avec certaines personnes. Ces patients sont encouragés à discuter de leurs facteurs émotionnels afin de trouver lien avec leurs symptômes (Creed et al., 2003). L'hypnose permet aux patients de prendre conscience de leur intestin et de contrôler et normaliser leur fonction gastro-intestinale (Peters et al., 2015). La thérapie cognitive basée sur la pleine conscience prône la prise de conscience de la perception des symptômes du SCI (Gaylord et al., 2011).

#### - Régimes et approches nutritionnelles

De nombreux patients atteints de SCI suivent un régime alimentaire particulier (sans gluten, lait, viande ou encore sans viande fumée) afin de diminuer leurs symptômes. L'alimentation semble donc avoir un rôle à jouer dans la physiopathologie du SCI. De nombreux aliments comme le blé ou le seigle contiennent des carbohydrates à chaînes courtes qui sont difficilement absorbés par l'organisme. Ces carbohydrates sont le substrat de fermentation bactérienne qui engendre des gaz qui peuvent induire un inconfort ou des douleurs abdominales. Un régime pauvre en carbohydrate réduit les symptômes des patients atteints de SCI et améliore leur qualité de vie (Østgaard et al., 2012). De plus, une alimentation pauvre en FODMAPs (Fermentable Oligo Di Mono saccharides and Polyols) aurait un effet bénéfique sur les symptômes d'une partie des patients atteints de SCI (Enck et al., 2016; Shepherd et al., 2008b). Soixante pourcent des patients atteints de SCI présentent une hypersensibilité au gluten et aux céréales. Un régime pauvre en gluten améliore les symptômes de certains patients (Shahbazkhani et al., 2015; Zar et al., 2005).

Aucune étude ne montre de lien direct entre allergies/intolérance alimentaire et le développement du SCI (Mansueto et al., 2015).

Les MICI et le SCI sont des pathologies intestinales dont l'incidence est en perpétuelle augmentation. Les traitements sont coûteux et ne permettent pas une rémission. L'étude des acteurs mis en jeu dans ces pathologies est donc nécessaire afin de permettre de développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans ces 2 pathologies, les cellules de l'épithélium intestinal jouent un rôle important. Or ces cellules sont une importante source de protéases qui sont impliquées dans l'inflammation et dans la douleur.

## **CHAPITRE 4 :**

### **Les protéases : leur implication dans le SCI et les MICI**

Les protéases sont codées par environ 2 à 3% du génome et sont exprimées par tous les organismes vivants comme les bactéries, les plantes ou encore les mammifères (Rawlings, 2010). Chez ces derniers, la diversité des protéases est très importante. Longtemps considérée comme uniquement mises en jeu dans la digestion via la dégradation des protéines du bol alimentaire, on sait aujourd'hui qu'elles ont de multiples fonctions. En effet, les protéases ont un rôle dans de nombreux processus physiologiques (coagulation, immunité, cicatrisation) mais aussi pathologique (MICI, pancréatite, cancer...). Les protéases hydrolysent des liaisons peptidiques à l'intérieur de la protéine (endopeptidase) ou clivent les liaisons présentes aux extrémités de la protéine (exopeptidase). Les protéases présentent un site actif permettant un clivage protéique spécifique de liaisons peptidiques. Cette spécificité de substrat ainsi que l'ensemble des liaisons se formant entre la protéase et son substrat définissent la spécificité de la protéase. Chez les mammifères, il existe 4 grandes classes de protéases : les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les protéases à aspartate et les métalloprotéines.

Dans cette partie nous nous intéresserons plus particulièrement aux protéases à sérine et à leurs inhibiteurs qui font l'objet de notre étude.

#### **1- Les protéases à sérine**

Cette classe de protéases se caractérise par la présence de 3 acides aminés conservés dans leur site catalytique : une sérine, une histidine et un acide aspartique qui forment la triade catalytique. La nature des résidus présents dans la poche catalytique ainsi que leur taille va permettre de classer ces protéases à sérine. Les protéases sont produites par de nombreux types cellulaires et sont impliquées dans la physiopathologie



de nombreuses maladies inflammatoires comme les MICI ou encore dans le SCI. Les principales protéases à sérine ainsi que celles identifiées dans notre étude seront développées dans cette partie.

### a) Les élastases

La poche catalytique des élastases est très réduite et permet d'accueillir des résidus courts non chargés comme l'alanine, la valine et la glycine. Dans les pathologies intestinales, l'élastase produite par le neutrophile ainsi que celle produite par l'épithélium intestinal sont impliquées dans l'inflammation.

#### - L'élastase du neutrophile

L'élastase du neutrophile (EN), produite sous forme immature est maturée grâce à une cathepsine C ou à la DPI (Dipeptidyl peptidase I) dans les granules azurophiles (Caputo et al., 1993). Lors de l'inflammation, les neutrophiles font parties des premières cellules infiltrées. Elles aident à lutter contre le pathogène grâce à différents mécanismes impliquant l'EN. Elle active l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), qui augmente la prolifération cellulaire des cellules épithéliales lésées (Meyer-Hoffert et al., 2004), elle augmente la production d'IL8 (cytokine clés de l'inflammation) grâce à l'activation de NFkB médié par le TLR-4 (Devaney et al., 2003). La délétion de cette protéase chez la souris montre que l'EN est nécessaire à la clairance de certaines bactéries Gram négative (*Klebsiella pneumonia* et *Escherichia coli*) (Belaouaj et al., 1998). De plus, dans les MICI la présence d'EN dans les fèces ou dans le sang des patients, indique une progression de la maladie (Langhorst et al., 2008).

#### - L'élastase épithéliale

L'activité protéolytique de la muqueuse colique des patients atteints de MICI est augmentée (Cenac N et al., 2007) et notamment l'activité élastase. Celle-ci est en partie due à l'infiltration des neutrophiles sur le site inflammatoire. Cependant, notre laboratoire (Motta JP et al., 2012) a montré que les tissus muqueux non inflammatoires des patients atteints de MICI présentent aussi une augmentation de l'activité élastase. La localisation par zymographie *in situ* de cette activité protéolytique montre une importante activité élastolytique de la cellule épithéliale.

-

L'activité élastolytique, provenant du neutrophile ou encore de l'épithélium intestinal semble donc avoir un rôle important dans la physiopathologie des MICI. La caractérisation de l'activité élastolytique dans les cellules épithéliales intestinales en conditions physiologiques et pathologiques est un programme de recherche actuellement développé au laboratoire. De précédentes études menées par le laboratoire ont montrés que l'activité élastolytique dans la muqueuse de patients atteints de MICI étaient augmentées et que l'administration d'Elafine, un inhibiteur endogène permet de protéger des souris contre une colite (Motta et al., 2011, 2012).

## b) Les trypsines

Les trypsines clivent après une lysine ou une arginine. Elles sont caractérisées par la triade catalytique His-57, Asp-102 et Ser-195 (Higaki et al., 1987). Il existe 3 principales formes de trypsines : la trypsine cationique, anionique et la mésotrypsine (ou trypsine-3). Elles sont ainsi nommées à cause de leur point isoélectrique.

### - Les trypsines digestives : PRSS1 et PRSS2

Les gènes *PRSS1* et *PRSS2* codent respectivement 2 trypsines, le trypsinogène 1 qui une fois activé génère la trypsine cationique (13% du jus pancréatique) et le trypsinogène 2 qui une fois clivé donnera la trypsine anionique (6% du jus pancréatique). Ces 2 formes de trypsine ont 88% d'homologie entre elles. Ces 2 gènes sont localisés sur le chromosome 7q35.

Ces 2 formes de trypsines sont sécrétées sous forme de zymogène par le pancréas et sont activées par une entéropeptidase présente dans la bordure en brosse des cellules épithéliales duodénales. Leur rôle est de dégrader les protéines du bol alimentaire afin de faciliter leur absorption par les cellules épithéliales intestinales.

### - La trypsine-3 : PRSS3

La trypsine-3 (nommée encore mésotrypsine) est une trypsine mineure du jus pancréatique (moins de 0,5%). Elle est codée par le gène *PRSS3*, présent sur le chromosome 9p13. Le transcrit *PRSS3* possède 2 sites d'épissages alternatifs permettant la synthèse de différentes protéines : le mésotrypsinogène, et le trypsinogène IV. Ces 2 enzymes sont activées par une entéropeptidase générant la protéine active trypsine-3 (Salameh and Radisky, 2013).

Cette trypsine a la particularité de ne posséder aucun inhibiteur endogène connu. De plus, elle possède une grande résistance aux inhibiteurs de trypsine classique comme les inhibiteurs de type Kunitz (SBTI : SoyBean Trypsin Inhibitor) (Rinderknecht et al., 1984). Une analyse par cristallographie de la structure de la trypsine-3 montre que cette résistance serait due à la substitution d'une arginine à la place d'une glycine en position 193. La présence de cette arginine dans la poche catalytique pourrait engendrer des répulsions stériques avec les inhibiteurs (Figure 28).

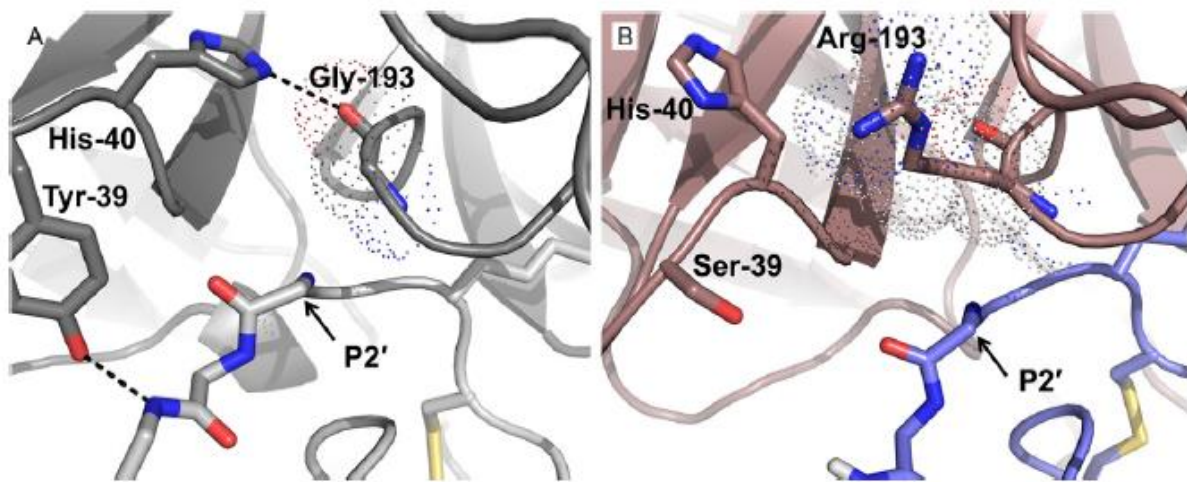


Figure 28: **Structure du site actif de la Trypsine-3** (Salameh et al., 2013)

Différence structurale majeure entre la trypsine cationique (à gauche en blanc) et la trypsine-3 (à droite en bleu) face à un inhibiteur (le BPTI, en gris et rouge). L'arginine en position 193 empêche l'inhibiteur de fixer la trypsine-3 par répulsion électrostatique alors que l'inhibiteur va former une liaison de type H avec la glycine 193 de la trypsine cationique.

La trypsine-3 est capable de dégrader les inhibiteurs de type Kazal qui, à l'opposé, forment des liaisons irréversibles avec les trypsines cationiques et anioniques (Sahin-Tóth, 2005). On a donc supposé que le rôle de la trypsine-3 pancréatique était de contrôler l'activité trypsique provenant du pancréas via la dégradation de ses inhibiteurs (Szmola et al., 2003). Cependant la trypsine-3 a été identifiée dans des tissus extra-pancréatiques.

La trypsine-3 a été mise en évidence à l'origine dans le cerveau humain (Wiegand et al., 1993) où son expression est importante. Elle est produite par les neurones, les cellules gliales et les astrocytes. Cependant, de très faibles taux d'entérokinase ont pu être détectés dans le cerveau (Yahagi et al., 1996). Son mode d'activation dans le cerveau ainsi que son rôle restent encore mal décrits. Elle pourrait être impliquée dans

l'inflammation neurogénique (Knecht et al., 2007), dans l'hydrolyse des protéines de myéline (Wang et al., 2007) et dans la régulation de la GFAP (Glial Fibrillary acidic protein) des astrocytes (Minn et al., 1998). Elle est capable d'activer des neurones sensitifs et d'induire une inflammation ainsi qu'une hypersensibilité lorsqu'elle est injectée dans la patte de la souris (Knecht et al., 2007).

L'expression de la trypsine-3 a aussi été décrite dans les épithéliums. L'expression de l'ARNm de la trypsine-3 est augmentée dans la muqueuse intestinale des patients atteints de SCI (Kerckhoffs et al., 2008). Au niveau de la peau, la trypsine-3 aurait un rôle dans la desquamation grâce à l'activation de kallikréines et la dégradation de leurs inhibiteurs (Miyai et al., 2014). Dans l'épithélium intestinal et plus particulièrement dans les cellules de Paneth, la trypsine-3 clive la pro-forme de l' $\alpha$ -defensine-5 permettant ainsi la libération de ce peptide antimicrobien dans la lumière intestinale (Ghosh et al., 2002).

Chez l'animal, il n'existe pas d'orthologue à la trypsine-3 chez la souris, uniquement un pseudogène. Chez le rat, une protéase, p23 possède les mêmes caractéristiques de suppression d'inhibiteur de trypsines que la trypsine-3 (Fukuoka and Nyaruhucha, 2002).

#### - Les trypsines dans les pathologies intestinales

Une augmentation de l'activité des protéases à sérine a été identifiée dans les fèces de patients atteints de SCI-D et induit une hypersensibilité viscérale lorsqu'elles sont injectées dans le côlon de souris (Annaházi et al., 2009). Chez les patients atteints de SCI, l'activité trypsique dans la muqueuse intestinale est plus élevée que chez des individus sains. Cette augmentation de l'activité protéolytique est capable d'activer des neurones sensitifs issus de la racine dorsale spinale murin et d'augmenter la sensibilité viscérale de souris lorsqu'on leur administre le surnageant de biopsies de patients atteints de SCI (Cenac et al., 2007). Cette activité trypsine-like peut en partie être due à l'augmentation de la dégranulation des mastocytes chez les patients atteints de SCI qui sécrèteraient de la tryptase, ainsi qu'à leur position très proche des terminaisons nerveuses. Cette proximité pourrait permettre aux protéases relarguées par le mastocyte d'activer les fibres sensitives et ainsi d'augmenter la sensibilité viscérale de ses individus (Barbara et al., 2004). Cependant à ce jour, aucune étude n'a déterminé le type de protéases à sérine impliquées dans le SCI.

### c) La thrombine

La thrombine est une protéase à serine multifactorielle, générée à partir de prothrombine. C'est un régulateur clé des processus hémostatiques. Elle permet la production d'activateurs de plaquettes comme l'adénosine diphosphate, la sérotonine ou encore le thromboxane A2. La thrombine est aussi capable de convertir directement le fibrinogène en monomère de fibrine permettant la formation d'un caillot qui stoppe le saignement (Bae et al., 2010). La thrombine active les plaquettes via PAR1 et PAR4 en fournissant une surface membranaire pro-coagulante sur laquelle les facteurs de coagulation peuvent se rassembler. La thrombine est capable de réguler sa propre génération. D'une part elle améliore sa production grâce à l'activation des cofacteurs FV, FVIII et FXI dans une boucle de rétroaction positive, et d'autre part elle diminue sa production via sa liaison sur un récepteur des cellules endothéliales (la thrombomoduline) qui aura pour conséquence l'activation de la voie de la protéine C et la diminution d'expression de la thrombine (Lane et al., 2005).

La thrombine possède aussi de nombreux effets non hémostatiques. En effet, sa capacité à activer les récepteurs PAR1, PAR4 et PAR2, lui confère de nombreux rôles physiologiques et pathologiques. Ces effets cellulaires peuvent être directement liés à sa concentration : à faible concentration (20 à 75pM), son activation du récepteur PAR1 induit un effet protecteur sur le maintien de la barrière formée par les cellules endothéliales (Feistritzer and Riewald, 2005) alors qu'une concentration plus importante (>100pM) induit un signal de rupture de barrière (Bae et al., 2009). PAR2 ne peut pas être activé directement par la thrombine mais peut être transactivé par PAR1. La thrombine génère sur PAR1 un ligand attaché en N-terminal qui permet l'activation d'un récepteur PAR2 (Blackhart et al., 1996). L'hétéromère PAR1PAR2 joue un rôle dans la septicémie, la réponse à des dommages artériels et dans les processus cytoprotecteurs (Kaneider et al., 2007). La thrombine pourrait être impliquée dans la progression de l'athérosclérose. Les lésions artérioscléreuses précoces sont hyper coagulables ce qui pourrait suggérer un rôle de la thrombine dans cette pathologie (Borissoff et al., 2010).

#### d) Les tryptases, chymase et trypsines-like

Les mastocytes sécrètent la tryptase et la chymase. Comme nous l'avons vu précédemment, l'augmentation de l'activité trypsin-like est impliquée dans des phénomènes d'hypersensibilité viscérale. Cependant, ces protéases peuvent aussi avoir un rôle dans les pathologies inflammatoires comme les MICI. Les patients atteints de RCH possèdent des mastocytes qui sécrètent davantage de tryptase (Raithel et al., 2001). La tryptase et la chymase, dans des modèles animaux vont augmenter la perméabilité endothéliale chez le cobaye (He et al., 1997) et induire l'accumulation de cellules inflammatoires dans le péritoine des souris. La chymase augmente la perméabilité épithéliale *in vitro* en diminuant les jonctions serrées (Scudamore et al., 1998).

#### e) La protéinase-3

Les granules secondaires des neutrophiles possèdent d'importantes quantités de protéinase-3 (PR-3). Cette enzyme possède une structure très proche de celle de l'EN (affinité pour les mêmes substrats) (Rao et al., 1993). Elle aide à la maturation et à l'activation de nombreuses cytokines (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  et IL18) (Wiedow and Meyer-Hoffert, 2005). La PR-3 possède aussi des propriétés pro-apoptotiques via l'activation de la pro-caspase-3 dans les neutrophiles eux-mêmes ou dans les cellules endothéliales (Pendergraft et al., 2004) (Figure 29).

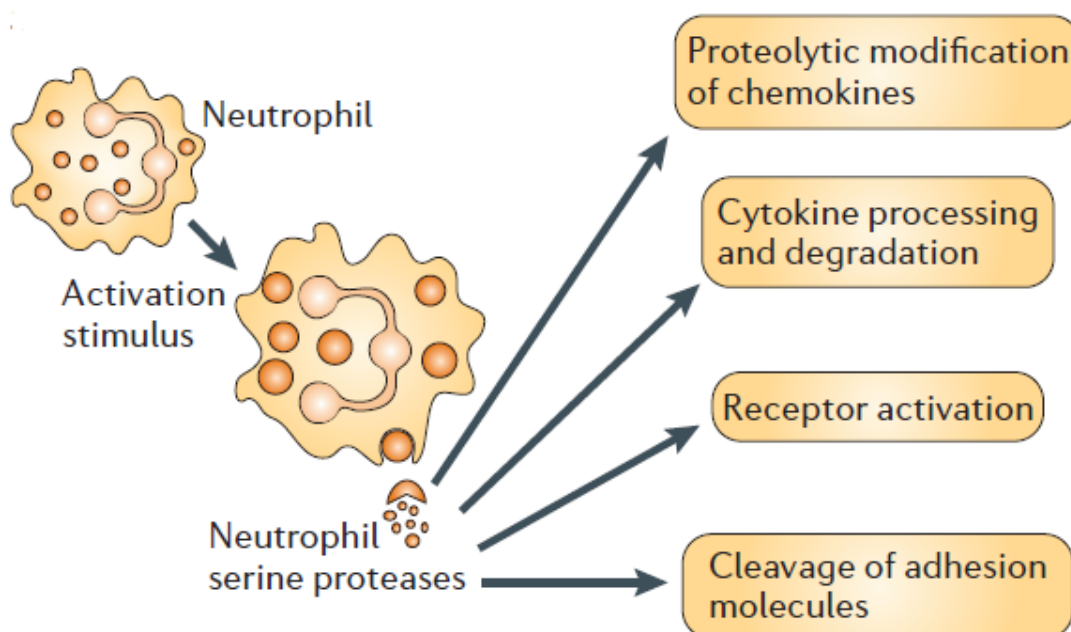


Figure 29 : **Les protéases à sérine du neutrophile dans l'inflammation** (adapté de (Pham, 2006))

#### f) Les cathepsines

Il existe 2 cathepsines dans la famille des protéases à sérine : la cathepsine A et la cathepsine G. La cathepsine A est une protéase lysosomale qui se lie à la neuraminidase et à la  $\beta$ -galactosidase pour former un complexe stable et actif dans les lysosomes. Sa déficience entraîne le développement de galactosialidose (surcharge lysosomale) (Kolli and Garman, 2014). La cathepsine G est exprimée par les neutrophiles. Elle est impliquée dans l'inflammation. Chez les patients atteints de RCH, elle modulerait la perméabilité de la barrière épithéliale grâce à des mécanismes dépendants du récepteur aux protéases PAR4 (Dabek et al., 2009).

#### g) Les kallikréines

Les kallikréines font parties des protéases à sérine parmi lesquelles on distingue la kallikréine plasmatique et les kallikréines tissulaires. Les kallikréines tissulaires sont composées de 15 kallikréines et sont exprimées dans de nombreux tissus (pancréas, vaisseaux sanguins, cerveau, intestin...) (Pathak et al., 2013). Par exemple, la kallikréine 1 clive le kinninogène en kinine active qui est impliqué dans les pathologies inflammatoires (Borgoño et al., 2004). Chez les patients atteints de MICI, la sécrétion de kallikréines dans la lumière intestinale est fortement augmentée. Ce phénomène est corrélé avec le degrés d'inflammation du tissus (Devani et al., 2005). L'inhibition de ces protéases diminue la colite chez le rat (Stadnicki et al., 1996) De plus, l'expression de la kallistatine, un inhibiteur de kallikréines tissulaires, est fortement diminuée chez les patients atteints de MC et RCH (Stadnicki et al., 2003). La kallikréine1 permet la libération de bradykinine. La kallikréine plasmatique est synthétisée par le foie, circule dans les vaisseaux sanguins où elle permet la libération de la bradykinine. La bradykinine est impliquée dans les phénomènes inflammatoires comme l'activation des macrophages (Tiffany and Burch, 1989), elle augmente le seuil de sensibilité des fibres nociceptives (Julia et al., 1995) et perturbe la motricité intestinale (Murrell and Deller, 1967).

## h) Les granzymes

Les granzymes sont les protéases à sérine permettant l'induction d'apoptose des cellules infectées (via la voie des caspases) par certaines cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T cytotoxiques, et intra-épithéliaux, ainsi que les cellules NK. Elles sont synthétisées sous forme de zymogènes puis stockées dans les granules cytolytiques de la cellule. L'activation des granzymes a lieu dans les lysosomes par la cathepsine C. Les granzymes B possèdent l'activité pro-apoptotique la plus importante. Elle va activer la voie des caspases via le clivage direct des pro-caspases et inactiver un inhibiteur de la voie des caspases ICAD (Inhibitor of caspase-activated DNase) (Trapani, 2001). La surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans la mitochondrie est capable d'inhiber totalement les granzymes B, ce qui indique l'importance de la destruction mitochondriale dans la mort cellulaire induite par les granzymes B (Sutton et al., 1997). Le granzyme A a un rôle dans la régulation de la prolifération des lymphocytes B, facilitent leur migration via le clivage des protéines de la matrice extracellulaire et sont impliquées dans l'activation de certaines cytokines (Trapani, 2001).

Dans les MICI, où le système immunitaire est suractivé, les granzymes des lymphocytes T participeraient à l'augmentation de la perméabilité épithéliale grâce à la lyse de cellules de l'épithélium (Souza et al., 2005).

## i) Les Matriptases

Les protéases à sérine sont pour la plupart sécrétées. Cependant, les protéases à sérine ancrées aux membranes sont des protéases transmembranaires présentes à la surface cellulaire (Buzza et al., 2010). Les 2 membres principaux de la famille des TTSP (type II transmembrane serine protease) sont la matriptase-1 et la matriptase-2. La matriptase-1 possède un court domaine cytosolique, un domaine transmembranaire et un domaine catalytique qui est relié au reste de la molécule par un pont disulfure (Yuan et al., 2011). Elle est exprimée dans les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal et joue un rôle dans le maintien de la barrière épithéliale. Les souris déficientes pour la matriptase-1 présente un défaut de perméabilité intestinale. L'expression de la matriptase-1 augmente durant la mise en place de la barrière épithéliale. Elle est localisée dans les jonctions intercellulaires en association avec l'E-cadhérine. Elle régule l'expression de la



claudine2 grâce à l'activation de la voie de signalisation PKC (Buzza et al., 2010). La matriptase-2 est, quant à elle, impliquée dans l'homéostasie du fer. Cette protéase est produite par le foie et régule de manière négative la production d'hepcidine via son clivage. L'hepcidine est un peptide sécrété par le foie qui joue un rôle central dans l'ajustement de l'absorption du fer (Nicolas et al., 2001). L'hepcidine régule de manière négative l'export cellulaire du fer en augmentant la dégradation de la ferroportine. La ferroportine est le seul exportateur de fer connu présent à la surface des entérocytes, des macrophages et des hépatocytes. Il permet de contrôler l'absorption et la sécrétion de fer. (Wang et al., 2014). L'expression de la matriptase-2 peut être régulée par le niveau de fer dans l'organisme (Meynard et al., 2011).

#### j) Expression des protéases à sérine

Les différentes protéases à sérine décrites ci-dessus, le type cellulaire et les conditions dans lesquelles elles sont exprimées sont résumés dans le tableau ci-dessous.

<i>Protéases à sérine</i>	<i>Types cellulaires où elles sont exprimées</i>	<i>Conditions d'expression</i>
<b>Elastase</b>	Cellules immunitaires (neutrophiles, mastocytes, monocytes, éosinophiles)	Inflammatoire
	Cellules épithéliales (peau, intestin)	Physiologique Surexprimées en condition pathologique
<b>Proteinase-3</b>	Neutrophiles, monocytes	Inflammatoire
<b>Tryptase</b>	Mastocytes, basophiles	Inflammatoire
<b>Chymase</b>	Mastocytes, basophiles	Inflammatoire
<b>Trypsines</b>	Pancréas	Physiologique
	Cellules épithéliales (peau, intestin, poumon)	Physiologique Surexprimées en condition pathologique (MICI et SCI)
	Cellules endothéliales	Physiologique
	Cellules neuronales	Physiologique
<b>Kallikreines</b>	Pancréas	Physiologique
	Cellules épithéliales de la peau et de l'intestin	Physiologique Surexprimées en condition pathologique
<b>Granzymes</b>	Lymphocytes	Inflammatoire

<b>Cathepsines</b>	A: lysosomes	Physiologique
	G: Neutrophiles, mastocytes	Inflammatoire
<b>Matriptase-1</b>	Cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal	Physiologique

Table 4 : **Localisation et conditions d'expression des protéases à sérine**

### k) Les protéases microbiennes

Les cellules de l'hôte ne sont pas les seules cellules productrices de protéases lors de pathologies intestinales. Le microbiote, dont le rôle est prépondérant dans des pathologies comme les MICI ou le SCI, peut aussi sécréter des protéases et participer à la dérégulation protéolytique. Des protéases à sérine produites chez un individu sains n'auront que peu d'effet alors que chez une personne prédisposée à développer une pathologie intestinale (terrain génétique propice, immunité altérée, dysbiose), celle-ci pourront augmenter l'incidence de la maladie. Le microbiote intestinal, en symbiose avec l'organisme, peut s'avérer délétère dans un environnement luminal inapproprié (Annaházi et al., 2009; Darfeuille-Michaud et al., 2004).

L'entéroagrégate *E.coli* (EAEC) produit une protéase Pic (Protease Involved in colonisation) qui est impliquée dans les premiers stades de l'infection, promeut la colonisation intestinale et est nécessaire aux premières étapes de formation du biofilm des EAEC (Henderson et al., 1999). La bactérie *E.coli* adhérente et invasive (AIEC) LF82 est retrouvée au niveau des lésions chroniques iléales des patients atteints de MC (Darfeuille-Michaud A et al., 2004). Cette bactérie produit une protéase, Vat-AIEC qui contribue à la pénétration des bactéries dans la barrière de mucus ainsi qu'à leur adhésion aux CEI (Gibold et al., 2016).

Dans un modèle de souris déficientes pour l'IL10, *Enterococcus faecalis* peut induire une inflammation. Elle sécrète une protéase (la gélatinase) capable de dégrader le collagène, le fibrinogène et la fibrine (Mäkinen et al., 1989). Elle participe ainsi aux dommages de la barrière épithéliale et à l'inflammation. Or les patients atteints de MC possèdent une grande diversité de bactéries gélatinolytiques comparées à des individus contrôles (Pruteanu et al., 2011). Elles pourraient donc participer à l'inflammation épithéliale des patients. De plus, les surnageants issus de fèces de patients atteints de SCI-D induisent une forte augmentation de la perméabilité intestinale chez la souris et une hypersensibilité viscérale dépendante des protéases (Gecse et al., 2008).

*Pseudomonas aeruginosa* produit de nombreuses enzymes extracellulaires qui participent à sa pathogénicité. L'une d'elles est une élastase, codée par le gène *lasB*. C'est un facteur de virulence qui contribue au développement de l'infection dans des modèles murins (Cicmanec and Holder, 1979). Cette protéase est capable de dégrader de nombreuses molécules comme les immunoglobulines, le collagène et les fibrines. Elle est aussi capable d'inactiver des cytokines comme le TNF $\alpha$  ou l'IFN $\gamma$  (Rust et al., 1996).

## 2- Les inhibiteurs endogènes

Les protéases sont finement régulées par des inhibiteurs endogènes. Ces inhibiteurs sont classés en 48 familles grâce à la classification de MEROPS, basée sur des identités de séquence protéiques (Rawlings, 2010).

### a) Les serpines

Les serpines (Serine Protease Inhibitor) constituent la famille d'inhibiteurs de protéases la plus répandue. Elles sont présentes chez les animaux, les plantes, les bactéries, les archées et chez les poxvirus. Elles font partie de la famille I4 d'après la classification de MEROPS et elles sont subdivisées en 16 clades (de A à P) (Rawlings, 2010). Leur taille est importante, entre 300 et 500 acides aminés. Leur mécanisme est de type « suicide » ou « utilisation unique ». Les serpines possèdent une boucle réactive très mobile. Lorsqu'elles se positionnent dans le site actif, cette boucle est clivée comme un substrat ce qui entraîne un changement conformationnel de l'inhibiteur, plus stable, qui encombre le site actif de l'enzyme et empêche tous autres clivages. L'action de l'inhibiteur est irréversible (Huntington et al., 2000). Les 2 principaux clades sont le clade A regroupant des serpines extracellulaires et le clade B, regroupant des inhibiteurs intracellulaires.

Le clade A se compose des inhibiteurs de trypsine (SERPINA1), d'inhibiteurs impliqués dans l'inhibition de l'élastase du neutrophile, et d'inhibiteurs de chymotrypsine (SERPINA3) qui peuvent aussi bloquer la cathepsine G. Le clade B contient des serpines

qui préviennent les actions pro-apoptotiques des protéases (SERPINB6 et SERPINB9) (Law et al., 2006) (Figure 30).

Serpin	Alternative name(s)	Protease target or function
SERPINA1	Antitrypsin	Extracellular; inhibition of neutrophil elastase
SERPINA2	Antitrypsin-related protein	Not characterized, probable pseudogene
SERPINA3	Antichymotrypsin	Extracellular; inhibition of cathepsin G
SERPINA4	Kallistatin (PI4)	Extracellular; inhibition of kallikrein
SERPINA5	Protein C inhibitor (PAI-3)	Extracellular; inhibition of active protein C
SERPINA6	Corticosteroid-binding globulin	Extracellular; non-inhibitory; cortisol binding
SERPINA7	Thyroxine-binding globulin	Extracellular; non-inhibitory; thyroxine binding
SERPINA8	Angiotensinogen	Extracellular; non-inhibitory; amino-terminal cleavage by the protease renin results in release of the decapeptide angiotensin I
SERPINA9	Centerin	Extracellular; maintenance of naive B cells
SERPINA10	Protein Z-dependent proteinase inhibitor	Extracellular; inhibition of activated factor Z and XI
SERPINA11	XP_170754.3	Not characterized
SERPINA12	Vaspin	Extracellular; insulin-sensitizing adipocytokine
SERPINA13	XM_370772	Not characterized
SERPINB1	Monocyte neutrophil elastase inhibitor	Intracellular; inhibition of neutrophil elastase
SERPINB2	Plasminogen activator inhibitor-2 (PAI2)	Intracellular; inhibition of uPA
SERPINB3	Squamous cell carcinoma antigen-1	Intracellular; cross-class inhibition of cathepsins L and V
SERPINB4	Squamous cell carcinoma antigen-2	Intracellular; cross-class inhibition of cathepsin G and chymase
SERPINB5	Maspin	Intracellular; non-inhibitory; inhibition of metastasis through uncharacterized mechanism
SERPINB6	Proteinase inhibitor-6 (PI6)	Intracellular; inhibition of cathepsin G
SERPINB7	Megsin	Intracellular; megakaryocyte maturation
SERPINB8	Cytoplasmic antiproteinase 8 (PI8)	Intracellular; inhibition of furin
SERPINB9	Cytoplasmic antiproteinase 9 (PI9)	Intracellular; inhibition of granzyme B
SERPINB10	Bomapin (PI10)	Intracellular; inhibition of thrombin and trypsin
SERPINB11	Epipin	Intracellular
SERPINB12	Yukopin	Intracellular; inhibition of trypsin
SERPINB13	Headpin (PI13)	Intracellular; inhibition of cathepsins L and K

Figure 30 : **Descriptions et fonctions associées aux principales serpinines humaines** (Law et al., 2006).

Dans les pathologies intestinales leur implication est controversée : des études montrent que les patients atteints de MICI ont une expression diminuée de SERPINA1 (Elzouki et al., 1999; Yang et al., 2000), alors qu'une autre étude ne trouve pas de corrélation avec la RCH (Becker et al., 1999).

## b) Les inhibiteurs de type Kazal

Ces inhibiteurs sont classés dans la famille I1, d'après la classification MEROPS (Rawling ND et al., 2010). Ils comprennent environ 30 membres dont SPINK1 (Serine Protease Inhibitor Kazal Type-1) et le PSTI (Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor) (Kazal et al., 1948). Ce sont des inhibiteurs réversibles des protéases à sérine et plus particulièrement des trypsines. Ils ont un mode d'action de type compétitif, l'inhibiteur se positionne à la place du substrat dans le site actif de l'enzyme. Ces inhibiteurs sont libérés dans les sucs pancréatiques par les cellules du pancréas, en même temps que les trypsines pancréatiques afin de réguler leur activité. *In vitro*, ils permettent l'activation du EGFR et augmente la régénération de l'épithélium intestinal lors de lésions (Marchbank et al., 2007). SPINK1 est impliqué dans la progression du cancer colorectal via la stimulation de la prolifération des cellules tumorales dans un modèle murin (Ida et al., 2015).

## c) Les chélonianines

Cette famille d'inhibiteur se caractérise par la présence de séquences substrats de la transglutaminase présent sur les domaines cémentoïnes et d'un domaine WAP (Whey Acid Protein). Ce sont des inhibiteurs réversibles. Chez l'homme, 2 membres composent cette famille : le SLPI (qui sera décrit très brièvement) et L'Elafine (sujet de notre étude).

### - Le SLPI

Le SLPI (Secretory Leukocyte Protease Inhibitor) présente 2 motifs WAP, des séquences substrat de la transglutaminase mais pas de domaine cémentoïne.

C'est un inhibiteur réversible de l'élastase du neutrophile, de la cathepsine G, de l'élastase pancréatique, de la trypsine, de la chimotrypsine et de la chymase (Bonnart et al., 2010; Sallenave, 2010a).

### - L'ELAFINE

L'Elafine est classée dans le clan IP d'après le classement MEROPS (Rawling ND et al., 2010). C'est un inhibiteur réversible.

- Structure

L'Elafine ou Trappin-2 (Transglutamisase substrate and wap domain containing protein) est codée par le gène *PI3* composé de 3 exons et 2 introns présents sur le chromosome 20. C'est une petite protéine de 117 acides animés soit d'environ 10 kDa. Elle ne présente pas de modification post-traductionnelle et possède un peptide signal permettant son export vers le milieu extracellulaire.

Son extrémité N-terminale présente un domaine cémentoïne, chargé positivement, qui contient 4 séquences substrats de la transglutaminase et permet sa liaison aux protéines de la matrice extracellulaire (Guyot et al., 2005). Cette charge positive lui confère des propriétés antimicrobiennes contre des bactéries Gram positive (*Staphylococcus aureus* (Simpson et al., 2008)) ou négative (*Pseudomonas aeruginosa* ((Guyot et al., 2010)). Ces propriétés antimicrobiennes dépendent de son domaine cémentoïne et non de son domaine inhibiteur de protéases (Baranger et al., 2008). En effet, en milieu aqueux, le domaine cémentoïne prend une conformation en hélice  $\alpha$  qui lui confère la capacité de faire des pores dans les membranes bactériennes (Bellemare et al., 2010) (Figure 31).

Le domaine C-terminal possède 8 cystéines qui forment 4 ponts disulfures permettant la formation d'une boucle rigide : c'est le domaine WAP (Whey Acidic Protein). Cette partie de L'Elafine porte l'activité inhibitrice de protéases (Tsunemi et al., 1996) (Figure 33).

L'Elafine est un inhibiteur d'élastases (élastase du neutrophile, protéinase-3 et élastase pancréatique). Elle ne possède pas d'orthologue chez la souris et le rat. Elle peut être clivée par une tryptase en 2 petites molécules de 6kDa (Guyot et al., 2005).

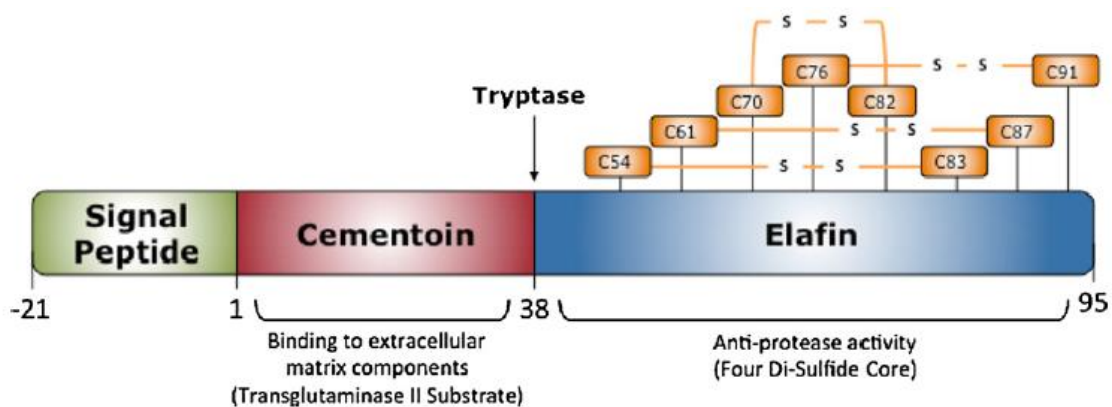


Figure 31 : Représentation de la Trappin-2 (Verrier et al., 2012)

La trappin-2 est capable de lier des composants matriciels extracellulaires via son domaine cémentoïne (ici en rouge) et en même temps, le domaine WAP/Elafine (en bleu) permet

l'inhibition de protéases spécifiques. Ces 2 domaines peuvent être clivés par une tryptase (la flèche indiquant le site de clivage). Huit résidus cystéines sont impliqués dans la formation de 4 liaisons disulfures (représentées dans les carrés orange).

#### - Fonctions

L'Elafine est exprimée par de nombreux tissus et plus particulièrement dans les épithéliums (digestif, pulmonaire, peau) et aussi par les macrophages (Pfundt et al., 1996) (Tremblay et al., 1996). Son expression est canonique dans l'épithélium intestinal (Smith et al., 2013), mais peut être augmentée en réponse à des signaux inflammatoires. En effet, L'Elafine est une alarmine, son expression est induite par l'IL1 $\beta$  et le TNF $\alpha$ , probablement pour éviter les dommages tissulaires induits par les protéases inflammatoires (Williams et al., 1991).

L'Elafine a d'importantes propriétés anti-inflammatoires (figure 32) : comme nous l'avons vu précédemment, elle possède des propriétés microbicides et fongicides (Baranger et al., 2008). Des études sur le poumon montrent que lors d'une infection à *P. aeruginosa*, elle agirait comme une opsonine et augmenterait la clairance de ces bactéries par les macrophages (Wilkinson et al., 2009). D'autres études controversées démontrent qu'elle augmenterait l'afflux de neutrophiles lors d'un challenge pulmonaire au LPS (Simpson et al., 2008) ou au contraire aurait des propriétés anti-inflammatoires, en diminuant l'infiltration des neutrophiles ainsi que les chimiokines pro-inflammatoires KC et MCP-1 dans des modèles murins d'amphisème pulmonaire (Vachon et al., 2002). Elle augmente le nombre et l'activation des cellules dendritiques dans le poumon, ces cellules polariseraient préférentiellement les lymphocytes T vers un profil Th1 (McMichael et al., 2005).

L'Elafine a aussi des propriétés antivirales, contre le virus de l'herpès génital (Drannik et al., 2012), et inhibe la réplication du virus VIH dans ces cellules cibles (Jasinghe et al., 2013). De plus L'Elafine aurait un effet direct sur NF $\kappa$ B : sur des monocytes pré-incubés avec du LPS, un traitement à L'Elafine augmenterait l'ubiquitination de I $\kappa$ B ce qui diminuerait la disponibilité de NF $\kappa$ B pour répondre aux signaux pro-inflammatoires (Butler et al., 2006). Lors de l'infection par le VIH, L'Elafine diminue la sécrétion de CXCL8 en inhibant la translocation de NF $\kappa$ B (Drannick et al., 2012).

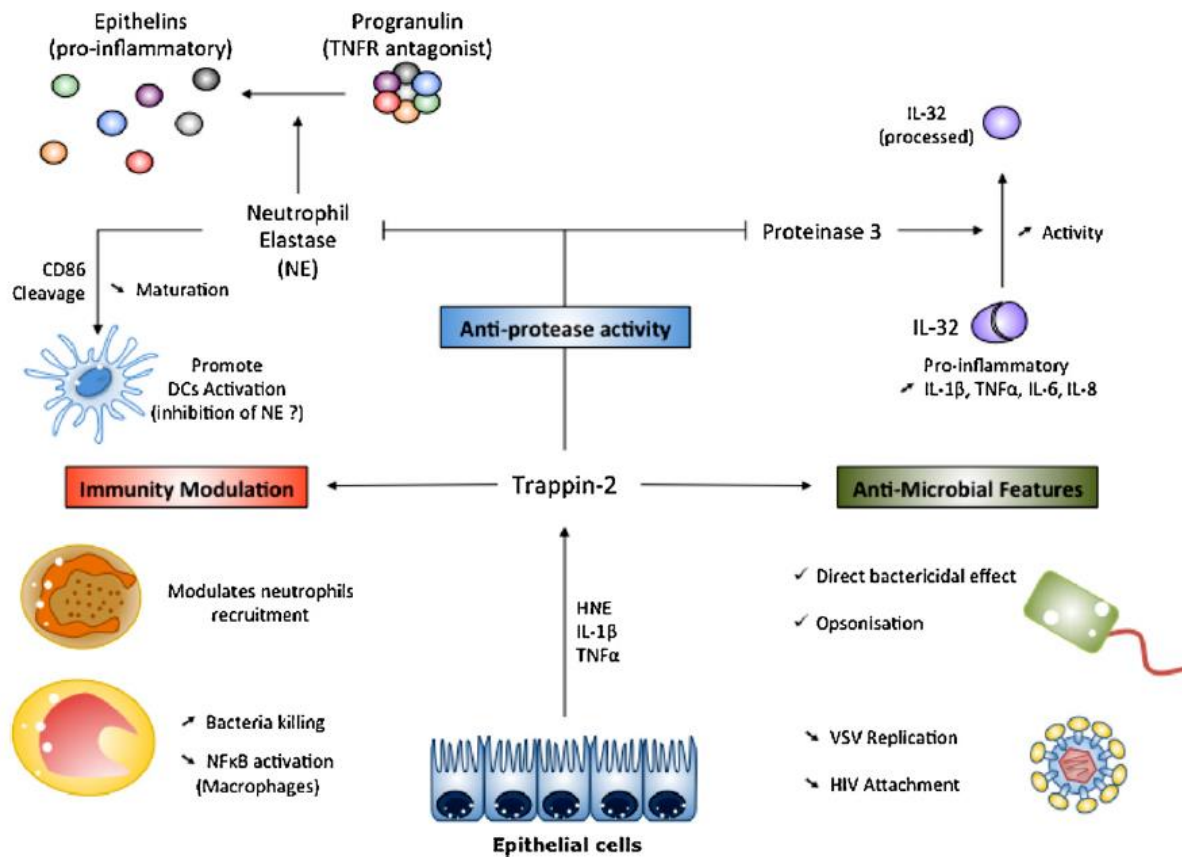


Figure 32 : Effets pléiotropiques de L'Elafine (Verrier T et al., 2012)

Les médiateurs inflammatoires tels que l'élastase du neutrophile, l'IL1β, le TNFα sont capables d'induire l'expression de L'Elafine dans les cellules épithéliales. Une fois sécrétées, L'Elafine présente de nombreuses cibles. Par exemple, L'Elafine inhibe la réplication du VSV, empêche la fixation du VIH aux cellules épithéliales et est aussi capable de tuer des pathogènes respiratoires comme *S. aureus* ou *P. aeruginosa* directement en agissant sur les membranes bactériennes ou indirectement en favorisant leur opsonisation. L'Elafine peut également moduler la réponse immunitaire en améliorant la destruction de bactéries phagocytées par les macrophages. Elle influe également sur le recrutement des neutrophiles, elle favorise l'activation des cellules dendritiques.

L'Elafine est aussi importante pour la physiologie de l'intestin. En effet, la surexpression d'Elafine chez la souris protège de la colite (Motta et al., 2011). De plus, les patients atteints de MICI possèdent une expression fortement diminuée de L'Elafine au niveau de l'épithélium intestinal. Leur activité élastolytique étant augmentée, la balance entre l'élastase et son inhibiteur est perturbée. L'apport d'Elafine grâce à une bactérie de l'alimentation *L.lactis* permet de rétablir cet équilibre et protège les animaux de la colite (Motta JP et al., 2012). De plus, l'expression de L'Elafine est aussi diminuée dans une autre pathologie intestinale, la maladie de Coéliqua et l'apport d'Elafine par *L.lactis* chez des souris sensibilisées au gluten améliore leurs symptômes (Galipeau et al., 2014).



L'Elafine a donc un rôle important dans l'immunité et la protection des pathologies inflammatoires, notamment celles digestives. Son potentiel thérapeutique pour traiter ces pathologies est très étudié et prometteur (Shaw and Wiedow, 2011). Cependant, son mode action et plus particulièrement le domaine impliqué dans ces différentes propriétés, reste inconnu. Les réponses à ces questions font parties du sujet d'étude dans le cadre de cette thèse.

#### d) Les inhibiteurs de protéases bactériennes

Les bactéries sont capables de produire de nombreuses protéases mais aussi des inhibiteurs. Les principaux inhibiteurs de protéases à sérine bactériennes ainsi que leurs caractéristiques fonctionnelles sont résumés dans le tableau 4.

Inhibiteur de protéase	Type MEROPS	Protéases inhibées	Mécanismes d'inhibition et structure caractéristique	Caractéristiques fonctionnelles	Origine bactérienne
Ovomucoïde (type Kazal)	I1	Chymotrypsine et subtilisine	Liaison forte	Impliqué dans la pathogénicité de <i>phytophthora infestans</i>	phytophthora infestans
Aprotinine	I2	Famille des chymotrypsines	Liaison forte	Spécificité de l'inhibiteur très vaste	
Inhibiteur de la peptidase B	I9	Famille des subtilisine	Ce sont des pro-peptides des protéases subtilisine	Forte inhibition mais non stable Peut être dégradé par la subtilisine	
Ecotine	I11	Famille des chymotrypsines	Liaison forte active sous forme de dimère	L'Ecotine des enterobactéries leur confère un rôle protecteur contre les protéases digestives de l'hôte pour faciliter la colonisation. Sa structure lui permet d'inhiber plusieurs protéases	Enterobactéries

Inhibiteur de subtilisine de <i>Streptomyces</i>	I16	Famille des subtilisine, des trypsines et plasmine, famille des metalloprotease griselyne	Liaison forte	Elle contrôle les protéases endogènes impliquées dans l'activation protéolytique de la transglutaminase	Spécifique à l'ordre des bactéries actinomycetales
Inhibiteur de carboxypeptidase Y	I51	carboxypeptidase à sérine Y	Liaison forte 2 sites de liaison responsable de son inhibition	Fixe les phospholipides des membranes, ce qui lui donne une localisation intracellulaire dans les membranes des vacuoles	Isolé de <i>saccharomyces cerevisiae</i>
Inhibiteur d'élastase d' <i>Aspergillus</i>	I78	Elastase-2 humaine et les élastase endogène d' <i>Aspergillus</i>	Inconnu		Des homologues ont été découverts dans des espèces d'ascomycètes et de protéobactéries mais aucune n'a été caractérisée biochimiquement
Serpine	I4	Famille des chymotrypsine et des subtilisine Certains membres inhibent aussi des cystéines protéases	Inhibiteur de type suicide avec un changement conformationnel rapide et formation de liaisons covalentes	Leur rôle physiologique est de protéger de la dégradation du cellulosome par les activités protéolytique	

Table 5 : **Inhibiteur de protéases à sérine d'origine microbienne** (modifié de (Sabotič and Kos, 2012))

Les activités protéolytiques excessives sont impliquées dans de nombreuses pathologies (MICI, SCI, cancer...), les bactéries exprimant des inhibiteurs de protéases ont donc été étudiées avec intérêt.

Des petits inhibiteurs bactériens ont été décrits comme ayant un rôle protecteur dans des pathologies auto-immunes, neurodégénératives, des maladies cardiovasculaires, des dystrophies musculaires et le diabète. AM-36, un inhibiteur de cathepsines diminue l'activation du récepteur aux intégrines LFA-1 qui est impliqué dans l'adhésion des lymphocytes T, leur prolifération et leur migration (Jevnikar et al., 2008). Une surexpression de LFA1 due à l'activation de la cathepsine X est typique des pathologies

auto-immunes comme le psoriasis. De plus, AM-36 augmente la prolifération des cellules neuronales et prévient le processing d'un facteur neurogénique par la cathepsine X (Obermajer et al., 2009).

### 3- Implication des protéases à sérine dans l'inflammation et la douleur

Les protéases grâce leurs effets pléiotropiques, sont capables d'agir sur de très nombreuses molécules. Par l'activation de leur récepteur les PAR ou encore par une action directe sur certaines protéines, elles jouent un rôle important dans la régulation de la perméabilité intestinale, de l'inflammation et de la douleur.

#### a) Les récepteurs activés par les protéases (PARs)

##### - Structure et classification

Les récepteurs activés par les protéases (ou PARs) sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G (RCPG). Ils possèdent 3 boucles intracellulaires et 3 extracellulaires reliées par des ponts disulfures (Hamm, 2001). Ce sont des récepteurs de classe A possédant une partie N-terminale extracellulaire disponible. Les protéases vont reconnaître et cliver de manière irréversible cette partie N-terminale. Ce clivage va mettre en évidence le motif ligand de la partie N-terminale qui va pouvoir se lier au récepteur et induire l'activation de la protéine G.

Le récepteur PAR1 fut le premier à être découvert, clivé par la thrombine (Rasmussen et al., 1991). Il peut aussi être activé par les trypsines. Son site d'activation est LDPR<sub>41</sub>! S<sub>42</sub>FLLRN (où ! représente le site de clivage).

Le screening d'une banque génomique murine a permis de mettre en évidence le récepteur PAR2 (Nystedt et al., 1995). Ce récepteur est clivé par les trypsines, tryptases, et les élastases (liste complète figure 33) au site SKGR<sub>34</sub>! S<sub>35</sub>LIGKV.

Les souris déficientes pour le récepteur PAR1, répondant cependant à la thrombine, ont permis de mettre en évidence le récepteur PAR3, impliqué dans la coagulation des plaquettes (Connolly et al., 1996). Il est clivé par la thrombine au site LPIK<sub>38</sub>! T<sub>39</sub>FRGAP.

Enfin, le récepteur PAR4 fut identifié grâce à la recherche de séquences PARlike (Kahn et al., 1998). Il est clivé par la thrombine et les trypsines au site de clivage PAPR47! G48YPGQV.

Ces récepteurs sont exprimés dans de nombreux tissus, et notamment dans le tractus digestif, où on les retrouve sur différents types cellulaires comme les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les macrophages ou encore les neurones (Vergnolle, 2005). Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la motricité intestinale, la prolifération, les fonctions de barrière épithéliale et endothéliale, l'inflammation, la coagulation, et la douleur (Adams et al., 2011).

Les récepteurs PAR1, PAR2 et PAR3 sont codés par les gènes *F2R*, *FR2L1* et *F2RL2* localisés sur le chromosome 5p13 tandis que PAR4, est codé par le gène *F2LR3* localisé sur le chromosome 19p2 (Khan et al., 1998).

Les protéases ne sont pas spécifiques d'un PAR particulier. Ainsi, la thrombine par exemple peut cliver l'ensemble des PARs (Mihara et al., 2016).

Afin d'étudier l'activation de ces récepteurs, les pharmacologues ont développés des peptides synthétiques agonistes pouvant mimer l'activation des PARs. Ils sont composés de la séquence ligand du récepteur et permettent son activation mais avec une efficacité moins importante (Xu et al., 1998).

	PAR <sub>1</sub>	PAR <sub>2</sub>	PAR <sub>3</sub>	PAR <sub>4</sub>
Activating proteases	Thrombin FXa APC Granzyme A Gingipains-R Trypsin	Trypsin Tryptase FVIIa FXa MT-SP1 Proteinase-3 Acrosien Der P3 D9 Gingipains-R Elastase Cathepsin G	Thrombin	Thrombin Trypsin Cathepsin G Gingipains-R
Inactivating proteases	Cathepsin G Plasmin Elastase Proteinase-3 Trypsin		Cathepsin G	
Cleavage site AP	LDPR <sup>41</sup> ↓ S <sup>42</sup> FLLRN SFLLRN TFLLRN	SKGR <sup>34</sup> ↓ S <sup>35</sup> LIGKV SLIGKV	LPIK <sup>38</sup> ↓ T <sup>39</sup> FRGAP None	PAPR <sup>47</sup> ↓ G <sup>48</sup> YPGQV GYPGQV AYPGKF
Localization	Platelets (human), endothelium, epithelium, fibroblasts, myocytes, neurons, astrocytes	Epithelium, endothelium, fibroblasts, myocytes, neurons, astrocytes	Platelets (mouse), endothelium, myocytes, astrocytes	Platelets (human), endothelium, myocytes, astrocytes
Phenotype of knockout	Partial embryonic lethality, vascular matrix deposition after injury	Impaired leukocyte migration; impaired allergic inflammation of airway, joints, kidney	Protection against thrombus formation/ pulmonary embolism	Protection against thrombus formation/ pulmonary embolism

**Figure 33 : Activation des PARs, peptides activateurs, localisation et phénotype des souris déficientes.** (Ossovskaya and Bunnnett, 2004)

- Le clivage des PARs

Les PARs peuvent être activés de manière canonique (figure 34A), grâce au clivage de leur partie N-terminale extracellulaire par une protéase, révélant ainsi le ligand du récepteur qui va se fixer sur celui-ci. Cette activation du récepteur va induire des changements conformationnels, entraînant la mise en place d'une cascade de signalisation (Soh et al., 2010). L'initiation du clivage canonique peut être différente suivant les protéases. Par exemple, la thrombine se fixe à PAR1 et à PAR3, ce qui facilite le clivage du récepteur et l'accès à la séquence ligand (Vu et al., 1991). Contrairement à la thrombine, la trypsine active PAR2 sans liaison au récepteur (Nystedt et al., 1994). Une activation canonique de ces récepteurs induit l'activation de plusieurs voies de signalisation (Hollenberg et al., 2014).

Certaines protéases peuvent cliver le récepteur à des sites distincts de ceux canoniques (sites d'activation non canoniques). Ce sont des agonistes biaisés. Dans certain cas, cela induit une signalisation alternative grâce à un nouveau ligand libéré par ce clivage particulier (figure 34B). Ce clivage peut aussi induire un changement conformationnel qui suffit à l'activation du récepteur (Figure 34C). Un agoniste biaisé va activer une seule voie de signalisation (Hollenberg et al., 2014).

D'autres protéases enfin peuvent empêcher l'activation d'un PAR par une autre protéase en clivant le récepteur sans induire de signalisation. Le ligand ne peut plus se fixer au récepteur. C'est le désarmage du récepteur. Ces récepteurs tronqués empêchent la future activation du récepteur (Figure 34E).

L'élastase du neutrophile est un agoniste biaisé de PAR1, son activation induit une activation de la voie des MAPK et ne parvient pas à mobiliser une signalisation calcique (Mihara et al., 2016). De la même façon, cette protéase ne clive pas PAR2 sur le site canonique et a été de fait longtemps considérée comme un agoniste désarmant (Dulon et al., 2003). Cependant, le clivage de PAR2 par l'élastase du neutrophile induit une phosphorylation et une activation de la voie ERK. De plus l'ajout sur le récepteur du peptide correspondant à la nouvelle extrémité N-terminale générée par le clivage élastolytique, ne provoque pas l'activation de cette voie, suggérant ainsi que l'élastase

active PAR2 par un mécanisme qui ne requiert pas la fixation du peptide clivé au récepteur (Ramachandran et al., 2011).

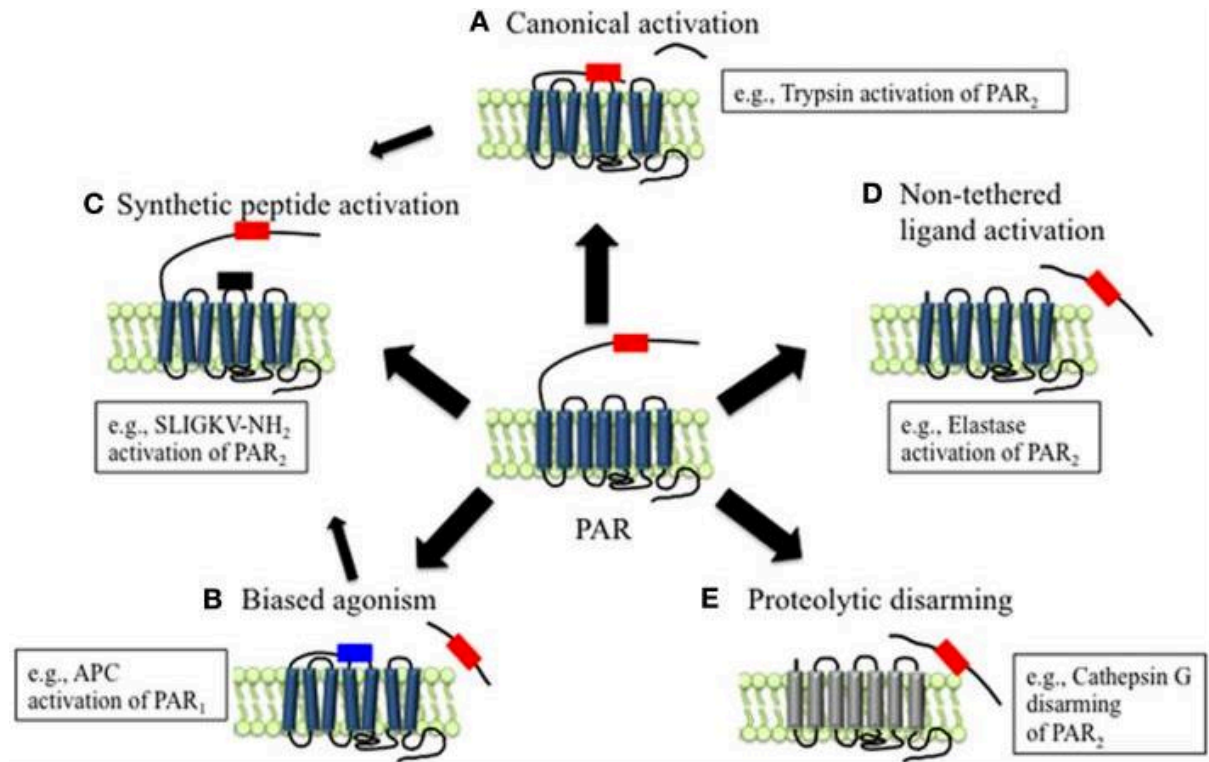


Figure 34 : **Mécanisme de signalisation des PARs** (Zhao et al., 2014)

**A : Mécanismes canoniques de la signalisation PAR.** Les protéases telles que la trypsine et la thrombine clivent les PAR au niveau des sites de clivages canoniques, démasquant le domaine du ligand attaché, qui se lie aux boucles extracellulaires des récepteurs clivés. Les PARs qui sont activés par de tels mécanismes se couplent souvent à plusieurs voies de signalisation dépendante de la protéine G et de la  $\beta$ -arrestine. **B : Mécanismes biaisés de signalisation PAR.** Les protéases telles que l'élastase, MMP1 et APC clivent les PARs à des sites distincts du site de clivage canonique. Le clivage peut démarquer un nouveau ligand attaché qui pourrait interagir avec des domaines du récepteur clivé, entraînant l'activation de voies de signalisation uniques et biaisées. **C :** Les peptides agonistes sont des peptides synthétiques qui imitent les ligands révélés par les protéases qui proviennent des sites canoniques ou biaisés. Les peptides agonistes peuvent activer les mêmes voies que les protéases, bien qu'ils puissent également déclencher des voies de signalisation différentes et générer un signal biaisé. **D :** Certaines protéases coupent les PARs sans révéler des ligands attachés, suggérant que la protéolyse seule peut activer le récepteur. **E :** Le désarmement protéolytique des PARs. Les protéases comme la cathepsine G clivent les PARs et éliminent ou détruisent les ligands attachés, désarmant ainsi l'activation protéolytique.

Le clivage du segment N-terminal va induire un changement conformationnel du récepteur permettant la transduction de signaux intracellulaires.

La signalisation des PARs est liée à l'activation des protéines G ( $G_{\alpha q}$ ,  $G_{\alpha 12/13}$ ,  $G_{\alpha i}$ ,  $G_{\alpha s}$  et  $G_{\beta \gamma}$ ) et de la  $\beta$ -arrestine. Certaines protéases et agonistes peuvent activer plusieurs de ces voies. La durée et la magnitude de la signalisation sont contrôlées grâce à la phosphorylation du récepteur qui va interagir avec la  $\beta$ -arrestine. Cela permettra la désensibilisation du récepteur et son endocytose (Moore et al., 2007).

L'activation des différentes protéines G met en jeu de nombreux acteurs moléculaires, induit la mobilisation de calcium intracellulaire, l'activation de voies de signalisation comme la voie des MAP kinases, de Rho et Rac, NF $\kappa$ B (Figure 35) (Steinhoff et al., 2005). L'activation de PAR2 couplé à la protéine  $G_{\alpha q}$  est impliquée dans l'hypersensibilité viscérale. A l'inverse PAR4 couplé à  $G_{\alpha i}$  va inhiber cette sensibilité (Amadesi et al., 2004).

Dans notre étude ainsi que dans la littérature, l'activation des PARs peut être visualisée par le suivi de la mobilisation de calcium dans la cellule. Toutefois, il est important de garder en mémoire que cela ne représente qu'une seule voie de signalisation des PARs et que plusieurs autres voies de signalisations existent, notamment celles des agonistes biaisés et ne sont pas appréhendées par la seule mesure de la mobilisation intracellulaire de calcium.

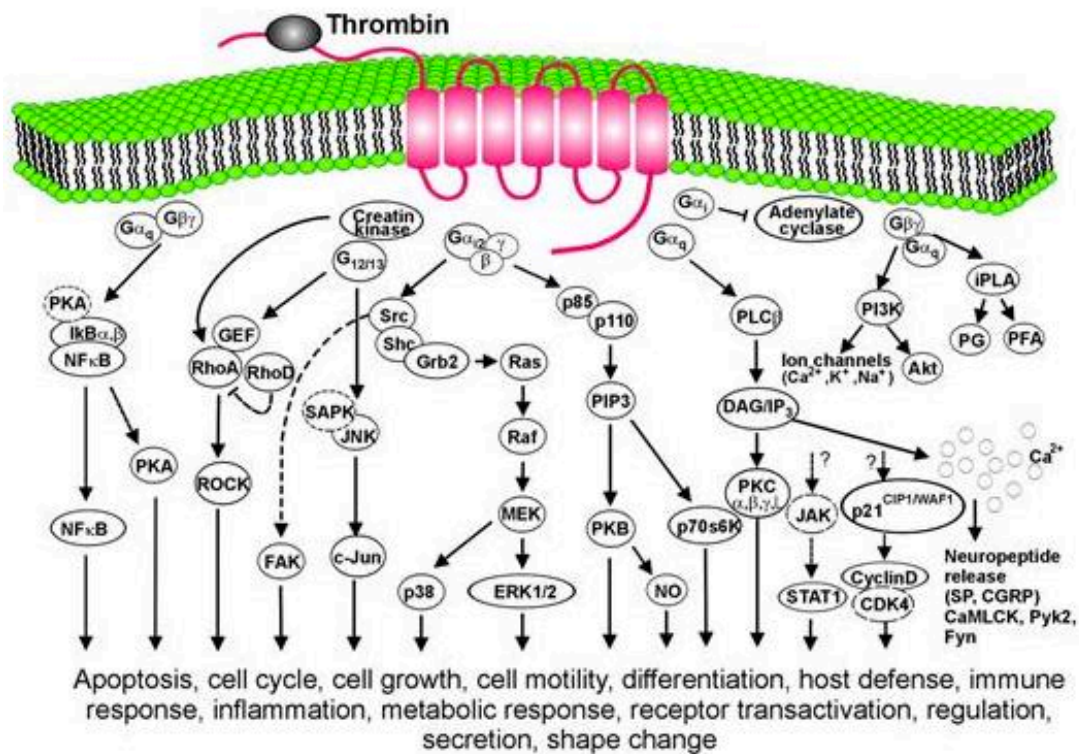


Figure 35 : Les voies de signalisation cellulaire après l'activation du récepteur **PAR1** (Steinhoff et al., 2005)

Diagramme montrant les principales voies de signalisation médiées par les protéines G couplées à PAR1. Les lignes ou cercles ponctués représentent des voies de signalisation ou des intermédiaires qui ne sont pas totalement révélés pour être activés par PAR1, mais sont en faveur d'autres récepteurs couplés aux protéines G ou sont des molécules typiques associant les intermédiaires. Le dessin représente une composition d'évènements de signalisation de différents tissus, types de cellules et espèces.

L'activation des PARs est impliquée dans de nombreux processus biologiques et notamment dans les pathologies intestinales.

### b) Rôle dans la perméabilité épithéliale

Les protéases ont un rôle important dans la régulation de la perméabilité épithéliale. Elles peuvent agir de manière directe via le clivage des protéines de jonctions cellulaires ou des molécules de mucus, ou elles peuvent cliver les PARs. Les effets des protéases à sérine ainsi que de leur inhibiteur sur la perméabilité intestinale sont décrits dans le table 5.



<b>Protéases</b>	<b>Effets</b>	<b>Modèle</b>	<b>Mécanismes d'action</b>
Matriptase-1	Protecteur	Souris ST14 hypomorphique	Déplétion génétique de la matryptase augmente la perméabilité intestinale
		Monocouche de cellules épithéliales	Inhibition de la matryptase (siRNA ou inhibiteur synthétique) augmente la perméabilité intestinale
Granzyme M	Protecteur	Souris déficiente pour GrzM	Augmentation de la perméabilité intestinale chez ces animaux
<b>Activation de PAR2</b>			
<b>Effets</b>	<b>Modèle</b>	<b>Conséquences</b>	
Trypsine, tryptase, chymase et agonistes synthétiques	Nocif	Rats et souris	L'activation de PAR2 augmente la perméabilité intestinale
<b>Activation de PAR4</b>			
<b>Effets</b>	<b>Modèle</b>	<b>Conséquences</b>	
Cathepsine G	Nocif	Biopsies coliques de patients atteints de RCH et de patients contrôles	Le surnageant fécal de patients atteints de RCH induit une augmentation de la perméabilité qui est abolie par un inhibiteur de la cathepsine G
<b>Activation de PAR1</b>			
<b>Effets</b>	<b>Modèle</b>	<b>Conséquences</b>	
Thrombine, agoniste synthétique	Nocif	Souris Monocouche de cellules épithéliales	Augmentation de la perméabilité après l'activation de PAR1
<b>Inhibiteurs endogènes</b>			
<b>Effets</b>	<b>Modèle</b>	<b>Mécanismes d'action</b>	
Elafine	Protecteur	Souris hypersensible au gluten	Sécrétion d'ELAFINE par <i>L. lactis</i> induit une diminution de la perméabilité
		Souris	Apport d'ELAFINE (animaux transgéniques ou via <i>L. lactis</i> ) protège de la colite
		Monocouche de cellules épithéliales	Traitement avec de l'Elafine + TNF induit une augmentation de la perméabilité paracellulaire
<b>Inhibiteurs synthétiques</b>			
<b>Effets</b>	<b>Modèle</b>	<b>Mécanismes d'action</b>	
Camostat mesolate	Protecteur	Modèle de MICI chez le rat	un traitement des rats malade avec cet inhibiteur normalise leur perméabilité intestinale
Nafamostat mesolate	Protecteur	Biopsies rectales de patients atteints de SCI et de patients contrôles	Cet inhibiteur diminue l'augmentation de perméabilité due à l'activité trypsique
		Monocouche de cellules épithéliales	Cet inhibiteur normalise l'augmentation de perméabilité induite par la tryptase
SPI	Protecteur	Modèle de MICI chez la souris	Cet inhibiteur normalise l'augmentation de perméabilité chez des souris malades

Table 6 : Les protéases à sérine affectent la barrière épithéliale (adapté de (Van Spaendonk et al., 2017))

- Clivages des jonctions cellulaires

Lors d'une inflammation, les protéines de jonctions, ZO-1 et l'occludine sont clivées par la chymase dans l'intestin (Scudamore et al., 1998). Les protéases du neutrophile ne sont pas capables de cliver directement les jonctions cellulaires. Cependant, l'élastase du neutrophile clive l'E-cadhérine induisant une désorganisation de l'épithélium intestinales entraînant ainsi la transmigration des neutrophiles dans la lumière intestinale (Ginzberg et al., 2001).

- Modification de la barrière de mucus

Le mucus forme une barrière protectrice sur l'épithélium intestinal. Comme nous l'avons précédemment présenté, sa diminution est impliquée dans des pathologies intestinales comme les MICI. Certaines protéases produites par des pathogènes intestinaux sont capables de cliver les protéines formant le mucus (MUC2). Par exemple, les bactéries pathogènes *P.gingivalis*, le nématode *Tricuris muris* ou encore le parasite *Entamoeba histolytica* peuvent dégrader le mucus grâce à leurs protéases (Hasnain et al., 2012; Lidell et al., 2006).

- Activation des PARs

L'activation des PARs altère la fonction de barrière de différentes manières. PAR2 favorise la sécrétion de mucus de manière indirecte : l'activation du récepteur entraîne la production de lipides dérivés de l'acide arachidonique (PGE2) qui lui-même est impliqué dans la sécrétion de mucus (Jarry et al., 2007). Une étude sur des cellules en culture T84 montre que l'activation de PAR2 au pôle basolatéral provoque une augmentation de la perméabilité transcellulaire (Jacob et al., 2005).

De plus, à faibles doses, les agonistes de PAR2 augmentent la perméabilité paracellulaire sans signes inflammatoires en induisant une ouverture des jonctions serrées. A des doses plus importantes, l'activation de PAR2 provoque une colite et une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Cenac et al., 2004). L'activation de PAR1 dérégule l'expression de ZO-1 et active la caspase-3 ce qui va induire l'apoptose des cellules épithéliales. La présence de neutrophiles au pôle basal des CEI va induire une augmentation de la perméabilité dépendante de l'élastase et de la protéinase-3 qui vont activer PAR1 et PAR2 (Chin et al., 2008).

### c) Rôle dans l'inflammation

#### - Clivage des cytokines et chimiokines

Les protéases à sérine sont impliquées dans des processus de régulation des cytokines et chimiokines. Elles sont capables d'activer et de dégrader ces molécules via leur clivage. Par exemple, la cathepsine G clive CXCL5 afin de générer une forme d'avantage chimio-attractante de cette chimiokine native (Nufer et al., 1999). La PR-3 quant à elle, génère une forme tronquée de CXCL8, et clive la pro-forme de l'IL1 $\beta$ , de l'IL18 et du TNF $\alpha$ . Ces 2 protéases inactivent l'IL6 (Coeshott et al., 1999) (Bank et al., 1999).

Les protéases du neutrophile peuvent aussi cliver des molécules du complément comme le facteur C3 ou C5 pour favoriser l'attraction de cellules immunitaires (Maison et al., 1999). Les Cathepsines sont capables de cliver des intégrines et ainsi inhiber les phénomènes de rolling, d'attachement et de diapédèse des leucocytes dans les vaisseaux sanguins (Lechner et al., 2006).

#### - Induction d'apoptose

Lors de la réponse immunitaire, les granzymes, des cellules cytotoxiques permettent la destruction des pathogènes via l'induction d'apoptose (Laforge et al., 2006). La thrombine peut induire l'apoptose des cellules épithéliales intestinales par l'activation du récepteur PAR1 ce qui active la voie des caspases (Chin et al., 2003a). Les protéases du neutrophile en condition inflammatoire peuvent activer les voies d'apoptose des cellules de l'épithélium intestinal et ainsi favoriser la perte de fonction barrière et la pénétration des antigènes de la lumière dans la muqueuse. Par exemple, l'EN peut modifier la membrane mitochondriale des cellules épithéliales provoquant leur apoptose (Ginzberg et al., 2004).

#### - Activation des PARs

L'activation de PAR2 a des effets pro-inflammatoires. (Figure 37) Dans l'intestin, ce récepteur joue un rôle dans la colite, où il favorise le recrutement massif de granulocytes, et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (CXCL8, IL1 $\beta$  et TNF $\alpha$ ) (Cenac et al., 2002). Le recrutement des leucocytes sur le site inflammatoire est aussi favorisé par l'activation de PAR2 qui permet une augmentation du rolling, de l'adhésion et de la translocation des cellules immunitaire à travers les vaisseaux sanguins (Hyun et

al., 2008; Vergnolle, 1999). L'injection d'agoniste de PAR2 dans la patte cause un œdème important ainsi qu'une augmentation de l'infiltration des cellules inflammatoires (Vergnolle 1999). L'activation de PAR2 sur les cellules inflammatoires est pro-inflammatoire (Figure 38).

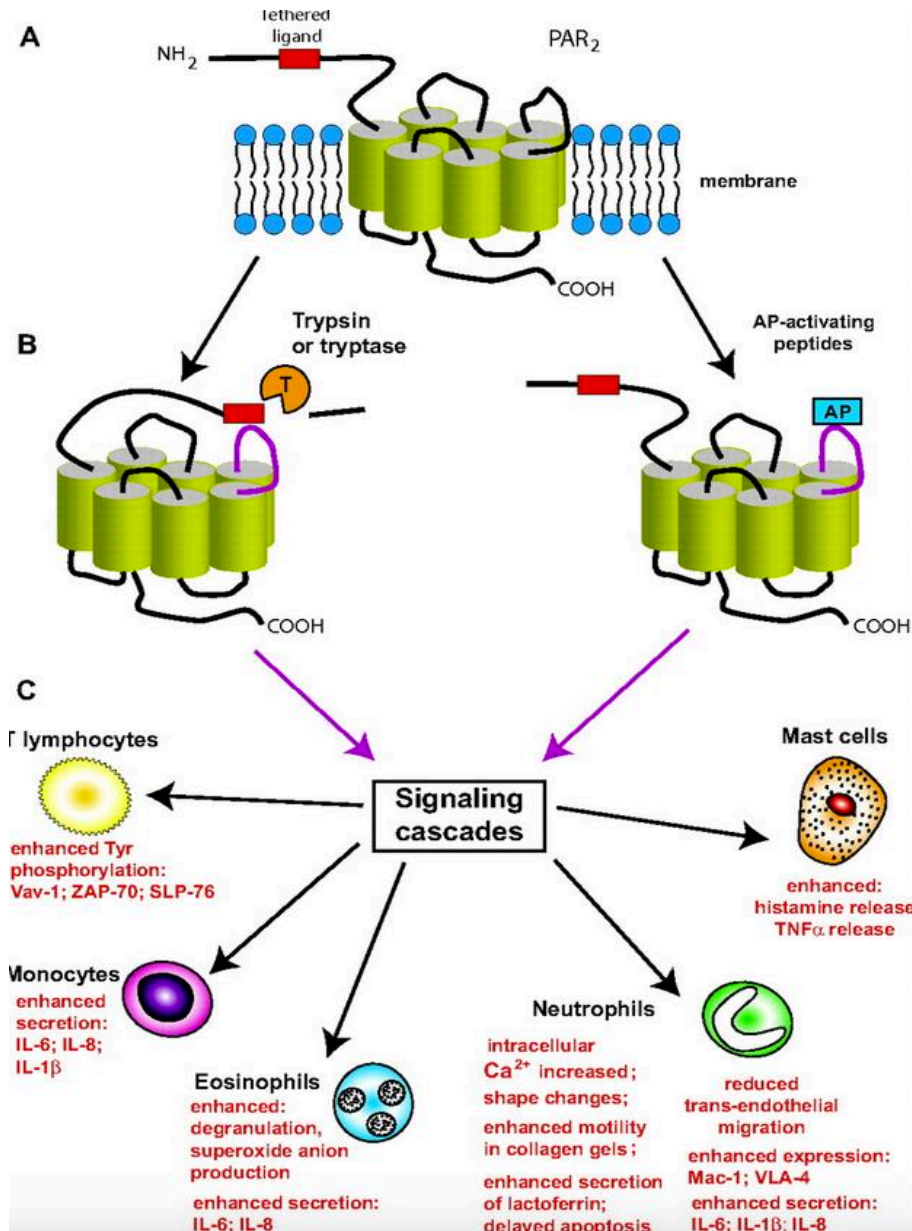


Figure 36 : Activation de PAR2 dans les cellules immunitaires et ses différents effets (Shpacovitch et al., 2008)

(A) PAR2 natif possède une séquence ligand sur sa partie N-terminale qui ne peut pas interagir avec la boucle du récepteur. (B) Une protéase à sérine (endogène ou exogène) peut cliver la partie N-terminale du récepteur et démasquer la séquence ligand. Cette séquence va agir sur la seconde boucle extracellulaire et induire une cascade de signalisation. Des peptides synthétiques et agonistes de PAR2 peuvent aussi activer le récepteur sans clivage protéolytique via leur

interaction avec la seconde boucle du récepteur. (C) L'activation de PAR2 dans les cellules immunitaires humaines induit des réponses variées.

Cependant dans un contexte de colite chronique, un traitement avec un agoniste de PAR2 peut avoir des effets anti-inflammatoires médiés par le CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) (Fiorucci et al., 2001).

Le traitement de souris avec l'agoniste de PAR1 entraîne aussi une importante colite, caractérisée par la formation d'œdèmes et une infiltration de cellules immunitaires (Vergnolle, 2004).

Le récepteur PAR4 est impliqué dans le recrutement des granulocytes, dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire et dans l'œdème (Houle et al., 2005). L'injection d'un agoniste de PAR4 dans la patte de souris induit une inflammation qui n'est pas dépendante de mécanismes neurogéniques mais implique les mastocytes (Hollenberg et al., 2004).

#### d) Rôle dans la douleur

Les PARs sont exprimés sur les neurones sensitifs. Leur activation provoque une excitabilité neuronale ou une désensibilisation associée ou non à la sensibilité viscérale. L'injection intra-plantaire de l'agoniste de PAR2 à des doses non inflammatoires chez le rat, entraîne une hyperalgésie thermique et mécanique et une augmentation de l'activation des nocicepteurs de la moelle épinière (Fiorucci et al., 2001). De plus, l'injection de Trypsine-3 dans la patte de souris induit une hyperalgésie et une allodynie mécanique dépendante du récepteur PAR2 mais n'impliquant pas le récepteur PAR1 (Knecht et al., 2007).

Le même type d'expérience basée sur l'injection dans la patte d'un agoniste de PAR1 n'induit pas de réponse à un stimuli mécanique ou thermique mais augmente le seuil de sensibilité à la perception douloureuse (Asfaha et al., 2002). L'activation de PAR1 lors d'une injection intravertébrale inhibe la transmission de signaux nociceptifs (Fang et al., 2003). L'activation de PAR1 aurait donc des effets analgésiques.

L'agoniste de PAR4 administré dans le côlon permet une diminution de la sensibilité des souris à la distension colorectale. De plus, sa co-administration avec l'agoniste de PAR2

inhibe l'hyperalgésie due à l'activation de PAR2 (Augé et al., 2009). PAR4 est donc capable de moduler la nociception viscérale.

Les PARS ont donc différents effets sur la douleur, PAR2 a un rôle pro-nociceptif alors que PAR1 et PAR4 sont plutôt anti-nociceptifs (Figure 37).

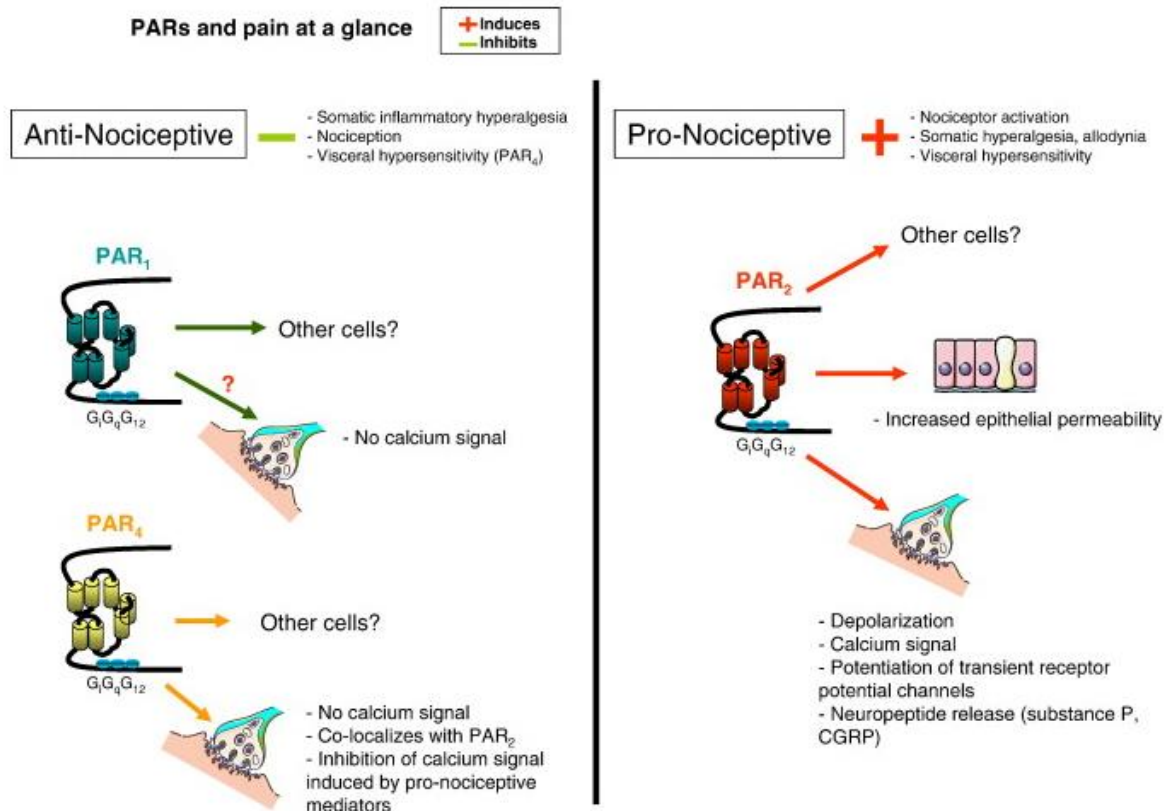


Figure 37 : Rôle des PAR dans la nociception. (Vergnolle N et al., 2009)

Les neurones des plexus myentérique et sous-muqueux participent aux fonctions motrices et sécrétrices de l'intestin. Ils partagent le même environnement que les neurones sensitifs. Une étude montre que les neurones sensitifs sont fortement activés par des surnageants de biopsies de patients atteints de SCI souffrant d'une hypersensibilité viscérale. Cela suggère donc que les neurones entériques pourraient participer de manière indirecte à la douleur viscérale.

De nombreuses études montrent une augmentation de l'activité protéolytique dans les MICI et le SCI (Barbara et al., 2004; Cenac et al., 2007; Motta et al., 2012; Zhao et al., 2012). Cependant l'origine de ces protéases reste encore peu connue et décrite.

La cellule épithéliale de par ses multiples rôles dans l'homéostasie et dans les pathologies intestinales est au cœur des processus biologiques intestinaux. Sa capacité à sécréter des protéases en fait un sujet d'étude privilégié pour la compréhension des mécanismes des 2 pathologies intestinales que sont les MICI et le SCI.





# **HYPOTHESE GENERALE et**

## **OBJECTIFS DE LA THESE**

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin et le Syndrome du Côlon Irritable sont des pathologies dont l'incidence augmente chaque année. Ces pathologies ont des composantes différentes : les MICI sont caractérisées par des inflammations chroniques de la muqueuse intestinale et se manifestent chez les patients par des phases de poussées et de rémission. La physiopathologie du SCI met en cause une perturbation de la motricité intestinale et une hypersensibilité viscérale avec, chez les patients atteints, d'importantes douleurs abdominales. Cependant ces 2 pathologies partagent des caractéristiques communes comme une augmentation de la perméabilité épithéliale, des douleurs abdominales, et des troubles gastro-intestinaux. Il n'existe actuellement aucun traitement pour soigner définitivement ces pathologies. Les thérapies sont uniquement symptomatiques. Elles visent à induire ou prolonger les phases de rémission. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques afin de pouvoir développer des thérapies pour soulager les patients.

En condition physiologique, les protéases sont exprimées dans l'ensemble de l'organisme par de nombreux types cellulaires (cellules immunitaires, épithéliales, neuronales, bactéries...). Elles ont des rôles très variés comme la digestion, la maturation des protéines ou encore des fonctions de signalisation. Leur sécrétion et leur activité sont finement contrôlées et des inhibiteurs endogènes permettent de réguler leurs activités protéolytiques. Il existe donc un équilibre entre les protéases et leurs inhibiteurs afin qu'elles puissent exercer leurs actions effectrices sans devenir délétère. Toutefois, en situation pathologique une dérégulation de l'homéostasie protéolytique est observée, associant des différences d'expression et d'activité pour les protéases et leurs inhibiteurs. Ainsi, les protéases et leurs inhibiteurs peuvent également être impliqués dans les processus inflammatoires et douloureux. Dans certaines pathologies intestinales comme les MICI et le SCI, l'activité protéolytique au sein de la muqueuse colique est augmentée. Les récepteurs activés par les protéases (PARs) sont fortement impliqués dans ces pathologies et participent aux symptômes des patients. Cependant, l'origine cellulaire de ces protéases, leur nature, leur régulation ainsi que leur rôle dans les pathologies sont mal connus.

**L'hypothèse générale que nous avons émise dans ce travail de thèse est que la cellule épithéliale via la sécrétion de protéases et d'inhibiteurs de protéases est un acteur majeur de l'homéostasie protéolytique de la muqueuse intestinale. Une dérégulation de la production de protéases et d'inhibiteurs de protéases par la cellule épithéliale joue un rôle majeur dans l'inflammation et la douleur colique.**

Nous avons focalisé notre étude sur les activités trypsiques et élastolytiques. En effet, ces 2 activités protéolytiques sont fortement augmentées dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MICI et de SCI. De plus, ces 2 types d'activités sont capables de cliver les PARs, connus pour être impliqués dans la physiopathologie de ces 2 maladies. Notre premier objectif a été de déterminer quel type cellulaire est à l'origine de l'augmentation de l'activité trypsique dans le côlon de patients atteints de SCI ou de MICI, quel type de trypsine est impliqué et quel rôle physiopathologique cette enzyme peut jouer.

Notre second objectif a été d'étudier dans un contexte de MICI la régulation de l'activité élastolytique par L'Elafine, un inhibiteur endogène d'élastase sécrété en grande majorité par la cellule épithéliale et ayant d'importantes propriétés anti-inflammatoires. Les mécanismes responsables de cette activité anti-inflammatoire de L'Elafine ont été abordés à l'échelle moléculaire et cellulaire.

# RESULTATS





OPEN ACCESS

ORIGINAL ARTICLE

# Epithelial expression and function of trypsin-3 in irritable bowel syndrome

Claire Rolland-Fourcade,<sup>1</sup> Alexandre Denadai-Souza,<sup>1</sup> Carla Cirillo,<sup>2</sup> Cintya Lopez,<sup>3</sup> Josue Obed Jaramillo,<sup>3</sup> Cleo Desormeaux,<sup>1</sup> Nicolas Cenac,<sup>1</sup> Jean-Paul Motta,<sup>1</sup> Muriel Larauche,<sup>4</sup> Yvette Taché,<sup>4</sup> Pieter Vanden Berghe,<sup>2</sup> Michel Neunlist,<sup>5,6,7</sup> Emmanuel Coron,<sup>5,6,7</sup> Sylvain Kirzin,<sup>8</sup> Guillaume Portier,<sup>8</sup> Delphine Bonnet,<sup>8</sup> Laurent Alric,<sup>8</sup> Stephen Vanner,<sup>3</sup> Celine Deraison,<sup>1</sup> Nathalie Vergnolle<sup>1,9</sup>

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312094>).

For numbered affiliations see end of article.

## Correspondence to

Dr Nathalie Vergnolle, Inserm UMR-1220, Institut de Recherche en Santé Digestive, CS60039 CHU Purpan, Toulouse, Cedex-3 31024, France; [nathalie.vergnolle@inserm.fr](mailto:nathalie.vergnolle@inserm.fr)

CR-F, AD-S, CC, CD and NV contributed equally.

Received 18 April 2016

Accepted 26 December 2016

## ABSTRACT

**Objectives** Proteases are key mediators of pain and altered enteric neuronal signalling, although the types and sources of these important intestinal mediators are unknown. We hypothesised that intestinal epithelium is a major source of trypsin-like activity in patients with IBS and this activity signals to primary afferent and enteric nerves and induces visceral hypersensitivity.

**Design** Trypsin-like activity was determined in tissues from patients with IBS and in supernatants of Caco-2 cells stimulated or not. These supernatants were also applied to cultures of primary afferents. mRNA isoforms of trypsin (*PRSS1*, 2 and 3) were detected by reverse transcription-PCR, and trypsin-3 protein expression was studied by western blot analysis and immunohistochemistry. Electrophysiological recordings and Ca<sup>2+</sup> imaging in response to trypsin-3 were performed in mouse primary afferent and in human submucosal neurons, respectively. Visceromotor response to colorectal distension was recorded in mice administered intracolonicallly with trypsin-3.

**Results** We showed that stimulated intestinal epithelial cells released trypsin-like activity specifically from the basolateral side. This activity was able to activate sensory neurons. In colons of patients with IBS, increased trypsin-like activity was associated with the epithelium. We identified that trypsin-3 was the only form of trypsin upregulated in stimulated intestinal epithelial cells and in tissues from patients with IBS. Trypsin-3 was able to signal to human submucosal enteric neurons and mouse sensory neurons, and to induce visceral hypersensitivity in vivo, all by a protease-activated receptor-2-dependent mechanism.

**Conclusions** In IBS, the intestinal epithelium produces and releases the active protease trypsin-3, which is able to signal to enteric neurons and to induce visceral hypersensitivity.

## INTRODUCTION

IBS is the most common functional GI disorder.<sup>1</sup> Patients with IBS suffer from abdominal pain, cramping and altered bowel habit. While the pathophysiology remains poorly understood, there is growing evidence that neurons innervating the intestine in patients with IBS are hyperexcitable, including both enteric neurons and extrinsic primary sensory afferents. Numerous studies

## Significance of this study

### What is already known on this subject?

- Colonic tissues from patient with IBS release 'trypsin-like' activity.
- Proteases in general and trypsins specifically can signal to enteric neurons.
- Protease-activated receptor-2 activation can be activated on mouse sensory neurons and submucosal neurons.
- In vivo, protease-activated receptor-2 activation causes visceral hypersensitivity.

### What are the new findings?

- The origin and the nature of one of the main proteases responsible for trypsin-like activity in tissues from patients with IBS have been unravelled: trypsin 3.
- Intestinal epithelial cells are the major source of trypsin activity in colonic tissues from patients with IBS.
- Among all the existing forms of trypsins, trypsin-3 is the protease responsible for IBS tissues-associated increased trypsin activity.
- Trypsin-3 increases intestinal epithelium permeability. Trypsin-3 also signals to human submucosal neurons, mouse sensory neurons and causes visceral hypersensitivity, all through a protease-activated receptor-2-dependent mechanism.
- Trypsin-3 could be considered as the endogenous agonist of protease-activated receptor-2 in the context of IBS.

### How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- Trypsin-3 could be used as a marker of epithelial dysfunction in patients with IBS.
- Specific inhibitors for trypsin-3 could be developed as new therapeutic options for the treatment of IBS hypersensitivity symptoms.

suggest that a number of mediators that are present within tissues from patients with IBS underlie these neuronal changes, and among them, proteases seem to be particularly important.<sup>2-4</sup>

**To cite:** Rolland-Fourcade C, Denadai-Souza A, Cirillo C, *et al.* Gut Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/gutjnl-2016-312094

Studies reported that protease inhibitors completely inhibited neuronal activation induced by IBS tissue supernatants.<sup>3 4</sup> However, the origin and the nature of proteases that could be responsible for neuronal hyperactivity in tissues from patients with IBS are still unclear. Identification of the origin and nature of such proteases would be an important step for potential therapeutic approach and drug development in the field of IBS. Here, we made the hypothesis that the intestinal epithelium could be an important source of proteases that are inducing neuronal signalling, and potentially hypersensitivity symptoms associated with IBS. Therefore, we have investigated proteolytic activity released by human cultured intestinal epithelial cells and tested their effect on sensory neuron activation. In humans, three serine protease (*PRSS*) genes encode trypsinogens: *PRSS1* encodes trypsinogen-1 (cationic trypsin), *PRSS2* encodes trypsinogen-2 (anionic trypsin) and *PRSS3* encodes trypsinogen-3, where at least two isoforms with overlapping mature peptide sequences, formerly designated as mesotrypsinogen and trypsinogen IV, have been functionally characterised. The mature protein of *PRSS3* gene uses the nomenclature of trypsin-3 protein, common to all transcripts of this gene. Here, we have determined that stimulated (by lipopolysaccharide (LPS) or epinephrine) intestinal epithelium released specifically on the basolateral side of trypsin-3, is able to signal to human enteric neurons and sensory neurons through a protease-activated receptor (PAR)-2 (PAR<sub>2</sub>)-dependent mechanism. In addition, trypsin-3 was able to induce increased epithelial permeability in vitro and visceral hypersensitivity in vivo, when delivered into the colon. Finally, in tissues from patients with IBS, we determined that the vast majority of trypsin-like proteolytic activity was associated with the epithelium, where trypsin-3 was upregulated compared with the levels of healthy controls. Our data demonstrated in IBS that the intestinal epithelium produces and releases active proteases, that is, trypsin-3 is able to signal to submucosal neurons, primary afferents and to induce visceral hypersensitivity.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

Colon tissues were obtained from patients with IBS and healthy controls at the Kingston General Hospital (Ontario, Canada) (ethic approval 6004988, collected between 2013 and 2016), Nantes (ethic approval DC-2008-402 collected between 2012 and 2016) and Toulouse (ethic approval DC-2015-2443 for the COLIC project collected in 2015 and 2016) Hospitals (France) (see online supplementary table S1). Patients with IBS were defined by the Rome III criteria. Descending colonic biopsies collected during colonoscopy procedures were used for immunohistochemistry and mRNA expression randomly. For immunohistochemistry, fresh biopsies were coated in optimal cutting temperature (OCT) compound (Dako) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For mRNA expression, complementary DNA (cDNA) samples generated from RNA extracts were used. For submucosal neuron imaging, samples of large bowel were harvested from non-pathologic zones of resections from six patients undergoing colectomy for colon cancer.

### Mice

Male C57BL/6 mice (6–10 weeks, Charles River Laboratories, Wilmington, Michigan, USA, or Janvier St Quentin-Fallavier, France) and male PAR<sub>2</sub>-deficient mice or wild-type littermates were used.<sup>5</sup> Mice had free access to food and water and were subjected to 12 hours light/dark cycles. Animal protocols followed the Canadian Council of Animal Care Guidelines and

were approved by Animal Care Committees at Queen's University (protocol 2016-1644), University of Calgary (protocol M08068-70) and Toulouse (protocol PI-U1220-NV19).

### Rat models of visceral hypersensitivity

Adult Wistar rats (aged 8–9 weeks, Harlan Laboratory, Indianapolis, Indiana, USA), males (240–300 g) and females (175–220 g) exposed to limited bedding stress as neonates<sup>6</sup> or naïve Sprague-Dawley rats (aged 7–8 weeks, 250–275 g) with free access to food and water and in 12 hours light/dark cycles were acclimated for 1 week before starting experiments. Experiments followed National Institutes of Health guidelines according to protocol #09026-11 and #9906-020 approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Veteran Affairs Greater Los Angeles Healthcare System under the auspice of the Office of Laboratory Animal Welfare—Assurance of Compliance (A3002-01).

Two methods were used to induce visceral hypersensitivity: repeated water avoidance stress (WAS), (10 days, 1 hour/day)<sup>7</sup> and the cortagine administration via intraperitoneal injection.<sup>8</sup> Visceral sensitivity was assessed as previously described.<sup>7 8</sup>

### Imaging

Section and live imaging were performed on Zeiss confocal LSM710 and ApoTome.2 microscopes, respectively.

### Culture of sensory neurons from dorsal root ganglia

Dorsal root ganglia (DRG) neurons were isolated from mice.<sup>3</sup> Cells were washed and incubated with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)+Ca<sup>2+</sup>, Fluo-4-AM (Invitrogen) and 20% pluronic F-127 (Invitrogen) during 30 min at 37°C followed by 30 min at room temperature before imaging.<sup>9</sup> Supernatants from apical or basal compartments of Caco-2 cells culture, stimulated or not by LPS (*Escherichia coli* serotype K235, ATCC13027), were pre-incubated with the serine protease inhibitor FUT-175 (Futhan) (50 µg/mL) or the trypsin inhibitor leupeptin (100 µM) (all from Calbiochem) for 15 min. Additional recordings were made from DRG neurons after addition of trypsin-3 (10 nM, R&D) or its vehicle (HBSS+0.025% Brij35) in the presence or absence of specific PAR<sub>1</sub> (SCH79797, Tocris Bio-Techne, UK) or PAR<sub>4</sub> (ML-354, Tocris Bio-Techne) antagonists (all at 10 µM for 5 min). Neurons were identified by addition of high K<sup>+</sup> (50 mM) solution at the end of the recording. Fluo-4 was excited at 475 nm, and fluorescence emission was collected at 490/515 nm. Changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> are reflected by Fluo-4 fluorescence intensity.

### Human submucosal neuron imaging

To isolate submucosal ganglia from descending colon, we used previously described methods.<sup>10 11</sup> The colon was placed in a cold oxygenated sterile HBSS (Sigma), cut along the mesenteric border and pinned flat with the mucosa facing upwards. Ice-cold HBSS was changed every 5 min. The submucosal plexus was dissected from the mucosal and underlying circular muscle, cut in small pieces (~1.5×1.5 mm) and digested at 37°C in an enzymatic solution (1 mg/mL; Sigma) and collagenase (1.25 mg/mL; Sigma) for 45 min. The suspension was centrifuged, the ganglia were plated onto 96-well plates (Greiner), topped-up with neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotic-antimycotic solution (Sigma) and nerve growth factor 25 ng/mL, and kept in an incubator at 37°C continuously gassed with 95% O<sub>2</sub>–5% CO<sub>2</sub>.<sup>11</sup> Ganglia were cultured for 3 days before performing Ca<sup>2+</sup> imaging experiments.<sup>12</sup> Tissues were loaded with 10 µM Fluo-4 AM (Molecular Probes, Invitrogen)

for 30 min at 37°C, then rinsed with HBSS and transferred on the microscope stage. Recordings were made at room temperature to monitor  $\text{Ca}^{2+}$  flux after addition of trypsin-3 (0.5–1–10 nM) to the wells, in the presence or absence of specific  $\text{PAR}_1$  (SCH79797),  $\text{PAR}_2$  (GB83, Axon Medchem, The Netherlands) or  $\text{PAR}_4$  (ML-354) antagonists (all at 10  $\mu\text{M}$  for 15 min). Neurons were identified by addition of high- $\text{K}^+$  (75 mM) solution at the end of the recording. Fluo-4 was excited at 475 nm, and fluorescence emission was collected at 525/50 nm. Changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  are reflected by Fluo-4 fluorescence intensity.

#### PAR<sub>2</sub> receptor internalisation in human submucosal neurons

Trypsin-3 (10 nM) was added to the submucosal tissue that was isolated from colonic biopsies and cultured in neurobasal medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 1% antibiotic-antimycotic solution for 2 hours. The plexus was then washed in phosphate buffer saline (PBS), fixed in paraformaldehyde 4% and processed for immunostaining, using chicken anti-neurofilament 200 kDa (NF200, 1:500, ab134306-Abcam), to identify neurons and nerve fibres, and mouse anti- $\text{PAR}_2$  antibody (1:200, SAM-11-LifeSpan BioSciences, Seattle, USA).<sup>13</sup> Primary antibody incubation (overnight at 4°C) was followed by incubation with appropriate fluorescently labelled secondary antibodies (2 hours room temperature). The tissue was mounted on a microscope slide in Citifluor (Citifluor, Leicester, UK).  $\text{PAR}_2$  involvement specificity was investigated in the presence of the  $\text{PAR}_2$  antagonist GB83 (10  $\mu\text{M}$ ),<sup>14</sup> added 30 min before trypsin-3.

#### Intestinal epithelial cell cultures

Caco-2 cells were grown to confluence as monolayers in Transwell plates ( $2 \times 10^5$  cells per well) (Corning).<sup>15</sup> After 21 days in culture (transepithelial electrical resistance of 350  $\Omega \text{ cm}^2$ ),<sup>15</sup> culture medium was replaced by OptiMEM (Life Technologies) and cells were exposed for 24 hours to trypsin-3 (0.5–10 nM) on the basolateral side, in the presence or absence of the ( $\text{PAR}_2$ ) antagonist (GB88). Paracellular permeability was measured by the passage of dextran-Fluorescein IsoThioCyanate (FITC) (3000 kDa, Sigma) from the apical to the basal medium, as previously described.<sup>16</sup>

#### Trypsin activity

Basal media were concentrated 3 times using Vivaspin 500 (Dutcher). Trypsin activity was measured in basal and apical medium with the substrate N-p-Tosyl-GPR-amino-4-methylcoumarin hydrochloride (0.1 mM) in 50 mM Tris, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . Substrate degradation was calculated by the change in fluorescence (excitation: 355 nm, emission: 460 nm), measured over 30 min at 37°C on a microplate reader NOVOstar (BMG Labtech). OCT-included biopsies of control and patients with IBS were cryostat sectioned (8  $\mu\text{m}$  thickness) and washed with PBS, 2% Tween-20. All samples were incubated overnight at 37°C with the substrate N-p-Tosyl-GPR-amino-4-methylcoumarin hydrochloride (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma) in 0.3% low melting agarose. Nuclei were stained with Topro3 (Invitrogen). Images were analysed with ImageJ software.

#### Reverse transcription, conventional and quantitative PCR

Total RNA was extracted with the Nucleospin RNA/Protein Kit (Macherey-Nagel, GmbH). DNase-treated RNA was reverse transcribed using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) (Thermo Scientific). Resulting cDNA samples were amplified by conventional PCR with Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA) and sequence-specific primer pairs (see online supplementary

table S2).<sup>17</sup> For qPCR, cDNA was amplified with the SYBR Green Master I Kit (Roche) and sequence-specific primer pairs (see online supplementary table S2) in a LightCycler 480 Instrument (Roche). The analysis of stability of three standard housekeeping genes (*HPRT1*, *GAPDH* and *TBP*) by using RefFinder ranked *HPRT1* as the overall most stable housekeeping gene in our experimental conditions. Thus, the relative level of mRNA expression for target genes was calculated with the method 2- $\Delta\Delta\text{Ct}$ <sup>17</sup> by using *hHPRT1* as reference gene. For conventional PCR and qPCR, negative controls consisted of samples from reverse transcription, where the enzyme was not added to reactions. The identity of amplicons from *PRSS1*, 2 and 3 was confirmed by automated DNA sequencing (Eurofins MWG Operon, GmbH).

#### Western blot analysis

Proteins from Caco-2 cells were extracted with the Nucleospin RNA/Protein Kit (Macherey-Nagel) as per manufacturer's instructions. Supernatant's proteins were precipitated by trichloroacetic acid/acetone, separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (12%) and transferred onto a nitrocellulose membrane (Life Science). Membranes were incubated with antitrypsin-3 antibody (1/100, ab107430-Abcam) overnight at 4°C and secondary antibody conjugated with HRP (1/3000, w4018-Promega) and then visualised by chemiluminescence (Chemidoc XRS Bio-Rad).

#### Immunofluorescence in cell cultures and biopsies

Cell cultures were fixed using formaldehyde (4%) during 10 min followed by washes in 0.1 M glycine ( $2 \times 10$  min). Immunostaining was performed with antitrypsin-3 (1/500 ab107430-Abcam), anti-occludin (1/100 711500 Life Technologies), antizonula occludens (ZO)-1 (1/100, 617300 Invitrogen) and 670 phalloidin (PHDN1-cytoskeleton), to label actin network. Human colonic biopsies were included in OCT and tissue cryosections (5  $\mu\text{m}$  thickness) were cut with cryostat (Leica Microsystems, GmbH). Tissue slices were costained with antibodies against trypsin-3 and the epithelial cell marker EpCAM/CD326 (1/500 VU1D9-Cell Signalling). Cells and tissue slices were then incubated with appropriate secondary antibodies conjugated to AlexaFluor 488 or 555 (Molecular Probes). Slides were mounted with Prolong Gold Antifading Reagent with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Molecular Probes), to counterstain cell nuclei. The mean fluorescence intensity corresponding to trypsin-3-immunoreactivity in epithelial cells, as delimited by EpCAM costaining, was quantified with ImageJ software.<sup>16</sup>

#### Electrophysiological recordings from nociceptive DRG neurons

Mouse DRG were dissected from T9 to L1 and were enzymatically dissociated, plated onto coverslips and cultured overnight, as described.<sup>4</sup> Neurons were incubated with active trypsin-3 (10 nM) 20 min prior electrophysiological studies, the  $\text{PAR}_2$  antagonist GB83 (10  $\mu\text{M}$ )<sup>14</sup> was added 30 min before trypsin-3. Whole-cell perforated patch current-clamp recordings were made using amphotericin B (240 g/mL, Sigma) on small diameter neurons (<40 pF capacitance). Changes in excitability were quantified by measuring rheobase and numbers of action potentials discharged at twice rheobase. Recordings were performed using Multiclamp 700B, digitised by Digidata 1440A, were stored and processed using pClamp 10.2 software (all by Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA). The recording chamber was continuously perfused with external solution



(~2 mL/min) at room temperature (23°C). Standard solutions used were (in mmol/L); pipette solution: K-gluconate 110, KCl 30, 4-(2-hydroethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid (HEPES) 10, MgCl<sub>2</sub> 1 and CaCl<sub>2</sub> 2; pH adjusted to 7.25 with 1 M KOH; external solution: NaCl 140, KCl 5 HEPES 10, glucose 10, MgCl<sub>2</sub> 1 and CaCl<sub>2</sub> 2; pH adjusted to 7.3–7.4 with 3 M NaOH.

### Colorectal distension

Recombinant human trypsinogen-IV was purchased and activated into trypsin-3 by enteropeptidase following commercial recommendations. Then, mice were submitted to intracolonic administration of trypsin-3 (10 U/mouse), followed by colorectal distensions at 0, 1, 3, 6 and 9 hours time points, as previously described.<sup>3</sup> In another set of experiments, mice were intracolonic administered with increasing doses of trypsin-3 (0.1, 1 or 10 U/mouse), followed by colorectal distension 3 hours later. Mice from the control group were administered intracolonic with vehicle (10% v/v absolute ethanol and 10% v/v Tween-80).<sup>18</sup> Similar experiments were repeated in PAR<sub>2</sub>-deficient mice and wild-type littermates.<sup>3</sup>

### Statistical analysis

Data were expressed as mean±SEM, except for RT-qPCR, immunostaining and in situ zymography quantification of patient biopsies, where each dot represents one patient. Statistical analysis was performed using parametric t-tests, two-way or one-way analysis of variance and Bonferroni's post-test (see figure legends). GraphPad Prism V5.0 software was used for analysis. Statistical significance was accepted at p<0.05.

## RESULTS

### Epithelial proteolytic activity signals to sensory neurons

Culture media from the apical compartment of Caco-2 cells stimulated or not with LPS, induced very small amplitude Ca<sup>2+</sup> response in a limited number of mouse sensory neurons (figure 1A, B). Similarly, culture media from the basal compartment of unstimulated Caco-2 cells had little effect on the Ca<sup>2+</sup> signal in DRG neurons (figure 1A, B). However, culture media from basal compartment of LPS-stimulated Caco-2 cells induced a significant increase in the number of responding neurons (figure 1A), and in the amplitude of their response (figure 1B). This increase was completely suppressed by pre-incubation with the non-selective trypsin inhibitors (FUT or leupeptin) (figure 1A, B), and the effect of the LPS-stimulated supernatant was not observed using DRG neurons from PAR<sub>2</sub><sup>-/-</sup> mice (figure 1C). These experiments demonstrated that LPS stimulation of intestinal epithelial cells releases proteolytic activity specifically on the basal compartment, and that this activity can signal to sensory neurons, through the activation of PAR<sub>2</sub>.

### Trypsin activity originates from intestinal epithelial cells in human colons

Residual trypsin activity was released in culture supernatants of intestinal epithelial Caco-2 cells, both in basal and apical compartments. This trypsin activity was significantly increased in the basal, but not the apical compartment after stimulation of Caco-2 cells by LPS (figure 2A). Thus, epithelial trypsin activity follows the same pattern as the epithelial proteolytic mediators activating primary afferents described above.

Using in situ zymography, we next investigated where trypsin activity was located in human colonic tissues. Very low trypsin activity was detected in colonic tissues from healthy controls (figure 2B, left panel), while in patients with IBS, increased activity was detected (figure 2B, middle panel), and this was

observed predominantly in the epithelium, with similar activity at the base and the tip of the crypts (figure 2B, middle panel). The epithelial trypsin activity was significantly increased in tissues from all IBS subgroups (IBS-C, IBS-D and IBS-M) (figure 2B, right panel). Hypersensitivity was induced in rats by submitting them to WAS. Colonic tissues from rats with demonstrated hypersensitivity (not shown) were used for in situ zymography. Trypsin activity was also increased in the colon epithelium of hypersensitive rats compared with naïve controls (figure 2C).

### Trypsin-3 is the predominant form of epithelial trypsin and is overexpressed in IBS

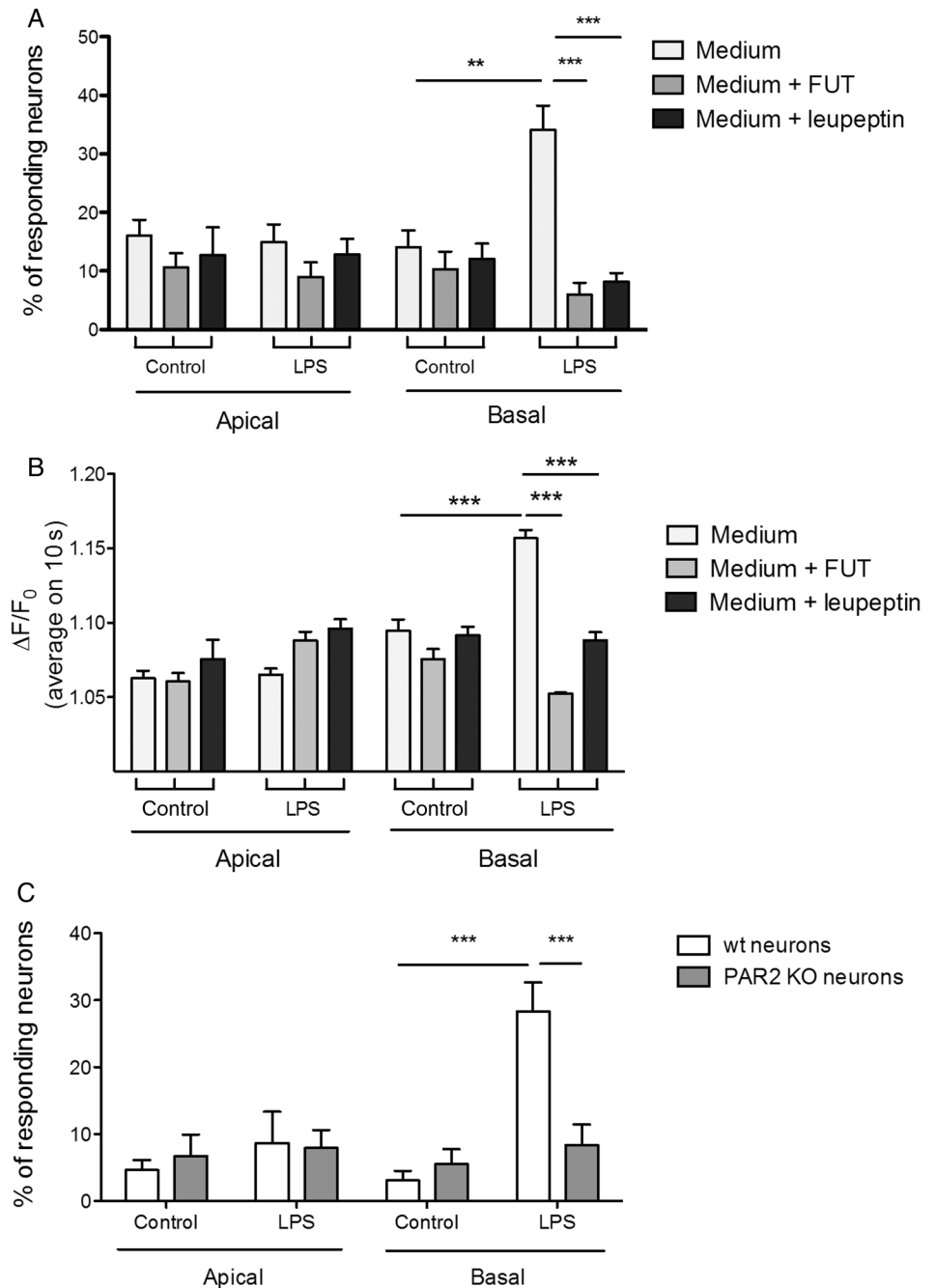
We then examined the forms of trypsin present in human intestinal epithelium and/or tissues from patients with IBS. We found that all three human trypsin genes: *PRSS1*, *PRSS2* and *PRSS3* forms were present in intestinal epithelial cells (figure 3A, B), and in human colonic tissues (figure 3B). However, only *PRSS3* mRNA (codes for the trypsin-3 protein) expression was upregulated in epithelial cells after LPS exposure, or after addition of epinephrine to the basolateral side (figure 3A). Cortisol exposure of intestinal epithelial cells had no effect on *PRSS1*, 2 or 3 mRNA expression (see online supplementary figure S1). In human colon, *PRSS3* was the predominant form of trypsin detected (figure 3B) and no difference was observed for *PRSS1* and *PRSS2* expression in IBS tissues versus healthy controls (see online supplementary figure S2A, B). However, *PRSS3* expression was significantly upregulated in tissues from IBS-C (constipation-predominant IBS), compared with healthy controls, while changes in *PRSS3* expression was not significant in IBS-D (diarrhoea-predominant IBS) or IBS-M (mixed-IBS), compared with healthy controls (figure 3C). We further investigated the splice variants of *PRSS3* that would be expressed in colonic tissues, and we determined that *PRSS3* variant 1 was the major transcript expressed in intestinal epithelial cells and in colonic tissue samples (see online supplementary figure S2C). Trypsin mRNA expression (amplicons from the *TPSAB1*, *TPSB2* and *TPSD1*, the three trypsin genes) was not detected in Caco-2 cells stimulated or not with LPS (see online supplementary figure S2D).

We confirmed the presence of the 33-kDa trypsin-3 protein in intestinal epithelial cells and its LPS-induced upregulation in those cells (figure 4A) as well as the epinephrine-induced upregulation (data not shown). In Caco-2 cells, trypsin-3 was associated with the plasma membrane colocalising with actin (figure 4B). We confirmed the secretion of trypsin-3 in culture supernatants of Caco-2 cells, at low level in apical supernatants (basal or LPS stimulated), but at significantly higher level in the basal compartment of Caco-2 cells after their stimulation with LPS (figure 4C).

In human and rat tissues, epithelial trypsin-3 was just above detection level in healthy controls but was significantly upregulated in tissues from patients with IBS (figure 4D) and from hypersensitive rats (cortagine-treated) (figure 4E). All IBS subgroups (IBS-D, IBS-C and IBS-M) expressed significantly larger amounts of trypsin-3 compared with healthy controls (figure 4D, lower panel). We also found that trypsin-3 epithelial expression was polarised towards the basolateral membrane in these tissues (figure 4F). This suggests that trypsin-3 would be released from the basolateral membrane of intestinal epithelial cells in vivo, as found in the in vitro studies. Taken together, we confirmed at a protein level that trypsin-3 matched the trypsin activity detected in intestinal epithelial cells and tissues from patients with IBS.



**Figure 1** Conditioned medium from intestinal epithelial cells activates dorsal root ganglia (DRG) sensory neurons by the release of trypsin-like serine protease. Effect of the serine protease inhibitor FUT or the trypsin inhibitor leupeptin on the percentage of responsive neurons (A) and on the Fluo-4 ( $\Delta F/F_0$ ) measured  $Ca^{2+}$  levels (B) stimulated by apical or basal supernatants recovered from control or lipopolysaccharide (LPS)-treated Caco-2 cell monolayers. (C) Percentage of sensory neurons dissociated from DRGs of wild-type (wt) or PAR<sub>2</sub> knockout (KO) mice responding to apical or basal supernatants recovered from control or LPS-treated Caco-2 cell monolayers. Data are expressed as mean $\pm$ SEM and were compared using a one-way analysis of variance followed by Bonferroni's post-test (n=6, 2 wells per condition for this experimentation) \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



### Trypsin-3 increases epithelial permeability, signals to human and mouse neurons and causes visceral hypersensitivity

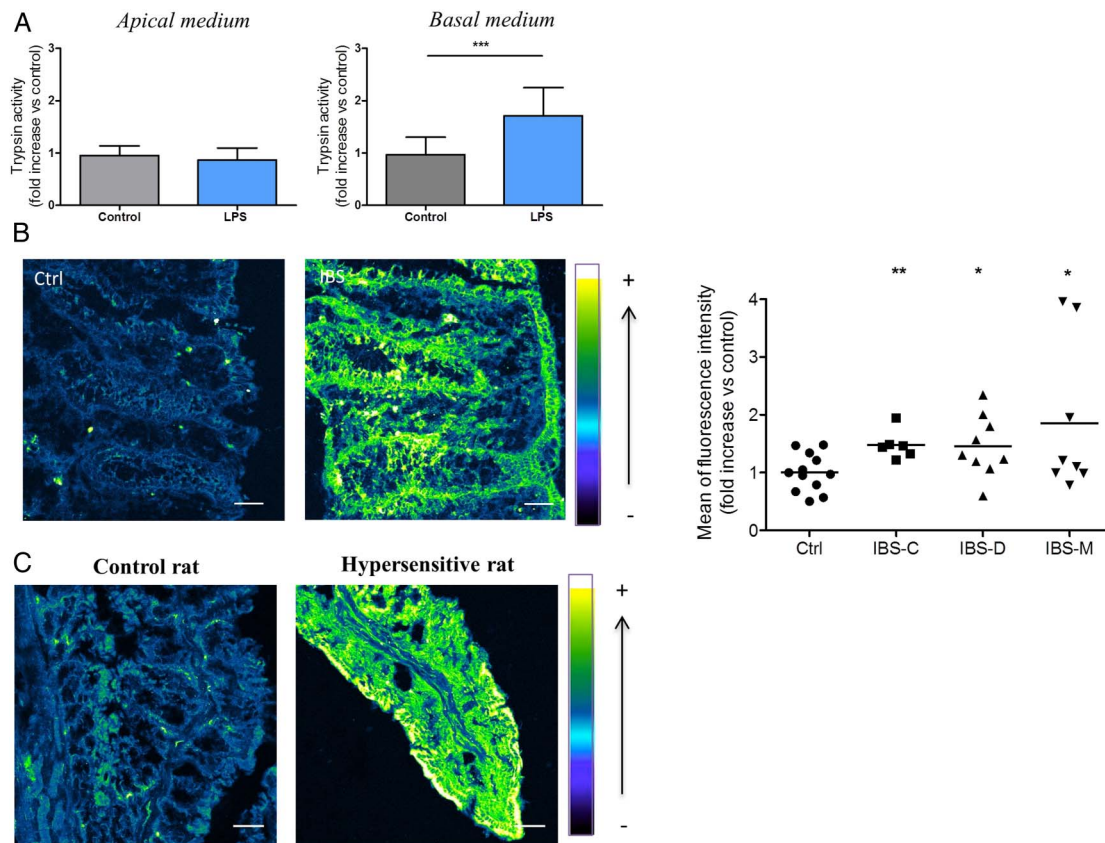
The addition of trypsin-3 (1 and 10 nM) to the basal compartment of Caco-2 monolayers caused an increased passage of dextran-FITC (figure 5A). It also caused a decreased staining and disorganisation of the epithelial tight junction protein ZO-1 and occludin, compared with control (trypsin-3 vehicle) conditions (figure 5B). Trypsin-3 increased excitability of mouse DRG neurons compared with controls (figure 6A–C). The mean rheobase of neurons was decreased by 30% and the mean action potential number at twice rheobase increased by 39% (n=23, p<0.05), compared with control neurons. Trypsin-1 (10 nM) and thrombin (50 nM) also increased neuronal excitability (figure 6C) to a similar level to that seen with trypsin-3 (10 nM).

Trypsin-3 was able to induce  $Ca^{2+}$  transients in human submucosal neurons (figure 6D) in a dose-dependent manner (figure 6E).

Trypsin-3 administered intracolonicly, in a Tween-based saline solution (in order to allow the passage of trypsin-3 through the intestinal barrier) caused visceral hyperalgesia in response to colorectal distension, compared with baseline measures (figure 7A–C). This was evident by 1 hour and persisted for 6 hours (figure 7A). No effect was seen with vehicle alone and the trypsin-3 effect was dose-dependent (figure 7B).

### Mechanisms of trypsin-3-induced enteric effects

The effects of trypsin-3 in mouse sensory neurons were blocked by the PAR<sub>2</sub> antagonist GB83, which also blocked the effect of trypsin-1 but had no effect on thrombin, a PAR<sub>1</sub>/PAR<sub>4</sub> agonist (figure 6C). PAR<sub>1</sub> or PAR<sub>4</sub> antagonists had no significant effect on trypsin-3-induced rise in  $[Ca^{2+}]_i$  (see online supplementary figure S3A). In human colonic submucosal neurons, the trypsin-3-induced rise in  $[Ca^{2+}]_i$  was completely abolished by pre-incubation with the PAR<sub>2</sub> antagonist GB83 (figure 6E), but



**Figure 2** Intestinal epithelial cells released trypsin-like activity. (A) Trypsin-like activity measured in apical and basal supernatants recovered from control or lipopolysaccharide (LPS)-treated Caco-2 cells. Assembled data from seven independent experiments with 4–6 wells per test. Representative confocal photomicrographs of in situ zymography assays performed in colonic tissue slices from healthy controls and patients with IBS (scale bar: 50  $\mu$ m), (B) from control (Ctrl) or water avoidance-induced hypersensitive rat (scale bar: 20  $\mu$ m), (C) evidencing the level of trypsin-like activity. Graph representation of mean fluorescence intensity quantified from 6 to 12 patients per group. Data are expressed as mean $\pm$ SEM and were compared using Student's t-test. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.005.

was not modified by pre-incubation with PAR<sub>1</sub> (SCH79797) or PAR<sub>4</sub> (ML-354) antagonists (see online supplementary figure S3B). In PAR<sub>2</sub>-deficient mice, trypsin-3-induced visceral hypersensitivity was also significantly inhibited at the 30 mm Hg pressure (figure 7C). The whole area under the curve of trypsin-3-induced visceromotor response as a function of increasing pressures of distension was significantly lower in PAR<sub>2</sub>-deficient mice compared with wild-type ( $p$ <0.05, not shown), thereby confirming the notion that the enteric effects of trypsin-3, including in vivo visceral hypersensitivity, are mediated by PAR<sub>2</sub> activation.

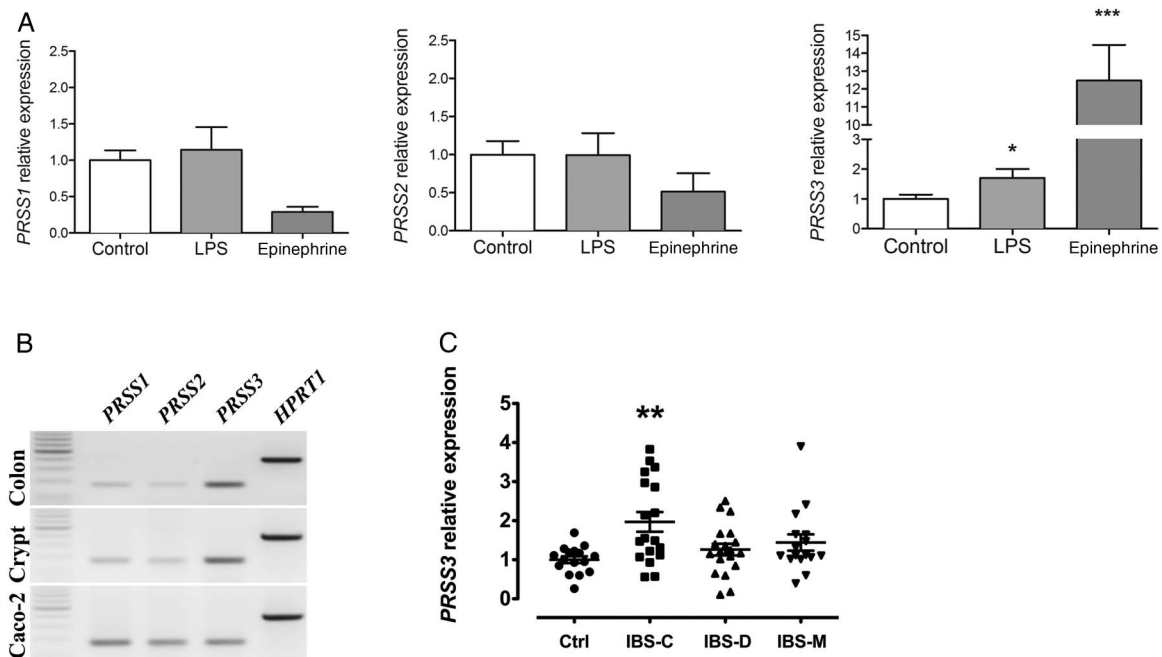
We further investigated in human colonic submucosal neurons, trypsin-3-induced potential changes in PAR<sub>2</sub> expression, as a marker of PAR<sub>2</sub> activation. In basal (unstimulated) conditions, PAR<sub>2</sub> staining was clustered seemingly at the plasma membrane of submucosal neurons (figure 8, upper panel). After trypsin-3 stimulation, PAR<sub>2</sub> expression radically changed, becoming either diffuse or in intracellular clusters (figure 8, middle panel). This suggested that PAR<sub>2</sub> had been activated by trypsin-3 and had been internalised into submucosal neurons. Exposure to the PAR<sub>2</sub> antagonist GB83 inhibited trypsin-3-induced changes in PAR<sub>2</sub> staining (figure 8, bottom panel).

## DISCUSSION

Increased proteolytic activity, and in particular trypsin activity is released by colonic tissues from patients with IBS. It is

considered to be involved in hyperexcitability of both extrinsic and intrinsic enteric neurons, and in visceral hypersensitivity.<sup>2–4</sup> However, the lack of knowledge on the origin and the nature of the protease(s) responsible for this trypsin activity has hampered further research on proteases as potential molecular targets for the treatment of IBS. The current study provides the first description of the expression and function of an epithelial form of trypsin: trypsin-3 and its potential importance in IBS. Trypsin-3 is presented as a valuable target for new therapeutic development, further highlighting the importance of epithelial biology in IBS.

Trypsin proteolytic activity is increased both in tissues from patients with IBS (figure 2B) and biopsy supernatants.<sup>3</sup> Several potential sources could account for this increase. First, the microbiota could be a major source of trypsin activity, and indeed, such activity has been found in the faeces of patients with IBS.<sup>19</sup> However, when the nature of the proteases present in human faeces has been investigated, only host proteases were identified.<sup>19</sup> Second, pancreatic enzymes and in particular trypsins could explain the luminal presence of trypsin activity. But for both sources (microbiota or pancreas), it seems implausible that luminal proteases could penetrate the mucus layer, cross the epithelial barrier and reach the vicinity of enteric neurons, remaining active to potentially induce hyperactivity in those neurons. Therefore, we sought to investigate mucosal tissue sources for trypsin activity in this study, by using in situ zymography. We observed very low trypsin activity in colonic tissues



**Figure 3** Gene expression of trypsinogens. A. Relative gene expression of *PRSS1* (cationic trypsin: trypsin-1 precursor), *PRSS2* (anionic trypsin: trypsin-2 precursor) and *PRSS3* (trypsin-3 precursor) in control, lipopolysaccharide (LPS)-treated or epinephrine-treated Caco-2 cell monolayers. Data are expressed as mean±SEM and were compared using one-way analysis of variance followed by Bonferroni's post-test. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . (B) Analytical agarose-gel electrophoresis of RT-PCR products performed with RNA extracted from human colonic biopsies (healthy control), isolated colonic crypts or Caco-2 cells. Amplicons were amplified with oligonucleotides specific for *PRSS1*, *PRSS2*, *PRSS3* and *HPRT1*. (C) Relative mRNA expression of *PRSS3* within colonic biopsies from healthy control and different IBS subtypes: IBS-C (constipated), IBS-D (diarrhoea), IBS-M (mixed). Data are expressed as mean±SEM and were compared using Student's t-test. \*\* $p < 0.01$  vs control (Ctrl).

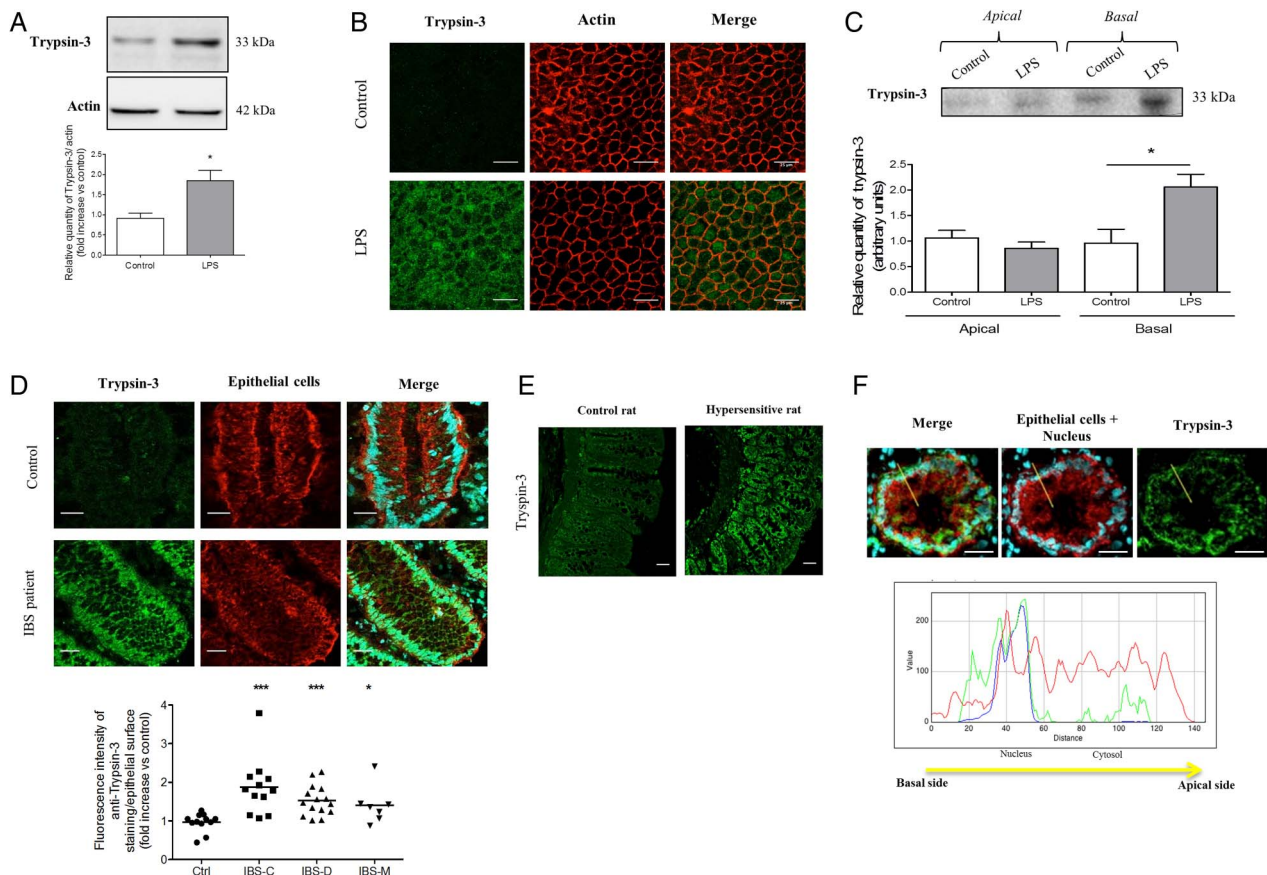
from healthy controls, but this activity was markedly increased in tissues from patients with IBS, and was strongly associated with intestinal epithelial cells (figure 2B). We therefore considered the intestinal epithelium as a potential important source of trypsin activity. We demonstrated that LPS-stimulated intestinal epithelial cells release trypsin activity, specifically on the basolateral side, and that this activity was able to signal to sensory neurons by a PAR<sub>2</sub>-dependent mechanism. The polarised secretion of trypsin activity in LPS-treated intestinal epithelial cells constitutes a major breakthrough in our comprehension of the role of epithelial mediators in enteric neuron signalling. First, it demonstrates that stressed intestinal epithelial cells (LPS-induced or epinephrine-induced stress) can overexpress and release active trypsin-like enzymes. Second, it demonstrates that this release is oriented towards mucosa-submucosa, where enteric neurons and primary afferent nerve terminals are found. Our results further suggest that polarised expression of trypsin proteins also occurs in vivo in patient's tissues, as observed by the presence of trypsin-3 protein on the basolateral side of epithelial layers in tissues from patients with IBS (figure 4F).

When investigating the forms of trypsin that could be expressed by intestinal epithelial cells, we demonstrated the presence of transcripts from the three trypsin genes: *PRSS1*, *PRSS2* and *PRSS3*. However, only *PRSS3* mRNA was upregulated in LPS-stimulated or epinephrine-stimulated intestinal epithelial cells (figure 3A), and in tissues from patients with IBS (see online supplementary figure S2, and figure 3C). Interestingly, *PRSS3* mRNA was significantly upregulated in patients with IBS (in agreement with the results of a previous study<sup>20</sup>), but in our study, this overexpression was significant only in the IBS-C subgroup (figure 3C), suggesting that only this condition is associated with transcriptional regulation of

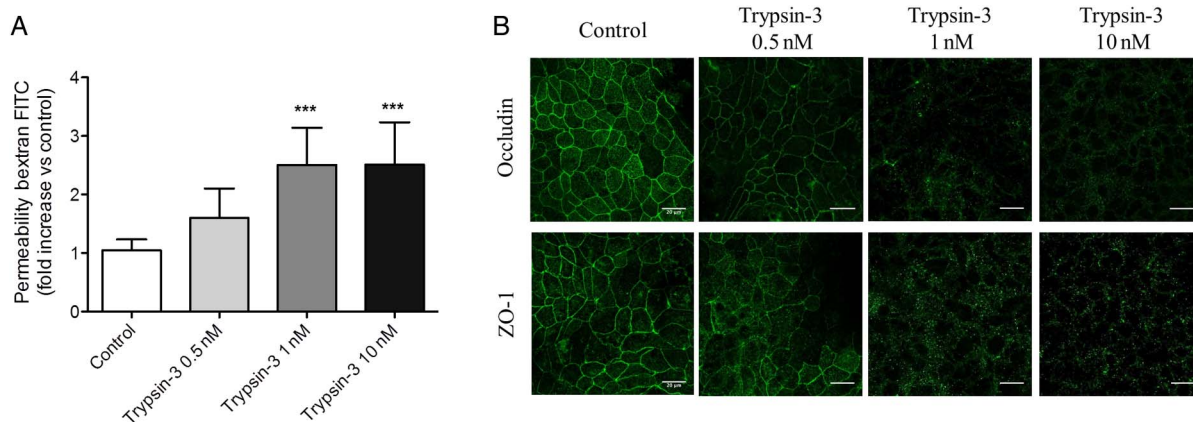
trypsin-3. The protein product of *PRSS3*, trypsin-3, matched the same pattern of overexpression in intestinal epithelial cells and in tissues from patients with IBS (figure 4), and is upregulated in all IBS subgroups: IBS-C, IBS-D and IBS-M. Taken together, our results clearly point to an increased presence of trypsin-3 in tissues from patients with IBS. However, differential regulatory mechanisms might be involved in patient subgroups with IBS, with some (IBS-C) being submitted to transcriptional regulation and others (IBS-D, IBS-M) being submitted to post-transcriptional regulation. Furthermore, we showed here that of the four different known alternative splice variants derived from *PRSS3* transcription (1–4), *PRSS3* variant 1 was the major transcript expressed in colonic tissues or in intestinal epithelial cells (see online supplementary figure S2C). Interestingly, we found that the protein product of *PRSS3*, trypsin-3 was expressed all along the colonic crypt (figure 4D), indicating that potentially most epithelial cell types express the protein. Low constitutive expression of trypsin-3 was detected in tissues from healthy controls (figure 4D). However, it might not be active there since very low trypsin-like activity was detected in tissues from healthy controls (figure 2B).

Very little is known about the physiological or pathophysiological functions of trypsin-3. Work by the group of E Radisky reported that trypsin-3 targets multiple endogenous human canonical inhibitors, therefore presenting trypsin-3 as a gatekeeper in the protease web.<sup>21 22</sup> We demonstrated that active trypsin-3 was able to signal both to primary afferent nerves and to submucosal enteric neurons. In both cases, our data show that trypsin-3 signals to PAR<sub>2</sub> in neurons. This finding is consistent with previous studies reporting that PAR<sub>2</sub> can be activated by trypsin-3.<sup>23</sup> Although our findings are in keeping with previous evidence that proteases in IBS tissues signal to neurons by

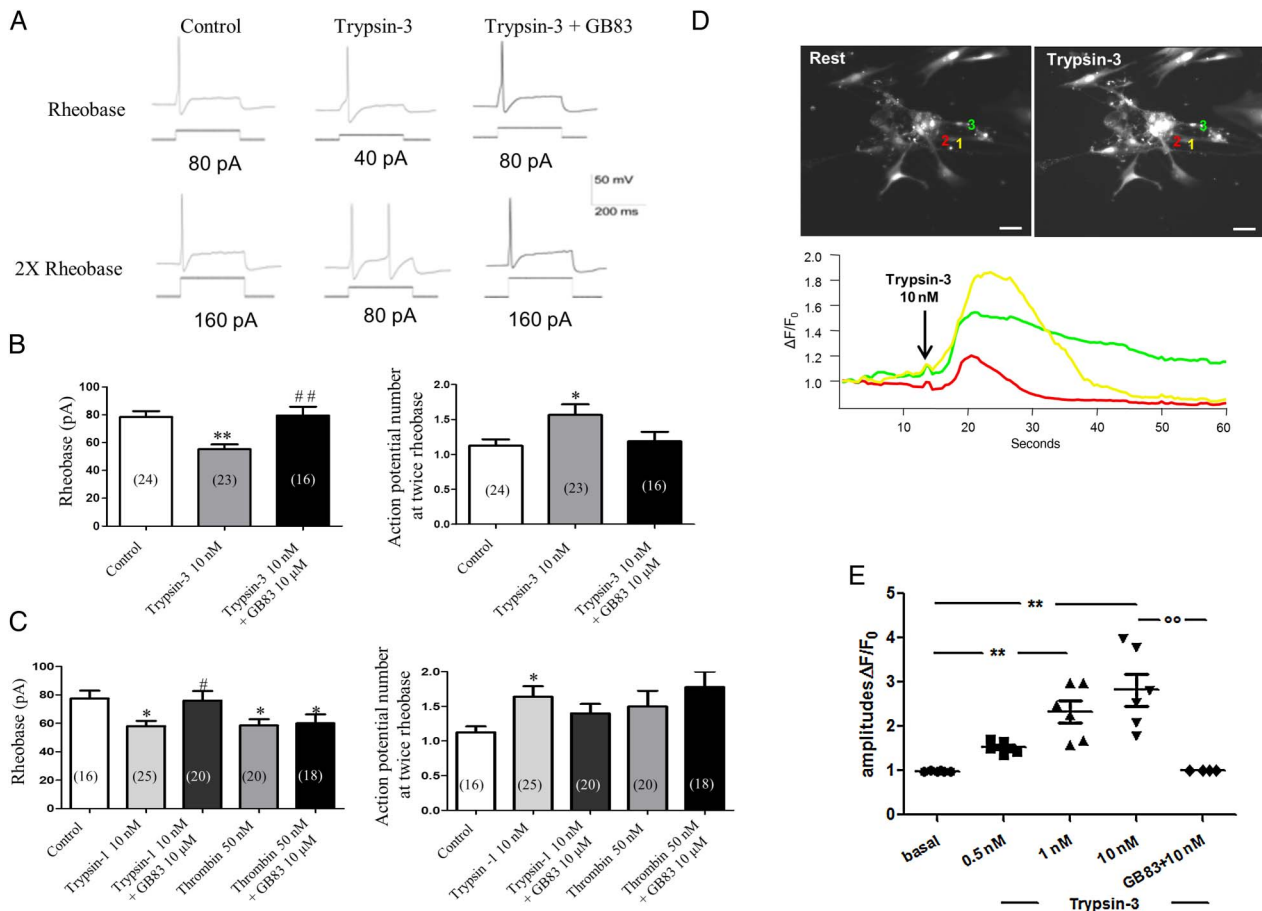




**Figure 4** Intestinal epithelial cells upregulate trypsin-3 secretion in inflammatory condition and in IBS. (A) Relative trypsin-3 quantification by western blot analysis from protein extract of control or lipopolysaccharide (LPS)-treated Caco-2 cells. (B) Confocal photomicrographs of control and LPS-treated Caco-2 cell monolayer evidencing trypsin-3-immunoreactivity (green) and actin cytoskeleton (red), scale bar: 25  $\mu$ m. (C) Relative trypsin-3 protein quantification from apical and basal supernatants from control or LPS-stimulated Caco-2 cell monolayers. (D) Representative confocal photomicrographs of colonic tissue slices from control (ctrl) and patients with IBS (scale bar: 20  $\mu$ m). (E) Colonic tissues from control or cortagine-induced hypersensitive rat (scale bar: 20  $\mu$ m), showing trypsin-3-immunoreactivity (green) for D and E, epithelial cell labelling (EpCAM-positive cells, red) and nuclei counterstain (cyan) for D. (D) Mean fluorescence intensity for trypsin-3-immunoreactivity quantified specifically in epithelial (EpCAM-positive) cells. (F) Confocal photomicrographs showing the transversal view of a colonic crypt labelled for trypsin-3 (green), EpCAM (red) and nuclei (cyan), scale bar: 25  $\mu$ m. The representative profile at the bottom of the panel shows the polarisation of trypsin-3-immunoreactivity towards the basolateral side of intestinal epithelial cells. Data are expressed as mean $\pm$ SEM and were analysed by Student's t-test in A and D, and a one-way analysis of variance followed by a Bonferroni's post-test in C.



**Figure 5** Trypsin-3 increases cellular permeability in intestinal epithelial cells. (A) Dextran passage from apical to basal medium of Caco-2 cell monolayers after trypsin-3 exposure (0.5, 1 and 10 nM) on the basolateral compartment. Assembled data from three independent experiments with 4 wells per test. (B) Representative confocal photomicrographs of Caco-2 cell monolayers after trypsin-3 exposure on the basolateral compartment (0.5, 1 and 10 nM) showing immunodetection of cellular junction occludin (top) and zonula occludens (ZO)-1 (bottom) in green, scale bar: 50  $\mu$ m. Data are expressed as mean $\pm$ SEM and were analysed by one-way analysis of variance followed by Bonferroni's post-test, \*\*\* $p$ <0.001.

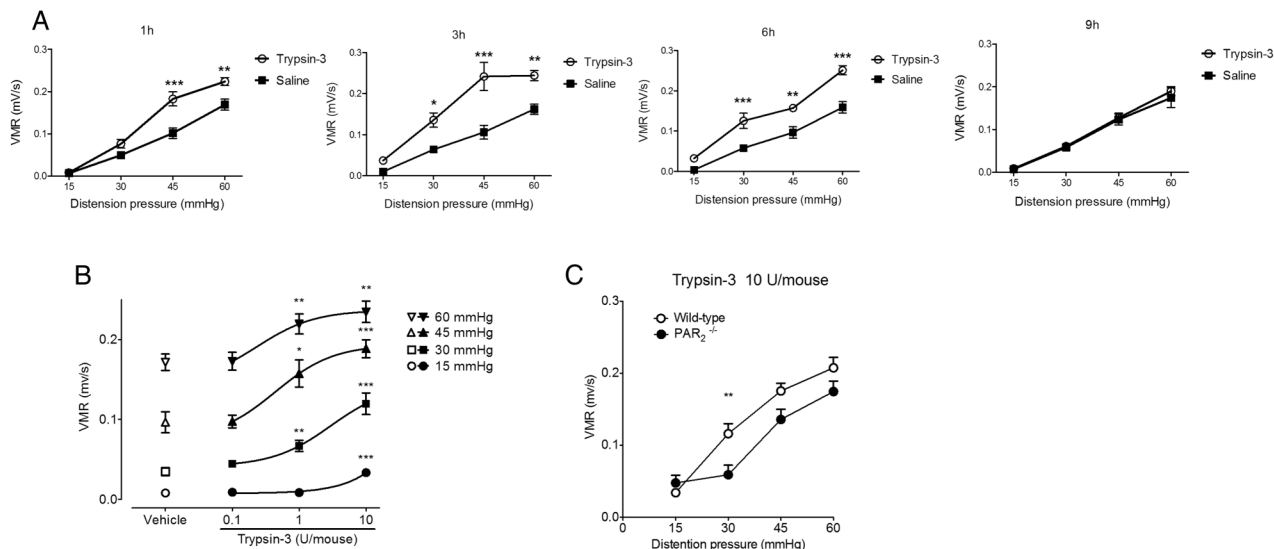


**Figure 6** Trypsin-3 evokes PAR<sub>2</sub>-dependent hyperexcitability of nociceptive dorsal root ganglia neurons and calcium signals in human submucosal neurons. (A) Representative traces of current clamp recordings showing the rheobase and the action potential discharge at twice the rheobase in control neurons (left panel), neurons incubated with trypsin-3 (10 nM) (middle panel) or neurons incubated with the PAR<sub>2</sub> antagonist GB83 (10 μM) before trypsin-3 (right panel). (B) Mean data of the rheobase and the action potential number at twice rheobase for the control, and trypsin-3 with or without GB83 (10 μM). \**p*<0.05 and \*\**p*<0.01 compared versus control, ###*p*<0.01 compared versus trypsin-3. (C) Representative data showing the effect of trypsin and thrombin on the rheobase and action potential discharge is similar in magnitude to that observed with trypsin-3, shown in B. The PAR<sub>2</sub> antagonist blocks the trypsin but not the thrombin effect on neuronal excitability. \**p*<0.05 compared with control, #*p*<0.05 compared with trypsin-1. One-way analysis of variance with Bonferroni's post-test. (D) Representative gray scale images of cultured human submucosal ganglia loaded with Fluo-4 and Ca<sup>2+</sup> responses of three neurons (colour-coded numbers in the gray images) to trypsin-3 (10 nM). Matched colours are represented between cell numbering and traces. The identity of human neurons was confirmed by application of high-K<sup>+</sup> solution (75 mM). Scale bar: 20 μm. (E) Average amplitude of trypsin-3 (0.5–10 nM)-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rises in submucosal neurons in the presence or absence of the PAR<sub>2</sub> antagonist GB83. Data are expressed as mean±SEM and were analysed by one-way analysis of variance followed by Bonferroni's post-test (*n*=6 subjects per group), \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, °°*p*<0.01.

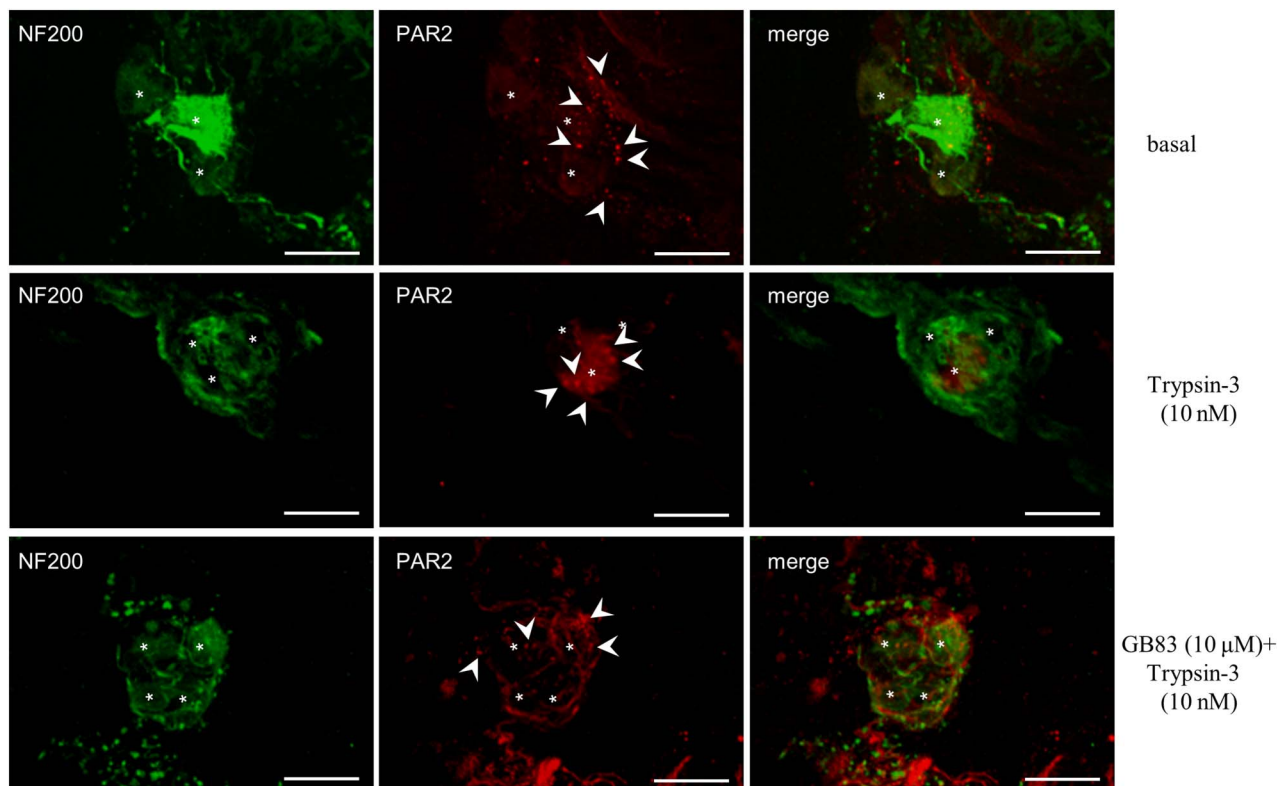
activating PAR<sub>2</sub>,<sup>3 4 24</sup> specific evidence for the role of trypsin-3 in IBS supernatants cannot be directly tested as trypsin-3 inhibitors are not yet available. However, we did show that PAR<sub>2</sub> was present on human submucosal neurons and was internalised following exposure to trypsin-3 (figure 8). This clearly suggests that PAR<sub>2</sub> can be activated in human submucosal neurons, and that trypsin-3 is a potential endogenous agonist of PAR<sub>2</sub> on this cell type in humans. Previous reports have demonstrated that PAR<sub>2</sub>-activating peptides induced low Ca<sup>2+</sup> signals in human submucosal neurons, leading the authors to conclude that PAR<sub>2</sub> was minimally activated in human submucosal neurons.<sup>25</sup> However, recent studies have highlighted the complex pharmacology of PARs and in particular the fact that these receptors can be cleaved at multiple sites, triggering different intracellular signalling pathways.<sup>13 14 26</sup> Canonical PAR<sub>2</sub> activation leading to β-arrestin-dependent receptor internalisation has been well documented.<sup>14</sup> In the present study, we provide evidence that such signalling occurs in human submucosal neurons in response

to trypsin-3 exposure. We also report that other PARs (PAR<sub>1</sub> and PAR<sub>4</sub>) are not implicated in trypsin-3-induced signalling to mouse sensory neurons or human submucosal neurons, at least on the amplitude of the response of neurons to trypsin-3 (see online supplementary figure S3). Interestingly, the data generated in PAR<sub>2</sub>-deficient mice demonstrated the implication of PAR<sub>2</sub>, but trypsin-3-induced visceral hypersensitivity was not fully inhibited in PAR<sub>2</sub>-deficient mice (figure 7C), suggesting that other mechanisms than PAR<sub>2</sub> are involved. One possible explanation could be a PAR<sub>2</sub>-independent effect of trypsin-3 on barrier function. This effect could either be direct: trypsin-3 inducing the cleavage of tight junction proteins, or indirect, trypsin-3 degrading the endogenous protease inhibitors, which maintain proteolytic homeostasis and barrier function. In-depth analysis will be necessary to completely decipher trypsin-3 mechanisms of action on visceral hypersensitivity.

Our data also demonstrate increased expression of trypsin-3 in rats with cortagine-induced visceral hypersensitivity



**Figure 7** Colorectal administration of trypsin-3 induces visceral hypersensitivity. (A) Kinetic visceromotor response (VMR) to intracolonic administration of trypsin-3 (10 U/mouse) 1, 3, 6 and 9 hours after its administration. (B) Visceromotor response to intracolonic administration of trypsin-3 (0.1, 1 or 10 U/mouse) or vehicle, 3 hours after intracolonic administration in wild-type or  $PAR_2^{-/-}$  mice (C). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM and were analysed by two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post-test ( $n=10$  per group). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  and \*\*\* $p<0.001$ .



**Figure 8** Trypsin-3 causes internalisation of  $PAR_2$  in human submucosal neurons. Representative images showing that the expression of  $PAR_2$  in human submucosal neurons changes in the presence of trypsin-3 (10 nM). Upper panel shows the clustered staining of  $PAR_2$  (arrowheads, red) on the plasma membrane of submucosal neurons (asterisks, NF200, green). Trypsin-3 (2 hours) caused internalisation of  $PAR_2$  (red) inside the neuron (asterisk, NF200, green).  $PAR_2$  staining appeared diffuse or clustered (arrowheads) inside the neuron. Pre-incubation with GB83 (10  $\mu$ M, 30 min before trypsin-3) inhibited the internalisation of  $PAR_2$ , which was expressed on the plasma membrane (arrowheads, red) of neurons (asterisks, NF200, green). Right panels show merged images. Scale bars: 20  $\mu$ m.



(figure 4E) and show that intracolonic administration of trypsin-3 recapitulates visceral hypersensitivity (figure 7). In these studies, we used a barrier breaker to allow trypsin-3 access to the *lamina propria*, recreating the postulated in vivo conditions, where trypsin-3 signals from the basolateral aspect of epithelial cells. This hyperalgesic effect of trypsin-3 was observed at concentrations as low as 1 U/mouse. This activity is comparable to that detected in supernatants of patients with IBS,<sup>3</sup> and in supernatants of LPS-treated intestinal epithelial cells. Together, these data suggest that epithelial trypsin-3 basolateral release could well be sufficient to activate neurons, and participates to visceral hypersensitivity symptoms. Another possible pathway for trypsin-3 to participate to visceral hypersensitivity is by affecting barrier function. Indeed, our results demonstrated that trypsin-3 basolateral exposure to intestinal epithelial cells leads to an increased permeability and a decreased expression and organisation or tight junction proteins (figure 5). At this point, it is impossible to determine the relative contribution of trypsin-3-induced increased permeability and its action on neuron signalling in the genesis of hypersensitivity symptoms. It might well be that both participate to generate visceral hypersensitivity, which could highlight trypsin-3 as a relevant target for the treatment of IBS.

In summary, these results point to colonocytes as a novel source of proteases that activate nociceptive and enteric nerves in patients with IBS and that participate to barrier dysfunction. We reveal that epithelial protease regulation might have profound implications in IBS, particularly when considering signalling from the lumen. Conceptually, most models in IBS have focused on capacity of the epithelium to release serotonin and on its role in barrier function. Here, we demonstrate that proteolytic homeostasis in intestinal epithelium is also a major signalling pathway in IBS and that luminal stimuli may be one important trigger leading to mucosal proteolytic changes. Thus, epithelial trypsin-3 may be a potential new target for IBS therapeutic intervention.

#### Author affiliations

<sup>1</sup>IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, Toulouse, France

<sup>2</sup>Laboratory for Enteric Neuroscience (LENS), TARGID, University of Leuven, Leuven, Belgium

<sup>3</sup>Gastrointestinal Diseases Research Unit, General Hospital, Queen's University School of Medicine, Kingston, Ontario, Canada

<sup>4</sup>Oppenheimer Family Center for Neurobiology of Stress and Resilience and CURE: Digestive Diseases Research Center, Vatche and Tamar Manoukian Division of Digestive Diseases, UCLA David Geffen School of Medicine, Los Angeles, California, USA

<sup>5</sup>Inserm, UMR913, Nantes, France

<sup>6</sup>Nantes University, Nantes, France

<sup>7</sup>Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, IMAD, CHU Nantes, Hôpital Hôtel-Dieu, Nantes, France

<sup>8</sup>Department of Internal Medicine and Digestive Diseases, Pole Digestif, CHU Toulouse, Toulouse, France

<sup>9</sup>Department of Physiology and Pharmacology, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada

**Acknowledgements** The authors thank the Image Core Facility of the CPTP, Toulouse-Purpan, headed by Sophie Allart, and the ANINFIMIP EquipEx facility headed by Professor E Oswald, and supported by the French government through the Investments for the future programme (ANR-11-EQPX-0003). We also thank Dr Eric Espinosa (CPTP, INSERM U1043, Toulouse, France) for the kind donation of human primary mast cells and Ms Muriel Quaranta (IRSD, INSERM U1220, Toulouse, France) for the isolation of human colonic crypts. The authors are also thankful to Nabila Moussaoui and Mandy Biraud for providing tissues from hypersensitive rats, and to Tony Durant for help with the patient's samples.

**Contributors** CR-F, AD-S, CC, CL, JOJ, NC and J-PM have acquired data, have performed statistical analysis and have participated to manuscript drafting. PVB, MN, EC, SK, GP, DB, YT, ML, SV and LA have provided technical and/or material support. SV, CD and NV have participated to study concept and design, analysis and

interpretation of data, drafting of the manuscript. CD and NV have supervised the study and have obtained funding.

**Funding** This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (R12177BB to NV), the Region Midi-Pyrénées (to CRF), the European Research Council (ERC-2012-StG-20111109) (to NV). The Toulouse Hospital for the COLIC project CC is a postdoctoral fellow of the Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek (FWO, Belgium). National Institutes of Health (NIH) grants DK088937 (to ML), NIH P30 DK41301 (models of GI function and disease core), NIH R01 DK57238 and NIH P50 DK064539 (both to YT) were also supporting parts of this study.

**Competing interests** None declared.

**Patient consent** Obtained.

**Ethics approval** French human ethics committee, Canada human ethics committee.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

**Open Access** This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

#### REFERENCES

- 1 Sperber AD, Dumitrascu D, Fukudo S, *et al*. The global prevalence of IBS in adults remains elusive due to the heterogeneity of studies: a Rome Foundation working team literature review. *Gut* 2016. doi: 10.1136/gutjnl-2015-311240. [Epub ahead of print 27 Jan 2016].
- 2 Buhner S, Li Q, Vignali S, *et al*. Activation of human enteric neurons by supernatants of colonic biopsy specimens from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2009;137:1425–34.
- 3 Cenac N, Bautzova T, Le Faouder P, *et al*. Quantification and potential functions of endogenous agonists of transient receptor potential channels in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2015;149:433–44.e7.
- 4 Valdez-Morales EE, Overington J, Guerrero-Alba R, *et al*. Sensitization of peripheral sensory nerves by mediators from colonic biopsies of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome patients: a role for PAR2. *Am J Gastroenterol* 2013;108:1634–43.
- 5 Hyun E, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, *et al*. Protease-activated receptor-2 activation: a major actor in intestinal inflammation. *Gut* 2008;57:1222–9.
- 6 Moussaoui N, Larauche M, Biraud M, *et al*. Limited nesting stress alters maternal behavior and in vivo intestinal permeability in male wistar pup rats. *PLoS ONE* 2016;11:e0155037.
- 7 Larauche M, Mulak A, Kim YS, *et al*. Visceral analgesia induced by acute and repeated water avoidance stress in rats: sex difference in opioid involvement. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:1031–e547.
- 8 Larauche M, Gourcerol G, Wang L, *et al*. Cortagine, a CRF1 agonist, induces stress-like alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;297:G215–27.
- 9 Cenac N, Altier C, Motta JP, *et al*. Potentiation of TRPV4 signalling by histamine and serotonin: an important mechanism for visceral hypersensitivity. *Gut* 2010;59:481–8.
- 10 Cirillo C, Sarnelli G, Turco F, *et al*. Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglial cells and induces autocrine nitric oxide production. *Neurogastroenterol Motil* 2011;23:e372–82.
- 11 Grundmann D, Klotz M, Rabe H, *et al*. Isolation of high-purity myenteric plexus from adult human and mouse gastrointestinal tract. *Sci Rep* 2015;5:9226.
- 12 Sarnelli G, Vanden Berghe P, Raeymaekers P, *et al*. Inhibitory effects of galanin on evoked [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> responses in cultured myenteric neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G1009–14.
- 13 Oikonomopoulou K, Hansen KK, Saifeddine M, *et al*. Proteinase-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs) by kallikreins and more. *Biol Chem* 2006;387:677–85.
- 14 Ramachandran R, Noorbakhsh F, Defea K, *et al*. Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:69–86.
- 15 Chin AC, Lee WY, Nusrat A, *et al*. Neutrophil-mediated activation of epithelial protease-activated receptors-1 and -2 regulates barrier function and trans epithelial migration. *J Immunol* 2008;181:5702–10.
- 16 Motta JP, Bermudez-Humaran LG, Deraison C, *et al*. Food-grade bacteria expressing elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis. *Sci Transl Med* 2012;4:158ra44.
- 17 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402–8.
- 18 Hyun E, Ramachandran R, Cenac N, *et al*. Insulin modulates protease-activated receptor 2 signaling: implications for the innate immune response. *J Immunol* 2010;184:2702–9.

**Neurogastroenterology**

- 19 Tooth D, Garsed K, Singh G, *et al.* Characterisation of faecal protease activity in irritable bowel syndrome with diarrhoea: origin and effect of gut transit. *Gut* 2014;63:753–60.
- 20 Kerckhoffs AP, Ter Linde JJ, Akkermans LM, *et al.* Trypsinogen IV, serotonin transporter transcript levels and serotonin content are increased in small intestine of irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol Motil* 2008;20:900–7.
- 21 Alloy AP, Kayode O, Wang R, *et al.* Mesotrypsin has evolved four unique residues to cleave trypsin inhibitors as substrates. *J Biol Chem* 2015;290:21523–35.
- 22 Pendlebury D, Wang R, Henin RD, *et al.* Sequence and conformational specificity in substrate recognition: several human Kunitz protease inhibitor domains are specific substrates of mesotrypsin. *J Biol Chem* 2014;289:32783–97.
- 23 Knecht W, Cottrell GS, Amadesi S, *et al.* Trypsin IV or mesotrypsin and p23 cleave protease-activated receptors 1 and 2 to induce inflammation and hyperalgesia. *J Biol Chem* 2007;282:26089–100.
- 24 Ibeakanma C, Ochoa-Cortes F, Miranda-Morales M, *et al.* Brain-gut interactions increase peripheral nociceptive signaling in mice with postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011;141:2098–108.e5.
- 25 Mueller K, Michel K, Krueger D, *et al.* Activity of protease-activated receptors in the human submucous plexus. *Gastroenterology* 2011;141:2088–97.e1.
- 26 Vergnolle N. Clinical relevance of proteinase activated receptors (pars) in the gut. *Gut* 2005;54:867–74.



**Supplementary Table 1: A.** Characteristics and outcomes of patients from which biopsies were collected. Values are number of patients with characteristic unless otherwise indicated. N, number ; F, female ; M, male. Abdominal pain intensity was scored according to: 0: absent 1: no impact on daily life 2: reducing some daily activities 3: greatly reducing daily activities 4: patient confined to bed. Pain frequency was classified as: 0: absent 1: rare (1day/week) 2: occasional (2-3 days/week) 3: frequent (4-6 days/week) 4: very frequent (7days/week). **B.** Characteristics of control patients sampled during resection of colon cancer, tissue samples were taken from non-pathological margins and were used to assess enteric neuron activity.

**A**

	<b>Control patients</b>	<b>IBS patients</b>		
		<b>IBS-D</b>	<b>IBS-C</b>	<b>IBS-M</b>
<b>Number (F/M)</b>	27 (9/18)	30 (22/8)	23 (19/4)	19 (14/5)
<b>Age (range)</b>	54 (25/74)	53 (18/75)	50 (25/70)	47 (24/74)
<b>Pain intensity (range)</b>	0 (0/0)	2.1 (1/3) N.D: 12	1.9 (1/3) N.D: 5	1.9 (0/3) N.D:8
<b>Pain frequency (range)</b>	0 (0/0)	2.6 (1/4) N.D: 12	2.8 (1/4) N.D: 5	2.4 (0/4) N.D: 8

**B**

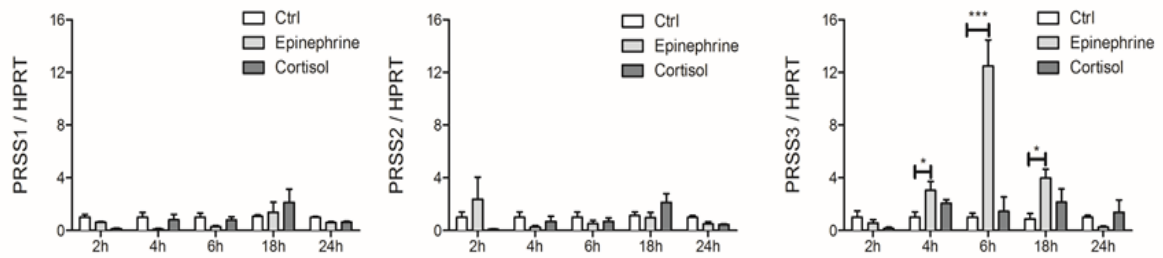
<b>Control patients</b>	
<b>Number (F/H)</b>	15 (7/8)
<b>Age (range)</b>	53 (33/66)

**Supplementary Table 2: Sequences of oligonucleotides used for RT-PCR experiments.** The human gene symbols, oligonucleotide sequences, amplicon size in base pairs (bp), individual or multiple splice variants targeted by each primer pair and respective NCBI accession numbers are indicated for each gene: *PRSS1*, protease serine 1 (cationic trypsin); *PRSS2*, protease serine 2 (anionic trypsin); *PRSS3*, protease serine 3, transcript variants 1 (trypsinogen IV), 2 (mesotrypsin), 3 (unknown protein) and 4 (trypsinogen 5); *TPSAB1*, tryptase alpha/beta-1; *TPSB2*, tryptase beta-2; *TPSD1*, tryptase delta-1; *HPRT1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1.

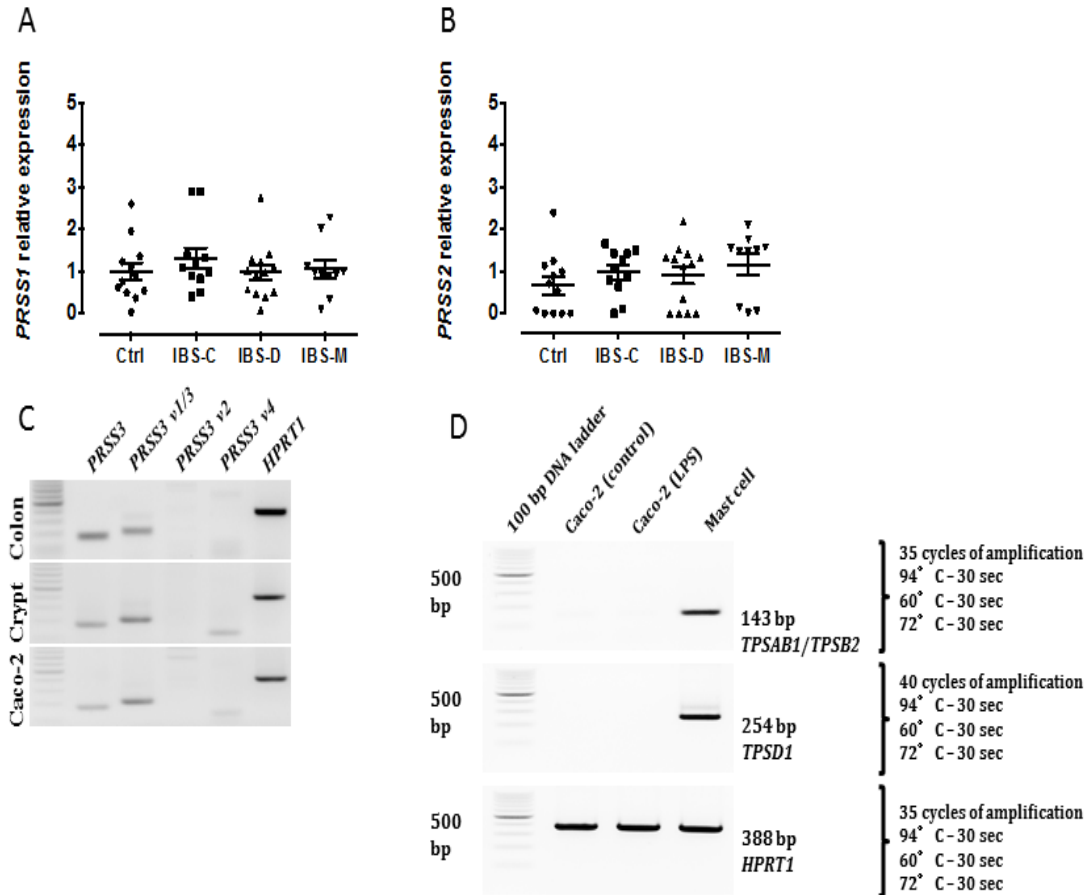
Transcript	Sequences (5'-3')	Amplicon (bp)	Splice variant	Accession number
<i>PRSS1</i>	CCACCCCAATACGACAGGAAG GCGCCAGAGCTCGCAGT	171		NM_002769
<i>PRSS2</i>	CCAAATACAACAGCCGG AGTCGGCACCAGAACTCAGA	171	1	NM_001303414
			2	NM_002770
<i>PRSS3</i>	ACCCTAAATACAACAGGGAC AGCACCAAAGCTCAGAGT	170	1	NM_007343
			2	NM_002771
			3	NM_001197097
			4	NM_001197098
<i>PRSS3_v1/3</i>	CTTCTGGGTGGACGCACTT ATACCACCCACTGTTGCTG	202 330	1	NM_007343
			3	NM_001197097
<i>PRSS3_v2</i>	ATCCTTGCCTTTGTGGGAGC CTCCAGGCCTGTTCTTCCAG	667	2	NM_002771
<i>PRSS3_v4</i>	TTCCGACTCGCATGGGACC GCCAGAATTCAGGGACACCT	122	4	NM_001197098
<i>TPSAB1/TPSB2</i>	CTGGCATCTACACCCGTG TGGGTAGGAAGCAGTGGT	143		NM_003294
				NM_024164
<i>TPSD1</i>	TGCACCCACAGTTCTACATC GTGATATTCCGCGTTGCAAAG	254		NM_012217
<i>HPRT1</i>	TGGGAGGCCATCACATTGT TCCAGCAGGTCAGCAAAGAA	70		NM_000194
<i>HPRT1</i>	AGGACTGAACGTCTTGCTCG ATCCAACACTTCGTGGGGTC	388		NM_000194

## Supplementary figures:

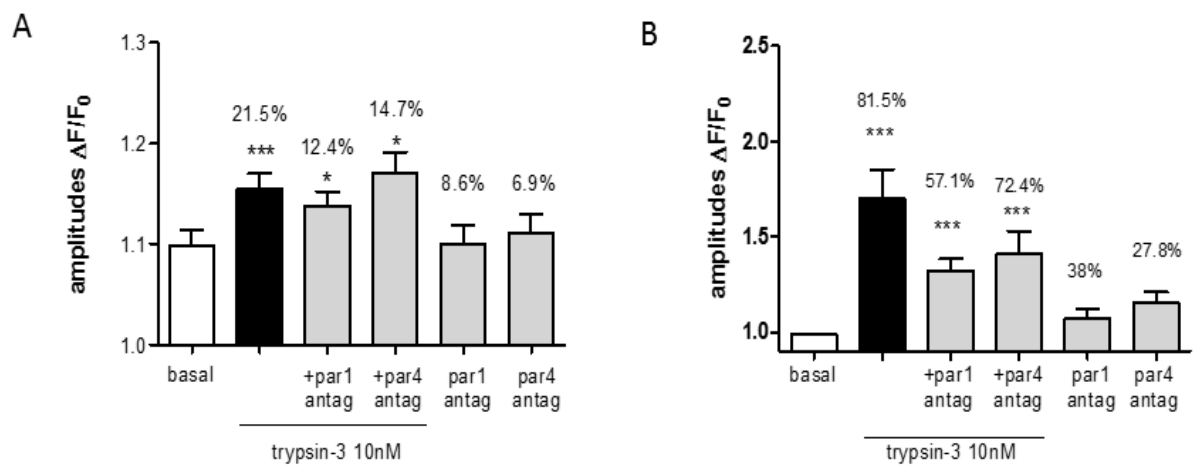
**Supplementary Figure 1:** Kinetic expression of the Trypsin genes PRSS1, PRSS2 and PRSS3 alternative splice variants in intestinal epithelial cells (Caco-2) at different times after their exposure to Epinephrine or to Cortisol. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.



**Supplementary Figure 2:** Expression of the Trypsin genes PRSS1, PRSS2 and PRSS3 alternative splice variants, and the Trypsin genes TPSAB1, TPSB2, TPSD1. Relative gene expression of **A.** PRSS1 (cationic trypsin: Trypsin-1 precursor) and **B.** PRSS2 (anionic trypsin: Trypsin-2 precursor) in colonic biopsies from control and IBS patients. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM and were compared using Student's *t*-test. **C.** Analytical agarose-gel electrophoresis of RT-PCR products performed with RNA extracted from human colonic biopsies (control patient), isolated colonic crypts or Caco2 cells. Amplicons were amplified with oligonucleotides for total PRSS3 (170 bp), or the alternative splice variants 1 (coding for Trypsinogen IV; 202 bp), 2 (coding for Mesotrypsinogen; 667 bp), 3 (330 bp) and 4 (122 bp) and HPRT1 (388 bp). **D.** Representative agarose-gel electrophoresis of RT-PCR products performed on RNA extracted from Caco-2 cells stimulated or not with LPS, or primary mast cells derived from human CD34<sup>+</sup> precursor cells. The amplicon in the top panel was amplified with oligonucleotides common for the genes coding for trypsinase- $\beta$ 1 and trypsinase- $\beta$ 2 (TPSAB1 and TPSB2, respectively). The amplicon in the middle panel was amplified with oligonucleotides specific for trypsinase- $\delta$ 1 (TPSD1). Amplicons in the bottom panel were amplified with oligonucleotides specific for the house-keeping gene HPRT1.



**Supplementary Figure 3. Trypsin-3-evoked calcium signals in mouse nociceptive DRG neurons and human submucosal neurons are PAR1 and PAR4 independent.** **A.** Average amplitude of  $[Ca^{2+}]_i$  rises and percentage of responding neurons to Trypsin-3 (10 nM) exposure in mouse nociceptive DRG neurons in the presence or absence of the PAR1 (SCH79797) or the PAR4 (ML-354) specific antagonists. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM and were analyzed by One-Way ANOVA followed by Kruskal Wallis's post-test, (\*\*\*) and \* different from basal for  $p < 0.001$ ,  $P < 0.05$  respectively. **B.** Average amplitude of  $[Ca^{2+}]_i$  rises and percentage of responding neurons to Trypsin-3 (10 nM) exposure in human submucosal neurons in the presence or absence of the PAR1 (SCH79797) or the PAR4 (ML-354) specific antagonists. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM and were analyzed by One-Way ANOVA followed by Kruskal Wallis's post-test, (n=3 subjects per group), (\*\*\*) $p < 0.001$ .





## PARTIE 1 :

# La trypsine-3 épithéliale : expression et fonction dans le SCI et les MICI

### Contexte scientifique :

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) et le Syndrome du Côlon Irritable (SCI) sont des pathologies qui affectent de plus en plus de patients (Lovell and Ford, 2012; Molodecky et al., 2012). Ce sont des pathologies aux composantes différentes : cycles de poussées inflammatoires pour les MICI et de troubles fonctionnels pour le SCI, Toutefois, elles possèdent certaines composantes physiopathologiques en communs. Ces 2 pathologies présentent des troubles de la motricité intestinale (de Souza et al., 2016) (Enck et al., 2016), une augmentation de la perméabilité épithéliale (Hering et al., 2012; Piche, 2014), des douleurs abdominales (Bielefeldt et al., 2009)(Ludidi et al., 2014), une dysbiose (Dolan and Chang, 2017; Rajilić-Stojanović et al., 2015), une inflammation de la muqueuse épithéliale (de bas grade chez les patients atteints de SCI et massive et chronique pour les patients atteints de MICI) (Huibregtse et al., 2007; Macsharry et al., 2008). De plus, de nombreux médiateurs comme les cytokines (Bashashati et al., 2014b; Neurath, 2014), les lipides (Kiss et al., 2013; Miranda-Bautista et al., 2015) ou encore les protéases (Vergnolle 2016) ont un rôle dans ces pathologies. L'activité protéolytique au sein de la muqueuse intestinale des patients atteints de MICI et de SCI, notamment l'activité trypsique, est augmentée par rapport à celle de patients contrôles (Cenac et al., 2007).

Les principales protéases possédant une activité trypsin-like sont les trypsines et les tryptases. Les tryptases sont sécrétées en majorité par les mastocytes (Hagel et al., 2013). Les tryptases sont classées en 2 groupes: les tryptases liées aux membranes ( $\gamma$ ) et les tryptase solubles ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$ ) (Pallaoro et al., 1999). La tryptase soluble  $\beta$  est impliquée dans les pathologies inflammatoires (Caughey, 2007). Il existe 3 formes de trypsine. Les trypsines cationiques et anioniques sont des protéases pancréatiques qui participent activement à la digestion. La trypsine-3 est une forme de trypsine dont les fonctions sont encore peu connues (Salamesh et al., 2013). L'expression de l'ARNm de

cette protéase est augmentée dans l'intestin des patients atteints de SCI (Kerckhoffs et al., 2008).

Cependant, la source de ces protéases trypsin-like, le type d'enzymes impliqués ainsi que leur mécanisme d'action permettant la modulation des symptômes des patients atteints de MICI et de SCI restaient indéterminés.

L'objectif de ce premier travail de thèse a été de déterminer dans les surnageants de tissus de patients atteints de SCI ou de MICI, la source de cette activité trypsique, la nature de la ou les protéases présentes et leur rôle potentiel dans l'augmentation de la perméabilité, dans l'activation neuronale ainsi que dans la douleur viscérale.

**Article:** Epithelial expression and function of Trypsin-3 in Irritable Bowel Syndrome



## Résultats complémentaires

L'activité trypsique épithéliale des patients atteints de MICI est augmentée et plus particulièrement la trypsine-3 chez les patients atteints de RCH

### Introduction

Chez les patients atteints de SCI, l'activité trypsique sécrétée est nettement augmentée grâce à la production de trypsine-3 par la cellule épithéliale à son pôle basal. L'activité protéolytique de la trypsine-3 active les neurones sensitifs et sous-muqueux et pourrait ainsi participer aux symptômes de douleurs des patients atteints de SCI. Notre étude précédente montre également que la trypsine-3 sécrétée par la cellule épithéliale intestinale augmente la perméabilité de la barrière intestinale. Douleur et augmentation de perméabilité sont des symptômes associés non seulement au SCI, mais également aux MICI. L'implication de la trypsine-3 dans les voies physiopathologiques des MICI se pose donc.

En effet, chez les patients atteints de MICI, l'activité trypsique produite par la muqueuse colique est significativement augmentée par rapport à celle de patients contrôles (Cenac N et al., 2007). *In vitro*, nous avons montré que des motifs bactériens (une stimulation avec du LPS) induisent la sur-expression de trypsine-3 par la cellule épithéliale. Chez les patients atteints de MICI, le microbiote est altéré, la barrière de mucus et la barrière épithéliale sont rompues favorisant le contact des antigènes bactériens avec la cellule épithéliale (de Souza and Fiocchi, 2016). Dans le contexte inflammatoire des MICI, nous sommes donc posés la question de l'origine de l'activité trypsique précédemment détectée (Cenac et al., 2007) et celle de la présence de trypsine-3.

### Matériels et méthode

#### *Patients*

Les tissus coliques humains ont été obtenus en collaboration avec le Centre Hospitalier de Toulouse Purpan. Ces biopsies ont été collectées lors de coloscopies. Elles proviennent de zones macroscopiquement inflammatoires pour les patients atteints de MICI. Des consentements écrits des patients ont été obtenus pour cette étude. Le

protocole de recherche a été approuvé par le comité d'éthique (NCT01990716). Les biopsies ont été cryoconservées en OCT à -186°C.

#### *Zymographie in situ de l'activité trypsique*

Le protocole est identique à celui présenté dans le manuscrit Rolland-Fourcade et al., Gut 2017.

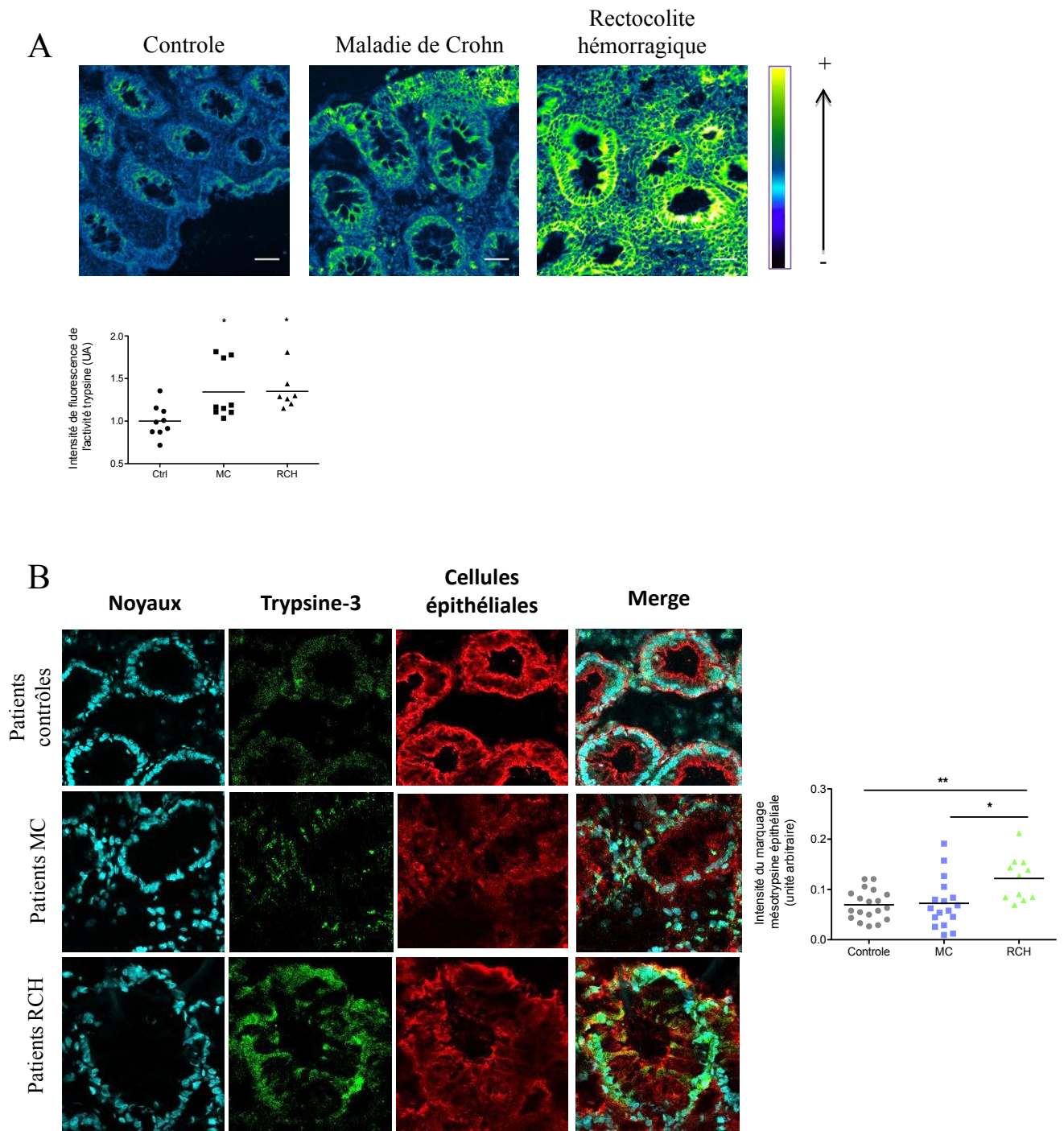
#### *Immunomarquage de la trypsine-3*

Le protocole est identique à celui présenté dans le manuscrit Rolland-Fourcade et al., Gut 2017.

### **Résultats**

La mise en évidence de l'activité trypsique par zymographie *in situ* nous a permis d'observer une activité trypsique significativement augmentée au sein de la muqueuse chez les patients atteints de MC et de RCH. Cette activité trypsique est principalement produite par la cellule épithéliale (Figure 1A).

Le marquage de la trypsine-3 sur des coupes de biopsies coliques de patients atteints de MC et de RCH révèle que la trypsine-3 est présente dans l'épithélium de ces patients et que son niveau d'expression est doublée chez les patients atteints de RCH par rapport aux patients atteints de MC et aux patients contrôles (Figure 1B). Sur le nombre d'échantillons dont nous disposions, l'analyse statistique n'a pas relevé de différence significative du niveau d'expression de la trypsine-3 entre les tissus de patients atteints de MC et les tissus contrôles (Figure 1B).



**Figure 1: Les cellules épithéliales intestinales coliques de patients atteints de MICI produisent de la Trypsine-3.**

Images représentatives de coupes histologiques de côlon de patients contrôles et de patients atteints de MICI. Activité trypsique détectée par zymographie *in situ* (A), et marquage en immunofluorescence de la Trypsine-3 (vert), des noyaux (bleu) et des cellules épithéliales (rouge) (B).

## ***Discussion***

La muqueuse colique des patients atteints de MICI présente une activité trypsique augmentée par rapport à celle de patients contrôles. Cette activité provient essentiellement des cellules de l'épithélium intestinal. Chez ces mêmes patients, la cellule épithéliale produit aussi une forte quantité d'élastase épithéliale (Motta et al., 2012). L'augmentation de l'activité élastolytique est similaire chez les patients atteints de MC et de RCH, ainsi que dans les zones inflammatoires et dans les zones non inflammatoires. Nos résultats montrent que l'activité trypsique est augmentée de la même manière chez les patients atteints de MC ou de RCH au niveau des zones inflammatoires. Cela pourrait suggérer un mécanisme d'induction de cette activité protéolytique (élastase et trypsine) similaire. L'étude de zones non inflammatoires issues du côlon de patients atteints de MC et de RCH nous permettrait d'étayer cette hypothèse.

De plus, les résultats du marquage de la trypsine-3 montrent une augmentation de cette protéase uniquement chez les patients atteints de RCH en comparaison aux patients contrôles et à ceux atteints de MC. Ces données sont en accord avec d'autres résultats générés au laboratoire ayant analysé les protéases à sérine actives présentes dans l'exsudat de biopsies de patients atteints de MICI. Cette approche s'est effectuée grâce à l'utilisation d'ABP (Activity-Based Probe), un outil qui permet de d'isoler spécifiquement les protéases actives, puis une analyse en spectroscopie de masse permet d'identifier les protéases actives qui se sont liées aux ABPs. Ces expériences ont montré que la trypsine-3 sécrétée par les biopsies coliques de patients atteints de RCH est significativement augmentée par rapport aux patients contrôles et à ceux atteints de MC.

L'activité trypsique épithéliale est similaire chez les patients atteints de MC et de RCH et dans les 2 cas significativement augmentée par rapport à des tissus contrôles. Dans le cas de la RCH, l'augmentation significative de la présence de trypsine-3 peut faire penser que c'est cette dernière qui est responsable de l'activité trypsique augmentée, mais dans le cas de la MC, la cellule épithéliale pourrait donc être capable de produire un autre type de protéases avec une activité « trypsin-like ». Le substrat que nous avons utilisé pour mesurer l'activité trypsique peut aussi être clivée par les tryptases et par la thrombine. Ces 2 protéases ne sont pas décrites comme étant produites et sécrétées par les cellules de l'épithélium intestinal. Les tryptases sont en majorité produites par les mastocytes. Le nombre de mastocytes est augmenté dans le côlon des patients atteints

de MC et de RCH (Vivinus-Nébot et al., 2014) et plus particulièrement chez les patients atteints de MC lors d'une phase active de la maladie (Andoh et al., 2006). Les tryptases sont capables de dégrader les jonctions adhérentes des cellules de l'épithélium favorisant ainsi une augmentation de la perméabilité épithéliale (Wilcz-Villega et al., 2013). L'activité tryptique révélée dans la muqueuse colique des patients atteints de MC pourrait donc être due à des mastocytes infiltrés dans la *lamina propria*, très proche des cellules de l'épithélium. Cette activité tryptase relarguée pourrait être dirigée contre les jonctions épithéliales et participer dans la maladie de Crohn, aux défauts de barrière de l'épithélium.

Cette augmentation de trypsine-3 spécifiquement dans l'épithélium de patients atteints de RCH pourrait être due à une différence de traitement entre ces 2 types de patients. Le traitement avec du 5-ASA (5-aminosalicylates) est prescrit à tous les patients atteints de RCH, car il est efficace pour induire et maintenir les phases de rémission ces patients (Bernstein, 2014). Ce traitement inhibe les voies du métabolisme de l'acide arachidonique, protège du stress oxydatif et inhibe le facteur de transcription NFkB. Les mécanismes inducteurs de l'expression de la trypsine-3 sont encore inconnus. Un des acteurs de la voie du métabolisme de l'acide arachidonique, du stress oxydatif ou encore de l'activation de NFkB pourrait avoir un rôle de frein sur l'expression de cette trypsine, ainsi sa diminution par le traitement au 5-ASA favoriserait l'expression de la trypsine-3. Ainsi, en collaboration avec les cliniciens, nous corrélons les traitements reçus par les différents patients atteints de RCH et de MC avec nos données d'expression de trypsine-3.

L'augmentation de l'activité tryptique pourrait avoir des rôles multiples sur son environnement et participer activement aux symptômes des patients atteints de MICI.

La barrière épithéliale intestinale des patients atteints de MICI est rompue permettant un passage accru des composés luminaux dans la muqueuse intestinale (Lee, 2015). C'est un facteur clé de la physiopathologie des MICI. Cette augmentation de la perméabilité est due à de nombreux facteurs comme les cytokines (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ ) (Barksby et al., 2007; Bruewer et al., 2005; Schulzke et al., 2006) ou encore les protéases (Van Spaendonk et al., 2017). Les trypsines et notamment la trypsine-3, sont capables d'activer PAR2. Ce récepteur est responsable de l'ouverture des jonctions serrées (Cenac et al., 2004) induisant une forte augmentation de la perméabilité paracellulaire. Notre étude a montré que la trypsine-3 augmente la perméabilité épithéliale de manière PAR2

dépendante. De plus, certaines protéases comme les élastases ou les tryptases sont capables de cliver directement les protéines des jonctions ou encore les protéines de mucus (Wilcz-Villega et al., 2013). Ce rôle particulier n'a jamais été décrit pour les trypsines. Il serait intéressant d'étudier si la trypsine-3 pourrait avoir un rôle sur l'ouverture des jonctions cellulaires de manière indépendante de l'activation de PAR2.

De plus, les patients atteints de MICI présentent une inflammation massive de la muqueuse intestinale avec une forte infiltration granulocytaire et lymphocytaire, ainsi qu'une augmentation des cytokines lumineales. L'activation des récepteurs PAR1 et PAR2 a d'importants effets pro-inflammatoires (Cader and Kaser, 2013; Wallace et al., 2014). PAR2 favorise le recrutement des cellules immunitaires, la sécrétion d'IL1 $\beta$ , de CXCL8 et de TNF $\alpha$ , favorise la diapédèse des leucocytes (Cenac et al., 2002; Hyun et al., 2008). Le récepteur PAR1 augmente la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ ) par les monocytes (Vergnolle et al., 2006). De plus, la littérature montre que la trypsine-3 active PAR1 (Wang et al., 2006).

L'activité tryptique, via l'activation des récepteurs PAR1 et PAR2 pourrait permettre le maintien l'inflammation mucosale via l'augmentation de la perméabilité intestinale et l'activation du système immunitaire.

Les patients atteints de MICI peuvent présenter des douleurs abdominales (40 à 50% des cas). Ces douleurs peuvent être causées directement par les cytokines pro-inflammatoires relarguées lors de l'inflammation de la muqueuse intestinale qui peuvent sensibiliser les afférences primaires (Bielefeldt et al., 2002). Les protéases ont aussi un rôle important dans la douleur. L'activation du récepteur PAR2 entraîne une hyperalgésie (Fiorucci et al., 2001). L'augmentation d'activité tryptique épithéliale détectée chez les patients atteints de MICI pourrait donc participer aux symptômes de douleur chez les patients. De plus, notre précédente étude montre que la Trypsine-3 épithéliale est capable d'activer les neurones du plexus sous-muqueux et les neurones sensitifs murins suggérant un rôle de cette trypsine dans la douleur associée aux patients atteints de RCH.

L'épithélium semble donc jouer un rôle prépondérant dans l'augmentation de l'activité protéolytique de la muqueuse colique des patients atteints de MICI et plus généralement dans les symptômes associés à cette pathologie.

## Partie 2 :

# L'ELAFINE : molécule anti-inflammatoire au rôle pléiotropique

### Contexte scientifique :

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des pathologies multifactorielles dont l'incidence est grandissante. Elles se caractérisent par une inflammation chronique du tractus intestinal impliquant de nombreux acteurs cellulaires comme le microbiote, les cellules de l'épithélium ou encore les cellules de l'immunité. Les cellules épithéliales produisent de nombreux médiateurs inflammatoires notamment des protéases. Les protéases participent aux symptômes des patients atteints de MICI. Elles peuvent activer les cellules immunitaires, augmenter la perméabilité épithéliale, et induire de la douleur. En condition physiologique, l'activité de ces protéases est hautement régulée. Cependant, dans certaines pathologies, comme les MICI, l'expression d'inhibiteur d'élastase comme L'Elafine peut être fortement diminuée. Notre laboratoire a montré que l'activité élastolytique épithéliale était dérégulée chez les patients atteints de MICI (Motta et al 2012).

Les traitements pour soulager les patients atteints de MICI sont uniquement symptomatiques. Ils sont coûteux et de nombreux patients sont résistants à toutes formes de traitements. Il est donc nécessaire d'étudier de nouvelles molécules. L'Elafine, un inhibiteur d'élastase dont l'expression est diminuée chez les patients atteints de MICI, a d'importantes propriétés anti-inflammatoires. Elle possède des activités antibactériennes, antivirales, et antifongiques. Elle module les cellules de l'immunité (cellules dendritiques, neutrophiles, lymphocytes T). Notre laboratoire a montré qu'un apport exogène d'ELAFINE via une bactérie de l'alimentation, *Lactococcus lactis*, protège les animaux de la colite. Cependant les mécanismes sur lesquels reposent ces propriétés anti-inflammatoires ainsi que les domaines de la protéine impliqués sont encore inconnus. En effet, L'Elafine possède 2 domaines : un premier domaine cémentoïne chargé positivement lui conférant des propriétés antimicrobiennes et un second domaine Elafine responsable de l'activité inhibitrice de protéases.

L'objectif de cette étude est de comprendre quels sont les domaines de L'Elafine impliqués dans ses propriétés anti-inflammatoires et plus généralement comment

L'Elafine protège de la colite. Plus largement, en posant la question du mécanisme d'action de L'Elafine, notre étude s'attache à confirmer ou infirmer le rôle de l'activité élastolytique dans les pathologies inflammatoires de l'intestin.

Les résultats relatifs à cette étude seront présentés sous la forme d'article de recherche ci-après. Cet article devrait être soumis (en langue anglaise) dans les prochains mois.



# La fonction inhibitrice de protéase de L'Elafine est nécessaire à son rôle anti-inflammatoire dans la cellule épithéliale

## Introduction

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) se caractérisent par une inflammation chronique du tractus gastro-intestinal. Les 2 principales formes de ces pathologies sont la maladie de Crohn où l'inflammation touche l'ensemble du tractus digestif de manière discontinue, et la rectocolite hémorragique où l'inflammation progresse de l'anus au caecum de façon continue. Les principaux symptômes sont des diarrhées, fièvre, douleurs abdominales, une importante fatigue et une perte d'appétit (Panaccione et al., 2005). Le traitement de ces pathologies représente un impact médical majeur car les thérapies proposées ne permettent pas une totale rémission. Ils ont un coût très important et de nombreux patients sont ou deviennent résistants (Yu et al., 2008). Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches afin de trouver de nouvelles molécules à visées thérapeutiques.

La physiopathologie des MICI est complexe et multifactorielle (Kaser et al., 2010). Les protéases à sérine sont considérées comme des acteurs majeurs des maladies inflammatoires chroniques. Leur hyperactivité conduit notamment à la sécrétion de cytokines et chimiokines inflammatoires (Vergnolle, 2009, 2016).

Plusieurs études ont mis en évidence une concentration de protéases à sérine augmentée dans les fèces ou dans la muqueuse des patients atteints de MICI (Bustos et al., 1998)(Motta et al., 2012)(Dabek et al., 2009). Notamment, une augmentation d'activité élastolytique a été montrée spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales coliques de ces patients. De plus, la quantité d'Elafine, un inhibiteur d'activité élastolytique est drastiquement diminuée dans l'épithélium (Motta et al., 2012). Il existe donc un déséquilibre de la balance élastolytique dans la muqueuse colique des patients atteints de MICI. Afin de rééquilibrer la balance protéolytique, L'Elafine humaine a été produite directement sur le site inflammatoire, grâce à une bactérie de l'alimentation *Lactococcus lactis* recombinante pour l'expression de cette protéine. Nous avons ainsi pu montrer que, dans plusieurs modèles murins de colite aiguës et chroniques, le gavage quotidien des animaux avec la bactérie recombinante pour L'Elafine protège les souris en réduisant l'inflammation intestinale (Motta et al., 2012). L'Elafine présente un potentiel thérapeutique plus important que l'utilisation

d'autres molécules anti-inflammatoires comme l'IL10 ou le TGF $\beta$ . En effet, L'Elafine produite par *L.lactis* protège mieux des souris de la colite que ces mêmes bactéries recombinantes pour l'IL10 ou le TGF $\beta$  (Bermúdez-Humarán et al., 2015).

De plus, dans un modèle de culture de cellules épithéliales se rapprochant des conditions inflammatoires observées dans les MICI, les bactéries lactiques exprimant L'Elafine, restaurent la fonction de barrière de la monocouche épithéliale et réduisent la sécrétion de chimiokines.

La diversité des modèles (*in vivo* et *in vitro*) dans lesquels les effets protecteurs de L'Elafine ont été mis en évidence suggère donc que L'Elafine peut agir selon différents mécanismes. En effet L'Elafine est une protéine dont au moins 3 fonctions distinctes ont été décrites. C'est un inhibiteur d'élastases, notamment de l'élastase du neutrophile et de la protéinase-3 (Ying and Simon, 2001). L'Elafine inhibe la croissance de différents micro-organismes pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* ou encore *Staphylococcus aureus* (Sallenave, 2002). Cette activité antimicrobienne est probablement due à la présence d'une hélice chargée positivement qui lui confère la capacité de former des pores dans les membranes bactériennes (Sallenave, 2010b). De plus, L'Elafine est aussi capable d'inhiber les facteurs de transcription NF $\kappa$ B et AP-1 en modulant leurs répresseurs (Butler et al., 2006). De nombreuses études montrent que L'Elafine a d'importants effets anti-inflammatoires notamment via la modulation du système immunitaire mais les mécanismes ont peu été étudiés et sont mal définis (Verrier et al., 2012)(Baranger et al., 2008; Bellemare et al., 2010; Motta et al., 2012; Vachon et al., 2002).

Afin de pouvoir considérer la bactérie *L.lactis* ELAFINE comme un traitement possible des MICI, les mécanismes protecteurs de l'inflammation intestinale qu'elle confère doivent être décryptés dans un contexte aussi proche que possible de la pathologie humaine et de ces médiateurs. Pour cela, nous avons généré des mutants de L'Elafine afin d'inhiber 2 de ces fonctions : sa capacité à inhiber l'activité élastolytique grâce à une mutation sur 2 acides aminés situés dans la boucle inhibitrice, et sa fonction antimicrobienne via la mutation de 2 acides aminés chargés positivement au sein du domaine cémentoine afin de rendre celui-ci électriquement neutre.

## Matériels et méthode

### *Génération des mutants de L'Elafine*

Une mutagenèse dirigée a été réalisée pour induire les différentes mutations sur le gène de L'Elafine humaine. Trois mutants ont été générés : un mutant sur le domaine inhibiteur de protéase A62G et M63G, un mutant sur le domaine antimicrobien K44D et K50G et enfin un dernier mutant possédant ces 4 mutations. Les séquences mutées ont ensuite été clonées dans un vecteur pSec sous le contrôle d'un promoteur inductible à la nisine et permettant la sécrétion de la protéine exogène grâce à la présence d'un peptide signal. Ce vecteur possède aussi un gène de sélection par l'antibiotique chloramphénicol. Ces différents plasmides ont été introduits dans la bactéries *Lactococcus lactis* comme décrit précédemment (Motta et al., 2012).

### *Culture des bactéries*

Les bactéries *L.lactis* sont cultivées en milieu M17 supplémenté par 0,5% de glucose ou dans du DMEM Glutamax (Invitrogen), 1% acides animés non essentiel (AANE), 10% sérum de veau fœtal (SVF). Du chloramphénicol (1µg/mL) est ajouté au milieu de culture afin de sélectionner les bactéries transformées. Après leur culture durant la nuit à 30°C, elles sont remises en phase exponentielle de croissance (DO=0,4 - 0,6), prolifèrent pendant 1h puis sont induites pendant 2h avec de la nisine (1ng/mL). La densité optique à 600nm (DO) est mesurée, puis les bactéries sont centrifugées, repris dans un volume adéquat de DMEM pour la co-culture avec les cellules épithéliales afin d'avoir 10<sup>7</sup> CFU par puit. Le surnageant de ces cultures induites pendant 2h est récupéré et filtré (0,22 µm).

Les bactéries *E.coli* LF82 sont cultivées en DMEM, 1% acides animés non essentiels, Rifampicine. Après leur culture durant la nuit, elles sont diluées afin d'être en phase exponentielle de croissance et prolifèrent durant 2h sous agitation. La DO est mesurée, puis les bactéries sont diluées à la concentration de 10<sup>7</sup> CFU/mL. 50µL est déposé sur plaque 96 puits auquel on ajoute 50µL du surnageant de culture de *L.lactis*. La DO est ensuite mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque (Tecan) toutes les 10 minutes pendant 6h.

### *Culture cellulaire*

Des cellules épithéliales intestinales humaines (Caco2) ont été cultivées en DMEM Glutamax, supplémenté avec 10% de SVF, 1% d'AANE et 1% de pénicilline-streptomycine (Invitrogen). Elles sontensemencées à la densité de 250 000 cellules par puit en transwell (Corning, Sigma). Après 21 jours de culture, la thapsigargine (10µg/mL) et/ou les bactéries sont ajoutées sur le pôle apical des cellules à raison de 10<sup>7</sup> CFU par puit dans du milieu contenant du dextran FITC (10µg/mL, 3000kDa, Sigma). Après 2 heures de co-culture, de la gentamycine (1µg/mL) est ajoutée au pôle apical afin d'éviter le développement bactérien. Le milieu basal est récupéré après 24 heures de co-culture et la fluorescence du dextran FITC est mesurée grâce à un lecteur de plaque (Varioskan) afin de connaître la perméabilité paracellulaire.

### *Analyse des transcrits*

Les ARN totaux ont été extraits avec le kit RNA/Protein Kit (Macherey-Nagel, GmbH). Les ARN ont été rétrotranscrits grâce au kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit. La quantité de cDNA a été mesurée avec le kit SYBR Green Master kit (Roche) dans un LightCycler 480 (Roche). Le niveau relatif d'ARNm des gènes cibles a été calculé d'après la méthode des DDCT avec le gène de l'HPRT comme référence.

### *Quantification des protéines*

Les différents échantillons protéiques ont été déposés sur gel polyacrylamide (13%), transférés sur une membrane de nitrocellulose (Life Science) puis incubés avec un anticorps anti-Elafine (1/250, sc-20637) toute la nuit à 4°C. Un anticorps secondaire couplé à la HRP (1/3000, w4018-Promega) a été ajouté puis les membranes ont été révélées par bioluminescence (Chemidoc XRS Bio-Rad).

### *Test d'inhibition d'activité élastolytique*

Les protéines recombinantes des différents mutants de L'Elafine ont été incubées avec l'élastase du neutrophile (5nM, E8140 Sigma) durant 20 minutes à 37°C. L'activité élastase a ensuite été mesurée grâce au clivage d'un substrat spécifique, l'élastine couplée à un fluorochrome (50mM, Invitrogen). La fluorescence est mesurée à 37°C toutes les minutes pendant 30 minutes par un lecteur de plaque (Varioskan).

### *ELISA*

Le dosage d'ELAFINE issu des surnageants de culture des bactéries induites pendant 2h a été réalisé grâce au kit Human Trappin-2/Elafin ELISA Kit (RAB0406, Sigma) suivant les recommandations du fabricant. Les échantillons ont été dilués au 1/50 et au 1/100, déposés sur des plaques pré-coatées et incubés avec des anticorps dirigés contre L'Elafine et biotynilés. La révélation a été réalisée grâce à l'ajout de l'enzyme HRP couplée à la Streptavidine puis d'une solution colorimétrique.

La cytokine CXCL8 a été dosée dans les milieux issus des co-cultures Caco2-bactéries lactiques dans les transwell. Le kit Human IL-8/CXCL8 ELISA kit (Sigma) a été utilisé suivant les recommandations du fabricant. Les plaques ont été préalablement coatées avec des anticorps spécifiques de CXCL8. Les échantillons ont été déposés en duplica et 3 dilutions (1/2, 1/5 et 1/10) ont été réalisées pour chaque condition. Puis ces plaques ont été incubées avec des anticorps dirigés contre CXCL8.

### *Immunofluorescence*

Les cultures issues des transwell ont été fixées en paraformaldéhyde 4% durant 15 minutes puis perméabilisées avec de la glycine 0,1M pendant 10 minutes. Les cellules ont été marquées avec l'anticorps anti-Elafine (1/100, sc-20637) et avec le secondaire correspondant (1/1000, AlexaFluor 488 Molecular Probes). Le noyau a été marqué avec du DAPI (1/5000). Les lames ont été montées avec le milieu de montage Prolong Gold Antifade Reagent (Molecular probe) et observées au microscope confocal (LSM710, Carl Zeiss). Les images obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ.

### *Cytométrie en flux*

Des Caco2 ont étéensemencées à 250 000 cellules par puits en plaque 12 puits. Après 2 jours de culture, elles ont été stimulées par de la thapsigargine (1µg/mL) et ou non, additionnées des bactéries recombinantes pour L'Elafine ou ces mutants. Après 24h de co-culture, les cellules ont été décollées à l'aide de trypsine-EDTA, fixées et perméabilisées. Elles ont été marquées avec un anticorps anti Elafine couplé au FITC (1/100, My Biosource). Les cellules sont ensuite analysées en cytométrie en flux grâce au cytomètre MACSQUANT10 (Myltenyl Biotec).

### *Statistiques*

Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$ SEM. Les études statistiques ont été réalisées grâce à des tests paramétriques comme le one-way ANOVA. Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative. Le logiciel GraphPad Prism V 5.0 a été utilisé pour l'analyse.

## Résultats

Notre précédente étude montre que la bactérie *Lactococcus lactis* recombinante pour le gène humain de L'Elafine native sécrète cet inhibiteur de protéases, que sa forme est fonctionnelle et protège de l'inflammation dans des modèles *in vivo* et *in vitro* (Motta et al., 2012). Afin de comprendre quelle fonction de L'Elafine est impliquée dans cette protection, nous avons généré différents mutants.

### *Génération des bactéries mutantes*

Deux mutations dans le site de la boucle inhibitrice de L'Elafine (A62G et M63G) ont été réalisées, la mutation de ces 2 sites est nécessaire à la perte de fonction inhibitrice de protéase (Baranger et al., 2008). Ce mutant est nommé AntiProt. L'activité antimicrobienne de L'Elafine pourrait être portée notamment par des charges cationiques du domaine cémentoïne (Bellemare et al., 2010). Ainsi, nous avons généré un mutant ayant perdu 2 acides aminés cationiques (K44D et K50G). La charge globale de la protéine devient par conséquent neutre. Ces changements ont été choisis car leur localisation et leur nature ne modifient pas la conformation de la protéine. De plus cette mutation n'affecte pas la boucle inhibitrice de protéases. Ce second mutant est nommé AntiMic. Un dernier mutant a été généré avec les 2 domaines de L'Elafine mutés (K44D, K50G et A62G, M63G) entraînant une perte de fonction antimicrobienne et inhibitrice de protéase (Figure 1A). Ce dernier mutant est nommé AntiMicProt. Après transfert des 4 constructions dans la bactérie probiotique *Lactococcus lactis*, la bonne conformation des mutants a été vérifiée. L'analyse réalisée en western blot et en ELISA (Figure 1B) montre que les bactéries recombinantes produisent toutes de L'Elafine et que la quantité sécrétée est équivalente pour tous les mutants ( $60 \pm 8$  ng/ml).

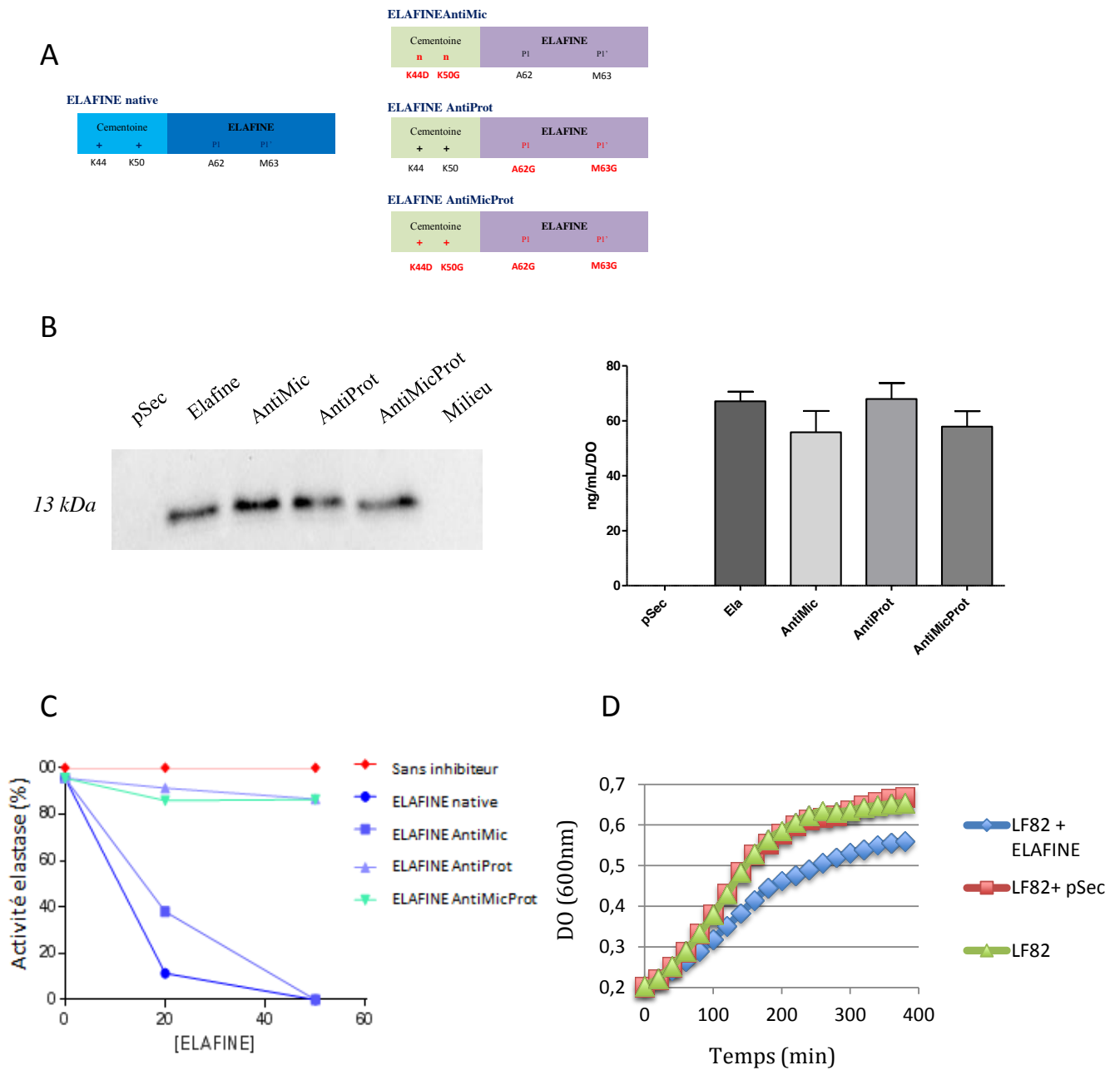
Les protéines de L'Elafine mutées ont été testées afin de vérifier leur perte de fonctions. La co-incubation de L'Elafine native et de l'élastase du neutrophile recombinante montre une forte inhibition de près de 90% de celle-ci (Figure 1C). Le mutant AntiMic entraîne une très forte inhibition de l'activité élastase élastolytique du neutrophile (environ 80% de l'activité inhibée). La co-incubation de l'élastase du neutrophile avec les mutants AntiProt et AntiMicProt n'inhibe pas l'activité élastolytique démontrant ainsi la perte de fonction inhibitrice de protéases de ces 2 mutants. Le changement des 2 lysines K44 et

K50 situées dans le domaine cémentoïne n'ont donc aucun impact sur la fonction inhibitrice d'élastase.

La fonction antimicrobienne de L'Elafine a été testée via sa capacité à inhiber la prolifération de la bactérie *Escherichia coli* LF82. L'ajout du surnageant des bactéries *L.lactis* contenant L'Elafine après induction dans une culture de bactérie *Escherichia coli* LF82 en phase exponentielle de croissance entraîne une absence de l'augmentation de la DO comparé à l'ajout du surnageant de *L.lactis* pSec (Figure 1D). L'ELAFINE native entraîne donc une forte inhibition de la prolifération bactérienne. Ces expériences seront à réitérer avec les différents mutants de L'Elafine afin de vérifier la perte de fonction du mutant AntiMic.



**Figure 1**



**Figure 1: Les bactéries *L.lactis* ELAFINE et ses différents mutants**

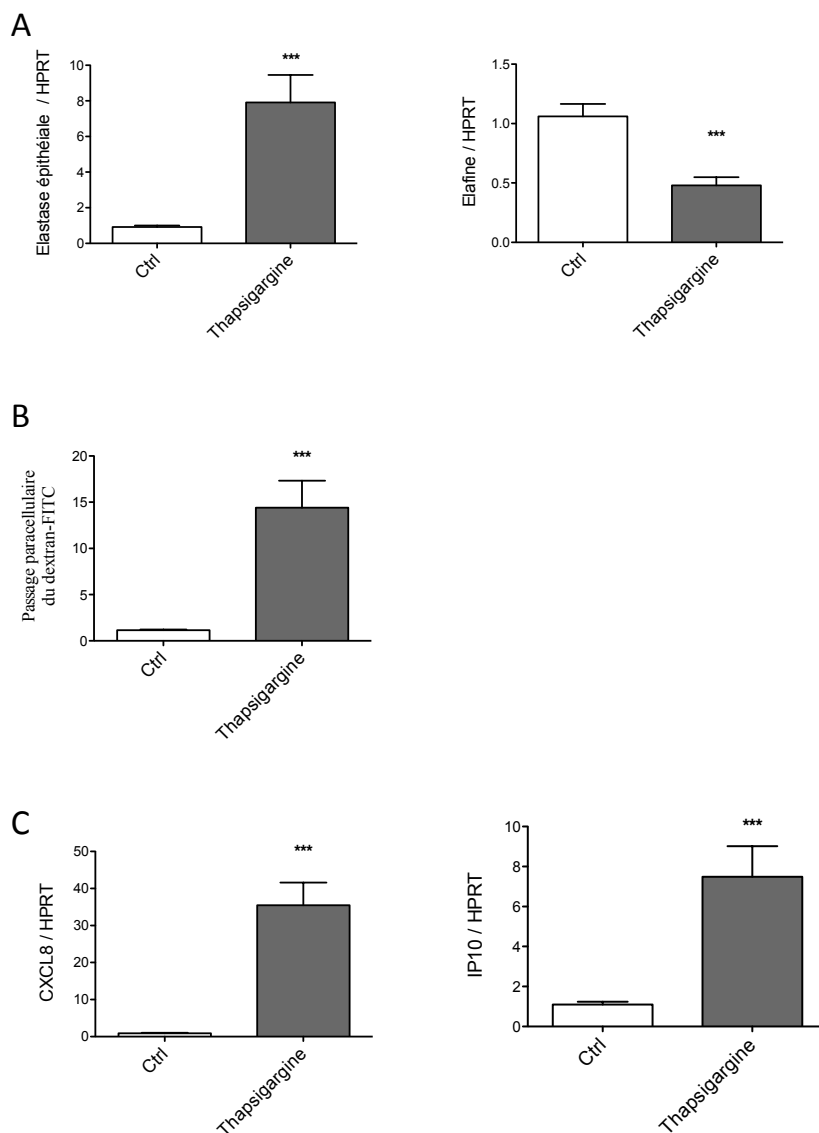
A: Représentation schématique des mutations de la protéine humaine de L'Elafine et des acides aminés mutés. B: Mise en évidence de la sécrétion d'ELAFINE et de ses mutants par western blot et par ELISA. C : Inhibition de l'activité élastolytique par les protéines recombinantes purifiées de L'Elafine et de ses différents mutants. D : Inhibition de la croissance de *E.coli* LF82 par L'Elafine et ses différents mutants.

*Le stress du réticulum provoque une rupture de la balance élastolytique in vitro*

Chez les patients atteints de MICI, l'induction de stress du réticulum endoplasmique dans la cellule épithéliale a été démontrée (Hosomi et al., 2015) et le rôle de ce stress du réticulum dans la pathologie a été caractérisé (Luo and Cao, 2015). La dérégulation de la balance élastolytique de la muqueuse intestinale chez les patients atteints de MICI (Motta et al., 2012) est assurée en grande partie par la sécrétion par l'épithélium qui sécrète une importante activité élastolytique et peu d'Elafine (Motta et al., 2012). Nous nous sommes donc posé la question des effets du stress du réticulum endoplasmique dans la cellule épithéliale, sur la régulation de la balance élastolytique. Plus précisément, nous avons étudié les effets d'un activateur du stress du réticulum (la thapsigargine) sur l'expression d'élastase épithéliale et d'Elafine.

La stimulation d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales humaines (Caco2) avec de la Thapsigargine (10 $\mu$ g/mL) induit une augmentation d'un facteur 10 de la quantité des transcrits de l'élastase épithéliale ainsi qu'une diminution de moitié de celle des transcrits de L'Elafine (Figure 2A). Cette stimulation engendre aussi la perte de la barrière épithéliale, quantifiée ici par un passage du dextran FITC du compartiment apical au compartiment basal (Figure 2B) 17 fois plus important en condition stimulée par rapport à la condition contrôle. De plus, cette même stimulation induit l'augmentation de la quantité des transcrits de cytokines inflammatoires comme CXCL8 et IP10, respectivement 4 et 8 fois plus importante par rapport à la condition contrôle (Figure 2 C).

**Figure 2**



**Figure 2:** La stimulation de cellules épithéliales intestinales par de la thapsigargin induit un phénotype inflammatoire.

La présence de thapsigargin dans le milieu d'une monocouche de Caco2 induit une augmentation de la quantité de transcrit d'élastase épithéliale et diminue celui de L'Elafine (A). Cette stimulation provoque une augmentation de la perméabilité paracellulaire (B) et de la transcription des cytokines pro-inflammatoires CXCL8 et IP10 (C).

Ces données sont exprimées en fonction de la moyenne  $\pm$  SEM et sont comparées grâce à un T test (n=4, 2 puits par conditions) \*\*\*p<0,001

### *La fonction inhibitrice de protéases est nécessaire à L'Elafine pour protéger l'épithélium de l'inflammation*

L'effet des bactéries exprimant L'Elafine et de ses mutants en condition inflammatoire, semblable à celle de la muqueuse colique des patients atteints de MICI, a été étudié dans le modèle de stimulation de Caco2 par la thapsigargine. Les différents clones de bactéries recombinantes ( $10^7$  CFU/mL) ont été ajoutés dans le compartiment apical lors de la stimulation à la thapsigargine. Différents paramètres inflammatoires ont été étudiés 16h après la stimulation. Dans ces conditions de culture, la bactérie contenant le vecteur vide pSec n'a aucun effet sur les différents paramètres analysés (Figure 3), il n'y a donc pas d'effet probiotique de *L.lactis* seule. L'Elafine native sécrétée par *L.lactis* protège de l'augmentation de perméabilité induite par la thapsigargine (diminution du passage du dextran FITC de plus de 3 fois par rapport à la stimulation avec la thapsigargine seule). Cette protection est maintenue avec le mutant AntiMic. Cependant, les mutants AntiProt et AntiMicProt ne sont plus capables d'empêcher la perte de barrière épithéliale induite par la thapsigargine (Figure 3A).

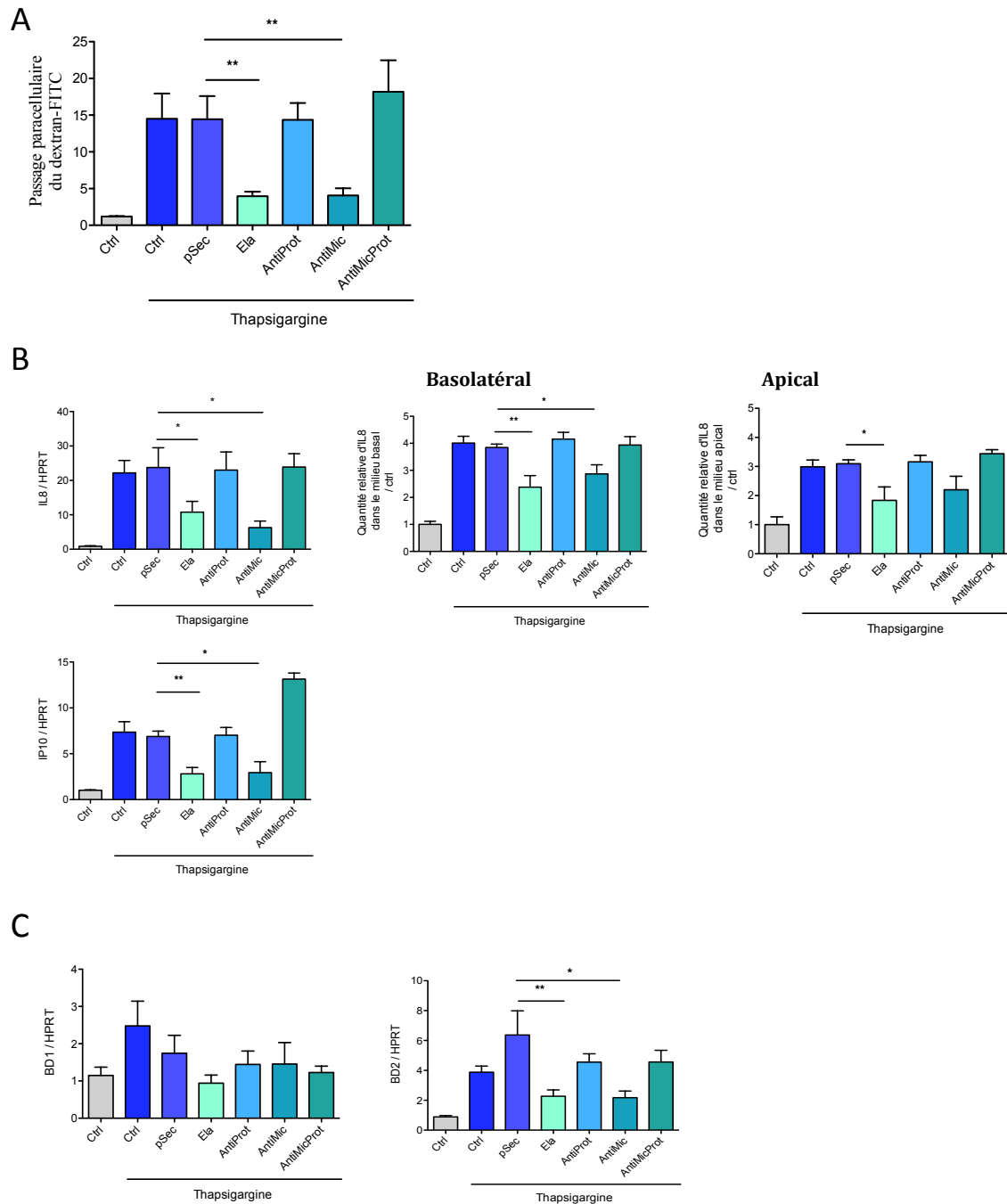
L'apport d'ELAFINE native par *L.lactis* sur les cellules épithéliales stimulées induit une diminution de moitié de la quantité des transcrits *CXCL8* ainsi qu'une diminution de la sécrétion par la cellule de la protéine correspondante (CXCL8) dans les milieux apicaux et baso-latéraux, en comparaison avec la stimulation à la thapsigargine seule (Figure 3B). De même, la transcription du gène de *IP10* est réduite par la présence de L'Elafine native. Le mutant AntiMic possède la même capacité de régulation de la transcription des gènes codant ces cytokines pro-inflammatoires que L'Elafine native. Les mutants AntiProt et AntiMicProt, qui ont perdus leur capacité à inhiber l'activité élastolytique, ne sont plus capables de contrer les effets pro-inflammatoires de l'induction du stress du réticulum puisque le taux de transcrit de *CXCL8* et de *IP10* est semblable à celui observé avec la thapsigargine seule.

La stimulation par la thapsigargine d'une monocouche de cellules épithéliales entraîne une augmentation de la quantité de transcrits de la  $\beta$ -defensine-1 (*hBD1*) et de la  $\beta$ -défensine-2 (*hBD2*) respectivement de 2 à 4 fois par rapport à la condition contrôle (Figure 3C). La présence de L'Elafine dans le milieu de culture n'a pas d'effets significatifs sur le niveau transcriptionnel de *hBD1*. L'ajout d'Elafine native sécrétée par *L.lactis* diminue de moitié la transcription du gène de *hBD2* par rapport à la condition thapsigargine seule. Les capacités de régulation transcriptionnelle de ce gène

sont conservées par le mutant AntiMic. Par contre, malgré la présence du mutant AntiProt ou AntiMicProt, la quantité de transcrits hBD2 est semblable à celle mesurée dans la condition thapsigargine seule.

Dans les conditions inflammatoires et de dérégulation de la balance élastolytique induite par la thapsigargine dans un modèle *in vitro* de culture cellulaire, l'apport de L'Elafine native par *L.lactis* protège les cellules épithéliales de l'inflammation en diminuant la perte de barrière ainsi que la production de cytokines, chimiokines pro-inflammatoires et de défensines par les cellules épithéliales. La perte de la fonction inhibitrice de protéases de L'Elafine provoque l'annihilation de ses propriétés régulatrices. La fonction inhibitrice de protéase est donc indispensable aux effets anti-inflammatoires de L'Elafine.

**Figure 3**



**Figure 3:** Effet de *L.lactis* ELAFINE et de ses mutants sur les paramètres inflammatoires de Caco2 stimulées par de la Thapsigargine.

Perméabilité paracellulaire mesurée grâce au passage du dextran FITC (A) de Caco2 stimulées par de la thapsigargine et *L.lactis* ELAFINE et ses différents mutants. Expression relative des gènes de cytokines pro-inflammatoires CXCL8 et IP10 ainsi que la quantification de la sécrétion de CXCL8 dans les milieux apicaux et basolatéraux (B), expression relative des peptides antimicrobiens hBD1 et hBD2 (C).

Ces données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM et la significativité est calculée grâce à un test statistique ANOVA one-way suivi d'un post-test Bonferroni. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

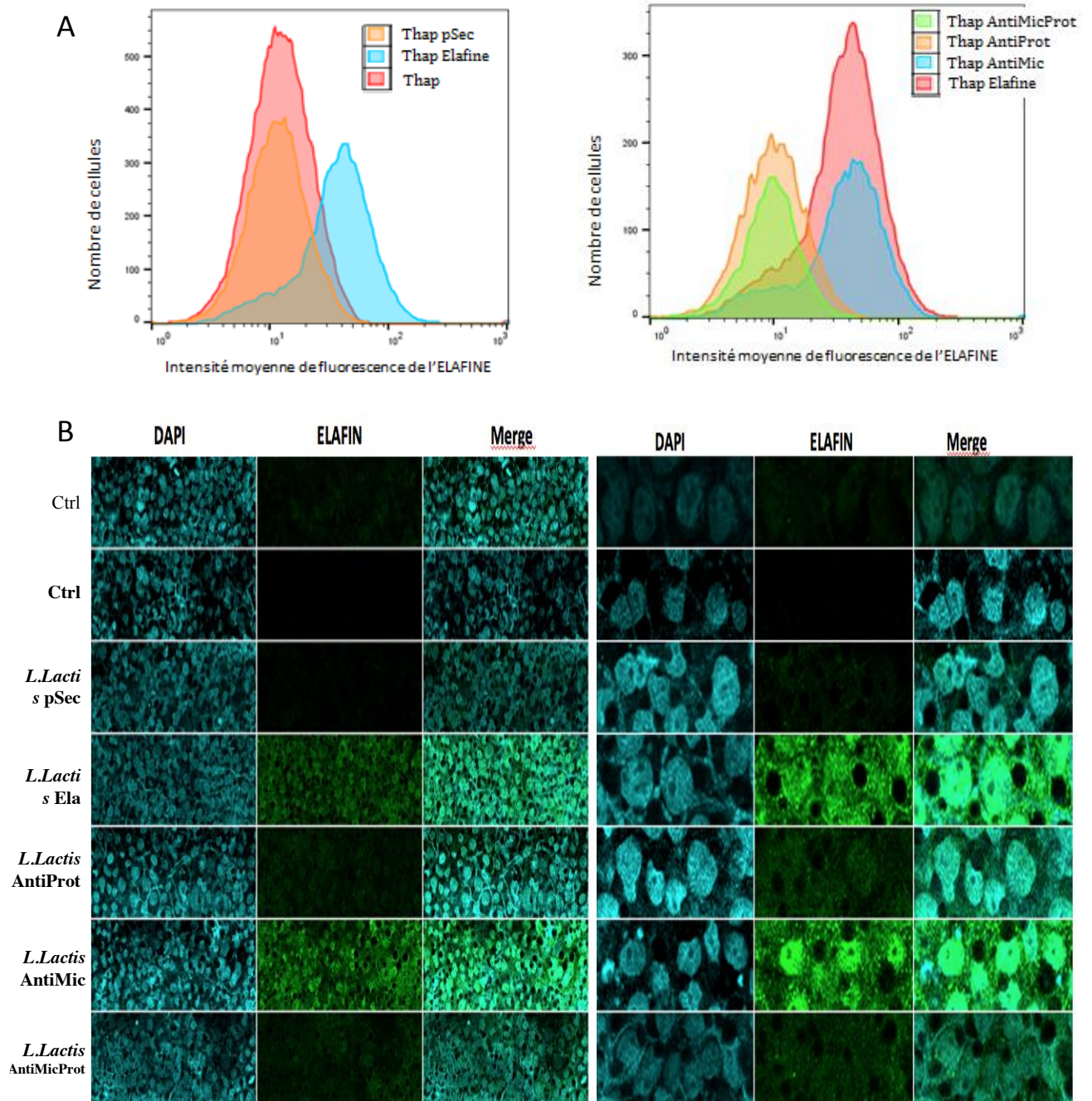
*L'ELAFINE grâce à sa fonction inhibitrice de protéases pénètre dans la cellule épithéliale jusqu'au noyau.*

L'analyse par cytométrie en flux des cellules épithéliales Caco2 stimulées par la thapsigargine et co-cultivées avec les différents clones de bactéries lactiques montrent que les cellules sont toujours vivantes après ces conditions de culture (plus de 80% des cellules vivantes après la co-culture). L'ELAFINE endogène est détectable après l'induction de stress du réticulum. L'incubation avec *L.lactis* pSec ne modifie pas la quantité d'ELAFINE endogène de la cellule. L'apport d'ELAFINE par *L.lactis* induit une augmentation de quantité d'ELAFINE détectée (Figure 4A panneau de gauche) dans la cellule. L'ELAFINE sécrétée par *L.lactis* est donc capable de pénétrer dans la cellule épithéliale. Les 2 mutants AntiProt et AntiMicProt ont un profil d'intensité de fluorescence de L'Elafine semblable à celui de la bactérie contrôle pSec. Par contre la perte de la charge positive de L'Elafine (mutant AntiMic) n'empêche pas L'Elafine de rentrer dans la cellule (Figure 4A panneau de droite).

L'analyse d'images générées en microscopie confocale confirme que L'Elafine grâce à sa fonction inhibitrice de protéases est prise en charge par la cellule épithéliale pour être internalisée (Figure 4B). De plus le marquage des noyaux par le DAPI révèle que L'Elafine native serait localisée préférentiellement dans le noyau.

Le mécanisme d'action de L'Elafine concernant ses effets anti-inflammatoires semble donc complexe. D'une part, elle diminue la transcription de cytokines inflammatoires et restaure la perméabilité intestinale de manière dépendante de son domaine inhibiteur d'élastase. Et d'autre part, également sur la base de son domaine inhibiteur de protéases, elle est capable de pénétrer dans la cellule et d'atteindre le noyau où elle pourrait réguler la transcription de gènes pro-inflammatoires.

**Figure 4**



**Figure 4:** L'ELAFINE sécrétée par *L.lactis* pénètre dans la cellule épithéliale

A: Graphique représentatif de la moyenne d'intensité de fluorescence de L'Elafine, quantifiée dans les Caco2 après une co-culture avec les différentes bactéries *L.lactis* recombinantes pour L'Elafine et ses mutants. B: Images représentatives de Caco2 marquées pour L'Elafine et leur noyau (x600 panneau de gauche et x800 panneau de droite).



## **Discussion**

L'incidence des MICI ne cesse d'augmenter ces dernières années, les traitements sont longs et coûteux et se sont surtout concentrés jusqu'alors sur la réduction de l'infiltrat inflammatoire. Aujourd'hui, à la fois une diminution de la réponse inflammatoire et une réparation rapide de la muqueuse constituent les buts à atteindre pour ces traitements. De nouveaux outils thérapeutiques sont développés pour accélérer et maintenir la maladie en phase de rémission. L'utilisation de la bactérie lactique, *Lactococcus lactis* comme transporteur de L'Elafine au contact de la muqueuse enflammée a démontré son efficacité non seulement *in vitro* dans des modèles inflammatoires de cellules épithéliales en culture, mais aussi dans différents modèles de colite chez la souris. L'ELAFINE délivrée par *L.lactis* semble donc posséder un fort potentiel thérapeutique. Néanmoins, les mécanismes d'actions de L'Elafine sur l'épithélium, premières cellules en contact avec celle-ci lors de sa sécrétion sur le site inflammatoire colique, sont peu connus. Cette étude nous permettra de mieux comprendre comment L'Elafine médie ces effets anti-inflammatoires.

Le changement d'acides aminés impliqués dans la boucle inhibitrice de L'Elafine et dans la polarité du domaine cémentoïne nous a permis d'étudier l'implication de ces 2 fonctions connues de L'Elafine sur ses effets anti-inflammatoires.

Dans la littérature, les effets antimicrobiens de L'Elafine ont été testés sur différentes souches bactériennes comme *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* ATCC, *K. pneumonia* ou encore *B. catarrhalis* (Baranger et al., 2008; Bellemare et al., 2010). L'ELAFINE diminue la survie et la croissance de ces bactéries. Dans notre étude, nous avons choisi de nous intéresser à une souche d'*Escherichia Coli* (*E. coli* LF82), pathogène et présente dans le microbiote des patients atteints de MICI (Vejborg et al., 2011). Cette souche a des effets pro-inflammatoires sur les cellules épithéliales via l'augmentation de la perméabilité épithéliale (Wine et al., 2009). La présence de L'Elafine dans le milieu de culture de LF82 induit une diminution de sa croissance démontrant que L'Elafine possède aussi une activité microbicide sur cette souche bactérienne pathogène. L'utilisation des différents mutants de L'Elafine pourra confirmer que la présence d'une charge positive du domaine cémentoïne est indispensable à L'Elafine pour contrôler la croissance bactérienne.

Il est intéressant de noter que dans notre modèle d'étude, l'expression d'ELAFINE ne modifie pas la prolifération de la bactérie *L.lactis* lorsque celle-ci la sécrète par rapport à la bactérie contenant le vecteur vide pSec. De même, les différents mutants de L'Elafine générés n'ont pas d'effet sur la croissance des *L.lactis* qui les expriment. Il serait intéressant d'étudier si les effets antimicrobiens de L'Elafine sont restreints à des souches de bactéries pathogènes. L'ELAFINE diminue la croissance de *E. coli* ATCC ou *E. coli* LF82 (Bellemare et al., 2010), son effet antibactérien pourrait être testé sur une souche de coli probiotique comme *E. coli* Nissle 1917 (Zyreck AA et al., 2007) afin de déterminer si l'effet de L'Elafine est dépendant de la souche bactérienne ou de la pathogénicité de la bactérie.

Dans un modèle d'inflammation mimant la rupture de la balance élastolytique observée chez les patients atteints de MICI, L'Elafine protège de l'inflammation en restaurant une perméabilité épithéliale et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires proches de celle des conditions contrôles. C'est la fonction inhibitrice de protéases qui confère à L'Elafine ces propriétés car lorsque celle-ci est abolie, L'ELAFINE perd ses capacités anti-inflammatoires. L'induction du stress du réticulum par ajout de thapsigargine induit une augmentation de la transcription du gène codant l'élastase épithéliale ainsi qu'une diminution de L'Elafine endogène. L'augmentation de l'activité élastolytique dans le milieu cellulaire après la stimulation avec la thapsigargine n'a pas pu encore être mesurée. Ces expériences sont en cours de réalisation et nécessitent certaines mises au point mais cette mesure constitue un complément d'information essentiel pour déterminer le rôle de l'inhibition de l'activité élastolytique dans les propriétés anti-inflammatoires de L'Elafine.

L'augmentation d'activité élastolytique a été mesurée à partir d'exsudats de biopsies de patients atteints de MICI (Motta et al., 2012). Cette activité élastase peut dégrader les jonctions intercellulaires et augmenter la perméabilité épithéliale (Boxio et al., 2016) mais aussi activer des récepteurs PARs (Proteases Activated Receptors) et induire des signaux pro-inflammatoires (Zhao et al., 2015) (Chin et al., 2003b, 2008). Ainsi L'Elafine grâce à son domaine inhibiteur de protéase protégerait les cellules de l'inflammation grâce à la réduction de l'activité élastolytique.

De plus, l'analyse réalisée par FACS et en imagerie montre que L'Elafine est aussi capable de pénétrer dans la cellule épithéliale. La mutation des 2 lysines positionnées dans le domaine cémentoïne changeant la charge nette de la protéine n'entraîne pas de modification de l'entrée de L'Elafine dans la cellule épithéliale. La neutralité de la protéine aurait pu modifier l'affinité de celle-ci avec les membranes cellulaires ou avec un récepteur d'entrée à la surface de la cellule épithéliale et modifier sa pénétration dans la cellule épithéliale, mais nous démontrons ici que ce n'est pas le cas. Le mécanisme d'entrée de L'Elafine reste encore à déterminer. Une étude montre que le SLPI (inhibiteur d'élastase de structure très proche de celle de L'Elafine) pénètre dans les monocytes, que cette entrée est diminuée à 4°C mais que des inhibiteurs d'endocytose tels que l'azide de sodium ou encore l'actinomycine A n'ont aucun effet (Taggart et al., 2005). Cela suggère une entrée plutôt non spécifique par macropinocytose du SLPI dans le monocyte. Il pourrait en être de même pour L'Elafine, cependant, on ne peut exclure l'existence d'un récepteur encore inconnu sur lequel L'Elafine pourrait se fixer et qui permettrait son entrée. Dans les cellules de l'épiderme humain, un inhibiteur de protéases  $\alpha$ 2ML1 possède un domaine de fixation au récepteur multifonctionnel LRP1 lui permettant de pénétrer dans la cellule (Galliano et al., 2008). Cette étude suggère que LRP1 pourrait internaliser  $\alpha$ 2ML1 liée à sa protéase inhibée (une kallikréine) et ainsi réguler l'activité protéolytique lors de la desquamation. De plus, un autre article montre que le récepteur LRP1 est responsable de la clairance de complexe serpine-protéases de la circulation (Strickland et al., 2011). L'existence de récepteurs permettant l'internalisation de complexe protéases/inhibiteur de protéases a aussi été montré dans des monocytes, et des hépatocytes (Maekawa and Tollefsen, 1996; Perlmutter et al., 1990). Dans nos travaux, c'est la partie de la protéine comportant la fonction inhibitrice de protéases qui est nécessaire pour médier l'entrée de L'Elafine dans la cellule épithéliale. La capacité de L'Elafine à pénétrer dans la cellule n'est peut-être pas médiée uniquement par la fonction inhibitrice de protéase en tant que telle, mais en l'absence de la formation du complexe ELAFINE/élastase, celle-ci pourrait ne plus entrer dans la cellule. L'utilisation d'inhibiteurs d'endocytose et de macropinocytose pourra, dans un premier temps, nous permettre de savoir si l'entrée de L'Elafine dans la cellule est spécifique ou non. Puis, afin de déterminer si l'entrée de L'Elafine est dépendante de la formation du couple Elastase/Elafine, nous utiliserons des petites molécules chimiques commerciales capables d'inhiber l'élastase épithéliale

spécifiquement ou encore un anticorps bloquant de l'élastase épithéliale (en cours de développement au laboratoire). Si l'entrée de L'Elafine est bloquée par l'utilisation d'un tel inhibiteur, cela suggérerait que L'Elafine nécessite la présence du complexe Elastase/Elafine pour pénétrer dans la cellule épithéliale.

De façon générale, pour démontrer de manière définitive le rôle de l'activité inhibitrice de protéase de L'Elafine dans ses effets anti-inflammatoires et dans sa capacité à pénétrer dans la cellule, il sera nécessaire de reproduire toutes ses expériences réalisées avec les mutants AntiProt et AntiMicProt, en présence d'un inhibiteur d'activité élastolytique. Si cet inhibiteur bloque l'entrée d'Elafine et/ou reverse l'effet observé avec les mutants AntiProt et AntiMicProt, cela confirmera le rôle de la fonction inhibitrice d'élastase de L'Elafine.

Enfin, la localisation intracellulaire de L'Elafine que nous avons mis en évidence suggère que L'Elafine pourrait aussi moduler des facteurs de transcription dans le noyau réduisant ainsi la transcription de gènes pro-inflammatoires. Une étude dans un contexte d'infection au VIH montre une localisation nucléaire de L'Elafine dans des cellules épithéliales génitales humaines (Drannik et al., 2012). Cette localisation particulière est corrélée avec un retard de translocation de NFkB dans le noyau et avec une protection des cellules de l'infection au VIH. Des données préliminaires du laboratoire montrent que L'Elafine retarderait la translocation de NFkB dans les cellules épithéliales intestinales après l'induction du stress du réticulum. Grâce à sa présence intracellulaire, L'Elafine pourrait donc agir de la même manière diminuant la translocation de NFkB et ainsi protéger la cellule de l'inflammation. Le domaine de L'Elafine spécifiquement impliqué dans l'interaction avec NFkB n'est pas connu. Notre étude suggère que les acides aminés A62 et M63 sont impliqués dans cette interaction puisque leur mutation induit une translocation normale de NFkB dans le noyau ainsi qu'un niveau de transcription élevé des gènes pro-inflammatoires. L'utilisation de la cytométrie couplé à de l'imagerie (ImageStreamX) nous permettra de visualiser L'Elafine dans la cellule, sa co-localisation possible avec NFkB ainsi que de quantifier cette interaction. Cependant, on ne peut exclure l'hypothèse que dans notre modèle, l'entrée de L'Elafine dans la cellule soit indépendante du retard de translocation de NFkB et que celui-ci soit uniquement dû à une diminution de l'activité élastolytique dans le milieu cellulaire. En effet, l'augmentation de l'activité élastolytique pourrait

potentialiser les effets pro-inflammatoires de la thapsigargine. L'élastase est capable d'induire un phénotype pro-inflammatoire des cellules épithéliales en augmentant la perméabilité cellulaire et en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires (Boxio et al., 2016) (Chin et al., 2003b, 2008). L'ELAFINE pourrait donc médier ces effets anti-inflammatoires uniquement via l'inhibition de l'élastase épithéliale. La diminution des cytokines, de la perméabilité et de la translocation de NFkB serait une conséquence de la baisse de l'activité élastolytique. Cette hypothèse pourrait être testée grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'élastase épithéliale (petites molécules ou anticorps bloquant).

Ainsi nos données suggèrent des mécanismes multiples mis en œuvre par L'Elafine sur lesquels reposent ses propriétés anti-inflammatoires.

## ***Bibliographies***

- Baranger, K., Zani, M.-L., Chandenier, J., Dallet-Choisy, S., and Moreau, T. (2008). The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function. *FEBS J.* 275, 2008–2020.
- Bellemare, A., Vernoux, N., Morin, S., Gagné, S.M., and Bourbonnais, Y. (2010). Structural and antimicrobial properties of human pre-elafin/trappin-2 and derived peptides against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 10, 253.
- Bermúdez-Humarán, L.G., Motta, J.-P., Aubry, C., Kharrat, P., Rous-Martin, L., Sallenave, J.-M., Deraison, C., Vergnolle, N., and Langella, P. (2015). Serine protease inhibitors protect better than IL-10 and TGF- $\beta$  anti-inflammatory cytokines against mouse colitis when delivered by recombinant lactococci. *Microb. Cell Factories* 14, 26.
- Boxio, R., Wartelle, J., Nawrocki-Raby, B., Lagrange, B., Malleret, L., Hirche, T., Taggart, C., Pacheco, Y., Devouassoux, G., and Bentaher, A. (2016). Neutrophil elastase cleaves epithelial cadherin in acutely injured lung epithelium. *Respir. Res.* 17, 129.
- Bustos, D., Negri, G., De Paula, J.A., Di Carlo, M., Yapur, V., Facente, A., and De Paula, A. (1998). Colonic proteinases: increased activity in patients with ulcerative colitis. *Medicina (Mex.)* 58, 262–264.
- Butler, M.W., Robertson, I., Greene, C.M., O'Neill, S.J., Taggart, C.C., and McElvaney, N.G. (2006). Elafin prevents lipopolysaccharide-induced AP-1 and NF-kappaB activation via an effect on the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 281, 34730–34735.
- Chin, A.C., Vergnolle, N., MacNaughton, W.K., Wallace, J.L., Hollenberg, M.D., and Buret, A.G. (2003). Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 11104–11109.
- Chin, A.C., Lee, W.Y., Nusrat, A., Vergnolle, N., and Parkos, C.A. (2008). Neutrophil-mediated activation of epithelial protease-activated receptors-1 and -2 regulates barrier function and transepithelial migration. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 5702–5710.
- Dabek, M., Ferrier, L., Roka, R., Gecse, K., Annahazi, A., Moreau, J., Escourrou, J., Cartier, C., Chaumaz, G., Leveque, M., et al. (2009). Luminal cathepsin g and protease-activated receptor 4: a duet involved in alterations of the colonic epithelial barrier in ulcerative colitis. *Am. J. Pathol.* 175, 207–214.
- Drannik, A.G., Nag, K., Yao, X.-D., Henrick, B.M., Ball, T.B., Plummer, F.A., Wachihi, C., Kimani, J., and Rosenthal, K.L. (2012). Anti-HIV-1 activity of elafin depends on its nuclear localization and altered innate immune activation in female genital epithelial cells. *PloS One* 7, e52738.
- Galliano, M.-F., Toulza, E., Jonca, N., Gonias, S.L., Serre, G., and Guerrin, M. (2008). Binding of  $\alpha$ 2ML1 to the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1) Reveals a New Role for LRP1 in the Human Epidermis. *PLoS ONE* 3.

- Hosomi, S., Kaser, A., and Blumberg, R.S. (2015). Role of endoplasmic reticulum stress and autophagy as interlinking pathways in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* *31*, 81–88.
- Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R.S. (2010). Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 573–621.
- Luo, K., and Cao, S.S. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress in Intestinal Epithelial Cell Function and Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Res. Pract.* *2015*.
- Maekawa, H., and Tollefsen, D.M. (1996). Role of the Proposed Serpin-Enzyme Complex Receptor Recognition Site in Binding and Internalization of Thrombin-Heparin Cofactor II Complexes by Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* *271*, 18604–18609.
- Motta, J.-P., Bermúdez-Humarán, L.G., Deraison, C., Martin, L., Rolland, C., Rousset, P., Boue, J., Dietrich, G., Chapman, K., Kharrat, P., et al. (2012). Food-grade bacteria expressing elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis. *Sci. Transl. Med.* *4*, 158ra144.
- Panaccione, R., Ferraz, J.G., and Beck, P. (2005). Advances in medical therapy of inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* *5*, 566–572.
- Perlmutter, D.H., Glover, G.I., Rivetna, M., Schasteen, C.S., and Fallon, R.J. (1990). Identification of a serpin-enzyme complex receptor on human hepatoma cells and human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 3753.
- Sallenave, J.M. (2002). Antimicrobial activity of antiproteinases. *Biochem. Soc. Trans.* *30*, 111–115.
- Sallenave, J.-M. (2010). Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *42*, 635–643.
- Strickland, D.K., Muratoglu, S.C., and Antalis, T.M. (2011). Serpin-Enzyme Receptors: LDL Receptor-Related Protein 1. *Methods Enzymol.* *499*, 17.
- Taggart, C.C., Cryan, S.-A., Weldon, S., Gibbons, A., Greene, C.M., Kelly, E., Low, T.B., O’neill, S.J., and McElvaney, N.G. (2005). Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *J. Exp. Med.* *202*, 1659–1668.
- Vachon, E., Bourbonnais, Y., Bingle, C.D., Rowe, S.J., Janelle, M.F., and Tremblay, G.M. (2002). Anti-inflammatory effect of pre-elafin in lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation. *Biol. Chem.* *383*, 1249–1256.
- Vejborg, R.M., Hancock, V., Petersen, A.M., Krogfelt, K.A., and Klemm, P. (2011). Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease. *BMC Genomics* *12*, 316.
- Vergnolle, N. (2009). Protease-activated receptors as drug targets in inflammation and pain. *Pharmacol. Ther.* *123*, 292–309.

Vergnolle, N. (2016). Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases. *Gut* *gutjnl-2015-309147*.

Verrier, T., Solhonne, B., Sallenave, J.-M., and Garcia-Verdugo, I. (2012). The WAP protein Trappin-2/Elafin: a handyman in the regulation of inflammatory and immune responses. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 1377–1380.

Wine, E., Ossa, J.C., Gray-Owen, S.D., and Sherman, P.M. (2009). Adherent-invasive *Escherichia coli*, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia. *BMC Microbiol.* *9*, 180.

Ying, Q.L., and Simon, S.R. (2001). Kinetics of the inhibition of proteinase 3 by elafin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *24*, 83–89.

Yu, A.P., Cabanilla, L.A., Wu, E.Q., Mulani, P.M., and Chao, J. (2008). The costs of Crohn's disease in the United States and other Western countries: a systematic review. *Curr. Med. Res. Opin.* *24*, 319–328.

Zhao, P., Lieu, T., Barlow, N., Sostegni, S., Haerteis, S., Korbmacher, C., Liedtke, W., Jimenez-Vargas, N.N., Vanner, S.J., and Bunnett, N.W. (2015). Neutrophil Elastase Activates Protease-activated Receptor-2 (PAR2) and Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) to Cause Inflammation and Pain. *J. Biol. Chem.* *290*, 13875–13887.



# DISCUSSION



Le SCI et les MICI sont des pathologies intestinales dont les composantes sont différentes (cycle de poussée inflammatoire pour les patients atteints de MICI et cycle de troubles fonctionnels pour les patients atteints de SCI) mais ont certains facteurs physiopathologiques communs. Ces 2 pathologies présentent des caractéristiques communes comme une augmentation de la perméabilité intestinale, des douleurs abdominales, une inflammation de la muqueuse (massive et chronique chez les patients atteints de MICI et de bas grade chez les patients atteints de SCI), une dysbiose ainsi qu'une augmentation de l'activité protéolytique détectée dans la muqueuse intestinale.

Nous avons pu montrer que cette activité provient principalement des cellules de l'épithélium intestinal qui sécrètent à leur pôle basal de la trypsine-3. Cette protéase augmente la perméabilité intestinale et est capable d'activer des neurones sous-muqueux mais aussi des neurones sensitifs participant à l'hypersensibilité viscérale via des mécanismes impliquant notamment le récepteur aux protéases PAR2.

De plus, chez les patients atteints de MICI, notre équipe a montré une augmentation de l'activité élastolytique et une diminution de la transcription d'un inhibiteur d'élastase par les cellules de l'épithélium. L'apport d'ELAFINE exogène grâce à une bactérie de l'alimentation, *Lactococcus lactis*, protège les animaux de la colite. L'ELAFINE possède donc des propriétés anti-inflammatoires (Motta et al., 2012). Cet inhibiteur de protéase est constitué de deux domaines : un premier capable d'inhiber l'activité élastolytique et un second avec des effets antimicrobiens. L'ELAFINE est aussi capable d'interagir avec NFkB, cependant la localisation du domaine responsable de cette interaction est inconnue. Mes travaux de thèse révèlent que les propriétés anti-inflammatoires de L'Elafine reposent principalement sur le domaine de la protéine renfermant la fonction d'inhibiteur de protéases. Ce domaine est également important pour permettre à L'Elafine exogène de pénétrer dans la cellule épithéliale où elle régule certainement la transcription de certains facteurs pro-inflammatoires.

Ce travail de thèse montre l'importance de la balance entre les protéases et leurs inhibiteurs dans les pathologies intestinales mais aussi le rôle de la cellule épithéliale dans la physiopathologie du SCI et des MICI.

## 1- La cellule épithéliale au cœur des pathologies intestinales

La cellule épithéliale et plus généralement l'épithélium intestinal, assure un rôle prépondérant dans l'homéostasie intestinale. Ces cellules possèdent de nombreuses fonctions pour assurer ce rôle qui incluent la mise en place d'une séparation physique de l'organisme avec les bactéries commensales, une intégration des signaux du milieu extérieur, une communication avec les cellules de leur environnement afin de permettre une réponse appropriée à ces signaux. Cette fonction est possible grâce à sa capacité à sécréter de très nombreux médiateurs aux rôles très variés (König et al., 2016) (Peterson and Artis, 2014).

### a) Régulation fine de l'activité protéolytique

Nous l'avons vu dans l'introduction, les protéases font l'objet d'une importante régulation en condition physiologique : leur expression est contrôlée au niveau transcriptionnelle, elles sont synthétisées sous forme de zymogène et leur activité est aussi régulée grâce à la sécrétion d'inhibiteurs. Cependant, en condition de pathologie chronique, la sécrétion de certaines protéases peut être modifiée, accompagnée ou non d'une diminution de leurs inhibiteurs. Cela induit une rupture de l'équilibre dans la balance protéases/inhibiteurs de protéases. L'origine de ces protéases est diverse cependant mes travaux montrent que la cellule épithéliale participe activement à ce déséquilibre (Figure 1).

Les patients atteints de SCI et de MICI ont une activité protéolytique colique augmentée (Cenac et al., 2007) (Motta et al., 2012) (Rolland-Fourcade et al., 2017). Plus particulièrement, l'activité élastolytique de la cellule épithéliale est augmentée dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MICI . Le traitement de souris avec *L.lactis* recombinante pour L'Elafine protège les animaux de la colite. Cet effet anti-inflammatoire de L'Elafine est porté par le domaine contenant la fonction inhibitrice de protéases. Ces données suggèrent que l'inhibition de l'activité élastolytique de la cellule épithéliale est importante pour la diminution de l'inflammation. L'activité élastolytique d'origine épithéliale aurait donc un rôle majeur dans les processus inflammatoires et plus généralement dans la pathologie des MICI.

L'implication de l'activité élastolytique dans le SCI est très peu étudiée. Une insuffisance pancréatique a été relevée chez certains patients (Leeds et al., 2010). Des auteurs ont purifié les protéases fécales de patients atteints de SCI et identifié de l'élastase pancréatique (Tooth et al., 2014)(Tooth D et al., 2010). Cependant les données du laboratoire montrent que la cellule épithéliale synthétise des protéases retrouvées aussi dans les sucs pancréatiques. Notamment l'étude de l'élastase épithéliale montre qu'elle est capable de dégrader les jonctions serrées de la barrière épithéliale augmentant ainsi la perméabilité épithéliale. Elle clive les récepteurs PARs qui sont impliqués dans l'hypersensibilité viscérale et l'inflammation. De plus, l'activité élastolytique est finement régulée par des inhibiteurs endogènes comme L'Elafine dont l'expression dans la muqueuse intestinale des patients atteints de SCI n'a jamais été décrite dans la littérature. La balance élastolytique pourrait ainsi participer aux syndromes des patients atteints de SCI et donc être un bon candidat dans l'étude des mécanismes de cette pathologie.

b) Actions directes des protéases et de leur inhibiteur sur les cellules épithéliales  
Dans les pathologies intestinales, étudié lors de ces travaux, la barrière épithéliale perd son intégrité. Cette augmentation de la perméabilité épithéliale va participer à l'inflammation. De nombreux facteurs sont impliqués dans cette perte de barrière. Les protéases jouent un rôle prépondérant. L'élastase ou encore la Trypsine-3 sont capables d'activer PAR2 (respectivement de façon biaisée ou canonique) (Dulon et al., 2003) (Knecht et al., 2007) qui un acteur majeur de l'augmentation de la perméabilité épithéliale (Cenac et al., 2004).

La perte d'intégrité de la barrière est aussi due à des phénomènes d'apoptose des cellules épithéliales (Roda et al., 2010). L'activation du récepteur PAR1 augmente l'apoptose des cellules épithéliales, neuronales, endothéliales et les fibroblastes (Flynn and Buret, 2004). Ce récepteur peut être clivé par les trypsines et plus particulièrement par la trypsine-3 (Wang et al., 2006)(Knecht et al., 2007). La trypsine-3 pourrait participer à la perte d'intégrité de la barrière via l'activation du récepteur PAR2 (augmentation directe de la perméabilité) et PAR1 (induction d'apoptose des cellules de l'épithélium).

De plus, l'élastase est aussi capable de cliver PAR1 afin d'induire l'apoptose cellulaire (Suzuki et al., 2005). L'augmentation de l'activité élastolytique dans la muqueuse

intestinale des patients atteints de MICI pourrait participer à la perte de barrière épithéliale. Cette augmentation de l'activité élastolytique est due à la sécrétion de l'élastase épithéliale mais aussi à l'infiltration des neutrophiles qui relarguent de l'élastase du neutrophile. Nos expériences *in vivo* ont montré que l'Elafine est capable de pénétrer dans la *lamina propria*, elle peut donc cibler non seulement l'élastase épithéliale mais aussi l'élastase du neutrophile. L'Elafine, via son action directe d'inhibition de l'élastase, diminuerait l'activité élastolytique et donc l'activation de PAR1, favorisant ainsi le maintien de l'intégrité de l'épithélium.

Lors de l'inflammation, l'activation de PAR2 peut empêcher l'apoptose des cellules épithéliales médiée par des signaux pro-apoptotiques provenant des cytokines pro-inflammatoires (Iablokov et al., 2014). L'élastase du neutrophile libérée par les infiltrats inflammatoires est un agoniste biaisé de PAR2. On peut donc supposer que le clivage biaisé de PAR2 sur les cellules épithéliales ne va pas permettre de diminuer l'apoptose cellulaire. L'inhibition de l'élastase du neutrophile par L'Elafine pourrait permettre à la trypsine, qui est en excès et qui clive PAR2 de manière canonique de favoriser la diminution de l'apoptose dans les cellules de l'épithélium.

Toutefois, on ne peut exclure l'hypothèse que L'Elafine pourrait avoir une action directe, indépendante de l'inhibition de l'élastase. Le SLPI (un inhibiteur d'élastase de structure très proche de celle de L'Elafine) diminue l'activité de la caspase 3 induite par le TNF $\alpha$  en condition inflammatoire. Les auteurs suggèrent que le SLPI pourrait interférer avec les voies pro-apoptotiques dans la cellule, dont la plupart sont contrôlées par des protéases. Le SLPI en inhibant directement une de ces protéases aurait pour effet d'inhiber l'apoptose (Taggart et al., 2005). Un mécanisme semblable de L'Elafine sur les cellules de l'épithélium pourrait être envisagé, elle diminuerait leur apoptose participant ainsi à la restauration de la barrière intestinale.

Afin de permettre le maintien en phase de rémission des patients atteints de MICI et de SCI, les nouvelles thérapies doivent viser à diminuer les facteurs inflammatoires et pro-nociceptifs mais doivent aussi tendre à favoriser la cicatrisation épithéliale.

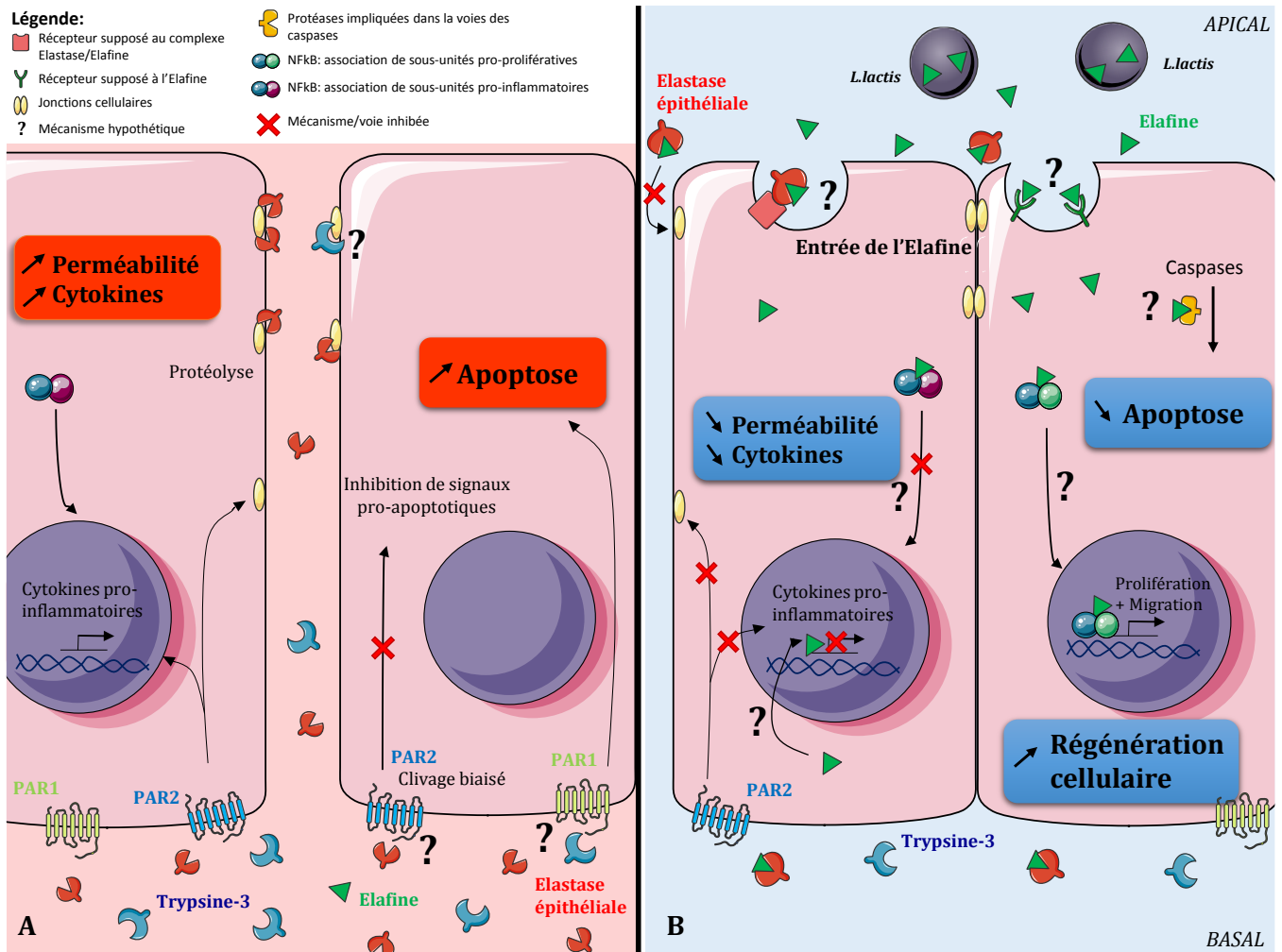
Lorsque l'épithélium intestinal subit des dommages, des phénomènes de réparation se mettent en place (Iizuka and Konno, 2011). La cicatrisation épithéliale est dépendante d'une balance très précise entre migration, prolifération et différenciation des cellules épithéliales proches de la zone lésée. De nombreux facteurs peuvent réguler ces

phénomènes comme la libération de peptides (cytokines, facteurs de prolifération...) (Sturm and Dignass, 2008), l'activation des TLRs (Harris et al., 2006), l'activation de certains facteurs de transcription (NFκB) (Shindo et al., 2006), des facteurs de l'alimentation (supplémentation en glutamine) (Sukhotnik et al., 2007) ou encore des agents gastro-protecteurs (sodium ecabet) (Sasaki et al., 2005).

Notre étude montre que L'Elafine possède d'importants effets anti-inflammatoires. De plus, des résultats non montrés dans cette thèse nous ont permis de percevoir des effets pro-régénératifs de L'Elafine sur l'épithélium intestinal. En effet, dans les différents modèles de colites, le traitement à L'Elafine protège les animaux de la maladie et permet le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale (restauration de l'architecture tissulaire de l'intestin et diminution de la perméabilité *in vivo* lors du traitement des animaux malades avec L'Elafine). L'ajout d'ELAFINE sur des cellules épithéliales intestinales en culture, en l'absence d'inflammation, augmente leur vitesse de prolifération. Ainsi, ces premières données préliminaires suggèrent que L'Elafine en complément de son action pro-inflammatoire, pourrait avoir un rôle pro-régénératif et favoriser la cicatrisation de l'épithélium intestinal en cas de lésion

De plus, notre étude montre que l'Elafine délivrée dans un contexte inflammatoire peut pénétrer dans la cellule épithéliale et potentiellement réduire la translocation de NFκB dans le noyau afin d'inhiber le phénotype pro-inflammatoire de la cellule épithéliale. Le retard de translocation de NFκB induit par l'Elafine reste à confirmer, cependant ces données et la littérature supposent un effet modulateur de l'Elafine sur ce facteur de transcription (Drannik et al., 2012). NFκB possède des effets très multiples suivant les gènes qu'il active et le contexte de son activation : il peut être pro-inflammatoire mais aussi protecteur. NFκB promeut la prolifération cellulaire (Li et al., 2012) et la survie grâce à des effets anti-apoptotiques dans les cellules épithéliales (Steinbrecher et al., 2008). Dans un contexte pro-régénératif, après un épisode inflammatoire, l'Elafine pourrait favoriser la cicatrisation tissulaire en activant une autre voie de la signalisation de NFκB.

Lors de l'inflammation, L'ELAFINE aurait donc un effet anti-inflammatoire sur la cellule épithéliale en diminuant l'apoptose des cellules de l'épithélium initiant la phase de résolution est amorcée, et favorisant la réparation cellulaire.



**Figure 1 : Les protéases épithéliales et leur inhibiteur : rôle dans la physiopathologie épithéliale**

**A : Mécanismes d'actions des acteurs épithéliaux de la balance protéolytique en condition inflammatoire sur la cellule épithéliale.**

L'augmentation de l'activité élastolytique et trypsique induit une augmentation de la perméabilité et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Pour l'activité élastolytique, ces effets peuvent se faire via le clivage de PAR2 et la protéolyse directe des jonctions cellulaires. Pour la trypsine-3, seule l'activation de PAR2 a été démontrée pour l'instant. L'apoptose est augmentée du fait de l'activation de PAR1 potentiellement activable par l'élastase et la trypsine-3. En condition inflammatoire, la sécrétion d'Elafine est diminuée.

**B : Les effets anti-inflammatoires de l'Elafine sur la cellule épithéliale.**

L'Elafine délivrée par *L.lactis* diminue l'activité trypsique et élastolytique. La perméabilité intestinale ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires sont réduites du fait de l'inhibition de l'activité élastolytique par l'Elafine. Le mécanisme d'action de ces effets pourrait inclure la diminution de la translocation de NFκB et l'encombrement par l'Elafine des sites génomiques de NFκB. L'Elafine est capable de pénétrer dans la cellule via 2 mécanismes encore hypothétiques : 1- L'entrée directe de l'Elafine ou 2- Une entrée complexée avec l'Elastase. L'Elafine augmenterait la régénération cellulaire en favorisant la migration et la prolifération de la cellule épithéliale. Ce mécanisme pourrait inclure : 1- l'inhibition des protéases de la voie des caspases et/ou 2- favoriser l'association et la translocation nucléaire de sous-unités de NFκB activatrices de gènes proliférateurs.



## 2- Les protéases et leurs inhibiteurs sont en interaction perpétuelle avec leur environnement

Les cellules épithéliales intestinales sont au cœur des processus biologiques intestinaux. Elles ont une position clé à l'interface entre le milieu intérieur et extérieur ce qui leur permet d'avoir une interaction facilitée avec de nombreux types cellulaires comme les cellules de l'immunité, les cellules neuronales, le microbiote ou encore les cellules endothéliales.

### a) Les cellules immunitaires

Chez les patients atteints de SCI, l'inflammation est dite de bas-grade car aucun signe macroscopique ou aucune lésion tissulaire ne sont visibles lors de la coloscopie. Cependant, certaines populations immunitaires sont augmentées chez ces patients (Clarke et al., 2009) comme les lymphocytes T, les neutrophiles et les mastocytes (Lee et al., 2008) (Barbara et al., 2007). De plus, les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et CXCL8 sont augmentées dans la circulation sanguine des patients atteints de SCI comparés à des patients contrôles (Dinan et al., 2006). PAR2 est associé à l'augmentation de l'inflammation intestinale. Son activation induit une infiltration granulocytaire et lymphocytaire et augmente les cytokines pro-inflammatoires de la *lamina propria* (Cenac et al., 2002). De plus, ce récepteur est exprimé par de nombreuses cellules de l'immunité. Son activation sur les cellules dendritiques promeut leur migration dans les ganglions lymphatiques et leur activation des lymphocytes T (Ramelli et al., 2010).

La Trypsine-3 est sécrétée en excès dans la *lamina propria* des patients atteints de SCI et de MICI. Elle est capable d'avoir des effets sur les cellules de son environnement comme les neurones afin de favoriser l'hypersensibilité viscérale via des mécanismes dépendant du récepteur PAR2. Dans notre étude, nous n'avons pas étudié le rôle de la trypsine-3 sur les cellules de l'immunité. Toutefois, la sécrétion au pôle basal de cette protéase entraîne une augmentation de la perméabilité épithéliale générant probablement une augmentation de l'activation des cellules dendritiques naïves dans la *lamina propria*. Cette activation accrue par des antigènes associés au clivage du récepteur PAR2 à leur surface permettrait d'augmenter leur potentialité à différencier les lymphocytes immature dans le GALT ainsi que leur migration dans la muqueuse des patients.

Le récepteur PAR1 a un rôle pro-inflammatoire lorsqu'il est clivé sur les cellules immunitaires. Son activation sur des monocytes entraîne leur sécrétion d'IFN $\gamma$ , et l'utilisation d'un antagoniste de PAR1 diminue leur production de TNF $\alpha$  (Vergnolle et al., 2006). Dans des modèles de colite pro-Th1, l'activation de PAR1 est pro-inflammatoire. La trypsine-3 est capable d'activer PAR1 (Knecht et al., 2007; Wang et al., 2006). Elle pourrait donc augmenter le phénotype pro-inflammatoire des cellules immunitaires via l'activation de PAR1.

Ainsi la trypsine-3 pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'inflammation chez les patients atteints de SCI et les patients atteints de MICI grâce à l'activation des récepteurs PAR1 et PAR2 directement sur les cellules de l'immunité.

De la même manière, lors de l'inflammation chronique de la muqueuse intestinale chez les patients atteints de MICI, l'activité élastolytique produite en excès pourrait activer les cellules de l'immunité et participer à l'entretien de l'inflammation. Le traitement avec L'Elafine produite par *L.lactis*, via l'inhibition de l'activité élastolytique pourrait donc réduire l'activation de ces cellules immunitaires. Des données du laboratoire montrent que lors de la colite, le traitement à L'Elafine diminue l'infiltration des macrophages et des lymphocytes T dans la muqueuse infiltrée (Motta et al., 2012). Des résultats complémentaires montrent que cette réduction de cellules de l'immunité est corrélée avec une diminution de cytokines chimioattractantes (RANTES) et une diminution des sous-populations lymphocytaires Th1 et Th17. Cette diminution de la différenciation des lymphocytes peut être due à une diminution de leur prolifération induite par les cellules dendritiques (CD). L'ELAFINE pourrait agir directement sur les CD au niveau du site inflammatoire et interférer avec leur activation et/ou leur capacité à rejoindre le ganglion mésentérique. De plus, le pourcentage de Th1 et de Th17 étant réduit, la capacité des CD à polariser les lymphocytes pourrait être altérée. En effet, l'activation de PAR2 sur les CD induit leur maturation et favorise leur capacité à polariser les lymphocytes T en Th1 (Csernok et al., 2006).

Lors du traitement à L'Elafine, la diminution du recrutement des lymphocytes et des macrophages pourrait être due à la réduction de la chimiokine RANTES. Cette cytokine est augmentée chez les patients atteints de MICI (Kmieć, 1998). L'expression de RANTES est sous la dépendance du facteur de transcription NF $\kappa$ B (Zoja et al., 1998), or L'Elafine est capable de moduler NF $\kappa$ B (Butler et al., 2006). Sa capacité à pénétrer dans la cellule

épithéliale pourrait lui permettre de diminuer l'activation de NFκB ce qui aurait pour conséquence de réduire la production de RANTES par la cellule épithéliale (van Deventer, 1997) et ainsi de diminuer l'infiltration des macrophages sur le site inflammatoire. De plus, une étude de McElvaney et al., montre que le SLPI, un inhibiteur d'élastase de structure similaire à L'Elafine est capable de pénétrer dans les monocytes et plus particulièrement dans leur noyau où il interagit avec les domaines de liaison à l'ADN de NFκB (Taggart et al., 2005). De la même manière, L'Elafine pourrait pénétrer dans les monocytes et réduire leur activation via la modulation de NFκB.

L'ELAFINE pourrait donc jouer un rôle majeur dans la diminution de l'inflammation via la modulation directe des cellules immunitaires.

#### b) Les cellules neuronales

Les patients atteints de MICI peuvent souffrir de douleur abdominale (Bielefeldt et al., 2009). Des études menées au laboratoire ont montré que lors de la colite, des souris traitées avec L'Elafine ont une hypersensibilité viscérale diminuée. Les neurones sensitifs expriment à leur surface des récepteurs PARs (Fiorucci et al., 2001). La diminution de l'activité protéolytique de la muqueuse intestinale induite par L'Elafine (trypsique et élastolytique (Motta et al., 2012)) pourrait réduire l'activation de ces neurones et participer à la réduction de l'hypersensibilité viscérale. Le même effet analgésique de L'Elafine a été observé dans un modèle d'hypersensibilité induite par l'administration intra-rectale d'huile de moutarde (données du laboratoire). Dans ce modèle, l'inhibition de PAR2 (souris KO ou inhibiteur pharmacologique) diminue l'hyperalgésie viscérale (Cenac et al., 2007). On peut donc supposer que L'Elafine ses nombreuses propriétés, réduit l'activation de PAR2 et donc la sensibilité viscérale induite par l'administration d'huile de moutarde. Ces travaux suggèrent un rôle bénéfique de L'Elafine dans les pathologies aux composantes de douleurs viscérales comme le SCI ou les MICI.

Dans le SCI et les MICI, outre la sensibilité viscérale, les patients souffrent de troubles gastro-intestinaux importants comme une modification de la motricité intestinale entraînant des diarrhées ou des constipations. Nos travaux ont montré que la trypsine-3 sécrétée en quantité importante chez les patients atteint de SCI et de MICI est capable d'activer les neurones du plexus sous muqueux et myentériques via une signalisation

dépendante de PAR2. Dans le colon, les neurones myentériques répondent aux agonistes de PAR2 en augmentant leur excitabilité (Linden et al., 2001). Certains de ces neurones sont des motoneurones excitateurs qui libèrent de l'acétylcholine entraînant une contraction des muscles lisses. D'autres sont des neurones inhibiteurs qui relarguent un cocktail de transmetteurs (NO, ATP...) qui auront pour effet d'inhiber la contraction des muscles circulaires lisses (Schemann, 2005). Une modulation de l'excitabilité des neurones activateurs et inhibiteurs aura pour conséquence une modification de la motricité intestinale entraînant des diarrhées ou des constipations. L'activation de PAR2 sur des neurones sous-muqueux peut affecter l'excitabilité des neurones inhibiteurs (Gao et al., 2002), la sécrétion des fluides et le transport des électrolytes dans l'intestin (Reed et al., 2003).

Les canaux ENaC (Epithelial sodium Channels) présent sur les cellules épithéliales intestinales régulent l'absorption de sodium dans le côlon (Singh et al., 2014). Chez les patients atteints de MC, l'expression de ces canaux ENaC sont réduits, ce qui contribue aux symptômes de diarrhée (Zeissig et al., 2008). En condition physiologique, le clivage de ces récepteurs par la trypsine-3 participe à l'absorption intestinale (Haerteis et al., 2014). Cependant, en condition pathologique, l'activité trypsique est fortement augmentée. Cette forte activité pourrait cliver de manière excessive des récepteurs sur d'autres sites et les rendre inactif et/ou accélérer leur recyclage entraînant une présence réduite des canaux à la membrane (Sullivan et al., 2009) ce que diminuerait fortement l'absorption de sodium intestinal et favoriserait des symptômes de diarrhées chez les patients atteints de SCI ou de MICI.

Ainsi chez les patients atteints de SCI et de MICI, la trypsine-3 pourrait aussi participer aux symptômes gastro-intestinaux de diarrhée et de constipation de ces patients grâce à la modulation de l'excitabilité des neurones du SNE via l'activation du récepteur PAR2 ainsi que par la modulation et l'activation des canaux ENaC. L'ensemble de ces pistes pourraient être explorées dans des études ancillaires.

### c) Le microbiote

Chez les patients atteints de MICI ou de SCI, la barrière épithéliale est rompue. L'activité protéolytique de la muqueuse intestinale est augmentée (Cenac et al., 2007; Motta et al., 2012; Rolland-Fourcade et al., 2017). Cette activité protéolytique et notamment l'élastase et les trypsines participent à la rupture de barrière via le clivage direct des

jonctions cellulaires et l'activation des PARs (Chin et al., 2008)(Chin et al., 2008). De plus, l'élastase est capable de dégrader les protéines MUC2 ce qui induit un relâchement de la couche de mucus (données du laboratoire). La perte d'intégrité du mucus induite par l'activité élastolytique pourrait permettre aux bactéries commensales de favoriser leur adhésion aux cellules épithéliales et d'induire leurs effets pathogènes sur l'organisme.

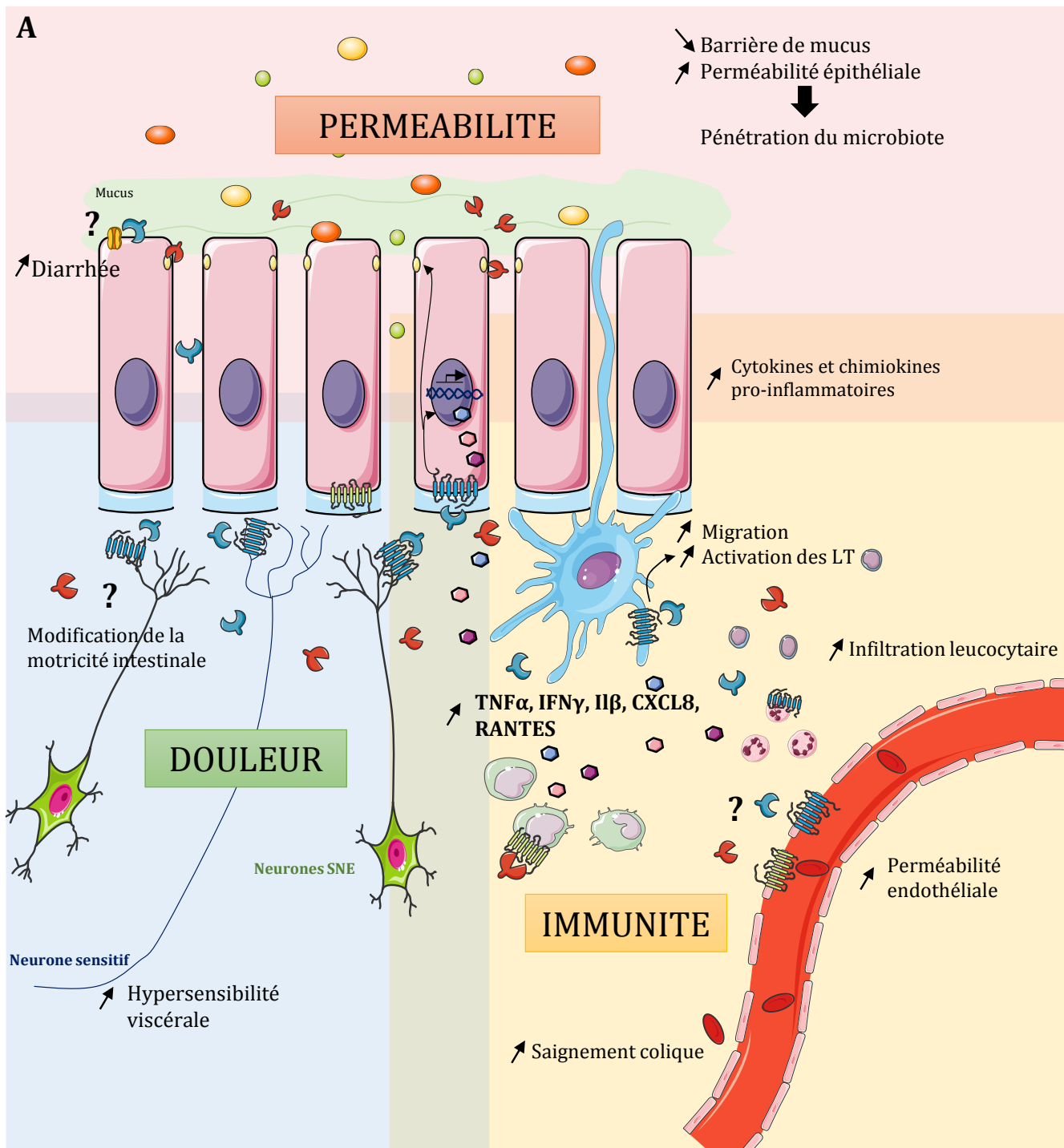
Ces actions combinées des protéases sur la barrière épithéliale favorisent la pénétration du microbiote intestinale dans la muqueuse ce qui participe à l'inflammation intestinale. L'ELAFINE en inhibant l'activité élastolytique pourrait diminuer cet effet de l'élastase sur la barrière épithéliale et réduire le passage du microbiote luminal dans la muqueuse entretenant ainsi une réponse inflammatoire dans l'intestin. L'ELAFINE possède des propriétés antimicrobiennes (Baranger et al., 2008). Lors d'un traitement par L'Elafine, sa présence dans la lumière intestinale pourrait réduire la quantité de bactéries pénétrant et se multipliant dans la muqueuse et ainsi réduire la stimulation du système immunitaire et donc l'inflammation intestinale. Cependant, lors d'un traitement à long terme avec L'Elafine, cette diminution de la prolifération de certaines bactéries pourrait induire une modification du microbiote intestinal et favoriser la dysbiose des patients en permettant à des bactéries pathogènes de s'implanter.

Aucune étude ne s'intéresse au rôle de la Trypsine-3 sur le microbiote intestinal. De plus, nos travaux montrent que la Trypsine-3 est relarguée au niveau du pôle basolatéral de la cellule épithéliale suggérant un rôle de cette trypsine au niveau des populations de la *lamina propria*, plutôt qu'au niveau du microbiote qui est présent dans la lumière intestinale.

#### d) Les cellules endothéliales

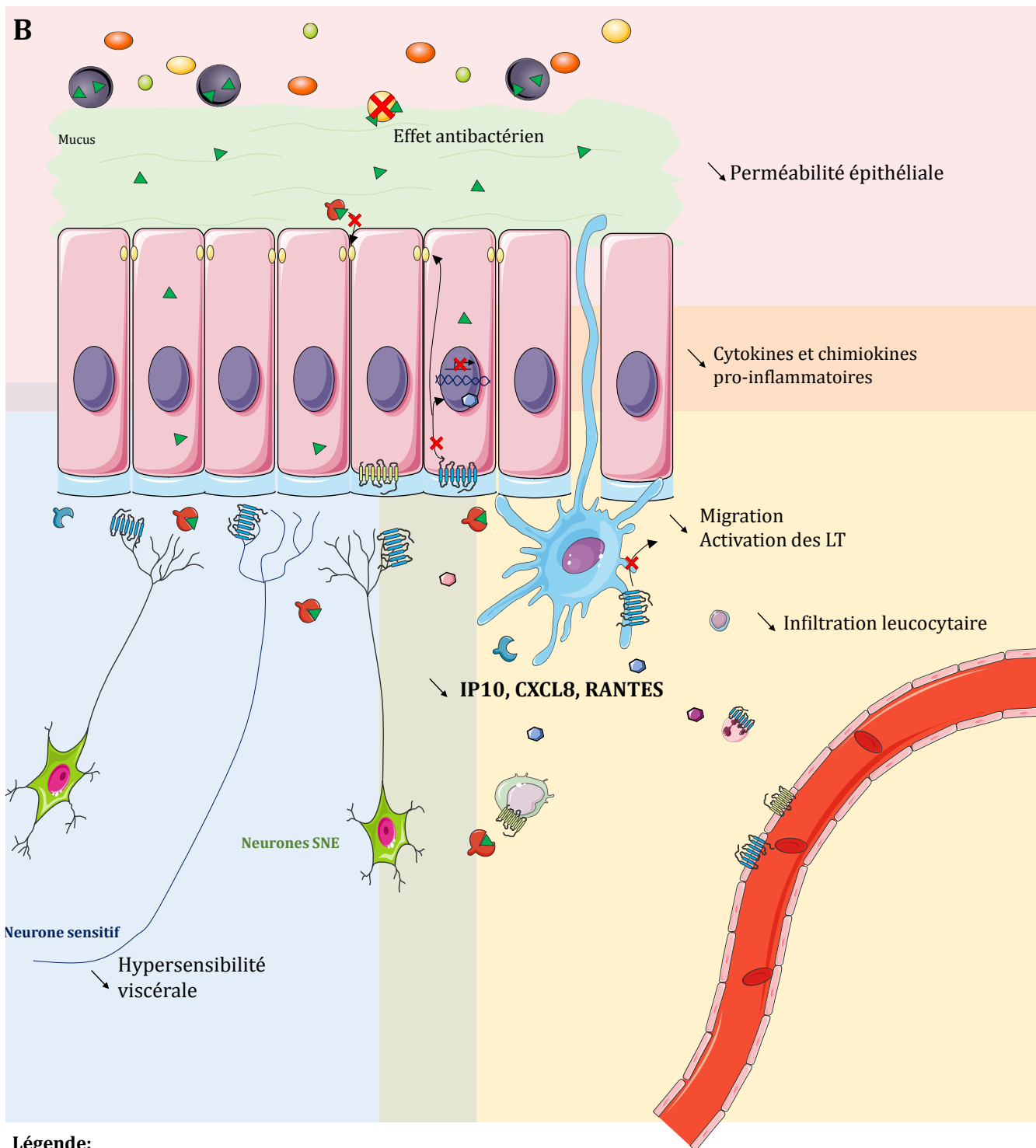
Les récepteurs PARs sont aussi exprimés sur les cellules endothéliales. L'activation de PAR2 induit une forte diminution de l'expression de la Ve-cadhérine, protéine de jonction serrée des cellules endothéliales (Zhang and Ge, 2017). Cette activation de PAR2 entraîne une perte de la barrière endothéliale. D'autres études montrent un effet vasodilatateur de l'activation de PAR2 sur les cellules endothéliales (Kagota et al., 2016; Roviezzo et al., 2005). Dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MICI et de SCI, l'augmentation de l'activité protéolytique pourrait participer à l'activation de PAR2

sur les cellules endothéliales entraînant ainsi une augmentation de la perméabilité de la barrière endothéliale. Cela aurait pour conséquence une augmentation des saignements coliques, symptômes importants des pathologies du SCI et des MICI.



**Légende:**

- |                      |   |                      |
|----------------------|---|----------------------|
| Elastase épithéliale | Microbiote                                  | Macrophage           |
| Trypsine-3           | Cytokines et chimiokines pro-inflammatoires | Neutrophile          |
| PAR1                 | Canaux ENaC                                 | Lymphocyte T (LT)    |
| PAR2                 | Jonction cellulaire                         | Globule rouge        |
| Elafine              | Neurones                                    | Cellule dendritique  |
|                      |   | Cellule endothéliale |
|                      |   | Cellule épithéliale  |



**Légende:**

- |                      |   |  |
|----------------------|---|--|
| Elastase épithéliale | Microbiote                                  | Macrophage                                 |
| Trypsine-3           | Cytokines et chimiokines pro-inflammatoires | Neutrophile                                |
| PAR1                 | Canaux ENaC                                 | Lymphocyte T (LT)                          |
| PAR2                 | Jonction cellulaire                         | Globule rouge                              |
| Elafine              | Neurones                                    | Cellule dendritique                        |
|                      |   | Cellule endothéliale                       |
|                      |   | <i>L.Lactis</i> recombinate pour l'Elafine |



**Figure 2: Les protéases épithéliales et leurs inhibiteurs communiquent activement avec les cellules de leur environnement.**

**A: Les protéases participent à l'augmentation de la perméabilité épithéliale, à la douleur et à l'immunité chez les patients atteints de MICI et de SCI.**

L'activation du récepteur PAR2 sur les neurones augmente la sensibilité viscérale et pourrait participer à la perturbation de la motricité. Le clivage excessif des canaux ENaC pourrait augmenter les symptômes de diarrhée. L'augmentation de la perméabilité est due à la dégradation des jonctions cellulaires par les protéases ainsi qu'au clivage de PAR2 sur la cellule épithéliale. De plus, l'élastase épithéliale clive MUC2, ce qui favoriserait la diminution de la barrière de mucus. La modification de ces différents paramètres pourrait accélérer la pénétration du microbiote dans la muqueuse intestinale et participer à l'augmentation de l'inflammation. Le clivage de PAR2 sur les cellules dendritiques augmente leur migration et leur capacité à activer les LT. L'infiltration des cellules immunitaires augmente ainsi que les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires produites. L'activation des PARs par la Trypsine-3 ou l'élastase sur les cellules endothéliales pourrait augmenter la perméabilité cellulaire.

**B: L'Elafine délivrée par *L.lactis* protège la muqueuse intestinale de l'inflammation et de la douleur.**

Le traitement à l'ELAFINE diminue l'activité élastolytique et trypsique. Elle réduit l'hypersensibilité viscérale, l'augmentation de la perméabilité et la production de cytokines pro-inflammatoires. Elle possède des effets antimicrobiens. L'Elafine diminue l'infiltration des macrophages, neutrophiles, LT et des chimiokines pro-inflammatoires comme RANTES.

### 3- Les inhibiteurs de protéases : vers un développement de nouvelles thérapeutiques ?

Au cours de l'inflammation, le tractus digestif est exposé à de nombreuses protéases à sérine (élastase du neutrophile, protéinase-3, tryptase...). Dans des pathologies comme les MICI ou le SCI, les activités élastolytiques et trypsiques sont augmentées dans la muqueuse intestinale. Ces protéases vont promouvoir l'inflammation notamment grâce à l'activation des récepteurs PARs. Ces récepteurs peuvent envoyer des messages douloureux, augmenter l'activation des cellules immunitaires, modifier la motricité ou encore stimuler la prolifération cellulaire (Vergnolle, 2009, 2016). Cependant ces récepteurs sont exprimés dans tous les organes du tractus digestif et modulent des fonctions physiologiques. L'utilisation d'antagonistes de ces récepteurs afin de réduire l'inflammation serait donc à considérer avec précautions. La stratégie développée par notre équipe est plutôt de modifier l'activité de leurs agonistes, les protéases à sérine car elles sont accessibles depuis la lumière.

a) Le potentiel thérapeutique de L'ELAFINE dans la bactérie probiotique *L.lactis*

De nombreuses thérapies ont été développées pour diminuer les symptômes et améliorer la qualité de vie des patients atteints de MICI. Cependant, un grand nombre de ces patients (20 à 40%) deviennent résistants aux traitements. Pour éviter les chirurgies palliatives, d'autres possibilités sont étudiées dans les MICI, notamment l'utilisation de probiotiques (Rolfe et al., 2006). Des études réalisées chez les patients atteints de RCH (Mallon et al., 2007) et de MC (Fujimori et al., 2007) ont pu mettre en évidence qu'un traitement avec des probiotiques en supplément de thérapies conventionnelles peut améliorer la qualité de vie des patients en diminuant les symptômes de la maladie. Cependant les probiotiques ne permettent pas une rémission. Il semble donc nécessaire d'améliorer les effets probiotiques de ces bactéries afin d'avoir un réel effet bénéfique sur ces pathologies. Dans notre étude, nous utilisons une bactérie lactique probiotique recombinante pour L'Elafine, une molécule capable de pénétrer dans la cellule épithéliale grâce à son domaine inhibiteur de protéase et d'avoir des effets anti-inflammatoires. Cette bactérie ELAFINE démontre un fort potentiel thérapeutique pour un traitement à long terme et peu onéreux contre l'inflammation intestinale chronique.

Cependant, la compréhension des mécanismes protecteurs de L'Elafine *in vivo* est indispensable pour le développement de thérapies et l'évaluation de potentiels effets secondaires. L'utilisation des bactéries recombinantes pour L'Elafine mutante dans des expériences de colites aiguës et chroniques ne nous a pas permis de conclure sur le domaine de L'Elafine impliqué dans cet effet protecteur de L'Elafine (données non montrées). En effet, bien que L'Elafine native soit toujours protectrice dans toutes nos expériences *in vivo*, les différents mutants donnent des résultats différents d'une expérience à l'autre. Dans ces modèles de colites, notamment le DSS, le microbiote des animaux traités est profondément impacté et modifié (Håkansson et al., 2015). Les bactéries recombinantes pour les ELAFINE mutantes pourraient être moins résistantes que celles produisant L'Elafine native et donc plus touchées par l'environnement microbiotique altéré dû au traitement par le DSS. Nous avons donc isolé des bactéries présentes dans les fèces de souris ayant subies une première colite au DSS durant 7 jours afin de sélectionner des bactéries résistantes à cet environnement. Ces bactéries sont capables de produire la protéine ELAFINE (mutée ou non) en quantité semblable. Elles ont ensuite été utilisées dans de nouvelles colites. Les résultats de ces colites ne

nous ont toujours pas permis de conclure car ils ne sont pas reproductibles. Le mode d'action de L'Elafine dans un contexte physiopathologique est donc très complexe. Cela pourrait s'expliquer par des effets pleiotropiques sur l'ensemble de l'environnement cellulaire (actions sur les cellules épithéliales, sur les cellules immunitaires, sur le microbiote). Ainsi, la perte d'un domaine pourrait être compensée par les effets de l'autre lorsque l'environnement est propice. De nouvelles investigations sont nécessaires afin de décrypter les mécanismes d'actions de L'Elafine sur les différents types cellulaires avec lesquels elle est en contact dans le tractus intestinal lors de l'inflammation.

Dans notre étude *in vitro*, c'est le domaine portant la fonction inhibitrice de l'activité protéolytique qui confère à L'Elafine ces propriétés anti-inflammatoires et participe à son entrée dans la cellule épithéliale. Le domaine antimicrobien n'a aucun effet sur ces paramètres. Ces données suggèrent que seule la partie portant le domaine inhibiteur de protéase, serait nécessaire à la protection que l'Elafine possède. De plus, la fonction régulatrice de NFkB ne serait pas due à la charge positive de l'Elafine. D'autres études sont nécessaires afin de vérifier cette hypothèse. Cependant, s'affranchir de la partie antimicrobienne lors du traitement par l'Elafine des patients atteints de MICI pourrait permettre de ne pas modifier le microbiote des patients qui est déjà altéré (Matsuoka and Kanai, 2015). Une perspective de notre étude est de comparer le microbiote de souris traitées ou non avec L'Elafine lors de la colite afin de mettre en évidence les variations de populations bactériennes induites par le traitement avec l'Elafine.

#### b) Développement d'un inhibiteur spécifique de la trypsine-3

La trypsine-3 joue un rôle important dans les symptômes des patients atteints de SCI et de MICI. Afin de soulager ces patients, une thérapeutique basée sur l'inhibition spécifique de cette protéase pourrait être envisagée.

Une stratégie similaire à celle utilisée avec L'Elafine aurait pu être imaginée : trouver un inhibiteur endogène de la trypsine-3 et l'apporter en excès dans le tractus afin d'inhiber l'activité de la trypsine-3. Cependant cette protéase possède des propriétés particulières qui lui confèrent la capacité de résister à la plupart des inhibiteurs protéiques. De plus, aucun inhibiteur endogène ou petite molécule chimique spécifique de la trypsine-3 n'est

encore connu. L'utilisation d'un inhibiteur plus large spectre inhiberait aussi les trypsines cationiques et anioniques nécessaires à la digestion.

L'utilisation d'un anticorps spécifique anti-trypsine-3 pourrait être envisagée. Ce type d'anticorps bloquant est déjà utilisé pour le traitement de pathologies intestinales, par exemple pour l'inhibition d'une cytokine pro-inflammatoire (le TNF $\alpha$ ) dans les MICI, et a prouvé son efficacité (Ben-Horin et al., 2014). L'administration d'un tel anticorps anti-trypsine-3 pourrait avoir un effet directement dans la muqueuse intestinale où la trypsine-3 est sécrétée et bloquer son activité. La trypsine-3 est exprimée faiblement par le pancréas et aurait pour rôle de contrôler l'inhibition des trypsines pancréatiques grâce à sa capacité à cliver certains inhibiteurs de trypsines (Salameh and Radisky, 2013). La bonne digestion des patients devrait donc être à surveiller avec l'utilisation d'un tel inhibiteur. La trypsine-3 est aussi décrite comme étant exprimée dans le cerveau et impliquée dans l'inflammation neurogénique (Knecht et al., 2007). Cependant, un anticorps n'étant pas capable de franchir la barrière hémato-encéphalique permettrait d'éviter les effets secondaires au niveau du système nerveux central.

A terme le développement d'un inhibiteur spécifique de la trypsine-3 pourrait permettre de soulager les symptômes des patients atteints de SCI et de MICI.

## CONCLUSION GENERALE

Les pathologies intestinales comme les MICI ou le SCI ont une incidence grandissante dans le monde. Aucun traitement ne permet encore de traiter efficacement ces pathologies. La mise au point de nouvelles thérapeutiques est donc un enjeu majeur. Celle-ci peut être possible grâce au décryptage des mécanismes et des acteurs impliqués dans ces maladies. Il est important pour le développement de ces pistes thérapeutiques de s'intéresser aux médiateurs de l'inflammation et de la douleur mais aussi, dans le but de maintenir les patients dans des phases de rémission, de prendre en compte la cicatrisation et la reconstruction des tissus lésés. Le retour à l'homéostasie des tissus n'est possible qu'en agissant sur ces acteurs de l'équilibre tissulaire, dérégulés lors des pathologies.

Notre laboratoire étudie les protéases sécrétées dans l'intestin en condition d'homéostasie tissulaire mais aussi pathologique. Ce travail de thèse s'est intéressé plus particulièrement aux protéases sécrétées par l'épithélium intestinal chez les patients atteints de MICI et de SCI. Nous avons pu montrer le rôle central de la cellule épithéliale dans les pathologies intestinales grâce à la sécrétion de protéases (trypsine et élastase) qui vont avoir un effet amplificateur de l'inflammation et de la douleur.

De plus, ces cellules épithéliales sont dérégulées et présentent une diminution de l'expression d'un régulateur de l'activité élastolytique : L'Elafine. Cet inhibiteur de protéase capable de pénétrer dans les cellules, possède des effets anti-inflammatoires et pro-régénératifs pleiotropiques impliquant très fortement son domaine inhibiteur de protéase suggérant un rôle fondamental de l'élastase dans l'inflammation.

Ce travail de thèse montre l'importance de l'épithélium dans le contrôle de l'homéostasie et dans le maintien de pathologies intestinales. La cellule épithéliale est une cellule clé à cibler pour les nouvelles thérapies visant à traiter les MICI et le SCI, tant pour son rôle pro-inflammatoire actif dans ces pathologies via tous les médiateurs qu'elle produit, que pour son rôle architectural dans les tissus.

## ANNEXE

### Publication scientifique :

*Epithelial expression and function of trypsin-3 in irritable bowel syndrome.* **Rolland-Fourcade C**, Denadai-Souza A, Cirillo C, Lopez C, Jaramillo JO, Desormeaux C, Cenac N, Motta JP, Larauche M, Taché Y, Berghe PV, Neunlist M, Coron E, Kirzin S, Portier G, Bonnet D, Alric L, Vanner S, Deraison C, Vergnolle N. Gut 2017 Jan 17. pii: gutjnl-2016-312094. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312094

### Brevet :

*Ep N° 16 306 760,6: "Method of treatment of gut disease such as irritable bowel syndrome (IBS)"*

### Communications orales:

Núria Solà Tapias, Alexandre Denadai-Souza, **Claire Rolland-Fourcade**, Catherine Blanpied, Anissa Edir, Corinne Rolland, Delphine Bonnet, Laurent Alric, Guillaume Portier, Gilles Dietrich, Chrystelle Bonnart, Céline Deraison, Nathalie Vergnolle, Frédérick Barreau. Endoplasmic reticulum stress increases trypsin-3 activity in enterocytes and alters barrier function Oct 2017 United European Gastroenterology (UEG) • Barcelona, Spain

Núria Solà Tapias, Alexandre Denadai-Souza, **Claire Rolland-Fourcade**, Catherine Blanpied, Anissa Edir, Corinne Rolland, Delphine Bonnet, Laurent Alric, Guillaume Portier, Gilles Dietrich, Chrystelle Bonnart, Céline Deraison, Nathalie Vergnolle, Frédérick Barreau. Ulcerative colitis-associated endoplasmic reticulum stress induces trypsin activity affecting innate immune response. July 2017 International Congress of Mucosal Immunology (ICMI) • Washington D.C, USA

**Rolland-Fourcade C.**, Denadai-Souza A., Cirillo C., Motta JP., Bautzova T., Cenac N., Spreadbury I., Vanner S., Deraison C., Vergnolle N. L'épithélium intestinal est source de l'activité trypsine sécrétée dans le colon des patients atteints du Syndrome du Colon Irritable. Au :CECED, Lille, mars 2016

**Rolland-Fourcade C.**, Denadai-Souza A., Motta JP., Bautzova T., Cenac N., Spreadbury I., Vanner S., Deraison C., Vergnolle N. Epithelial trypsin signals to sensory neurons : release in Irritable Bowel Syndrome. Au NeuroGASTRO, Istanbul, juin 2015

**Rolland-Fourcade C.**, Denadai-Souza A., Motta JP., Bautzova T., Cenac N., Spreadbury I., Vanner S., Deraison C., Vergnolle N. Epithelial mesotrypsin in IBS : expression and function. Au Digestive Dease Week, Washington, mai 2015

**Rolland-Fourcade C.**, Denadai-Souza A., Motta JP., Bautzova T., Cenac N., Spreadbury I., Vanner S., Deraison C., Vergnolle N. L'épithélium participe à la dérégulation de la balance protéolytique lors de l'inflammation : implication de la mésotrypsine. Au CECED, Paris, mars 2014

### **Communications affichées :**

Núria Solà Tapias, Alexandre Denadai-Souza, **Claire Rolland-Fourcade**, Catherine Blanpied, Anissa Edir, Corinne Rolland, Delphine Bonnet, Laurent Alric, Guillaume Portier, Gilles Dietrich, Chrystelle Bonnart, Céline Deraison, Nathalie Vergnolle, Frédérick Barreau. Intestinal epithelial cells under endoplasmic reticulum stress boosts serine proteolytic activity and modulates barrier function Feb 2017 European Crohn Colitis Organization (ECCO) • Barcelona, Spain.

Núria Solà Tapias, Alexandre Denadai-Souza, **Claire Rolland-Fourcade**, Catherine Blanpied, Anissa Edir, Corinne Rolland, Delphine Bonnet, Laurent Alric, Guillaume Portier, Gilles Dietrich, Chrystelle Bonnart, Céline Deraison, Nathalie Vergnolle, Frédérick Barreau. Endoplasmic reticulum stress enhances the release of serine proteases by epithelial cells altering the intestinal barrier function. Oct 2016 United European Gastroenterology (UEG) • Vienna, Austria

Núria Solà Tapias, Alexandre Denadai-Souza, **Claire Rolland-Fourcade**, Catherine Blanpied, Anissa Edir, Corinne Rolland, Delphine Bonnet, Laurent Alric, Guillaume Portier, Gilles Dietrich, Chrystelle Bonnart, Céline Deraison, Nathalie Vergnolle, Frédérick Barreau. Endoplasmic reticulum stress alters the gut barrier function by modulating the proteolytic activity of intestinal. May 2016 Digestive Disease Week (DDW) • San Diego, USA

**Rolland-Fourcade C.**, Denadai-Souza A., Motta JP., Bautzova T., Cenac N., Spreadbury I., Vanner S., Deraison C., Vergnolle N. Epithelial cells release trypsin activity in inflammatory condition : role in Irritable Bowel syndrome. Au World Congress of Inflammation, août 2015

**Rolland-Fourcade C.**, Denadai-Souza A., Motta JP., Bautzova T., Cenac N., Spreadbury I., Vanner S., Deraison C., Vergnolle N. Intestinal epithelial cells release trypsin activity : relevance of Irritable Bowel Syndrome symptoms. Au 7ème colloque de protéolyse cellulaire, Sète, mai 2015

**Rolland-Fourcade C.**, Denadai-Souza A., Motta JP., Bautzova T., Cenac N., Spreadbury I., Vanner S., Deraison C., Vergnolle N. Intestinal epithelial cells through meotrypsin's secretion are involved in Irritable Bowel Syndrome. Au Canadian Digestive Disease Week, Banff (Canada), janvier 2015

**Rolland-Fourcade C.**, Boué J., Motta JP., Basso L., Dietrich G., Deraison C., Vergnolle N. ELAFIN alters immune cell recruitment in inflamed intestine. A ICMI, Vancouver, juin 2013

### **Autres activités scientifiques:**

**Membre du conseil de laboratoire de l'IRSD** pendant ma thèse

**Journée de la science 2013 et 2014**, accueil des lycéens et présentation des techniques de culture cellulaire et de microscopie

**Organisation de séminaire de prestige** par les doctorants

**Encadrement d'étudiants** en stage de M1 et M2

### **Prix :**

**Obtention d'une 4<sup>ème</sup> année financée par le FRM** : Par quel(s) mécanisme(s) L'Elafine produite par une bactérie lactique protège de l'inflammation intestinale ?



## REFERENCES

- Adams, M.N., Ramachandran, R., Yau, M.-K., Suen, J.Y., Fairlie, D.P., Hollenberg, M.D., and Hooper, J.D. (2011). Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol. Ther.* *130*, 248–282.
- Aerssens, J., Hillsley, K., Peeters, P.J., de Hoogt, R., Stanisiz, A., Lin, J.-H., Van den Wyngaert, I., Göhlmann, H.W., Grundy, D., Stead, R.H., et al. (2007). Alterations in the brain-gut axis underlying visceral chemosensitivity in *Nippostrongylus brasiliensis*-infected mice. *Gastroenterology* *132*, 1375–1387.
- Akbar, A., Walters, J.R.F., and Ghosh, S. (2009). Review article: visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome: molecular mechanisms and therapeutic agents. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *30*, 423–435.
- Al-Chaer, E.D., Kawasaki, M., and Pasricha, P.J. (2000). A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development. *Gastroenterology* *119*, 1276–1285.
- Almeida, T.A., Rojo, J., Nieto, P.M., Pinto, F.M., Hernandez, M., Martín, J.D., and Candenás, M.L. (2004). Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr. Med. Chem.* *11*, 2045–2081.
- Amadesi, S., Nie, J., Vergnolle, N., Cottrell, G.S., Grady, E.F., Trevisani, M., Manni, C., Geppetti, P., McRoberts, J.A., Ennes, H., et al. (2004). Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 4300–4312.
- Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A.H., Schöneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2002). Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.* *115*, 4969–4976.
- Andersson, R.E., Olaison, G., Tysk, C., and Ekblom, A. (2003). Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* *124*, 40–46.
- Andoh, A., Tsujikawa, T., and Fujiyama, Y. (2003). Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Curr. Pharm. Des.* *9*, 347–358.
- Andoh, A., Deguchi, Y., Inatomi, O., Yagi, Y., Bamba, S., Tsujikawa, T., and Fujiyama, Y. (2006). Immunohistochemical study of chymase-positive mast cells in inflammatory bowel disease. *Oncol. Rep.* *16*, 103–107.
- Andoh, A., Imaeda, H., Aomatsu, T., Inatomi, O., Bamba, S., Sasaki, M., Saito, Y., Tsujikawa, T., and Fujiyama, Y. (2011). Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Gastroenterol.* *46*, 479–486.
- Annaházi, A., Gecse, K., Dabek, M., Ait-Belgnaoui, A., Rosztóczy, A., Róka, R., Molnár, T., Theodorou, V., Wittmann, T., Bueno, L., et al. (2009). Fecal proteases from diarrheic-IBS

and ulcerative colitis patients exert opposite effect on visceral sensitivity in mice. *Pain* 144, 209–217.

Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Filì, L., Ferri, S., Frosali, F., et al. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 204, 1849–1861.

Apkarian, A.V., Bushnell, M.C., Treede, R.-D., and Zubieta, J.-K. (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 9, 463–484.

Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J.R., Pfeffer, K., Coffey, P.J., et al. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504, 451–455.

Asfaha, S., Brussee, V., Chapman, K., Zochodne, D.W., and Vergnolle, N. (2002). Proteinase-activated receptor-1 agonists attenuate nociception in response to noxious stimuli. *Br. J. Pharmacol.* 135, 1101–1106.

Auffray, C., Fogg, D.K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N., Leemput, J., Bigot, K., Campisi, L., Abitbol, M., et al. (2009). CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J. Exp. Med.* 206, 595–606.

Augé, C., Balz-Hara, D., Steinhoff, M., Vergnolle, N., and Cenac, N. (2009). Protease-activated receptor-4 (PAR 4): a role as inhibitor of visceral pain and hypersensitivity. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 21, 1189–e107.

Auvin, S., Molinié, F., Gower-Rousseau, C., Brazier, F., Merle, V., Grandbastien, B., Marti, R., Lerebours, E., Dupas, J.-L., Colombel, J.-F., et al. (2005). Incidence, clinical presentation and location at diagnosis of pediatric inflammatory bowel disease: a prospective population-based study in northern France (1988-1999). *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 41, 49–55.

Axelsson, L.G., Landström, E., Goldschmidt, T.J., Grönberg, A., and Bylund-Fellenius, A.C. (1996). Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* 45, 181–191.

Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915–1920.

Bae, J.-S., Kim, Y.-U., Park, M.-K., and Rezaie, A.R. (2009). Concentration dependent dual effect of thrombin in endothelial cells via Par-1 and Pi3 Kinase. *J. Cell. Physiol.* 219, 744–751.

Bae, J.-S., Kim, I.-S., and Rezaie, A.R. (2010). Thrombin down-regulates the TGF-beta-mediated synthesis of collagen and fibronectin by human proximal tubule epithelial cells through the EPCR-dependent activation of PAR-1. *J. Cell. Physiol.* 225, 233–239.

- Banasaz, M., Norin, E., Holma, R., and Midtvedt, T. (2002). Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 3031–3034.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245–252.
- Bank, U., Küpper, B., Reinhold, D., Hoffmann, T., and Ansorge, S. (1999). Evidence for a crucial role of neutrophil-derived serine proteases in the inactivation of interleukin-6 at sites of inflammation. *FEBS Lett.* *461*, 235–240.
- Baranger, K., Zani, M.-L., Chandenier, J., Dallet-Choisy, S., and Moreau, T. (2008). The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function. *FEBS J.* *275*, 2008–2020.
- Barbara, G., De Giorgio, R., Deng, Y., Vallance, B., Blennerhassett, P., and Collins, S.M. (2001). Role of immunologic factors and cyclooxygenase 2 in persistent postinfective enteric muscle dysfunction in mice. *Gastroenterology* *120*, 1729–1736.
- Barbara, G., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Cremon, C., Cottrell, G.S., Santini, D., Pasquinelli, G., Morselli-Labate, A.M., Grady, E.F., Bunnett, N.W., et al. (2004). Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* *126*, 693–702.
- Barbara, G., Wang, B., Stanghellini, V., de Giorgio, R., Cremon, C., Di Nardo, G., Trevisani, M., Campi, B., Geppetti, P., Tonini, M., et al. (2007). Mast Cell-Dependent Excitation of Visceral-Nociceptive Sensory Neurons in Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* *132*, 26–37.
- Barbara, G., Cremon, C., Giorgio, R.D., Dothel, G., Zecchi, L., Bellacosa, L., Carini, G., Stanghellini, V., and Corinaldesi, R. (2011). Mechanisms Underlying Visceral Hypersensitivity in Irritable Bowel Syndrome. *Curr. Gastroenterol. Rep.* *13*, 308–315.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* *449*, 1003–1007.
- Barksby, H.E., Lea, S.R., Preshaw, P.M., and Taylor, J.J. (2007). The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin. Exp. Immunol.* *149*, 217–225.
- Barman, M., Unold, D., Shifley, K., Amir, E., Hung, K., Bos, N., and Salzman, N. (2008). Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* *76*, 907–915.
- Barnes, P.J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979* *94*, 557–572.
- Barrett, J.C., Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Brant, S.R., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Barmada, M.M., et al. (2008). Genome-wide association

defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat. Genet.* *40*, 955–962.

Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* *139*, 267–284.

Bashashati, M., Rezaei, N., Shafieyoun, A., McKernan, D.P., Chang, L., Öhman, L., Quigley, E.M., Schmulson, M., Sharkey, K.A., and Simrén, M. (2014a). Cytokine imbalance in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *26*, 1036–1048.

Bashashati, M., Rezaei, N., Shafieyoun, A., McKernan, D.P., Chang, L., Öhman, L., Quigley, E.M., Schmulson, M., Sharkey, K.A., and Simrén, M. (2014b). Cytokine imbalance in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neurogastroenterol. Motil.* *26*, 1036–1048.

Baumgart, D.C., and Carding, S.R. (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *The Lancet* *369*, 1627–1640.

Bautista, D.M., Jordt, S.-E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* *124*, 1269–1282.

Beatty, J.K., Bhargava, A., and Buret, A.G. (2014). Post-infectious irritable bowel syndrome: mechanistic insights into chronic disturbances following enteric infection. *World J. Gastroenterol.* *20*, 3976–3985.

Becker, K., Niederau, C., and Frieeling, T. (1999). Fecal excretion of alpha 2-macroglobulin: a novel marker for disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Z. Gastroenterol.* *37*, 597–605.

Belaouaj, A., McCarthy, R., Baumann, M., Gao, Z., Ley, T.J., Abraham, S.N., and Shapiro, S.D. (1998). Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat. Med.* *4*, 615–618.

Bellemare, A., Vernoux, N., Morin, S., Gagné, S.M., and Bourbonnais, Y. (2010). Structural and antimicrobial properties of human pre-elafin/trappin-2 and derived peptides against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* *10*, 253.

Benchimol, E.I., Fortinsky, K.J., Gozdyra, P., Van den Heuvel, M., Van Limbergen, J., and Griffiths, A.M. (2011). Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. *Inflamm. Bowel Dis.* *17*, 423–439.

Ben-Horin, S., Kopylov, U., and Chowers, Y. (2014). Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease. *Autoimmun. Rev.* *13*, 24–30.

Bermúdez-Humarán, L.G., Motta, J.-P., Aubry, C., Kharrat, P., Rous-Martin, L., Sallenave, J.-M., Deraison, C., Vergnolle, N., and Langella, P. (2015). Serine protease inhibitors protect better than IL-10 and TGF- $\beta$  anti-inflammatory cytokines against mouse colitis when delivered by recombinant lactococci. *Microb. Cell Factories* *14*, 26.

Bernstein, C.N. (2014). Treatment of IBD: Where We Are and Where We Are Going. *Am. J. Gastroenterol.*

Bernstein, C.N., Wajda, A., Svenson, L.W., MacKenzie, A., Koehoorn, M., Jackson, M., Fedorak, R., Israel, D., and Blanchard, J.F. (2006). The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Am. J. Gastroenterol.* *101*, 1559–1568.

Bertiaux-Vandaële, N., Youmba, S.B., Belmonte, L., Lecleire, S., Antonietti, M., Gourcerol, G., Leroi, A.-M., Déchelotte, P., Ménard, J.-F., Ducrotté, P., et al. (2011). The Expression and the Cellular Distribution of the Tight Junction Proteins Are Altered in Irritable Bowel Syndrome Patients With Differences According to the Disease Subtype. *Am. J. Gastroenterol.* *106*, 2165–2173.

Bevins, C.L., and Salzman, N.H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 356–368.

Bezençon, C., le Coutre, J., and Damak, S. (2007). Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells. *Chem. Senses* *32*, 41–49.

Bielefeldt, K., Ozaki, N., and Gebhart, G.F. (2002). Experimental ulcers alter voltage-sensitive sodium currents in rat gastric sensory neurons. *Gastroenterology* *122*, 394–405.

Bielefeldt, K., Davis, B., and Binion, D.G. (2009). Pain and inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *15*, 778–788.

Biesiekierski, J.R., Newnham, E.D., Irving, P.M., Barrett, J.S., Haines, M., Doecke, J.D., Shepherd, S.J., Muir, J.G., and Gibson, P.R. (2011). Gluten causes gastrointestinal symptoms in subjects without celiac disease: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Am. J. Gastroenterol.* *106*, 508–514; quiz 515.

Bjerknes, M., and Cheng, H. (2001). Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 12497–12502.

Blackhart, B.D., Emilsson, K., Nguyen, D., Teng, W., Martelli, A.J., Nystedt, S., Sundelin, J., and Scarborough, R.M. (1996). Ligand cross-reactivity within the protease-activated receptor family. *J. Biol. Chem.* *271*, 16466–16471.

Blackshaw, L.A., Brookes, S.J.H., Grundy, D., and Schemann, M. (2007). Sensory transmission in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *19*, 1–19.

Blair, S.A., Kane, S.V., Clayburgh, D.R., and Turner, J.R. (2006). Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *86*, 191–201.

Bohórquez, D.V., Shahid, R.A., Erdmann, A., Kreger, A.M., Wang, Y., Calakos, N., Wang, F., and Liddle, R.A. (2015). Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells. *J. Clin. Invest.* *125*, 782–786.

- Boltin, D., Perets, T.T., Vilkin, A., and Niv, Y. (2013). Mucin function in inflammatory bowel disease: an update. *J. Clin. Gastroenterol.* *47*, 106–111.
- Bonizzi, G., and Karin, M. (2004). The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* *25*, 280–288.
- Bonnart, C., Deraison, C., Lacroix, M., and Hovnanian, A. (2010). [Elastase 2, a key player in the integrity of the epidermal barrier and in Netherton syndrome]. *Med. Sci.* *MS 26*, 681–685.
- Borgoño, C.A., Michael, I.P., and Diamandis, E.P. (2004). Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Mol. Cancer Res. MCR 2*, 257–280.
- Borrisoff, J.I., Heeneman, S., Kiliç, E., Kassák, P., Van Oerle, R., Winckers, K., Govers-Riemslog, J.W.P., Hamulyák, K., Hackeng, T.M., Daemen, M.J.A.P., et al. (2010). Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. *Circulation* *122*, 821–830.
- Borregaard, N., Sehested, M., Nielsen, B.S., Sengeløv, H., and Kjeldsen, L. (1995). Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. *Blood* *85*, 812–817.
- Bourriaud, C., Robins, R.J., Martin, L., Kozlowski, F., Tenailleau, E., Cherbut, C., and Michel, C. (2005). Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *J. Appl. Microbiol.* *99*, 201–212.
- Boxio, R., Wartelle, J., Nawrocki-Raby, B., Lagrange, B., Malleret, L., Hirche, T., Taggart, C., Pacheco, Y., Devouassoux, G., and Bentaher, A. (2016). Neutrophil elastase cleaves epithelial cadherin in acutely injured lung epithelium. *Respir. Res.* *17*, 129.
- Bradesi, S., Schwetz, I., Ennes, H.S., Lamy, C.M.R., Ohning, G., Fanselow, M., Pothoulakis, C., McRoberts, J.A., and Mayer, E.A. (2005a). Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *289*, G42–G53.
- Bradesi, S., Schwetz, I., Ennes, H.S., Lamy, C.M.R., Ohning, G., Fanselow, M., Pothoulakis, C., McRoberts, J.A., and Mayer, E.A. (2005b). Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *289*, G42-53.
- Braz, J.M., Nassar, M.A., Wood, J.N., and Basbaum, A.I. (2005). Parallel “pain” pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. *Neuron* *47*, 787–793.
- Brehmer, A. (2006). Structure of enteric neurons. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* *186*, 1–91.
- Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* *3*, 238–250.
- Brookes, S.J.H., Spencer, N.J., Costa, M., and Zagorodnyuk, V.P. (2013). Extrinsic primary afferent signalling in the gut. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 286–296.

- Bruewer, M., Utech, M., Ivanov, A.I., Hopkins, A.M., Parkos, C.A., and Nusrat, A. (2005). Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 923–933.
- Buonocore, S., Ahern, P.P., Uhlig, H.H., Ivanov, I.I., Littman, D.R., Maloy, K.J., and Powrie, F. (2010). Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* *464*, 1371–1375.
- Bustos, D., Negri, G., De Paula, J.A., Di Carlo, M., Yapur, V., Facente, A., and De Paula, A. (1998). Colonic proteinases: increased activity in patients with ulcerative colitis. *Medicina (Mex.)* *58*, 262–264.
- Butler, M.W., Robertson, I., Greene, C.M., O'Neill, S.J., Taggart, C.C., and McElvaney, N.G. (2006). Elafin prevents lipopolysaccharide-induced AP-1 and NF-kappaB activation via an effect on the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* *281*, 34730–34735.
- Buzza, M.S., Netzel-Arnett, S., Shea-Donohue, T., Zhao, A., Lin, C.-Y., List, K., Szabo, R., Fasano, A., Bugge, T.H., and Antalis, T.M. (2010). Membrane-anchored serine protease matriptase regulates epithelial barrier formation and permeability in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 4200–4205.
- Cader, M.Z., and Kaser, A. (2013). Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut* *62*, 1653–1664.
- Capaldo, C.T., Powell, D.N., and Kalman, D. (2017). Layered defense: how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier. *J. Mol. Med. Berl. Ger.*
- Caputo, A., Garner, R.S., Winkler, U., Hudig, D., and Bleackley, R.C. (1993). Activation of recombinant murine cytotoxic cell proteinase-1 requires deletion of an amino-terminal dipeptide. *J. Biol. Chem.* *268*, 17672–17675.
- Cario, E., Gerken, G., and Podolsky, D.K. (2007). Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* *132*, 1359–1374.
- Carter, M.J., Lobo, A.J., and Travis, S.P.L. (2004). Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* *53*, v1–v16.
- Cash, B.D., Epstein, M.S., and Shah, S.M. (2016). A Novel Delivery System of Peppermint Oil Is an Effective Therapy for Irritable Bowel Syndrome Symptoms. *Dig. Dis. Sci.* *61*, 560.
- Caughey, G.H. (2007). Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol. Rev.* *217*, 141–154.
- Cenac, N., Coelho, A.-M., Nguyen, C., Compton, S., Andrade-Gordon, P., MacNaughton, W.K., Wallace, J.L., Hollenberg, M.D., Bunnett, N.W., Garcia-Villar, R., et al. (2002). Induction of Intestinal Inflammation in Mouse by Activation of Proteinase-Activated Receptor-2. *Am. J. Pathol.* *161*, 1903.
- Cenac, N., Chin, A.C., Garcia-Villar, R., Salvador-Cartier, C., Ferrier, L., Vergnolle, N., Buret, A.G., Fioramonti, J., and Bueno, L. (2004). PAR2 activation alters colonic paracellular

permeability in mice via IFN- $\gamma$ -dependent and -independent pathways. *J. Physiol.* *558*, 913–925.

Cenac, N., Andrews, C.N., Holzhausen, M., Chapman, K., Cottrell, G., Andrade-Gordon, P., Steinhoff, M., Barbara, G., Beck, P., Bunnett, N.W., et al. (2007). Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Invest.* *117*, 636–647.

Chang, L., Sundaresh, S., Elliott, J., Anton, P.A., Baldi, P., Licudine, A., Mayer, M., Vuong, T., Hirano, M., Naliboff, B.D., et al. (2009). Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *21*, 149–159.

Chao, M.V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 299–309.

Chatzaki, E., Crowe, P.D., Wang, L., Million, M., Taché, Y., and Grigoriadis, D.E. (2004). CRF receptor type 1 and 2 expression and anatomical distribution in the rat colon. *J. Neurochem.* *90*, 309–316.

Chen, H., Duan, L., Zhu, Y., Ye, S., Yang, Y., and Wen, Y. (2004). [Persistent intestinal motility disorder after transient intestinal nematode infection in rats]. *Beijing Da Xue Xue Bao* *36*, 198–201.

Cheng, H., and Leblond, C.P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am. J. Anat.* *141*, 537–561.

Cherrier, M. (2014). [Innate lymphoid cells: new players of the mucosal immune response]. *Med. Sci. MS* *30*, 280–288.

Chey, W.D., Lembo, A.J., Lavins, B.J., Shiff, S.J., Kurtz, C.B., Currie, M.G., MacDougall, J.E., Jia, X.D., Shao, J.Z., Fitch, D.A., et al. (2012). Linaclotide for Irritable Bowel Syndrome With Constipation: A 26-Week, Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Trial to Evaluate Efficacy and Safety. *Am. J. Gastroenterol.* *107*, 1702–1712.

Chin, A.C., Vergnolle, N., MacNaughton, W.K., Wallace, J.L., Hollenberg, M.D., and Buret, A.G. (2003a). Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11104–11109.

Chin, A.C., Vergnolle, N., MacNaughton, W.K., Wallace, J.L., Hollenberg, M.D., and Buret, A.G. (2003b). Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11104–11109.

Chin, A.C., Lee, W.Y., Nusrat, A., Vergnolle, N., and Parkos, C.A. (2008). Neutrophil-mediated activation of epithelial protease-activated receptors-1 and -2 regulates barrier function and transepithelial migration. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 5702–5710.

Chu, V.T., Beller, A., Rausch, S., Strandmark, J., Zänker, M., Arbach, O., Kruglov, A., and Berek, C. (2014). Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity* *40*, 582–593.



- Chung, H., Pamp, S.J., Hill, J.A., Surana, N.K., Edelman, S.M., Troy, E.B., Reading, N.C., Villablanca, E.J., Wang, S., Mora, J.R., et al. (2012). Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell* 149, 1578–1593.
- Cicmanec, J.F., and Holder, I.A. (1979). Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in normal and burned skin extract: role of extracellular proteases. *Infect. Immun.* 25, 477–483.
- Clarke, G., Quigley, E.M.M., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2009). Irritable bowel syndrome: towards biomarker identification. *Trends Mol. Med.* 15, 478–489.
- Clavé, P., Acalovschi, M., Triantafillidis, J.K., Uspensky, Y.P., Kalayci, C., Shee, V., Tack, J., and OBIS Study Investigators (2011). Randomised clinical trial: otilonium bromide improves frequency of abdominal pain, severity of distention and time to relapse in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 34, 432–442.
- Clerc, N., and Furness, J.B. (2004). Intrinsic primary afferent neurones of the digestive tract. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 16 Suppl 1, 24–27.
- Coëffier, M., Gloro, R., Boukhattala, N., Aziz, M., Leclaire, S., Vandaele, N., Antonietti, M., Savoye, G., Bôle-Feysot, C., Déchelotte, P., et al. (2010). Increased Proteasome-Mediated Degradation of Occludin in Irritable Bowel Syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 1181–1188.
- Coeshott, C., Ohnemus, C., Pilyavskaya, A., Ross, S., Wiczorek, M., Kroona, H., Leimer, A.H., and Cheronis, J. (1999). Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6261–6266.
- Connolly, A.J., Ishihara, H., Kahn, M.L., Farese, R.V., and Coughlin, S.R. (1996). Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature* 381, 516–519.
- Cooke, H.J., Wang, Y.Z., and Rogers, R. (1993). Coordination of Cl<sup>-</sup> secretion and contraction by a histamine H<sub>2</sub>-receptor agonist in guinea pig distal colon. *Am. J. Physiol.* 265, G973-978.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204, 1757–1764.
- Corfield, A.P., Carroll, D., Myerscough, N., and Probert, C.S. (2001). Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 6, D1321-1357.
- Cosnes, J. (2004). Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18, 481–496.
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., and Cortot, A. (2011). Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 140, 1785–1794.e4.

Cosnes, J., Bourrier, A., Laharie, D., Nahon, S., Bouhnik, Y., Carbonnel, F., Allez, M., Dupas, J.-L., Reimund, J.-M., Savoye, G., et al. (2013). Early administration of azathioprine vs conventional management of Crohn's Disease: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* *145*, 758-765.e2; quiz e14-15.

Coss-Adame, E., and Rao, S.S.C. (2014). Brain and Gut Interactions in Irritable Bowel Syndrome: New Paradigms and New Understandings. *Curr. Gastroenterol. Rep.* *16*, 1-8.

Cox, J.J., Reimann, F., Nicholas, A.K., Thornton, G., Roberts, E., Springell, K., Karbani, G., Jafri, H., Mannan, J., Raashid, Y., et al. (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* *444*, 894-898.

Creed, F., Fernandes, L., Guthrie, E., Palmer, S., Ratcliffe, J., Read, N., Rigby, C., Thompson, D., Tomenson, B., and North of England IBS Research Group (2003). The cost-effectiveness of psychotherapy and paroxetine for severe irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* *124*, 303-317.

Cremon, C., Gargano, L., Morselli-Labate, A.M., Santini, D., Cogliandro, R.F., De Giorgio, R., Stanghellini, V., Corinaldesi, R., and Barbara, G. (2009). Mucosal Immune Activation in Irritable Bowel Syndrome: Gender-Dependence and Association With Digestive Symptoms. *Am. J. Gastroenterol.* *104*, 392-400.

Cribbs, L.L. (2006). T-type Ca<sup>2+</sup> channels in vascular smooth muscle: multiple functions. *Cell Calcium* *40*, 221-230.

Crouzet, L., Gaultier, E., Del'Homme, C., Cartier, C., Delmas, E., Dapoigny, M., Fioramonti, J., and Bernalier-Donadille, A. (2013). The hypersensitivity to colonic distension of IBS patients can be transferred to rats through their fecal microbiota. *Neurogastroenterol. Motil.* *25*, e272-e282.

Crowell, M.D. (2004). Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. *Br. J. Pharmacol.* *141*, 1285-1293.

Csernok, E., Ai, M., Gross, W.L., Wicklein, D., Petersen, A., Lindner, B., Lamprecht, P., Holle, J.U., and Hellmich, B. (2006). Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway. *Blood* *107*, 4440-4448.

Dabek, M., Ferrier, L., Roka, R., Gecse, K., Annahazi, A., Moreau, J., Escourrou, J., Cartier, C., Chaumaz, G., Leveque, M., et al. (2009). Luminal cathepsin g and protease-activated receptor 4: a duet involved in alterations of the colonic epithelial barrier in ulcerative colitis. *Am. J. Pathol.* *175*, 207-214.

D'Alessio, F.R., Tsushima, K., Aggarwal, N.R., West, E.E., Willett, M.H., Britos, M.F., Pipeling, M.R., Brower, R.G., Tuder, R.M., McDyer, J.F., et al. (2009). CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *J. Clin. Invest.* *119*, 2898-2913.

Dalli, J., Norling, L.V., Renshaw, D., Cooper, D., Leung, K.-Y., and Perretti, M. (2008). Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood* *112*, 2512-2519.

- Damman, C.J., Miller, S.I., Surawicz, C.M., and Zisman, T.L. (2012). The microbiome and inflammatory bowel disease: is there a therapeutic role for fecal microbiota transplantation? *Am. J. Gastroenterol.* *107*, 1452–1459.
- Danese, S., Fiorino, G., Peyrin-Biroulet, L., Lucenteforte, E., Virgili, G., Moja, L., and Bonovas, S. (2014). Biological agents for moderately to severely active ulcerative colitis: a systematic review and network meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* *160*, 704–711.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* *127*, 412–421.
- Darmoul, D., and Ouellette, A.J. (1996). Positional specificity of defensin gene expression reveals Paneth cell heterogeneity in mouse small intestine. *Am. J. Physiol.* *271*, G68-74.
- De Palma, G., Lynch, M.D.J., Lu, J., Dang, V.T., Deng, Y., Jury, J., Umeh, G., Miranda, P.M., Pigrau Pastor, M., Sidani, S., et al. (2017). Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. *Sci. Transl. Med.* *9*.
- Deberry, J.J., Bielefeldt, K., Davis, B.M., Szigethy, E.M., Hartman, D.J., and Coates, M.D. (2014). Abdominal pain and the neurotrophic system in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *20*, 2330–2339.
- Delvaux, M., Denis, P., and Allemand, H. (1997). Sexual abuse is more frequently reported by IBS patients than by patients with organic digestive diseases or controls. Results of a multicentre inquiry. French Club of Digestive Motility. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *9*, 345–352.
- Devaney, J.M., Greene, C.M., Taggart, C.C., Carroll, T.P., O'Neill, S.J., and McElvaney, N.G. (2003). Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS Lett.* *544*, 129–132.
- Devani, M., Vecchi, M., Ferrero, S., Avesani, E.C., Arizzi, C., Chao, L., Colman, R.W., and Cugno, M. (2005). Kallikrein-kinin system in inflammatory bowel diseases: Intestinal involvement and correlation with the degree of tissue inflammation. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* *37*, 665–673.
- van Deventer, S.J. (1997). Review article: Chemokine production by intestinal epithelial cells: a therapeutic target in inflammatory bowel disease? *Aliment. Pharmacol. Ther.* *11 Suppl 3*, 116-120; discussion 120-121.
- Devlin, H.B., Datta, D., and Dellipiani, A.W. (1980). The incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in North Tees Health District. *World J. Surg.* *4*, 183–193.
- Didari, T., Mozaffari, S., Nikfar, S., and Abdollahi, M. (2015). Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: Updated systematic review with meta-analysis. *World J. Gastroenterol. WJG* *21*, 3072.

Dinan, T.G., Quigley, E.M.M., Ahmed, S.M.M., Scully, P., O'Brien, S., O'Mahony, L., O'Mahony, S., Shanahan, F., and Keeling, P.W.N. (2006). Hypothalamic-Pituitary-Gut Axis Dysregulation in Irritable Bowel Syndrome: Plasma Cytokines as a Potential Biomarker? *Gastroenterology* 130, 304–311.

Dinan, T.G., Clarke, G., Quigley, E.M.M., Scott, L.V., Shanahan, F., Cryan, J., Cooney, J., and Keeling, P.W.N. (2008). Enhanced cholinergic-mediated increase in the pro-inflammatory cytokine IL-6 in irritable bowel syndrome: role of muscarinic receptors. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 2570–2576.

Distrutti, E., Cipriani, S., Mencarelli, A., Renga, B., and Fiorucci, S. (2013). Probiotics VSL#3 protect against development of visceral pain in murine model of irritable bowel syndrome. *PloS One* 8, e63893.

Dockray, G.J. (2003). Luminal sensing in the gut: an overview. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 54 Suppl 4, 9–17.

Dolan, K.T., and Chang, E.B. (2017). Diet, gut microbes, and the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Mol. Nutr. Food Res.* 61.

Drannik, A.G., Nag, K., Yao, X.-D., Henrick, B.M., Ball, T.B., Plummer, F.A., Wachihi, C., Kimani, J., and Rosenthal, K.L. (2012). Anti-HIV-1 activity of elafin depends on its nuclear localization and altered innate immune activation in female genital epithelial cells. *PloS One* 7, e52738.

Drossman, D.A. (2006). The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 130, 1377–1390.

Drossman, D.A., Chey, W.D., Johanson, J.F., Fass, R., Scott, C., Panas, R., and Ueno, R. (2009). Clinical trial: lubiprostone in patients with constipation-associated irritable bowel syndrome - results of two randomized, placebo-controlled studies. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 29, 329–341.

Dubin, A.E., and Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J. Clin. Invest.* 120, 3760–3772.

Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B., and Lipsky, P.E. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 12, 1063–1073.

Dubuquoy, L., Jansson, E.A., Deeb, S., Rakotobe, S., Karoui, M., Colombel, J.-F., Auwerx, J., Pettersson, S., and Desreumaux, P. (2003). Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124, 1265–1276.

Dulon, S., Candé, C., Bunnett, N.W., Hollenberg, M.D., Chignard, M., and Pidard, D. (2003). Proteinase-Activated Receptor-2 and Human Lung Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28, 339–346.

- Dunlop, S.P., Hebden, J., Campbell, E., Naesdal, J., Olbe, L., Perkins, A.C., and Spiller, R.C. (2006). Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes. *Am. J. Gastroenterol.* *101*, 1288–1294.
- Efskind, P.S., Bernklev, T., and Vatn, M.H. (1996). A Double-Blind Placebo-Controlled Trial with Loperamide in Irritable Bowel Syndrome. *Scand. J. Gastroenterol.* *31*, 463–468.
- Egan, L.J., and Sandborn, W.J. (1996). Methotrexate for inflammatory bowel disease: pharmacology and preliminary results. *Mayo Clin. Proc.* *71*, 69–80.
- Egger, B., Bajaj-Elliott, M., MacDonald, T.T., Inglin, R., Eysselein, V.E., and Büchler, M.W. (2000). Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* *62*, 240–248.
- Elzouki, A.N., Eriksson, S., Löfberg, R., Nässberger, L., Wieslander, J., and Lindgren, S. (1999). The prevalence and clinical significance of alpha 1-antitrypsin deficiency (PiZ) and ANCA specificities (proteinase 3, BPI) in patients with ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *5*, 246–252.
- Enck, P., Aziz, Q., Barbara, G., Farmer, A.D., Fukudo, S., Mayer, E.A., Niesler, B., Quigley, E.M.M., Rajilić-Stojanović, M., Schemann, M., et al. (2016). Irritable bowel syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primer* *2*, 16014.
- Eswaran, S., Goel, A., and Chey, W.D. (2013). What role does wheat play in the symptoms of irritable bowel syndrome? *Gastroenterol. Hepatol.* *9*, 85–91.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., and Henson, P.M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* *101*, 890–898.
- Fang, M., Kovács, K.J., Fisher, L.L., and Larson, A.A. (2003). Thrombin inhibits NMDA-mediated nociceptive activity in the mouse: possible mediation by endothelin. *J. Physiol.* *549*, 903–917.
- Farmer, A.D., and Aziz, Q. (2013). Gut pain & visceral hypersensitivity. *Br. J. Pain* *7*, 39.
- Feagan, B.G., McDonald, J.W., Rochon, J., Laupacis, A., Fedorak, R.N., Kinnear, D., Saibil, F., Groll, A., Archambault, A., and Gillies, R. (1994). Low-dose cyclosporine for the treatment of Crohn's disease. The Canadian Crohn's Relapse Prevention Trial Investigators. *N. Engl. J. Med.* *330*, 1846–1851.
- Feagan, B.G., Rochon, J., Fedorak, R.N., Irvine, E.J., Wild, G., Sutherland, L., Steinhart, A.H., Greenberg, G.R., Gillies, R., and Hopkins, M. (1995). Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. The North American Crohn's Study Group Investigators. *N. Engl. J. Med.* *332*, 292–297.
- Fearon, D.T., and Locksley, R.M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* *272*, 50–53.

Feistritzer, C., and Riewald, M. (2005). Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood* 105, 3178–3184.

Fichera, A., and Michelassi, F. (2007). Surgical treatment of Crohn's disease. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* 11, 791–803.

Fiorucci, S., Mencarelli, A., Palazzetti, B., Distrutti, E., Vergnolle, N., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Morelli, A., and Cirino, G. (2001). Proteinase-activated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13936–13941.

Fish, E.W., Shahrokh, D., Bagot, R., Caldji, C., Bredy, T., Szyf, M., and Meaney, M.J. (2004). Epigenetic Programming of Stress Responses through Variations in Maternal Care. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1036, 167–180.

Flanagan, W.M., Corthésy, B., Bram, R.J., and Crabtree, G.R. (1991). Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352, 803–807.

Flint, H.J., Scott, K.P., Duncan, S.H., Louis, P., and Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* 3, 289–306.

Flynn, A.N., and Buret, A.G. (2004). Proteinase-activated receptor 1 (PAR-1) and cell apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 9, 729–737.

Foligne, B., Dessein, R., Marceau, M., Poiret, S., Chamailard, M., Pot, B., Simonet, M., and Daniel, C. (2007). Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV protein. *Gastroenterology* 133, 862–874.

Ford, A.C., Achkar, J.-P., Khan, K.J., Kane, S.V., Talley, N.J., Marshall, J.K., and Moayyedi, P. (2011). Efficacy of 5-aminosalicylates in ulcerative colitis: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 601–616.

Fox, S., Leitch, A.E., Duffin, R., Haslett, C., and Rossi, A.G. (2010). Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J. Innate Immun.* 2, 216–227.

Franchi, L., Kamada, N., Nakamura, Y., Burberry, A., Kuffa, P., Suzuki, S., Shaw, M.H., Kim, Y.-G., and Núñez, G. (2012). NLRC4-driven production of IL-1 $\beta$  discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. *Nat. Immunol.* 13, 449–456.

Franchimont, D., Vermeire, S., El Housni, H., Pierik, M., Van Steen, K., Gustot, T., Quertinmont, E., Abramowicz, M., Van Gossum, A., Devière, J., et al. (2004). Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 53, 987–992.

Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13780–13785.

- Fujimori, S., Tatsuguchi, A., Gudis, K., Kishida, T., Mitsui, K., Ehara, A., Kobayashi, T., Sekita, Y., Seo, T., and Sakamoto, C. (2007). High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *22*, 1199–1204.
- Fujiya, M., Ueno, N., and Kohgo, Y. (2014). Probiotic treatments for induction and maintenance of remission in inflammatory bowel diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin. J. Gastroenterol.* *7*, 1–13.
- Fukuoka, S.-I., and Nyaruhucha, C.M. (2002). Expression and functional analysis of rat P23, a gut hormone-inducible isoform of trypsin, reveals its resistance to proteinaceous trypsin inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* *1588*, 106–112.
- Furness, J.B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* *81*, 87–96.
- Furness, J.B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *9*, 286–294.
- Furness, J.B., Kunze, W.A., and Clerc, N. (1999). Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. *Am. J. Physiol.* *277*, G922–928.
- Furness, J.B., Jones, C., Nurgali, K., and Clerc, N. (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.* *72*, 143–164.
- Furness, J.B., Rivera, L.R., Cho, H.-J., Bravo, D.M., and Callaghan, B. (2013). The gut as a sensory organ. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 729–740.
- Gaffney, P.R., Doyle, C.T., Gaffney, A., Hogan, J., Hayes, D.P., and Annis, P. (1995). Paradoxical response to heparin in 10 patients with ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* *90*, 220–223.
- Galipeau, H.J., Wiepjes, M., Motta, J.-P., Schulz, J.D., Jury, J., Natividad, J.M., Pinto-Sanchez, I., Sinclair, D., Rousset, P., Martin-Rosique, R., et al. (2014). Novel role of the serine protease inhibitor elafin in gluten-related disorders. *Am. J. Gastroenterol.* *109*, 748–756.
- Galliano, M.-F., Toulza, E., Jonca, N., Gonias, S.L., Serre, G., and Guerrin, M. (2008). Binding of  $\alpha$ 2ML1 to the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1) Reveals a New Role for LRP1 in the Human Epidermis. *PLoS ONE* *3*.
- Gallo, R.L., and Hooper, L.V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 503–516.
- Gao, C., Liu, S., Hu, H.-Z., Gao, N., Kim, G.Y., Xia, Y., and Wood, J.D. (2002). Serine proteases excite myenteric neurons through protease-activated receptors in guinea pig small intestine. *Gastroenterology* *123*, 1554–1564.
- Garcia-Hernandez, V., Quiros, M., and Nusrat, A. (2017). Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1397*, 66–79.

Gay, J., Fioramonti, J., Garcia-Villar, R., and Buéno, L. (2000). Alterations of intestinal motor responses to various stimuli after *Nippostrongylus brasiliensis* infection in rats: role of mast cells. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *12*, 207–214.

Gaylord, S.A., Palsson, O.S., Garland, E.L., Faurot, K.R., Coble, R.S., Mann, J.D., Frey, W., Leniek, K., and Whitehead, W.E. (2011). Mindfulness Training Reduces the Severity of Irritable Bowel Syndrome in Women: Results of a Randomized Controlled Trial. *Am. J. Gastroenterol.* *106*, 1678–1688.

Gecse, K., Róka, R., Ferrier, L., Leveque, M., Eutamene, H., Cartier, C., Ait-Belgnaoui, A., Rosztóczy, A., Izbéki, F., Fioramonti, J., et al. (2008). Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* *57*, 591–599.

Geerling, B.J., Dagnelie, P.C., Badart-Smook, A., Russel, M.G., Stockbrügger, R.W., and Brummer, R.J. (2000). Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* *95*, 1008–1013.

Gerbe, F., and Jay, P. (2016). Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal Immunol.* *9*, 1353–1359.

Gershon, M.D. (1999). Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *13 Suppl 2*, 15–30.

Ghosh, D., Porter, E., Shen, B., Lee, S.K., Wilk, D., Drazba, J., Yadav, S.P., Crabb, J.W., Ganz, T., and Bevins, C.L. (2002). Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat. Immunol.* *3*, 583–590.

Gibold, L., Garenaux, E., Dalmaso, G., Gallucci, C., Cia, D., Mottet-Auselo, B., Fais, T., Darfeuille-Michaud, A., Nguyen, H.T.T., Barnich, N., et al. (2016). The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* *18*, 617–631.

Gillespie, J.J., Wattam, A.R., Cammer, S.A., Gabbard, J.L., Shukla, M.P., Dalay, O., Driscoll, T., Hix, D., Mane, S.P., Mao, C., et al. (2011). PATRIC: the comprehensive bacterial bioinformatics resource with a focus on human pathogenic species. *Infect. Immun.* *79*, 4286–4298.

Ginzberg, H.H., Cherapanov, V., Dong, Q., Cantin, A., McCulloch, C.A., Shannon, P.T., and Downey, G.P. (2001). Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *281*, G705-717.

Ginzberg, H.H., Shannon, P.T., Suzuki, T., Hong, O., Vachon, E., Moraes, T., Abreu, M.T.H., Cherepanov, V., Wang, X., Chow, C.-W., et al. (2004). Leukocyte elastase induces epithelial apoptosis: role of mitochondrial permeability changes and Akt. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *287*, G286-298.

Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzocchi, G., Poggioli, G., Miglioli, M., and Campieri, M. (2000). Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in



patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 119, 305–309.

Giorgio, R.D., and Barbara, G. (2008). Is irritable bowel syndrome an inflammatory disorder? *Curr. Gastroenterol. Rep.* 10, 385–390.

Goldenberg, B.A., Rawsthorne, P., and Bernstein, C.N. (2004). The utility of 6-thioguanine metabolite levels in managing patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 99, 1744–1748.

Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., and Gill, H.S. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 207–216.

Gordon, H.A., and Bruckner-Kardoss, E. (1961). Effect of normal microbial flora on intestinal surface area. *Am. J. Physiol.* 201, 175–178.

Greenfield, S.M., Punchard, N.A., Teare, J.P., and Thompson, R.P. (1993). Review article: the mode of action of the aminosalicylates in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 7, 369–383.

Grimoud, J., Durand, H., de Souza, S., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V., and Roques, C. (2010). In vitro screening of probiotics and synbiotics according to anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 42–50.

de Groat, W.C., Nadelhaft, I., Milne, R.J., Booth, A.M., Morgan, C., and Thor, K. (1981). Organization of the sacral parasympathetic reflex pathways to the urinary bladder and large intestine. *J. Auton. Nerv. Syst.* 3, 135–160.

Grundy, D. (2002). Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. *Gut* 51, i2.

Günzel, D., and Yu, A.S.L. (2013). Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiol. Rev.* 93, 525.

Guyot, N., Zani, M.-L., Maurel, M.-C., Dallet-Choisy, S., and Moreau, T. (2005). Elafin and its precursor trappin-2 still inhibit neutrophil serine proteinases when they are covalently bound to extracellular matrix proteins by tissue transglutaminase. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 15610–15618.

Guyot, N., Bergsson, G., Butler, M.W., Greene, C.M., Weldon, S., Kessler, E., Levine, R.L., O'Neill, S.J., Taggart, C.C., and McElvaney, N.G. (2010). Functional study of elafin cleaved by *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinases. *Biol. Chem.* 391, 705–716.

Gwee, K. -a. (2005). Irritable bowel syndrome in developing countries – a disorder of civilization or colonization? *Neurogastroenterol. Motil.* 17, 317–324.

Haerteis, S., Krappitz, A., Krappitz, M., Murphy, J.E., Bertog, M., Krueger, B., Nacken, R., Chung, H., Hollenberg, M.D., Knecht, W., et al. (2014). Proteolytic activation of the human

epithelial sodium channel by trypsin IV and trypsin I involves distinct cleavage sites. *J. Biol. Chem.* *289*, 19067–19078.

Hagel, A.F., deRossi, T., Zopf, Y., Konturek, P., Dauth, W., Kressel, J., Hahn, E.G., and Raithel, M. (2013). Mast cell tryptase levels in gut mucosa in patients with gastrointestinal symptoms caused by food allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *160*, 350–355.

Hait, E., Hait, L., Bousvaros, A., and Grand, R. (2005). Pediatric inflammatory bowel disease: what children can teach adults. *Inflamm. Bowel Dis.* *11*, 519–527.

Håkansson, Å., Tormo-Badia, N., Baridi, A., Xu, J., Molin, G., Hagslätt, M.-L., Karlsson, C., Jeppsson, B., Cilio, C.M., and Ahrné, S. (2015). Immunological alteration and changes of gut microbiota after dextran sulfate sodium (DSS) administration in mice. *Clin. Exp. Med.* *15*, 107–120.

Hamm, H.E. (2001). How activated receptors couple to G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 4819–4821.

Hampe, J., Heymann, K., Krawczak, M., and Schreiber, S. (2003). Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure. *Int. J. Colorectal Dis.* *18*, 413–417.

Hanauer, S.B., Sandborn, W., and Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology (2001). Management of Crohn's disease in adults. *Am. J. Gastroenterol.* *96*, 635–643.

Hans, W., Schölmerich, J., Gross, V., and Falk, W. (2000). The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 267–273.

Hansen, R., Russell, R.K., Reiff, C., Louis, P., McIntosh, F., Berry, S.H., Mukhopadhyay, I., Bisset, W.M., Barclay, A.R., Bishop, J., et al. (2012). Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased *Faecalibacterium prausnitzii* and reduced bacterial diversity in Crohn's but not in ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* *107*, 1913–1922.

Hansson, G.C., and Johansson, M.E. (2010). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes* *1*, 51–54.

Hara, K., Saito, Y., Kiriwara, Y., Yamada, Y., Sakura, S., and Kosaka, Y. (1999). The interaction of antinociceptive effects of morphine and GABA receptor agonists within the rat spinal cord. *Anesth. Analg.* *89*, 422–427.

Harder, J., Gläser, R., and Schröder, J.-M. (2007). Review: Human antimicrobial proteins — effectors of innate immunity. *J. Endotoxin Res.* *13*, 317–338.

Harris, G., KuoLee, R., and Chen, W. (2006). Role of Toll-like receptors in health and diseases of gastrointestinal tract. *World J. Gastroenterol.* *12*, 2149–2160.

- Hart, A.L., Al-Hassi, H.O., Rigby, R.J., Bell, S.J., Emmanuel, A.V., Knight, S.C., Kamm, M.A., and Stagg, A.J. (2005). Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 129, 50–65.
- Hasnain, S.Z., McGuckin, M.A., Grencis, R.K., and Thornton, D.J. (2012). Serine protease(s) secreted by the nematode *Trichuris muris* degrade the mucus barrier. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1856.
- Hayday, A., Theodoridis, E., Ramsburg, E., and Shires, J. (2001). Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat. Immunol.* 2, 997–1003.
- He, S., Peng, Q., and Walls, A.F. (1997). Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159, 6216–6225.
- Heel, K.A., McCauley, R.D., Papadimitriou, J.M., and Hall, J.C. (1997). REVIEW: Peyer's patches. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 122–136.
- Heitkemper, M., Jarrett, M., Cain, K.C., Burr, R., Levy, R.L., Feld, A., and Hertig, V. (2001). Autonomic nervous system function in women with irritable bowel syndrome. *Dig. Dis. Sci.* 46, 1276–1284.
- Henderson, I.R., Czeczulin, J., Eslava, C., Noriega, F., and Nataro, J.P. (1999). Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 67, 5587–5596.
- Henrich, J.F., Knittle, K., De Gucht, V., Warren, S., Dombrowski, S.U., and Maes, S. (2015). Identifying effective techniques within psychological treatments for irritable bowel syndrome: A meta-analysis. *J. Psychosom. Res.* 78, 205–222.
- Hering, N.A., Fromm, M., and Schulzke, J.-D. (2012). Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J. Physiol.* 590, 1035–1044.
- Hermiston, M.L., and Gordon, J.I. (1995). In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.* 129, 489–506.
- Higaki, J.N., Gibson, B.W., and Craik, C.S. (1987). Evolution of catalysis in the serine proteases. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52, 615–621.
- Hod, K., Sperber, A.D., Ron, Y., Boaz, M., Dickman, R., Berliner, S., Halpern, Z., Maharshak, N., and Dekel, R. (2017). A double-blind, placebo-controlled study to assess the effect of a probiotic mixture on symptoms and inflammatory markers in women with diarrhea-predominant IBS. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 29.
- Höfer, D., and Drenckhahn, D. (1996). Cytoskeletal markers allowing discrimination between brush cells and other epithelial cells of the gut including enteroendocrine cells. *Histochem. Cell Biol.* 105, 405–412.

- Hoffmann, W. (2004). Trefoil factor family (TFF) peptides: regulators of mucosal regeneration and repair, and more. *Peptides* 25, 727–730.
- Hoffmann, A., Leung, T.H., and Baltimore, D. (2003). Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. *EMBO J.* 22, 5530–5539.
- Hollenberg, M.D., Saifeddine, M., Sandhu, S., Houle, S., and Vergnolle, N. (2004). Proteinase-activated receptor-4: evaluation of tethered ligand-derived peptides as probes for receptor function and as inflammatory agonists in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 143, 443.
- Hollenberg, M.D., Mihara, K., Polley, D., Suen, J.Y., Han, A., Fairlie, D.P., and Ramachandran, R. (2014). Biased signalling and proteinase-activated receptors (PARs): targeting inflammatory disease. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1180–1194.
- Holmén, N., Isaksson, S., Simrén, M., Sjövall, H., and Öhman, L. (2007). CD4+CD25+ regulatory T cells in irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol. Motil.* 19, 119–125.
- Homer, C.R., Richmond, A.L., Rebert, N.A., Achkar, J.-P., and McDonald, C. (2010). ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology* 139, 1630–1641, 1641.e1-2.
- Hosomi, S., Kaser, A., and Blumberg, R.S. (2015). Role of endoplasmic reticulum stress and autophagy as interlinking pathways in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 31, 81–88.
- Houle, S., Papez, M.D., Ferazzini, M., Hollenberg, M.D., and Vergnolle, N. (2005). Neutrophils and the kallikrein-kinin system in proteinase-activated receptor 4-mediated inflammation in rodents. *Br. J. Pharmacol.* 146, 670–678.
- Huang, Y., and Chen, Z. (2016). Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity. *Am. J. Transl. Res.* 8, 2490–2497.
- Hudcovic, T., Kolinska, J., Klepetar, J., Stepankova, R., Rezanka, T., Srutkova, D., Schwarzer, M., Erban, V., Du, Z., Wells, J.M., et al. (2012). Protective effect of *Clostridium tyrobutyricum* in acute dextran sodium sulphate-induced colitis: differential regulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-18 in BALB/c and severe combined immunodeficiency mice. *Clin. Exp. Immunol.* 167, 356–365.
- Huibregtse, I.L., van Lent, A.U., and van Deventer, S.J.H. (2007). Immunopathogenesis of IBD: insufficient suppressor function in the gut? *Gut* 56, 584–592.
- Huntington, J.A., Read, R.J., and Carrell, R.W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 407, 923–926.
- Hyun, E., Andrade-Gordon, P., Steinhoff, M., and Vergnolle, N. (2008). Protease-activated receptor-2 activation: a major actor in intestinal inflammation. *Gut* 57, 1222–1229.

Iablokov, V., Hirota, C.L., Peplowski, M.A., Ramachandran, R., Mihara, K., Hollenberg, M.D., and MacNaughton, W.K. (2014). Proteinase-activated receptor 2 (PAR2) decreases apoptosis in colonic epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *289*, 34366–34377.

IBD in EPIC Study Investigators, Tjonneland, A., Overvad, K., Bergmann, M.M., Nagel, G., Linseisen, J., Hallmans, G., Palmqvist, R., Sjodin, H., Hagglund, G., et al. (2009). Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: a nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut* *58*, 1606–1611.

Ida, S., Ozaki, N., Araki, K., Hirashima, K., Zaitu, Y., Taki, K., Sakamoto, Y., Miyamoto, Y., Oki, E., Morita, M., et al. (2015). SPINK1 Status in Colorectal Cancer, Impact on Proliferation, and Role in Colitis-Associated Cancer. *Mol. Cancer Res. MCR* *13*, 1130–1138.

Iizuka, M., and Konno, S. (2011). Wound healing of intestinal epithelial cells. *World J. Gastroenterol. WJG* *17*, 2161–2171.

Ireland, H., Houghton, C., Howard, L., and Winton, D.J. (2005). Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine Paneth cell longevity in the murine small intestine. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *233*, 1332–1336.

Jacob, C., Yang, P.-C., Darmoul, D., Amadesi, S., Saito, T., Cottrell, G.S., Coelho, A.-M., Singh, P., Grady, E.F., Perdue, M., et al. (2005). Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *J. Biol. Chem.* *280*, 31936–31948.

Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., and Reddy, D.N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol. WJG* *21*, 8787–8803.

Jarry, A., Dorso, L., Gratio, V., Forgue-Lafitte, M.-E., Laburthe, M., Laboisse, C.L., and Darmoul, D. (2007). PAR-2 activation increases human intestinal mucin secretion through EGFR transactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *364*, 689–694.

Jasinghe, V.J., Peyrotte, E.A., Meyers, A.F.A., Gajanayaka, N., Ball, T.B., Sandstrom, P., and Lavigne, C. (2013). Human rElafin Inhibits HIV-1 Replication in Its Natural Target Cells. *BioResearch Open Access* *2*, 128–137.

Jevnikar, Z., Obermajer, N., Bogyo, M., and Kos, J. (2008). The role of cathepsin X in the migration and invasiveness of T lymphocytes. *J. Cell Sci.* *121*, 2652–2661.

Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Holmén-Larsson, J., Jabbar, K.S., Xia, L., Xu, H., Ghishan, F.K., Carvalho, F.A., Gewirtz, A.T., Sjövall, H., et al. (2014). Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut* *63*, 281–291.

Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Schumm, L.P., Sharma, Y., Anderson, C.A., et al. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* *491*, 119–124.

- Julia, V., Morteau, O., and Buéno, L. (1994). Involvement of neurokinin 1 and 2 receptors in viscerosensitive response to rectal distension in rats. *Gastroenterology* 107, 94–102.
- Julia, V., Mezzasalma, T., and Buéno, L. (1995). Influence of bradykinin in gastrointestinal disorders and visceral pain induced by acute or chronic inflammation in rats. *Dig. Dis. Sci.* 40, 1913–1921.
- Julius, D. (2013). TRP channels and pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 355–384.
- Kagota, S., Maruyama, K., and McGuire, J.J. (2016). Characterization and Functions of Protease-Activated Receptor 2 in Obesity, Diabetes, and Metabolic Syndrome: A Systematic Review. *BioMed Res. Int.* 2016, 3130496.
- Kahn, M.L., Hammes, S.R., Botka, C., and Coughlin, S.R. (1998). Gene and locus structure and chromosomal localization of the protease-activated receptor gene family. *J. Biol. Chem.* 273, 23290–23296.
- Kanazawa, M., Endo, Y., Whitehead, W.E., Kano, M., Hongo, M., and Fukudo, S. (2004). Patients and nonconsulters with irritable bowel syndrome reporting a parental history of bowel problems have more impaired psychological distress. *Dig. Dis. Sci.* 49, 1046–1053.
- Kaneider, N.C., Leger, A.J., Agarwal, A., Nguyen, N., Perides, G., Derian, C., Covic, L., and Kuliopulos, A. (2007). “Role reversal” for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage. *Nat. Immunol.* 8, 1303–1312.
- Kang, S., Okuno, T., Takegahara, N., Takamatsu, H., Nojima, S., Kimura, T., Yoshida, Y., Ito, D., Ohmae, S., You, D.-J., et al. (2012). Intestinal epithelial cell-derived semaphorin 7A negatively regulates development of colitis via  $\alpha v \beta 1$  integrin. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 188, 1108–1116.
- Kaser, A., Lee, A.-H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E.S., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., et al. (2008). XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134, 743–756.
- Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R.S. (2010). Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 573–621.
- Kawahito, Y., Sano, H., Kawata, M., Yuri, K., Mukai, S., Yamamura, Y., Kato, H., Chrousos, G.P., Wilder, R.L., and Kondo, M. (1994). Local secretion of corticotropin-releasing hormone by enterochromaffin cells in human colon. *Gastroenterology* 106, 859–865.
- Kazal, L.A., Spicer, D.S., and Brahinsky, R.A. (1948). Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas. *J. Am. Chem. Soc.* 70, 3034–3040.
- Kerckhoffs, A.P.M., Ter Linde, J.J.M., Akkermans, L.M.A., and Samsom, M. (2008). Trypsinogen IV, serotonin transporter transcript levels and serotonin content are increased in small intestine of irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol. Motil.* 20, 900–907.

- Khaldi, S., Gargala, G., Le Goff, L., Parey, S., Francois, A., Fioramonti, J., Ballet, J.-J., Dupont, J.-P., Ducrotté, P., and Favennec, L. (2009). *Cryptosporidium parvum* isolate-dependent postinfectious jejunal hypersensitivity and mast cell accumulation in an immunocompetent rat model. *Infect. Immun.* 77, 5163–5169.
- Khan, K.J., Ullman, T.A., Ford, A.C., Abreu, M.T., Abadir, A., Abadir, A., Marshall, J.K., Talley, N.J., and Moayyedi, P. (2011). Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 661–673.
- Kim, Y.S., and Ho, S.B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 319–330.
- Kim, J.J., Shajib, M.S., Manocha, M.M., and Khan, W.I. (2012). Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD. *J. Vis. Exp. JoVE.*
- Kiss, M., Czimmerer, Z., and Nagy, L. (2013). The role of lipid-activated nuclear receptors in shaping macrophage and dendritic cell function: From physiology to pathology. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 264–286.
- Klement, E., Cohen, R.V., Boxman, J., Joseph, A., and Reif, S. (2004). Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1342–1352.
- Kmieć, Z. (1998). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 46, 143–155.
- Knecht, W., Cottrell, G.S., Amadesi, S., Mohlin, J., Skåregärde, A., Gedda, K., Peterson, A., Chapman, K., Hollenberg, M.D., Vergnolle, N., et al. (2007). Trypsin IV or Mesotrypsin and p23 Cleave Protease-activated Receptors 1 and 2 to Induce Inflammation and Hyperalgesia. *J. Biol. Chem.* 282, 26089–26100.
- Knighton, D.R., Hunt, T.K., Scheuenstuhl, H., Halliday, B.J., Werb, Z., and Banda, M.J. (1983). Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science* 221, 1283–1285.
- Kolli, N., and Garman, S.C. (2014). Proteolytic Activation of Human Cathepsin A. *J. Biol. Chem.* 289, 11592–11600.
- König, J., Wells, J., Cani, P.D., García-Ródenas, C.L., MacDonald, T., Mercenier, A., Whyte, J., Troost, F., and Brummer, R.-J. (2016). Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 7, e196.
- Kornbluth, A., and Sachar, D.B. (2004). Ulcerative Colitis Practice Guidelines in Adults (Update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am. J. Gastroenterol.* 99, 1371–1385.
- Koutroubakis, I.E., Vlachonikolis, I.G., and Kouroumalis, E.A. (2002). Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm. Bowel Dis.* 8, 277–286.

- Kraehenbuhl, J.P., and Neutra, M.R. (1992). Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol. Rev.* 72, 853–879.
- Krogius-Kurikka, L., Lyra, A., Malinen, E., Aarnikunnas, J., Tuimala, J., Paulin, L., Mäkivuokko, H., Kajander, K., and Palva, A. (2009). Microbial community analysis reveals high level phylogenetic alterations in the overall gastrointestinal microbiota of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome sufferers. *BMC Gastroenterol.* 9, 95.
- Kurata, J.H., Kantor-Fish, S., Frankl, H., Godby, P., and Vadheim, C.M. (1992). Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology* 102, 1940–1948.
- Laforge, M., Bidère, N., Carmona, S., Devocelle, A., Charpentier, B., and Senik, A. (2006). Apoptotic death concurrent with CD3 stimulation in primary human CD8+ T lymphocytes: a role for endogenous granzyme B. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 176, 3966–3977.
- Laird, J.M., Roza, C., De Felipe, C., Hunt, S.P., and Cervero, F. (2001a). Role of central and peripheral tachykinin NK1 receptors in capsaicin-induced pain and hyperalgesia in mice. *Pain* 90, 97–103.
- Laird, J.M., Martinez-Caro, L., Garcia-Nicas, E., and Cervero, F. (2001b). A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse. *Pain* 92, 335–342.
- Lane, D.A., Philippou, H., and Huntington, J.A. (2005). Directing thrombin. *Blood* 106, 2605–2612.
- Langhorst, J., Elsenbruch, S., Koelzer, J., Rueffer, A., Michalsen, A., and Dobos, G.J. (2008). Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 162–169.
- Larauche, M., Gourcerol, G., Wang, L., Pambukchian, K., Brunnhuber, S., Adelson, D.W., Rivier, J., Million, M., and Taché, Y. (2009). Cortagine, a CRF1 agonist, induces stresslike alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 297, G215.
- Larauche, M., Mulak, A., and Taché, Y. (2011). Stress-Related Alterations of Visceral Sensation: Animal Models for Irritable Bowel Syndrome Study. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 17, 213.
- Larauche, M., Mulak, A., and Taché, Y. (2012). Stress and visceral pain: from animal models to clinical therapies. *Exp. Neurol.* 233, 49.
- Law, R.H., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A.M., Silverman, G.A., Wong, W., Rosado, C.J., Langendorf, C.G., Pike, R.N., Bird, P.I., et al. (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.* 7, 216.
- Lechner, A.M., Assfalg-Machleidt, I., Zahler, S., Stoeckelhuber, M., Machleidt, W., Jochum, M., and Nögler, D.K. (2006). RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 mediates cell-adhesive properties. *J. Biol. Chem.* 281, 39588–39597.



Lee, S.H. (2015). Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. *Intest. Res.* 13, 11.

Lee, J., Mo, J.-H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A.N., Liu, Y.-T., Lee, H.-K., Shen, C., Cojocaru, G., Shenouda, S., et al. (2006). Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 8, 1327–1336.

Lee, K.J., Kim, J.H., and Cho, S.W. (2005). Gabapentin reduces rectal mechanosensitivity and increases rectal compliance in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22, 981–988.

Lee, K.J., Kim, Y.B., Kim, J.H., Kwon, H.C., Kim, D.K., and Cho, S.W. (2008). The alteration of enterochromaffin cell, mast cell, and lamina propria T lymphocyte numbers in irritable bowel syndrome and its relationship with psychological factors. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, 1689–1694.

Leeds, J.S., Hopper, A.D., Sidhu, R., Simmonette, A., Azadbakht, N., Hoggard, N., Morley, S., and Sanders, D.S. (2010). Some patients with irritable bowel syndrome may have exocrine pancreatic insufficiency. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 8, 433–438.

Lembo, T., Plourde, V., Shui, Z., Fullerton, S., Mertz, H., Tache, Y., Sytnik, B., Munakata, J., and Mayer, E. (1996). Effects of the corticotropin-releasing factor (CRF) on rectal afferent nerves in humans. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 8, 9–18.

Lesko, S., Wessler, I., Gäbel, G., Petto, C., and Pfannkuche, H. (2013). Cholinergic modulation of epithelial integrity in the proximal colon of pigs. *Cells Tissues Organs* 197, 411–420.

Levine, B., Mizushima, N., and Virgin, H.W. (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 469, 323–335.

Levy, R.L., Jones, K.R., Whitehead, W.E., Feld, S.I., Talley, N.J., and Corey, L.A. (2001). Irritable bowel syndrome in twins: Heredity and social learning both contribute to etiology. *Gastroenterology* 121, 799–804.

Li, W., Wang, H., Kuang, C.-Y., Zhu, J.-K., Yu, Y., Qin, Z.-X., Liu, J., and Huang, L. (2012). An essential role for the Id1/PI3K/Akt/NFκB/survivin signalling pathway in promoting the proliferation of endothelial progenitor cells in vitro. *Mol. Cell. Biochem.* 363, 135–145.

Lichtiger, S., Present, D.H., Kornbluth, A., Gelernt, I., Bauer, J., Galler, G., Michelassi, F., and Hanauer, S. (1994). Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N. Engl. J. Med.* 330, 1841–1845.

Lidell, M.E., Moncada, D.M., Chadee, K., and Hansson, G.C. (2006). *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9298–9303.

- Linden, D.R., Manning, B.P., Bunnett, N.W., and Mawe, G.M. (2001). Agonists of proteinase-activated receptor 2 excite guinea pig ileal myenteric neurons. *Eur. J. Pharmacol.* *431*, 311–314.
- Lodes, M.J., Cong, Y., Elson, C.O., Mohamath, R., Landers, C.J., Targan, S.R., Fort, M., and Hershberg, R.M. (2004). Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J. Clin. Invest.* *113*, 1296–1306.
- Loftus, E.V., Schoenfeld, P., and Sandborn, W.J. (2002). The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *16*, 51–60.
- Louis, E., Collard, A., Oger, A.F., Degroote, E., Aboul Nasr El Yafi, F.A., and Belaiche, J. (2001). Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* *49*, 777–782.
- Lovell, R.M., and Ford, A.C. (2012). Global Prevalence of and Risk Factors for Irritable Bowel Syndrome: A Meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 712–721.e4.
- Ludidi, S., Mujagic, Z., Jonkers, D., Keszthelyi, D., Hesselink, M., Kruimel, J., Conchillo, J., and Masclee, A. (2014). Markers for visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* *26*, 1104–1111.
- Ludidi, S., Jonkers, D., Elamin, E., Pieters, H.-J., Schaepkens, E., Bours, P., Kruimel, J., Conchillo, J., and Masclee, A. (2015). The Intestinal Barrier in Irritable Bowel Syndrome: Subtype-Specific Effects of the Systemic Compartment in an In Vitro Model. *PLOS ONE* *10*, e0123498.
- Luo, K., and Cao, S.S. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress in Intestinal Epithelial Cell Function and Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Res. Pract.* *2015*.
- Macfarlane, G.T., and Macfarlane, S. (2011). Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* *45 Suppl*, S120-127.
- Macfarlane, S., and Macfarlane, G.T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* *62*, 67–72.
- Mack, D.R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., and Hollingsworth, M.A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.* *276*, G941-950.
- Macsharry, J., O'Mahony, L., Fanning, A., Bairead, E., Sherlock, G., Tiesman, J., Fulmer, A., Kiely, B., Dinan, T.G., Shanahan, F., et al. (2008). Mucosal cytokine imbalance in irritable bowel syndrome. *Scand. J. Gastroenterol.* *43*, 1467–1476.
- Maekawa, H., and Tollefsen, D.M. (1996). Role of the Proposed Serpin-Enzyme Complex Receptor Recognition Site in Binding and Internalization of Thrombin-Heparin Cofactor II Complexes by Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* *271*, 18604–18609.

- Maillot, C., Million, M., Wei, J.Y., Gauthier, A., and Taché, Y. (2000). Peripheral corticotropin-releasing factor and stress-stimulated colonic motor activity involve type 1 receptor in rats. *Gastroenterology* *119*, 1569–1579.
- Maison, W., Schlemminger, I., Westerhoff, O., and Martens, J. (1999). Modified PNAs: a simple method for the synthesis of monomeric building blocks. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *9*, 581–584.
- Mäkinen, P.L., Clewell, D.B., An, F., and Mäkinen, K.K. (1989). Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase (“gelatinase”) from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). *J. Biol. Chem.* *264*, 3325–3334.
- Mallon, P., McKay, D., Kirk, S., and Gardiner, K. (2007). Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD005573.
- Man, S.M., Kaakoush, N.O., and Mitchell, H.M. (2011). The role of bacteria and pattern-recognition receptors in Crohn’s disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *8*, 152–168.
- Mankertz, J., Amasheh, M., Krug, S.M., Fromm, A., Amasheh, S., Hillenbrand, B., Tavalali, S., Fromm, M., and Schulzke, J.D. (2009). TNF $\alpha$  up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res.* *336*, 67–77.
- Mansueto, P., D’Alcamo, A., Seidita, A., and Carroccio, A. (2015). Food allergy in irritable bowel syndrome: The case of non-celiac wheat sensitivity. *World J. Gastroenterol. WJG* *21*, 7089.
- Mantis, N.J., McGuinness, C.R., Sonuyi, O., Edwards, G., and Farrant, S.A. (2006). Immunoglobulin A antibodies against ricin A and B subunits protect epithelial cells from ricin intoxication. *Infect. Immun.* *74*, 3455–3462.
- Marchbank, T., Mahmood, A., Fitzgerald, A.J., Domin, J., Butler, M., Goodlad, R.A., Elia, G., Cox, H.M., van Heel, D.A., Ghosh, S., et al. (2007). Human pancreatic secretory trypsin inhibitor stabilizes intestinal mucosa against noxious agents. *Am. J. Pathol.* *171*, 1462–1473.
- Marger, F., Gelot, A., Alloui, A., Matricon, J., Ferrer, J.F.S., Barrère, C., Pizzoccaro, A., Muller, E., Nargeot, J., Snutch, T.P., et al. (2011). T-type calcium channels contribute to colonic hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11268–11273.
- Marín, L., Miguélez, E.M., Villar, C.J., and Lombó, F. (2015). Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed Res. Int.* *2015*, 905215.
- Matsuoka, K., and Kanai, T. (2015). The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin. Immunopathol.* *37*, 47–55.
- Matthes, H., Krummenerl, T., Giensch, M., Wolff, C., and Schulze, J. (2010). Clinical trial: probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). *BMC Complement. Altern. Med.* *10*, 13.

- Maul, J., Loddenkemper, C., Mundt, P., Berg, E., Giese, T., Stallmach, A., Zeitz, M., and Duchmann, R. (2005). Peripheral and intestinal regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>(high)</sup> T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *128*, 1868–1878.
- Mawdsley, J.E., and Rampton, D.S. (2005). Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* *54*, 1481–1491.
- Mayer, E.A. (2000). The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut* *47*, 861–869.
- Mayer, E.A., and Gebhart, G.F. (1994). Basic and clinical aspects of visceral hyperalgesia. *Gastroenterology* *107*, 271–293.
- Mayer, L., and Eisenhardt, D. (1990). Lack of induction of suppressor T cells by intestinal epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* *86*, 1255–1260.
- Mazmanian, S.K., Round, J.L., and Kasper, D.L. (2008). A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* *453*, 620–625.
- McGrath, J., McDonald, J.W.D., and Macdonald, J.K. (2004). Transdermal nicotine for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004722.
- McLean, P.G., Picard, C., Garcia-Villar, R., Ducos de Lahitte, R., Moré, J., Fioramonti, J., and Buéno, L. (1998). Role of kinin B1 and B2 receptors and mast cells in post intestinal infection-induced hypersensitivity to distension. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *10*, 499–508.
- McMahon, S.B., Cafferty, W.B.J., and Marchand, F. (2005). Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp. Neurol.* *192*, 444–462.
- McMichael, J.W., Roghanian, A., Jiang, L., Ramage, R., and Sallenave, J.-M. (2005). The antimicrobial antiproteinase elafin binds to lipopolysaccharide and modulates macrophage responses. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *32*, 443–452.
- McQuibban, G.A., Gong, J.-H., Wong, J.P., Wallace, J.L., Clark-Lewis, I., and Overall, C.M. (2002). Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* *100*, 1160–1167.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* *454*, 428–435.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* *427*, 154–159.
- Mertz, H., Naliboff, B., Munakata, J., Niazi, N., and Mayer, E.A. (1995). Altered rectal perception is a biological marker of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* *109*, 40–52.

- Meyer-Hoffert, U., Wingertszahn, J., and Wiedow, O. (2004). Human leukocyte elastase induces keratinocyte proliferation by epidermal growth factor receptor activation. *J. Invest. Dermatol.* *123*, 338–345.
- Meynard, D., Vaja, V., Sun, C.C., Corradini, E., Chen, S., López-Otín, C., Grgurevic, L., Hong, C.C., Stirnberg, M., Gütschow, M., et al. (2011). Regulation of TMPRSS6 by BMP6 and iron in human cells and mice. *Blood* *118*, 747–756.
- Michlewska, S., Dransfield, I., Megson, I.L., and Rossi, A.G. (2009). Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF-alpha. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *23*, 844–854.
- Middel, P., Raddatz, D., Gunawan, B., Haller, F., and Radzun, H.-J. (2006). Increased number of mature dendritic cells in Crohn's disease: evidence for a chemokine mediated retention mechanism. *Gut* *55*, 220–227.
- Mihara, K., Ramachandran, R., Saifeddine, M., Hansen, K.K., Renaux, B., Polley, D., Gibson, S., Vanderboor, C., and Hollenberg, M.D. (2016). Thrombin-Mediated Direct Activation of Proteinase-Activated Receptor-2: Another Target for Thrombin Signaling. *Mol. Pharmacol.* *89*, 606–614.
- Minn, A., Schubert, M., Neiss, W.F., and Müller-Hill, B. (1998). Enhanced GFAP expression in astrocytes of transgenic mice expressing the human brain-specific trypsinogen IV. *Glia* *22*, 338–347.
- Miranda-Bautista, J., de Gracia-Fernández, C., López-Ibáñez, M., Barrientos, M., Gallo-Moltó, A., González-Arias, M., González-Gil, C., Díaz-Redondo, A., Marín-Jiménez, I., and Menchén, L. (2015). Lipid Profile in Inflammatory Bowel Disease Patients on Anti-TNF $\alpha$  Therapy. *Dig. Dis. Sci.* *60*, 2130–2135.
- Miyai, M., Matsumoto, Y., Yamanishi, H., Yamamoto-Tanaka, M., Tsuboi, R., and Hibino, T. (2014). Keratinocyte-Specific Mesotrypsin Contributes to the Desquamation Process via Kallikrein Activation and LEKTI Degradation. *J. Invest. Dermatol.* *134*, 1665–1674.
- Molinié, F., Gower-Rousseau, C., Yzet, T., Merle, V., Grandbastien, B., Marti, R., Lerebours, E., Dupas, J.-L., Colombel, J.-F., Salomez, J.-L., et al. (2004). Opposite evolution in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut* *53*, 843–848.
- Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., et al. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* *142*, 46–54.e42; quiz e30.
- Moloney, R.D., O'Mahony, S.M., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2015). Stress-induced visceral pain: toward animal models of irritable-bowel syndrome and associated comorbidities. *Front. Psychiatry* *6*, 15.
- Monteleone, G., Monteleone, I., Fina, D., Vavassori, P., Del Vecchio Blanco, G., Caruso, R., Tersigni, R., Alessandrini, L., Biancone, L., Naccari, G.C., et al. (2005). Interleukin-21

- enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 128, 687–694.
- Moore, C.A.C., Milano, S.K., and Benovic, J.L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 451–482.
- Moret, C., and Briley, M. (2006). Antidepressants in the treatment of fibromyalgia. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2, 537.
- Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, M.S., Depew, W.T., Szewczuk, M.R., and Wallace, J.L. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96, 795–803.
- Morris-Yates, A., Talley, N.J., Boyce, P.M., Nandurkar, S., and Andrews, G. (1998). Evidence of a genetic contribution to functional bowel disorder. *Am. J. Gastroenterol.* 93, 1311–1317.
- Morteau, O., Hachet, T., Caussette, M., and Bueno, L. (1994). Experimental colitis alters visceromotor response to colorectal distension in awake rats. *Dig. Dis. Sci.* 39, 1239–1248.
- Mortha, A., Chudnovskiy, A., Hashimoto, D., Bogunovic, M., Spencer, S.P., Belkaid, Y., and Merad, M. (2014). Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* 343, 1249288.
- Motta, J.-P., Magne, L., Descamps, D., Rolland, C., Squarzoni-Dale, C., Rousset, P., Martin, L., Cenac, N., Balloy, V., Huerre, M., et al. (2011). Modifying the protease, antiprotease pattern by elafin overexpression protects mice from colitis. *Gastroenterology* 140, 1272–1282.
- Motta, J.-P., Bermúdez-Humarán, L.G., Deraison, C., Martin, L., Rolland, C., Rousset, P., Boue, J., Dietrich, G., Chapman, K., Kharrat, P., et al. (2012). Food-grade bacteria expressing elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis. *Sci. Transl. Med.* 4, 158ra144.
- Muller, W.A. (2013). Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet. Pathol.* 50, 7–22.
- Murdoch, T.B., Xu, W., Stempak, J.M., Landers, C., Targan, S.R., Rotter, J.I., and Silverberg, M.S. (2012). Pattern recognition receptor and autophagy gene variants are associated with development of antimicrobial antibodies in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 1743–1748.
- Murrell, T.G., and Deller, D.J. (1967). Intestinal motility in man: the effect of bradykinin on the motility of the distal colon. *Am. J. Dig. Dis.* 12, 568–576.
- Nanayakkara, W.S., Skidmore, P.M., O'Brien, L., Wilkinson, T.J., and Geary, R.B. (2016). Efficacy of the low FODMAP diet for treating irritable bowel syndrome: the evidence to date. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 9, 131.
- Narducci, F., Snape, W.J., Battle, W.M., London, R.L., and Cohen, S. (1985). Increased colonic motility during exposure to a stressful situation. *Dig. Dis. Sci.* 30, 40–44.

- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846–852.
- Neill, D.R., Wong, S.H., Bellosi, A., Flynn, R.J., Daly, M., Langford, T.K.A., Bucks, C., Kane, C.M., Fallon, P.G., Pannell, R., et al. (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464, 1367–1370.
- Neurath, M.F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 329–342.
- Newberry, R.D., and Lorenz, R.G. (2005). Organizing a mucosal defense. *Immunol. Rev.* 206, 6–21.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A., and Vaulont, S. (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8780–8785.
- Niec, A.M., Frankum, B., and Talley, N.J. (1998). Are adverse food reactions linked to irritable bowel syndrome? *Am. J. Gastroenterol.* 93, 2184–2190.
- Nielsen, O.H., Vainer, B., and Rask-Madsen, J. (2001). Review article: the treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine or azathioprine. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15, 1699–1708.
- Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B.A., Vyas, J.M., Boes, M., Ploegh, H.L., Fox, J.G., et al. (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254–258.
- Nieto-Alamilla, G., Márquez-Gómez, R., García-Gálvez, A.-M., Morales-Figueroa, G.-E., and Arias-Montaño, J.-A. (2016). The Histamine H3 Receptor: Structure, Pharmacology, and Function. *Mol. Pharmacol.* 90, 649–673.
- Noguchi, E., Homma, Y., Kang, X., Netea, M.G., and Ma, X. (2009). A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nat. Immunol.* 10, 471–479.
- Nostrant, T.T., Kumar, N.B., and Appelman, H.D. (1987). Histopathology differentiates acute self-limited colitis from ulcerative colitis. *Gastroenterology* 92, 318–328.
- Nufer, O., Corbett, M., and Walz, A. (1999). Amino-terminal processing of chemokine ENA-78 regulates biological activity. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 636–642.
- Nystedt, S., Emilsson, K., Wahlestedt, C., and Sundelin, J. (1994). Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9208–9212.
- Nystedt, S., Emilsson, K., Larsson, A.K., Strömbeck, B., and Sundelin, J. (1995). Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur. J. Biochem.* 232, 84–89.
- Obermajer, N., Doljak, B., Jamnik, P., Fonović, U.P., and Kos, J. (2009). Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1685–1696.

Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., et al. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603–606.

O'Hara, A.M., and Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7, 688.

Öhman, L., Isaksson, S., Lundgren, A., Simrén, M., and Sjövall, H. (2005). A Controlled Study of Colonic Immune Activity and  $\beta$ 7+ Blood T Lymphocytes in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 980–986.

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98, 694–702.

Oliva, S., Di Nardo, G., Ferrari, F., Mallardo, S., Rossi, P., Patrizi, G., Cucchiara, S., and Stronati, L. (2012). Randomised clinical trial: the effectiveness of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 rectal enema in children with active distal ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35, 327–334.

O'Mahony, S.M., Tramullas, M., Fitzgerald, P., and Cryan, J.F. (2012). Rodent models of colorectal distension. *Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 9*, Unit 9.40.

Ong, D.K., Mitchell, S.B., Barrett, J.S., Shepherd, S.J., Irving, P.M., Biesiekierski, J.R., Smith, S., Gibson, P.R., and Muir, J.G. (2010). Manipulation of dietary short chain carbohydrates alters the pattern of gas production and genesis of symptoms in irritable bowel syndrome. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25, 1366–1373.

Oren, R., Arber, N., Odes, S., Moshkowitz, M., Keter, D., Pomeranz, I., Ron, Y., Reisfeld, I., Broide, E., Lavy, A., et al. (1996). Methotrexate in chronic active ulcerative colitis: a double-blind, randomized, Israeli multicenter trial. *Gastroenterology* 110, 1416–1421.

Ossovskaya, V.S., and Bunnett, N.W. (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol. Rev.* 84, 579–621.

Østgaard, H., Hausken, T., Gundersen, D., and El-Salhy, M. (2012). Diet and effects of diet management on quality of life and symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Mol. Med. Rep.* 5, 1382–1390.

Pabst, O., Cerovic, V., and Hornef, M. (2016). Secretory IgA in the Coordination of Establishment and Maintenance of the Microbiota. *Trends Immunol.* 37, 287–296.

Pallaoro, M., Fejzo, M.S., Shayesteh, L., Blount, J.L., and Caughey, G.H. (1999). Characterization of genes encoding known and novel human mast cell tryptases on chromosome 16p13.3. *J. Biol. Chem.* 274, 3355–3362.

Panaccione, R., Ferraz, J.G., and Beck, P. (2005). Advances in medical therapy of inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 566–572.

Pathak, M., Wong, S.S., Dreveny, I., and Emsley, J. (2013). Structure of plasma and tissue kallikreins. *Thromb. Haemost.* 110, 423–433.



- Pei, Z., Bini, E.J., Yang, L., Zhou, M., Francois, F., and Blaser, M.J. (2004). Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4250–4255.
- Pendergraft, W.F., Rudolph, E.H., Falk, R.J., Jahn, J.E., Grimmler, M., Hengst, L., Jennette, J.C., and Preston, G.A. (2004). Proteinase 3 sidesteps caspases and cleaves p21(Waf1/Cip1/Sdi1) to induce endothelial cell apoptosis. *Kidney Int.* *65*, 75–84.
- Perlmutter, D.H., Glover, G.I., Rivetna, M., Schasteen, C.S., and Fallon, R.J. (1990). Identification of a serpin-enzyme complex receptor on human hepatoma cells and human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 3753.
- Peters, S.L., Muir, J.G., and Gibson, P.R. (2015). Review article: gut-directed hypnotherapy in the management of irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *41*, 1104–1115.
- Peterson, L.W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 141–153.
- Peyrin-Biroulet, L., Deltenre, P., de Suray, N., Branche, J., Sandborn, W.J., and Colombel, J.-F. (2008). Efficacy and safety of tumor necrosis factor antagonists in Crohn's disease: meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *6*, 644–653.
- Pfundt, R., van Ruissen, F., van Vlijmen-Willems, I.M., Alkemade, H.A., Zeeuwen, P.L., Jap, P.H., Dijkman, H., Fransen, J., Croes, H., van Erp, P.E., et al. (1996). Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides anti-elastase defense in human epithelia. *J. Clin. Invest.* *98*, 1389–1399.
- Pham, C.T.N. (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 541–550.
- Piche, T. (2014). Tight junctions and IBS - the link between epithelial permeability, low-grade inflammation, and symptom generation? *Neurogastroenterol. Motil.* *26*, 296–302.
- Pickard, J.M., and Chervonsky, A.V. (2010). Sampling of the intestinal microbiota by epithelial M cells. *Curr. Gastroenterol. Rep.* *12*, 331–339.
- Pimentel, M., Chatterjee, S., Chang, C., Low, K., Song, Y., Liu, C., Morales, W., Ali, L., Lezcano, S., Conklin, J., et al. (2008). A new rat model links two contemporary theories in irritable bowel syndrome. *Dig. Dis. Sci.* *53*, 982–989.
- Pimentel, M., Hwang, L., Melmed, G.Y., Low, K., Vasilias, E., Ippoliti, A., Yang, J., Lezcano, S., Conklin, J.L., and Sahakian, A. (2010). New Clinical Method for Distinguishing D-IBS from Other Gastrointestinal Conditions Causing Diarrhea: The LA/IBS Diagnostic Strategy. *Dig. Dis. Sci.* *55*, 145–149.
- Piscaglia, A.C. (2014). Intestinal stem cells and celiac disease. *World J. Stem Cells* *6*, 213.
- Platt, A.M., Bain, C.C., Bordon, Y., Sester, D.P., and Mowat, A.M. (2010). An independent subset of TLR expressing CCR2-dependent macrophages promotes colonic inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 6843–6854.

Posserud, I., Stotzer, P.-O., Bjornsson, E.S., Abrahamsson, H., and Simren, M. (2007). Small intestinal bacterial overgrowth in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 56, 802–808.

Powley, T.L., and Phillips, R.J. (2002). Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflexes? I. Morphology and topography of vagal afferents innervating the GI tract. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, G1217-1225.

Prantera, C., Scribano, M.L., Falasco, G., Andreoli, A., and Luzi, C. (2002). Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus GG*. *Gut* 51, 405–409.

Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K.L., Powell, R.M., MacDonald, T.T., and Collins, J.E. (2005). Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* 85, 1139–1162.

Pruteanu, M., Hyland, N.P., Clarke, D.J., Kiely, B., and Shanahan, F. (2011). Degradation of the extracellular matrix components by bacterial-derived metalloproteases: implications for inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 1189–1200.

Psichas, A., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2015). Gut chemosensing mechanisms. *J. Clin. Invest.* 125, 908–917.

Qin, H.-Y., Wu, J.C.Y., Tong, X.-D., Sung, J.J.Y., Xu, H.-X., and Bian, Z.-X. (2011). Systematic review of animal models of post-infectious/post-inflammatory irritable bowel syndrome. *J. Gastroenterol.* 46, 164–174.

Quévrain, E., Maubert, M.A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., Miquel, S., Carlier, L., Bermúdez-Humarán, L.G., Pigneur, B., et al. (2016). Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 65, 415–425.

Quinton, J.F., Sendid, B., Reumaux, D., Duthilleul, P., Cortot, A., Grandbastien, B., Charrier, G., Targan, S.R., Colombel, J.F., and Poulain, D. (1998). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 42, 788–791.

Raithel, M., Winterkamp, S., Pacurar, A., Ulrich, P., Hochberger, J., and Hahn, E.G. (2001). Release of mast cell tryptase from human colorectal mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 36, 174–179.

Rajilić-Stojanović, M., Biagi, E., Heilig, H.G.H.J., Kajander, K., Kekkonen, R.A., Tims, S., and de Vos, W.M. (2011). Global and Deep Molecular Analysis of Microbiota Signatures in Fecal Samples From Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 141, 1792–1801.

Rajilić-Stojanović, M., Jonkers, D.M., Salonen, A., Hanevik, K., Raes, J., Jalanka, J., de Vos, W.M., Manichanh, C., Golic, N., Enck, P., et al. (2015). Intestinal Microbiota And Diet in IBS: Causes, Consequences, or Epiphenomena? *Am. J. Gastroenterol.* 110, 278–287.

Ramachandran, R., Mihara, K., Chung, H., Renaux, B., Lau, C.S., Muruve, D.A., DeFea, K.A., Bouvier, M., and Hollenberg, M.D. (2011). Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase-activated receptor-2 (PAR2). *J. Biol. Chem.* *286*, 24638–24648.

Ramelli, G., Fuertes, S., Narayan, S., Busso, N., Acha-Orbea, H., and So, A. (2010). Protease-activated receptor 2 signalling promotes dendritic cell antigen transport and T-cell activation in vivo. *Immunology* *129*, 20–27.

Ransford, R. a. J., and Langman, M.J.S. (2002). Sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the Committee on Safety of Medicines. *Gut* *51*, 536–539.

Rao, N.V., Marshall, B.C., Gray, B.H., and Hoidal, J.R. (1993). Interaction of secretory leukocyte protease inhibitor with proteinase-3. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *8*, 612–616.

Rasmussen, U.B., Vouret-Craviari, V., Jallat, S., Schlesinger, Y., Pagès, G., Pavirani, A., Lecocq, J.P., Pouysségur, J., and Van Obberghen-Schilling, E. (1991). cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca<sup>2+</sup> mobilization. *FEBS Lett.* *288*, 123–128.

Ratcliffe, E.M. (2011). Molecular development of the extrinsic sensory innervation of the gastrointestinal tract. *Auton. Neurosci.* *161*, 1–5.

Rawlings, N.D. (2010). Peptidase inhibitors in the MEROPS database. *Biochimie* *92*, 1463–1483.

Reed, K.K., and Wickham, R. (2009). Review of the Gastrointestinal Tract: From Macro to Micro. *Semin. Oncol. Nurs.* *25*, 3–14.

Reed, D.E., Barajas-Lopez, C., Cottrell, G., Velazquez-Rocha, S., Dery, O., Grady, E.F., Bunnett, N.W., and Vanner, S.J. (2003). Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. *J. Physiol.* *547*, 531–542.

Ricciardelli, I., Lindley, K.J., Londei, M., and Quaratino, S. (2008). Anti tumour necrosis-alpha therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. *Immunology* *125*, 178–183.

Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat. Immunol.* *6*, 507–514.

Rinderknecht, H., Renner, I.G., Abramson, S.B., and Carmack, C. (1984). Mesotrypsin: a new inhibitor-resistant protease from a zymogen in human pancreatic tissue and fluid. *Gastroenterology* *86*, 681–692.

Riordan, A.M., Ruxton, C.H., and Hunter, J.O. (1998). A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars. *Eur. J. Clin. Nutr.* *52*, 229–238.

- Rivas, M.A., Beaudoin, M., Gardet, A., Stevens, C., Sharma, Y., Zhang, C.K., Boucher, G., Ripke, S., Ellinghaus, D., Burtt, N., et al. (2011). Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.* *43*, 1066–1073.
- Roblin, X., and Bonaz, B. (2007). Osteoporosis and inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* *102*, 209; author reply 209-210.
- Roda, G., Sartini, A., Zambon, E., Calafiore, A., Marocchi, M., Caponi, A., Belluzzi, A., and Roda, E. (2010). Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol. WJG* *16*, 4264–4271.
- Rolfe, V.E., Fortun, P.J., Hawkey, C.J., and Bath-Hextall, F. (2006). Probiotics for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004826.
- Rolland-Fourcade, C., Denadai-Souza, A., Cirillo, C., Lopez, C., Jaramillo, J.O., Desormeaux, C., Cenac, N., Motta, J.-P., Larauche, M., Taché, Y., et al. (2017). Epithelial expression and function of trypsin-3 in irritable bowel syndrome. *Gut*.
- Rosen, M.R., Brink, P.R., Cohen, I.S., and Robinson, R.B. (2004). Genes, stem cells and biological pacemakers. *Cardiovasc. Res.* *64*, 12–23.
- Rosenthal, R., Milatz, S., Krug, S.M., Oelrich, B., Schulzke, J.-D., Amasheh, S., Günzel, D., and Fromm, M. (2010). Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J. Cell Sci.* *123*, 1913–1921.
- Rot, A., and von Andrian, U.H. (2004). Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 891–928.
- Round, J.L., Lee, S.M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T.A., and Mazmanian, S.K. (2011). The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science* *332*, 974–977.
- Roviezzo, F., Bucci, M., Brancaleone, V., Di Lorenzo, A., Geppetti, P., Farneti, S., Parente, L., Lungarella, G., Fiorucci, S., and Cirino, G. (2005). Proteinase-activated receptor-2 mediates arterial vasodilation in diabetes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *25*, 2349–2354.
- Rust, L., Pesci, E.C., and Iglewski, B.H. (1996). Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) regulatory region. *J. Bacteriol.* *178*, 1134–1140.
- Sabotič, J., and Kos, J. (2012). Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *93*, 1351–1375.
- Sahin-Tóth, M. (2005). HUMAN MESOTRYPSIN DEFIES NATURAL TRYPSIN INHIBITORS. FROM PASSIVE RESISTANCE TO ACTIVE DESTRUCTION. *Protein Pept. Lett.* *12*, 457–464.
- Saito, Y.A., Locke, G.R., Weaver, A.L., Zinsmeister, A.R., and Talley, N.J. (2005). Diet and functional gastrointestinal disorders: a population-based case-control study. *Am. J. Gastroenterol.* *100*, 2743–2748.

- Salameh, M.A., and Radisky, E.S. (2013). Biochemical and structural insights into mesotrypsin: an unusual human trypsin. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* *4*, 129–139.
- Sallenave, J.M. (2002). Antimicrobial activity of antiproteases. *Biochem. Soc. Trans.* *30*, 111–115.
- Sallenave, J.-M. (2010a). Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *42*, 635–643.
- Sallenave, J.-M. (2010b). Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *42*, 635–643.
- Salmon, P., Skaife, K., and Rhodes, J. (2003). Abuse, dissociation, and somatization in irritable bowel syndrome: towards an explanatory model. *J. Behav. Med.* *26*, 1–18.
- Samuel, B.S., Shaito, A., Motoike, T., Rey, F.E., Backhed, F., Manchester, J.K., Hammer, R.E., Williams, S.C., Crowley, J., Yanagisawa, M., et al. (2008). Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 16767–16772.
- Sandborn, W., Sutherland, L., Pearson, D., May, G., Modigliani, R., and Prantera, C. (2000). Azathioprine or 6-mercaptopurine for inducing remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD000545.
- Sandborn, W.J., Rutgeerts, P., Enns, R., Hanauer, S.B., Colombel, J.-F., Panaccione, R., D'Haens, G., Li, J., Rosenfeld, M.R., Kent, J.D., et al. (2007). Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* *146*, 829–838.
- Sasaki, K., Iizuka, M., Konno, S., Shindo, K., Sato, A., Horie, Y., and Watanabe, S. (2005). Ecabet sodium prevents the delay of wound repair in intestinal epithelial cells induced by hydrogen peroxide. *J. Gastroenterol.* *40*, 474–482.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* *459*, 262–265.
- Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., and Sofroniew, M.V. (2007). Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* *132*, 1344–1358.
- Sawa, S., Lochner, M., Satoh-Takayama, N., Dulauroy, S., Bérard, M., Kleinschek, M., Cua, D., Di Santo, J.P., and Eberl, G. (2011). ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat. Immunol.* *12*, 320–326.
- Scheiffele, F., and Fuss, I.J. (2002). Induction of TNBS colitis in mice. *Curr. Protoc. Immunol. Chapter 15*, Unit 15.19.

Schemann, M. (2005). Control of gastrointestinal motility by the “gut brain”--the enteric nervous system. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *41 Suppl 1*, S4-6.

Schoepfer, A.M., Schaffer, T., Seibold-schmid, B., Müller, S., and Seibold, F. (2008). Antibodies to flagellin indicate reactivity to bacterial antigens in IBS patients. *Neurogastroenterol. Motil.* *20*, 1110–1118.

Schulze, K.S. (2015). The imaging and modelling of the physical processes involved in digestion and absorption. *Acta Physiol.* *213*, 394–405.

Schulzke, J.-D., Bojarski, C., Zeissig, S., Heller, F., Gitter, A.H., and Fromm, M. (2006). Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1072*, 288–299.

Schwab, M., Schaeffeler, E., Marx, C., Fromm, M.F., Kaskas, B., Metzler, J., Stange, E., Herfarth, H., Schoelmerich, J., Gregor, M., et al. (2003). Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* *124*, 26–33.

Scoville, D.H., Sato, T., He, X.C., and Li, L. (2008). Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* *134*, 849–864.

Scudamore, C.L., Jepson, M.A., Hirst, B.H., and Miller, H.R. (1998). The rat mucosal mast cell chymase, RMCP-II, alters epithelial cell monolayer permeability in association with altered distribution of the tight junction proteins ZO-1 and occludin. *Eur. J. Cell Biol.* *75*, 321–330.

Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., and Finlay, B.B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* *90*, 859–904.

Sengupta, J.N., Su, X., and Gebhart, G.F. (1996). Kappa, but not mu or delta, opioids attenuate responses to distention of afferent fibers innervating the rat colon. *Gastroenterology* *111*, 968–980.

Sengupta, J.N., Mickle, A., Kannampalli, P., Spruell, R., McRorie, J., Shaker, R., and Miranda, A. (2014). Visceral analgesic effect of 5-HT(4) receptor agonist in rats involves the rostroventral medulla (RVM). *Neuropharmacology* *79*, 345–358.

Serhan, C.N., Chiang, N., and Van Dyke, T.E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 349–361.

Shahbazkhani, B., Sadeghi, A., Malekzadeh, R., Khatavi, F., Etemadi, M., Kalantri, E., Rostami-Nejad, M., and Rostami, K. (2015). Non-Celiac Gluten Sensitivity Has Narrowed the Spectrum of Irritable Bowel Syndrome: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. *Nutrients* *7*, 4542–4554.

Shaw, L., and Wiedow, O. (2011). Therapeutic potential of human elafin. *Biochem. Soc. Trans.* *39*, 1450–1454.

Shepherd, S.J., Parker, F.C., Muir, J.G., and Gibson, P.R. (2008a). Dietary Triggers of Abdominal Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome: Randomized Placebo-Controlled Evidence. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *6*, 765–771.

Shepherd, S.J., Parker, F.C., Muir, J.G., and Gibson, P.R. (2008b). Dietary triggers of abdominal symptoms in patients with irritable bowel syndrome: randomized placebo-controlled evidence. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *6*, 765–771.

Sheridan, B.S., and Lefrançois, L. (2010). Intraepithelial Lymphocytes: To Serve and Protect. *Curr. Gastroenterol. Rep.* *12*, 513.

Shindo, K., Iizuka, M., Sasaki, K., Konno, S., Itou, H., Horie, Y., and Watanabe, S. (2006). Sucralfate prevents the delay of wound repair in intestinal epithelial cells by hydrogen peroxide through NF-kappaB pathway. *J. Gastroenterol.* *41*, 450–461.

Shpacovitch, V., Feld, M., Hollenberg, M.D., Luger, T.A., and Steinhoff, M. (2008). Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J. Leukoc. Biol.* *83*, 1309–1322.

Shulzhenko, N., Morgun, A., Hsiao, W., Battle, M., Yao, M., Gavrilova, O., Orandle, M., Mayer, L., Macpherson, A.J., McCoy, K.D., et al. (2011). Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut. *Nat. Med.* *17*, 1585–1593.

Siegel, C.A., and MacDermott, R.P. (2009). Is chronic pain an extraintestinal manifestation of IBD? *Inflamm. Bowel Dis.* *15*, 769–771.

Simpson, K.J., Selfors, L.M., Bui, J., Reynolds, A., Leake, D., Khvorova, A., and Brugge, J.S. (2008). Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1027–1038.

Singh, V., Yang, J., Chen, T., Zachos, N.C., Kovbasnjuk, O., Verkman, A.S., and Donowitz, M. (2014). Translating molecular physiology of intestinal transport into pharmacologic treatment of diarrhea: stimulation of Na<sup>+</sup> absorption. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *12*, 27–31.

Sjövall, H., Abrahamsson, H., Westlander, G., Gillberg, R., Redfors, S., Jodal, M., and Lundgren, O. (1986). Intestinal fluid and electrolyte transport in man during reduced circulating blood volume. *Gut* *27*, 913–918.

Smith, J.L., and Bayles, D. (2007). Postinfectious irritable bowel syndrome: a long-term consequence of bacterial gastroenteritis. *J. Food Prot.* *70*, 1762–1769.

Smith, P.M., Howitt, M.R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C.A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J.N., and Garrett, W.S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* *341*, 569–573.

Snape, W.J., Carlson, G.M., and Cohen, S. (1976). Colonic myoelectric activity in the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* *70*, 326–330.

Snider, W.D., and McMahon, S.B. (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 20, 629–632.

Söderholm, J.D., Yang, P., Ceponis, P., Vohra, A., Riddell, R., Sherman, P.M., and Perdue, M.H. (2002). Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* 123, 1099–1108.

Soh, U.J.K., Dores, M.R., Chen, B., and Trejo, J. (2010). Signal transduction by protease-activated receptors. *Br. J. Pharmacol.* 160, 191–203.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., et al. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16731–16736.

Souza, H.S.P., Tortori, C.J.A., Castelo-Branco, M.T.L., Carvalho, A.T.P., Margallo, V.S., Delgado, C.F.S., Dines, I., and Elia, C.C.S. (2005). Apoptosis in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease: evidence of altered expression of FasL and perforin cytotoxic pathways. *Int. J. Colorectal Dis.* 20, 277–286.

de Souza, H.S.P., and Fiocchi, C. (2016). Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 13–27.

Spencer, J., Isaacson, P.G., MacDonald, T.T., Thomas, A.J., and Walker-Smith, J.A. (1991). Gamma/delta T cells and the diagnosis of coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol.* 85, 109–113.

Spiller, R. (2006). Role of motility in chronic diarrhoea. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 18, 1045–1055.

Spiller, R.C. (2003). Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 124, 1662–1671.

Spiller, R., and Garsed, K. (2009). Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 136, 1979–1988.

Spiller, R.C., Jenkins, D., Thornley, J.P., Hebden, J.M., Wright, T., Skinner, M., and Neal, K.R. (2000). Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 47, 804–811.

Stadnicki, A., DeLa Cadena, R.A., Sartor, R.B., Bender, D., Kettner, C.A., Rath, H.C., Adam, A., and Colman, R.W. (1996). Selective plasma kallikrein inhibitor attenuates acute intestinal inflammation in Lewis rat. *Dig. Dis. Sci.* 41, 912–920.

Stadnicki, A., Mazurek, U., Plewka, D., and Wilczok, T. (2003). Intestinal tissue kallikrein-kallistatin profile in inflammatory bowel disease. *Int. Immunopharmacol.* 3, 939–944.

Stappenbeck, T.S., Hooper, L.V., and Gordon, J.I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15451–15455.



- Stasi, C., Bellini, M., Bassotti, G., Blandizzi, C., and Milani, S. (2014). Serotonin receptors and their role in the pathophysiology and therapy of irritable bowel syndrome. *Tech. Coloproctology* 18, 613–621.
- Staud, R. (2015). Cytokine and immune system abnormalities in fibromyalgia and other central sensitivity syndromes. *Curr. Rheumatol. Rev.* 11, 109–115.
- Steed, H., Macfarlane, G.T., Blackett, K.L., Bahrami, B., Reynolds, N., Walsh, S.V., Cummings, J.H., and Macfarlane, S. (2010). Clinical trial: the microbiological and immunological effects of synbiotic consumption - a randomized double-blind placebo-controlled study in active Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 32, 872–883.
- Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryneck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W., and Remaut, E. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 289, 1352–1355.
- Steinbrecher, K.A., Harmel-Laws, E., Sitcheran, R., and Baldwin, A.S. (2008). Loss of epithelial RelA results in deregulated intestinal proliferative/apoptotic homeostasis and susceptibility to inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 2588–2599.
- Steinhoff, M., Buddenkotte, J., Shpacovitch, V., Rattenholl, A., Moormann, C., Vergnolle, N., Luger, T.A., and Hollenberg, M.D. (2005). Proteinase-Activated Receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response. *Endocr. Rev.* 26, 1–43.
- Stoney, R.J., and Reilly, L.M. (1983). Chronic visceral ischemia. An often overlooked cause of abdominal pain. *Postgrad. Med.* 74, 111–118.
- Strickland, D.K., Muratoglu, S.C., and Antalis, T.M. (2011). Serpin–Enzyme Receptors: LDL Receptor-Related Protein 1. *Methods Enzymol.* 499, 17.
- Sturm, A., and Dignass, A.U. (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol. WJG* 14, 348–353.
- Sukhotnik, I., Khateeb, K., Mogilner, J.G., Helou, H., Lurie, M., Coran, A.G., and Shiloni, E. (2007). Dietary glutamine supplementation prevents mucosal injury and modulates intestinal epithelial restitution following ischemia-reperfusion injury in the rat. *Dig. Dis. Sci.* 52, 1497–1504.
- Sullivan, S., Alex, P., Dassopoulos, T., Zachos, N.C., Iacobuzio-Donahue, C., Donowitz, M., Brant, S.R., Cuffari, C., Harris, M.L., Datta, L.W., et al. (2009). Downregulation of sodium transporters and NHERF proteins in IBD patients and mouse colitis models: potential contributors to IBD-associated diarrhea. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 261–274.
- Sun, J., Shen, X., Li, Y., Guo, Z., Zhu, W., Zuo, L., Zhao, J., Gu, L., Gong, J., and Li, J. (2016). Therapeutic Potential to Modify the Mucus Barrier in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients* 8.
- Sutton, V.R., Vaux, D.L., and Trapani, J.A. (1997). Bcl-2 prevents apoptosis induced by perforin and granzyme B, but not that mediated by whole cytotoxic lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 158, 5783–5790.

Suzuki, T., Moraes, T.J., Vachon, E., Ginzberg, H.H., Huang, T.-T., Matthay, M.A., Hollenberg, M.D., Marshall, J., McCulloch, C.A.G., Abreu, M.T.H., et al. (2005). Proteinase-activated receptor-1 mediates elastase-induced apoptosis of human lung epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *33*, 231–247.

Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Lochs, H., and Hale, L.-P. (2005). Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J. Gastroenterol.* *11*, 1131–1140.

Szmola, R., Kukor, Z., and Sahin-Tóth, M. (2003). Human Mesotrypsin Is a Unique Digestive Protease Specialized for the Degradation of Trypsin Inhibitors. *J. Biol. Chem.* *278*, 48580–48589.

Tack, J., Fried, M., Houghton, L.A., Spicak, J., and Fisher, G. (2006). Systematic review: the efficacy of treatments for irritable bowel syndrome--a European perspective. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *24*, 183–205.

Tack, J., Outryve, M. van, Beyens, G., Kerstens, R., and Vandeplassche, L. (2009). Prucalopride (Resolor) in the treatment of severe chronic constipation in patients dissatisfied with laxatives. *Gut* *58*, 357–365.

Taggart, C.C., Cryan, S.-A., Weldon, S., Gibbons, A., Greene, C.M., Kelly, E., Low, T.B., O'Neill, S.J., and McElvaney, N.G. (2005). Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *J. Exp. Med.* *202*, 1659–1668.

Tait Wojno, E.D., and Artis, D. (2012). Innate lymphoid cells: balancing immunity, inflammation, and tissue repair in the intestine. *Cell Host Microbe* *12*, 445–457.

Thim, L., Madsen, F., and Poulsen, S.S. (2002). Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur. J. Clin. Invest.* *32*, 519–527.

Thomas, C.M., and Versalovic, J. (2010). Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes* *1*, 148–163.

Thomas, G.A., Rhodes, J., and Green, J. (1996). Nicotine and gastrointestinal disease. *QJM Mon. J. Assoc. Physicians* *89*, 485–488.

Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K.G., Rangell, L., Klein, O.D., and de Sauvage, F.J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* *478*, 255–259.

Tiffany, C.W., and Burch, R.M. (1989). Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett.* *247*, 189–192.

Tilley, S.L., Coffman, T.M., and Koller, B.H. (2001). Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J. Clin. Invest.* *108*, 15–23.

Tooth, D., Garsed, K., Singh, G., Marciani, L., Lam, C., Fordham, I., Fields, A., Banwait, R., Lingaya, M., Layfield, R., et al. (2014). Characterisation of faecal protease activity in

irritable bowel syndrome with diarrhoea: origin and effect of gut transit. *Gut* 63, 753–760.

Torres, L.-F., Karam, S.M., Wendling, C., Chenard, M.-P., Kershenovich, D., Tomasetto, C., and Rio, M.-C. (2002). Trefoil factor 1 (TFF1/pS2) deficiency activates the unfolded protein response. *Mol. Med. Camb. Mass* 8, 273–282.

Toumi, F., Neunlist, M., Cassagnau, E., Parois, S., Laboisse, C.L., Galmiche, J.-P., and Jarry, A. (2003). Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 15, 239–242.

Trapani, J.A. (2001). Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol.* 2, reviews3014.1-reviews3014.7.

Tremblay, G.M., Sallenave, J.M., Israël-Assayag, E., Cormier, Y., and Gauldie, J. (1996). Elafin/elastase-specific inhibitor in bronchoalveolar lavage of normal subjects and farmer's lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 1092–1098.

Tsunemi, M., Matsuura, Y., Sakakibara, S., and Katsube, Y. (1996). Crystal structure of an elastase-specific inhibitor elafin complexed with porcine pancreatic elastase determined at 1.9 Å resolution. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 11570–11576.

Turner, J.R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 799–809.

Undseth, R., Berstad, A., Kløw, N.-E., Arnljot, K., Moi, K.S., and Valeur, J. (2014). Abnormal accumulation of intestinal fluid following ingestion of an unabsorbable carbohydrate in patients with irritable bowel syndrome: an MRI study. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 26, 1686–1693.

Ursing, B., Alm, T., Bárány, F., Bergelin, I., Ganrot-Norlin, K., Hoevels, J., Huitfeldt, B., Järnerot, G., Krause, U., Krook, A., et al. (1982). A comparative study of metronidazole and sulfasalazine for active Crohn's disease: the cooperative Crohn's disease study in Sweden. II. Result. *Gastroenterology* 83, 550–562.

Vachon, E., Bourbonnais, Y., Bingle, C.D., Rowe, S.J., Janelle, M.F., and Tremblay, G.M. (2002). Anti-inflammatory effect of pre-elafin in lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation. *Biol. Chem.* 383, 1249–1256.

Vaishnava, S., Yamamoto, M., Severson, K.M., Ruhn, K.A., Yu, X., Koren, O., Ley, R., Wakeland, E.K., and Hooper, L.V. (2011). The antibacterial lectin RegIIIγ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 334, 255–258.

Valatas, V., Vakas, M., and Kolios, G. (2013). The value of experimental models of colitis in predicting efficacy of biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 305, G763–785.

Valencia, X., Stephens, G., Goldbach-Mansky, R., Wilson, M., Shevach, E.M., and Lipsky, P.E. (2006). TNF downmodulates the function of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T-regulatory cells. *Blood* 108, 253–261.

- Van Deventer, S.J. (2000). Immunotherapy of Crohn's disease. *Scand. J. Immunol.* *51*, 18–22.
- Van Itallie, C.M., Holmes, J., Bridges, A., Gookin, J.L., Coccaro, M.R., Proctor, W., Colegio, O.R., and Anderson, J.M. (2008). The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J. Cell Sci.* *121*, 298–305.
- Van Spaendonk, H., Ceuleers, H., Witters, L., Patteet, E., Joossens, J., Augustyns, K., Lambeir, A.-M., De Meester, I., De Man, J.G., and De Winter, B.Y. (2017). Regulation of intestinal permeability: The role of proteases. *World J. Gastroenterol.* *23*, 2106–2123.
- Vejborg, R.M., Hancock, V., Petersen, A.M., Krogfelt, K.A., and Klemm, P. (2011). Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease. *BMC Genomics* *12*, 316.
- Veltkamp, C., Anstaett, M., Wahl, K., Möller, S., Gangl, S., Bachmann, O., Hardtke-Wolenski, M., Länger, F., Stremmel, W., Manns, M.P., et al. (2011). Apoptosis of regulatory T lymphocytes is increased in chronic inflammatory bowel disease and reversed by anti-TNF $\alpha$  treatment. *Gut* *60*, 1345–1353.
- Venkova, K., and Greenwood-van Meerveld, B. (2006). Long-lasting changes in small intestinal transport following the recovery from *Trichinella spiralis* infection. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *18*, 234–242.
- Vera, I., and Júdez, F.J. (2017). Eluxadolone in the treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. The SEPD perspective. *Rev. Espanola Enfermedades Dig. Organo Of. Soc. Espanola Patol. Dig.*
- Vergnolle, N. (1999). Proteinase-Activated Receptor-2-Activating Peptides Induce Leukocyte Rolling, Adhesion, and Extravasation In Vivo. *J. Immunol.* *163*, 5064–5069.
- Vergnolle, N. (2004). Modulation of visceral pain and inflammation by protease-activated receptors. *Br. J. Pharmacol.* *141*, 1264–1274.
- Vergnolle, N. (2005). Protease-activated receptors and inflammatory hyperalgesia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *100*, 173–176.
- Vergnolle, N. (2009). Protease-activated receptors as drug targets in inflammation and pain. *Pharmacol. Ther.* *123*, 292–309.
- Vergnolle, N. (2016). Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases. *Gut* [gutjnl-2015-309147](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309147).
- Vergnolle, N., Cellars, L., Mencarelli, A., Rizzo, G., Swaminathan, S., Beck, P., Steinhoff, M., Andrade-Gordon, P., Bunnett, N.W., Hollenberg, M.D., et al. (2006). A role for proteinase-activated receptor-1 in inflammatory bowel diseases. *J. Clin. Invest.* *116*, 2056.
- Vermeulen, W., De Man, J.G., Pelckmans, P.A., and De Winter, B.Y. (2014). Neuroanatomy of lower gastrointestinal pain disorders. *World J. Gastroenterol.* *20*, 1005–1020.

Verrier, T., Solhonne, B., Sallenave, J.-M., and Garcia-Verdugo, I. (2012). The WAP protein Trappin-2/Elafin: a handyman in the regulation of inflammatory and immune responses. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 1377–1380.

Victoria, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 429–457.

Villani, A., Lemire, M., Thabane, M., Belisle, A., Geneau, G., Garg, A.X., Clark, W.F., Moayyedi, P., Collins, S.M., Franchimont, D., et al. (2010). Genetic Risk Factors for Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome Following a Waterborne Outbreak of Gastroenteritis. *Gastroenterology* *138*, 1502–1513.

Visser, J., Rozing, J., Sapone, A., Lammers, K., and Fasano, A. (2009). Tight Junctions, Intestinal Permeability, and Autoimmunity Celiac Disease and Type 1 Diabetes Paradigms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1165*, 195.

Vivier, E., Spits, H., and Cupedo, T. (2009). Interleukin-22-producing innate immune cells: new players in mucosal immunity and tissue repair? *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 229–234.

Vivinus-Nébot, M., Dainese, R., Anty, R., Saint-Paul, M.C., Nano, J.L., Gonthier, N., Marjoux, S., Frin-Mathy, G., Bernard, G., Hébuterne, X., et al. (2012). Combination of allergic factors can worsen diarrheic irritable bowel syndrome: role of barrier defects and mast cells. *Am. J. Gastroenterol.* *107*, 75–81.

Vivinus-Nébot, M., Frin-Mathy, G., Bziouche, H., Dainese, R., Bernard, G., Anty, R., Filippi, J., Saint-Paul, M.C., Tulic, M.K., Verhasselt, V., et al. (2014). Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut* *63*, 744–752.

Vonarbourg, C., Mortha, A., Bui, V.L., Hernandez, P.P., Kiss, E.A., Hoyler, T., Flach, M., Bengsch, B., Thimme, R., Hölscher, C., et al. (2010). Regulated expression of nuclear receptor ROR $\gamma$ t confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR $\gamma$ t(+) innate lymphocytes. *Immunity* *33*, 736–751.

Vu, T.K., Hung, D.T., Wheaton, V.I., and Coughlin, S.R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* *64*, 1057–1068.

Wahl, C., Liptay, S., Adler, G., and Schmid, R.M. (1998). Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J. Clin. Invest.* *101*, 1163–1174.

Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y., Naramura, M., Tian, L., Towne, J., Sims, J.E., Stark, G.R., and Li, X. (2003). SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat. Immunol.* *4*, 920–927.

Waldhauer, I., and Steinle, A. (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* *27*, 5932–5943.

Wallace, K.L., Zheng, L.-B., Kanazawa, Y., and Shih, D.Q. (2014). Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* *20*, 6–21.

- Wallace, R.J., McKain, N., Shingfield, K.J., and Devillard, E. (2007). Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *J. Lipid Res.* *48*, 2247–2254.
- Wang, C.-Y., Meynard, D., and Lin, H.Y. (2014). The role of TMPRSS6/matriptase-2 in iron regulation and anemia. *Front. Pharmacol.* *5*, 114.
- Wang, Y., Luo, W., Wartmann, T., Halangk, W., Sahin-Tóth, M., and Reiser, G. (2006). Mesotrypsin, a brain trypsin, activates selectively proteinase-activated receptor-1, but not proteinase-activated receptor-2, in rat astrocytes. *J. Neurochem.* *99*, 759–769.
- Wang, Y., Luo, W., and Reiser, G. (2007). Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: Proteolysis and cellular functions. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 237–252.
- Watson, C.J., Hoare, C.J., Garrod, D.R., Carlson, G.L., and Warhurst, G. (2005). Interferon-gamma selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores. *J. Cell Sci.* *118*, 5221–5230.
- Weaver, C.T., and Hatton, R.D. (2009). Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 883–889.
- Weber, C.R., Nalle, S.C., Tretiakova, M., Rubin, D.T., and Turner, J.R. (2008). Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *88*, 1110–1120.
- Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., Wehkamp-von Meissner, B., Schlee, M., Enders, C., Sonnenborn, U., Nuding, S., Bengmark, S., Fellermann, K., et al. (2004). NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect. Immun.* *72*, 5750–5758.
- Wehkamp, J., Fellermann, K., Herrlinger, K.R., Bevins, C.L., and Stange, E.F. (2005). Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* *2*, 406–415.
- Wehkamp, J., Götz, M., Herrlinger, K., Steurer, W., and Stange, E.F. (2016). Inflammatory Bowel Disease. *Dtsch. Arzteblatt Int.* *113*, 72–82.
- Weiner, H.L., Cunha, A.P. da, Quintana, F., and Wu, H. (2005). Oral Tolerance. *Immunol. Rev.* *206*, 232.
- Whitehead, W.E., Palsson, O.S., Levy, R.R., Feld, A.D., Turner, M., and Von Korff, M. (2007). Comorbidity in Irritable Bowel Syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* *102*, 2767–2776.
- Wiedow, O., and Meyer-Hoffert, U. (2005). Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation. *J. Intern. Med.* *257*, 319–328.
- Wiegand, U., Corbach, S., Minn, A., Kang, J., and Müller-Hill, B. (1993). Cloning of the cDNA encoding human brain trypsinogen and characterization of its product. *Gene* *136*, 167–175.

Wilcz-Villega, E.M., McClean, S., and O'Sullivan, M.A. (2013). Mast cell tryptase reduces junctional adhesion molecule-A (JAM-A) expression in intestinal epithelial cells: implications for the mechanisms of barrier dysfunction in irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* *108*, 1140–1151.

Wilkinson, T.S., Dhaliwal, K., Hamilton, T.W., Lipka, A.F., Farrell, L., Davidson, D.J., Duffin, R., Morris, A.C., Haslett, C., Govan, J.R.W., et al. (2009). Trappin-2 promotes early clearance of *Pseudomonas aeruginosa* through CD14-dependent macrophage activation and neutrophil recruitment. *Am. J. Pathol.* *174*, 1338–1346.

Williams, A.J., Merrick, M.V., and Eastwood, M.A. (1991). Idiopathic bile acid malabsorption--a review of clinical presentation, diagnosis, and response to treatment. *Gut* *32*, 1004–1006.

Wine, E., Ossa, J.C., Gray-Owen, S.D., and Sherman, P.M. (2009). Adherent-invasive *Escherichia coli*, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia. *BMC Microbiol.* *9*, 180.

Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., and Neurath, M.F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat. Protoc.* *2*, 541–546.

Wouters, M.M., Balemans, D., Van Wanrooy, S., Dooley, J., Cibert-Goton, V., Alpizar, Y.A., Valdez-Morales, E.E., Nasser, Y., Van Veldhoven, P.P., Vanbrabant, W., et al. (2016). Histamine Receptor H1-Mediated Sensitization of TRPV1 Mediates Visceral Hypersensitivity and Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* *150*, 875–887.e9.

Wright, N.A. (2000). Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *Int. J. Exp. Pathol.* *81*, 117–143.

Wright, E.M., and Loo, D.D. (2000). Coupling between Na<sup>+</sup>, sugar, and water transport across the intestine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *915*, 54–66.

Xu, W.F., Andersen, H., Whitmore, T.E., Presnell, S.R., Yee, D.P., Ching, A., Gilbert, T., Davie, E.W., and Foster, D.C. (1998). Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 6642–6646.

Yahagi, N., Ichinose, M., Matsushima, M., Matsubara, Y., Miki, K., Kurokawa, K., Fukamachi, H., Tashiro, K., Shiokawa, K., Kageyama, T., et al. (1996). Complementary DNA cloning and sequencing of rat enteropeptidase and tissue distribution of its mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *219*, 806–812.

Yamamoto, M., Kweon, M.-N., Rennert, P.D., Hiroi, T., Fujihashi, K., McGhee, J.R., and Kiyono, H. (2004). Role of gut-associated lymphoreticular tissues in antigen-specific intestinal IgA immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 762–769.

Yan, F., Cao, H., Cover, T.L., Washington, M.K., Shi, Y., Liu, L., Chaturvedi, R., Peek, R.M., Wilson, K.T., and Polk, D.B. (2011). Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* *121*, 2242–2253.

- Yang, P., Tremaine, W.J., Meyer, R.L., and Prakash, U.B. (2000). Alpha1-antitrypsin deficiency and inflammatory bowel diseases. *Mayo Clin. Proc.* 75, 450–455.
- Yang, X., Sheng, L., Guan, Y., Qian, W., and Hou, X. (2009). Synaptic plasticity: the new explanation of visceral hypersensitivity in rats with *Trichinella spiralis* infection? *Dig. Dis. Sci.* 54, 937–946.
- Yiangou, Y., Facer, P., Chessell, I.P., Bountra, C., Chan, C., Fertleman, C., Smith, V., and Anand, P. (2007). Voltage-gated ion channel Nav1.7 innervation in patients with idiopathic rectal hypersensitivity and paroxysmal extreme pain disorder (familial rectal pain). *Neurosci. Lett.* 427, 77–82.
- Ying, Q.L., and Simon, S.R. (2001). Kinetics of the inhibition of proteinase 3 by elafin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24, 83–89.
- Yu, A.P., Cabanilla, L.A., Wu, E.Q., Mulani, P.M., and Chao, J. (2008). The costs of Crohn's disease in the United States and other Western countries: a systematic review. *Curr. Med. Res. Opin.* 24, 319–328.
- Yuan, C., Chen, L., Meehan, E.J., Daly, N., Craik, D.J., Huang, M., and Ngo, J.C. (2011). Structure of catalytic domain of Matriptase in complex with Sunflower trypsin inhibitor-1. *BMC Struct. Biol.* 11, 30.
- Zaph, C., Du, Y., Saenz, S.A., Nair, M.G., Perrigoue, J.G., Taylor, B.C., Troy, A.E., Kobuley, D.E., Kastelein, R.A., Cua, D.J., et al. (2008). Commensal-dependent expression of IL-25 regulates the IL-23-IL-17 axis in the intestine. *J. Exp. Med.* 205, 2191–2198.
- Zar, S., Mincher, L., Benson, M.J., and Kumar, D. (2005). Food-specific IgG4 antibody-guided exclusion diet improves symptoms and rectal compliance in irritable bowel syndrome. *Scand. J. Gastroenterol.* 40, 800–807.
- Zeissig, S., Bergann, T., Fromm, A., Bojarski, C., Heller, F., Guenther, U., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.-D. (2008). Altered ENaC expression leads to impaired sodium absorption in the noninflamed intestine in Crohn's disease. *Gastroenterology* 134, 1436–1447.
- Zelante, T., Iannitti, R.G., Cunha, C., De Luca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., Zecchi, R., D'Angelo, C., Massi-Benedetti, C., Fallarino, F., et al. (2013). Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* 39, 372–385.
- Zeuthen, L.H., Fink, L.N., and Frokiaer, H. (2008). Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology* 123, 197–208.
- Zeos, P., Papaioannou, G., Nikolaidis, N., Patsiaoura, K., Papageorgiou, A., Vassiliadis, T., Giouleme, O., and Evgenidis, N. (2006). Low-molecular-weight heparin (enoxaparin) as adjuvant therapy in the treatment of active ulcerative colitis: a randomized, controlled, comparative study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 23, 1443–1453.



- Zhang, R., and Ge, J. (2017). Proteinase-Activated Receptor-2 Modulates Ve-Cadherin Expression to Affect Human Vascular Endothelial Barrier Function. *J. Cell. Biochem.*
- Zhao, J., Dong, L., Shi, H., Wang, Z., Shi, H., and Ding, H. (2012). The expression of protease-activated receptor 2 and 4 in the colon of irritable bowel syndrome patients. *Dig. Dis. Sci.* 57, 58–64.
- Zhao, J., Zheng, X., Chu, H., Zhao, J., Cong, Y., Fried, M., Fox, M., and Dai, N. (2014). A study of the methodological and clinical validity of the combined lactulose hydrogen breath test with scintigraphic oro-cecal transit test for diagnosing small intestinal bacterial overgrowth in IBS patients. *Neurogastroenterol. Motil.* 26, 794–802.
- Zhao, P., Lieu, T., Barlow, N., Sostegni, S., Haerteis, S., Korbmacher, C., Liedtke, W., Jimenez-Vargas, N.N., Vanner, S.J., and Bunnett, N.W. (2015). Neutrophil Elastase Activates Protease-activated Receptor-2 (PAR2) and Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) to Cause Inflammation and Pain. *J. Biol. Chem.* 290, 13875–13887.
- Zoja, C., Donadelli, R., Colleoni, S., Figliuzzi, M., Bonazzola, S., Morigi, M., and Remuzzi, G. (1998). Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kappa B activation. *Kidney Int.* 53, 1608–1615.
- Zoller, V., Laguna, A.-L., Prazeres Da Costa, O., Buch, T., Göke, B., and Storr, M. (2015). [Fecal microbiota transfer (FMT) in a patient with refractory irritable bowel syndrome]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 140, 1232–1236.
- Zyrek, A.A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U., and Schmidt, M.A. (2007). Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell. Microbiol.* 9, 804–816.