



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Aude MARCHAL-BRESSENOT

**Aspects anatomopathologiques des maladies inflammatoires
chroniques intestinales chez l'homme et effet d'une carence
en donneurs de méthyles sur le développement intestinal chez
l'animal.**

17/10/2012

Membres du jury :

Rapporteurs : Professeur Marie-Danièle Diébold PU-PH à l'Université de Reims-
Champagne Ardenne

Professeur Jean-Marie Reimund PU-PH à l'Université de Caen

Examineurs : Professeur Jean-Louis Guéant Directeur de l'Unité Inserm
U954,

PU-PH à l'Université Henri Poincaré Nancy

Professeur Laurent Peyrin-Biroulet Directeur de thèse
PU-PH à l'Université Henri Poincaré
Nancy 1,

Professeur Jean-Michel Vignaud PU-PH à l'Université Henri
Poincaré

Nancy 1

Professeur Bernard Duclos PU-PH à l'Université de Strasbourg

**Inserm U954, Unité de recherche NGERE - Nutrition-Génétique et
Exposition aux**

Risques Environnementaux

Faculté de Médecine BP 184, 54505, Vandoeuvre-lès-Nancy

Je tiens à remercier Monsieur le professeur **Jean-Louis Guéant**, directeur de l'unité INSERM

U954 et chef de service du laboratoire de biochimie du CHU Nancy-Brabois de m'avoir

accueilli au sein de son laboratoire et de l'intérêt qui l'a porté à ce travail. Je le remercie

également de son soutien. Qu'il trouve ici l'expression de mon plus profond respect.

Pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté d'être rapporteur de ce mémoire, je tiens à remercier Madame le professeur **Marie-Danièle Diébold**, Monsieur le **Professeur Bernard Duclos** et Monsieur le professeur **Jean-Marie Reimund**. Je tiens à leur témoigner ma reconnaissance la plus sincère.

Un grand merci à Monsieur le Professeur **Laurent Peyrin-Biroulet**, directeur de thèse, pour avoir dirigé ces recherches, pour m'avoir fait confiance durant ces années de thèse et surtout pour son soutien. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de l'estime que je lui porte.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Jean-Michel Vignaud**, chef de service du laboratoire d'anatomie pathologique du CHRU, Hôpital Central, pour m'avoir accueilli dans son service et permis de réaliser ce travail. Ces années passées à vos côtés ont été riches d'enseignement. Que ce travail soit le témoignage de mon respect et de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier Madame le docteur **Carine Bossenmeyer-Pourié** pour ses conseils judicieux qui ont permis l'aboutissement de ce travail et pour sa disponibilité.

Je remercie également Mademoiselle **Shabnam Pooya**, Monsieur le docteur **Jean-Baptiste Chevaux**, Monsieur le docteur **Abderahim Oussalah**, Madame le docteur **Adeline Germain** pour leur aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

Je remercie tous les membres de l'unité Inserm U954, du Laboratoire de Biochimie -
Biologie Moléculaire - Nutrition – Métabolisme qui ont permis à ce travail de voir le jour.

Je remercie également

mes collègues Dr Virginie Cahn, Dr Jacqueline Champigneulle, Dr
Guillaume Gauchotte, Dr Béatrice Marie,

mes anciennes collègues Dr Nathalie Marcon, Dr Karine Montagne, Dr
Amandine Rousseau,

Camille, Charlène, Claire et Marie-Pierre,

L'ensemble des équipes techniques des laboratoires d'anatomie
pathologique avec un merci particulier à Amale, Chantal V, Claudine, Delphine, Hélène,
Laure, Lydia, Pauline, Stéphanie et Valérie. Merci pour votre aide si précieuse et votre bonne
humeur.

L'ensemble du personnel des laboratoires d'anatomie pathologique.

A toi,

Qui est mon ombre,

Qui m'a soutenu et encouragé,

Et sans qui ce travail n'aurait jamais abouti,

Que celui-ci soit le témoignage de tout mon amour,

Ce n'est que le début d'un beau et long parcours ...

A mes fils Guillaume et Mathieu,

A mes parents, Estelle, Eric, Emma et Camille,

A mes amis,

PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES.

Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury.

Normand S, Delanoye-Crespin A, **Bressenot** A, Huot L, Grandjean T, Peyrin-Biroulet L, Lemoine Y, Hot D, Chamailard M.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 7;108(23):9601-6.

Methyl deficient diet aggravates experimental colitis in rats.

Chen M, Peyrin-Biroulet L, George A, Coste F, **Bressenot** A, Bossenmeyer-Pourie C, Alberto JM, Xia B, Namour B, Guéant JL.

J Cell Mol Med. 2011 Nov;15(11):2486-97.

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon.

Peyrin-Biroulet L, Beisner J, Wang G, Nuding S, Oommen ST, Kelly D, Parmentier-Decrucq E, Dessein R, Merour E, Chavatte P, Grandjean T, **Bressenot** A, Desreumaux P, Colombel JF, Desvergne B, Stange EF, Wehkamp J, Chamailard M.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 May 11;107(19):8772-7.

Methyl donor deficiency affects small intestinal differentiation and barrier function in rats.

Bressenot A, Pooya S, Bossenmeyer-Pourie C, Gauchotte G, Germain A, Chevaux J.B, Coste F, Vignaud J.M, Guéant J.L, Peyrin-Biroulet L.

Br. J of nutrition. 2012 Jul 16:1-11.

Submucosal plexitis as a predictor of postoperative surgical recurrence in Crohn's disease

Bressenot A, Chevaux J.B, Oussalah A, Germain A, Gauchotte G, Wissler M.P, Vignaud J.M, Bresler L, Bigard M.A, Plénat F, Guéant J.L, Peyrin-Biroulet L.

Sous presse

Microscopic features for initial diagnosis and disease activity evaluation in inflammatory bowel disease

Bressenot A, Geboes K, Vignaud J.M, Guéant J.L, Peyrin-Biroulet L.

Soumis (révision majeure)

SOMMAIRE

PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES.....	6
SOMMAIRE	7
INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS	10
PARTIE I	
LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES	11
1.1- Généralités et épidémiologie.....	12
1.1.1- La rectocolite hémorragique (RCH)	12
1.1.2- La maladie de Crohn.....	13
1.2-Histologie.....	14
1.2.1-Publication n°1: Caractéristiques microscopiques du diagnostic initial et de l'évaluation de l'activité de la maladie dans les MICI. (révision majeure)	14
1.2.1.1- Diagnostic histologique initial	15
1.2.1.1.1- Rectocolite hémorragique	15
1.2.1.1.2- La maladie de Crohn.....	18
1.2.1.1.3- Colite indéterminée.....	24
1.2.1.2- Détermination de l'activité histologique de la maladie.	25
1.2.1.2.1- La RCH.....	25
1.2.1.2.2-La maladie de Crohn.....	29
1.2.2- Marqueurs histologiques prédictifs du devenir de la maladie.	30
1.2.2.1-Dans la RCH.	30
1.2.2.2-Dans la maladie de Crohn.....	31
1.2.3-Publication n°2 : Une plexite sous-muqueuse prédit une récurrence post-opératoire de la maladie de Crohn. (sous presse).....	32
1.2.3.1- Introduction.....	32
1.2.3.2- Matériels et méthodes	33
1.2.3.3- Résultats.....	36
1.2.3.4- Discussion.....	47
PARTIE II	
PATHOGENIE DES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES	51
2.1- Les facteurs génétiques.....	52
2.2- Les facteurs environnementaux	56
2.3- Les facteurs immunitaires.....	58
2.4- Publication n°3 : « L'activation de PPAR gamma est requise pour le maintien de la défense antimicrobienne colique. » (PNAS, vol.107, mai 2011).....	59
2.4.1- Introduction.....	59
2.4.2-Résultats.....	60
2.4.3-Discussion.....	63
2.5- Publication n°4 : « NRLP6 (Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6) contrôle le renouvellement cellulaire épithélial et la carcinogénèse colorectale. » (PNAS, vol.108, juin 2011)	64
2.5.1- Introduction.....	64
2.5.2-Résultats.....	65
2.5.3-Discussion.....	68

PARTIE III

MALADIES INFLAMMATOIRES INTESTINALES CHRONIQUES ET CARENCE EN DONNEURS DE METHYLES	70
3.1-Métabolisme de la vitamine B12	71
3.1.1-Structure.....	71
3.1.2 Nutrition	72
3.1.3 Absorption.....	73
3.1.4 Transport	75
3.1.5 Processing cellulaire de la cobalamine	78
3.2- Métabolisme des folates	82
3.2.1 Nutrition	82
3.2.2-Absorption	82
3.2.3-Transport plasmatique et cycle entérohépatique.....	84
3.2.4 Capture cellulaire de folates.....	85
3.2.4.1-Les récepteurs des folates (Folate receptors, FR-alpha, FR-beta, FR-gamma)	85
3.2.4.2-Les récepteurs RFC (Reduced Folate Carriers)	86
3.2.4.3-Le système de transport 'Proton-coupled folate transporter' (PCFT)	87
3.2.5-Rétention cellulaire et excrétion des folates	87
3.3-Métabolisme intracellulaire et interaction entre cobalamine et folates.	88
3.4-Métabolisme de l'homocystéine	90
3.4.1-Introduction.....	90
3.4.2-Les voies du métabolisme de l'homocystéine	91
3.4.3-Régulation nutritionnelle du métabolisme de l'homocystéine	93
3.4.4-Les causes nutritionnelles de l'hyperhomocystéinémie.....	95
3.4.5-L'hyperhomocystéinémie chez l'homme.....	95
3.4.6- La thermolabilité de la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR).....	98
3.4.7- Autres facteurs contrôlant le taux plasmatique de l'homocystéine	99
3.4.8- MICI et l'homocystéine	99
3.4.8.1-Implication de l'homocystéine dans la pathogénie des MICI.....	99
3.4.8.1.1-Stress oxydant	99
3.4.8.1.2-Inflammation.....	100
3.4.8.1.3-Stress du Réticulum Endoplasmique	100
3.4.8.1.4- Hypométhylation	101
3.4.8.2- Les études cliniques d'association de l'homocystéine avec les MICI.....	102
3.4.8.3-Prévalence de l'hyperhomocystéinémie au cours des MICI.....	102
3.4.8.4-L'hyperhomocystéinémie et thromboses au cours des MICI	103
3.4.8.5-Association des déterminants de l'homocystéine avec les MICI	105
3.4.8.5.1-Déterminants nutritionnels.....	105
3.4.8.5.2 Déterminants génétiques	106
3.4.8.5.3 Pharmacogénétique	107
3.5-Publication n°5 : « Une carence en donneurs de méthyles aggrave les lésions de colite expérimentale chez le rat. » (Journal of Cellular and Molecular Medicine, Vol 15, N°11, 2011)	107
3.5.1-Introduction.....	107
3.5.2-Résultats.....	108
3.5.3-Discussion.....	115
3.6-Publication n°6: « Une carence en donneurs de méthyles affecte la différenciation cellulaire et le fonctionnement de la barrière intestinale au niveau de l'intestin grêle chez le rat. » (British Journal of nutrition, vol.16, juillet 2012).	120

3.6.1-Introduction.....	120
3.6.2-Matériel et méthodes.....	122
3.6.3-Résultats.....	123
3.6.3.1-Confirmation de la carence en donneurs de méthyles	123
3.6.3.2-Effets de la carence sur le poids et l'aspect morphologique de la paroi intestinale grêle au niveau distal et proximal.	123
3.6.3.3-La carence en donneurs de méthyles affecte l'apoptose cellulaire et la prolifération au niveau de la muqueuse intestinale.	128
3.6.3.4-La carence en donneurs de méthyles affecte la différenciation entérocytaire au niveau de l'intestin grêle distal.	132
3.6.3.5-Une carence en donneurs de méthyles altère l'expression de β -caténine au niveau de l'intestin grêle distal.	134
3.6.3.6- Une carence en donneurs de méthyles agit sur l'organisation des cellules à mucus et des cellules de Paneth au niveau de l'intestin grêle proximal.	136
3.6.4-Discussion.....	140
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	144
MATERIEL ET METHODES	147
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	177

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont un groupe d'affections idiopathiques incluant la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC). Ces maladies représentent un véritable problème de santé publique de part leur fréquence^{1,2}, leur coût^{3,4}, leur pronostic à court et à long termes^{5,6} leur retentissement sur la qualité de vie, et le handicap fonctionnel qu'elles engendrent.⁷ Ces maladies sont diagnostiquées sur la base d'un faisceau d'arguments cliniques, endoscopiques, histologiques, iconographiques. Du point de vue anatomopathologique, la prise en charge de ces maladies peut se faire de plusieurs façons avec la réalisation d'une part du diagnostic initial mais aussi l'évaluation de facteur pronostic afin de prédire l'évolution de la maladie pour instaurer une prise en charge thérapeutique la plus adaptée possible. La pathogénie des MICI reste encore en partie inconnue : de multiples facteurs ont été incriminés. La carence en vitamine B12 et une hyperhomocytéinémie modérée sont fréquemment observées au cours des MICI. D'après des données de la littérature, l'homocystéine pourrait promouvoir une inflammation chronique de la muqueuse par le biais d'un stress oxydant, de l'induction de l'apoptose, et d'une activation de facteurs pro-inflammatoires. Ce travail a pour but d'une part de faire le point sur la prise en charge histologique des MICI, d'autre part d'étudier certains paramètres histologiques afin de prédire l'évolutivité de ces maladies, et enfin une grande partie de ce travail a porté sur une meilleure connaissance de la pathogénie de ces maladies inflammatoires chroniques intestinales avec en particulier l'étude de l'influence d'une carence en donneurs de méthyle sur le développement de ces maladies.

PARTIE I

LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES

1.1- Généralités et épidémiologie

Selon la théorie actuellement admise, la pathogénie des MICI implique une dysrégulation de la réponse immunitaire muqueuse dirigée contre des éléments de la flore intestinale, survenant chez des patients génétiquement prédisposés. Le mode d'hérédité des

MICI est complexe et ces maladies représentent probablement un groupe hétérogène de désordres partageant plusieurs gènes de susceptibilité. De considérables progrès ont été réalisés quant à l'élucidation des mécanismes génétiques des MICI et à ce jour 30 gènes de susceptibilité ont été identifiés dans les MICI.⁸

L'incidence des MICI varie de manière importante selon les pays.⁹ Elle est plus élevée dans les pays du nord de l'Europe et en Amérique du Nord. Les incidences des MICI sont estimées à 0,5~17/100 000 dans les pays occidentaux.⁵

1.1.1- La rectocolite hémorragique (RCH)

La RCH est une affection chronique caractérisée par une inflammation diffuse de la muqueuse colique. Elle touche le rectum dans 95 % des cas et peut s'étendre en proximal de façon symétrique, circonférentielle, sans interruption pour toucher une partie ou la totalité du colon.¹⁰ Les signes cliniques cardinaux de la RCH sont représentés par la diarrhée glairo-sanglante souvent avec un syndrome rectal proéminent fait de ténésme et de faux besoins.

L'évolution de la maladie est faite de poussées entrecoupées de rémissions pouvant survenir spontanément ou en réponse au traitement.¹¹ La RCH touche environ 500.000 personnes au Etats-Unis avec une incidence de 8 à 12 nouveaux cas par 100.000 habitants par an.

L'incidence est restée constante au cours des cinq dernières décennies.^{1,2} La RCH représente environ un quart de million de visites médicales par an, 30.000 hospitalisations et une perte de plus d'un million de jours de travail.³ Le coût médical annuel direct de la RCH dépasse quatre

milliards de dollars, incluant le coût des hospitalisations qui dépasse 960 millions de dollars US¹¹, et le coût lié aux médicaments qui dépasse 680 millions de dollars US.⁴ Le traitement médical de la RCH repose sur les dérivés de l'acide 5-aminosalicylique, les corticoïdes, les immunosuppresseurs —incluant l'azathioprine et le méthotrexate— et les thérapies biologiques représentées par l'infliximab qui est le seul anti-TNF à posséder l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement d'induction et de maintien de la rémission au cours de la RCH.¹⁰

1.1.2- La maladie de Crohn

La MC correspond à un groupe de désordres multisystémiques avec des signes cliniques et anatomopathologiques caractéristiques incluant une inflammation focale, asymétrique, transmurale et parfois granulomateuse touchant principalement le tractus digestif.¹³ Ce désordre multisystémique avec un risque potentiel de complications systémiques et extra-intestinales¹⁴ peut toucher tous les groupes d'âge mais l'âge de début de la maladie est classiquement situé entre les deuxième et troisième décades. L'incidence et la prévalence de la MC aux États-Unis sont en augmentation pour des raisons qui ne sont pas claires.

L'incidence et la prévalence de la MC aux États-Unis sont similaires à celles observées dans les pays développés avec des chiffres respectifs de 5/100.000 et 50/100.000.¹⁵ Il est important de différencier la MC des autres MICI. La MC est une affection chronique actuellement incurable médicalement ou chirurgicalement et nécessitant des approches thérapeutiques permettant d'induire et de maintenir la rémission clinique, d'améliorer la qualité de vie, de minimiser les toxicités à court et à long terme des traitements ainsi que les complications.¹⁶

Les nouveaux objectifs thérapeutiques de la MC sont représentés par l'induction et le maintien d'une cicatrisation muqueuse (et histologique)^{17,18} pouvant modifier « l'histoire naturelle » de la maladie.¹⁹ Malgré les chiffres relativement faibles de l'incidence et de la

prévalence de la MC en comparaison avec les autres affections digestives, le coût annuel du traitement médico-chirurgical de la MC est estimé à 2 milliards de dollars US aux États-Unis avec une augmentation attendue depuis l'avènement des thérapies biologiques.^{20,21} Lorsqu'un patient débute un traitement par les corticoïdes, la probabilité cumulée de chirurgie à un an est de 38 %.⁶ Dans une étude de population récemment menée au Canada, le taux d'hospitalisation pour MC était de 27/100.000 patients avec une durée estimée du séjour de 9 jours avec la moitié des hospitalisations qui avaient nécessité une prise en charge chirurgicale.⁵

1.2-Histologie

Le rôle du pathologiste dans la prise en charge des MICI est complexe, avec une attente différente en fonction du stade de la maladie.

1.2.1-Publication n°1: Caractéristiques microscopiques du diagnostic initial et de l'évaluation de l'activité de la maladie dans les MICI. (*révision majeure*)

Les MICI sont caractérisées par deux entités: la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. En pratique, la distinction entre ces deux entités est basée sur une variété de critères cliniques, endoscopiques, radiologiques ainsi que sur des critères macroscopiques et microscopiques.^{22, 23} Les critères microscopiques étant présents de façon variable, des difficultés pour établir le diagnostic peuvent survenir et un diagnostic précis est impossible dans 10%–15% des cas.^{24,25} Le diagnostic microscopique des MICI est basé sur l'association de 2 types de lésions: les anomalies architecturales et l'inflammation. Les anomalies architecturales de la muqueuse incluent des cryptes raccourcies, irrégulières avec une diminution de la densité des cryptes (augmentation de l'espace entre les cryptes) et irrégularité de la surface de la muqueuse. L'inflammation se caractérise par une augmentation

du nombre de cellules inflammatoires mononucléées sur toute la hauteur de la lamina propria.²⁶ La distinction entre maladie de Crohn et rectocolite hémorragique peut être assez facile lorsque les critères microscopiques classiques sont présents, mais certains patients présentent des caractéristiques pouvant être retrouvées dans les deux maladies, ce qui peut empêcher d'établir clairement le diagnostic et d'effectuer le diagnostic de « colite indéterminée ».

1.2.1.1- Diagnostic histologique initial

1.2.1.1.1- Rectocolite hémorragique

Les caractéristiques histologiques communément utilisées pour le diagnostic de la rectocolite hémorragique sont temps-, maladie- et traitement dépendants. Le diagnostic est basé sur une combinaison de critères établis.²⁷ Les caractéristiques sont résumées dans les tableaux 1 et 3.

Au début de la maladie, peu de critères morphologiques peuvent être présents. La plasmocytose basale, (figure 1A) est observée sur les biopsies au début de la maladie chez 38%–100% des adultes et 58% des enfants atteints de RCH.^{28, 29, 30} Ce critère est particulièrement présent chez les jeunes patients. C'est parfois la première et la seule lésion, pouvant régresser pendant le traitement.^{31,32} Sa valeur diagnostique est confirmée, puisque ce critère est présent dans 63% des cas lorsque la maladie est installée.³³ Cette caractéristique morphologique est également fréquemment retrouvée dans la maladie de Crohn mais est très rare dans les colites non incluses dans les MICI.³⁴ Une inflammation diffuse, sur toute la hauteur de la muqueuse au sein de la lamina propria est en faveur du diagnostic de RCH²⁶, mais une inflammation en patch^{35, 36} peut aussi être vue dans la RCH chez les adultes et aussi chez les enfants.³⁷ Une inflammation focale, en patch, est également rapportée chez les patients porteurs d'une cholangite sclérosante primitive sans colite cliniquement déclarée.

Dans une revue de 71 patients porteurs d'une cholangite sclérosante primitive et d'une RCH comparés à 142 patients porteurs d'une RCH sans cholangite sclérosante primitive, l'atteinte rectale était plus fréquente chez les patients porteurs de cholangite sclérosante primitive.³⁸ Les anomalies glandulaires peuvent être identifiées avec une bonne concordance interobservateurs (83%–90%). L'irrégularité architecturale diffuse des cryptes (figure 1A) est indicative de RCH. Elle peut être toutefois absente sur les biopsies réalisées au début de la maladie. Dans une étude, cette caractéristique a été observée sur des biopsies réalisées entre 16 et 30 jours après le début de la maladie, mais pas sur des biopsies réalisées plus précocement. Dans une autre étude, ce critère était retrouvé sur toutes les biopsies réalisées 1 jour après le début de la maladie ; le début de la maladie étant défini par une perte de sang.³⁹

²⁸ Dans les RCH dont le diagnostic est établi, une surface d'architecture villose (figure 1C) est présente dans 17%–63% des cas (comparé à 0%–24% pour la maladie de Crohn et 0%–7% pour les infections). Cette lésion est observée dans environ un tiers des biopsies initiales chez les enfants souffrant d'une RCH. Chez les adultes, ce critère est présent chez 23% des patients après 16–30 jours après le début des premiers symptômes mais pas sur les biopsies réalisées plus précocement. Une métaplasie à cellules de Paneth est en faveur du diagnostic de RCH, mais peut-être présente là où la muqueuse a été remaniée. La valeur prédictive est élevée mais pas la sensibilité. Ce critère n'est pas retrouvé sur les biopsies réalisées au début de la maladie⁴⁰, il est probablement lié à une durée longue de la maladie.^{34, 41, 42, 43} Le diagnostic morphologique de la RCH au début de la maladie peut donc être difficile chez les adultes et spécialement chez les enfants car les caractéristiques histologiques typiques de la maladie ne sont pas forcément présentes. Il existe de plus certaines circonstances où les critères morphologiques classiques de la RCH peuvent être altérés ou entièrement absents: certains cas de RCH montrent une maladie de répartition discontinue ou en patch, une absence relative ou complète d'atteinte rectale, une atteinte inflammatoire de l'iléon (iléite « de reflux »), une

atteinte extracolique, une inflammation granulomateuse, des ulcérations aphthoïdes ou une inflammation panpariétale. ⁴⁰

Tableau 1: Principales caractéristiques microscopiques de la RCH. ⁴⁴

<i>Stade aiguë (maladie active)</i>	<i>Stade en cours de rémission</i>	<i>Stade de maladie chronique</i>
Congestion vasculaire	Moins de congestion vasculaire que dans le stade de maladie active.	Dystrophies architecturales (atrophie, cryptes raccourcies, transformation villose, cryptes irrégulières)(figure 1A)
Déplétion en mucine	Disparition graduelle des polynucléaires neutrophiles	Métaplasie à cellules de Paneth (figure 1D)
Cryptite, abcès cryptiques	Disparition graduelle des abcès cryptiques	Hyperplasie lymphoïde
Ulcerations	Régénération épithéliale	Augmentation des cellules inflammatoire mononucléées dans la lamina propria Hyperplasie à cellules endocrine
Infiltrats riches en polynucléaires, en mastocytes.	Augmentation de l'activité mitotique	
Pus dans la lumière colique Plasmocytose basale (figure 1B)	Plasmocytose basale (figure 1B)	Métaplasie malpighienne

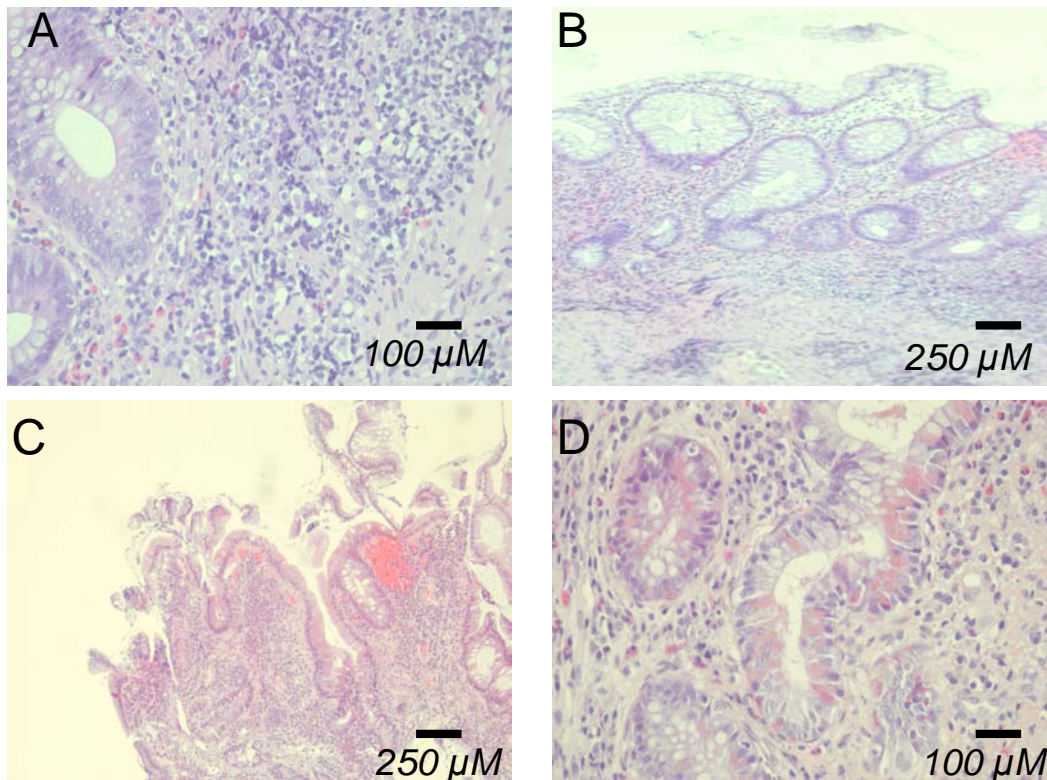


Figure 1: (A) Rectocolite hémorragique avec accumulation basale de lymphocytes et plasmocytes (lymphoplasmocytose basale) (HES x 100). (B) Rectocolite hémorragique en phase non active avec des distorsions architecturales des cryptes sur la biopsie rectale. (HES x 40) (C) Biopsie de la muqueuse rectale chez un patient atteint de rectocolite hémorragique montrant un aspect vilieux de l'épithélium de surface (HES x 40). (D) Rectocolite hémorragique en phase chronique avec des aspects de métaplasie à cellules de Paneth retrouvés au niveau de la muqueuse rectale. (HES x 100)

1.2.1.1.2- La maladie de Crohn

Bien que de nombreux cas de MICI ont été rapportés bien avant 1932, la maladie de Crohn a été décrite pour la première fois par Crohn, Ginzburg and Oppenheimer en 1932.⁴⁵ Depuis, de nombreuses études ont été réalisées pour déterminer les principales caractéristiques histologiques du diagnostic de maladie de Crohn. Le consensus Européen pour le diagnostic et la prise en charge de la maladie de Crohn, dirigé par l'European Crohn's and Colitis

Organisation (ECCO) a établi un guide de références pour le diagnostic histologique de la maladie de Crohn.⁴⁶

Le diagnostic de maladie de Crohn peut s'avérer difficile à cause des problèmes d'échantillonnage. Il est recommandé de réaliser des biopsies multiples (2 échantillons pour chaque site) au niveau de 5 sites (colon, rectum et iléon).⁴⁷ Pour le diagnostic initial, l'analyse d'une série de biopsie colique est préférable à l'analyse d'une seule biopsie au niveau rectale.^{31, 22, 48,49, 26, 28, 33, 41} Les échantillons obtenus doivent être réalisés au niveau des zones pathologiques et au niveau des zones macroscopiquement saines. Les prélèvements biopsiques doivent bien évidemment être accompagnés d'informations cliniques (âge du patient, durée de la maladie, durée et type de traitement).⁴⁷

Une grande variété de critères histologiques a été identifiée pour aider à la réalisation du diagnostic de maladie de Crohn. Les caractéristiques microscopiques les plus classiquement rencontrées sont résumées dans les tableaux 2 et 3.

L'inflammation chronique focale ou en patch se caractérise par une augmentation de la densité de cellules inflammatoires au sein de la lamina propria, sur toute la hauteur de la muqueuse. L'augmentation focale de l'inflammation implique un fond à cellularité normale avec une augmentation localisée du nombre de cellules inflammatoires. L'inflammation dite en patch implique quand à elle un fond inflammatoire avec une intensité variable.

L'inflammation focale ou en patch ne doit pas être confondue avec la présence normale d'un agrégat lymphoïde. L'irrégularité des cryptes implique des anomalies touchant plus de 10% des cryptes lorsqu'une inflammation focale ou en patch est présente. L'irrégularité des cryptes peut se définir par une distorsion des cryptes (cryptes non parallèles, diamètres variables ou cryptes dilatées), cryptes raccourcies ou cryptes ramifiées.²⁶ La présence de plus de 2 cryptes ramifiées sur une biopsie bien orientée peut être considéré comme anormale.²⁶

Le granulome dans la maladie de Crohn est défini par une accumulation d'histiocytes épithélioïdes (figure 2B) (monocyte/macrophage). La présence de cellules géantes multinucléées n'est pas caractéristique et la nécrose est habituellement absente. Seuls les granulomes au sein de la lamina propria non associés à des lésions actives des cryptes peuvent être considérés comme des lésions attestant d'une maladie de Crohn. Les granulomes associées à des atteintes des cryptes sont moins spécifiques.⁵⁰ Les granulomes sans nécrose caséuse, les petites amas d'histiocytes épithélioïdes, les cellules géantes peuvent être retrouvées dans les colites infectieuses (*Mycobacterium* sp, *Chlamydia* sp, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Treponema* sp, *Salmonella* sp, *Campylobacter* sp, *Yersinia enterocolitica*, *Chlamydia* sp) et ne suggèrent pas forcément une maladie de Crohn.

Ces critères sont basés sur une revue de la littérature : leur sensibilité et spécificité sont au moins de 50% et leur reproductibilité est modérée à élevée (k de 0.4 ou pourcentage de concordance d'au moins 80%).^{41,51, 52,53} L'inflammation en patch est uniquement un critère diagnostique chez les patients adultes non traités. L'inflammation peut devenir en patch dans les RCH sous traitement, et chez les enfants porteurs de RCH.^{35, 54, 55, 32, 37} La présence d'un seul de ces critères n'est pas suffisant pour affirmer le diagnostic de maladie de Crohn. Pour les prélèvements biopsiques uniques ou multiples, il n'y a pas d'études ayant déterminé le nombre de critères suffisants pour établir le diagnostic de maladie de Crohn. Pour les pièces de résection chirurgicales, il a été suggéré que la présence d'au moins 3 critères soit suffisant en l'absence de granulome.⁵⁶ La même définition pourrait être proposée pour les prélèvements biopsiques. Les critères histologiques suivants peuvent être identifiés dans la muqueuse des prélèvements biopsiques: les granulomes, les anomalies architecturales focales des cryptes associées à une inflammation chronique focale ou en patch (la chronicité étant définie par la présence de lymphocytes et de plasmocytes), ou l'absence de déplétion en mucine au niveau des sites actifs. La plupart des experts cliniciens (91%) et tous les pathologistes sont d'accord

pour dire que la présence de granulome avec au moins un des autres critères est suffisante pour établir le diagnostic de maladie de Crohn. Un aspect pseudovilleux de la surface colorectale est plutôt en faveur d'une RCH, alors que des anomalies architecturales focales sont plutôt en faveur d'une maladie de Crohn. La présence de granulome n'est pas toujours nécessaire pour établir le diagnostic de maladie de Crohn. D'autres critères peuvent aider au diagnostic: l'augmentation du nombre de lymphocytes au sein de l'épithélium³¹, l'inflammation étendue au delà de la muqueuse (figure 2C)⁵², l'inflammation chronique focale sans atrophie des cryptes, la cryptite focale^{26, 57}, les ulcérations aphtoïdes (figure 2A), l'inflammation de la sous-muqueuse, l'hyperplasie des filets nerveux⁵⁸ et la localisation proximale des ulcérations et des distortions architecturales. Lorsque les biopsies sont multiples, l'atteinte iléale et la distribution de l'inflammation avec un gradient proximal-distal peuvent également être utiles. Dans des cas difficiles, des biopsies gastriques peuvent aider à établir le diagnostic par la présence de granulome ou de lésions de gastrite focale active. Cette dernière est caractéristique en l'absence d'*Helicobacter pylori* avec la présence d'un infiltrat inflammatoire périglandulaire composé de cellules mononucléées (cellules T CD3+ et cellules CD68+) et de polynucléaires. La gastrite focale n'est cependant pas spécifique de la maladie de Crohn.^{59, 60, 61, 62, 63}

Sur les pièces de résections chirurgicales, le caractère transmural de l'inflammation peut le plus souvent être identifié associé à d'autres critères microscopiques.^{58, 64} L'atteinte de la graisse a une forte valeur prédictive pour le diagnostic de maladie de Crohn.^{65, 66} Une pièce de résection chirurgicale nécessite un examen macroscopique complet. L'intestin est ouvert complètement, selon l'axe longitudinal et un échantillonnage pour l'examen microscopique est réalisé, incluant des prélèvements au niveau de l'iléon terminal, des ganglions lymphatiques, de l'appendice. Le nombre de prélèvement optimum n'a pas été établi.

Cependant la multiplicité des prélèvements augmente la probabilité d'établir le diagnostic. Un

échantillonnage des zones macroscopiquement pathologiques et macroscopiquement saines doit être réalisé.

Tableau 2: Caractéristiques microscopiques de la maladie de Crohn.

<i>Caractéristiques microscopiques de la maladie de Crohn.</i>
Lésion aphtoïde
Irrégularité architecturale des cryptes
Augmentation du nombre de lymphocytes et de plasmocytes
Cryptite à polynucléaires neutrophiles, abcès cryptiques
Métaplasie distale à cellules de Paneth
Fibrose de la sous-muqueuse
Hypertrophie musculaire et neuronale
Granulome sans nécrose caséuse
Ulcérations fissuraires
Agrégats lymphoïdes transmuraux
Vasculite

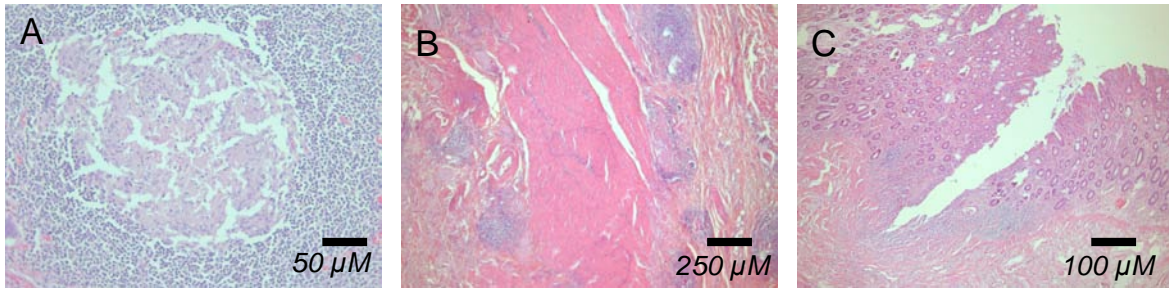


Figure 2: (A) Granulome non nécrosant caractérisé par une accumulation d'histiocytes épithélioïdes dans une maladie de Crohn au niveau colique. (HES x 200) (B) Inflammation transmurale dans une maladie de Crohn avec présence d'agrégats lymphoïdes retrouvés sur toute la hauteur de la paroi colique. (HES x 40) (C) Maladie de Crohn au niveau du colon avec une ulcération fissuraire s'étendant en profondeur jusqu'à la sous-muqueuse.(HES x100)

Tableau 3. Caractéristiques morphologiques classiques de la RCH et de la maladie de Crohn.⁵⁷

Critères morphologiques	RCH	Maladie de Crohn
Distribution de la maladie	Diffuse et continue	Segmentaire
Atteinte rectale	Toujours (adultes)	Occasionnellement
Sévérité de la maladie	Augmentation distale	En patch, variable
Atteinte iléale	Occasionnellement ('reflux')	Très souvent
Localisation de la maladie au sein de la paroi intestinale	Superficielle (muqueuse)	Transmurale
Agrégats lymphoïdes transmuraux	Rares	Fréquents, localisation multiples
Fissures	Rares, superficielles	Profondes, localisations multiples
Fistules	Absentes	Présentes
Granulomes	Peu fréquent, en relation avec une atteinte des cryptes	Fréquent, pas en relation avec une atteinte des cryptes

1.2.1.1.3- Colite indéterminée

Le diagnostic précis de colite ne peut parfois pas être établi avec précision. Le sous-groupe de patients avec un diagnostic incertain a été classé comme « colite indéterminée ». La définition de "indéterminé" s'est modifiée durant les années.⁶ Initialement, le terme de colite indéterminée a été proposé par les pathologistes pour les pièces de colectomie, provenant habituellement de patients opérés pour des colites sévères, montrant à la fois des caractéristiques de RCH et de maladie de Crohn. Plus tard, la même terminologie a été utilisée pour des patients sans diagnostics clinique, endoscopique, histologique clairement établis et

présentants des critères permettant le diagnostic de RCH ou de maladie de Crohn.²⁷ Il n'y a pas de critères établis pour le diagnostic de colite indéterminée sur des prélèvements endoscopiques.^{40,31} Beaucoup de définitions indiquent la nécessité de critères de colite chronique, sans spécificité. L'organisation internationale des maladies inflammatoires intestinales (IOIBD) confirme 1) l'ambiguïté du terme, et 2) propose une actualisation de la classification pour la catégorie de patient avec un diagnostic non clairement établi. Conformément à cela, le terme de maladie inflammatoire intestinale non classée est confirmée, comme l'avait suggéré la conférence de Montréal en 2005, pour les patients atteints cliniquement de colite chronique, qui présente de façon certaine une maladie inflammatoire chronique sans critère définitif d'une RCH ou d'une maladie de Crohn. Pour les pièces de résection, le terme de "colite de type ou d'étiologie incertains" peut être utilisé. La plupart du temps, l'utilisation de préfixe peut être acceptée, comme sévère ou chronique.²⁷ Cependant le terme de "colite de type ou d'étiologie incertain" n'a pas été communément accepté et généralement le terme de colite indéterminée est maintenant utilisé pour les pièces de résection avec un diagnostic non clairement établi.

1.2.1.2- Détermination de l'activité histologique de la maladie.

L'utilisation de plus en plus fréquente de thérapeutiques a favorisé le développement de scores histologiques évaluant l'activité de la maladie, particulièrement dans la RCH.

1.2.1.2.1- La RCH

Etant donnée l'atteinte habituelle du rectum, sous forme d'une inflammation diffuse de la muqueuse, un échantillon est facilement réalisable et la biopsie rectale est donc potentiellement utile pour évaluer la sévérité de la maladie.⁶⁷ La biopsie rectale a souvent été

utilisée pour juger de l'efficacité thérapeutique depuis 1966.⁶⁸ Les critères pris en considération sont la présence de polynucléaires, la formation d'abcès cryptiques et la présence d'une ulcération, ainsi que l'intensité de l'infiltrat de cellules mononucléées dans la lamina propria et les anomalies architecturales au niveau des cryptes et de la surface. L'activité de la maladie est définie par la présence de polynucléaires neutrophiles avec des dommages épithéliaux.⁶⁹ Le terme de maladie chronique inactive permet la présence d'anomalies architecturales et d'une augmentation des cellules mononucléées au sein de la lamina propria. Le terme de maladie quiescente signifie qu'il existe des anomalies architecturales sans altération de la composition et de l'intensité de l'infiltrat inflammatoire au sein de la lamina propria.⁷⁰ Plusieurs scores pour l'évaluation histologique de l'activité de la maladie ont été développés.^{71,72,73,74, 75, 76, 77, 78} L'inflammation de la muqueuse est habituellement gradée par des moyennes de scores effectués à partir de différents critères ayant prouvé leur sensibilité.^{77, 26} L'analyse est effectuée par examination microscopique d'un prélèvement biopsique. Mais deux échantillons semblent plus appropriés car les traitements peuvent entraîner une variation de l'intensité de l'inflammation.³⁵ Plusieurs études montrent une bonne concordance entre différents observateurs pour l'évaluation des scores histologiques de l'activité de la maladie.^{77, 78} En général, il existe une bonne corrélation entre l'aspect endoscopique et histologique, spécialement lorsque les prélèvements sont réalisés en phase active de la maladie. Cependant, certains critères microscopiques d'activité peuvent persister en cas de maladie macroscopiquement inactive.^{67, 74, 78, 79} La corrélation entre indice d'activité clinique et histologie est variable avec une corrélation faible entre les deux dans certaines études.⁷⁹ Actuellement, il n'y a pas de score considéré comme optimum, mais il est recommandé d'inclure le score histologique en second rang pour l'évaluation de l'efficacité à un traitement. L'indice de Geboes a été validé et testé pour sa reproductibilité⁷⁸ et présente 6 critères: les modifications architecturales, l'infiltrat inflammatoire chronique, la présence de

polynucléaires neutrophiles et éosinophiles au sein de la lamina propria, la présence de polynucléaires neutrophiles dans l'épithélium (figure 3A), la destruction de cryptes et l'érosion ou l'ulcération (figure 3C). Les scores vont de 0 à 5.4, avec les scores les plus élevés pour une inflammation histologique sévère. L'indice de Geboes a été utilisé dans quelques essais cliniques dans la RCH.⁸⁰ L'indice de Riley est composé de 6 critères: l'infiltrat inflammatoire aiguë (polynucléaires dans la lamina propria), l'infiltrat inflammatoire chronique (lymphocytes et plasmocytes dans la lamina propria), les abcès cryptiques (figure 3B), la déplétion en mucine, l'intégrité de la surface épithéliale et les anomalies architecturales des cryptes.⁷⁶ Chaque critère est gradé sur une échelle de 4 points correspondant à absent, faible, modéré et sévère. Le grade final est la moyenne de 2 évaluations indépendantes. L'index de Riley apparaît comme étant hautement reproductible (peu de variation interobservateur).^{76, 81} Il a été utilisé dans quelques essais cliniques.^{81, 82, 83} La différence entre l'index de Geboes et celui de Riley est que le grading le plus élaboré concernant les lésions cryptiques et les dommages épithéliaux de surface est celui de Geboes.

Tableau 4: Critères histologiques des scores d'activité dans la RCH.

Index de Geboes	Index de Riley
Modifications architecturales	Infiltrat inflammatoire aiguë
Infiltrat inflammatoire chronique	Infiltrat inflammatoire chronique
Polynucléaires neutrophiles et éosinophiles au sein de la lamina propria	Abcès cryptiques
Polynucléaires neutrophiles dans l'épithélium	Déplétion en mucine
Destruction des cryptes	Intégrité de la surface épithéliale
Ulcération	Anomalies architecturales des cryptes

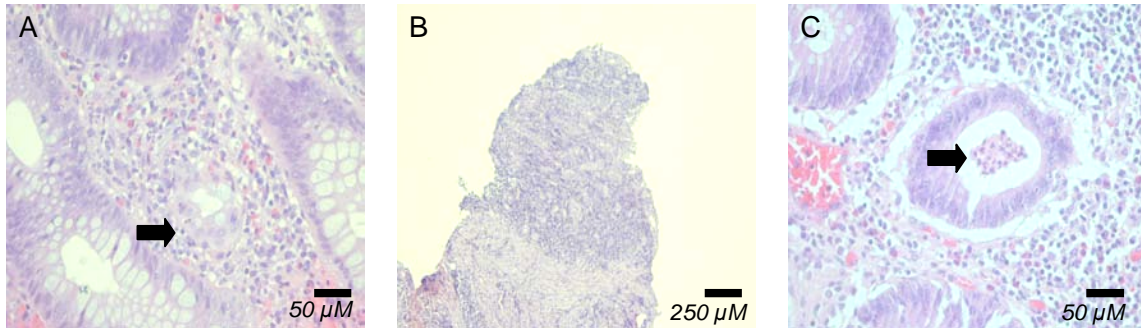


Figure 3: (A) Lésions de cryptite dans une rectocolite hémorragique, caractérisées par la présence de polynucléaires neutrophiles au sein de l'épithélium cryptique (flèche). (HES x 200) (B) Rectocolite hémorragique présentant une activité sévère avec une ulcération de la muqueuse (HES x40) (C) Rectocolite hémorragique présentant une activité modérée avec la présence d'abcès cryptique caractérisé par une accumulation de polynucléaires neutrophiles au sein de la lumière des cryptes (flèche). (HES x 200)

1.2.1.2.2-La maladie de Crohn.

A l'inverse de la RCH, l'activité de la maladie de Crohn n'est habituellement pas évaluée par les pathologistes. Ceci est attribuable au caractère discontinu de la maladie, induisant des erreurs d'échantillonnage, et au fait que l'iléon peut être la seule zone atteinte. Les erreurs d'échantillonnage sont particulièrement importantes surtout lorsque l'on ne dispose que de biopsie rectale. L'analyse microscopique de multiples échantillons de plusieurs segments coliques et iléal pourrait apporter de meilleures informations et permettre l'évaluation de l'activité de la maladie. Les études concernant l'histologie et l'activité pour la maladie de Crohn sont limitées. Plusieurs essais cliniques ont montré que les traitements pouvaient changer l'aspect histologique de la muqueuse, en entraînant une guérison et une normalisation

de la muqueuse.^{76, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91} Il n'y a cependant pas d'accord général entre les experts cliniciens pour l'évaluation microscopique de l'activité de la maladie. Si des biopsies sont réalisées dans ce but, elles doivent être multiples, dans des zones variables. La présence de dommages épithéliaux avec des polynucléaires neutrophiles est un marqueur d'activité.⁶⁸

1.2.2- Marqueurs histologiques prédictifs du devenir de la maladie.

L'étude histologique dans les maladies inflammatoires intestinales peut être également utile pour détecter ou prédire une rechute de la maladie ; en effet, le devenir de la RCH ou de la maladie de Crohn est très difficile à prédire : les patients souffrant de RCH peuvent développer des lésions de pouchite lorsqu'ils ont subi une procédure d'anastomose iléo-anal et les patients atteints de maladie de Crohn peuvent développer une récurrence de la maladie après chirurgie.⁴⁶ De plus, le risque de développer un cancer est significativement augmenté dans la RCH et dans la maladie de Crohn. Le rôle du pathologiste est particulièrement important dans ce contexte pour évaluer les lésions de dysplasie.⁹² Nous n'aborderons pas dans ce travail l'évaluation histologique des lésions de pouchite et de dysplasie.

1.2.2.1-Dans la RCH.

La persistance d'une inflammation aiguë et d'abcès cryptiques sur des biopsies rectales est associée à un risque plus marqué de rechute de la maladie à 12 mois.⁷⁶ La plasmocytose basale est également associée à un risque plus marqué de récurrence.⁸⁴

Dans une série de 75 patients adultes avec un score de Mayo à 0 indiquant une maladie endoscopiquement inactive et un suivi de 12 mois, il a été démontré qu'une activité inflammatoire aiguë au niveau microscopique (score de Geboes égal ou >3.1) et une plasmocytose basale étaient prédictifs d'une rechute de la maladie (définie par un score

clinique de Mayo égal ou >3). Il a donc été conclu que les patients atteints de RCH avec une muqueuse présentant un aspect guéri devaient être biopsiés pour avoir une évaluation histologique.⁹³ Dans une autre étude par Rutter et al, portant sur 136 contrôles et 68 patients atteints d'un carcinome colo-rectal développé sur RCH, l'analyse statistique multivariée démontrait qu'une inflammation importante augmentait le risque de développement d'un cancer.⁹⁴

Les polynucléaires éosinophiles sont particulièrement présents dans la phase quiescente de la RCH. L'explication exacte de ce phénomène n'est pas bien connue et pourrait être associée à un risque accru de rechute de la maladie mais ces données ne sont pas confirmées.^{95,96}

1.2.2.2-Dans la maladie de Crohn.

La récurrence post-opératoire clinique et endoscopique de la maladie de Crohn est fréquente. Dans le suivi post chirurgical, des biopsies du néoterminal iléon peuvent être indiquées lorsqu'une récurrence de la maladie est suspectée. L'identification de facteurs de risque histologiques pourrait permettre de cibler les patients à risque de récurrence et d'adapter par conséquent la prise en charge thérapeutique. Plusieurs marqueurs histologiques ont été étudiés sur les pièces de résection chirurgicale de maladie de Crohn.⁹⁷ Dans un centre de référence allemand, sur 100 patients ayant subi une résection iléocaecale pour maladie de Crohn, la présence de granulome n'avait pas significativement de lien avec une récurrence post-opératoire de la maladie.⁹⁸ Alors qu'une étude Australienne, sur 130 patients opérés pour une maladie de Crohn, montrait une association entre la présence de granulomes et récurrence de la maladie.⁹⁹ Ces constatations demandent à être confirmées par d'autres études.

1.2.3-Publication n°2 : Une pléxite sous-muqueuse prédit une récurrence post-opératoire de la maladie de Crohn. (*sous presse*)

1.2.3.1- Introduction

La nécessité de recourir à un traitement chirurgical dans les centres de référence est de l'ordre de 18% à 33% dans les 5 années après de diagnostic de maladie de Crohn.¹⁰⁰ La chirurgie n'est pas curative et la récurrence post-opératoire de la maladie demeure un problème.¹⁰¹ La rechute de la maladie se fait souvent au niveau de l'anastomose ou du néoterminal iléon dans les mois ou les années après la chirurgie.¹⁰² La maladie de Crohn se caractérise par la présence d'un infiltrat inflammatoire, riche en lymphocytes, en plasmocytes, en polynucléaires éosinophiles, en mastocytes et occasionnellement en granulomes dans les plexus sous-muqueux et myentériques.¹⁰³ De nombreux facteurs prédictifs histologiques ont été étudiés sur les pièces de résections chirurgicales, incluant les granulomes^{104,99} et le statut histologique des limites de résection.^{105,106} Des modifications histologiques dans le système nerveux entérique (comme une hypertrophie des fibres nerveuses et une hyperplasie) sur les limites de résection, ont été observées à la fois dans les plexus nerveux sous-muqueux et myentériques de colon et/ou d'iléon affectés par la maladie de Crohn.^{100,107} Dans une étude rétrospective, Ferrante *et al.* ont démontré que l'activité inflammatoire dans le plexus myentérique au niveau de la limite de résection proximale était significativement associée à un risque de récurrence post-opératoire de la maladie de Crohn.¹⁰⁸ De plus, la sévérité des lésions de pléxite était corrélée à la sévérité de la récurrence endoscopique à 3 mois et à 1 an.¹⁰⁸ Sokol *et al.* ont démontré une association entre pléxite sous-muqueuse et récurrence clinique précoce.¹⁰⁹ Aucune étude n'a évalué les facteurs histologiques prédictifs d'une récurrence nécessitant une seconde chirurgie après une première résection iléocaecale pour maladie de Crohn.

Le but de notre étude est donc d'évaluer pour la première fois la valeur d'une plexite sous-muqueuse ou myentérique comme facteur prédictif de récurrence de la maladie de Crohn nécessitant une seconde chirurgie.

1.2.3.2- Matériels et méthodes

Population étudiée

Les patients ont été sélectionnés rétrospectivement à partir de la base de données du département de pathologie du CHRU de Nancy. Tous les patients ayant subi une chirurgie en relation avec une maladie de Crohn, entre 1996 et 2008 et dont les données étaient disponibles ont été inclus dans notre étude.

Collection des données cliniques

Pour chaque patient les données suivantes ont été extraites de la chartre médicale: âge, sexe, date de la première chirurgie en relation avec la maladie de Crohn, le phénotype de la maladie de Crohn selon la classification de Montreal ¹⁰⁹, le statut de fumeur, la date de la rechute chirurgicale (seconde chirurgie en relation avec la maladie de Crohn), le traitement immunosuppresseur à la date de la première chirurgie, l'indication chirurgicale, le type d'anastomose, les complications postopératoires (se définissant par la nécessité d'une seconde chirurgie dans le premier mois suivant l'intervention chirurgicale), le traitement mis en place après la première chirurgie.

Examen histologique

La limite de résection proximale a été analysée par 2 pathologistes (A.Bressenot et G.Gauchotte), ignorants le devenir post-opératoire du patient. Pour chaque pièce de résection chirurgicale, les lésions histologiques typiques de maladie de Crohn sont recherchées, incluant

l'infiltrat inflammatoire, les anomalies architecturales de la muqueuse et la présence de granulome. Le système nerveux entérique a tout particulièrement été analysé avec une évaluation indépendante des plexus sous-muqueux et myentérique. La pléxite a été évaluée au niveau du plexus le plus sévèrement touché par l'inflammation. La pléxite a été gradée comme légère (pl1) lorsque le ganglion contenait moins de 4 cellules inflammatoires, modérée (pl2) lorsqu'il contenait de 4-9 cellules, ou sévère (pl3) lorsqu'il contenait plus de 9 cellules. De plus l'évaluation s'est faite indépendamment en comptant chaque type de cellule inflammatoire (mastocytes, plasmocytes, lymphocytes, polynucléaires éosinophiles et neutrophiles) dans les plexus les plus inflammatoires. Un désaccord entre les deux observateurs faisait l'objet d'une évaluation conjointe au microscope multitéte.

Chaque prélèvement était fixé dans du formol et analysé après coloration Hématoxyline, éosine, safran (HES). Les polynucléaires éosinophiles, les polynucléaires neutrophiles et les plasmocytes étaient facilement détectables sur coloration HES.

Une étude immunohistochimique a été utilisée pour détecter les lymphocytes (anticorps anti CD3) et les mastocytes (anticorps anti CD117). Les coupes ont été tout d'abord déparaffinées et réhydratées. Le démasquage des sites antigéniques a été effectué par incubation des lames dans un tampon citrate Tris pH 6.0 pendant 10 minutes à 120°C. Les coupes ont ensuite été incubées avec un anticorps monoclonal de souris anti CD3 (clone f7.2.38, 1/200, Dakocytomation, Trappes, France) ou un anticorps monoclonal de souris anti-CD117 (clone a4502, 1/400, Dakocytomation, Trappes, France) pendant 16h 4°C, suivi par une incubation avec un anticorps secondaire biotinylé de chèvre anti souris (Dakocytomation; Trappes, France) pendant 1h à température ambiante (dilution 1: 200). L'activité des peroxydases endogènes a été bloquée par incubation pendant 10 minutes dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 6%. Les coupes ont ensuite été incubées dans une solution de streptavidine-peroxydase (Dakocytomation) diluée au 1:150 dans du PBST, pendant 1h à température

ambiante. La révélation s'est ensuite faite par utilisation d'une solution Novared TR (Abcys; Paris, France). Les lames ont ensuite été contre-colorées avec de l'hématoxyline. Un contrôle négatif par omission de l'anticorps primaire a été réalisé.

Analyse statistique

Toutes les variables quantitatives sont décrites en médiane et en intervalle interquartile (25^e et 75^e percentiles). Toutes les proportions sont exprimées en pourcentages avec un intervalle de confiance à 95 %. L'événement « seconde chirurgie due à la maladie de Crohn » a été évalué par la méthode d'analyse de survie. Les probabilités cumulées de survie sans 'événement' ont été estimées selon la méthode de Kaplan-Meier. La durée d'évolution jusqu'à la seconde chirurgie due à une récurrence de la maladie de Crohn a été considérée comme commençant à la date de la première chirurgie et terminant à la date de la seconde chirurgie ou aux dernières nouvelles du suivi chez les patients n'ayant pas présenté l'événement. Afin d'identifier les facteurs prédictifs de la seconde chirurgie due à une récurrence de la maladie de Crohn parmi les données baseline, une analyse statistique univariée a été réalisée avec le test du log-rank. En considérant les données continues pour l'analyse dichotomique, les valeurs seuil ont été définies par la méthode d'analyse ROC (*Receiver Operating Characteristics*, en anglais) selon la méthode de De Long *et al.*¹¹⁰ Afin d'identifier des facteurs prédictifs indépendants de survenue d'une seconde chirurgie liée à la maladie de Crohn, en analyse multivariée, toutes les variables significatives en analyse univariée ont été intégrées dans un modèle de régression de Cox selon la méthode de sélection *stepwise*. Toutes les variables avec des valeurs $P < 0.1$ ont été initialement intégrées dans le modèle et les variables avec $P < 0.05$ ont été retenues dans le modèle. Les résultats sont rapportés par des hazard ratios (HRs) et leur intervalle de confiance à 95%. Les valeurs $P < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel MedCalc, version 12.1.4.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

1.2.3.3- Résultats

Caractéristiques des patients

Les données baseline des 67 patients atteints de maladie de Crohn sont reportées dans le tableau 5. La médiane de durée du suivi était de 46 mois (IQR, 14–72.5). La médiane de l'âge au moment de la première chirurgie due à la maladie de Crohn était de 34 ans (IQR, 25–42). La majorité des patients était sous traitement médical au moment de la première résection intestinale. (Tableau 5) Le tableau 6 résume le traitement prophylactique post-opératoire de la maladie de Crohn après la première chirurgie. Le tableau 7 résume les caractéristiques des patients au moment de la seconde chirurgie avec la durée du suivi. 30% des patients ont bénéficié d'une seconde chirurgie avec une médiane de durée de 42 mois entre la première et la seconde chirurgie.

Tableau 5. Données de base des 67 patients inclus dans l'étude.

	N	n	%	95% CI
Sexe masculin	67	34	51	39 – 63
Histoire de la résection colique	61	3	5	0 – 11
Histoire de la résection intestinale grêle	61	10	16	7 – 26
Statut de fumeur actif au moment de la première chirurgie	54	23	43	29 – 56
<i>Classification de Montréal</i>				
A1 (moins de 16 ans)	63	1	2	0 – 5
A2 (entre 17 et 40 ans)	63	50	79	69 – 90
A3 (plus de 40 ans)	63	12	19	9 – 29
B1 (non-sténosante, non-fistulisante)	63	6	10	2 – 17
B2 (sténosante)	63	31	49	37 – 62
B3 (fistulisante)	63	24	38	26 – 50
L1 (maladie iléale isolée)	63	33	52	40 – 65
L2 (maladie colique isolée)	63	9	14	5 – 23
L3 (maladie iléocolique)	63	21	33	21 – 45
L4 (maladie isolée du système digestif supérieur)	63	0	0	—
p (maladie périanale)	63	15	24	13 – 35
<i>Traitement de la maladie de Crohn au moment de la première chirurgie</i>				
Aminosalicylés	56	6	11	2 – 19
Anti-TNF	56	6	11	2 – 19
Antibiotiques	56	7	13	4 – 21
Corticostéroïdes	56	21	38	24 – 51
Immunosuppresseurs (azathioprine/méthotrexate)	56	19	34	21 – 47
Nutrition parentérale exclusive	58	1	2	0 – 5
<i>Indication de la première chirurgie due à la maladie de Crohn</i>				
Abcès	60	11	18	8 – 28
Fistule	60	11	18	8 – 28
Perforation	60	3	5	0 – 11
Sténose	60	39	65	53 – 77
Autres	60	6	10	2 – 18

N: nombres de sujets; CI: Intervalle de Confiance.

Tableau 6. Traitement prophylactique post-opératoire de la maladie de Crohn après la première chirurgie.

	N	n	%	95% CI
Aminosalicylés	47	5	11	1 – 20
Thiopurines	48	10	21	9 – 33
Méthotrexate	48	1	2	0 – 6
Anti-TNF	49	4	8	0 – 16

N: nombres de sujets; CI: Intervalle de Confiance.

Tableau 7. Caractéristiques des patients au moment de la seconde chirurgie et durant le suivi.

	N	n	%	95% CI	Median	IQR, 25-75
Anastomose en 1 temps au moment de la première résection iléocaecale.	58	47	81	71 – 91		
Occurrence de la seconde chirurgie	67	20	30	19 – 41		
Récidive clinique à 2 ans ou dernière nouvelle du patient nécessitant un traitement	58	22	38	25 – 51		
Intervalle entre la première et la seconde chirurgie (mois)	67	0			42.0	10.3 – 67.5
Intervalle entre la première chirurgie et les dernières nouvelles du patient (mois)	67	0			46.0	14.0 – 72.5
Révision chirurgicale précoce après la première résection iléocaecale	55	4	7	0 – 14		
Statut de fumeur actif au moment de la récurrence	46	18	39	25 – 54		
<i>Traitement après la récurrence postopératoire de la maladie de Crohn</i>						
Aminosalicylés	29	1	3	0 – 11		
Budesonide	26	2	8	0 – 19		
Corticostéroïdes	26	9	35	15 – 54		
Thiopurines	26	3	12	0 – 25		
Méthotrexate	26	2	8	0 – 19		
Anti-TNF	26	8	31	12 – 50		
<i>Type de seconde chirurgie relative à la maladie de Crohn</i>						
Résection iléale	57	5	9	1 – 16		
Résection iléocaecale	59	35	59	46 – 72		
Colectomie	54	12	22	11 – 34		
Résection iléocolique	59	10	17	7 – 27		

NOTE. IQR: Intervalle Interquartile .N: nombres de sujets; CI: Intervalle de Confiance.

Etude histologique

Tous les patients présentaient des lésions histologiques typiques de maladie de Crohn au niveau du segment intestinal atteint comme un infiltrat inflammatoire, des altérations architecturales, des abcès cryptiques, des granulomes et des ulcères. L'examen microscopique a ensuite essentiellement porté sur la limite longitudinale proximale avec une évaluation quantitative de la pléxite myentérique et sous-muqueuse. (**Figure 4**) Le compte des cellules inflammatoires pour chaque plexus est résumé dans la figure 4. Chez un patient, la pléxite myentérique n'a pu être évaluée car les plexus myentériques n'étaient pas représentés sur la coupe. Dans les plexus myentériques et sous-muqueux, la médiane du score d'inflammation était 2 (inflammation modérée, p12) (Tableau 8). Les lésions de pléxite sous-muqueuse et myentérique étaient principalement constituées de lymphocytes avec une médiane de 5 lymphocytes dans les plexus myentériques et 3 lymphocytes dans les plexus sous-muqueux. (Figure 4C et Tableau 8). Les autres types de cellules inflammatoires comme des polynucléaires éosinophiles, des mastocytes, des polynucléaires neutrophiles et des plasmocytes étaient moins fréquemment observés à la fois dans les plexus sous-muqueux et myentérique. (Figure 4D et Tableau 8)

Tableau 8. Comptes des cellules inflammatoires dans les plexus de la recoupe iléale des pièces de résections chirurgicales.

	N	Median	IQR, 25-75th
<i>Plexus Myentérique</i>			
Eosinophiles	66	0	0 – 0
Lymphocytes	66	5	2 – 7
Mastocytes	66	0	0 – 0
Neutrophiles	66	0	0 – 0
Plasmocytes	66	0	0 – 0
Score d'inflammation	66	2	1 – 2
<i>Plexus sous-muqueux</i>			–
Eosinophiles	67	0	0 – 0
Lymphocytes	67	3	2 – 5
Mastocytes	67	1	1 – 2
Neutrophiles	67	0	0 – 0
Plasmocytes	67	0	0 – 0.75
Score d'inflammation	67	2	1 – 2

N: nombres de sujets; CI: Intervalle de Confiance.

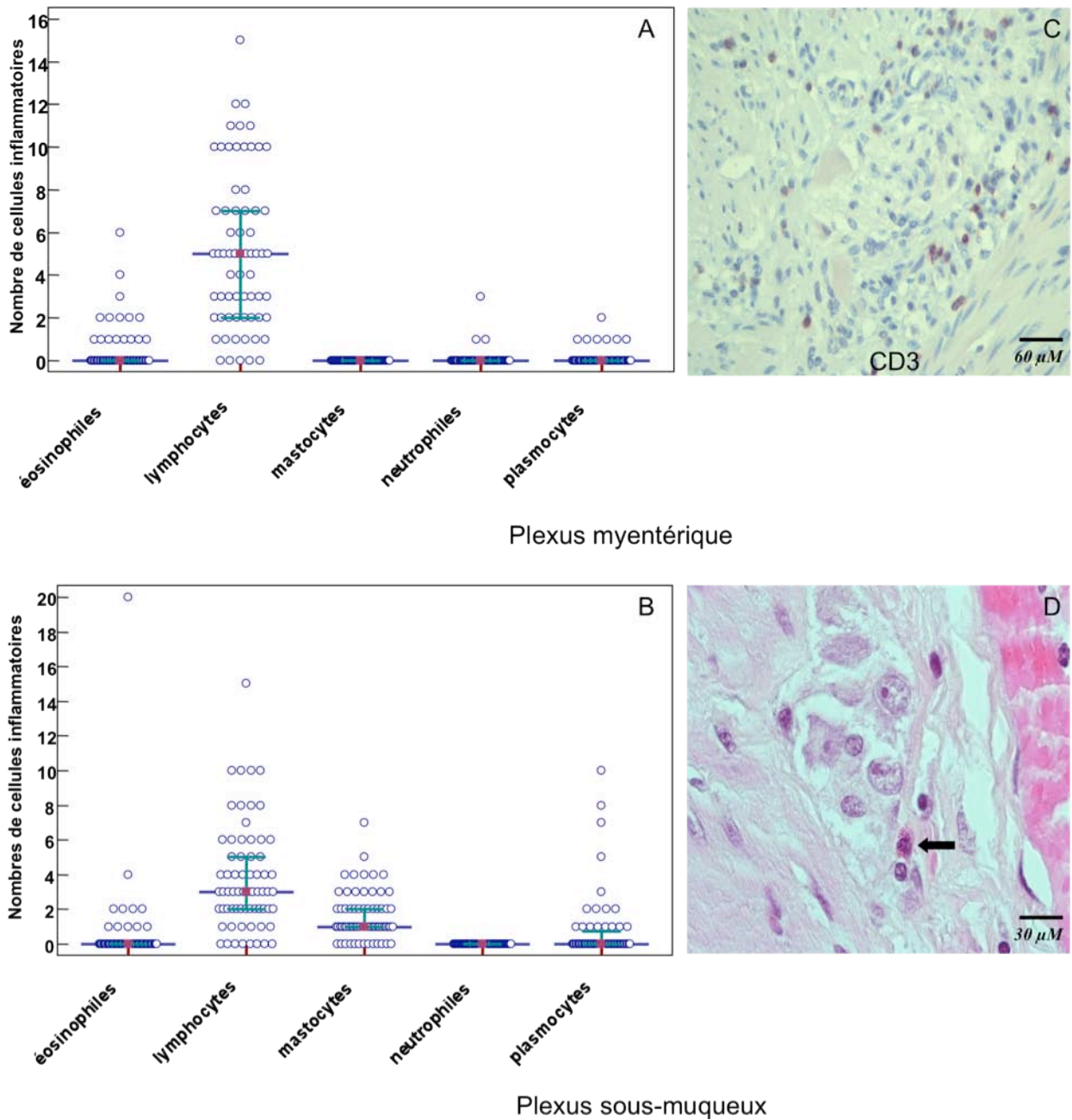


Figure 4. (A) Nombre de cellules inflammatoires pour chaque type de cellules inflammatoires (éosinophiles, neutrophiles, plasmocytes, mastocytes et lymphocytes) au sein des plexus myentériques. (B) Nombre de cellules inflammatoires pour chaque type de cellules inflammatoires (éosinophiles, neutrophiles, plasmocytes, mastocytes et lymphocytes) au sein des plexus sous-muqueux. (C) Nombreux lymphocytes au sein d'un plexus myentérique détecté par immunomarquage de l'antigène CD3 (x400). (D) Plexus sous-muqueux infiltré par un polynucléaire éosinophile (flèche) (HES x1000).

Probabilité de survie sans récurrence de la maladie de Crohn nécessitant une seconde chirurgie.

La Figure 5 montre la probabilité de survie sans seconde chirurgie due à une récurrence de la maladie de Crohn. En utilisant une analyse de survie de Kaplan-Meier, la proportion de patients sans seconde chirurgie due à une récurrence de la maladie de Crohn était de 92% ($\pm 4\%$), 90% ($\pm 4\%$), 74% ($\pm 7\%$) et 68% ($\pm 7\%$) à respectivement 1, 3, 4, et 5 ans.

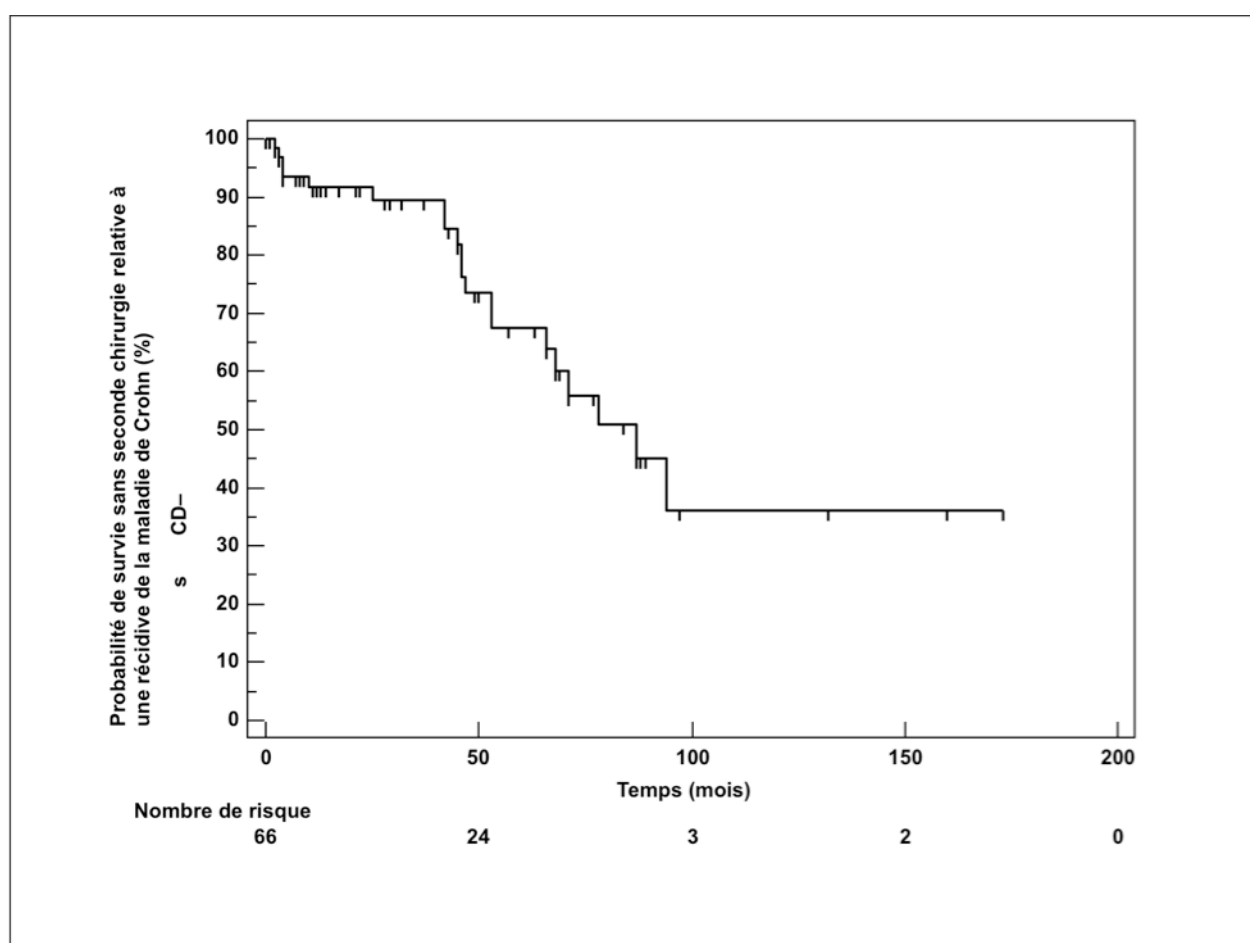


Figure 5. Survie sans seconde chirurgie relative à une récurrence de la maladie de Crohn (analyse de Kaplan-Meier).

Analyse univariée

Les valeurs seuil du compte de cellules inflammatoires dans les plexus sous-muqueux et myentériques ont été définies par la méthode d'analyse ROC (*Receiver Operating Characteristics*, en anglais). En analyse univariée, utilisant le test du log-rank, cinq items sont associés avec une seconde chirurgie relative à la maladie de Crohn: 'la révision chirurgicale précoce après la première chirurgie', 'le nombre de polynucléaires éosinophiles >1', 'le nombre de plasmocytes >0', 'le nombre de polynucléaires éosinophiles >0', et 'le nombre de lymphocytes >6' (**Tableau 9**).

Tableau 9. Facteurs prédictifs de seconde chirurgie en analyse univariée.

	P- valeur^a
Sexe masculin	0.2538
Statut de fumeur actif au moment de la chirurgie	0.8325
Anastomose en 1 temps au moment de la première chirurgie	0.1130
Révision chirurgicale précoce après une première résection iléocaecale	0.0381
<i>Classification de Montréal</i>	
A1 (moins de 16 ans)	0.7830
A2 (entre 17 et 40 ans)	0.7443
A3 (plus de 40 ans)	0.7761
B1 (non-sténosante, non-fistulisante))	0.2377
B2 (sténosante)	0.5527
B3 (fistulisante)	0.4604
L1 (maladie iléale isolée)	0.1485
L2 (maladie colique isolée)	0.9892
L3 (maladie iléocolique)	0.1071
P (maladie périanale)	0.0832
<i>Traitements concomittants de la maladie de Crohn au moment de la première chirurgie</i>	
Antibiotiques	0.1564
Aminosalicylés	0.3279
Corticostéroïdes	0.8548
Immunosuppresseurs (Thiopurines / Méthotrexate)	0.8081
Anti-TNF	0.6686
<i>Traitements prophylactiques post-opératoires de la maladie de Crohn</i>	P- valeur^a

Aminosalicylés	0.4907
Thiopurines	0.0868
Anti-TNF	0.3539
<i>Indication de la première chirurgie relative à la maladie de Crohn</i>	
Sténose	0.8615
Fistule	0.8063
Abcès	0.4421
Perforation	0.3294
<i>Type de première chirurgie relative à la maladie de Crohn</i>	
Résection iléale	0.8258
Résection iléocaecale	0.3856
Colectomie	0.8003
Résection iléocolique	0.6812
<i>Nombre de cellules inflammatoires au sein des plexus sous-muqueux (valeurs seuils définies par analyse ROC)</i>	
Eosinophiles >1	0.0117
Lymphocytes >8	0.0577
Neutrophiles >1	0.4691
Plasmocytes >0	0.0016
<i>Nombre de cellules inflammatoires au sein des plexus myentériques (valeurs seuils définies par analyse)</i>	
Eosinophiles >0	0.0001
Lymphocytes >6	0.0001
Mastocytes >2	0.0514
Plasmocytes >5	0.2008

NOTE. ROC: receiver operating characteristic analyse (Tableau 10) ^a test Log-rank

Tableau 10. Analyse Receiver Operating Characteristic (ROC) réalisée sur le compte des cellules inflammatoires basées sur les aspects histologiques de la limite de resection iléale au moment de la première chirurgie relative à la maladie de Crohn

Variabiles continues	P-valeur ^a	Valeurs seuil ^b
<i>Plexus myentériques</i>		
Eosinophiles	0.4542	>1
Lymphocytes	0.2725	>8
Mastocytes	Insufficient data ^c	—
Neutrophiles	0.9253	>1
Plasmocytes	0.1834	>0
Score d'inflammation	0.1763	>2
<i>Plexus sous-muqueux</i>		
Eosinophiles	0.0950	>0
Lymphocytes	0.5688	>6
Mastocytes	0.3672	>2
Plasmocytes	0.9584	>5
Neutrophiles	Insufficient data ^c	—
Score d'inflammation	0.5505	>2

^a Analyse Receiver operating characteristic selon DeLong *et al.* (21)

^b Valeurs seuil définies par l'analyse receiver operating characteristic.

^c Données insuffisantes pour l'analyse receiver operating characteristic.

Analyse multivariée

En analyse multivariée (dans un modèle de régression de Cox selon la méthode de sélection *stepwise*) trois facteurs prédictifs sont indépendamment associés avec le risque de seconde chirurgie en rapport avec une récurrence de la maladie de Crohn: 'la révision chirurgicale précoce après une première résection iléocaecale' (HR=9.56; 95% IC, 2.02 à 45.19; $P=0.0046$), 'la présence d'au moins 1 polynucléaire éosinophile dans le plexus sous-muqueux' (HR=8.02; 95% IC, 1.87 à 34.47; $P=0.0054$), et 'la présence de plus de 6 lymphocytes dans le plexus sous-muqueux' (HR=5.84; 95% IC, 1.23 à 27.65; $P=0.0269$). (Tableau 11).

Tableau 11. Facteurs prédictifs indépendants de seconde chirurgie en rapport avec une récurrence de la maladie de Crohn en analyse multivariée.

Covariable	valeur	Hazard	95% IC,
------------	--------	--------	---------

	<i>P</i> ^{-a}	Ratio	Hazard ratio
la révision chirurgicale précoce après une première résection iléocaecale	0.0046	9.56	2.02 à 45.19
Plexus sous-muqueux, Polynucléaires éosinophiles >0	0.0054	8.02	1.87 à 34.47
Plexus sous-muqueux, Lymphocytes >6	0.0269	5.84	1.23 à 27.65
Plexus myentérique, Polynucléaires éosinophiles >1	Non retenu dans le modèle de régression de Cox		
Plexus myentérique, Plasmocytes >0	Non retenu dans le modèle de régression de Cox		

NOTE. IC; Intervalle de Confiance. ^a Modèle de régression Cox

1.2.3.4- Discussion

La consommation de tabac est le facteur de risque le plus important de récurrence post-chirurgicale, multipliant par deux le risque de récurrence clinique.⁹⁷ Une résection intestinale antérieure, une forme fistulisante de la maladie de Crohn, une atteinte périanales et une extension intestinale diffuse de la maladie (>50 cm) sont des facteurs de risque établis de récurrence post-chirurgicale.⁹⁷ Les données sur les facteurs histologiques prédictifs d'une récurrence post-chirurgicale sont conflictuelles.⁹⁷

Nous avons trouvé, dans cette étude, que la pléxite sous-muqueuse sur la marge de résection proximale et la révision chirurgicale précoce après chirurgie étaient associées avec un risque de récurrence post chirurgicale. Durant ces dernières années, deux grandes études ont été réalisées sur ce sujet. Ferrante *et al.* ont démontré que l'activité inflammatoire dans les plexus myentériques était significativement associée à un risque de récurrence post-chirurgicale de la maladie de Crohn¹⁰⁸, alors que Sokol *et al.* ont démontré une association entre pléxite sous-muqueuse et récurrence clinique précoce.¹⁰⁹

Les limites de ces études incluent l'utilisation d'une évaluation subjective de la récurrence comme la récurrence clinique et le pourcentage élevé de données manquantes.^{108,109}

Dans l'étude de Sokol et al., à cause du caractère rétrospectif du travail, seuls 61 des 171 patients ont bénéficié d'une coloscopie pour l'évaluation de la récurrence endoscopique.¹⁰⁹ De plus, la pléxite a été évaluée en utilisant une échelle semi-quantitative¹⁰⁸ ou une valeur seuil fixée approximativement.¹⁰⁹ Dans notre étude, la récurrence a été définie par la nécessité d'une réintervention chirurgicale, ce qui est une évaluation objective de récurrence. La récurrence chirurgicale a été rapportée chez 11 à 32% des patients en 5 ans.¹¹¹ Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature, puisque 26% des patients inclus dans notre étude ont présenté une récurrence de la maladie de Crohn nécessitant une chirurgie après un suivi de 4 ans. De plus une analyse ROC a été utilisée pour identifier les valeurs limites optimales des critères histologiques afin de réduire les biais relatifs au choix arbitraire de ces valeurs limites.

Le fait de constater une récurrence le plus souvent située au niveau du segment iléal préalablement sain de l'anastomose iléocolique, a conduit à l'élaboration de nombreuses hypothèses afin d'expliquer les mécanismes de ce phénomène. Une des hypothèses les plus intéressantes s'est orientée vers le système nerveux entérique.¹¹² Ce système indépendant et bien organisé pourrait être une des voies de propagation de l'inflammation. Ferrante *et al.*¹⁰⁸ ont montré que la moitié des patients souffrant d'une maladie de Crohn sans atteinte histologique de la limite de résection proximale par la maladie présentait des lésions de pléxite sur cette limite. Dans cette étude, la présence d'une pléxite était moins fréquente au niveau de la limite de résection distale, ce qui pourrait expliquer la récurrence de la maladie de Crohn de façon plus fréquente au niveau du segment iléal de l'anastomose iléocolique.¹⁰⁸ Sokol *et al.*¹⁰⁹ ont retrouvé qu'une pléxite sous-muqueuse composée de mastocytes sur la limite proximale était prédictive d'une récurrence post-chirurgicale précoce de la maladie de Crohn. Ceci est la raison pour laquelle nous avons utilisé pour la première fois une approche plus précise et complète pour étudier les plexus sous-muqueux et myentériques de la limite de résection proximale. De plus, tous les types de cellules inflammatoires ont été analysés. Nous

avons pu démontrer que la pléxite sous-muqueuse de plus de 0 polynucléaires éosinophiles et/ou de plus de 6 lymphocytes étaient des facteurs prédictifs indépendants de récurrence chirurgicale de la maladie de Crohn. Dans l'étude de Sokol *et al.* les valeurs limites optimales utilisées pour l'analyse ont été déterminées en utilisant le nombre maximum de cellules inflammatoires observées au niveau de plexus sur des pièces de résection de patients non atteints par une maladie inflammatoire chronique intestinale.¹⁰⁹ La pléxite sous-muqueuse était plus prononcée chez les patients atteints d'une maladie de Crohn que chez les contrôles, en particulier pour les lymphocytes et les mastocytes.¹⁰⁹ La pléxite sous-muqueuse comportait au moins un de ces trois types de cellules inflammatoires (polynucléaires éosinophiles, lymphocytes ou mastocytes), mais en analyse multivariée le seul critère histologique prédictif d'une récurrence post-chirurgicale était la présence d'une pléxite sous-muqueuse ≥ 3 mastocytes.¹⁰⁹ Les différences constatées entre nos résultats et ceux de l'étude Sokol *et al.* pourraient être expliquées par la définition de la récurrence post-chirurgicale et l'utilisation de valeurs limites de référence différentes.

Les facteurs prédisposants à une récurrence de la maladie de Crohn ne sont pas bien définis, de ce fait il est nécessaire de développer une meilleure compréhension de la pathogénie de la récurrence de la maladie et de rechercher les facteurs de risque après une résection iléocolique.¹¹³ Les lymphocytes et les polynucléaires éosinophiles jouent un rôle important dans la pathogénie de la maladie de Crohn. Une des observations les plus précoces est une augmentation du nombre de polynucléaires éosinophiles au sein de la lamina propria sous l'épithélium de surface.¹¹⁴ Les polynucléaires éosinophiles perdent leurs granules dans les zones ulcérées, avec principalement dépôt de protéines cationiques et de cathepsine G, contribuant au processus inflammatoire.¹¹⁴ Dans les maladies inflammatoires intestinales, l'équilibre entre facteurs pro- et anti-inflammatoires est altéré avec un état pro-inflammatoire dû à une dérégulation du système immunitaire avec une interface complexe entre effecteur et

régulateur des lymphocytes T, cytokines immunosuppressives et proinflammatoires. La maladie de Crohn est clairement associée aux lymphocytes T helper (Th1) entraînant une augmentation de la production d'interféron γ et de TNF α .¹¹³

Nous avons montré une relation entre révision chirurgicale précoce et récurrence chirurgicale post-opératoire. Holzheimer *et al.*¹¹⁵ ont constaté que le développement de complications post-opératoires était un facteur de risque de récurrence précoce de maladie de Crohn. Ces données pourraient être expliquées par l'hypothèse qu'il existe deux types de maladie de Crohn: un type agressif qui entraîne des perforations et qui récidive de façon précoce et un second type qui se développe plus lentement entraînant des obstructions et qui récidive moins souvent et plus tardivement.¹¹⁵

La principale limitation de notre étude est son caractère rétrospectif. Sa principale force est que, au contraire des autres études de Ferrante *et al.* et Sokol *et al.*, nous avons confirmé la récurrence post-opératoire par analyse microscopique des pièces de résection chirurgicale, ce qui est un critère beaucoup plus objectif de récurrence. De plus nous avons utilisé la cohorte IBD de Nancy, qui est un centre de référence incluant tous les patients nouvellement diagnostiqués pour une maladie de Crohn.^{116,117,118}

En conclusion, la pléxite sous-muqueuse > 0 polynucléaires éosinophiles et/ou > 6 lymphocytes au niveau de la limite proximale et la révision chirurgicale précoce après une première résection iléocœcale sont prédictifs d'une seconde chirurgie pour récurrence de la maladie de Crohn. L'identification de facteurs de risque de récurrence post-chirurgicale pourrait être utilisée pour classer les patients en fonction de leur risque, déterminant ainsi ceux devant bénéficier d'une prise en charge thérapeutique plus agressive, afin de modifier l'évolution naturelle de la maladie.

PARTIE II

PATHOGENIE DES MALADIES
INFLAMMATOIRES CHRONIQUES
INTESTINALES

La pathogénie des MICI reste encore mal connue. Elle est complexe et probablement multifactorielle, faisant intervenir des facteurs génétiques, des anomalies de la réponse immune et des facteurs environnementaux.

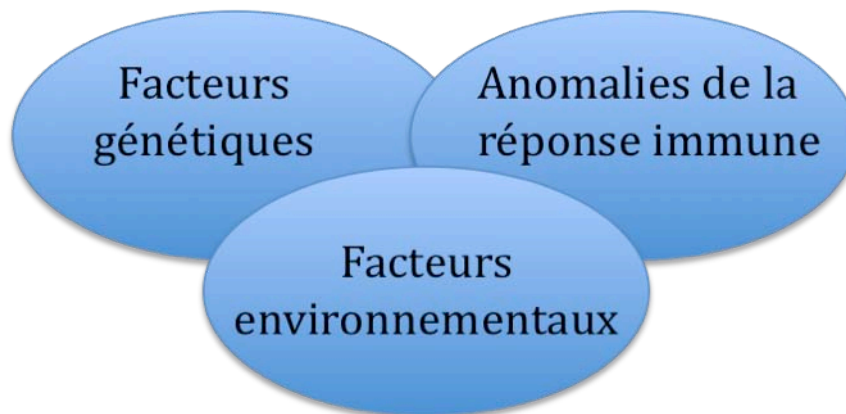


Figure 6: Schéma récapitulatif des différents facteurs impliqués dans la pathogénie de la maladie de Crohn.

Actuellement, l'hypothèse communément admise pour expliquer le développement des MICI serait une dysrégulation de la réponse immunitaire muqueuse dirigée contre des éléments de la flore intestinale, survenant chez des patients génétiquement prédisposés. Une dérégulation de la barrière intestinale est incriminée également dans la pathogénie des MICI. Celle-ci est composée de l'épithélium et de la couche de mucus qui forment une barrière physique entre les agents potentiellement toxiques dans la lumière intestinale et les tissus de la paroi intestinale.¹¹⁹

2.1- Les facteurs génétiques

Des études épidémiologiques, portant sur des jumeaux, et sur les différences raciales et

ethniques de la prévalence de la maladie, soulignent l'implication de facteurs génétiques dans la pathogénie des MICI. De nombreux variants ont été récemment identifiés dans la susceptibilité génétique des maladies inflammatoires de l'intestin du génome par des études d'association (tableau 12).

Les modifications dans les gènes du système immunitaire inné, comme NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain protein 2, également connu sous le nom de CARD15), ATG16L1 (autophagy related 16-like protein 1), IRGM (qui code immunity-related GTPase family, M) et LLRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) sont spécifiques de la maladie de Crohn et ne sont pas associés à la RCH. En revanche, plusieurs gènes impliqués dans la voie de l'IL-23, y compris IL23R (qui code une sous-unité essentielle de l'IL-23 receptor), IL12B (qui code la sous-unité p40 de IL-12 et IL-23) et STAT3 (qui code signal transducer and activator of transcription 3) ont été associés à la fois à la maladie de Crohn et à la RCH. Le NKX2-3 (NK2 transcription factor related, locus 3) et HLA (Human leucocyte antigen) montrent également une association avec les deux maladies.¹²⁰ Enfin, un nouveau locus de susceptibilité ECM1 (Extracellular matrix protein 1) a été identifié récemment comme facteur de risque associé avec la RCH.¹²¹

En 2001, le premier gène de prédisposition à la maladie de Crohn, baptisé Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2 (NOD2) puis renommé Caspase activation recruitment domains 15 (CARD15) a été découvert.¹²² Environ 25-30% des gènes de susceptibilité de la MC peuvent être expliqués par les mutations du gène NOD2/CARD15, mais ces études n'ont pas trouvé d'association entre les mutations du gène NOD2/CARD15 et la RCH.^{123,124}

La protéine NOD2 est un récepteur intra-cellulaire pour un composé de la paroi bactérienne, le muramyl-dipeptide, et est exprimé par les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules de Paneth.^{123,124} NOD2/CARD15 est impliqué dans l'identification d'un produit bactérien, le peptidoglycan- derived muramyl dipeptide (MDP). L'activation de NOD2 par le

MDP met en jeu les voies du NF- κ B (facteur nucléaire- κ B) et des MAPKs (mitogen-activated-proteins-kinases).¹²⁵ Trois variants de type SNPs rares dans NOD2, Arg702Trp, Gly908Arg et Leu1007fsinsC (insertion de cytosine provoquant une frameshift à Leu1007) sont fortement associés à la susceptibilité à la maladie de Crohn. Dans les cellules mononucléées humaines primaires, chacun des trois principaux variants de NOD2 est associée à une diminution de l'activation de NF- κ B en réponse à la stimulation MDP.¹²⁶

Les mécanismes qui sous-tendent la relation entre NOD2 et la maladie de Crohn restent mal connus. Une diminution significative de l'expression des α -défensines a été observée chez les patients atteints de la maladie de Crohn qui sont porteurs du variant de NOD2.^{127,128} La diminution de la clairance microbienne des muqueuses résultant d'une diminution de l'expression des défensines pourrait tenir compte des changements dans la flore intraluminaire, ce qui génère une vulnérabilité tout au long de la barrière épithéliale à l'infection par des agents pathogènes tels que E. Coli adhérent-invasif et Mycobacterium paratuberculosis.¹²⁹ Cependant, des données plus récentes ont montré que la diminution de l'expression des α -défensines est indépendante de NOD2 et reflète une perte de cellules épithéliales de surface et une réduction du nombre de cellules Paneth secondaire à l'inflammation, et non un mécanisme pathogène primaire.

Dans le gène ATG16L1, un SNP (Ala281Thr) est très significativement associé à la maladie de Crohn.¹³⁰ ATG16L1 est membre d'une famille de gènes impliqués dans l'autophagie. Une mutation de ATG16L1 aurait pour conséquence la réduction de la clairance des agents pathogènes. Il a été rapporté que l'expression de ATG16L1 par les cellules épithéliales intestinales est essentielle à l'efficacité de l'autophagie de S. Typhimurium.¹³¹ Une observation intéressante a été celle de l'association de variants génétiques dans le gène IRGM avec la maladie de Crohn.¹³² Des expériences de knockdown d' IRGM ont permis de montrer son rôle dans l'autophagie, et donc le contrôle de la charge en mycobactéries

intracellulaires.¹³³ Une étude récente a montré l'induction de l'autophagie par un mutant LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2), qui est fortement associé à la maladie de Crohn et aux gènes d'autophagie ATG16L1 et IRGM2-5.¹³⁴ Dans l'ensemble, les associations de SNPs dans NOD2, ATG16L1, IRGM et LRRK2 avec la maladie de Crohn, mais pas avec la RCH, indiquent que les modifications du devenir intracellulaire des bactéries constituent un élément central de la pathogenèse de la maladie de Crohn.

Plus récemment un nouveau gène IL23R associé aux MICI a été mis en évidence¹³⁵ en analysant plus de 300 000 polymorphismes génétiques dans une population d'Amérique du Nord. Le gène codant pour IL23R, le récepteur de l'IL-23, ont été identifiés comme étant associé à un moindre risque de MC et de RCH. IL-23 est composé des sous-unités p19 (IL23A, chromosome 12q13) et p40 (IL12B, chromosome 5q33). Le blocage par des anticorps spécifiques de p40 inhibe les voies de signalisation liées à IL-23 et IL-12, alors que des anticorps spécifiques de p19 inhibent seulement les voies liées à l'IL-23. Suite à l'engagement de l'IL-23R par IL-23, Janus kinase 2 (JAK2) est activé, ce qui conduit à l'autophosphorylation de JAK2 et la phosphorylation de l'IL-23R. Cela se traduit par l'homodimérisation et la translocation nucléaire de STAT3. STAT3 joue un rôle central dans la différenciation des cellules Th17.¹³⁶ Dans une méta-analyse des GWA (études d'association pangénomique) sur des cohortes européennes et nord-américaines, il a été montré une association de plus de 30 régions génomiques avec la maladie de Crohn.⁸ Sur les trente régions, quatre (IL23R, IL12B, STAT3 et JAK2) ont un rôle dans la signalisation IL-23R. De plus, d'importantes associations de IL23R, IL12B et STAT3 ont récemment été signalés dans la RCH.^{121,120}

L'IL23 régule l'expression de l'IL17. L'IL17 stimule la sécrétion de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires par des fibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules épithéliales¹³⁷ et la production locale de IL17 va aboutir à l'activation des cellules

inflammatoires.¹³⁸ L'IL 23 peut contribuer à maintenir une inflammation chronique pathologique.¹³⁸

Les gènes du HLA sont situés dans la région MICI3, qui est la région la plus étudiée. Le HLA joue un rôle important dans l'immunité adaptative. Le lymphocyte T ne reconnaît que l'antigène associé aux produits du gène HLA. ECM1 est un gène candidat plausible pour la RCH: il code pour la protéine 1, une glycoprotéine exprimée dans le petit et le gros intestin, et il interagit avec la membrane basale et inhibe la matrix metalloproteinase 9.¹³⁹ ECM1 active fortement la voie de signalisation NF-kB. Récemment, une forte association entre le locus ECM1 et la RCH ont été identifiés.¹²¹

La recherche de gènes de prédisposition aux MICI est loin d'être achevée et il est probable que dans les toutes prochaines années, d'autres associations seront décrites.

Chromosome	Location (Mb)	Genes of Interest	Associated with Crohn's disease	Associated with ulcerative colitis
1p31	67	<i>IL23R</i>	Yes	Yes
2q37	231	<i>ATG16L1</i>	Yes	No
3p21	49	Multiple, including <i>MST1</i>	Yes	Yes
5p13	40	Intergenic, <i>PTGER4</i>	Yes	No
5q31	131	Multiple, including <i>SLC22A5</i>	Yes	Unclear
5q33	150	Multiple, including <i>IRGM</i>	Yes	No
5q33	158	<i>IL12B</i> (p40)	Yes	Yes
10q21	64	<i>ZNF365</i>	Yes	Unclear
10q24	101	<i>NKX2-3</i>	Yes	Yes
16q12	49	<i>NOD2</i>	Yes	No
17q21	37	Multiple, including <i>STAT3</i>	Yes	Yes
18p11	12	<i>PTPN2</i>	Yes	Unclear

ATG16L1, autophagy related 16-like protein 1; *IL12B*, interleukin-12β; *IL23R*, interleukin-23 receptor; *IRGM*, immunity-related GTPase family, M; *NKX2-3*, NK2 transcription factor related, locus 3; *NOD2*, nucleotide-binding oligomerization domain protein 2; *PTGER4*, prostaglandin receptor, EP4; *PTPN2*, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2; *SLC22A5*, solute carrier family 22, member 5; *STAT3*, signal transducer and activator of transcription 3; *ZNF365*, zinc-finger protein 365.

Tableau 12: Des gènes de susceptibilité des MICI (D'après Cho et al. 2008)¹⁴⁰

2.2- Les facteurs environnementaux

L'augmentation du risque de MICI pour les Asiatiques migrant en Europe et inversement la diminution du risque chez les Européens migrant dans ce pays sont en faveur de l'existence de facteurs environnementaux impliqués dans la pathogénie des MICI.¹⁴¹ L'absence de

concordance totale chez les jumeaux monozygotes¹⁴², l'agrégation familiale dans les MICI¹⁴³ sont autant d'éléments en faveur de l'intervention de facteurs d'environnement comme les microbes dans la genèse des MICI.¹⁴⁴

Deux facteurs d'environnement ont un rôle établi: le tabac et l'appendicectomie. De nombreux autres facteurs d'environnement font l'objet de recherches actives. Il s'agit d'agents infectieux, alimentaires, du stress et de facteurs socio-économiques.

La consommation de tabac a un effet « bénéfique » bien établi sur l'évolution de la RCH¹⁴⁵. Plusieurs études concordantes ont démontré qu'un antécédent d'appendicectomie avait un effet "protecteur" vis-à-vis de la RCH en réduisant le risque d'environ 70%. Cet effet "protecteur" ne s'observe que chez les malades opérés avant l'âge de 20 ans pour une authentique appendicite.¹⁴⁶ L'effet bénéfique de l'appendicectomie sur le cours évolutif d'une RCH déjà diagnostiquée n'est pas démontré, mais des observations suggèrent qu'une appendicectomie pourrait permettre d'obtenir une amélioration de l'évolution dans les formes sévères de RCH résistantes au traitement médical.¹⁴⁷ Par contre, la réalisation d'une appendicectomie est associée à un risque de MC.¹⁴⁸

Plusieurs agents infectieux ont été incriminés dans la genèse des MICI : le virus de la rougeole, le CMV, listeria monocytogenes, chlamydia trachomatis, Escherichia. Coli, Helicobacter pylori, Mycobacterium paratuberculosis, Saccharomyces cerevisiae. Mais le rôle de Mycobacterium paratuberculosis et des autres agents pathogènes reste très discuté.

Les aliments ont également été proposés comme potentiellement impliqués dans la pathogénie des MICI. Il a été rapporté que les légumes, les fruits, le poisson, les fibres et les acides gras ω -3 à longue chaîne protègent contre la MC.¹⁴⁹ Les acides gras saturés augmentent l'activation de NF- κ B par Toll-like receptor (TLR), et cette activation est inhibée par acide gras ω -3.¹⁵⁰ Les ω -3 acides gras poly-insaturés produisent les médiateurs anti-inflammatoires comme LTB-5 et Prostaglandine 3.¹⁵¹ Ces pistes n'ont pour l'instant pas été confirmées.

L'hypothèse de l'hygiène permet d'intégrer les facteurs d'environnement aux données connues de la physiopathologie des MICI. Une amélioration des conditions d'hygiène, notamment au cours de l'enfance, est souvent émise pour expliquer l'augmentation de l'incidence des MICI dans les pays en voie de développement et l'augmentation de l'incidence des MICI depuis la dernière guerre.¹⁵²

Tableau 13: Résumé des différents facteurs environnementaux impliqués dans la pathogénie des maladie inflammatoires chroniques intestinales.

<i>Facteurs environnementaux établis, impliqués dans la pathogénie des maladie inflammatoires chroniques intestinales.</i>
Tabac
Appendicectomie
<i>Facteurs environnementaux potentiellement impliqués dans la pathogénie des maladie inflammatoires chroniques intestinales.</i>
Agents infectieux
Alimentation
Stress
Facteurs socio-économiques

2.3- Les facteurs immunitaires

Le système immunitaire inné représente une défense non spécifique contre les pathogènes. L'implication d'un déficit immunitaire inné au cours de la MC a été soulignée par l'identification de NOD2 et TLR comme des gènes de susceptibilité de la MC.^{123,153,124} Jusqu'à présent, plus de 11 TLRs, 23 NODs, quelques C-type lectin-like molecules et β -glucan receptors ont été identifiés. Plus récemment, il a été montré que NOD2 régule l'expression de certains peptides antimicrobiens dont font partie les défensines et dont l'expression est diminuée au cours de la MC, ce qui contribuerait au défaut d'élimination des

microbes.¹²⁷

Ces anomalies du système immunitaire inné sont associées à une rupture de tolérance et donc à une inflammation intestinale qui va entraîner une activation excessive du système adaptatif qui va être responsable des lésions intestinales. Cette réponse immunitaire spécifique à des antigènes est médiée par différents types cellulaires résidant dans la paroi intestinale ou recrutés lors du développement d'une inflammation : les lymphocytes B muqueux produisant des immunoglobulines G et A, différentes sous-populations de lymphocytes T de phénotype Th1, Th2 ou Th17, et les lymphocytes T/B régulateurs.¹⁵⁴ Classiquement, la MC est considérée comme étant de phénotype Th1, et La RCH comme étant de phénotype Th2.

Récemment, des études suggèrent un chevauchement plus complexe et plus significatif entre RCH et MC, les deux formes principales de MICI. Une nouvelle lignée de lymphocytes T CD4 au phénotype Th17 a été mise en évidence et impliquée dans la pathogénie des MICI. La population de Th17 est développée par IL23 et est inhibée par des facteurs des transcriptions qui sont nécessaires à Th1 et Th2.¹⁵⁵ Enfin, d'autres types cellulaires que sont les lymphocytes T régulateurs produisant IL-10 et/ou le transforming growth factor-beta (TGF- β) sont également nécessaires au maintien d'une homéostasie intestinale chez l'homme.

2.4- Publication n°3 : « L'activation de PPAR gamma est requise pour le maintien de la défense antimicrobienne colique. » (PNAS, vol.107, mai 2011)

2.4.1- Introduction

Les peptides anti-microbiens, incluant les défensines alpha et beta, sont des effecteurs clé de la réponse immunitaire innée gastrointestinale. La maladie de Crohn iléale est caractérisée par la diminution d'expression par les cellules de Paneth des défensines alpha, qui est indépendamment liée à la maladie de Crohn présentant les mutations NOD2 et TCF7L2.^{156,157}

La diminution de l'activité anti-microbienne contre certains groupes de bactéries de la flore

intestinale a été rapportée au niveau de la muqueuse colique de patients atteints d'une maladie de Crohn comparée à des patients atteints de rectocolite hémorragique ou de contrôles.¹⁵⁸ Le mécanisme entraînant cette diminution d'immunité antimicrobienne dans la maladie de Crohn est peu compris. PPAR gamma est exprimé principalement au niveau des entérocytes. PPAR gamma est impliqué dans la régulation d'un groupe spécifique de gènes intervenant dans l'homéostasie intestinale.¹⁵⁹ Il a été montré que l'absence d'expression génétique de PPAR gamma augmentait la susceptibilité à la colite expérimentale chez les rongeurs.¹⁵⁹ Inversement, l'activation de la voie PPAR gamma par des agonistes connus atténue la sévérité des lésions inflammatoires à la fois dans un modèle expérimental de colite et dans un modèle de colite spontanée.¹⁵⁹ Le but de ce travail était donc d'évaluer le rôle de PPAR gamma dans la défense de l'hôte par la régulation des peptides antimicrobiens au niveau de la muqueuse intestinale de patients souffrant de maladies inflammatoires intestinales.

2.4.2-Résultats

Les analyses in vitro suggèrent que certains signaux endogènes et exogènes pourraient intervenir dans la régulation de l'expression épithéliale de défensine bêta 1 par l'activation de PPAR gamma. En effet le traitement de cellules Caco-2 par thiazolidinedione rosiglitazone synthétique entraîne une augmentation du taux de ARNm à la fois de DEFB1 et ADRP, un gène connu pour être une cible de PPAR gamma.

Les analyses effectuées sur deux modèles de souris avec déficience de PPAR gamma montrent une diminution significative en immunohistochimie de l'expression de certaines défensines, incluant mDefB10 (figure 7), au niveau de la muqueuse colique chez les animaux déficientes en PPAR gamma (Ppar gamma +/- ; Ppar gamma -/-) par rapport aux témoins non déficients. L'immunomarquage a été réalisé à l'aide d'un anticorps primaire polyclonal de lapin anti DEFB10 utilisé à une dilution de 1 :100, avec une incubation de 12h à 4°C. Le

protocole utilisé est celui décrit en annexe (Fiche 9). Par contre l'expression d'autres défensines comme mDefB1 n'est pas régulé par PPAR gamma : un traitement par rosiglitazone induit en effet une induction de l'expression d'ARNm de mDefB10 au niveau du colon par rapport aux animaux non traités, alors que l'expression d'ARNm de mDefB1 n'est pas modifié par le traitement. Ces résultats suggèrent donc que l'activation de PPAR gamma par des signaux endogènes ou exogènes est requise pour le maintien du niveau physiologique d'expression de certaines défensines au niveau du colon.

Les peptides cationiques extraits de la muqueuse colique des animaux Ppar gamma +/- présentent un déficit dans l'élimination de colonies cultivées de *Bactéroïdes fragilis*, *Enterococcus faecalis* et *Candida albicans* comparativement aux animaux témoins. La viabilité de colonies d'*Escherichia Coli* est significativement diminuée après 90 minutes d'exposition d'extraits de biopsie colique de contrôle par rapport à ceux d'animaux PPAR gamma mutants.

Une neutralisation de l'activité colicide, en utilisant un anticorps bloquant anti-mDef10, sur les extraits de biopsie colique provenant d'animaux mutés Ppar gamma +/- est significativement diminuée par rapport à des extraits issus d'animaux témoins non mutés, signifiant ainsi qu'il existe un lien entre un déficit d'expression de mDef10 et un affaiblissement de l'immunité antimicrobienne dans les colons d'animaux mutés Ppar gamma. Par contre l'analyse de l'activité antimicrobienne et de la flore réalisée au niveau de l'intestin grêle ne montre pas de différence entre les animaux mutés Ppar gamma +/- et les contrôles, suggérant ainsi que PPAR gamma n'est pas indispensable pour le maintien de l'immunité antimicrobienne innée au niveau de l'iléon chez la souris.

Une mesure du taux de DEFB1 (défensine beta 1) dans la muqueuse colique a été réalisée chez des patients atteints de maladie de Crohn, de RCH et chez des sujets contrôles. Le taux d'ARMm de DEFB1 est spécifiquement réduit au niveau de la muqueuse colique

macroscopiquement et microscopiquement non inflammatoire chez des patients présentant une atteinte colique. Afin de confirmer cette observation, l'expression de DEFB1 a été recherchée par technique immunohistochimique sur des coupes histologiques issues de pièce de résections coliques chez des contrôles et chez des patients présentant des lésions de colites dans le cadre d'une maladie de Crohn. Les résultats confirment une diminution d'expression de DEFB1 au niveau des entérocytes chez les patients atteints d'une maladie de Crohn. Chez les patients avec une atteinte iléale pure ou atteints de RCH, le taux d'expression de DEFB1 ne diffère pas de celui des contrôles. Il n'y a pas de corrélation entre les taux de transcrits DEFB1 et IL-8 retrouvés sur des biopsies coliques issus de patients contrôles et atteints de maladie de Crohn, suggérant que la diminution d'expression de DEFB1 n'est pas liée à l'inflammation résultant des dommages tissulaires.

Pour finir une analyse génotype-phénotype a été réalisée chez les patients atteints de maladie de Crohn, montrant que l'atteinte colique dans la maladie de Crohn est associée à une variante fonctionnelle de promoteur de DEFB1.

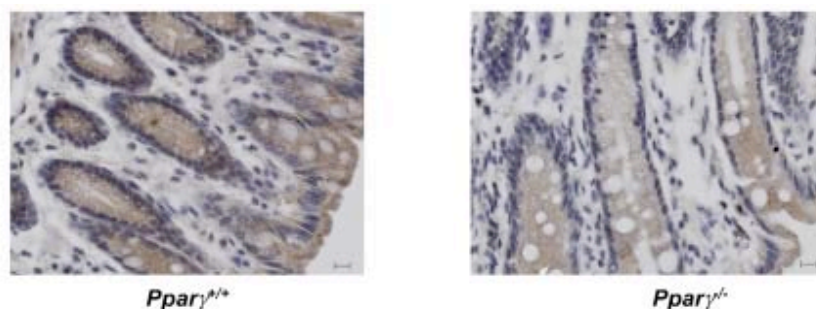


Figure 7: L'activation de PPAR gamma est requise pour l'expression de activation *mDefB10* dans le colon. Immunomarquage montrant une localisation de *mDefB10* chez les animaux

Pparγ^{+/+} et *Pparγ^{-/-}*.

2.4.3-Discussion

Ces résultats suggèrent le rôle clé de PPAR gamma dans la régulation de l'expression de DEFB1 qui contribue à l'activité bactéricide et candidacide au niveau de la muqueuse colique.¹⁵⁸ Dans la maladie de Crohn avec atteinte colique, le déficit constitutif d'expression de DEFB1 pourrait contribuer à la diminution de l'activité antimicrobienne de la muqueuse colique entraînant alors une augmentation de l'adhérence de certains microorganismes¹⁶⁰, une inflammation excessive et une exacerbation de la réponse des anticorps aux antigènes microbiens.¹⁶¹

En rapport avec les résultats des études in vitro antérieures^{162,163,164}, l'expression de DEFB1 est inversement corrélée avec le transport de *C.Albicans*¹⁶⁵ et la réponse humorale à mannan, un épitope majeur pour la production de anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA).¹⁶⁴ La colonisation par *C.Albicans* est significativement plus élevée chez les patients atteints de maladie de Crohn et est identifiée comme un immunogène pour ASCA¹⁶⁶, un marqueur sérologique associé principalement à l'atteinte colique au cours de la maladie de Crohn.¹⁶⁷ En accord avec les résultats d'une étude récente¹⁶⁸, nous avons expliqué le mécanisme par lequel l'allèle rs1800972 G pourrait être lié à la transactivation de l'expression de DEFB1 par l'intermédiaire de PPAR gamma. Cela pourrait ainsi expliquer l'inefficacité des thérapies basées sur la voie de PPAR gamma, comme les 5-aminosalicylés, dans les atteintes coliques au cours de la maladie de Crohn en comparaison à une atteinte au cours des RCH. De plus le maintien d'un taux d'expression de DEFB1 pourrait être nécessaire pour expliquer l'effet protecteur de PPAR gamma sur le développement de cancer colorectal, mais ceci nécessite d'être confirmé par d'autres investigations.^{169,170} En résumé, cette étude semble montrer que la restauration de la fonction de la barrière antimicrobienne dépendante de PPAR gamma pourrait prévenir ou peut-être même guérir les lésions inflammatoires coliques chez les patients atteints de maladie de Crohn.

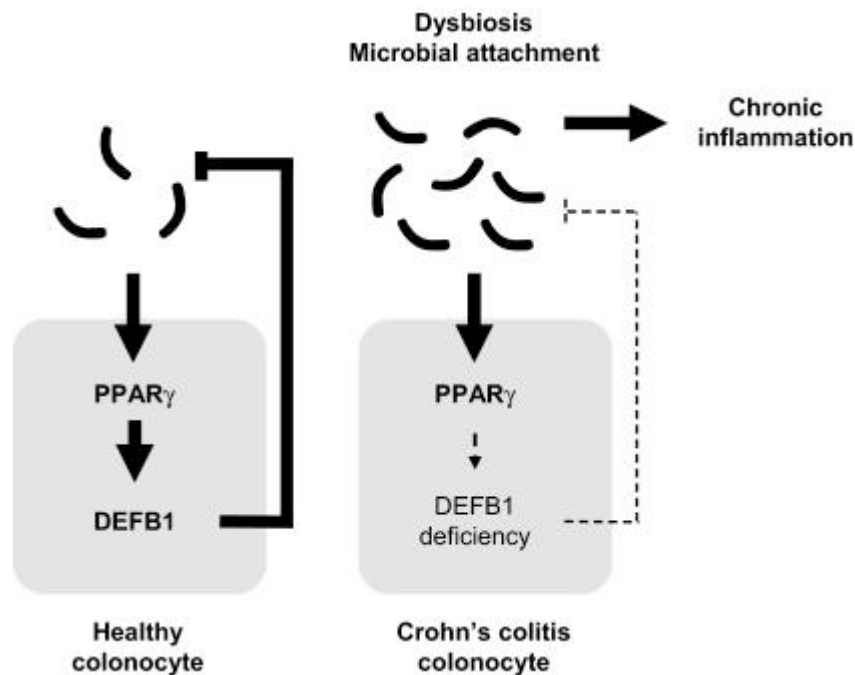


Figure 8: Schéma expliquant l'action de PPAR γ dans la régulation de l'immunité antimicrobienne dans le colon.

2.5- Publication n°4 : « NRLP6 (Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6) contrôle le renouvellement cellulaire et la carcinogénèse colorectale. » (PNAS, vol.108, juin 2011)

2.5.1- Introduction

Le risque cumulatif de cancer colorectal (CCR) est supérieur à deux fois dans les maladies inflammatoires intestinales comparé à la population générale.¹⁷¹ Les facteurs de risque établis de CCR dans les maladies inflammatoires intestinales sont le jeune âge au diagnostic, l'extension diffuse et la durée de la maladie, l'existence de CCR dans la famille et la coexistence de cholangite sclérosante primitive. Au niveau de l'adénome colorectal inflammatoire, plusieurs mutations contribuent à la cancérogénèse par activation de kinases, incluant ERK¹⁷², et de facteurs de transcriptions comme STAT3.¹⁷³ Cependant les mécanismes par lesquels les patients souffrant de maladies inflammatoires intestinales développent des CCR restent peu connus. La sévérité de la colite est un déterminant important

pour le développement de néoplasie colorectal au cours des maladies inflammatoires intestinales.^{94,174} Les cellules inflammatoires qui infiltrent le microenvironnement de la tumeur contribuent à la production d'une variété de substance, comme l'interleukine 1 β (IL-1 β), qui est connu pour altérer la stabilité génomique de cellules épithéliales.¹⁷⁵ La forme active de l'IL-1 bêta est sécrétée suite à son clivage par une protéase inflammatoire cystéine, appelée Caspase-1 (connue comme étant l'enzyme de conversion de l'IL-1bêta). Au niveau moléculaire, Caspase-1 interagit avec ASC (une protéine associée à l'apoptose comportant un domaine de recrutement pour les caspases) et avec la protéine NRLP6 (Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6).¹⁷⁶ Cette dernière possède une pyrine comme domaine effecteur C-terminal qui interagit avec ASC et caspase-1.¹⁷⁷ En réponse d'un stress moléculaire, NRLP6, caspase-1 et ASC s'assemblent pour former une plate-forme moléculaire (NLRP6-inflammasome). Il a été montré que la coexpression de NLRP6 et ASC entraîne la sécrétion d'IL1 bêta biologiquement active par clivage protéolytique de Caspase-1 et active la sécrétion de facteur de transcription NF-kappaB in vitro.¹⁷⁷ Des résultats récents montrent le rôle essentiel de Caspase-1 dans l'inflammation intestinale et la carcinogénèse, puisque les souris déficientes en caspase-1 présentent une sensibilité accrue aux maladies inflammatoires intestinales et aux CCR.^{178,179,180,181} Le rôle de NLRP6 dans la réparation tissulaire et la cancérogénèse intestinale sont mal connus.

2.5.2-Résultats

L'analyse d'expression génique montre que NLRP6 est exprimé par toutes les parties de l'intestin (colon et intestin grêle). En analyse RT-PCR quantitative, les taux de transcrits *nrlp6* sont plus élevés au niveau des myofibroblastes coliques. L'expression de NLRP6 a été recherchée par technique immunohistochimique sur des coupes histologiques issues de muqueuse colique humaine. L'immunomarquage a été réalisé à l'aide d'un anticorps primaire

polyclonal de chèvre anti NRLP6 (sc-50636 ; Santa Cruz Biotechnology) utilisé à une dilution de 1:25, avec une incubation de 30 minutes. Le protocole utilisé est celui décrit en annexe (fiche 9). L'immunomarquage obtenu confirme l'expression de l'antigène NRLP6 au sein des myofibroblastes en périphérie des cryptes dans une muqueuse colique humaine normale (Figure 9). La régénération de la muqueuse après biopsie au niveau du colon descendant a été étudiée chez des animaux déficients *Nlrp6* et chez des animaux contrôles. Une cicatrisation incomplète est observée chez les souris déficientes *Nlrp6*, montrant ainsi que NRLP6 joue un rôle important au cours de la cicatrisation intestinale. Des lésions de colite expérimentale (traitement par DSS-Dextran Sodium Sulfate) ont été induites chez des souris déficientes *Nlrp6* (-/-) et contrôles : les souris déficientes *Nlrp6* (-/-) sont plus susceptibles avec des signes cliniques (poids, consistance des selles et sang dans les selles) plus marqués et persistants chez les souris *Nlrp6* (-/-). L'analyse endoscopique retrouve également des signes de colites plus importants chez les animaux déficients (ulcérations et saignements). L'étude microscopique confirme la présence de lésions inflammatoires plus marquées chez les animaux *Nlrp6* (-/-).

De plus les résultats montrent que NRLP6 contrôle l'organisation et la prolifération des cellules épithéliales au niveau des zones lésées avec la présence chez les animaux déficients *Nlrp6* (-/-) d'une augmentation de l'arrêt des cellules épithéliales dans le cycle cellulaire, de la perméabilité intestinale et de la réponse inflammatoire. L'analyse quantitative par RT-PCR réalisée au niveau de la muqueuse colique après traitement par DSS montre une augmentation du taux de transcrits pour des molécules impliquées dans la prolifération (caseïne kinase epsilon, SMARCC1, deux molécules exprimées de façon anormale dans la tumorigénèse intestinale) chez les animaux déficients *Nlrp6* (-/-) par rapport aux contrôles. De même une augmentation des ARNm et de la protéines IL17A est observée chez les animaux déficients *Nlrp6* (-/-) avec une augmentation du taux de transcrits de molécules impliquées dans la voie

Th17 (chemokine ligand 20-Ccl20-, matrice metalloproteinase-7). Par contre pour certaines cytokines pro-inflammatoires comme IL-1bêta, le taux de transcrits est le même entre les animaux déficients Nrlp6 (-/-) et les contrôles traités par DSS.

De plus, NRLP6 semble être un régulateur négatif de la tumorigénèse colorectal : en effet l'expression de NRLP6 est retrouvée à un niveau plus faible dans les adénocarcinomes, comparativement à une muqueuse non tumorale. Afin de tester cette hypothèse, un modèle expérimentale de colite associée au développement de CCR (DSS-AOM) a été réalisé chez des souris déficientes Nrlp6 (-/-) et chez des contrôles, mettant en évidence des signes cliniques plus marqués chez les souris déficientes Nrlp6 (-/-) (perte de poids, diarrhées et saignements). Du point de vue endoscopique, des adénomes au niveau du colon des souris déficientes Nrlp6 (-/-) étaient retrouvés.

Une analyse du profil transcriptionnel a ensuite été réalisée à partir de biopsies tumorales et non tumorales réalisées chez les animaux déficients Nrlp6 (-/-) et les contrôles après traitement par DSS-AOM. L'expression de certains gènes est influencée par NRLP6 avec une surexpression significative chez les animaux déficients Nrlp6 (-/-) de facteurs paracrine comme p53 confirmant ainsi le rôle de NRLP6 dans la régulation de la prolifération cellulaire au niveau des cryptes. L'analyse microarray montre clairement une surexpression de facteurs impliqués dans la voie Wnt chez les animaux déficients Nrlp6 (-/-) par rapport aux contrôles.

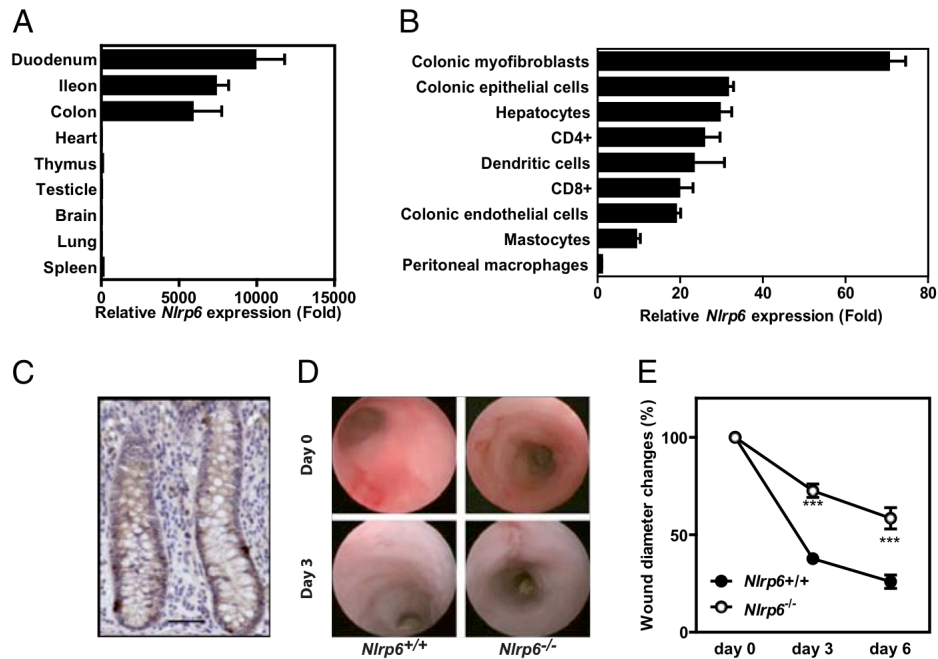


Figure 9: (A et B) *Nlrp6* est exprimé par les myofibroblastes coliques et est impliqué dans la réparation tissulaire. L'expression de *Nlrp6* a été déterminée par RT-PCR quantitative (n = 4). (C) *Nlrp6* a été détecté par immunohistochimie au sein des myofibroblastes colique humain. (D et E) La régénération de la muqueuse a été évaluée après biopsie au niveau du colon descendant chez les animaux *Nlrp6*-déficients et chez les contrôles en utilisant un endoscope miniature rigide. Le diamètre de la plaie est évalué après la biopsie à J0, J3 et J6 (n = 3).

2.5.3-Discussion

Dans cette étude, le rôle important que joue *NLRP6* dans l'auto-renouvellement de l'épithélium intestinal est mis en évidence. L'absence de *NLRP6* entraîne un défaut de cicatrisation en réponse à un traumatisme (biopsie ou lésion de colite expérimentale) peut-être dû à une absence d'activation entérocytaire de *STAT3*.¹⁸² De plus *NLRP6* est sous-régulé dans le colon inflammatoire et dans les adénomes chez la souris, ceci entraînant une augmentation de la synthèse épithéliale de molécules impliquées dans la prolifération ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la prolifération dans les lésions dysplasiques. De plus une augmentation de l'expression de facteurs paracrines qui altèrent la voie *Wnt*/bêta caténine

est également observée dans les tumeurs développées chez les souris déficientes *Nrlp6* (-/-).

En conclusion, ces résultats montrent que NRLP6 est impliqué dans la maintenance de l'intégrité de la barrière épithéliale, suggérant qu'une stimulation continue de NRLP6 pourrait représenter une stratégie thérapeutique intéressante dans la prise en charge des maladies inflammatoires intestinales et les cancers colorectaux.

PARTIE III

MALADIES INFLAMMATOIRES INTESTINALES CHRONIQUES ET CARENCE EN DONNEURS DE METHYLES

3.1-Métabolisme de la vitamine B12

3.1.1-Structure

Le terme cobalamine fait référence à une famille de composés dont la structure est montrée en Figure 10. La vitamine B12, ou cyanocobalamine, est une molécule de 1355 Da composée en deux parties : (1) un groupe planaire (noyau corrine) constitué par une structure annulaire entourant un atome de cobalt, et (2) un groupe nucléotidique qui consiste en une base, le 5,6-diméthylbenzimidazole et un ribose phosphorylé estérifié avec le 1-amino,2-propanolol (Figure 10). La vitamine B12 est appelée cyanocobalamine car lorsqu'elle a été isolée initialement à partir du foie, sa position beta était occupée par un groupement cyano. La cobalamine ne possède pas un ligand dans son cobalt en position beta. Différentes formes de vitamine B12 résultent du remplacement du cyanure par un groupement hydroxylé, adénosyl, ou méthyle ; généralement elles sont appelées les cobalamines.¹⁸³

La cobalamine est synthétisée par certains microorganismes à l'instar des bactéries ou des levures. Certaines souches de microorganismes produisent la cobalamine en excès par rapport à leur besoin et représentent ainsi une excellente source de cobalamine commerciale utilisée en pharmacologie. Les analogues de la cobalamine avec des effets cobalamine-like ou anti-cobalamine sont produits par des microbes via des interactions chimiques avec la cobalamine naturelle ou avec ses métabolites.

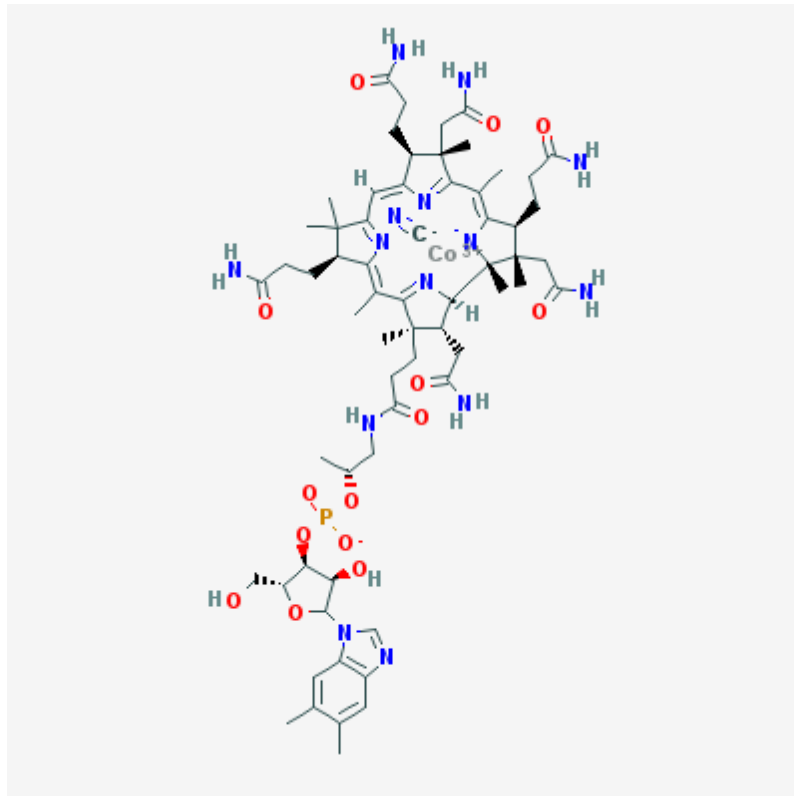


Figure 10. Structure de la vitamine B12 (C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P). Source :

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

3.1.2 Nutrition

La cobalamine est produite uniquement par des microorganismes producteurs de cobalamine et les êtres humains reçoivent la cobalamine uniquement à partir de l'alimentation.¹⁸⁴ Chez l'homme, les bactéries coliques produisent la cobalamine ; néanmoins le colon est distal par rapport au site d'absorption de la cobalamine chez l'homme (iléon). Les protéines animales sont la source majeure de la cobalamine chez les non-végétariens. Les viandes issues des organes parenchymateux (abats) sont les plus riches en cobalamine (> 10 µg de cobalamine par 100 g de poids sec). Les poissons, et le muscle strié animal, les produits laitiers, et le jaune d'oeuf contiennent 1 à 10 µg de cobalamine par 100 g de poids sec. En moyenne, un sujet occidental non-végétarien ingère entre 5 et 7 µg de cobalamine par jour, ce qui participe à l'équilibre physiologique de la balance en cobalamine. Une diététique végétarienne apporte

en moyenne entre 0,25 et 0,5 µg de cobalamine par jour. Par conséquent, la plupart des végétariens ne reçoivent pas l'apport journalier recommandé en cobalamine et sont à risque de développer une carence en cobalamine.¹⁸⁵ Les besoins journaliers en cobalamine dans les différentes catégories sont comme suite : homme, 2,4 µg/j ; femme en dehors de la grossesse, 2,4 µg/j ; femme enceinte, 2,6 µg/j ; femme allaitante, 2,8 µg/j ; sujet jeune (entre 9 et 18 ans), 1,5 à 2 µg/j.¹⁸⁶

Bien que la cobalamine soit stable au cours de la cuisson à de hautes températures, elle peut être convertie en analogues inactifs par l'acide ascorbique. La cobalamine est exceptionnellement bien conservée dans les tissus sous sa forme de coenzyme. Le contenu total en cobalamine chez l'adulte varie entre 2 et 5 mg dont 1 mg contenu dans le foie. La perte obligatoire en cobalamine est de 0,1 % par jour (1,3 µg). Trois à quatre ans sont nécessaires pour dépler les stocks en cobalamine de l'organisme lorsque l'apport en cobalamine cesse brutalement (exemple : gastrectomie).¹⁸⁷

3.1.3 Absorption

Les principales étapes de l'absorption de la vitamine B12 sont présentées dans les Figures 11 et 12. La cobalamine alimentaire est généralement sous la forme de coenzyme (5'-déoxyadénosyl cobalamine [adénosylcobalamine] et méthylcobalamine), non spécifiquement liée aux protéines. Dans l'estomac, la digestion peptique à faible pH est nécessaire pour la libération de la cobalamine à partir des protéines alimentaires.¹⁸⁷ Une fois libérée par la protéolyse, la cobalamine se lie préférentiellement à une protéine de 150-kd, la cobalamine binding protein appelée aussi R protein ou haptocorrine, au niveau de la salive et du suc gastrique et qui présente une affinité supérieure à celle du facteur intrinsèque (FI). Le complexe 'cobalamine-haptocorrine' (protéine holo-R), en même temps que l'apo-haptocorrine en excès et que le FI, traversent la seconde portion du duodénum où les protéases pancréatiques dégradent l'holo-R et l'apo-haptocorrine mais non le FI. Ceci résulte

en un transfert de la cobalamine vers le FI, une glycoprotéine de 45-kd avec une haute affinité. L'échec de la dégradation de la protéine holo-R par les protéases pancréatiques entraîne l'exclusion du FI du processus d'absorption de la cobalamine car les récepteurs du complexe 'cobalamine-FI' sont spécifiques de la cobalamine liée au FI et non de la cobalamine liée à l'haptocorrine.¹⁸⁷ Alors que l'haptocorrine se lie à la cobalamine et ses analogues, le FI se lie uniquement à la cobalamine. Le FI est produit par la cellule pariétale (oxyntique) dans le fundus et le cardia de l'estomac¹⁸⁷ et est libéré par un processus de transport vésiculaire à travers la membrane.¹⁸⁷ Le FI possède deux sites de liaison : un pour la cobalamine et un autre pour le récepteur iléal du complexe 'cobalamine-FI'. Le FI est produit largement en excès par rapport à la quantité requise pour l'absorption.¹⁸⁷ Le FI est sécrété en réponse à la présence d'aliments dans l'estomac de façon analogue à la sécrétion gastrique acide (par stimulation vagale et hormonale). Le FI se lie à la cobalamine présente dans la bile ainsi qu'à la cobalamine nouvellement ingérée après son transfert de l'haptocorrine.¹⁸⁷

L'absence de liaison entre le FI et les analogues de la cobalamine est un mécanisme d'excrétion fécale des analogues de la cobalamine permettant ainsi la réabsorption de la cobalamine biliaire uniquement. Le complexe stable 'cobalamine-FI' traverse le jéjunum vers l'iléon où il est fixé sur des récepteurs membranaires spécifiques du complexe 'cobalamine-FI', situés dans les microvillosités des entérocytes de l'iléon.¹⁸⁷

Le récepteur fonctionnel du complexe 'cobalamine-FI' est composé de deux protéines appelées collectivement cubam —composée de la cubiline (codée par le gène CUBN, chromosome 6) et amnionless (codée par le gène AMN, chromosome 7)— qui est essentiel au transport du complexe 'cobalamine-FI' à partir de la lumière intestinale vers l'intérieur de l'entérocyte. Le récepteur cubam nécessite le Ca²⁺ pour sa liaison avec un pH supérieur à 5,4. Il ne se lie pas au FI, à la cobalamine seule, ou au complexe 'cobalamine-haptocorrine' mais se lie uniquement et de façon spécifique au complexe 'cobalamine-FI'. L'iléon humain

contient assez de récepteurs cubam pour lier jusqu'à 1 mg de cobalamine intégrée dans le complexe 'cobalamine-FI' et représente donc l'étape limitante pour l'absorption de la cobalamine.¹⁸⁷ En outre, le récepteur cubam participe à l'absorption de plusieurs protéines porteuses de vitamines (complexe vitamine B12-transcobalamine, protéine de liaison de la vitamine D, retinol binding protein) ainsi que celle d'autres protéines transporteuses (albumine, myoglobine, hémoglobine, lactoferrine, transferrine), d'hormones (exemple : insuline), d'enzymes, de drogues, et de toxines (exemple : aminoglycosides).¹⁸⁸

Les événements qui suivent la liaison du complexe 'cobalamine-FI' au récepteur cubam dans l'entérocyte n'ont pas été complètement élucidés. La transcobalamine II (TC II) est secrétée de façon unidirectionnelle à travers la membrane basolatérale et la cobalamine se fixe sur la TC II au niveau de la surface basale de l'entérocyte iléal.¹⁸⁷ Le complexe 'cobalamine-FI' subit une transcytose à partir du pôle apical en direction du pôle basal ; durant cette transcytose le transfert de la TC II est accompli.¹⁸⁷ Après un délai de 3 à 5 heures, la cobalamine apparaît dans le sang portal avec une proportion prédominante (> 90 %) liée à la TC II. Bien qu'une partie de la cobalamine soit convertie en adénosylcobalamine dans l'entérocyte, la majorité de la cobalamine est destinée au sang portal et atteint un pic de concentration après 8 heures environ.¹⁸⁷ A forte dose, la cobalamine peut diffuser de façon passive à travers les muqueuses buccale, gastrique, jéjunale et moins de 1 % de la dose ingérée peut donc apparaître dans la circulation après quelques minutes.

3.1.4 Transport

Les principales étapes du transport de la vitamine B12 sont présentées dans les Figures 11 et 12. Plus de 90 % de la cobalamine récemment ingérée ou injectée est liée à la TC II, qui est une protéine de transport spécifique permettant de délivrer la cobalamine aux différents tissus. La TC II, un polypeptide de 38-kd synthétisé dans plusieurs tissus, fixe la cobalamine avec

une haute affinité (molarité 1 : 1).¹⁸⁷ Contrairement au FI, la TC II —tout comme l'haptocorrine— peut fixer une variété d'analogues de la cobalamine. Néanmoins, la TC II ne fait pas partie de la famille des protéines-R et diffère immunologiquement de deux autres protéines-R plasmatiques, les TC I et TC III. Le complexe 'cobalamine-TC II' est éliminé si rapidement de la circulation (demi-vie de 6 à 9 minutes) que 98 % de la TC II plasmatique est non saturée.¹⁸⁷ Le complexe 'cobalamine-TC II' est rapidement lié à des récepteurs protéiques de surface pour la TC II, présents sur plusieurs cellules.¹⁸⁷ La haute affinité de la liaison du complexe 'cobalamine-TC II' avec les récepteurs TC II est spécifique pour holo- et apo-TC II. Une fois fixé sur les récepteurs de la TC II, le complexe 'cobalamine-TC II' est internalisé par un mécanisme d'endocytose.¹⁸⁷ A faible pH, au sein des lysosomes, la TC II se dissocie de la cobalamine. La TC II est par la suite dégradée et la cobalamine réduite et convertie en coenzyme. L'importance de la fonction de transport de la TC II est soulignée par le fait qu'un déficit en TC II entraîne un déficit cellulaire grave en cobalamine.¹⁸⁷ La protéine TC II peut aussi être synthétisée par une variété de cellules incluant les cellules rénales, les entérocytes et les hépatocytes. La protéine TC II agit comme une protéine de la phase aiguë de l'inflammation et son taux augmente au cours des conditions inflammatoires ou infectieuses.¹⁸⁹

La cobalamine n'est pas retrouvée sous forme libre dans le plasma. Dix à 30 % de la cobalamine plasmatique est liée à la TC II ; la majeure partie de la cobalamine plasmatique étant liée à une autre protéine-R, la TC I. La TC I n'est pas une protéine de transport et la cobalamine liée à la TC I présente une faible clairance avec une demi-vie de 9 à 12 jours. Malgré le fait que la TC I fixe 75 % de la cobalamine plasmatique, approximativement 50 % de la TC I totale est sous forme apo-.

Le déficit héréditaire en TC I n'a pas de conséquence clinique apparente.¹⁸⁷ La TC I peut représenter la forme de stockage plasmatique de la cobalamine, car celle-ci représente moins

de 0,5 % de la capture cellulaire totale de la cobalamine plasmatique. Les TC I et III sont retrouvées dans les granules secondaires des polynucléaires matures.¹⁸⁷ La TC III paraît présenter des fonctions de transport, car elle est éliminée du plasma après un délai de 3 minutes et exclusivement par les récepteurs asialoglycoprotéines hépatiques, un mécanisme commun à une variété d'asialoglycoprotéines dont le groupement terminal beta-galactosyl terminale est intact. La TC III fonctionnelle se lie à une variété d'analogues de la cobalamine et est rapidement éliminée par le foie dans le flux d'excrétion biliaire. La majeure partie de la TC III sérique est libérée à partir des granulocytes au cours de la coagulation in vitro. Les haptocorrines (TC I et III) peuvent être libérées à partir des granulocytes, des glandes salivaires, du foie, ou à partir des autres tissus de l'organisme. L'élévation des taux de TC I et de TC III est observée au cours des syndromes myéloprolifératifs.

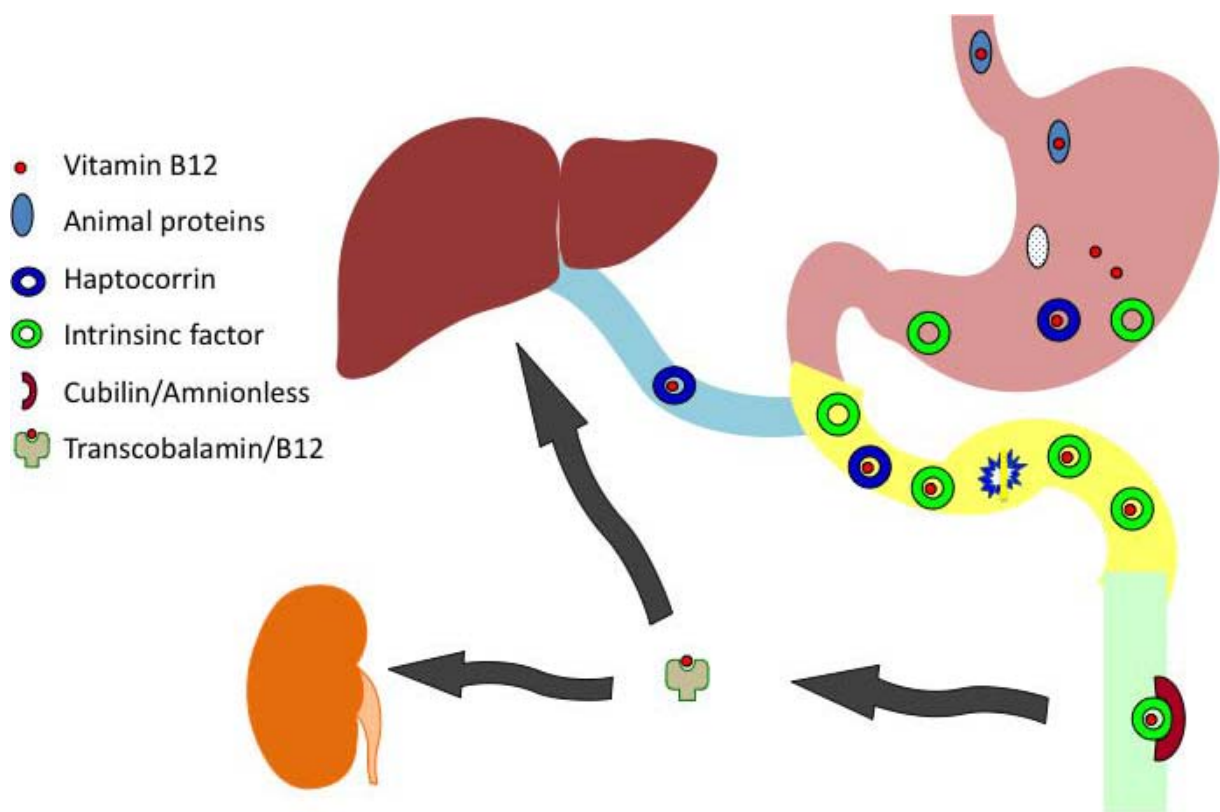


Figure 11. Vue d'ensemble sur le transport et l'absorption de la vitamine B12.

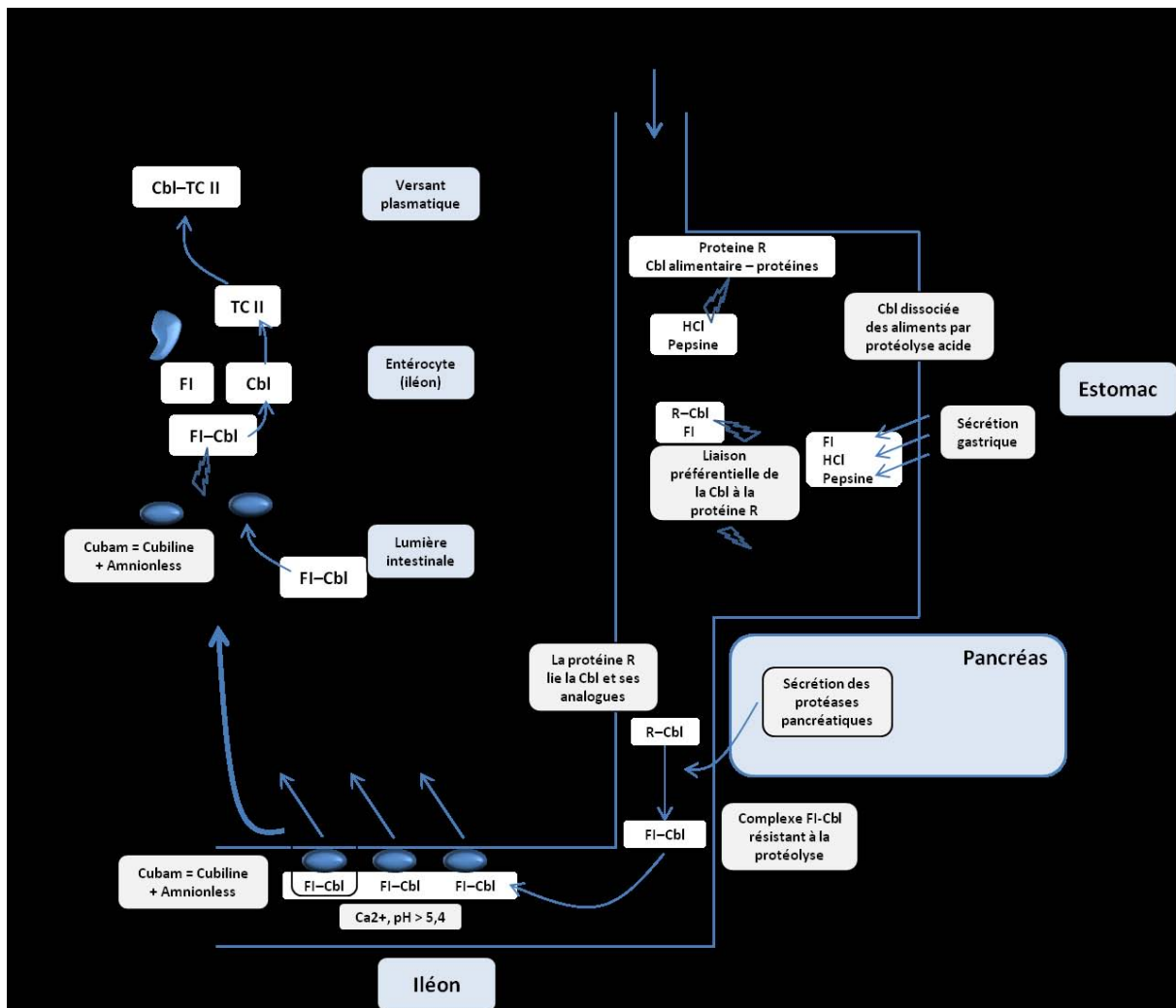


Figure 12. Absorption et transport de la vitamine B12 chez l'homme. R : haptocorrine (protéine R) ; Cbl : cobalamine ; FI : facteur intrinsèque ; TC II : transcobalamine II ; HCl : sécrétion gastrique acide.

3.1.5 Processing cellulaire de la cobalamine

Après l'endocytose médiée par la TC II dans le lysosome, la libération de la cobalamine par la dégradation lysosomale de la TC II est une étape obligatoire pour le métabolisme intracellulaire de la cobalamine. Après son transport par le lysosome dans le cytoplasme par un système de transport spécifique¹⁸⁷, plus de 95 % de la cobalamine intracellulaire est liée à deux enzymes intracellulaires : la méthylmalonyl-CoA mutase et la méthionine synthase.¹⁸⁷

La cob(III)alamine, la forme la plus oxydée de la cobalamine doit être convertie en cob(II)alamine et en cob(I)alamine par deux reductases séquentiellement.

Dans la mitochondrie, la cob(I)alamine est par la suite convertie sous sa forme coenzyme, l'adénylcobalamine, qui agit comme une coenzyme. L'enzyme méthylmalonyl-CoA mutase, en présence de l'adénylcobalamine convertit le méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA, convertissant ainsi les produits du métabolisme du propionate (c.-à-d. le méthylmalonyl-CoA) en produits métaboliques faciles à utiliser. Dans le cytoplasme, la cobalamine, sous la forme de méthylcobalamine fonctionne comme une coenzyme dans la réaction impliquant la méthionine synthase, qui catalyse le transfert d'un groupement méthyl de la méthylcobalamine vers l'homocystéine pour former la méthionine.¹⁸⁷ Dans ce processus, la méthylcobalamine est convertie en cob(I)alamine. Le groupement méthyl du 5-MTHF (5-méthyl-H4PteGlu, 5-méthyltétrahydrofolate) est fourni à la cob(I)alamine afin de régénérer la méthylcobalamine et le 5-MTHF est converti en tétrahydrofolate. Les folates et la cobalamine sont donc tous deux nécessaires pour le métabolisme des monocarbone. Après la formation de la méthionine, celle-ci peut être adénylée en S-adényl-méthionine qui peut à son tour donner son groupement méthyl dans une série de réactions biologiques de méthylation impliquant plus de 80 protéines, des phospholipides, des neurotransmetteurs, l'ARN, et l'ADN. La méthionine synthase catalyse par ailleurs la conversion de la S-adénylméthionine en S-adényl-homocystéine, processus au cours duquel le groupement méthyl de la S-adényl-méthionine peut aussi servir à la reméthylation de la cob(I)alamine. Il existe un régulateur redox, la méthionine synthase réductase qui restaure l'activité enzymatique en présence de S-adényl-méthionine et de NADPH.¹⁹⁰ Cette enzyme a un intérêt clinique car les mères présentant à la fois un polymorphisme de la méthionine synthase réductase (MTRR A66G) en association à un polymorphisme de la MTHFR C677T, sont à haut risque d'avoir des enfants avec un syndrome de Down.¹⁹¹ L'importance physiologique

des deux rôles de cofacteurs des deux formes de la cobalamine adénosylcobalamine et méthylcobalamine pour la méthylmalonyl-CoA mutase et la méthionine synthase, respectivement— est représentée par le fait que les produits de ces deux réactions enzymatiques sont critiques pour la biosynthèse de l'ADN, de l'ARN, et des protéines (Figure 13). La méthionine synthase est une protéine modulaire qui comporte quatre régions distinctes et séparées pour la liaison à l'homocystéine, au 5-MTHF, au groupement prosthétique de la cobalamine, et à la S-adénosyl-méthionine.¹⁸⁷ Ceci explique comment l'enzyme joue un rôle central dans la catalyse du transfert du groupement méthyl de la méthylcobalamine vers l'homocystéine, permettant la fabrication de la cob(I)alamine et de la méthionine ; par la suite le cofacteur libre, la cob(I)alamine, est reméthylé par le 5-MTHF, complétant ainsi le cycle. La réabsorption rénale de la cobalamine est mal élucidée. Une protéine membranaire appelée mégaline, qui interagit avec la cubiline et qui est retrouvée dans les cellules épithéliales du tube contourné proximal, fonctionne comme un récepteur multiligand pour une variété de molécules.¹⁹² Par ailleurs, la mégaline se lie de façon spécifique et permet de médier l'endocytose du complexe 'cobalamine-TC II' dans le tube contourné proximal.^{187,188}

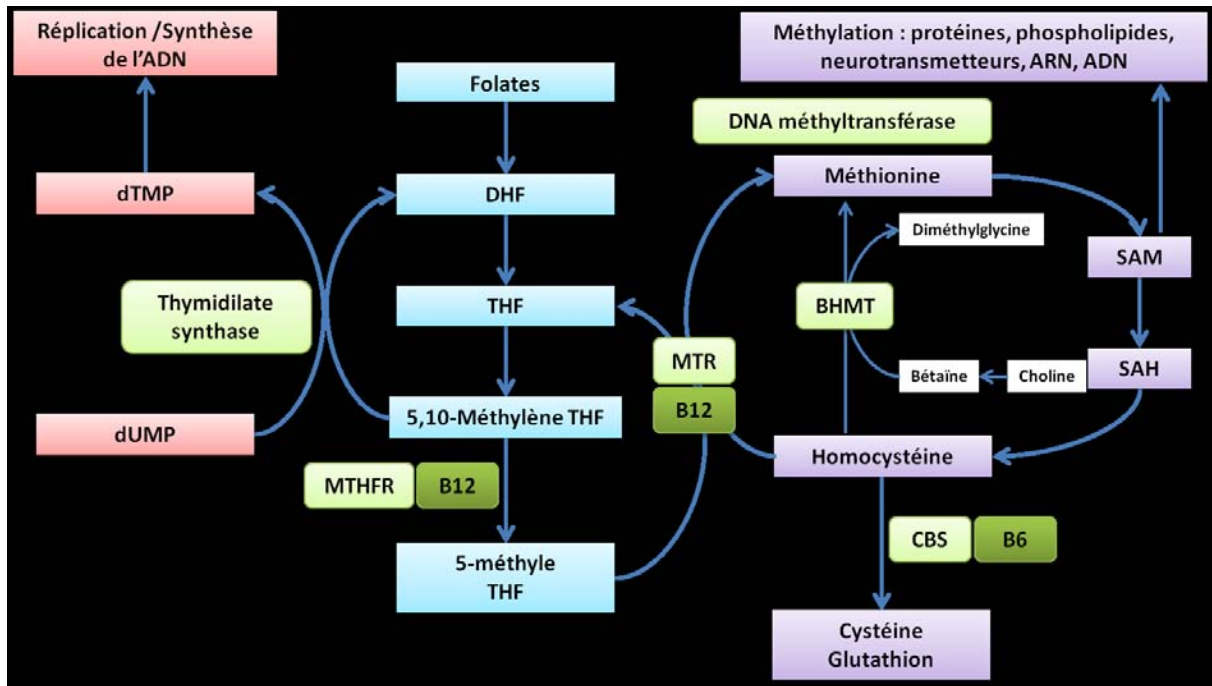


Figure 13. Vitamines du groupe B, métabolisme des monocarbone, méthylation et réplication de l'ADN. DHF : dihydrofolate ; THF : tétrahydrofolate ; MTR : méthionine synthase ; MTHFR : méthylène tétrahydrofolate reductase ; CBS : cystathionine β -synthase ; SAM ; S-adenosyl- méthionine ; SAH : S-adenosyl-homocystéine ; B12 : vitamine B12 ; B6 : vitamine B6 ; dUMP : déoxyuridine monophosphate ; dTMP : déoxythymidine monophosphate.

3.2- Métabolisme des folates

3.2.1 Nutrition

Les folates, largement distribués dans la nature sous forme réduite ou polyglutamée, sont synthétisés par les microorganismes et les plantes. Les légumes à feuilles (épinards, laitue, le brocoli), les haricots, les fruits (par exemple, bananes, melons, citrons), la levure, les champignons, et des protéines animales (par exemple, foie, reins) sont de riches sources d'acide folique.¹⁸⁷ Les folates sont dégradés au cours d'une cuisson dépassant 15 min ; une dégradation pouvant atteindre une proportion de 95 %.¹⁸⁷ L'apport journalier recommandé en folates est de 400 µg/jour chez l'homme et la femme en dehors de la grossesse, de 600 µg/j chez la femme enceinte, de 500 µg/j chez la femme allaitante, et entre 300 et 400 µg/j chez le sujet jeune (entre 9 et 18 ans).¹⁸⁶ Une nutrition occidentale équilibrée apporte des quantités adéquates en folates. A l'inverse l'apport en folates dans certains pays en voie de développement peut être insuffisant.^{187,193,194}

3.2.2-Absorption

Les folates contenus dans l'alimentation, qui sont sous forme de ptéroylpolyglutamate (PteGlu_n), sont moins bien absorbés que le ptéroylmonoglutamate (PteGlu ; acide folique) (Figure 14).¹⁸⁷ Bien que les folates de certains aliments (chou, laitue, orange) sont moins bien absorbés, la plupart des autres folates apportés par l'alimentation ont une bonne biodisponibilité.¹⁸⁷ Les ptéroylpolyglutamates doivent être hydrolysés en dérivés de ptéroylmonoglutamate avant leur absorption par l'enzyme ptéroylpolyglutamate hydrolase, une enzyme présente sur la bordure en brosse des entérocytes.¹⁸⁷ Cette enzyme a une activité maximale à un pH de 5,5 en présence du zinc. Au niveau de la bordure en brosse intestinale, le polyglutamate luminal interagit avec des protéines de type Reduced folate carriers (RFCs).^{195,196} L'expression du gène RCF, qui code pour une protéine de 85-kd, est régulé au

cours du développement avec une capacité d'absorption maximale pour le 5-méthyl-H4PteGlu dans les entérocytes matures en comparaison aux cellules cryptiques en cours de prolifération.¹⁸⁷ Chez la souris, l'expression du gène RCF peut être stimulée en cas de carence en folates, ce qui a pour effet d'augmenter la capacité d'absorption intestinale des folates.¹⁹⁷ L'augmentation simultanée de l'activité de la ptéroylpolyglutamate hydrolase¹⁹⁸ et de l'expression des récepteurs RCF de la surface cellulaire^{197,199} permet aux entérocytes luminaux déficients en folates d'augmenter leur absorption en folates afin de maintenir l'intégrité cellulaire.¹⁹⁷ La membrane basolatérale possède un système de transport des folates vers le sang portal.¹⁸⁷

L'ingestion du lait maternel humain, qui contient des protéines spécifiques pour le transport des folates, folate binding proteins (FBP), régule la biodisponibilité des folates chez le nouveau-né.¹⁸⁷ Bien que le mécanisme précis de cette régulation reste obscure, celle-ci peut impliquer l'interaction avec la mégaline qui peut lier et médier la capture cellulaire par l'entérocyte des FBP solubles du lait maternel qui contiennent les folates.²⁰⁰ La diffusion passive de l'acide folique (aka ptéroylglutamate, PteGlu) est probablement le mécanisme principal d'absorption intestinale des folates à concentration élevée.¹⁸⁷ L'intestin grêle a une grande capacité d'absorption des folates, avec un pic plasmatique de folates atteint en 1 à 2 heures après l'administration orale.¹⁸⁷ Alors que l'acide folique pharmacologique est directement absorbé et ne subit aucune modification lors du passage dans le sang portal, les folates alimentaires (PteGlu) subissent une hydrolyse avant le transport dans l'entérocyte et sont réduits en H4PteGlu (tétrahydrofolate) puis méthylés en 5-méthyl-H4PteGlu (5-MTHF) avant leur libération dans le plasma.¹⁸⁷

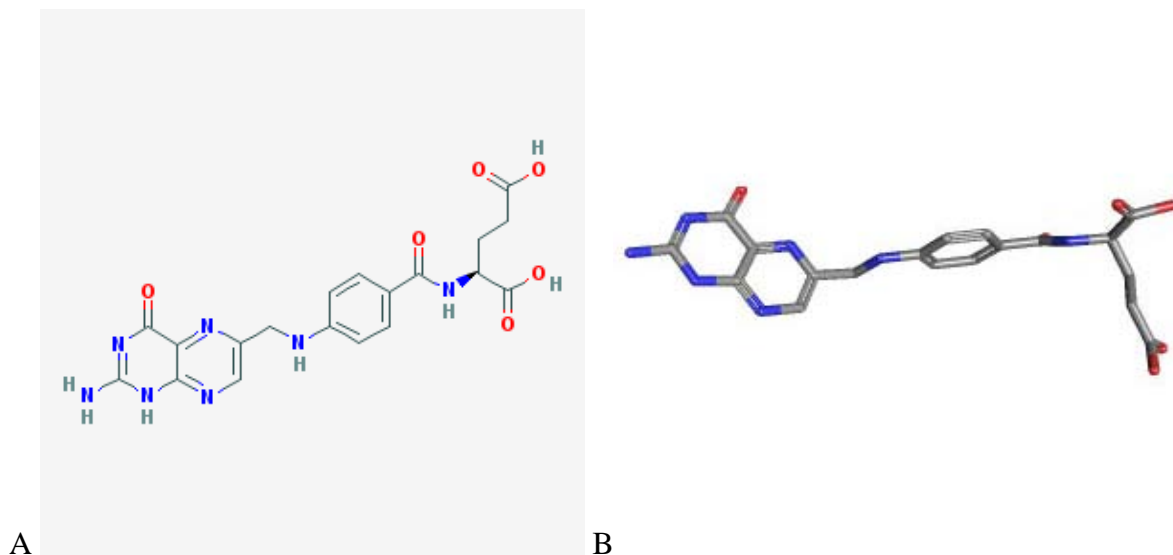


Figure 14. Structures en 2D (panel A) et en 3D (panel B) de l'acide folique (C₁₉H₁₉N₇O₆).

Source : <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

3.2.3-Transport plasmatique et cycle entérohépatique

Le taux plasmatique normal de folate est maintenu par l'apport alimentaire en folates ainsi qu'un cycle entérohépatique efficace et représentant environ 90 µg/j en folates.¹⁸⁷ Les folates sont rapidement éliminés du plasma (jusqu'à 95 % en 3 minutes) par les tissus, incluant le foie, par l'intermédiaire d'un récepteur RCF.¹⁹⁵ Le drainage biliaire entraîne une chute majeure du taux sérique de folates (à environ 30 % du taux basal après 6 heures), et une interruption brutale de l'apport en folates dans l'alimentation entraîne une chute du taux sérique de folate après 3 semaines environ.¹⁸⁷ Dans le plasma, un tiers des folates est sous forme libre et deux tiers sont faiblement liés aux protéines sériques. Une faible proportion des folates sériques est liée de façon hautement spécifique à une protéine FBP de 40-kd.²⁰¹ A l'inverse de la cobalamine, il n'existe pas de transporteur sérique spécifique des folates qui augmente leur capture cellulaire.¹⁸⁷

3.2.4 Capture cellulaire de folates

Le transport des folates implique la translocation du ligand dans la cellule à partir du compartiment extracellulaire (mécanismes de capture cellulaire) ou à travers les barrières cellulaires d'un compartiment vers l'autre (mécanismes transcellulaires).^{187,201} Deux composants distincts sont impliqués dans le transport cellulaire des folates. Le RFC est un système de faible affinité et de haute capacité qui permet de médier la capture des folates par une variété de cellules.¹⁹⁵ Le transport des folates vers la cellule est médié aussi par une protéine membranaire de 44-kd appelée folate receptors (FR) (en anglais) qui lie les folates physiologiques (5-MTHF) avec une haute affinité.²⁰¹ Les voies d'entrée des folates et des antagonistes des folates diffèrent selon les cellules et dépendent de l'efficacité relative des mécanismes médiés par les FR et les RFC ainsi que des concentrations intra- et extracellulaires des folates et de leurs antagonistes.¹⁸⁷ Le transporteur ABCB1 (ATP-binding cassette sub-family B member 1), appelé aussi glycoprotéine-P, MDR1, et PGY1 a été impliqué dans le transport et le maintien de l'homéostasie des folates.²⁰² Le transporteur ABCB1 est un transporteur bien caractérisé et fait parti de la famille des transporteurs ABC qui permettent le passage d'une variété de substrats à travers la membrane cellulaire.²⁰³ La protéine ABCB1 est exprimée dans l'épithélium intestinal, les hépatocytes, le tube contourné proximal du rein, les glandes surrénales, et les cellules endothéliales. Il est intéressant de souligner que la protéine ABCB1 intervient dans le transport intracellulaire du méthotrexate à côté d'autres xénobiotiques.^{204,205,206,207,208} Les membres de la famille des protéines ABC sont impliqués dans la résistance aux drogues.

3.2.4.1-Les récepteurs des folates (Folate receptors, FR-alpha, FR-beta, FR-gamma)

Les FRs permettent la capture du 5-MTHF par les cellules normales ou malignes.²⁰¹

Parmi les trois isoformes humaines de FR, FR-alpha et FR-beta sont attachés à la surface cellulaire par un ancrage membranaire, le glycosyl-phosphatidylinositol alors que la troisième isoforme (FR-gamma) est sécrétée de façon constitutive.¹⁸⁷ Le FR transfère le folate en intracellulaire par endocytose. Le FR-alpha est exprimé dans la plupart des cellules épithéliales normales et malignes. L'expression du FR-beta dans les tissus normaux est limitée au placenta et aux cellules hématopoïétiques. Les systèmes de transport FR et RFC ne communiquent pas mutuellement et sont tous deux efficaces pour le transport du méthotrexate.¹⁸⁷ Lorsque les récepteurs FR sont exprimés en quantité suffisante, ils permettent le transport simultané du méthotrexate et du 5-MTHF avec des vitesses comparables en comparaison aux cellules exprimant les récepteurs RFC. La production des FR est régulée en fonction des concentrations intra- et extracellulaires des folates via des mécanismes de régulation de la transcription, de la traduction, ou en post-traduction. L'inhibition posttraductionnelle de la production des récepteurs FR (ou FBPs) chez le rat au cours du déficit en folate s'effectue via une protéolyse préférentielle de l'apo-FR par une métalloprotéinase appelée meprine.²⁰⁹ Chez l'homme, dans un modèle de cancer du col de l'utérus, la stimulation de la traduction du FR-alpha au cours du déficit en folate est médiée par l'homocystéine.^{210,211}

3.2.4.2-Les récepteurs RFC (Reduced Folate Carriers)

Le second mécanisme de capture cellulaire des folates implique un processus de transport pH- et énergie-dépendant qui transporte les folates réduits.¹⁹⁵ Le gène RFC code pour une protéine de 58-kd et ressemble au transporteur de glucose des mammifères (GLUT1), qui est un membre de la famille des transporteurs membranaires à 12 domaines transmembranaires.^{212,213} L'acquisition d'un déficit en transport du méthotrexate dans certaines cellules peut résulter d'une mutation inactivatrice des allèles du gène RFC.¹⁸⁷

3.2.4.3-Le système de transport 'Proton-coupled folate transporter' (PCFT)

Jusque tout récemment, le transport des folates dans la cellule était rattaché à la fonction de deux récepteurs que sont les récepteurs RFC et FR.²¹⁴ Récemment, un nouveau récepteur a été cloné : le proton-coupled folate transporter (PCFT) et a été impliqué dans l'absorption des folates, notamment dans un environnement à faible pH.²¹⁴ Après l'entrée des folates dans la cellule par endocytose, le transporteur PCFT aide à exporter les folates du milieu acidifié de l'endosome vers le cytoplasme des cellules ainsi que vers le liquide céphalo-rachidien.^{214,215}

3.2.5-Rétention cellulaire et excrétion des folates

La polyglutamation des folates est le mécanisme majeur de rétention intracellulaire des folates.¹⁸⁷ Par conséquent, les cellules déficitaires en folypolyglutamate synthase sont résistantes aux antagonistes des folates, qui ne peuvent être polyglutamatés et retenus dans la cellule. Dans les érythrocytes humains, les folates sont accumulés au cours des stades précoces dans la moelle osseuse par les récepteurs FR. Lors de leur maturation, plus de 90 % des molécules de PteGlun interagissent avec l'hémoglobine permettant ainsi la rétention des folates en intracellulaire.¹⁸⁷

Le turn-over de folates et leur catabolisme peut être accéléré par l'activité de la ferritine à chaîne lourde²¹⁶ qui limite la quantité importée de folates monoglutamate avant la polyglutamation.¹⁸⁷

Après filtration glomérulaire, les folates luminaux se lient aux récepteurs FR de la bordure en brosse des membranes des cellules rénales tubulaires proximales et sont internalisés par endocytose. Dans les vésicules d'endocytose, le faible pH favorise la dissociation des folates et leur libération à travers la membrane basolatérale vers la circulation sanguine avec un recyclage de l'apo-FR vers la bordure en brosse.¹⁸⁷ La cubiline et la mégaline participant

toutes les deux à la captation et à l'endocytose des folates liés au récepteurs FBP via le tube contourné proximal du rein.²⁰⁰

3.3-Métabolisme intracellulaire et interaction entre cobalamine et folates.

Les ptéroylpolyglutamates sont des substrats naturels pour plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des monocarbones. Les ptéroylmonoglutamates doivent être polyglutamés par la folypolyglutamate synthase avant d'être intégrés dans le métabolisme des monocarbones.¹⁸⁷ Le tétrahydroptéroylglutamate (H4PteGlu) est le substrat physiologique préférentiel pour la folypolyglutamate synthase et la forme polyglutamée (H4PteGlu_n) joue un rôle central dans le métabolisme des monocarbones.¹⁸⁷ Les facteurs qui limitent l'apport du H4PteGlu ou qui régulent la folypolyglutamate synthase influencent la polyglutamation et la rétention intracellulaire des folates. La forme polyglutamée H4PteGlu_n peut être convertie en formate sous la forme de 10-formyl-H4PteGlu_n (utilisé dans la synthèse de novo des purines) et en formaldéhyde sous la forme de 5,10-méthylène-H4PteGlu_n (utilisé dans la biosynthèse du thymidilate).¹⁸⁷

Afin de comprendre les fonctions des coenzymes des folates, il est important de souligner d'emblée que le 5,10-méthylène-H4PteGlu_n peut être utilisé dans le cycle du thymidilate par la thymidilate synthase pour la synthèse de la thymidine et de l'ADN ou dans le cycle de méthylation après sa conversion en 5-méthyl-H4PteGlu_n, qui par l'intermédiaire de la méthionine synthase entraîne la formation de la méthionine et du H4PteGlu_n. L'acide folique (ptéroylmonogluamate, PteGlu) n'est pas une forme biologiquement active des folates.

Lorsque l'acide folique est apporté sous forme thérapeutique, il nécessite une réduction en H4PteGlu par la dihydrofolate réductase —une enzyme de 20-kd— dans une réaction en deux temps (PteGlu en H2PteGlu puis en H4PteGlu). La forme majoritaire de folate transportée dans la cellule par les récepteurs FR et RFC est le 5-méthyl-H4PteGlu. Les données suggèrent

que le métabolisme des monocarbone médié par les folates est compartimentalisé dans les organelles intracellulaires.^{187,217} L'enzyme thymidilate synthase catalyse le transfert de la forme formaldéhyde 5,10-méthylène-H4PteGlu vers la position 5 du déoxyuridylate. Dans ce processus, le 5,10-méthylène-H4PteGlu est par ailleurs réduit en dihydrofolate, qui inhibe la 5,10-méthylène-H4PteGlu reductase (MTHFR). L'inhibition par la méthionine —produit de la méthionine synthase— de la méthionine synthase elle-même, illustre que la modulation de la MTHFR par les niveaux du dihydrofolate et de la méthionine peut déterminer le degré de canalisation du 5,10-méthylène-H4PteGlu vers le cycle de la méthylation ou du thymidilate.¹⁸⁷

Le métabolisme des folates et des enzymes folate-dépendantes est compartimentalisé dans la matrice mitochondriale et dans le cytoplasme. La plupart des unités monocarbone, sous forme de formate, sont dérivées des mitochondries et sont utilisées dans la synthèse du formate, de la glycine, et du f-met-tRNA (ARNt portant l'acide aminé méthionine formylé, 1^{er} acide aminé de la chaîne de protéines).¹⁸⁷

Dans les conditions normales, le 5,10-méthylène-H4PteGlu est converti par la méthionine synthase dépendante de la cobalamine en H4PteGlu qui est à son tour polyglutamaté pour intégrer le métabolisme des monocarbone. Avec le déficit en cobalamine, la méthionine synthase est inactive et entraîne une accumulation de 5-méthyl-H4PteGlu, qui n'est pas un bon substrat pour la folypolyglutamate synthase. Sans alternative métabolique, le 5-méthyl-H4PteGlu piégé fuit hors de la cellule, entraînant un déficit progressif en folates polyglutamatés intracellulaires. L'hypothèse de la carence en formate, ou « formate starvation hypothesis », focalise sur l'importance du formate (sous la forme de 10-formyle-H4PteGlu) et du précurseur du formate —la méthionine— qui sont diminués aussi lorsque la méthionine synthase est inhibée par le déficit en cobalamine. Lorsque la méthionine intracellulaire est en

excès, son groupement méthyl est oxydé en formate qui peut être utilisé pour générer les 5- et le 10-formyle-H4PteGlu.¹⁸⁷

3.4-Métabolisme de l'homocystéine

3.4.1-Introduction

En 1969, McCully et al. rapportent le cas d'un enfant souffrant d'homocystéinurie, de cystathioninurie, et de méthylmalonurie secondaires à une anomalie du métabolisme de la cobalamine, qui présentait des lésions artérielles ressemblant particulièrement à celles observées chez les patients souffrant de déficit en cystathionine- β -synthase (CBS).²¹⁸ Cette observation a permis de proposer l'hypothèse que des taux plasmatiques élevés d'homocystéine, retrouvée chez les patients avec une homocystéinurie, étaient responsables de l'apparition des lésions vasculaires précoces. En 1976, Wilcken et al. rapportent pour la première fois que les concentrations du disulfure mixte 'cystéine-homocystéine' était plus élevées chez les patients avec une coronaropathie en comparaison des sujets contrôles après un test de charge en méthionine.²¹⁹ Cette étude princeps a pavé la voie à plusieurs travaux depuis les années 1990 pour culminer en une méta-analyse en 1995.²²⁰ Cette méta-analyse a identifié 27 études ayant inclus 4000 patients avec une atteinte vasculaire sténosante (coronaropathie, pathologies vasculaire périphérique et cérébrovasculaire) et 4000 sujets contrôles et a démontré que l'homocystéine était un facteur de risque indépendant de ces pathologies vasculaires occlusives.²²⁰ L'hyperhomocystéinémie a par ailleurs été impliquée dans le défaut de fermeture du tube neural²²¹, dans la maladie d'Alzheimer, la démence et la perte de la fonction cognitive.^{222,223,224,225} Néanmoins, il est important de souligner que la relation entre l'hyperhomocystéinémie et les diverses affections suscitées est basée sur des données épidémiologiques sans que le lien de causalité ne soit formellement établi.

L'homocystéine est un acide aminé soufré dont le métabolisme se situe entre deux voies : (i) la voie de la méthylation en méthionine qui nécessite les folates et la vitamine B12 (ou la bétaine dans une réaction alternative) et (ii) la voie de la transsulfuration en cystathionine qui nécessite le pyridoxine 5'-phosphate. Ces deux voies sont coordonnées par la S-adénosylméthionine (SAM) qui agit comme un inhibiteur allostérique de la méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) et comme un activateur de la cystathionine- β -synthase (CBS).²²⁶ L'hyperhomocystéinémie est associée à une augmentation du risque vasculaire et survient lors d'une perturbation du métabolisme de l'homocystéine. L'hyperhomocystéinémie sévère peut être causée par de rares déficits génétiques des enzymes CBS ou MTHFR ou bien des enzymes impliquées dans la synthèse de la méthyle-B12 et la méthylation de l'homocystéine.²²⁶ L'hyperhomocystéinémie modérée peut être observée en cas d'altération de la voie de la méthylation (déficit en vitamine B12 ou en folate ou bien thermolabilité de l'enzyme MTHFR). L'hyperhomocystéinémie faisant suite à un test de charge en méthionine peut être en rapport avec un génotype hétérozygote pour la CBS ou à un déficit en vitamine B6.

3.4.2-Les voies du métabolisme de l'homocystéine

L'homocystéine est un acide aminé soufré dont le métabolisme se situe à l'intersection de deux voies métaboliques : la reméthylation et la transsulfuration (Figure 15).²¹ Au cours de la reméthylation, l'homocystéine acquiert un groupement méthyl à partir du N-5-méthyltétrahydrofolate ou de la bétaine pour former la méthionine. La réaction avec le N-5-méthyltétrahydrofolate a lieu dans tous les tissus et dépend de la vitamine B12, alors que la réaction avec la bétaine a lieu essentiellement dans le foie et ne dépend pas de la vitamine B12.²²⁶ Une proportion considérable de méthionine est par la suite activée par l'ATP pour former la S-adénosylméthionine (SAM). La SAM sert principalement de donneur de méthyles

universel pour une variété d'accepteurs. La S-adénosyl-L-homocystéine (SAH), le produit de ces réactions de méthylation, est par la suite hydrolysée afin de régénérer l'homocystéine qui devient de nouveau disponible pour un nouveau cycle de transfert du groupement méthyl. Il est important de noter que cette hydrolyse est une réaction réversible qui favorise la synthèse de la SAH et que des concentrations intracellulaires élevées de ce métabolite accompagnent souvent toutes les formes d'hyperhomocystéinémie.²²⁶

Dans la voie de la transsulfuration, l'homocystéine s'associe à la sérine pour former la cystathionine au cours d'une réaction irréversible catalysée par une enzyme contenant du pyridoxine 5'-phosphate (PLP), la CBS. La cystathionine est hydrolysée par une seconde enzyme contenant du PLP, la γ -cystathioninase, pour former la cystéine et le α -kétobutyrate. L'excès de cystéine est oxydé en taurine ou en sulfate inorganique ou bien est excrété dans les urines. Ainsi, outre la synthèse de la cystéine, la voie de la transsulfuration catabolise efficacement l'excès d'homocystéine non nécessaire au transfert du groupement méthyl.

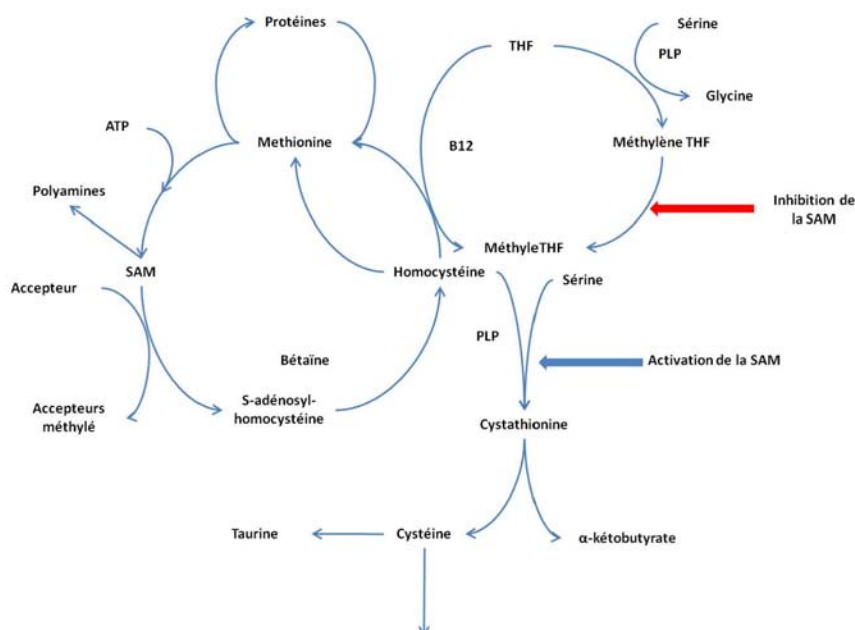


Figure 15. Métabolisme de l'homocystéine chez l'homme et l'animal (adapté à partir de :

Selhub J. ²²⁶ THF : tétrahydrofolate ; PLP :

Pyridoxine 5'-phosphate ; SAM : S-adénosyl-méthionine ; B12 : vitamine B12.

3.4.3-Régulation nutritionnelle du métabolisme de l'homocystéine

Plusieurs études sur la régulation du métabolisme de l'homocystéine ont démontré que l'utilisation des molécules d'homocystéine par les voies de transsulfuration et de reméthylation est régulée par des facteurs nutritionnels.²²⁶ Deux études ont démontré que lorsque l'apport en groupement méthyl labile (méthionine et choline) est modifié, la synthèse de novo de la méthionine était affectée.^{227,228} Lorsqu'une alimentation carencée en méthionine était administrée, l'homocystéine est déviée vers la voie de la reméthylation. A l'inverse, lorsque l'alimentation administrée est riche en méthionine, le recyclage de l'homocystéine en méthionine diminue. Des adaptations similaires ont été retrouvées chez le rat.²²⁹

La capacité de l'organisme à discriminer entre les voies de la reméthylation et de la transsulfuration afin de s'adapter aux variations d'apport de la méthionine dans l'alimentation implique l'existence d'une régulation et d'une coordination entre ces deux voies.²²⁶ Les données expérimentales disponibles suggèrent que cette coordination est réalisée par deux mécanismes. Le premier mécanisme réside dans la capacité de la SAM d'agir comme un inhibiteur allostérique de la MTHFR et comme un activateur de la CBS (Figure 15).²³⁰ Le second mécanisme par lequel la reméthylation et la transsulfuration sont coordonnées consiste en la régulation intracellulaire de la SAM. Dans le foie, la synthèse de la SAM est catalysée par deux enzymes spécifiques de cet organe.²³¹ La première enzyme, un tétramère de haut poids moléculaire, présente une haute affinité pour la méthionine et fonctionne dans des conditions physiologiques. La seconde enzyme est un dimère de bas poids moléculaire avec une faible affinité pour la méthionine et fonctionne dans des conditions d'apport élevé en méthionine.²²⁶ Ainsi, les modifications de la concentration intracellulaire en méthionine, en rapport avec les apports alimentaires, affecte la vitesse de synthèse de la SAM basée sur les enzymes SAM synthétases.²²⁶ Par ailleurs, il a été suggéré que l'utilisation de la SAM est spécifiquement régulée par une réaction dans laquelle un groupement méthyl de la SAM est

transféré vers la glycine pour former la sarcosine. Cette réaction est catalysée par glycine Nméthyltransférase (GNMT) qui est abondante dans le foie et qui est fortement inhibée par le N-5-méthyltétrahydrofolate polyglutamate.²³² Ainsi, en parallèle avec la concentration intracellulaire de la méthionine, le N-5 méthyltétrahydrofolate participe à la régulation de la concentration intracellulaire de la SAM.²²⁶

Lorsque les deux mécanismes de régulation sont considérés en même-temps, les scenarios suivants peuvent être prédits :

1. lorsque l'apport diététique de méthionine est élevé, la SAM synthétases convertit rapidement la méthionine en SAM. L'augmentation résultante de la SAM intracellulaire sera associée à (i) l'inhibition de la MTHFR ce qui entraîne une diminution de la synthèse du N-5-méthyltétrahydrofolate, permettant ainsi à l'enzyme GNMT d'agir en pleine capacité du fait de la suppression de son inhibiteur (le N-5-méthyltétrahydrofolate) ; et (ii) à l'activation de l'enzyme CBS ce qui entraîne une augmentation du catabolisme de l'homocystéine. Dans ce scénario, la transsulfuration de l'homocystéine prédomine sur la reméthylation, ce qui est consistant avec une diminution des besoins en méthionine du fait de son apport élevé.
2. Inversement, lorsque l'apport en méthionine est faible, la concentration de la SAM est insuffisante pour inhiber la MTHFR, ce qui entraîne une augmentation de la production du N-5-méthyltétrahydrofolate. L'augmentation résultante du N-5- méthyltétrahydrofolate sera associée avec (i) une inhibition de la GNMT et donc une conservation de la SAM ; et (ii) une augmentation de la disponibilité du substrat pour la reméthylation de l'homocystéine. Ainsi, dans ce scénario, la reméthylation de l'homocystéine est favorisée sur la transsulfuration car la concentration de la SAM est trop faible pour activer l'enzyme CBS. Ce processus est consistant avec la nécessité de l'augmentation de la synthèse de novo de la méthionine du fait de son faible apport.

3.4.4-Les causes nutritionnelles de l'hyperhomocystéinémie

Dans des modèles expérimentaux, la concentration plasmatique d'homocystéine augmentait de 8 à 10 fois chez le rat carencé en folate et de 2,5 fois chez le rat carencé en vitamine B12.²²⁶ Chez le rat carencé en folate, il existait une relation inverse entre la concentration intracellulaire de la SAM et la concentration plasmatique de l'homocystéine.²³³

Par ailleurs, lorsque une injection intra-péritonéale d'ethionine —un analogue de la méthionine— était réalisée chez le rat carencé en folate, le taux plasmatique d'homocystéine diminuait et se normalisait. Cette diminution est probablement liée à la S-adénosylethionine, qui comme la SAM est un activateur puissant de la CBS mais qui contrairement à la SAM est moins déméthylée et métabolisée en homocystéine.²³⁰

L'activation par la S-adénosylethionine a réintroduit la coordination entre les deux voies de méthylation et de transsulfuration initialement interrompue par la carence en folate du fait de la diminution de la synthèse de la SAM.

Chez le rat carencé en vitamine B6, la concentration plasmatique d'homocystéine n'est pas augmentée.²³⁴ Par ailleurs, chez le rat carencé en vitamine B6, un gavage par voie orale en méthionine provoque une augmentation de la concentration en homocystéine plasmatique avec une élévation significative de la concentration hépatique en SAM. Ceci contraste avec ce qui est observé chez le rat carencé en folate qui présente une augmentation significative de la concentration plasmatique d'homocystéine après une charge en méthionine.²³⁵

3.4.5-L'hyperhomocystéinémie chez l'homme

L'hyperhomocystéinémie observée chez l'homme peut être classée en différentes catégories selon la cause, la prévalence, et la sévérité. Les cas les plus sévères d'hyperhomocystéinémie sont dus, dans la plupart des cas, à des mutations homozygotes des gènes codant pour les enzymes du métabolisme de l'homocystéine (Tableau 14). Dans ces cas, le déficit impliquant

une enzyme de la voie de la reméthylation ou de la transsulfuration entraîne une augmentation majeure de l'homocystéinémie et de l'homocystéinurie. La forme classique de ce désordre — l'homocystéinurie congénitale — est causée par un déficit sur le gène codant pour la CBS.²²⁶ Chez ces patients, l'homocystéinémie plasmatique à jeun peut atteindre 400 µmol/L. Des déficits homozygotes sur d'autres gènes peuvent entraîner des élévations similaires et incluent les mutations du gène codant pour MTHFR ou toute autre enzyme participant à la synthèse de la méthylcobalamine.^{236,237} Les causes les plus fréquentes d'hyperhomocystéinémie, responsable des formes modérées, sont représentées par les déficits moins sévères sur les gènes codant pour les enzymes du métabolisme de l'homocystéine ou de l'apport inadéquat des vitamines impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine (Tableau 14).

L'homocystéine plasmatique chez ces patients dépend de la voie altérée du métabolisme de l'homocystéine.²³⁸ Une altération de la voie de la reméthylation, même si elle est minime, entraînera une augmentation substantielle de l'homocystéinémie. Une telle altération peut être causée par un statut déficient en folate ou en vitamine B12 ou à un déficit sur l'enzyme MTHFR.^{238,239,240} A l'inverse, en cas d'altération de la voie de transsulfuration, l'augmentation de l'homocystéine plasmatique sera modérée. Cette altération peut être provoquée par un déficit hétérozygote de l'enzyme CBS ou d'un apport inadéquat en vitamine B6²⁴¹ et sera identifiée par une augmentation anormale de l'homocystéine après un test de charge en méthionine ou en postprandial.^{235,234,242}

Tableau 14. Classification des hyperhomocystéinémies

Hyperhomocystéinémie sévère

- Taux élevés d'homocystéine en permanence ;
- Causes : Déficit des enzymes CBS, MTHFR, ou des enzymes impliquées dans le métabolisme des vitamines B12.

Hyperhomocystéinémie modérée

- Hyperhomocystéinémie à jeun modérément élevée ;
- Reflète une altération de la méthylation de l'homocystéine ;
- Causes : déficit en folate, en B12 ou déficit enzymatique modéré : ex. MTHFR thermolabile.

Hyperhomocystéinémie après test de charge en méthionine

- Augmentation anormale de l'homocystéine après test de charge de méthionine ;
 - Altération de la voie de la transsulfuration de l'homocystéine (statut hétérozygote pour la CBS, déficit en vitamine B6).
-

Note. CBS : Cystathionine β -synthase; MTHFR : Méthyltétrahydrofolate reductase.

Les données relatives à la relation entre le statut vitaminique et le taux plasmatique de l'homocystéine étaient rapportées initialement par Kang et al. qui ont démontré une relation inverse entre les taux d'homocystéine et de folate.²³⁶ D'autres études ont démontré une relation inverse entre les taux d'homocystéine et de vitamine B12 et ont rapporté l'efficacité de la supplémentation vitaminique sur la réduction et la normalisation du taux plasmatique de l'homocystéine.^{223,243,244} Dans ces dernières études, la supplémentation en folate et en vitamine B12, mais non en vitamine B6, réduisait l'homocystéinémie plasmatique à jeun. La vitamine B6 était efficace uniquement dans la réduction du taux plasmatique d'homocystéine après un test de charge en méthionine.²²⁶ L'association indépendante entre les

nutriments et la concentration plasmatique d'homocystéine a été étudiée dans une cohorte bien établie, la Framingham Heart Study.²⁴⁵ Après ajustement pour l'âge, le sexe, et les autres vitamines, le taux plasmatique d'homocystéine était significativement associé et de façon non linéaire au taux de folates plasmatiques. Les taux les plus bas d'homocystéine étaient observés pour des concentrations de folate autour de 10 nmol/L ou plus. La concentration plasmatique d'homocystéine était faiblement associée à la concentration en vitamine B12 et au pyridoxine 5'-phosphate.²⁴⁵

3.4.6- La thermolabilité de la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR)

Les mutations qui entraînent une réduction sévère de l'activité MTHFR et une hyperhomocystéinémie sévère sont rares.²⁴⁶ En 1988, Kang et al. ont rapporté le cas de deux patients non apparentés et qui présentaient une hyperhomocystéinémie avec un taux plasmatique faible en folate.²³⁶ Ces patients présentaient un variant de l'enzyme MTHFR distinguée de l'enzyme normale par une activité réduite de 50 % et une thermolabilité.²³⁶ Dans des études ultérieures, le même groupe a démontré que la thermolabilité de la MTHFR était un trait hérité de façon récessive, et touchait environ 5 % de la population générale et 17 % des patients avec une coronaropathie mais qu'il n'était pas associé à des complications neurologiques.²⁴⁷ L'ADN complémentaire de l'enzyme MTHFR humaine a été isolé²⁴⁸ et il a été démontré que la thermolabilité de la MTHFR était causée par une mutation sur un site polymorphe (677 C>T), résultant en une substitution de l'acide aminé valine par une alanine dans l'enzyme.²⁴⁹ La mutation était retrouvée chez 38 % des chromosomes non sélectionnés chez 57 sujets canadiens français. L'état homozygote pour cette mutation était présent chez 12 % des sujets et était corrélé de façon significative à l'augmentation de l'homocystéinémie.²⁴⁹ Dans un travail publié en 1996, Jacques et al. ont démontré une interaction entre le variant thermolabile de MTHFR et le statut en folate.²⁵⁰ Lorsque la concentration plasmatique en

folate est élevée (> 15,4 nmol/L), les taux d'homocystéine sont bas et non associés au génotype MTHFR. A l'inverse, lorsque la concentration en folate est basse, le taux plasmatique d'homocystéine est significativement élevé chez les sujets homozygotes MTHFR 677, T/T en comparaison aux sujets présentant un génotype sauvage.²⁵⁰ L'existence d'une telle interaction a été confirmée dans des études ultérieures.^{251,252} Ces données impliquent que l'expression phénotypique du génotype de MTHFR est dépendante de la biodisponibilité en folate. Ceci suggère que les sujets homozygotes MTHFR 677, T/T pourraient avoir un besoin plus élevé en folate en comparaison aux sujets présentant un génotype sauvage.

3.4.7- Autres facteurs contrôlant le taux plasmatique de l'homocystéine

Le taux plasmatique de l'homocystéine est plus élevé chez les hommes en comparaison aux femmes. Des taux élevés d'homocystéinémie ont été associés à l'altération de la fonction rénale, une créatininémie élevée, un tabagisme actif, la consommation de café, d'alcool, et de certaines drogues incluant les antagonistes des folates, le monoxyde d'azote, et la L-DOPA.²⁵³

3.4.8- MICI et l'homocystéine

3.4.8.1-Implication de l'homocystéine dans la pathogénie des MICI

3.4.8.1.1-Stress oxydant

L'homocystéine provoque une production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et par conséquent un stress oxydant. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle majeur joué par les espèces réactives de l'oxygène dans la survenue des lésions de la muqueuse colique au cours des MICI.²⁵⁴

De plus, l'homocystéine sensibilise les cellules au stress oxydant en diminuant l'expression de nombreuses enzymes anti-oxydantes dont la glutathion peroxydase (GPX) et l'hème oxygénase-1 (HO-1).²⁵⁵ Une diminution du pouvoir anti-oxydant a ainsi été rapportée chez les

sujets atteints de MICI.²⁵⁶

3.4.8.1.2-Inflammation

Il a été montré in vitro que l'homocystéine pouvait stimuler la production de plusieurs facteurs pro-inflammatoires tels que MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), une chémokine pour les monocytes, et l'interleukine IL-8, une chémokine pour les lymphocytes T et les neutrophiles, ceci via l'activation du Necrosis Factor kappa B (NF- κ B). Par ailleurs, l'homocystéine est capable de moduler la réponse inflammatoire en régulant la synthèse de molécules d'adhésion comme VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) et PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1).²⁵⁷ L'expression de ces 3 molécules étant augmentée chez les patients atteints de MICI.²⁵⁸ L'homocystéine pourrait également provoquer des lésions de la muqueuse intestinale par un effet cytotoxique médié par le tumor necrosis factor- α (TNF- α). En effet, l'homocystéine induirait une mort cellulaire en augmentant la capacité du TNF- α à détruire les potentiels membranaires mitochondriaux.²⁵⁹ L'homocystéine induit ainsi une inflammation sur l'endothélium microvasculaire d'intestin humain en stimulant l'expression de VCAM-1, MCP-1 et la phosphorylation de p38.²⁶⁰ Au total, les lésions induites par l'homocystéine via une augmentation de molécules d'adhésion, de cytokines et de chémokines pourraient participer au maintien d'une inflammation chronique de la muqueuse intestinale chez les patients atteints de MICI.

3.4.8.1.3-Stress du Réticulum Endoplasmique

Récemment, Danese et al. (2006) ont montré que la néoangiogénèse était un phénomène impliqué dans la pathogénie des MICI. En effet, le taux de VEGF (vascular endothelial growth factor) est significativement élevé dans des prélèvements de muqueuse intestinale de

patients atteints de maladie de Maladies de Crohn (MC) ou de rectocolite hémorragique.²⁶¹ Etant donné qu'in vitro, on observe une surexpression du VEGF et de la GRP78 (glucose regulated protein-78) après stimulation des cellules par l'homocystéine, un lien entre stress du RE (réticulum endoplasmique), VEGF (vascular endothelial growth factor) et homocystéine est possible au cours des MICI.²⁶²

3.4.8.1.4- Hypométhylation

La méthylation des régions promotrices du génome joue un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes. Une hyperméthylation entraîne une répression, alors qu'une hypométhylation est associée à une activation de gènes.²⁶³

L'homocystéine influence le niveau de méthylation de l'ADN car :

1) la reméthylation de l'homocystéine produit de la méthionine, le précurseur de la S- adénosylméthionine (SAM), qui est un donneur de groupes méthyles impliqués dans plus de cent réactions de méthylations dans notre organisme;

2) SAH, est un puissant inhibiteur des enzymes responsables de la méthylation de l'ADN, les méthyltransférases; l'inhibition de ces dernières par une hyperhomocystéinémie est donc responsable d'un état d'hypométhylation dans la cellule. Cette hypométhylation pourrait alors avoir comme conséquence d'activer certains gènes pro-inflammatoires chez les sujets atteints de MICI, même si aucune donnée n'est à ce jour disponible à ce sujet.

Par ailleurs, une hypométhylation globale de l'ADN associée à une hyperméthylation spécifique de gènes suppresseurs de tumeurs est un trait caractéristique des cellules tumorales, comme cela été rapporté avec une hyperméthylation spécifique des promoteurs des gènes p16 et hMLH1 (human mutL homologue 1) dans les tumeurs colorectales.²⁶³ Une hypométhylation globale de l'ADN, peut-être secondaire à une hyperhomocystéinémie par carence en folates, a été mise en évidence dans les formes sévères de RCH.²⁶⁴ Ces données

pourraient donc expliquer, au moins en partie, le surrisque de cancer colorectal chez les sujets souffrant de MICI. Plus récemment, une hyperméthylation du récepteur à l'oestrogène a été proposée comme un marqueur du risque de néoplasie colorectale dans la RCH, soulignant l'implication possible d'anomalies épigénétiques dans la carcinogénèse colorectale au cours des MICI.²⁶⁵

3.4.8.2- Les études cliniques d'association de l'homocystéine avec les MICI

Une hyperhomocystéinémie modérée est fréquente chez les sujets atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Etant donné qu'une hyperhomocystéinémie est un facteur de risque de thromboses dans la population générale et que les patients avec MICI présentent un risque accru de maladie thrombotique, plusieurs équipes ont cherché à expliquer ce surrisque par une hyperhomocystéinémie. D'après des données récentes de la littérature, l'homocystéine pourrait promouvoir une inflammation muqueuse chronique par le biais d'un stress oxydant, d'un stress du réticulum endoplasmique (RE), et d'une activation de facteurs pro-inflammatoires.²⁶⁰ Les anomalies épigénétiques (méthylation de l'ADN) associées à une hyperhomocystéinémie et à une carence en folates pourraient quant à elles expliquer, au moins en partie, l'augmentation du risque de cancer colorectal observée chez les malades souffrant de MICI. Dans une étude récente, le niveau d'homocystéine plasmatique est corrélé à l'activité, au nombre de poussées, à la sévérité et à la durée de la RCH.²⁶⁶ L'ensemble de ces éléments pourrait permettre une meilleure compréhension de la physiopathologie des MICI.

3.4.8.3-Prévalence de l'hyperhomocystéinémie au cours des MICI

En 2001, Papa et al.²⁶⁷ rapportaient une hyperhomocystéinémie chez 26,5% des patients atteints de MICI contre 3,3% chez les sujets sains. Zazos et al.²⁶⁸ ont trouvé le même résultat.

Depuis 1998, onze autres études ont étudié la concentration de l'homocystéine plasmatique chez les patients atteints de MC ou de RCH. Parmi eux, dix études ont retrouvé que le taux d'homocystéine est plus élevé chez les patients atteints de MICI que chez les sujets sains (tableau 15). Deux études ont également étudié la concentration de l'homocystéine sur des prélèvements de muqueuse colique chez des sujets atteints de MICI : les taux intra-muqueux s'avèrent nettement plus élevés que chez les sujets sains ²⁶⁰, ce qui souligne l'implication possible de l'hyperhomocystéinémie dans la pathogénie des MICI.

Tableau 15. Le niveau de l'homocystéinémie chez les sujets atteints de MICI et les sujets sains (D'après Peyrin-Biroulet et al.2007 ²⁶⁹)

Reference	Case Number (UC/CD)	Homocysteine ($\mu\text{mol/L}$, Mean \pm SD or Median [Range])		P Value
		IBD Patients	Controls	
(45)	61 (29/32)	12.2 \pm 7.7	10.5 \pm 4.6	0.045
(47)	68 (37/31)	13.2 \pm 7.8	7.4 \pm 2.8	<0.01
(48)	171 (0/171)	14.8 (4.1–51)	4.4–12.4	ND
(49)	65 (9/56)	8.7 \pm 1	6.6 \pm 0.4	<0.05
(50)	108 (53/55)	15.9 \pm 10.3 (UC) and 13.6 \pm 6.5 (CD)	9.6 \pm 3.4	<0.05
(54)	231 (89/142)	12.3 (4.6–51.3)	11.1 (3.9–27.6)	0.001
(51)	105 (0/105)	10.9 \pm 5.1	7.5 \pm 1.5	0.0001
(52)	21 (0/21)	13.24 \pm 5.53	10.2 \pm 3.6	<0.01
(53)	106 (52/54)	10.7 (not reported)	ND	ND
(46)	64 (39/25)	11.7 \pm 5.7	7.8 \pm 2.5	0.001
(5)	174 (91/83)	10.85 (3.25–39.24)	8.99 (4.13–16.16)	0.0001

UC = ulcerative colitis; CD = Crohn's disease; ND = not determined.

3.4.8.4-L'hyperhomocystéinémie et thromboses au cours des MICI

L'homocystéine pourrait favoriser le développement de thromboses par des mécanismes différents: l'inhibition de molécules anticoagulantes (Heparin-like glycosaminoglycan, antithrombine III, protéine C réactive, thrombomoduline) ou une diminution de la fibrinolyse.²⁷⁰

Les complications thrombotiques représentent une cause de morbidité et de mortalité non négligeable chez les sujets atteints de MICI, avec une incidence évaluée entre 1,3% et 6,4% selon les séries.²⁷¹ Il faut noter que les complications thromboemboliques observées au cours des MICI sont principalement des thromboses veineuses profondes et des embolies pulmonaires.

Slot et al.²⁷² rapportent le cas d'une patiente ayant une maladie de Crohn, atteinte de thromboses étendues après l'accouchement avec ischémie du territoire médullaire et symptômes neurologiques graves. L'hyperhomocystéinémie provoquée par le déficit en folate est la cause principale des thromboses. Récemment, une augmentation du risque d'athérosclérose a été rapportée chez les patients souffrants de MICI, avec notamment une association significative entre l'épaisseur de l'intima/média des artères carotides communes et le taux d'homocystéine plasmatique, suggérant une possible implication de l'hyperhomocystéinémie dans la survenue des thromboses au cours des MICI.²⁷³ Cependant, dans une étude précédente, Papa et al.²⁶⁷ n'ont pas trouvé de différence de prévalence de l'hyperhomocystéinémie entre les patients atteints de MICI ayant présenté des antécédents personnels de maladie thrombotique et ceux indemnes de ce type de complication. Oldenburg et al.²⁷⁴ ont confirmé cette absence d'association dans une autre série indépendante.

Peu de travaux ont analysé les relations entre les polymorphismes des enzymes du métabolisme de l'homocystéine et les complications thromboemboliques dans les MICI. A notre connaissance, une seule étude a évalué l'association entre le variant 677TT de la MTHFR et la survenue d'événements thrombotiques dans les MICI. Dans cette étude, Guédon et al.²⁷⁵ n'ont pas trouvé de différence significative de prévalences du variant 677TT entre quatre populations: un groupe de patients atteints de MICI avec ou sans les complications thrombotiques, un groupe de témoins indemnes de MICI, avec ou sans les complications thrombotiques. Les thromboses ont probablement une origine multifactorielle chez les patients ayant des MICI.²⁷⁶ Cattaneo et al.²⁷⁷ ont démontré que le risque de thromboses peut être augmenté uniquement si le génotype homozygote 677TT est associé à l'autres anomalies de la coagulation comme une mutation du facteur V de Leyden.

3.4.8.5-Association des déterminants de l'homocystéine avec les MICI

3.4.8.5.1-Déterminants nutritionnels

Les patients atteints de MICI présentent une prédisposition aux carences nutritionnelles qui peuvent être causées par:

- 1) Réduction des apports alimentaires secondaire à l'anorexie, aux nausées et aux douleurs abdominales liées à la maladie ;
- 2) La malabsorption secondaire aux résections de l'iléon²⁷⁸ ou aux lésions causées par l'inflammation muqueuse chronique;
- 3) Entéropathie exsudative;
- 4) Hypermétabolisme secondaire au processus inflammatoire, aux complications infectieuses ou encore au stress chirurgical et aux complications postopératoires ;
- 5) L'inhibition d'absorption des folates à cause de la prise d'aminosalycilés.²⁷⁹

Plusieurs études ont exploré l'influence des déterminants nutritionnels de l'hyperhomocystéinémie chez les patients atteints de MICI. Globalement, une carence en folates est la principale cause des hyperhomocystéinémies constatées chez les patients atteints de MICI.^{268,274} C'est ainsi que certains auteurs ont trouvé que le taux de folates est le seul facteur indépendant significativement associé à une hyperhomocystéinémie.²⁶⁷

Le lien entre vitamine B12 et homocystéinémie semble moins évident au cours des MICI. Des travaux ont mis en évidence la corrélation entre la carence en vitamine B12 et les hyperhomocystéinémies.^{269,268,274}

Par rapport aux folates et à la vitamine B12, l'influence du taux de vitamine B6 et vitamine B2 sur celui de l'homocystéine dans les MICI serait nulle. A notre connaissance, il n'y a qu'Oldenbrug et al.²⁷⁴ qui ont montré une association significative entre le taux de vitamine B6 et le taux de l'homocystéine. Dans une autre étude, l'hyperhomocystéinémie a été trouvée

plus fréquemment chez les patients atteints de MICI, mais aucune association significative n'a été observée entre le taux de vitamine B6 et le taux de homocystéine.²⁸⁰

3.4.8.5.2 Déterminants génétiques

Les données disponibles concernant la prévalence du variant de la MTHFR restent discordantes. Deux études réalisées en Europe du Nord montrent une augmentation significative de la fréquence du génotype homozygote MTHFR 677TT. Mahmud et al.²⁸¹ ont été les premiers à retrouver une prévalence accrue de l'hyperhomocystéinémie et du variant MTHFR 677T dans une série de patients irlandais atteints de MICI: les auteurs montrent que 17,2% de patients atteints de MICI présentant ce génotype contre 7,3% de sujets témoins (P=0.01). Une étude Danoise a confirmé ces résultats, avec 15,1% de patients atteints de MICI présentant une homozygotie 677TT contre 8,3% dans la population générale (P<0.01).²⁸² Cinq études réalisées en Europe de sud (deux en Italie, une en France, une en Espagne, et une au Portugal) et une série chinoise ne retrouvaient pas de différence significative pour ce variant.^{275,283,284,285}

Ces résultats sont cependant difficilement interprétables car la fréquence des polymorphismes de la MTHFR varie selon des facteurs géographiques et ethniques. Le faible effectif ainsi que l'absence de données sur le statut en folates dans ces études pourraient également expliquer ces résultats discordants.

Peu d'études ont porté sur les polymorphismes des autres enzymes du métabolisme de l'homocystéine. Une seule étude a porté sur l'association du polymorphisme de la CBS (864ins68) aux MICI.²⁶⁷ Les conclusions sont que la prévalence de la mutation hétérozygote de CBS était identique chez les patients atteints de MICI et chez les sujets sains.

Cependant, il a été montré que le variant A66G de la MTRR est plus fréquent chez les patients français atteints de MICI que chez les sujets contrôles (OR=4,0, 95% C.I.=1,7-9,2).²⁸⁶

3.4.8.5.3 Pharmacogénétique

Parmi les traitements incriminés, les aminosalicylés ont longtemps été considérés comme une cause potentielle d'hyperhomocystéinémie dans les MICI: on pensait en effet que l'absorption des folates était inhibée par la sulfasalazine.²⁷⁹ Cependant, aucune association n'a été observée entre l'utilisation des aminosalicylés et le taux d'homocystéine plasmatique dans les études les plus récentes.^{281,267}

Les effets du méthotrexate, un antagoniste de l'acide folique, sur l'homocystéinémie n'avaient jamais été évalués dans les MICI, alors que cette molécule est une cause reconnue d'hyperhomocystéinémie chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde.²⁸⁷ Le traitement par méthotrexate ne semble pas influencer le taux d'homocystéine au cours des MICI. Par ailleurs, les polymorphismes du gène MTHFR ne semblent pas influencer l'efficacité du méthotrexate. En revanche, ils pourraient moduler la toxicité liée à ce traitement. En effet, les effets secondaires sous méthotrexate seraient plus fréquents chez les individus homozygotes pour l'allèle 1298C de la MTHFR.²⁸⁸

3.5-Publication n°5 : « Une carence en donneurs de méthyles aggrave les lésions de colite expérimentale chez le rat. » (Journal of Cellular and Molecular Medicine, Vol 15, N°11, 2011)

3.5.1-Introduction

Comme nous l'avons décrit ci-dessus, un déficit en donneurs de méthyles (folate et/ou vitamine B12) entraîne une augmentation de l'homocystéine au sein des tissus et pourrait promouvoir une inflammation de la muqueuse par activation de différentes voies relatives à l'inflammation, le stress oxydant cellulaire et l'apoptose.²⁸⁸ Bien qu'il y ait une association

entre les déterminants génétiques et nutritionnels de l'homocystéine avec les maladies inflammatoires chroniques intestinales, les effets de la carence en donneurs de méthyles sur l'homéostasie intestinale sont peu connus d'un point de vue moléculaire. Le but de cette étude a été d'examiner l'impact d'un régime pauvre en donneurs de méthyles (alimentation sans folate, vitamine B12 et choline) sur les lésions coliques induites par un traitement par DSS (Dextran Sodium Sulfate) chez le rat et d'identifier les médiateurs de l'inflammation, l'apoptose et le stress oxydant pouvant potentiellement contribuer à l'inflammation. Pour se faire l'ensemble de ces paramètres a été étudié chez des rats, issus de mères carencées en donneurs de méthyles durant la gestation et l'allaitement, et chez lesquels des lésions de colite expérimentale ont été induites par DSS.

3.5.2-Résultats

La carence en donneurs de méthyles a été confirmée par mesure des taux plasmatiques d'homocystéine, de vitamine B12 et de folate, retrouvant ainsi chez les rats carencés une diminution significative des taux de vitamine B12 et de folate associée à une augmentation du taux d'homocystéine.

L'indice d'activité de la maladie ²⁸⁹, corrélée aux lésions inflammatoires histologiques, montrait une nette augmentation de ce score pour le groupe carencé traité par DSS par rapport au groupe de rats non carencés également traités par DSS et par rapport aux deux autres groupes de rats (carencés/non traités par DSS et non carencés/non traités par DSS).(Figure 16)

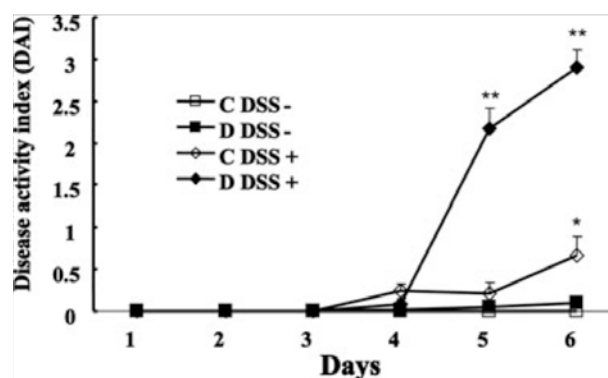


Figure 16: Représentation graphique de l'index d'activité de la maladie (DAI) moyen quotidien des rats entre J21 et J27. Différence statistiquement significative, * C DSS+ (Carencé traité par DSS) vs. NC DSS+ (Non carencé traité par DSS), $P < 0,05$; **C DSS+ vs NC DSS+, $P < 0,01$, ANOVA, test de Fisher.

L'analyse du stress oxydant par différents marqueurs (tableau 16) (activité des superoxide dismutase et glutathione peroxidase) ne retrouvait pas de différence significative entre les groupes carencés et non carencés traités par DSS.

Tableau 16: Activité des superoxide dismutase et glutathione peroxidase dans le colon des rats.

	C/DSS ⁻	D/DSS ⁻	C/DSS ⁺	D/DSS ⁺
Total SOD (UI/mg)	7.98 ± 1.85	13.46 ± 7.01*	8.11 ± 2.41	7.65 ± 1.08
SOD Mn (UI/mg)	0.76 ± 0.23	1.05 ± 0.27*	0.53 ± 0.12	0.74 ± 0.17
SOD Cu/Zn (UI/mg)	7.22 ± 1.73	12.42 ± 6.77*	7.58 ± 2.3	6.91 ± 1.01
GPX (μmol/min/g)	64.86 ± 6.95	84.55 ± 31.77	66.97 ± 15.33	69.03 ± 14.88

Les résultats sont exprimés en moyennes ± déviations standards. *D DSS-(carencé non traité par DSS) vs C DSS- (contrôle non traité par DSS), $P < 0,05$, ANOVA, test de Fisher.

Par contre une diminution de l'expression de caspase-3 et de Bax était retrouvée avec une augmentation du taux de Bcl-2 chez les rats carencés traités par DSS en comparaison aux animaux non carencés traités par DSS (figure 17), ceci signifiant que la carence en donneurs de méthyles durant un traitement expérimental induisant des lésions de colite stimule des voies anti-apoptotiques.

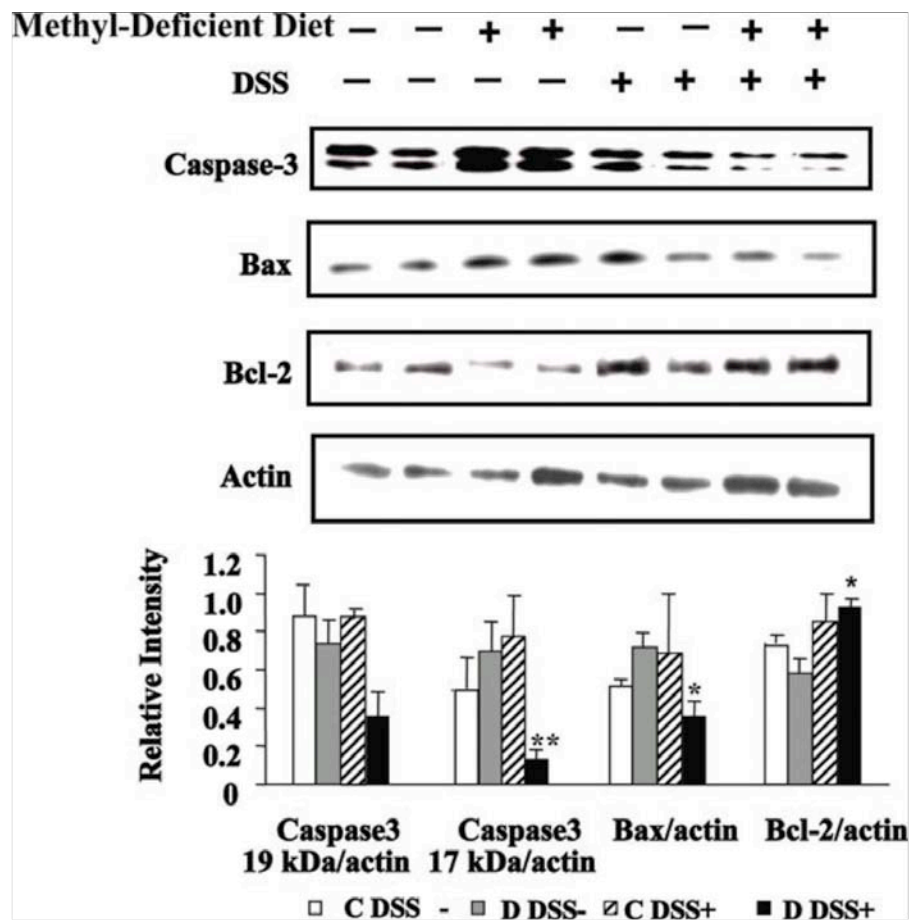


Figure 17: Effets de la carence en donneurs de méthyles sur l'apoptose. L'analyse en western-blot de caspase-3, Bax et BCL-2 a été réalisée sur des rats avec des lésions de colite induite par DSS. ** Caspase-3 chez les rats carencés non traités (D DSS-) comparée aux rats carencés traités par DSS (D DSS+). $P < 0,05$; * ratios Bax/actine et Bcl-2/actine chez les rats carencés non traités (D DSS-) comparés aux rats carencés traités par DSS (D DSS+). $P < 0,05$.

L'analyse du taux d'ARNm de TNF alpha, déterminé par RT-PCR en temps réel semi-quantitative retrouvait un taux significativement plus élevé chez les animaux carencés traités par DSS. De plus l'analyse en western blot montrait une diminution du taux de TIMP3 (Tissue Inhibitor metalloprotéinase), un régulateur négatif de TNF alpha.

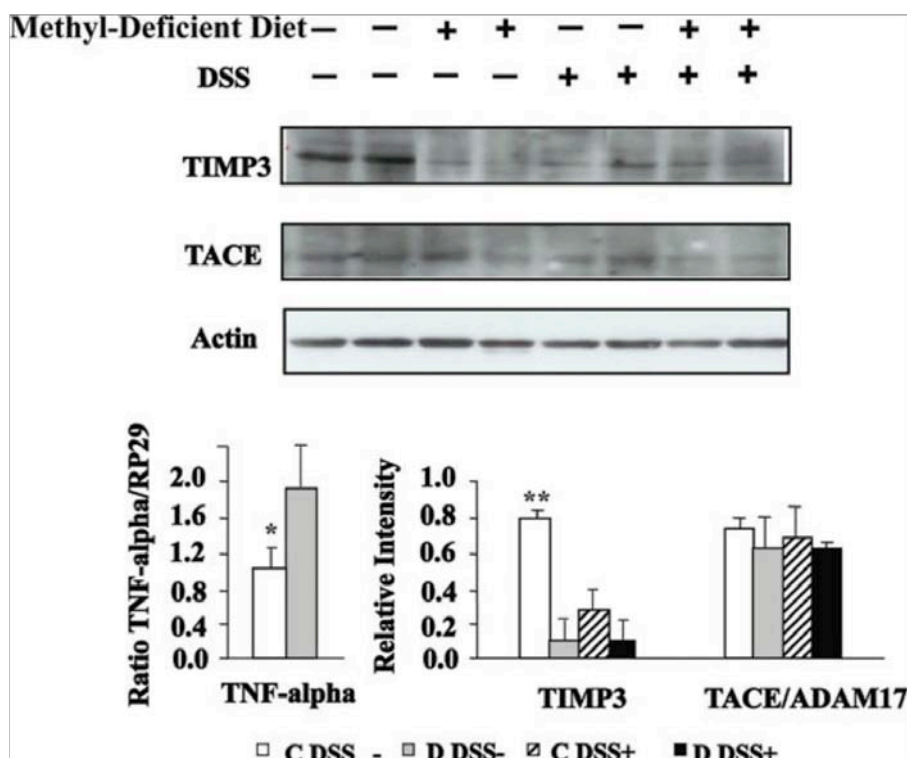


Figure 18: Effets de la carence en donneurs de méthyles sur l'expression de TNF-alpha, TIMP3 et TACE chez les rats présentant des lésions de colite induites par DSS. Analyse de l'expression en western blot de TIMP3 et TACE et des taux d'ARNm par TNF alpha en RT-PCR semi-quantitative en temps réel, utilisant PR29 comme gène de référence.*TNF alpha des animaux contrôles non traités par DSS (C DSS-) comparé aux animaux carencés non traités par DSS (D DSS-), $P < 0,05$; ** TIMP3 chez les animaux contrôles non traités par DSS (C DSS-) comparé aux animaux carencés non traités par DSS (D DSS-), $P < 0,01$.

Les taux de p38 et de cPLA2 (cytosolique phospholipase A2) étaient significativement augmentés chez les animaux carencés comparativement aux animaux non carencés, qu'ils soient traités ou non par DSS. La phospholipase A2 (PLA2) dégrade les phospholipides membranaires en acide arachidonique et en lysoPAF (platelet activating factor).

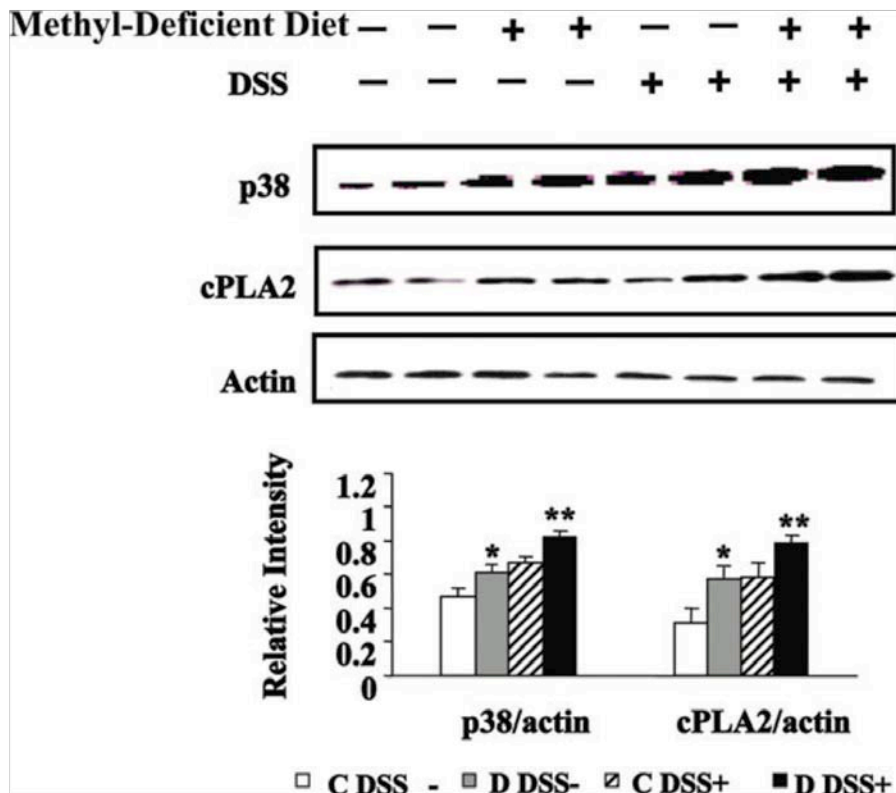


Figure 19: Effets de la carence en donneurs de méthyles sur l'expression de p38 et cPLA2 chez les rats présentant des lésions de colite induites par DSS. Analyse de l'expression en western blot de p38 et cPLA2 et analyse quantitative. * p38 et cPLA2 chez les animaux contrôles non traités par DSS (C DSS-) comparé aux animaux carencés non traités par DSS (D DSS-), $P < 0,05$; ** p38 et cPLA2 chez les animaux contrôles traités par DSS (C DSS+) comparé aux animaux carencés traités ou non par DSS (D DSS-/D DSS+), $P < 0,01$.

Ensuite, l'acide arachidonique est métabolisé par les cyclo-oxygénases (COX) et la lipooxygénase (LOX). Il existe deux types de cyclo-oxygénases: COX1 et COX2. Pour

documenter l'augmentation de phospholipase A2 cytotique (cPLA2) induite par la carence en donneurs de méthyles et le DSS, nous avons étudié l'expression de COX1, COX2 et LOX dans le côlon des rats.

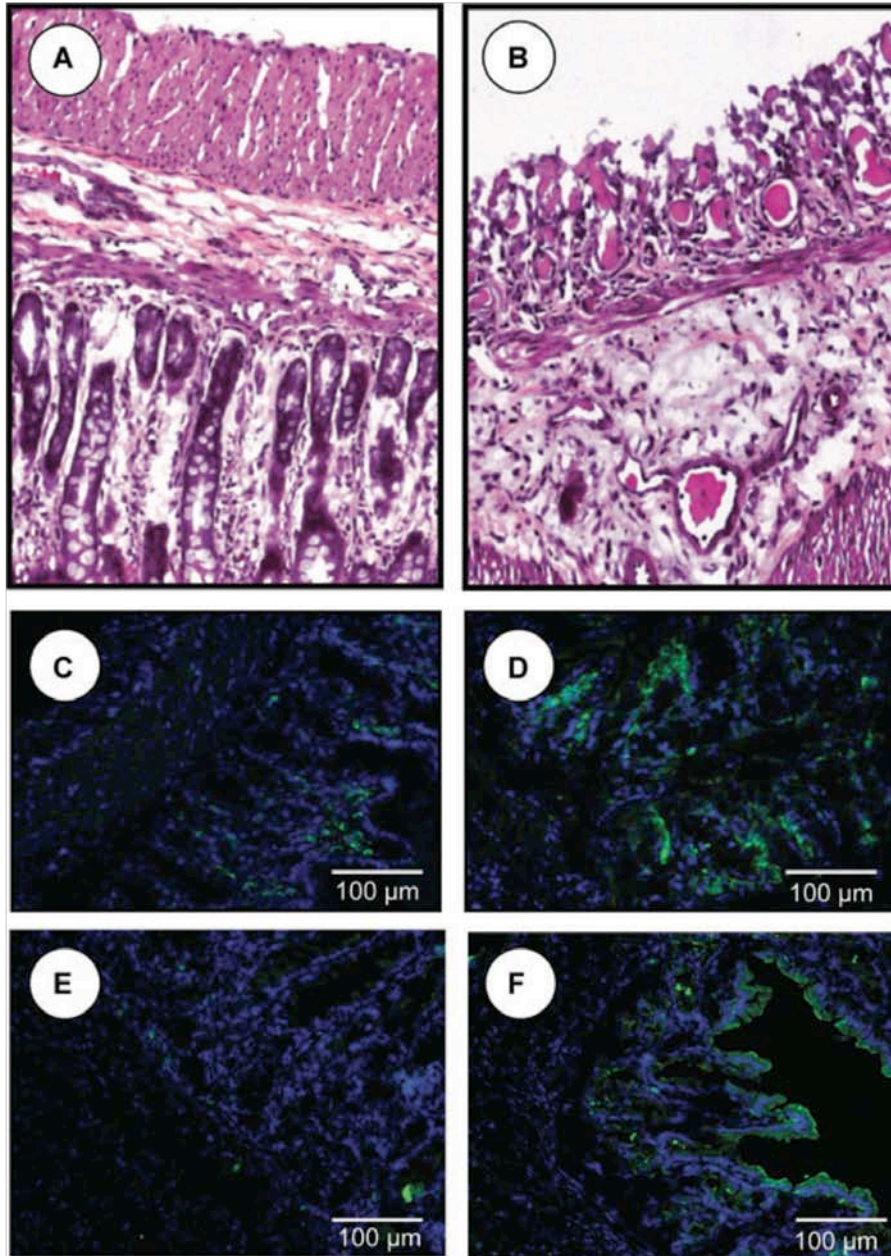


Figure 20: Examen histologique de la muqueuse des rats carencés en donneurs de méthyles traités par DSS (B) comparés aux contrôles (A) montrant des dommages plus marqués chez les animaux carencés. Immunofluorescence de cPLA2 sur la muqueuse colique

des rats contrôles (C) et des rats carencés (D) montrant un signal plus marqué chez les animaux carencés

. Immunofluorescence de COX2 sur la muqueuse colique des rats contrôles (E) et des rats carencés (F) montrant un signal plus marqué chez les animaux carencés

L'analyse par Western-Blotting montre une augmentation très significative de COX2 dans le côlon des rats carencés traités par DSS par rapport aux rats non carencés traités par DSS. Par contre, l'expression de COX1 n'est pas modifiée.

L'expression de 5-LOX montre la même tendance que celle de cPLA2.

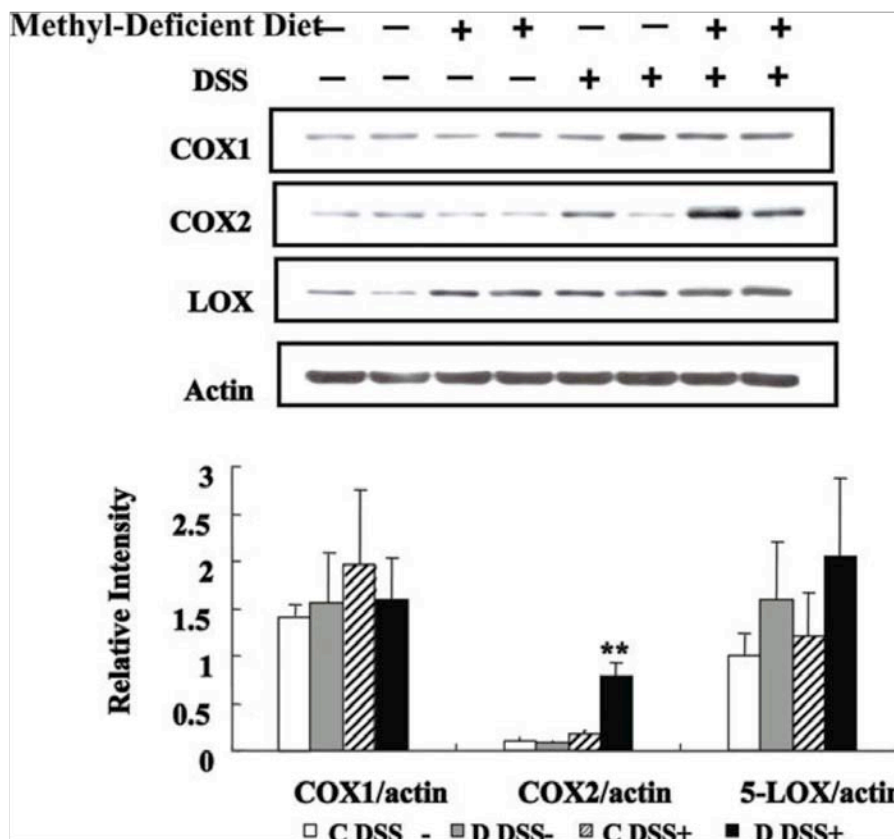


Figure 21: Effets de la carence en donneurs de méthyles sur l'expression de COX1, COX2 et LOX chez les rats présentant des lésions de colite induites par DSS. Analyse de l'expression en western blot de COX1, COX2 et LOX et analyse quantitative. ** COX2 chez les animaux

carencés traités par DSS (D DSS+) comparé aux animaux contrôles traités par DSS (C DSS+), contrôles non traités (C DSS-) et carencés non traités (D DSS-) ; $P < 0,001$.

3.5.3-Discussion

D'après des données récentes de la littérature, l'homocystéine pourrait promouvoir une inflammation muqueuse chronique par le biais d'un stress oxydant, d'un stress du réticulum endoplasmique, et d'une activation de facteurs pro-inflammatoires²⁶⁹. Par ailleurs, les anomalies épigénétiques (méthylation de l'ADN) associées à une hyperhomocystéinémie et à une carence en folates pourraient quant à elles expliquer, au moins en partie, l'augmentation du risque de cancer colorectal observée chez les malades souffrant de MICI.

L'Index d'activité de la maladie (DAI) est un bon indice pour quantifier la sévérité de la maladie et correspond bien à l'inflammation mise en évidence par l'analyse histologique²⁸⁹.

Dans notre étude, le DAI des rats non traités pas DSS est à 0, Ainsi, une hyperhomocystéinémie produite par la carence en groupements méthyles ne peut pas induire à elle seule une inflammation du côlon des rats. En revanche, elle augmente l'expression de médiateurs clés de l'inflammation muqueuse comme cPLA2 et COX2. C'est probablement pour cette raison que la carence en groupements méthyles aggrave l'inflammation colique induite par le DSS, comme ceci est montré par le DAI du groupe carencé traité par DSS, qui est significativement plus élevé que celui du groupe non carencé traité par DSS. Les mécanismes cellulaires possibles par lesquels l'élévation de l'homocystéine favorise l'inflammation colique peuvent potentiellement être de différentes natures: stress oxydant, stress du réticulum endoplasmique, apoptose, ou activation des facteurs pro-inflammatoires. Le Superoxyde dismutase (SOD) et la Glutathion peroxydase (GPX) sont deux enzymes anti-oxydantes dont l'action combinée permet de lutter efficacement contre le stress oxydant.

Dans ce travail, l'activité de la SOD est augmentée chez les rats du groupe carencé non traité par DSS par rapport aux rats du groupe non carencé et non traité par DSS. L'activité de la GPX est aussi augmentée chez le groupe carencé par rapport au groupe non carencé, mais la différence n'est pas significative. Ces résultats sont en accord avec ceux de Moat et al. (2000)²⁶⁹, montrant que les activités de SOD et GPX sont plus élevées chez les sujets ayant une hyperhomocystéinémie modérée (>20Xmol/L) par rapport au groupe contrôle. D'autres études ont rapporté que l'hyperhomocystéinémie pourrait diminuer les activités des différentes enzymes impliquées dans la réduction des espèces oxygénées, comme la superoxyde dismutase (SOD)²⁹⁰ et la glutathion peroxydase (GPX)²⁹⁰. Ces divergences de résultats peuvent être liées aux différences entre les modèles d'étude (humains, animaux ou culture cellulaire) ou à la concentration de l'homocystéine. L'augmentation de l'activité de SOD observée dans notre étude peut-être une manière de s'adapter au stress oxydant induit par une hyperhomocystéinémie modérée. Le stress oxydant est impliqué dans la pathogénie des MICI. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle majeur joué par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la survenue des lésions de la muqueuse colique²⁹¹.

Dans notre travail, il semblerait que les activités SOD et GPX ne soient pas modifiées par le DSS. Durak et al.²⁹² n'ont pas trouvé de modification de l'activité de la SOD et GPX chez les patients atteints de RCH, ce qui est en accord avec nos résultats. Cependant, les données de la littérature sont controversées. Certaines études ont rapporté que l'activité de la SOD²⁹³ et de la GPX²⁹⁴ sont diminuées dans la muqueuse colique des patients ayant des MICI. Mais l'interprétation de ces divergences est tempérée par la différence des méthodes qui incluent l'utilisation des prélèvements biopsiques ou des prélèvements chirurgicaux, les méthodes d'analyse ou la phase de recrutement de l'étude. Par exemple, Korenaza et al.²⁵⁴ ont démontré que l'activité de la SOD était augmentée pendant la phase aiguë de l'inflammation

et diminuée en cas d'inflammation chronique dans un modèle animal de colite inflammatoire au DSS.

La carence en donneurs de méthyles est connue pour générer une apoptose. Vijayalakshmi et al.²⁹⁶ ont rapporté qu'une carence multi-vitaminique augmente l'index apoptotique et l'activité de la caspase 3 dans la muqueuse colique tandis que le rapport Bax/Bcl2 est diminué. Une hyperhomocystéinémie pourrait favoriser l'apoptose des cellules comme les cellules endothéliales vasculaires²⁹⁶, les cellules neuronales²⁹⁷ et les cellules du trophoblaste²⁹⁸. Le mécanisme par lequel l'homocystéine conduit à l'apoptose n'est pas encore clairement élucidé.

Robert et al.²⁹⁹ n'ont pas trouvé de cellules apoptotiques, ni d'activation de la caspase 3 ni de fragmentation de l'ADN dans le foie chez la souris CBS^{-/-}. De même, Mangiagalli et al.³⁰⁰ ont montré qu'il n'y a pas de modification de l'expression de caspase3, Bax et Bcl2 dans les lymphocytes humains incubés avec l'homocystéine. En accord avec ces travaux, nous n'avons pas observé d'augmentation de la caspase 3, ni de Bax ni de baisse de Bcl2 dans le côlon des rats carencés.

L'étude immunohistochimique a démontré que l'expression de p53 est augmentée dans la muqueuse inflammatoire des patients de RCH.³⁰¹ La protéine p53 pourrait induire l'apoptose en augmentant Bax et diminuant Bcl2. Cependant, il existe une augmentation de Bcl2 chez les rats carencés traités par DSS. Nous avons aussi observé une diminution de caspase 3 et Bax dans le côlon chez les rats carencés après traitement avec le DSS, ce qui suggère qu'il existe un mécanisme protecteur anti-apoptotique.

La diminution de caspase 3, Bax et l'augmentation de Bcl2 dans le côlon des rats carencés après traitement avec le DSS peut être expliquée par l'hyperhomocystéinémie. En effet l'homocystéine est capable d'activer le facteur de transcription Necrosis Factor kappa B

(NF- κ B)^{302,303} qui est un régulateur des cytokines pro-inflammatoires et un inhibiteur important de l'apoptose.³⁰⁴ Imura et al.³⁰⁵ ont trouvé que l'expression de Bax est diminuée non seulement dans la muqueuse des patients porteurs de MICI, mais également dans la muqueuse des patients ayant une inflammation « non-MICI », suggérant ainsi que l'expression de Bax est probablement régulée par des médiateurs inflammatoires.

Le TNF-alpha joue un rôle central dans la cascade inflammatoire des MICI, notamment la Maladie de Crohn.³⁰⁶ L'anticorps monoclonal anti-TNF- alpha (influximab) induit la rémission clinique chez plus de 50% des patients atteints de MICI.³⁰⁷ La protéine p38 est ainsi impliquée dans la pathogénie des MICI.³⁰⁸ Des études ont montré que dans la muqueuse inflammatoire intestinale des patients atteints de MICI, p38 est la MAPK qui est le plus activée.³⁰⁹ TNF- alpha est régulée par p38³¹⁰ et l'inhibition de p38 supprime la synthèse de TNF- alpha chez les souris.³¹¹ Danese et al.²⁶⁰ ont montré que l'homocystéine et TNF- alpha peuvent promouvoir une inflammation muqueuse par l'activation de p38 in vitro et que la combinaison de l'homocystéine et TNF- alpha exerçait un effet synergique. Nous avons trouvé que l'expression des ARNm de TNF- alpha est augmentée dans le côlon des rats carencés par rapport aux témoins. En accord avec notre travail, Peracchi et al.³¹² et Scalabrino et al.³¹³ ont rapporté que la concentration de TNF- alpha est inversement proportionnelle à la concentration de vitamine B12 chez des patients qui ont une déficience en vitamine B12. Le mécanisme par lequel la carence en vitamine B12 stimule la production de TNF- alpha n'est pas encore élucidé. Il est possible que la voie de signalisation de p38 soit impliquée, comme le suggèrent nos résultats qui mettent en évidence une augmentation de la protéine p38 dans le côlon des rats carencés. L'activation de la cPLA2 est également sous l'influence de p38, par phosphorylation sur la Ser505.³¹⁴ La cPLA2 dégrade les phospholipides membranaires en acide arachidonique, qui est le substrat des cyclo-oxygénases (COX) et de la lipooxygénase (LOX). Les COX sont de deux types: la COX1 est constitutivement présente et active dans

presque toutes les cellules. Elle induit la synthèse des prostaglandines physiologiques qui jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité intestinale.³¹⁵ La COX2 est synthétisée et induite par les cytokines pro-inflammatoires, comme IL-1U et TNF- alpha.³¹⁶ Elle favorise la synthèse des prostaglandines impliquées dans l'inflammation.³¹⁷ La lipo-oxygénase (LOX) produit les leucotriènes (LTB4, C4, D4, E4) qui augmentent la perméabilité capillaire et le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles. Ces médiateurs de l'inflammation (PGs et LTs) sont augmentés dans la muqueuse colique des patients souffrants de MICI et jouent un rôle très important dans la pathogénie de ces maladies.³¹⁸ Récemment, Leoncini et al.³¹⁹ ont trouvé que l'incubation des plaquettes avec l'homocystéine stimule la production de TXB2 via l'activation de P38/cPLA2. Ces données suggèrent qu'une hyperhomocystéinémie pourrait aggraver les MICI en modifiant la production de prostaglandines et de leucotriènes via la voie p38/cPLA2.

En résumé, dans cette étude, nous avons mis en évidence une augmentation importante de cPLA2 consécutive à la carence en donneurs de méthyles. L'augmentation de cPLA2 pourrait être liée à l'augmentation de la protéine p38, qui est un régulateur de cPLA2.

Ensuite, nous avons étudié l'expression de COX1, COX2 et 5-LOX dans le côlon des rats.

Les résultats des Western Blots montrent que la protéine COX2 est augmentée dans le côlon des rats carencés traités par DSS comparativement aux rats non carencés traités par DSS. Par contre, il n'y a pas de modification de l'expression de COX1 ni 5-LOX. Ainsi, l'aggravation de la réaction inflammatoire en cas de carence pourrait être expliquée par l'augmentation de l'expression de cPLA2 et COX2. COX2 n'est pas exprimée dans le côlon des sujets sains et les patients atteints de MICI en rémission. La protéine COX2 est aussi exprimée dans le côlon inflammatoire des patients atteints de MICI active. L'expression de COX2 est régulée par plusieurs facteurs de transcription, notamment NF-kappaB.³²⁰ Il est donc possible que

l'augmentation de ROS ou TNF-alpha, qui sont tous activateur de NF-kappaB, contribue à l'élévation de l'expression de COX2.

En conclusion, une carence en donneurs de méthyles pourrait avoir pour conséquence une sur-expression de facteurs pro-inflammatoires, entraînant ainsi un effet aggravant de la carence en folate et en vitamine B12 sur des lésions expérimentales de maladies inflammatoires intestinales. Une attention particulière doit donc être donnée à la présence d'une carence en folate et en vitamine B12 chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales.

3.6-Publication n°6: « Une carence en donneurs de méthyles affecte la différenciation cellulaire et le fonctionnement de la barrière intestinale au niveau de l'intestin grêle chez le rat. » (British Journal of nutrition, vol.16, juillet 2012)

3.6.1-Introduction

Les maladies inflammatoires intestinales, comprenant la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, sont des désordres inflammatoires chroniques du tractus gastrointestinal.³²¹ Environ 1.4 millions de personnes aux Etats-Unis pourraient souffrir d'une maladie inflammatoire intestinale.¹⁵ Les concepts actuels de la pathogénie des maladies inflammatoires intestinales suggèrent des interactions complexes entre des facteurs génétiques, nutritionnels, environnementaux et la flore digestive.³²¹ L'hyperhomocystéinémie légère à modérée et les variantes génétiques du métabolisme des monocarbones sont associés aux maladies inflammatoires intestinales.^{286,269,281} Des concentrations élevées d'homocystéine sont retrouvées dans la muqueuse colique de patients atteints de maladies inflammatoires intestinales.^{260,322} Comme nous l'avons démontré dans l'étude précédente, dans le colon une carence en donneurs de méthyles due à un déficit en folate et en vitamine B12 dans

l'alimentation, entraînant ainsi une élévation du taux d'homocystéine, aggrave les lésions de colite expérimentale chez le rat en augmentant le stress oxydant, en diminuant l'apoptose cellulaire et en activant des mécanismes pro-inflammatoires.³²³ Dans la muqueuse gastrique de rats, la carence en donneurs de méthyles affecte l'organisation cellulaire et leur fonction, avec une altération de couche de mucine en surface et la réduction de l'épaisseur des glandes.³²⁴

La maladie de Crohn peut atteindre le colon mais aussi l'intestin grêle. Un tiers des patients présente ainsi une iléite, une colite ou une iléo-colite au moment du diagnostic.¹⁷¹ L'apoptose des lymphocytes T joue un rôle clé dans la physiopathologie des maladies inflammatoires intestinales.³²⁵ Un ratio perturbé entre des voies pro-apoptotiques et des voies anti-apoptotiques entraînent une résistance à l'apoptose chez les patients atteints de la maladie de Crohn.³²⁶ En modulant les différentes voies de régulation de l'apoptose³²⁷, le statut de donneurs de méthyles pourrait contribuer au maintien de l'homéostasie intestinale.²⁶⁹ Les maladies inflammatoires intestinales sont caractérisées par un défaut de la barrière intestinale et de la fonction sécrétoire.³²⁸ La barrière intestinale, un système complexe formé par les cellules épithéliales et la couche de mucus, est un élément majeur de l'homéostasie intestinale.³²⁹ La phosphatase alcaline intestinale est impliquée dans le maintien de l'homéostasie de la flore digestive.³³⁰ Des défenses antimicrobiennes perturbées provenant des cellules de Paneth pourraient être un facteur critique de la pathogénie de la maladie de Crohn.^{157,331} La voie Wnt/ β -caténine joue un rôle essentiel durant le développement et l'homéostasie adulte, incluant ainsi la détermination, la prolifération, la migration, et la différenciation de l'intestin.³³²

Les effets d'une carence en donneurs de méthyles sur la différenciation et le fonctionnement de la barrière intestinale sont inconnus. Ce travail a étudié l'impact d'une carence en donneurs de méthyles (régime sans folate, vitamine B12 et choline) sur l'organisation, l'apoptose, la

prolifération et la différenciation au niveau des parties proximales et distales de l'intestin grêle chez des rats issus de mères carencées en donneurs de méthyles durant la grossesse et l'allaitement.

3.6.2-Matériel et méthodes.

L'ensemble des techniques et des protocoles réalisés est résumé sous forme de fiches techniques dans la partie annexe du manuscrit.

En résumé, l'étude a porté sur 18 rats: 10 issus de mères carencées en folate et en vitamine B12 durant la gestation et l'allaitement et 8 issus de mères ayant reçu un régime normal.

Une étude morphologique de l'intestin grêle proximal et distal est réalisée pour chaque raton à partir de prélèvements fixés dans le formol, sur coloration standard HES.

Le taux de prolifération est évalué par immunomarquage à l'aide des anticorps anti-Ki-67, PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), Phosphohistone H3 et MCM-6 (Minichromosome Maintenance Protein).

Le taux d'apoptose est déterminé par marquage des cellules apoptotiques par immunodétection de l'antigène caspase-3 clivée et par la technique Apostain.

La différenciation entérocytaire est étudiée grâce à la détection de l'activité de la phosphatase alcaline.

L'étude des cellules à mucus est réalisée par immunodétection de MUC-2 et par marquage des mucines par les colorations spéciales PAS et Bleu Alcian.

L'étude des cellules de Paneth est faite par immunomarquage à l'aide de l'anticorps anti-lysosyme.

L'étude des interactions β -caténine/E-cadherine et de la phosphorylation de β -caténine est réalisée par technique duolink sur l'intestin grêle distal avec évaluation de l'expression des

protéines PP2A (Protéine Phosphatase A2), cdx-2, Cycline E, cdk-2 et β -caténine par western-blot.

3.6.3-Résultats

3.6.3.1-Confirmation de la carence en donneurs de méthyles

Les taux de vitamine B12, folate et homocystéine sont mesurés à partir d'échantillons sanguins prélevés chez chaque raton. A 26 jours de vie, on constate chez les animaux carencés une nette diminution des concentrations de vitamine B12 (778 ± 229.13 chez les contrôles vs. 298 ± 93.53 pM chez les animaux carencés, $p=0.0003$) et de folate (104 ± 31.03 chez les contrôles vs. 13.5 ± 5.10 chez les animaux carencés, $p=0.0004$), associée à une augmentation de la concentration plasmatique d'homocystéine (6.98 ± 0.94 chez les contrôles vs. 55.6 ± 6.49 chez les animaux carencés, $p=0.0011$). Les résultats sont résumés dans le tableau 17.

Tableau 17. Taux plasmatiques d'homocystéine, de vitamine B12 et de vitamine B9 (folate) chez les animaux carencés et les animaux contrôle.

	Concentration plasmatique d'homocystéine (μ M)	Concentration plasmatique de vitamine B12 (pM)	Concentration plasmatique de vitamine B9 (nM)
Contrôles (n=8)	6,98 +/- 0.94	778+/-229.13	104+/-31.03
Carencés (n=10)	55.6 +/- 16.49*	298+/-93.53*	13.5+/-5.10*

Les résultats sont exprimés en moyennes +/- Ecart-type, * Contrôles versus carencés, $p<0.01$, U Mann Withney test.

3.6.3.2-Effets de la carence sur le poids et l'aspect morphologique de la paroi intestinale grêle au niveau distal et proximal.

Au moment du sevrage, les animaux carencés (n=10) pèsent statistiquement moins que les animaux contrôles (n=8) ($31.57\text{g} \pm 6.84$ chez les contrôles vs. 21.41 ± 0.96 chez les carencés, $p=0.0004$).

La paroi intestinale distale chez les animaux carencés (Figure 22D) présente une hypotrophie globale par rapport à celle des animaux contrôles (Figure 22C). Par contre, aucune différence au point de vue de l'épaisseur n'est observée au niveau de la paroi intestinale proximale entre les animaux contrôles et carencés. (Figure 22A et 22B)

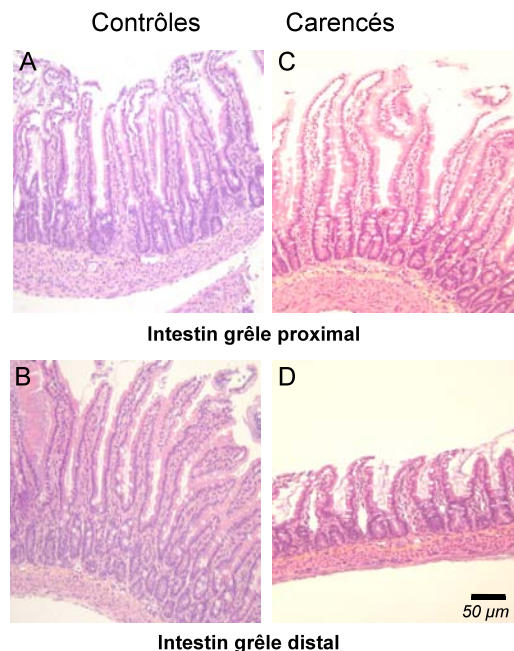


Figure 22: Aspect de la paroi intestinale grêle en microscopie optique au niveau proximal (A et B) et au niveau distal (C et D) chez les animaux contrôles (A et C) et chez les animaux carencés (B et D). (HES x 200)

Comme décrits au niveau du tableau 18, des modifications majeures sont observées au niveau de l'intestin grêle distal chez les animaux carencés en donneurs de méthyles. L'épaisseur de l'intestin distal des animaux carencés étaient plus petite que celle observée chez les animaux contrôles ($0.30\text{ mm} \pm 0.03$ chez les carencés vs. $0.58\text{ mm} \pm 0.11$ chez les contrôles, $p=0.0003$)

alors qu'aucune différence n'était observée au niveau de l'épaisseur de l'intestin grêle proximal ($0.41 \text{ mm} \pm 0.07$ chez les carencés vs. $0.43 \text{ mm} \pm 0.09$ chez les contrôles, $p=0.45$). L'intestin grêle distal des animaux carencés était le siège d'une hypotrophie globale de la paroi avec une hauteur des villosités plus petite ($0.17 \text{ mm} \pm 0.05$ chez les carencés vs. $0.33 \text{ mm} \pm 0.03$ chez les contrôles, $p=0.004$), une longueur des cryptes plus petite ($0.08 \text{ mm} \pm 0.01$ chez les carencés vs. $0.14 \text{ mm} \pm 0.04$ chez les contrôles, $p=0.0009$), une épaisseur de la sous-muqueuse plus petite ($0.01 \text{ mm} \pm 0$ chez les carencés vs. $0.03 \text{ mm} \pm 0.01$ chez les contrôles, $p=0.0045$) et une épaisseur de la musculature plus faible (interne : $0.03 \text{ mm} \pm 0.01$ chez les carencés vs. $0.048 \text{ mm} \pm 0.02$ chez les contrôles $p=0.0016$; externe: $0.017 \text{ mm} \pm 0$ chez les carencés vs. $0.028 \text{ mm} \pm 0.01$ chez les contrôles, $p=0.003$). Le ratio hauteur des villosités sur longueur des cryptes n'était pas modifié entre les animaux carencés et les non carencés. (0.44 ± 0.12 vs. 0.41 ± 0.1 respectivement, $p=0.6$). Au niveau de l'intestin grêle distal, l'épaisseur des villosités était de façon significative plus petite chez les animaux carencés que chez les contrôles ($0.05 \text{ mm} \pm 0.014$ chez les carencés vs. $0.067 \text{ mm} \pm 0.004$ chez les contrôles, $p=0.0004$) avec une diminution de la taille des entérocytes ($0.017 \text{ mm} \pm 0.001$ chez les carencés vs. $0.024 \text{ mm} \pm 0.003$ chez les contrôles, $p=0.0003$), alors que l'épaisseur de l'axe conjonctivo-vasculaire des villosités n'était pas affectée par le régime carencé ($0.017 \text{ mm} \pm 0.003$ chez les carencés vs. $0.018 \text{ mm} \pm 0.002$ chez les contrôles, $p=0.96$).

Au niveau de l'intestin grêle proximal, des modifications mineures étaient observées chez les animaux carencés avec une épaisseur des cryptes plus petite ($0.025 \text{ mm} \pm 0.004$ chez les carencés vs. $0.03 \text{ mm} \pm 0.005$ chez les contrôles, $p=0.004$), une épaisseur des villosités plus petite ($0.04 \text{ mm} \pm 0.006$ chez les carencés vs. $0.05 \text{ mm} \pm 0.006$ chez les contrôles, $p=0.028$) et une épaisseur des axes conjonctivo-vasculaires villositaires plus faible ($0.016 \text{ mm} \pm 0.001$ chez les carencés vs. $0.018 \text{ mm} \pm 0.004$ chez les contrôles, $p=0.043$). La carence en donneurs de méthyles n'affectaient pas les autres paramètres, à savoir la hauteur des villosités,

l'épaisseur de la sous-muqueuse, l'épaisseur de la musculature, la densité des cryptes, la taille des entérocytes et le ratio hauteur villosité sur longueur des cryptes.

L'ensemble de ces résultats indique donc que la carence en donneurs de méthyles affecte de façon différente l'intestin grêle distal et l'intestin grêle proximal avec des modifications majeures au niveau de l'intestin grêle distal caractérisées par une hypotrophie globale de la paroi.

Tableau 18: Modifications morphologiques au niveau de l'intestin grêle proximal et distal chez les animaux carencés en donneurs de méthyles et chez les animaux contrôles.

	INTESTIN PROXIMAL		INTESTIN DISTAL	
	Contrôles	Carencés	Contrôles	Carencés
Epaisseur de la paroi (mm)	0.43 ± 0.09	0.41 ± 0.07	0.58 ± 0.11	0.30 ± 0.03**
Hauteur des villosités (mm)	0.24 ± 0.04	0.26 ± 0.06	0.33 ± 0.05	0.17 ± 0.03**
Longueur des cryptes (mm)	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.14 ± 0.04	0.08 ± 0.01**
Epaisseur de la sous-muqueuse (mm)	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0**
Epaisseur de la musculature (interne-externe) (mm)	0.045 ± 0.02-0.025 ± 0.01	0.034 ± 0.01-0.017 ± 0.01	0.048 ± 0.02-0.03 ± 0.01	0.028 ± 0.01**-0.017 ± 0**
Ratio hauteur villosités/longueur cryptes.	0.37 ± 0.1	0.34 ± 0.09	0.41 ± 0.1	0.44 ± 0.12
Densité de cryptes (pour 0.02 mm ²)	9.37 ± 2.3	10.4 ± 4.4	9.25 ± 0.7	9 ± 1.4
Densité de villosité (pour 1 mm)	14.6 ± 1.5	14.7 ± 1.3	13.5 ± 1.6	13.2 ± 1.8
Epaisseur des cryptes (mm)	0.033 ± 0.005	0.025 ± 0.004**	0.026 ± 0.003	0.029 ± 0.008
Epaisseur des villosités (mm)	0.055 ± 0.006	0.048 ± 0.006*	0.067 ± 0.004	0.05 ± 0.014**
Epaisseur de l'axe villositaire (mm)	0.018 ± 0.004	0.016 ± 0.001*	0.018 ± 0.002	0.017 ± 0.003
Taille des entérocytes (hauteur en mm)	0.018 ± 0.002	0.017 ± 0.002	0.024 ± 0.003	0.017 ± 0.001**

Les résultats sont exprimés en moyenne ± Ecart Types ; * Contrôles versus carencés, p < 0.05; ** Contrôles versus carencés, p < 0.01, test de U Mann Whitney.

3.6.3.3-La carence en donneurs de méthyles affecte l'apoptose cellulaire et la prolifération au niveau de la muqueuse intestinale.

Les cellules marquées au sein des cryptes par l'anticorps anti caspase-3 clivée et la technique Apostain sont représentées dans la figure 23. Chez les ratons contrôles (Figure 23A et 23C), le nombre de cellules positives obtenus par immunomarquage de l'antigène caspase-3 clivée était significativement plus faible que celui observé chez les ratons carencés au niveau des cryptes de l'intestin grêle proximal ($3.5\% \pm 0.40$ chez les carencés vs. $1.4\% \pm 1.02$ chez les contrôles, $p=0.018$) (Figures 23B et 23E) et de l'intestin grêle distal ($3.37\% \pm 2.27$ chez les carencés vs. $0.4\% \pm 0.4$ chez les contrôles, $p<0.001$) (Figures 23D et 23E). L'index obtenu par la technique Apostain confirmait ces données avec une augmentation du nombre de cellules en apoptose dans les cryptes chez les animaux carencés à la fois au niveau proximal (12.93 ± 1.98 chez les carencés vs. $3.22\% \pm 0.37$ chez les contrôles, $p<0.001$) et au niveau distal de l'intestin grêle (9.28 ± 2.14 chez les carencés vs. 4.35 ± 0.64 chez les contrôles, $p=0.005$) (Figure 23F).

La prolifération cellulaire était évaluée par immunohistochimie utilisant 4 marqueurs: Phospho-Histone H3, un marqueur des cellules en phase tardive G2 et en phase mitotique³³³; Ki-67, une protéine présente durant toutes les phases actives du cycle cellulaire (G₁, S, G₂, et mitose)³³⁴; PCNA (proliferating cellular nuclear antigen), une protéine synthétisée durant la phase précoce de G1 et la phase S du cycle cellulaire³³⁴, et MCM-6 (Minichromosome maintenance protein-6), un marqueur de prolifération (présent dans la phase active du cycle cellulaire G₁, S, G₂, et mitose) et d'immaturité.³³⁵ Les résultats sont résumés dans la figure 23. Il n'y avait pas de différence concernant les index de prolifération obtenus avec le marqueur Phospho-Histone H3 entre les animaux carencés et contrôles (dans l'intestin proximal (Figure 23F): $4.1\% \pm 0.70$ chez les carencés vs. 4.18 ± 1.3 chez les contrôles, $p=0.81$; dans l'intestin distal (Figure 23F): $4.40\% \pm 0.77$ chez les carencés vs. 4.47 ± 1.3 chez les contrôles, $p=0.69$).

Les index obtenus par immunomarquage à l'aide de l'anticorps anti-Ki-67 dans les cryptes et les villosités au niveau de l'intestin grêle proximal et distal chez les animaux carencés et contrôles étaient à peu près similaires (Figures 23E et 23F). Le nombre de cellules positives après immunomarquage de MCM-6 était significativement plus élevé chez les animaux carencés dans les villosités au niveau de l'intestin grêle distal comparé aux contrôles (Figures 23C, 23D et 23F) ($55.8\% \pm 13.38$ chez les carencés vs. $3\% \pm 1.73$ chez les contrôles, $p=0.046$). Par contre, le nombre de cellules positives au sein des cryptes par immunomarquage de MCM-6 ne différait pas entre animaux carencés et contrôles au niveau de l'intestin grêle distal. ($84\% \pm 5.57$ vs. $83.83\% \pm 5.57$ respectivement, $p=0.82$). Au niveau de l'intestin grêle proximal, (Figures 23A, 23B et 23E) le niveau d'expression de la protéine MCM-6 était comparable au sein des villosités entre animaux carencés et contrôles ($2.67\% \pm 0.58$ chez les carencés vs. $3\% \pm 1$ chez les contrôles, $p=0.64$), alors qu'une diminution du nombre de cellules positives pour MCM-6 était observée dans les cryptes des animaux carencés ($52.83\% \pm 10.77$ chez les carencés vs. $83.17\% \pm 2.57$ chez les contrôles, $p=0.048$). Une diminution du nombre de cellules positives obtenues par immunomarquage de PCNA était notée au sein des cryptes de la muqueuse chez les animaux carencés au niveau de l'intestin grêle proximal (46.25 ± 9.21 chez les carencés vs. $59\% \pm 6.39$ chez les contrôles, $p=0.05$) (Figure 23E), alors qu'il n'y avait pas de différence entre animaux carencés et contrôles au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle distal (47.5 ± 9.21 vs. $59\% \pm 6.39$, respectivement, $p=0.47$) (Figure 23F).

L'ensemble de ces résultats montre donc une augmentation de l'apoptose au sein des cryptes à la fois au niveau de l'intestin grêle proximal et de l'intestin grêle distal. La prolifération cellulaire est également affectée avec une augmentation du nombre de cellules exprimant l'antigène MCM-6 au sein des villosités de l'intestin grêle distal et avec une diminution du nombre de cellules exprimant les antigènes MCM-6 et PCNA au niveau des

cryptes de l'intestin grêle proximal.

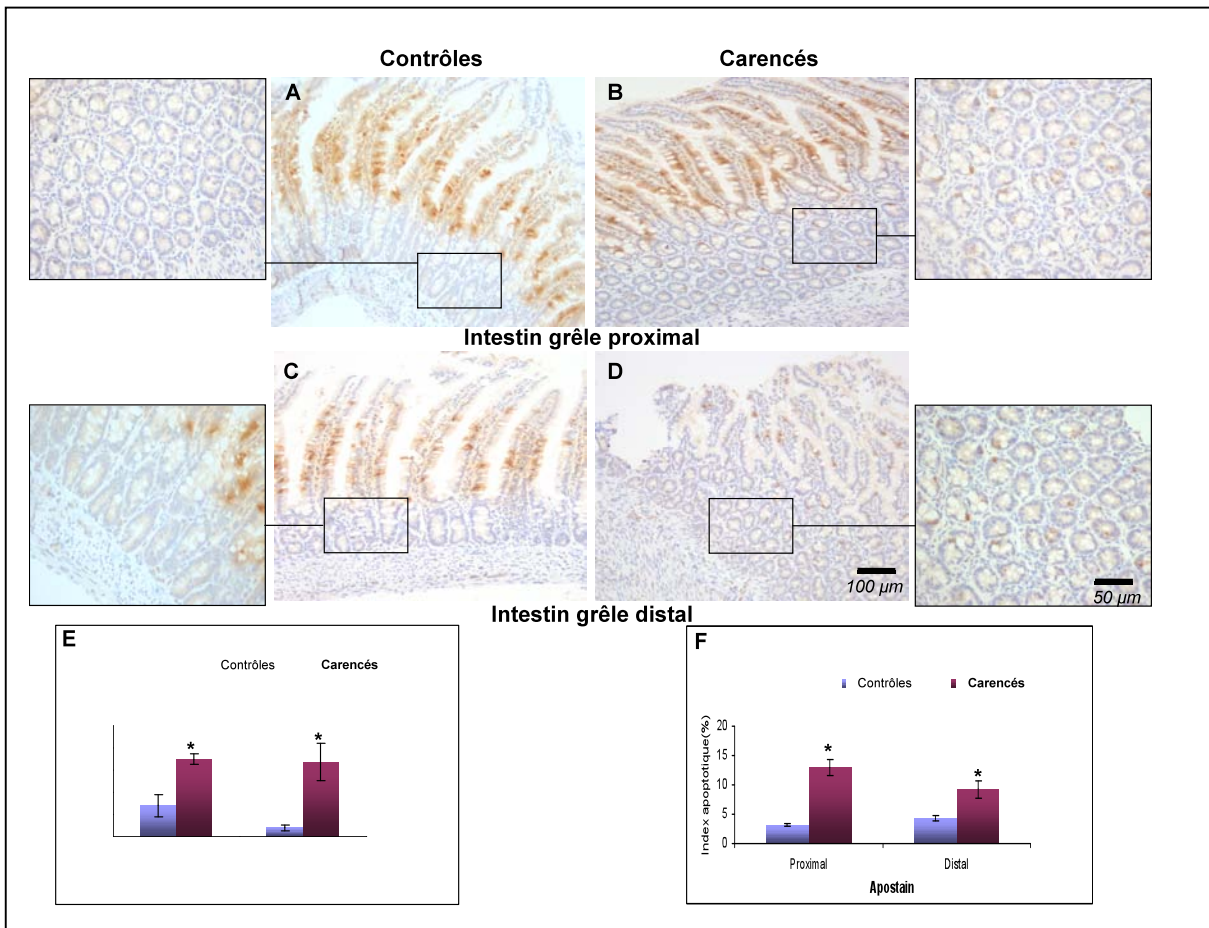


Figure 22: Marquage immunohistochimique de caspase-3 clivée au niveau de l'intestin grêle proximal chez les contrôles (22A) et chez les carencés (22B) montrant une augmentation du nombre de cellules marquées au sein des cryptes chez les animaux carencés. La même observation était faite au niveau de l'intestin grêle distal chez les contrôles (22C) et chez les carencés (22D) (x400). Graphique E: Résultats des index obtenus par immunodétection de l'antigène caspase-3 clivée, exprimés en moyenne et dérivation standard. * Contrôles (n=8) versus animaux carencés (n=10), $p < 0.05$, test de U Mann Withney. Graphique F: Résultats

des index obtenus par technique Apostain, exprimés en moyenne et dérivation standart. *

Contrôles (n=3) versus animaux carencés (n=3), $p < 0.05$, test de U Mann Withney.

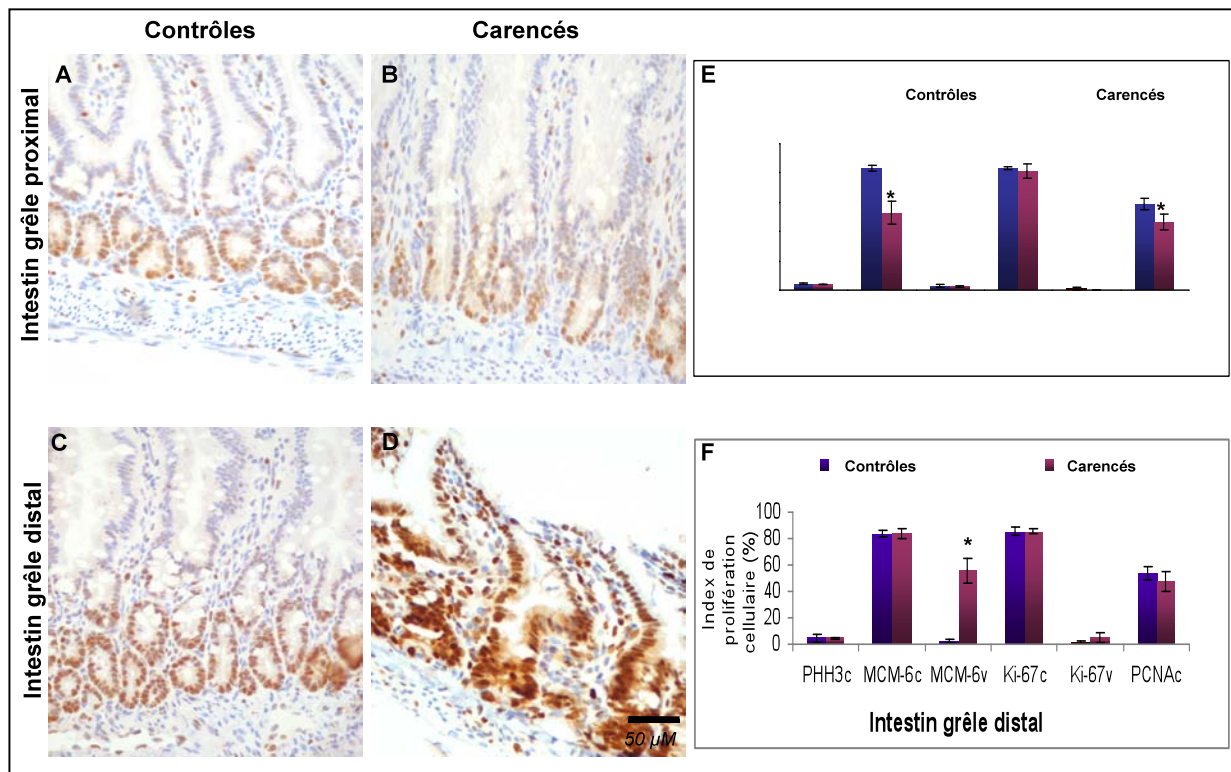


Figure 23: Immunomarkage de l'antigène MCM-6 au niveau de l'intestin grêle proximal chez les contrôles (23A) et chez les carencés (23B) retrouvant une diminution du nombre de cellules marquées dans les cryptes des animaux carencés. Au niveau de l'intestin grêle distal le nombre de cellules marquées était à peu près comparable chez les carencés (23D) et chez les contrôles (23C), alors qu'il était augmenté dans les villosités (23D) (x400). Graphiques E et F: Résultats des index de prolifération après immunomarkage de Phospho-Histone H3, Ki-67, MCM-6 et PCNA. Les résultats sont exprimés en moyennes et dérivations standarts au niveau de l'intestin grêle proximal (23E) et de l'intestin grêle distal (23F). * Contrôles (n=4) versus carencés (n=4), $p < 0.05$, test de U Mann Withney. (PHH3c: index Phospho-Histone H3 dans les cryptes; MCM-6c: index MCM-6 dans les cryptes; MCM-6v: index MCM-6 dans les villosités; Ki-67c: index Ki-67 dans les cryptes; Ki-67v: index Ki-67 dans les villosités, PCNAc: index PCNA dans les cryptes).

3.6.3.4-La carence en donneurs de méthyles affecte la différenciation entérocytaire au niveau de l'intestin grêle distal.

Dans les entérocytes des animaux contrôles (Figures 24A, 24A1, 24C et 24C1), des modifications graduelles histomorphologiques étaient notées selon la maturation de la base de la villosité vers le sommet des villosités, caractérisées par une augmentation de l'éosinophilie cytoplasmique et la présence d'un noyau plus rond et en situation basale au sein de la cellule. Par contre, chez les animaux carencés au niveau de l'intestin grêle distal, les entérocytes présentaient la même morphologie le long de la villosité, à savoir un cytoplasme plus sombre et un noyau plus allongé, positionné au centre de la cellule. Cet aspect était retrouvé de façon identique au niveau des entérocytes situés à la base et au sommet des villosités. (Figures 24D1 et 24D2) alors qu'il était différent chez les animaux contrôles (Figures 24C1 et C2). Au niveau de l'intestin grêle proximal, la morphologie des entérocytes chez les contrôles (Figures 24A1 et 24A2) et chez les carencés (Figures 24B1 et 24B2), indiquait une maturation normale des cellules entérocytaires.

Afin de caractériser ce phénotype, nous avons étudié l'expression d'un marqueur bien établi de maturation entérocytaire, appelé phosphatase alcaline intestinale ⁽²⁹⁾. Au niveau de l'intestin grêle proximal, une expression appropriée de phosphatase alcaline intestinale était observée chez les contrôles (Figure 24A3) et chez les carencés (Figure 24B3). Par contre, une expression très faible de phosphatase alcaline intestinale était observée chez les carencés (Figure 24D3) comparée aux contrôles (Figure 24C3) au niveau de l'intestin grêle distal. De plus, comme montré sur la figure 23D, une expression persistante inappropriée de MCM-6, un marqueur d'immaturité épithéliale villositaire, le long de toute la hauteur de la villosité était observée au niveau de l'intestin grêle distal des animaux carencés.

Ces résultats indiquent donc une perte de la différenciation entérocytaire chez les rats carencés au niveau de l'intestin grêle distal.

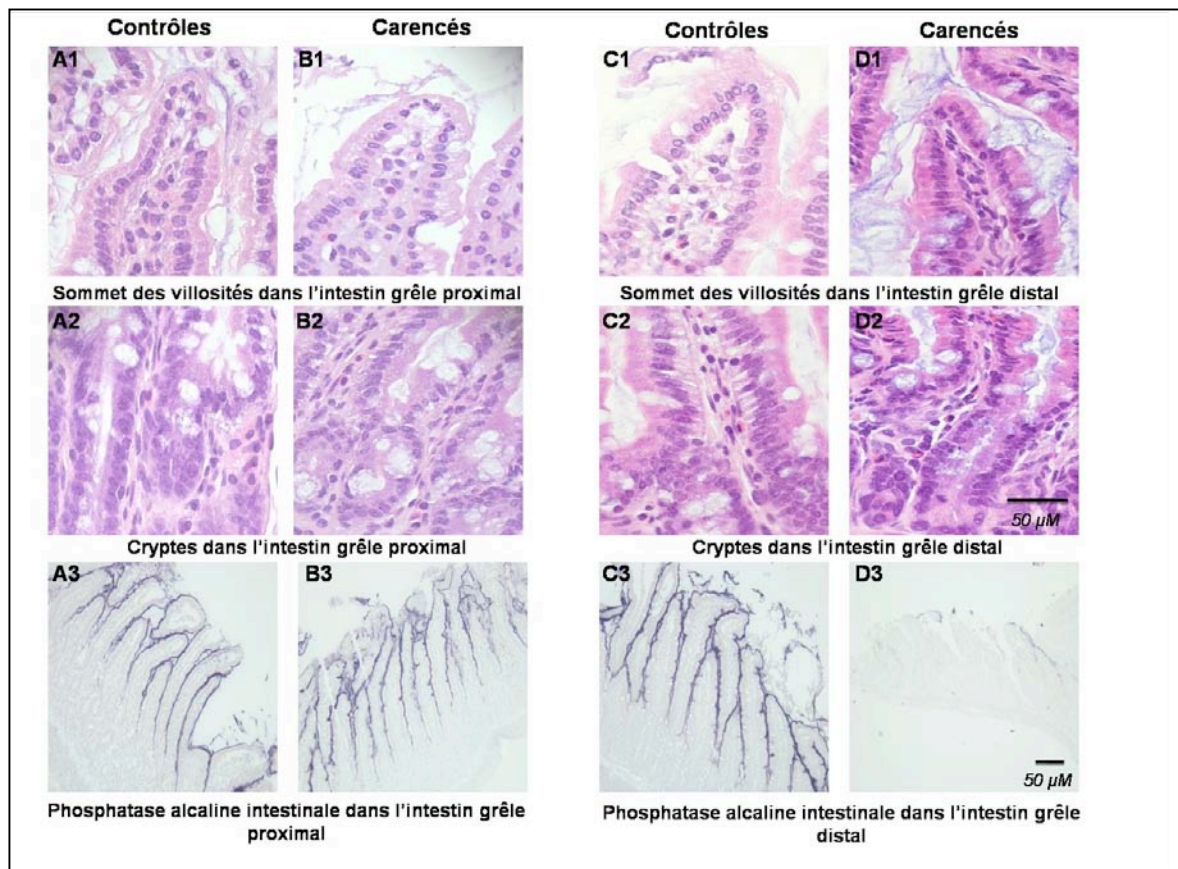


Figure 24: Colorations HES comparant la morphologie des entérocytes au niveau des cryptes (24A2, B2, C2 et D2) et du sommet des villosités (24A1, B1, C1, D1) : on retrouve une morphologie normale de la maturation entérocytaire au niveau de l'intestin grêle proximal des contrôles (24A1 et 4A2) et des carencés (24B1 and 4B2). Au niveau de l'intestin grêle distal l'absence de modifications morphologiques entérocytaires en comparant les cryptes (24D2) et le sommet des villosités (24D1) indique l'absence de maturation entérocytaire (x1000). Photos A3, B3, C3 et D3: Marquage de la phosphatase alcaline intestinale retrouvant une expression normale au niveau de l'intestin grêle proximal chez les contrôles (24A3) et chez les carencés (24B3), alors qu'une diminution de l'expression de phosphatase alcaline intestinale était notée au niveau de l'intestin grêle distal chez les animaux carencés (24D3) par rapport aux contrôles (24C3). (x400) (Contrôles n=3 et carencés n=3)

3.6.3.5- Une carence en donneurs de méthyles altère l'expression de β -caténine au niveau de l'intestin grêle distal.

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est impliquée par différents aspects dans le développement embryonnaire et dans l'auto-renouvellement des tissus adultes, incluant l'intestin.³³²

Park *et al.*³³⁶ ont démontré l'association de cdk2 avec la cycline E qui se lie directement à la β -caténine et entraîne sa dégradation rapide dans le cytoplasme de la cellule. Nous avons déjà démontré qu'un déficit cellulaire en vitamine B12 était associé à une diminution du taux d'expression de cdk2-cyclinE dans les cellules de neuroblastome.³³⁷ En rapport avec ces précédents résultats, l'analyse en western blot montrait une diminution du taux d'expression de β -caténine, cdk2 et cycline E chez les animaux carencés comparée aux animaux non carencés (Figure 25C). Les faibles taux de cycline E et de cdk2 pourraient refléter le mécanisme par lequel l'intestin limite la dégradation de β -caténine en cas de carence.

La Protéine Phosphatase 2A (PP2A) appartient à la famille des phosphatases sérine/thréonine.³³⁸ Au niveau de la membrane nucléaire, PP2A forme un complexe avec E-cadhérine et β -caténine, deux composants de la cascade de signalisation Wnt.³³⁸ Chez les embryons PP2A^{-/-}, à la fois la E-cadhérine et la β -caténine sont redistribuées dans le cytoplasme, entraînant une dégradation de β -caténine à la fois en présence et en l'absence d'un signal Wnt.³³⁸ L'analyse en western blot des extraits issus de l'intestin grêle distal retrouve une diminution des taux de PP2A_c (Figure 25C) et les résultats de la technique Duolink™ réalisée sur des coupes d'intestin grêle distal montre une diminution des interactions entre β -caténine et E-Cadhérine chez les animaux carencés par rapport aux animaux contrôles (22.7 ± 15.3 chez les carencés vs. 64.4 ± 29.7 chez les contrôles, $p < 0.001$)

(Figure 25A). Le défaut d'expression de β -caténine était accompagné par une augmentation de la phosphorylation de β -caténine sur les résidus sérine chez les animaux carencés par rapport aux contrôles (22.17 ± 12.62 chez les carencés vs. 10.86 ± 8.10 chez les contrôles, $p < 0.001$) (Figure 25B).

Nous avons préalablement démontré qu'un déficit en donneurs de méthyles diminuait l'expression de la protéine CDX2³³⁹, un régulateur majeur de la différenciation intestinale.³⁴⁰ Le niveau d'expression de CDX2 était comparable entre les animaux carencés et les contrôles (Figure 25C), indiquant ainsi qu'un déficit en donneurs de méthyles agissait sur la différenciation entérocytaire par altération de la voie de signalisation β -caténine et non par l'intermédiaire de l'expression de CDX2.

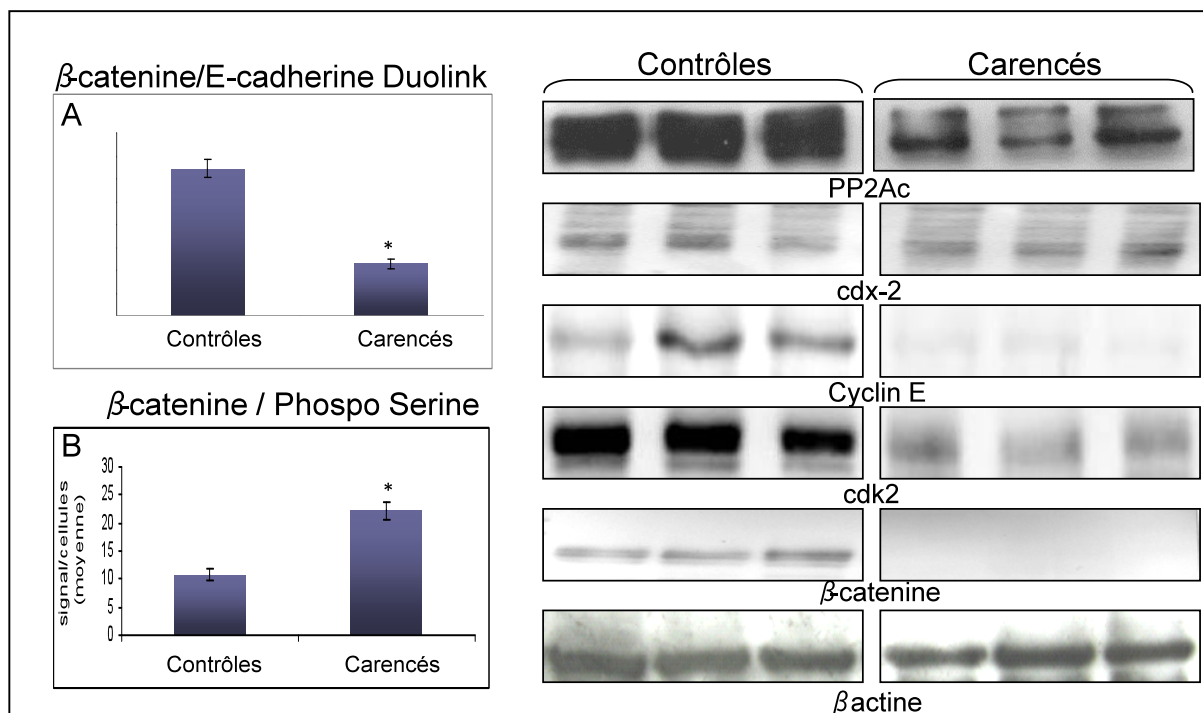


Figure 25 A: Résultats de la technique Duolink™ montrant une diminution des interactions β -Caténine/E-cadherine dans l'intestin grêle distal des rats carencés (étude réalisée sur 54 cellules épithéliales chez les contrôles et 57 cellules épithéliales chez les animaux carencés). Résultats exprimés en moyenne \pm DS (* $p < 0.0001$). La phosphorylation de β -Caténine sur les résidus sérine apparaît augmentée dans l'intestin grêle distal des rats carencés (25B) (étude

réalisée sur 52 cellules épithéliales chez les contrôles et 57 cellules épithéliales chez les animaux carencés). Résultats exprimés en moyenne \pm DS (* $p < 0.0001$). 25 C: L'étude en Western blot montre une diminution de l'expression de PP2Ac, cyclin E, cdk2 et β -caténine dans l'intestin grêle distal des rats carencés. Aucune différence d'expression n'est retrouvée concernant CDX-2 (β actine utilisée comme contrôle). (Contrôles $n=3$ and Carencés $n=3$).

3.6.3.6- Une carence en donneurs de méthyles agit sur l'organisation des cellules à mucus et des cellules de Paneth au niveau de l'intestin grêle proximal.

L'homéostasie intestinale chez les sujets sains est assurée en partie par un système complexe appelé «barrière intestinale», composée principalement par une couche de mucus qui contient des produits antimicrobiens.³²⁹ Un déficit global de la réponse immunitaire de la muqueuse (fonctionnalité de la barrière, réponses innée et adaptative) est observé dans les maladies inflammatoires intestinales.³²⁹ MUC-2 est un constituant macromoléculaire majeur du mucus intestinal.³⁴¹ Les cellules de Paneth sont des cellules épithéliales sécrétoires situées dans les cryptes de l'intestin grêle, connues pour synthétiser et sécréter de nombreux peptides antimicrobiens, incluant le lysozyme, la phospho-lipase A2 sécrétoire et les défensines humaines.

L'anticorps anti lysozyme a été utilisé pour marquer les cellules de Paneth. Comme décrit dans la figure 26, le nombre de cellules marquées était diminué au sein des cryptes de l'intestin grêle proximal chez les animaux carencés (Figure 26B) et l'index obtenu était significativement plus faible chez les rats carencés (Figure 26E) ($8.66\% \pm 3.7$ chez les carencés vs. $21.66\% \pm 3.61$ chez les contrôles). Au niveau de l'intestin grêle distal, la carence en donneurs de méthyles n'affectait pas le nombre de cellules de Paneth (Figures 26C, 26D et 26E).

Les cellules à mucus ont été évaluées par immunodétection de l'antigène MUC-2 et par un marquage à l'aide de colorations standards marquant les mucines (bleu Alcian pH 2.5, bleu Alcian pH 1.0 et acide périodique de Schiff (PAS)). Au niveau de l'intestin grêle proximal, l'index permettant d'évaluer les cellules à mucus obtenu par immunomarquage de MUC-2 au sein des cryptes et des villosités était significativement plus faible chez les animaux carencés (Figures 27B et 27E) comparé aux contrôles (Figure 27A) (dans les cryptes: $8.66\% \pm 1.52$ chez les carencés vs. $15.33\% \pm 1,52$ chez les contrôles; dans les villosités: $7\% \pm 1$ chez les carencés vs. $17\% \pm 2.64$ chez les contrôles). De plus, la coloration standard (PAS) (Figures 27A1, B1, C1 et D1) confirmait la diminution de production des mucines neutres et acides par les cellules à mucus (Figure 27B1 et 27E). Au niveau de l'intestin grêle distal, la carence en donneurs de méthyles n'influçait pas le nombre de cellules à mucus et la production de mucines (Figures 27C, 27C1, 27D, 27D1 et 27F).

L'ensemble de ces résultats montre que la carence en donneurs de méthyles agit sur l'organisation des cellules à mucus et des cellules de Paneth au niveau de l'intestin grêle proximal.

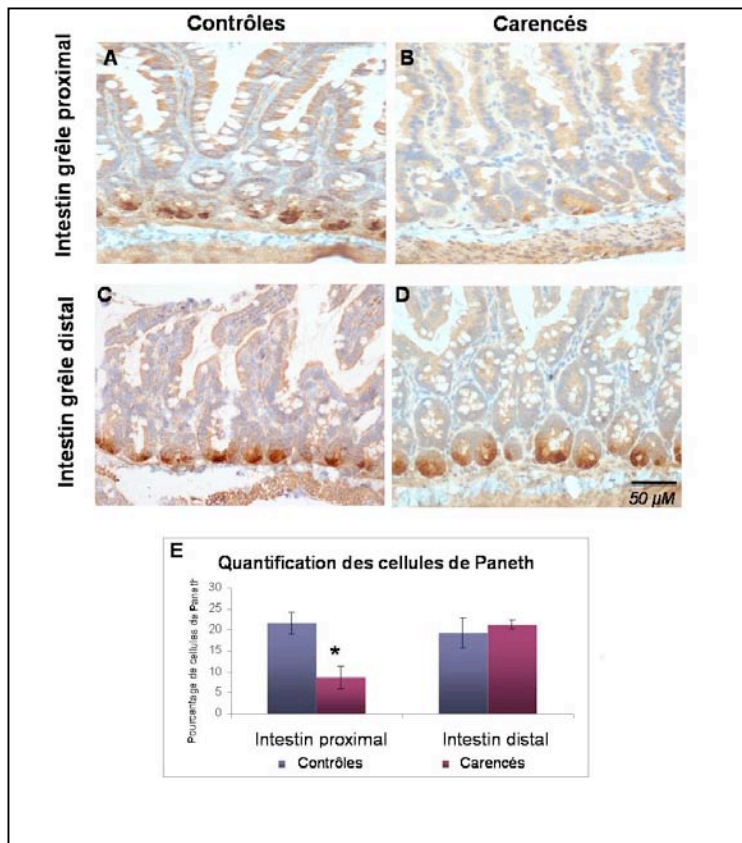


Figure 26: Immunomarquage de l'antigène lysosyme au niveau de l'intestin grêle proximal montrant une diminution du nombre de cellules marquées chez les carencés (26B) comparé aux animaux contrôles (26A). Au niveau de l'intestin grêle distal, aucune différence n'était observée entre contrôles (26C) et carencés (26D). (x400) Graphique E: les résultats des index obtenus après immunodétection du lysosyme sont exprimés en moyennes et dérivations standards (Contrôles n=3 et animaux carencés n=3). * Contrôles versus animaux carencés, $p < 0.05$, test de U Mann Withney.

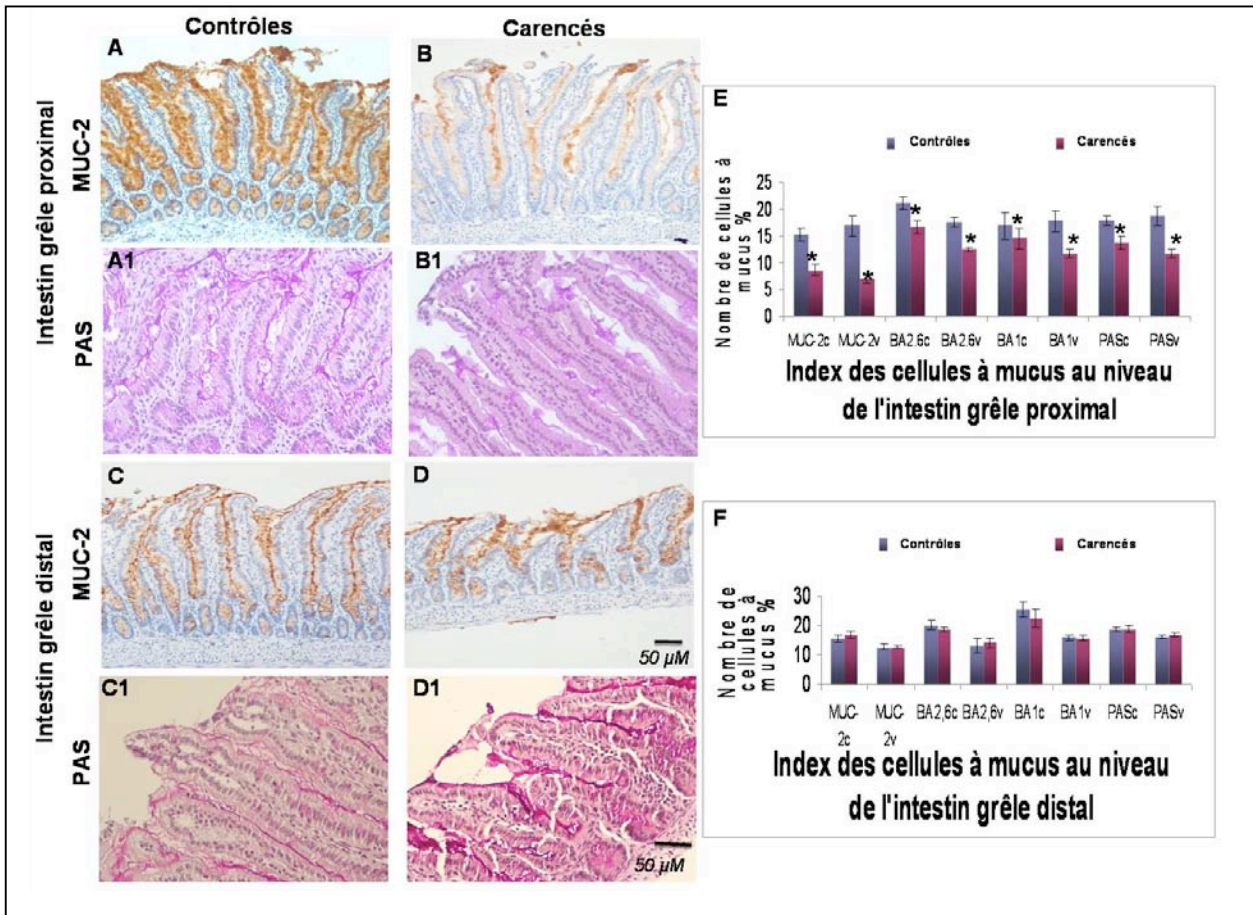


Figure 27: Immunodétection de Mucine-2 (MUC-2) au niveau de l'intestin proximal montrant une diminution du nombre de cellules marquées au sein des cryptes et des villosités chez les animaux carencés (27B), comparé aux contrôles (27A). Au niveau de l'intestin grêle distal, aucune différence n'était retrouvée entre les animaux contrôles (27C) et les carencés (27D). (x200). Les mêmes résultats étaient obtenus avec une coloration PAS (A1, B1, C1, D1). (x400) Graphiques E et F: les résultats des index de cellules à mucus obtenus après immunodétection de MUC-2 et colorations standards (Bleu Alcian pH=2.6, Bleu Alcian pH=1.0, PAS) au sein des cryptes et des villosités, sont exprimés en moyennes et en dérivations standard. (Contrôles n=3 et carencés n=3) * Contrôles versus carencés, $p < 0.05$, test de U Mann Withney. (MUC-2c: index MUC-2 au sein des cryptes; MUC-2v: index MUC-2 au sein des villosités; BA-1c: index Bleu Alcian pH=1.0 au sein des cryptes; BA-1v: index Bleu Alcian pH=1.0 au sein des villosités; BA-2.6c: index Bleu Alcian pH=2.6 au sein des

cryptes; BA-2.6v: index Bleu Alcian pH=2.6 au sein des villosités; PASc: index PAS au sein des cryptes; PASv: index PAS au sein des villosités.)

3.6.4-Discussion

Nous avons évalué pour la première fois l'effet d'une carence en donneurs de méthyles sur la structure et la fonctionnalité de l'intestin grêle distal et proximal chez le rat.

L'intestin grêle distal était affecté de façon importante par la carence comme l'illustre la présence d'une diminution marquée de l'épaisseur de la paroi associée à une hypotrophie globale chez les animaux carencés. Au contraire, l'épaisseur de la paroi intestinale grêle au niveau proximal n'était pas affectée par la carence. Ceci indique donc que la croissance de l'intestin grêle distal est particulièrement sensible à la carence en donneurs de méthyles.

L'homéostasie intestinale est physiologiquement régulée par une balance entre apoptose et prolifération cellulaire. L'augmentation du nombre de cellules en apoptose était observée au sein des cryptes au niveau de la muqueuse intestinale grêle distale et proximale. Nous avons rapporté des effets similaires de la carence en donneurs de méthyles au niveau de la muqueuse gastrique³²⁴ et de l'hippocampe³⁴², mais pas au niveau du côlon.³²³ Un traitement par homocystéine est connu pour induire l'apoptose sur différents types de cellules *in vitro*.^{327,343} Au sein de l'hippocampe de rats carencés en donneurs de méthyles, l'apoptose est augmentée dans les cellules contenant de l'homocystéine³⁴² alors qu'une restriction en vitamine n'influence pas le taux d'apoptose au sein des cryptes intestinales chez le rat.²⁹⁸ La mort cellulaire par apoptose dans les cryptes intestinales peut ainsi être induite par une hyperhomocystéinémie qui est connue pour induire des dommages au niveau de l'ADN et altérer la réparation de l'ADN.³⁴⁴

Conformément à des travaux antérieurs, l'homocystéine est connue pour susciter la prolifération cellulaire au sein des cellules musculaires lisses des vaisseaux³⁴⁵, de la microglie

³⁴⁶ ou de la muqueuse gastrique chez les rats carencés.³²⁴ L'effet pro-mitotique est associé à la production d'espèces actives d'oxygènes.³⁴⁷ D'autres études ont démontré que l'homocystéine induisait un arrêt du cycle cellulaire au niveau des hépatocytes³⁴⁸ ou des cellules endothéliales veineuses³⁴⁹ par diminution de l'induction de la voie des cyclines.³⁴⁹ Dans notre étude les effets d'une carence en donneurs de méthyles sur la prolifération cellulaire différaient entre intestin grêle proximal et distal, avec une diminution du nombre de cellules marquées au sein des cryptes avec les anticorps anti-MCM-6 et -PCNA au niveau de l'intestin grêle proximal, alors que les index obtenus avec les marqueurs Ki-67 et Phospho-Histone H3 n'étaient pas perturbés par la carence.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'arrêt du cycle cellulaire au sein des cryptes induit par une carence en donneurs de méthyles pourrait être lié à un nombre réduit de cellules en phase précoce de la phase G1, probablement par diminution de l'activité des kinases dépendantes des cyclines. Les protéines MCM sont connues pour être exprimées de façon abondante durant toutes les phases du cycle cellulaire (phase précoce de G1, G2, M et S) et sont dégradées dans les phases de quiescence, de sénescence et de différenciation.³³⁵ Le complexe protéique MCM est associé à la réplication de l'ADN en formant une partie du complexe pré-réplicatif. L'activation du complexe MCM par des kinases dépendantes des cyclines entraîne le début de la synthèse d'ADN.³⁵⁰ Au niveau de la muqueuse intestinale grêle distale, la carence en donneurs de méthyles était associée à une augmentation de l'expression de MCM-6 au sein des villosités, alors que le nombre de cellules exprimant l'antigène Ki-67 n'était pas affecté par la carence et aucun effet au sein des cryptes sur la prolifération cellulaire n'était observée. De plus, l'absence de dégradation de la protéine MCM-6 au sein des villosités était associée avec une absence de maturation morphologique entérocytaire et une diminution d'expression de la phosphatase alcaline intestinale, un

marqueur connu de différenciation entérocytaire³⁵¹, témoignant ainsi de l'effet potentiel de la carence en donneurs de méthyles sur la maturation des entérocytes.

La phosphatase alcaline intestinale joue un rôle clé dans la maintenance de l'homéostasie microbienne normale au niveau intestinal.³³⁰ Elle limite en effet l'accès des toxines et des microbes au niveau du tissu sous-jacent.³⁵² Tuin *et al.*³⁵³ ont ainsi montré une expression réduite des ARNm de la phosphatase alcaline intestinale chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales. La carence en donneurs de méthyles pourrait donc prédisposer au développement des maladies inflammatoires intestinales en diminuant la production de phosphatase alcaline intestinale au niveau de l'intestin grêle distal, le principal site intestinal atteint au cours de la maladie de Crohn.³⁵⁴ Une diminution d'expression de β -caténine et une diminution des interactions entre β -caténine et E-cadhérine pourrait expliquer le défaut de différenciation entérocytaire au niveau de l'intestin grêle distal chez les rats carencés.³³² Le faible niveau d'expression de PP2Ac chez les animaux carencés pourrait avoir pour conséquence une augmentation de la dégradation de la β -caténine.^{336,355}

Une carence en donneurs de méthyles affecte également l'intestin grêle proximal en réduisant le nombre de cellules de Paneth et de cellules à mucus avec une diminution de la synthèse des mucines. MUC-2 est un composant majeur de la barrière intestinale.³⁴⁹ Bien qu'il ne soit pas rapporté que des souris avec une diminution du nombre de cellules à mucus et de cellules de Paneth développent une inflammation spontanée^{356,357}, un modèle murin knockout pour le gène *Muc 2*, retrouve un développement spontané de lésions de colite, confirmant ainsi que MUC-2 joue un rôle critique dans la maintenance de l'homéostasie intestinale.^{119,358} En ce qui concerne les cellules de Paneth, le rôle clé des peptides antimicrobiens de l'intestin grêle a largement été démontré chez l'homme et chez la souris.³⁵⁹ Une diminution des alpha-défensines secrétées par les cellules de Paneth contribue fortement à la pathogénie de l'iléite au cours de la maladie de Crohn.³⁴¹ Les effets d'une carence en

donneurs de méthyles sur la barrière intestinale grêle devront faire l'objet d'investigations supplémentaires. Les modifications épigénétiques dues à la carence en donneurs de méthyles pourraient également permettre de mieux comprendre la carcinogénèse chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales.³³⁸

Beaucoup d'études ont exploré l'influence des déterminants nutritionnels pour l'hyperhomocystéinémie chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales et la plupart d'entre-elles rapporte la présence de faibles taux circulants de vitamine B12 et de folate chez les patients atteints de maladie inflammatoires intestinales.²⁶⁹ Nos résultats prouvent qu'un déficit en vitamine B12 et en folate joue un rôle dans la pathogénie de la maladie de Crohn.

Les effets différents d'une carence en donneurs de méthyles observés au niveau de l'intestin grêle distal et proximal chez les rats pourraient s'expliquer par des différences d'absorption des folates et la vitamine B12 le long de l'intestin grêle. En effet les protéines impliquées dans l'absorption des folates sont principalement exprimées au niveau de l'intestin grêle proximal³⁶⁰, alors que l'absorption de la vitamine B12 est principalement réalisée au niveau de l'intestin grêle distal.³⁶¹ Ce qui pourrait expliquer que la susceptibilité à une carence en donneurs de méthyles est différente entre les segments distaux et proximaux de l'intestin grêle.

En conclusion, nos résultats montrent qu'une carence en donneurs de méthyles durant la grossesse et l'allaitement affecte différemment la prolifération, la différenciation des cellules intestinales au niveau de l'intestin grêle proximal et distal. Les effets de la carence en donneurs de méthyles sur la différenciation entérocytaire pourraient être liés à une altération de la voie de signalisation de la β -caténine. Une carence en donneurs de méthyles pourrait être utilisée comme modèle expérimental pour la maladie de Crohn au niveau de l'intestin grêle. Ceci devra être étudié plus en profondeur.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons tout d'abord évalué l'apport de l'étude anatomopathologique des pièces opératoires dans la prise en charge post-opératoire des MICI. C'est ainsi que le pathologiste pourrait avoir un rôle plus important à jouer dans le suivi de ces malades en recherchant des facteurs prédictifs d'une récurrence post-opératoire. Comme le démontre notre étude, la présence de lésions de pléxite sur la recoupe proximale de pièces opératoires réséquées chez des patients atteints de maladie de Crohn était un facteur prédictif de recours à une seconde chirurgie. Cette analyse devrait donc être réalisée de façon systématique sur les pièces d'exérèse de patients atteints de la maladie de Crohn afin de prévenir au mieux la récurrence de la maladie. Par ailleurs, ces résultats permettent de proposer un mécanisme par lequel la maladie de Crohn récidive, à savoir une voie de dissémination via le système neurologique.

Nous avons par la suite pu mettre en avant le rôle clé joué par certains acteurs de l'immunité innée dans la pathogénie des MICI. La pathogénie de ces maladies est complexe, faisant intervenir à la fois l'immunité innée et l'immunité spécifique ou adaptative. Nos résultats démontrent que PPAR gamma et NLRP6 jouent un rôle majeur dans l'homéostasie intestinale et pourraient donc permettre une meilleure compréhension des MICI, ce qui pourrait aboutir à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Enfin, nous avons pu étudier pour la première fois les effets d'une carence en donneurs de méthyles sur l'intestin chez l'animal. Au niveau du côlon, une telle carence va aggraver l'inflammation intestinale par des mécanismes impliquant notamment l'apoptose, le stress oxydant et certains acteurs de l'inflammation. Au niveau de l'intestin grêle, une carence en donneurs de méthyles va affecter la différenciation cellulaire et le fonctionnement de la barrière intestinale chez le rat.

Les effets d'une carence en donneurs de méthyles sur le développement de l'intestin grêle sont différents en fonction de la zone étudiée de l'intestin grêle (proximale ou distale), suggérant ainsi que les voies et les mécanismes impliqués sont différents d'une région à une autre.

Ces résultats posent avant tout la question du dépistage systématique des carences en B12 et en folates chez les sujets atteints de MICI comme cela a été proposé dans les maladies cardiovasculaires. C'est ainsi que plusieurs questions restent en suspens après la publication de nos résultats parmi lesquelles: le rétablissement d'un régime normal en donneurs de méthyles permet-il une restitution ad integrum de l'intestin et un maintien de l'homéostasie intestinale ? La correction d'une carence en vitamine en folates et/ou vitamine B12 permet-elle de prévenir voire de traiter l'évolution de ces maladies invalidantes et fréquentes ? Des études d'intervention doivent être menées en ce sens chez l'homme.

MATERIEL ET METHODES

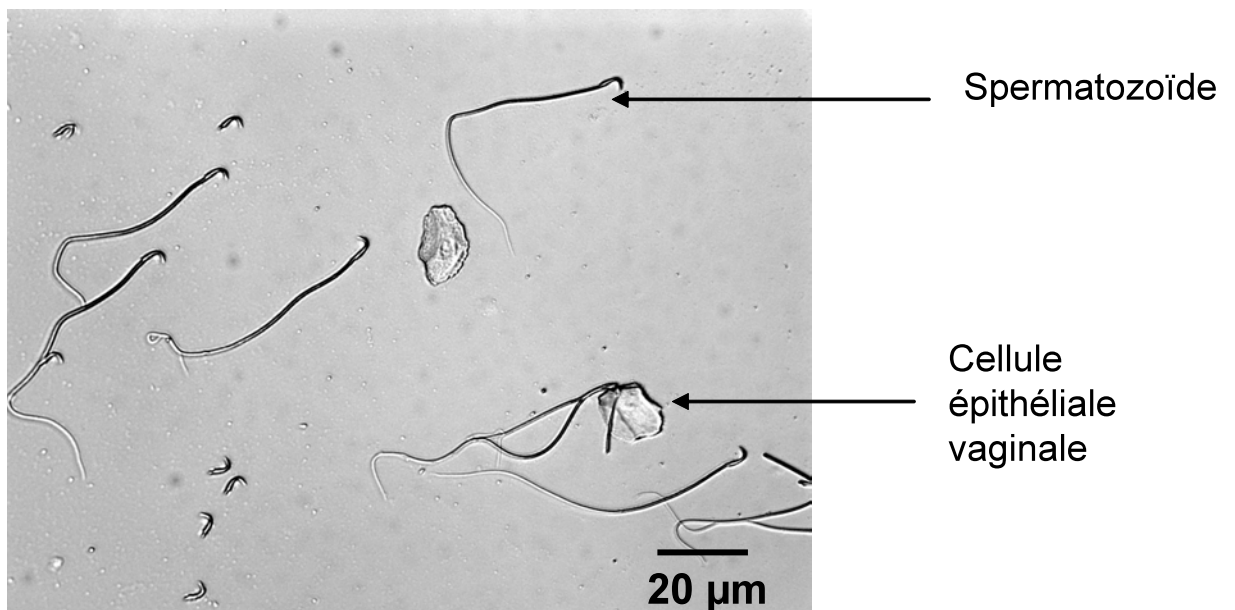
Fiche 1

Protocole animal

- Les animaux ont été traités en accord avec le N.I.H. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.
- Provenance des animaux : Charles River, l'Arbresle, France
- Espèce utilisée : rats Wistar
- Poids à l'arrivée : 180-210 g
- Age à l'arrivée : 2 mois
- Acclimatation : 2 semaines
- Environnement: conditions standard du laboratoire avec accès à volonté à la nourriture et à l'eau
- Rats mâles reproducteur : alimentés avec de la nourriture standard avant l'accouplement.
- Adaptation : un mois avant la mise en accouplement, 2 groupes de rates ont été créés selon le régime alimentaire fourni:

Groupes	Nombre de rates	Régime	Gavage
Témoin	2	Standard ①	eau
Carencé	2	Carencé ②	eau

- Accouplement : Après un mois d'adaptation les rates sont mises en présence des mâles. Après 24h, réalisation d'un frottis vaginal afin de témoigner du jour exact de l'accouplement :
- Utiliser un coton tige imbibé de sérum physiologique
 - Etaler le prélèvement sur une lame
 - Observer la lame au microscope
 - Si le test est positif, considérer le jour J0 de gestation et enlever le mâle de la cage
 - Si le test est négatif, laisser la rate en présence du mâle et recommencer la manipulation après 24h



Exemple de photo montrant un test positif

- Gestation : compter 20 jours à partir de J0.
- Poursuite du régime alimentaire, *ad libitum*, pour chaque groupe pendant la gestation et la période d'allaitement jusqu'au 21^{ème} jour après la naissance.

① Régime alimentaire normal : SAFE, Augy, France

vitamine B12 (0,04 mg/kg), folates (0,9 mg/kg), choline (2100 mg/kg)

② Régime carencé, Special Diet Service, Saint-Gratien, France

vitamine B12 (0 μg/kg), folates (0,01 mg/kg), choline (0,06 mg/kg)

Fiche 2 **Prélèvement des échantillons**

- Après 21 jours d'allaitement, anesthésier les rats avec un excès d'isoflurane (Isoflurane, Baxter). (contrôle n=8 et carencé n=10)
- Effectuer un prélèvement sanguin intracardiaque à l'aide d'une seringue héparinée ② pour l'analyse des concentrations plasmatiques en folates, vitamine B12 et homocystéine
- Recueillir le sang dans des tubes ③ contenant 50 µL d'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) et centrifuger à 3000 g pendant 20 min à 4°C pour récupérer le plasma.
- Peser chaque rat.
- Placer les rats sur la glace et disséquer chaque animal afin de récupérer les organes (foie, rein, cerveau, intestin grêle, colon...)
- Pour les prélèvements au niveau de l'intestin grêle, l'intestin est ouvert longitudinalement et des prélèvements sont réalisés selon le même protocole pour chaque animal : 2 prélèvements sont réalisés au même endroit au niveau de l'intestin grêle proximal, à 1 cm en dessous du duodénum. Deux autres prélèvements sont réalisés au niveau de l'intestin distal, au même endroit, au $\frac{3}{4}$ de la longueur totale de l'intestin.
- Au niveau de chaque site de prélèvement : un échantillon est directement congelé dans l'azote liquide puis placé à -80°C (pour les analyses de biologie moléculaire, western blot, dosages tissulaires). Un autre échantillon est placé dans une solution de méthylbutane froid (-30°C) puis conservé à -80°C (pour les études d'immunohistofluorescence) et enfin un dernier échantillon est fixé dans du formol à 10% (v/v) pH 7,4 (LABONORD S.A., Templemars) (pour les analyses morphologiques).

Fiche 3
Traitement des échantillons fixés

- Après fixation pendant 24h le formol, les prélèvements sont mis en cassette.
- Ils sont ensuite déshydratés et imprégnés de paraffine dans un automate de type Excelsior ES (Thermoscientific, Pittsburg) par passages dans une série de bains successifs de formol, d'alcool, de toluène et de paraffine.
- A partir des blocs de paraffine ainsi obtenus, des coupes de 5 μM d'épaisseur sont réalisées.
- Ces coupes sont ensuite montées à l'eau albumineuse sur des lames de verre traitées à la polylysine (Polylysine TM; VWR international, Leuven, Belgique) pour les colorations ordinaires ou spéciales ou à l'eau sur des lames de type X-traTM Adhesive (Leica, Peterborough, UK) pour les techniques immunohistochimiques.

Fiche 4
Réalisation de la coloration HES

- Les coupes sont colorées dans un automate (tissue-Tek DRS, Sakura, Nagano) par bains successifs :
- Toluène (Carlo-Erba, Val de Reuil)
 - Alcool 100° (VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois)
 - Alcool 95° (VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois)
 - D'Hematoxyline (Shardon Gill 2 Hematoxylin, Thermoscientific)
 - Eau acétifiée à 1% (eau + acide acétique (Merck, Darmstadt)
 - Eosine 1% (Diapath, Microstain Division, Martinengo)
 - Alcool 100°
 - Safran (Microm Microtech, Francheville)
 - Alcool 100°
 - Toluène
- Montage des lames avec lamelles 24x60mm (VWR) et Eukitt^R (Freiburg)

Fiche 5
Réalisation de la coloration spéciale PAS

- But : étude des mucines intestinales neutres et acides.

- Après déparaffinage et hydratation, immerger les coupes dans une solution d'acide périodique à 1% (m/v) pendant 15 minutes (acide périodique 1g (Merck, Darmstadt) et eau distillée 100mL).
- Rincer à l'eau courante
- Immerger les lames dans le réactif de Schiff (Merck, Darmstadt) pendant 20 minutes à l'abri de la lumière
- Rincer à l'eau courante
- Bain d'Hematoxyline (Shardon Gill 2 Hematoxylin, Thermoscientific) pendant 1 minute
- Rincer à l'eau courante
- Bains d'alcool (95° puis 100°) et toluène
- Montage des lames avec lamelles 24x60mm (VWR) et Eukitt^R (Freiburg)

Fiche 6
Réalisation de la coloration spéciale Bleu Alcian

- But : étude des mucines intestinales avec réalisation de la coloration bleu Alcian pH 2,5 pour l'étude des sialomucines acides et la coloration bleu Alcian pH 1,0 pour l'étude des sulfomucines acides

- Après déparaffinage et hydratation, immerger les coupes dans une solution fille de bleu Alcian, pH 2,6 dilué au ½ pendant 10 minutes ①
- Rinçage à l'eau courante
- Incubation des coupes pendant 1 minute avec de la safranine ②
- Rinçage à l'eau courante
- Séchage sur la platine
- Bain de toluène
- Montage des lames avec lamelles 24x60mm et Eukitt^R

Pour réaliser la coloration bleu Alcian pH 1,0, le pH est adapté au cours de la préparation de la solution fille de bleu Alcian par ajout d'acide chlorhydrique 37% (VWR).

① Solution fille obtenue à partir d'une solution mère diluée au ½ dans de l'eau milliQ ; solution mère de bleu alcian acétique pH 2,6 obtenue à partir de Bleu Alcian 8GX (1g) (Merck), Acide Acétique 100% (10 mL) et eau distillée (100 mL)

② Safranine : préparer une solution de tampon citrate 0.1 M pH4 à partir d'acide citrique (9.86g) (Interchim, Montluçon), Trisodium citrate (14.4g) (VWR), QSP 1L eau distillée. La solution obtenue est autoclavée. Mélanger la Safranine (0.75g, sigma chemical CO, St Louis) dans 100 mL de la solution de tampon citrate précédemment obtenue

Fiche 7

Détection de la phosphatase alcaline intestinale endogène

- But : détection de la phosphatase alcaline endogène par un substrat chromogène spécifique de la phosphatase alcaline : le 5-bromo-4-chloro-3-indoyle phosphate (BciP) et le nitro bleu de tétrazolium (NBT).
- Incubation des coupes par un mélange chromogène pendant 2 minutes par dépôt de quelques gouttes du mélange ①
- Arrêt de la réaction par rinçage des lames dans l'eau distillée.
- Montage des lames en milieu aqueux ②

① Mélange composé de 15 ml de solution tampon Tris BciP, 66µl de NBT et 50µl de BciP :

- composition de la solution tampon Tris BciP: 5 ml MgCl₂ 1M (VWR), 5 ml Tris 2M (MP Biochemicals, Illkirch), 2 ml NaCl 5M (VWR), eau distillée afin d'amener le volume à 100 ml. Le pH de la solution est ensuite amené à 9,5.
- composition de la solution de BciP: 25 mg de BciP (sigma chemical CO) dans 500µl de diméthylformamide (VWR)
- composition de la solution de NBT : 75mg de NBT dans 0,76 ml de formamide (Fluka Chemika, Buchs) et 0,23ml d'H₂O_K.

② Milieu de montage obtenu par mélange de polyvinyl alcool 40, 000 (12g) (sigma chemical CO) et de polyvinyl alcool 70, 000-100,000 (sigma chemical CO), eau distillée (30 mL) et tampon TRIS 0.2 M pH8 (60 mL)

Fiche 8

Etude morphologique

- Analyses effectuées en microscopie optique sur un microscope Olympus BX 60 (Rungis, France) avec si besoin un micromètre Olympus.
- Les paramètres étudiés sur coloration HES, sur les échantillons proximaux et distaux (contrôle n=8 et carencés n=10), sont:
 - l'épaisseur de la paroi intestinale
 - la hauteur des villosités
 - la profondeur des cryptes
 - l'épaisseur de la sous-muqueuse
 - l'épaisseur de la musculature interne et de la musculature externe
 - la densité des cryptes pour 1 mm^2
 - le nombre de villosité sur 1mm de long
 - l'épaisseur des villosités
 - la hauteur des entérocytes
 - l'épaisseur de l'axe villositaire
- Etude de la mucosécrétion par comptage des cellules à mucus sur les colorations spéciales PAS, Bleu Alcian pH=1,0 et Bleu Alcian pH=2,6 (contrôle n=3 et carencés n=3)
 - Détermination du pourcentage de cellules à mucus au sein des cryptes et des villosités (comptage effectué sur un total de 500 cellules) sur les échantillons distaux et proximaux
- Evaluation de l'activité des phosphatases alcaline intestinale endogène sur les échantillons distaux et proximaux (contrôle n=3 et carencés n=3)

- L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel Statview 5.0 software avec réalisation de test U Mann-Whitney (limite $p < 0.05$)

Fiche 9

Immunohistochimie

- Etude immunohistochimique réalisée selon la méthode streptavidine/biotine/peroxydase dans un automate Dakocytomation AutoStainer (Glostrup, Denmark) selon le protocole suivant :
 - Les coupes sont déparaffinées et réhydratées
 - Un démasquage des sites antigéniques est réalisé par incubation des coupes pendant 20 minutes à 97°C dans une solution de Tris-citrate buffer pH 6.0^① dans un automate PT Link (Dakocytomation, Glostrup, Denmark)
 - Lavage 20 minutes dans une solution de tampon Tris-HCl Tween^②
 - Blocage de l'activité des peroxydases endogènes par incubation pendant 10 minutes dans une solution de peroxyde d'hydrogène 3% (Dako)
 - Lavage 5 minutes dans une solution de tampon Tris-HCl Tween
 - Incubation de l'anticorps primaire (voir liste ci-après) selon les dilutions indiquées (dilution réalisée dans diluant pour anticorps (Dako)), à température ambiante pendant 30 minutes
 - Lavage 5 minutes dans une solution de tampon Tris-HCl Tween
 - Incubation avec l'anticorps secondaire biotinylé (cf tableau ci-après) (dilution réalisée dans une solution de tampon Tris) ^③
 - Lavage 5 minutes dans une solution de tampon Tris-HCl Tween
 - Incubation des coupes avec une solution de Streptavidine/Peroxydase au 1/480
 - Lavage 5 minutes dans une solution de tampon Tris-HCl Tween
 - Révélation par incubation des coupes avec une solution de Tris 0.05M pH 7.6 DAB ^④ pendant 10 minutes
 - Lavage 5 minutes dans une solution de tampon Tris-HCl Tween
 - Contre-coloration avec de l'Hematoxyline 1/10 (Dako) pendant 5 minutes
 - Arrêt de la réaction par rinçage à l'eau distillée
 - A noter la réalisation pour chaque technique de témoins négatifs par omission de l'anticorps primaire

Anticorps primaires	Source	Dilution	Fournisseur
Ki-67	Polyclonal de lapin	1/100	Thermo Scientific, Courtaboeuf, France
MUC-2	Polyclonal de lapin	1/200	SantaCruz Biotechnology, INC
lysosyme	Polyclonal de lapin	1/1000	Dakocytomation, Glostrup, Danemark
Caspase-3 clivée	Polyclonal de lapin	1/400	Cell Signalling Technology, USA
Phospho-Histone H3	Polyclonal de lapin	1/2000	Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japon
MCM-6	Polyclonal de chèvre	1/400	SantaCruz Biotechnology, INC
β-caténine	Monoclonal de souris	1/50	SantaCruz Biotechnology, INC
Anticorps secondaires	Source	Dilution	Fournisseur
Anti souris	Polyclonal de chèvre	1/150	Dakocytomation, Glostrup, Danemark
Anti chèvre	Polyclonal de lapin	1/150	Dakocytomation
Anti lapin	Polyclonal de porc	1/150	Dakocytomation

① 1 L de solution de Tris-citrate buffer pH 6.0 obtenu par mélange de 125 mL d'acide borique 0.08M, 16 mL d'acide citrique 0.1M, 90 mL de citrate de sodium 0.1M, 500 μ L de tween20 (Sigma Aldrich) et 500 μ L de Emulloil LN (procalp S.A, Mazamet, France), complétée par de l'eau distillée pour obtenir 1L de solution.

② Tampon Tris-HCl Tween : 250 mL de Tris 2M pH 7.6 (60.57g de Tris (hydroxyméthyl-aminométhane, MP Biomedicals) dans 32 mL d'HCl pur 37% (Merck) QSP 250mL avec eau distillée), 300mL de NaCl 5M, 5 mL de Tween 20, complétée par de l'eau distillée pour obtenir 10L de solution

③ Tampon Tris : 12.5 mL de Tris 2M et 15 mL de NaCl 5M complétés à 500mL avec de l'eau distillée puis ajout de 250 μ L de tween et 5 mL d'albumine bovine

④ pour 10 mL de solution de Tampon Tris 0.05M pH 7.6 : 6mg de Diaminobenzidine tétrahydrochloride (Sigma Aldrich), 200 μ L de MRX et 36 μ L d'eau oxygénée à 30 volumes (Gilbert laboratoire, Hérouville Saint-Clair, France) ; solution MRX 50X : 14.5 mL de Brij 35 sol 10% (Merck), 500mg de Saponine (Fluka), 2.5 mL de Tween 20, 1.7g d'Imidazole (Boehringer, Paris, France) complété avec de l'eau QSP 50mL.

Fiche 10

Marquage des cellules apoptotiques (APOSTAIN™)

Principe : Ce test est basé sur la sensibilité accrue de l'ADN à la dénaturation thermique des cellules apoptotiques. Cette méthode permet la dénaturation de l'ADN par chauffage à 56°C en présence de formamide, et son marquage par l'anticorps monoclonal (Mab F7-26) spécifique de l'ADN simple brin

- Les coupes sont déposées sur lames à bords rodés (Menzel-Glaser), non fixées, conservées à -80°C
- Fixer les coupes en plongeant les lames dans un bain de paraformaldéhyde 5% ① pendant 10min à température ambiante (à faire sous la hotte)
- Rincer dans du PBS 1X② 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce.
- Déshydrater les coupes en plongeant les lames dans une solution de méthanol③ à 80% pendant 30min à température ambiante. (sous une hotte)
- Mettre les lames dans une solution de saponine④ à 0,2mg/ml pour perméabiliser les membranes pendant 20 min à température ambiante.
- Laver une fois avec du PBS 1X rapidement (environ 30s) à température ambiante.
- Plonger les lames dans une solution de formamide⑤ à 50% pendant 20 min au bainmarie à 56°C. (sous une hotte)
- Rincer avec du PBS 1X froid 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce.
- Sécher le pourtour des coupes avec du papier absorbant.
- Entourer les coupes avec un stylo hydrophobe DakoPen™ et laisser sécher.
- Déposer 100µl de solution de BSA à 10% (diluer dans du PBS 1X) contenant 0,2mg/ml de saponine afin de bloquer les sites non spécifiques sur les coupes pendant 1h à température ambiante et dans une chambre humide.
- Diluer au 1/10° l'anticorps primaire Apostain (anti-ADNsb/Apostain, AbCys SA) dans une solution de BSA à 10% contenant 0,2mg/ml de saponine.
- Déposer 100µl d'anticorps primaire dilué sur chaque coupe et laisser incuber une nuit à 4°C (dans une chambre humide).
- Rincer les lames dans des bains de PBS 1X 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce.
- Sécher le pourtour des coupes avec du papier absorbant.

- Diluer au 1/2000° l'anticorps secondaire (Alexa Fluor 555 de chèvre **anti IgM** de souris ©) dans une solution de BSA à 10% diluée dans du PBS 1X.
- Déposer 100µl d'anticorps secondaire dilué sur chaque coupe et laisser incuber 1h à température ambiante et à l'obscurité.(dans une chambre humide)
- Laver avec du PBS 1X 3 fois pendant 5 min à température ambiante sous agitation douce.
- Déposer sur les coupes 100µl de DAPI ☉ (dilué au 1/200° dans de l'eau distillée soit une concentration finale de 5µg/ml) pendant 30s à température ambiante et à l'obscurité dans une chambre humide.
- Rincer les lames 3 fois pendant 5min dans de l'eau distillée sous agitation douce
- Monter les lamelles avec une solution Gel/Mount™ (sécher le pourtour des coupes et ajouter une goutte au milieu de la coupe) et laisser sécher à 4°C à l'obscurité.
- Conserver bien les lames à l'obscurité dans du papier aluminium à 4°C

① Paraformaldéhyde (PAF) à 5%→ 25g de paraformaldéhyde dans 450 ml d'eau distillée+50 ml de PBS 10X+quelques pastilles de soude jusqu'à dissolution complète du paraformaldéhyde

② PBS 10X → 12,1g de Na₂HPO₄, 2g de KH₂PO₄, 80g de NaCl, 2g de KCl Qsp 1 litre d'eau distillée et ajuster à pH=7,4

Pour du PBS 1X mélanger 100ml de PBS 10X dans 900ml d'eau distillée

③ Méthanol à 80%→ Pour 1 litre : 800ml de méthanol et 200ml de PBS 1X

④ Solution de saponine→ Pour 1 litre : 200mg de saponine dans 1 litre de PBS 1X

⑤) Solution de formamide→ Pour 1 litre : 500ml formamide et 500ml d'eau distillée

© Alexa Fluor 555 de chèvre anti IgM de souris ;Invitrogen

☉ DAPI→ Diamidino-4',6 phénylindol-2 dichlorhydrate

Fiche 10

Extraction de protéines totales à partir des cellules et des tissus

➤ Avant de commencer :

→ Préparer une solution de phenylmethanesulfonylfluoride ou phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ① à 10 mg/mL dans l'éthanol absolu

→ Préparer une solution d'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) ① à 18,39 mg/mL dans de l'eau MilliQ

→ Préparer le tampon RIPA selon le tableau suivant :

Tampon RIPA	Concentration
NaCl (sodium chloride) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)	8 g/L
Na_2HPO_4 (sodium phosphate anhydrous dibasic) (Sigma-Aldrich)	1,44 g/L
KH_2PO_4 (potassium dihydrogen phosphate) (Sigma-Aldrich)	0,24 g/L
NP40 (Nonidet P40) (Sigma-Aldrich)	1%
DOC (Deoxycholate de sodium) (Sigma-Aldrich)	0,5%
SDS (Lauryl sulfate ou sodium dodecyl sulfate) (Sigma-Aldrich)	0,1%
PMSF (Sigma-Aldrich)	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$
Na_3VO_4 (Sigma-Aldrich)	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$
Cocktail antiprotéases (Sigma-Aldrich)	1,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$

➤ Procédure :

→ Pour les cellules : décoller les cellules avec la trypsine et collecter les sous forme de culot cellulaire avant la lyse :

NB : le culot cellulaire peut également être congelé à -80°C pour réaliser l'étape suivante ultérieurement.

→ Pour les tissus : broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote et la carboglace et garder environ 50 mg de tissu puis conserver le reste à -80°C

- Reprendre les cellules ou le broyat tissulaire dans du tampon RIPA à raison de 200 μ L de tampon pour 5 millions de cellules et 500 μ L de tampon pour 100 mg de tissu
- Passer le lysat/broyat 5 fois dans une seringue munie d'une aiguille de 0.9 mm de diamètre
- Faire 2 cycles congélation-décongélation – azote-bain marie à 37°C
- Centrifuger 30 min à 4°C, 12000 rpm
- Récupérer le surnageant et stocker au congélateur à -80°C.

Fiche 11
**Dosage des protéines/histones par la méthode de l'acide
bicinchoninique (BCA)**

- Préparer une gamme étalon (0, 50, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600 et 2000 µg/mL, en duplicat) à partir d'une solution stock de BSA^① (bovine serum albumin) diluée dans le même tampon que les échantillons à doser
- Préparer le réactif de travail en mélangeant 50 volumes de réactif A (BCA)^② avec 1 volume de réactif B (CuSO₄)^③
- Distribuer 25 µL de chaque dilution de BSA ou d'échantillon à doser sur une plaque de 96 puits à fonds plats
- Deux blancs sont réalisés avec 25 µL de diluant seul
- Ajouter 200 µL de réactif de travail et agiter la plaque
- Couvrir la plaque et la placer 30 min à 37°C
- Laisser refroidir la plaque à température ambiante
- Mesurer l'absorbance sur un spectrophotomètre lecteur de plaques^④ à 570 nm
- La droite de régression étalon est tracée et la concentration protéique des échantillons déduite
- La concentration en protéines est déterminée à partir de la courbe étalon

Smith et al. (1985) Anal. Biochem., 150 : 76-85

① Ampoule contenant de la BSA à 2,0 mg/mL dans une solution de NaCl à 0,9% (p/v) et NaN₃ à 0,05% (p/v)

② Réactif A : solution aqueuse contenant BCA-Na₂ 1% (p/v), Na₂CO₃ 2% (p/v), tartrate-Na₂ 0,16%, NaOH 0,4% (p/v) et NaHCO₃ 0,95% (p/v) (pH 11,25)

③ Réactif B : solution de CuSO₄.5H₂O à 4% (p/v) dans de l'eau déionisée

Pierce, Rockford, IL, USA kit BCA Protein Assay® Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA)

④ Lecteur de plaques Victor3 Wallac Multilabel, Perkin Elmer

Fiche 12

Electrophorèse analytique des protéines/histones sur gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE) – Western Blotting

➤ Préparation du tampon de migration pour 1 litre 10X concentré :

- Tris ① 250 mM 30g
- Glycine ① 1,92 M 144g
- SDS ① 1 % 10g
- qsp eau MilliQ

- A utiliser 1X concentré : diluer 100ml de la solution 10X et compléter à 1litre.
- pH ≈ 8,3 - ne pas ajuster avec HCl
- Conserver à 4°C
- Utiliser à température ambiante

➤ Préparation des gels d'electrophorèse

- Passer les plaques de verre à l'alcool
- Monter l'appareil d'électrophorèse Mini-Protean III : plaques de verre et espaceurs (en général 1,5mm)
- Préparer les gels de séparation et de concentration selon le tableau ci-dessous en adaptant la concentration en acrylamide ② selon la taille de la protéine : (pour 2 gels prévoir 20 mL de solution)
- Couler les gels et s'arrêter à au niveau bas du plastique vert en dessous de l'emplacement du peigne
- Déposer un fin film (~ 500µl) d'isopropanol ③ (ou isobutanol)
- Attendre la polymérisation à température ambiante (pour gel 12%, si T° ~ 20-22°C compter 20min)
- Rincer abondamment à l'eau distillée et éliminer toutes traces d'eau
- Couler le gel de concentration à 5% (voir tableau). Pour 2 gels prévoir 8 mL
- Positionner le peigne en Téflon en évitant la formation de bulles : polymérisation
- Retirer le peigne et rincer les puits avec du tampon de migration
- Monter l'appareil en assemblant les deux supports de gel sur le système central

→ Remplir le réservoir central (cathode) jusqu'en haut ainsi que la cuve (à moitié) avec le tampon de migration

➤ Préparation des échantillons

→ Les échantillons récupérés dans un tampon de lyse doivent être préalablement dosés. Pour un premier essai, prévoir un dépôt de 20 à 30 µg par puit pour les protéines et de 4µg par puit pour les histones. Pour une plus belle migration, déposer à quantité et volume constants (pour une même quantité de protéines par échantillon, compléter avec le tampon de lyse pour obtenir le même volume)

→ Dans des tubes Eppendorf, ajouter 1 volume de tampon Laemmli 2X ④ à 1 volume d'échantillon

→ Chauffer 5 mn à 100°C les échantillons et les marqueurs de taille ⑤ (si nécessaire)

→ Charger les puits avec les échantillons et les marqueurs

➤ Migration ⑥ :

→ A voltage constant

→ Gel de concentration : 80V, environ 15 min

→ Gel de séparation : 110V, ~1h30

→ Arrêter la migration quand le front de migration arrive en bas des plaques

➤ Tableau indiquant la composition des gels de polyacrilamide

Gel de Séparation		5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6%	Eau MILLIQ	2.7	5.3	8	10.6	13.3	15.9	21.1	26.5
	Acrylamide Mix 29:1 ②	1	2	3	4	5	6	8	10
	Tris 1.5M pH 8.8 ⑦	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10% ⑧	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10% ⑨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ⑩	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
	Eau MILLIQ	2.3	4.6	7	9.3	11.6	13.9	18.6	23.2
8%	Acrylamide Mix 29:1 ②	1.3	2.7	4	5.3	6.7	8	10.7	13.4
	Tris 1.5M pH 8.8 ⑦	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10% ⑧	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10% ⑨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ⑩	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
	Eau MILLIQ	2	4	5.9	7.9	9.9	11.9	15.8	20
	Acrylamide Mix 29:1 ②	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10	13.3	16.6
10%	Tris 1.5M pH 8.8 ⑦	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10% ⑧	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10% ⑨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ⑩	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
	Eau MILLIQ	1.7	3.3	5	6.6	8.3	9.9	13.2	16.4
	Acrylamide Mix 29:1 ②	2	4	6	8	10	12	14	20
	Tris 1.5M pH 8.8 ⑦	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
12%	SDS 10% ⑧	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10% ⑨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ⑩	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
	Eau MILLIQ	1.2	2.3	3.5	4.6	5.7	6.9	9.2	11.4
	Acrylamide Mix 29:1 ②	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20	25
	Tris 1.5M pH 8.8 ⑦	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10% ⑧	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
15%	APS 10% ⑨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ⑩	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
Gel de concentration								
Eau MILLIQ	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
Acrylamide								
Mix 29:1 ②	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1	1.3	1.7
Tris 0.5M pH								
6.8 ⑩*	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1	1.25
SDS 10% ⑧	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
APS 10% ⑨	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED ⑩	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

① Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

② Acrylamide : bisacrylamide (29:1) (Bio-Rad Laboratories)

③ Isopropanol VWR Prolabo

④ Tampon Laemmli X2 ; Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑤ Marqueurs de poids moléculaires : Low Molecular Weight ; LMW - Amersham Pharmacia, UK

⑥ Appareil d'électrophorèse Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)

⑦ Tris-HCl 1,5M pH 8,8 : 18,165 g de Tris/100ml Eau MilliQ, ajuster à pH 8,8 avec HCl, filtrer sur 0,22µm et conserver à 4°C, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑧ SDS : (Lauryl sulfate ou sodium dodecyl sulfate) 10%

10 g de SDS/100ml eau MilliQ, sous agitation douce pour éviter que cela mousse, conserver à température ambiante, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑨ APS : Persulfate d'ammonium 10%, 1g/10ml eau MilliQ, aliquoter par 400µl, conserver à -20°C, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑩ TEMED, Tetramethylethylenediamine, Euromedex

⑩* Tris-HCl 0,5M pH 6,8: 6,055 g de Tris/100ml eau MilliQ, ajuster à pH 6,8 avec HCl, filtrer sur 0,22µm et conserver à 4°C, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

Fiche 13

Transfert des protéines sur membrane de Polyvinylidene fluoride (PVDF)

➤ Préparation du tampon de transfert : pour un litre 10X concentré

- Tris ① 480 mM 58,1g
- Glycine ① 390 mM 29,3g
- SDS ① 0,375 % (13 mM) 3,75g

qsp eau MilliQ

- A utiliser 1X concentré : 100ml de la solution 10X + 200ml de éthanol + qsp eau MilliQ
- pH ≈ 9,2 – ne pas ajuster avec HCl –
- Conserver à 4°C
- Utiliser froid

➤ Préparation de la membrane②

- Découper la membrane à la dimension du gel : 7x8,5cm minimum (gants)
- Mettre la membrane PVDF au moins 30 sec dans du méthanol
- Equilibrer la membrane dans le tampon de transfert froid (5min max) ainsi que les éponges et les filtres
- Démontez l'appareil de migration, éliminez le gel de concentration et équilibrez les gels dans le tampon de transfert froid (5mn max)

➤ Transfert ③ :

→ Préparation du sandwich : placer la face blanche en haut et noire en bas, superposer sur la face blanche dans l'ordre :

- une éponge
- un papier filtre ④
- la membrane
- le gel
- un papier filtre ④: expulser les bulles d'air à l'aide d'une pipette plastique
- une éponge

- Expulser les bulles d'air en faisant rouler une pipette plastique, sur le sandwich
- Fermer le sandwich

- Placer les cassettes dans le module de transfert, face noire vers face noire
- Mettre le glaçon
- Remplir la cuve avec du tampon de transfert froid

- Transfert à ampérage constant :
 - 350 mA pendant 45mn
 - ou 90 mA toute une nuit
- Démontez le sandwich et récupérez la membrane PVDF
- Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau S^⑤ pendant 5 min, décolorer partiellement à l'eau distillée puis repérer les standards de poids moléculaires au crayon de papier.
- Poursuivre le rinçage jusqu'à décoloration complète de la membrane

① Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

② Membrane polyvinylidène difluorure membrane, (PVDF), porosité 0,2 μm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)

③ Appareil de transfert électrophorétique semi-sec Trans-Blot[®] SD (Bio-Rad Laboratories)

④ Papier filtre Whatman ou blotting paper, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑤ Solution filtrée de rouge Ponceau S à 0,5% (p/v) contenant acide acétique à 1% (v/v) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

Fiche 14

Immunodétection en révélation par chimiluminescence de l'activité peroxydase

➤ Préparation du tampon de lavage : pour un litre 10X concentré :

→ Tris ① 200 mM 24,2g

→ NaCl ① 1,5 M 87,5g

→ A utiliser 1X concentré : TBST :100ml de la solution 10X + qsp eau MilliQ + 1ml de Tween 20① à 0,1%

→ pH 7,4 à ajuster avec HCl

→ Conserver à 4°C

➤ Préparation du tampon de blocage :

→ Dissoudre du lait écrémé à 5% dans le tampon de lavage TBST

→ Agiter jusqu'à complète dissolution

➤ Immunodétection :

→ Saturer les sites aspécifiques en incubant la membrane dans du tampon de blocage pendant 1 h à température ambiante sous agitation lente

→ Incuber la membrane avec l'anticorps primaire dirigé contre une protéine donnée (voir tableau ci-dessous) dans du tampon de blocage pendant 1 nuit à 4°C, sous agitation rotative lente, dans de petits sacs en plastique scellés

→ Laver la membrane PVDF 4 fois 10 min avec le tampon de lavage

→ Incuber la membrane dans la solution d'anticorps secondaires conjugués à la peroxidase (voir tableau ci-dessous) pendant 1 h sous agitation rotative lente à température ambiante dans de petits sacs en plastique scellés

→ Laver 4 fois 10 min la membrane avec du tampon de lavage

→ L'activité peroxidase est révélée par chimiluminescence ②

→ Déposer la membrane (protéines vers le haut) sur un film plastique ③

→ Appliquer le volume indiqué par le fournisseur de mélange réactionnel

- Laisser 5 min, puis sécher la membrane
- Disposer la membrane entre 2 films plastique
- Mettre en contact la membrane ainsi protégée avec un film autoradiographique ④ pendant 1 à 5 min
- Révélation du film autoradiographique dans un bain de révélation ⑤ jusqu'à apparition des premières bandes (~30 s)
- Rinçage à l'eau
- Plonger la membrane dans le bain de fixation ⑥ jusqu'à transparence du film (~2 min)
- Vérifier que les bandes ainsi révélées se trouvent à la bonne taille en superposant le film sur la membrane et en reportant le marqueur de taille sur le film par transparence.

➤ Anticorps utilisés :

Anticorps primaires	Source	Dilution	Fournisseur
PP2A-c	Polyclonal de lapin	1/1000	Cell Signalling Technology, USA
β-caténine	Polyclonal de lapin	1/1000	Cell Signalling Technology, USA
cdx-2	Monoclonal de souris	1/1000	BioGenex, USA
Cycline E	Polyclonal de lapin	1/1000	Millipore, France
cdk2	Polyclonal de lapin	1/1000	SantaCruz Biotechnology, INC
β actine	Polyclonal de poulet	1/1000	US Biological, USA

Anticorps secondaires	Source	Dilution	Fournisseur
Anti-Lapin		1/2000	Molecular Probes,
Anti-Souris	Chèvre	1/2000	Cergy- Pontoise, France
Anti-Poulet		1/2000	Southern Biotech, Birmingham, USA

① Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

② ECL+Plus (Amersham Pharmacia Biotech, UK) est basé sur la synthèse enzymatique d'un ester acridinique émettant une lumière intense

③ Saran® (Dow Chemical Company, Midland, MI, USA)

④ BIOMAX MR (Kodak Scientific Imaging Film, NY, USA)

⑤ Révélateur radio (LX24 – Kodak, France)

⑥ Fixateur radio (AL4 – Kodak, France)

Fiche 15 **Duolink® in situ PLA™ reagents**

Principe : Cette technique permet de détecter, visualiser et quantifier des protéines individuelles, des modifications post-traductionnelles ou des interactions protéiques dans des échantillons cellulaires et tissulaires. Les réactifs Duolink sont basés sur le PLA® (Proximity Ligation Assay). Lorsque les sondes PLA sont à proximité (28Å), les brins d'ADN peuvent interagir et se lier grâce à un ajout ultérieur d'oligonucléotides et d'une ligase. Ils sont ensuite amplifiés plusieurs centaines de fois à l'aide d'une polymérase et l'ajout de sondes oligonucléotidiques complémentaires fluorescentes met en évidence le produit final. Le signal de chaque paire de sondes PLA détectées est visualisé comme un spot fluorescent individuel.

➤ Protocole

- Sortir les lames du congélateur et les laisser décongeler environ 2-3min à température ambiante (ne pas les laisser sécher).
- Entourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™.
- Fixer les coupes en ajoutant 200µl de paraformaldéhyde ① à 4% pendant 15min à température ambiante.
- Rincer les lames dans un bain de PBS ② 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce (facultatif).
- Incuber les coupes dans un bain de Triton ③ à 0,1% afin de perméabiliser les membranes, 2 fois pendant 10min à température ambiante.
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce.
- Réentourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™.
- Déposer 200µl d'une solution de BSA ④ à 10% diluée dans du PBS 1X (attention à ce que la coupe soit bien recouverte de la solution) afin de bloquer les sites non spécifiques et laisser incuber entre 1h à température ambiante.
- Déposer environ 100µl d'anticorps primaire (diluer l'anticorps dans une solution de PBS 1X-BSA 10%) si il y a deux anticorps sinon 200µl et laisser incuber de 24 à 72h selon anticorps dans une chambre humide à 4°C.
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce.
- Déposer environ 80µl de chaque PLA probes ⑤ (diluer les anticorps au 1/5° dans une solution PBS 1X-BSA 10%) NB : les deux PLA probes utilisés doivent avoir une

dénomination différente → un « espèce » minus et un « espèce » plus et incubé pendant 1h dans une chambre humide à 37°C.

→ Laver dans un bain de TBST ®, 2 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce.

→ Déposer environ 80µl de la solution de ligation (Diluer la solution stock de ligation au 1/5° dans de l'eau MilliQ puis diluer dans cette solution la ligase au 1/40°) et laisser incubé 30 min dans une chambre humide à 37°C.

→ Laver dans un bain de TBST, 2 fois pendant 2min à température ambiante sous agitation douce.

→ NB : ce réactif est sensible à la lumière donc à partir de cette étape procéder à l'obscurité. Déposer environ 80µl de la solution de ligation (Diluer la solution stock d'amplification au 1/5° dans de l'eau MilliQ puis diluer dans cette solution la polymérase au 1/80°) et laisser incubé 100min dans une chambre humide à 37°C.

→ Laver dans un bain de tampon de lavage B⊗, 2 fois pendant 10min à température ambiante sous agitation douce.

→ Déposer environ 200µl de DAPI ® (dilution 1/200° dans du PBS 1X soit une concentration finale de 5µg/ml) et laisser incubé de 30s à 1min à température ambiante.

→ Laver dans un bain d'eau distillé, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce.

→ Monter les lames au montage fluo (Fluoromount, Sigma) (verser sur le milieu de la coupe une goutte, poser une lamelle et laisser sécher à 4°C.

→ Conserver bien les lames à l'obscurité dans du papier aluminium à 4°C.

→ L'observation se fait au microscope à fluorescence à 555nm.

→ Pour le comptage, utiliser le logiciel.

➤ Anticorps utilisés :

Anticorps primaires	Source	Dilution	Fournisseur
E-Cadhérine	Mouse monoclonal	1/200	Zymed Invitrogen Laboratories, USA
β-caténine	Rabbit polyclonal	1/200	Cell Signalling Technology, USA
Phosphor-Serine	Mouse monoclonal	1/100	Cell Signalling Technology, USA

① Paraformaldéhyde (PAF) à 4% → 20g de paraformaldéhyde dans 450 ml d'eau distillée. Ajouter 50 ml de PBS 10X.

② PBS 10X → 12,1g de Na₂HPO₄, 2g de KH₂PO₄, 80g de NaCl, 2g de KCl Qsp 1 litre d'eau distillée et ajuster à pH=7,4. Pour du PBS 1X mélanger 100ml de PBS 10X dans 900ml d'eau distillée.

③ Triton 0,1% → Ajouter avec un cône coupé à l'extrémité 1ml de Triton dans 1l de PBS 1X.

④ BSA 10% → 10g de BSA dans 100ml de PBS 1X.

⑤ PLA probes : Mouse, Rabbit, Goat MINUS ou PLUS, Kit Duolink Detection reagent Orange (Olink Bioscience, Suède).

⑥ Solution de TBST (Tris-Buffered Saline Tween-20) : diluer 100ml de la solution TBS 10X + qsp H₂O MQ 1 litre + 1ml de Tween 20 à 0,1%. TBS 10X (pour 1 litre) → Tris 200 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,4, qsp H₂O MQ 1 litre (à ajuster avec HCl ; conserver à 4°C).

⑦ Tampon de lavage B : Dans 500 ml d'eau MilliQ dissoudre 5,84g de NaCl ; 4,24g de Tris base et 26g de Tris HCl. Ajuster le pH à 7,5 par ajout d'HCl et compléter à 1 litre avec de l'eau MilliQ. Filtrer la solution avec un filtre de 0,22µm et stocker à 4°C

⑧ DAPI → Diamidino-4',6 phénylindol-2 dichlorhydrate

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kappelman, M. D. *et al.* The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 1424–1429 (2007).
2. Loftus, C. G. *et al.* Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 254–261 (2007).
3. Sonnenberg, A. & Chang, J. Time trends of physician visits for Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States, 1960-2006. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 249–252 (2008).
4. Nguyen, G. C., Tuskey, A., Dassopoulos, T., Harris, M. L. & Brant, S. R. Rising hospitalization rates for inflammatory bowel disease in the United States between 1998 and 2004. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 1529–1535 (2007).
5. Bernstein, C. N. & Nabalamba, A. Hospitalization, surgery, and readmission rates of IBD in Canada: a population-based study. *Am. J. Gastroenterol.* **101**, 110–118 (2006).
6. Faubion, W. A., Jr, Loftus, E. V., Jr, Harmsen, W. S., Zinsmeister, A. R. & Sandborn, W. J. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* **121**, 255–260 (2001).
7. Peyrin-Biroulet, L. *et al.* Development of the first disability index for inflammatory bowel disease based on the international classification of functioning, disability and health. *Gut* **61**, 241–247 (2012).
8. Barrett, J. C. *et al.* Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat. Genet.* **40**, 955–962 (2008).
9. Shivananda, S. *et al.* Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* **39**, 690–697 (1996).
10. Kornbluth, A. & Sachar, D. B. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am. J. Gastroenterol.* **105**, 501–523; quiz 524 (2010).
11. Meyers, S. & Janowitz, H. D. The 'natural history' of ulcerative colitis: an analysis of the placebo response. *J. Clin. Gastroenterol.* **11**, 33–37 (1989).
12. Kappelman, M. D. *et al.* Direct health care costs of Crohn's disease and ulcerative colitis in US children and adults. *Gastroenterology* **135**, 1907–1913 (2008).
13. Hanauer, S. B. & Sandborn, W. Management of Crohn's disease in adults. *Am. J.*

- Gastroenterol.* **96**, 635–643 (2001).
14. Sands, B. E. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology* **126**, 1518–1532 (2004).
 15. Loftus, E. V., Jr Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* **126**, 1504–1517 (2004).
 16. Lichtenstein, G. R., Yan, S., Bala, M. & Hanauer, S. Remission in patients with Crohn's disease is associated with improvement in employment and quality of life and a decrease in hospitalizations and surgeries. *Am. J. Gastroenterol.* **99**, 91–96 (2004).
 17. Geboes, K. *et al.* Endoscopic and histologic evidence of persistent mucosal healing and correlation with clinical improvement following sustained infliximab treatment for Crohn's disease. *Curr Med Res Opin* **21**, 1741–1754 (2005).
 18. Rutgeerts, P. J. An historical overview of the treatment of Crohn's disease: why do we need biological therapies? *Rev Gastroenterol Disord* **4 Suppl 3**, S3–9 (2004).
 19. Vermeire, S., van Assche, G. & Rutgeerts, P. Review article: Altering the natural history of Crohn's disease--evidence for and against current therapies. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **25**, 3–12 (2007).
 20. Bodger, K. Cost of illness of Crohn's disease. *Pharmacoeconomics* **20**, 639–652 (2002).
 21. Feagan, B. G., Vreeland, M. G., Larson, L. R. & Bala, M. V. Annual cost of care for Crohn's disease: a payor perspective. *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 1955–1960 (2000).
 22. Dejaco, C. *et al.* Diagnosing colitis: a prospective study on essential parameters for reaching a diagnosis. *Endoscopy* **35**, 1004–1008 (2003).
 23. Pera, A. *et al.* Colonoscopy in inflammatory bowel disease. Diagnostic accuracy and proposal of an endoscopic score. *Gastroenterology* **92**, 181–185 (1987).
 24. Hawk, W. A. & Turnbull, R. B., Jr Primary ulcerative disease of the colon. *Gastroenterology* **51**, 802–805 (1966).
 25. Glotzer, D. J. *et al.* Comparative features and course of ulcerative and granulomatous colitis. *N. Engl. J. Med.* **282**, 582–587 (1970).
 26. Jenkins, D. *et al.* Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. The British Society of Gastroenterology Initiative. *J. Clin. Pathol.* **50**, 93–105 (1997).
 27. Geboes, K. *et al.* Indeterminate colitis: a review of the concept--what's in a name? *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 850–857 (2008).
 28. Schumacher, G., Kollberg, B. & Sandstedt, B. A prospective study of first attacks of inflammatory bowel disease and infectious colitis. Histologic course during the 1st year

- after presentation. *Scand. J. Gastroenterol.* **29**, 318–332 (1994).
29. Nostrant, T. T., Kumar, N. B. & Appelman, H. D. Histopathology differentiates acute self-limited colitis from ulcerative colitis. *Gastroenterology* **92**, 318–328 (1987).
 30. Washington, K. *et al.* Histopathology of ulcerative colitis in initial rectal biopsy in children. *Am. J. Surg. Pathol.* **26**, 1441–1449 (2002).
 31. Bentley, E., Jenkins, D., Campbell, F. & Warren, B. How could pathologists improve the initial diagnosis of colitis? Evidence from an international workshop. *J. Clin. Pathol.* **55**, 955–960 (2002).
 32. Robert, M. E., Tang, L., Hao, L. M. & Reyes-Mugica, M. Patterns of inflammation in mucosal biopsies of ulcerative colitis: perceived differences in pediatric populations are limited to children younger than 10 years. *Am. J. Surg. Pathol.* **28**, 183–189 (2004).
 33. Seldenrijk, C. A. *et al.* Histopathological evaluation of colonic mucosal biopsy specimens in chronic inflammatory bowel disease: diagnostic implications. *Gut* **32**, 1514–1520 (1991).
 34. Dundas, S. A., Dutton, J. & Skipworth, P. Reliability of rectal biopsy in distinguishing between chronic inflammatory bowel disease and acute self-limiting colitis. *Histopathology* **31**, 60–66 (1997).
 35. Kleeer, C. G. & Appelman, H. D. Ulcerative colitis: patterns of involvement in colorectal biopsies and changes with time. *Am. J. Surg. Pathol.* **22**, 983–989 (1998).
 36. Schmitz-Moormann, P. & Himmelmann, G. W. Does quantitative histology of rectal biopsy improve the differential diagnosis of Crohn's disease and ulcerative colitis in adults? *Pathol. Res. Pract.* **183**, 481–488 (1988).
 37. Glickman, J. N. *et al.* Pediatric patients with untreated ulcerative colitis may present initially with unusual morphologic findings. *Am. J. Surg. Pathol.* **28**, 190–197 (2004).
 38. Loftus, E. V., Jr *et al.* PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut* **54**, 91–96 (2005).
 39. Størdal, K., Jahnsen, J., Bentsen, B. S. & Moum, B. Pediatric inflammatory bowel disease in southeastern Norway: a five-year follow-up study. *Digestion* **70**, 226–230 (2004).
 40. Moum, B. *et al.* Incidence of ulcerative colitis and indeterminate colitis in four counties of southeastern Norway, 1990–93. A prospective population-based study. The Inflammatory Bowel South-Eastern Norway (IBSEN) Study Group of Gastroenterologists. *Scand. J. Gastroenterol.* **31**, 362–366 (1996).
 41. Theodossi, A. *et al.* Observer variation and discriminatory value of biopsy features in inflammatory bowel disease. *Gut* **35**, 961–968 (1994).
 42. Surawicz, C. M. & Belic, L. Rectal biopsy helps to distinguish acute self-limited colitis

- from idiopathic inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **86**, 104–113 (1984).
43. Tanaka, M. *et al.* Spatial distribution and histogenesis of colorectal Paneth cell metaplasia in idiopathic inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 1353–1359 (2001).
44. Inflammatory bowel disease. *Gastrointestinal pathology an atlas and text*
45. Crohn, B., Ginzburg, I. & Oppenheimer, G. Regional ileitis: a pathological and clinical entity. Crohn, B.B., Ginzburg, I. & Oppenheimer, G.D. *JAMA* 1323–1329 (1932).
46. Yantiss, R. K. & Odze, R. D. Diagnostic difficulties in inflammatory bowel disease pathology. *Histopathology* **48**, 116–132 (2006).
47. Stange, E. F. *et al.* European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* **55 Suppl 1**, i1–15 (2006).
48. Tanaka, M. *et al.* Morphologic criteria applicable to biopsy specimens for effective distinction of inflammatory bowel disease from other forms of colitis and of Crohn's disease from ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **34**, 55–67 (1999).
49. Geboes, K., Ectors, N., D'Haens, G. & Rutgeerts, P. Is ileoscopy with biopsy worthwhile in patients presenting with symptoms of inflammatory bowel disease? *Am. J. Gastroenterol.* **93**, 201–206 (1998).
50. Mahadeva, U., Martin, J. P., Patel, N. K. & Price, A. B. Granulomatous ulcerative colitis: a re-appraisal of the mucosal granuloma in the distinction of Crohn's disease from ulcerative colitis. *Histopathology* **41**, 50–55 (2002).
51. Surawicz, C. M. Serial sectioning of a portion of a rectal biopsy detects more focal abnormalities: a prospective study of patients with inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **27**, 434–436 (1982).
52. Bernades, P. *et al.* [Proposal of a system of criteria for the diagnosis of cryptogenic inflammatory enterocolitis (Crohn's disease and hemorrhagic rectocolitis). A cooperative study by the Cryptogenic Enterocolitis Study Group]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **2**, 1047–1054 (1978).
53. Jenkins, D., Goodall, A., Drew, K. & Scott, B. B. What is colitis? Statistical approach to distinguishing clinically important inflammatory change in rectal biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.* **41**, 72–79 (1988).
54. Bernstein, C. N., Shanahan, F., Anton, P. A. & Weinstein, W. M. Patchiness of mucosal inflammation in treated ulcerative colitis: a prospective study. *Gastrointest. Endosc.* **42**, 232–237 (1995).
55. Markowitz, J. *et al.* Atypical rectosigmoid histology in children with newly diagnosed ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* **88**, 2034–2037 (1993).

56. Lennard-Jones, J. Crohn's disease: definition, pathogenesis, aetiology. *Clin Gastroenterol Suppl* **1**, 173–89 (1980).
57. Tanaka, M. & Riddell, R. H. The pathological diagnosis and differential diagnosis of Crohn's disease. *Hepatogastroenterology* **37**, 18–31 (1990).
58. Cook, M. G. & Dixon, M. F. An analysis of the reliability of detection and diagnostic value of various pathological features in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* **14**, 255–262 (1973).
59. Ectors, N. L. *et al.* Granulomatous gastritis: a morphological and diagnostic approach. *Histopathology* **23**, 55–61 (1993).
60. Shapiro, J. L., Goldblum, J. R. & Petras, R. E. A clinicopathologic study of 42 patients with granulomatous gastritis. Is there really an 'idiopathic' granulomatous gastritis? *Am. J. Surg. Pathol.* **20**, 462–470 (1996).
61. Oberhuber, G. *et al.* Focally enhanced gastritis: a frequent type of gastritis in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **112**, 698–706 (1997).
62. Wright, C. L. & Riddell, R. H. Histology of the stomach and duodenum in Crohn's disease. *Am. J. Surg. Pathol.* **22**, 383–390 (1998).
63. Parente, F. *et al.* Focal gastric inflammatory infiltrates in inflammatory bowel diseases: prevalence, immunohistochemical characteristics, and diagnostic role. *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 705–711 (2000).
64. Farmer, M., Petras, R. E., Hunt, L. E., Janosky, J. E. & Galandiuk, S. The importance of diagnostic accuracy in colonic inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 3184–3188 (2000).
65. Sheehan, A. L., Warren, B. F., Gear, M. W. & Shepherd, N. A. Fat-wrapping in Crohn's disease: pathological basis and relevance to surgical practice. *Br J Surg* **79**, 955–958 (1992).
66. Borley, N. R., Mortensen, N. J., Jewell, D. P. & Warren, B. F. The relationship between inflammatory and serosal connective tissue changes in ileal Crohn's disease: evidence for a possible causative link. *J. Pathol.* **190**, 196–202 (2000).
67. TRUELOVE, S. C. & RICHARDS, W. C. Biopsy studies in ulcerative colitis. *Br Med J* **1**, 1315–1318 (1956).
68. Wright, R. & Truelove, S. R. Serial rectal biopsy in ulcerative colitis during the course of a controlled therapeutic trial of various diets. *Am J Dig Dis* **11**, 847–857 (1966).
69. Goldman, H. Interpretation of large intestinal mucosal biopsy specimens. *Hum. Pathol.* **25**, 1150–1159 (1994).
70. D'Haens, G. *et al.* A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of

- medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology* **132**, 763–786 (2007).
71. Hanauer, S. *et al.* Mesalamine capsules for treatment of active ulcerative colitis: results of a controlled trial. Pentasa Study Group. *Am. J. Gastroenterol.* **88**, 1188–1197 (1993).
72. Hanauer, S. B. *et al.* Budesonide enema for the treatment of active, distal ulcerative colitis and proctitis: a dose-ranging study. U.S. Budesonide enema study group. *Gastroenterology* **115**, 525–532 (1998).
73. Levine, D. S. *et al.* A randomized, double blind, dose-response comparison of balsalazide (6.75 g), balsalazide (2.25 g), and mesalamine (2.4 g) in the treatment of active, mild-to-moderate ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* **97**, 1398–1407 (2002).
74. Florén, C. H., Benoni, C. & Willén, R. Histologic and colonoscopic assessment of disease extension in ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **22**, 459–462 (1987).
75. Ginsberg, A. L., Beck, L. S., McIntosh, T. M. & Nochomovitz, L. E. Treatment of left-sided ulcerative colitis with 4-aminosalicylic acid enemas. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **108**, 195–199 (1988).
76. Riley, S. A., Mani, V., Goodman, M. J., Dutt, S. & Herd, M. E. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* **32**, 174–178 (1991).
77. Odze, R., Antonioli, D., Peppercorn, M. & Goldman, H. Effect of topical 5-aminosalicylic acid (5-ASA) therapy on rectal mucosal biopsy morphology in chronic ulcerative colitis. *Am. J. Surg. Pathol.* **17**, 869–875 (1993).
78. Geboes, K. *et al.* A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut* **47**, 404–409 (2000).
79. Gomes, P., du Boulay, C., Smith, C. L. & Holdstock, G. Relationship between disease activity indices and colonoscopic findings in patients with colonic inflammatory bowel disease. *Gut* **27**, 92–95 (1986).
80. Sandborn, W. J. *et al.* Safety of celecoxib in patients with ulcerative colitis in remission: a randomized, placebo-controlled, pilot study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 203–211 (2006).
81. Gibson, P. R. *et al.* Comparison of the efficacy and safety of Eudragit-L-coated mesalazine tablets with ethylcellulose-coated mesalazine tablets in patients with mild to moderately active ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **23**, 1017–1026 (2006).
82. Feagan, B. G. *et al.* Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2499–2507 (2005).
83. Kruis, W. *et al.* The optimal dose of 5-aminosalicylic acid in active ulcerative colitis: a dose-finding study with newly developed mesalamine. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **1**, 36–

- 43 (2003).
84. Bitton, A. *et al.* Clinical, biological, and histologic parameters as predictors of relapse in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **120**, 13–20 (2001).
85. Korelitz, B. I. & Sommers, S. C. Response to drug therapy in Crohn's disease: evaluation by rectal biopsy and mucosal cell counts. *J. Clin. Gastroenterol.* **6**, 123–127 (1984).
86. D'Haens, G., Geboes, K., Ponette, E., Penninckx, F. & Rutgeerts, P. Healing of severe recurrent ileitis with azathioprine therapy in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **112**, 1475–1481 (1997).
87. D'haens, G. *et al.* Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: A European multicenter trial. *Gastroenterology* **116**, 1029–1034 (1999).
88. Nicholls, S. *et al.* Cyclosporin as initial treatment for Crohn's disease. *Arch. Dis. Child.* **71**, 243–247 (1994).
89. Beattie, R. M. *et al.* Polymeric nutrition as the primary therapy in children with small bowel Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **8**, 609–615 (1994).
90. Breese, E. J. *et al.* Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **106**, 1455–1466 (1994).
91. Fell, J. M. *et al.* Mucosal healing and a fall in mucosal pro-inflammatory cytokine mRNA induced by a specific oral polymeric diet in paediatric Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **14**, 281–289 (2000).
92. Mudter, J. What's new about inflammatory bowel diseases in 2011. *World J. Gastroenterol.* **17**, 3177 (2011).
93. Bessissow, T. *et al.* Prognostic value of serologic and histologic markers on long-term outcomes in ulcerative colitis patients with mucosal healing. Abstract UEGW. (2012).
94. Rutter, M. *et al.* Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **126**, 451–459 (2004).
95. Bischoff, S. C., Mayer, J., Nguyen, Q. T., Stolte, M. & Manns, M. P. Immunohistological assessment of intestinal eosinophil activation in patients with eosinophilic gastroenteritis and inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **94**, 3521–3529 (1999).
96. Raab, Y., Fredens, K., Gerdin, B. & Hällgren, R. Eosinophil activation in ulcerative colitis: studies on mucosal release and localization of eosinophil granule constituents. *Dig. Dis. Sci.* **43**, 1061–1070 (1998).
97. Buisson, A., Chevaux, J.-B., Allen, P. B., Bommelaer, G. & Peyrin-Biroulet, L. Review

- article: the natural history of postoperative Crohn's disease recurrence. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **35**, 625–633 (2012).
98. Welsch, T. *et al.* Early re-laparotomy for post-operative complications is a significant risk factor for recurrence after ileocaecal resection for Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* **22**, 1043–1049 (2007).
99. Anseline, P. F., Włodarczyk, J. & Murugasu, R. Presence of granulomas is associated with recurrence after surgery for Crohn's disease: experience of a surgical unit. *Br J Surg* **84**, 78–82 (1997).
100. Siemers, P. T. & Dobbins, W. O., 3rd The Meissner plexus in Crohn's disease of the colon. *Surg Gynecol Obstet* **138**, 39–42 (1974).
101. Bouguen, G. & Peyrin-Biroulet, L. Surgery for adult Crohn's disease: what is the actual risk? *Gut* **60**, 1178–1181 (2011).
102. Peyrin-Biroulet, L., Loftus, E. V., Jr, Colombel, J.-F. & Sandborn, W. J. The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Am. J. Gastroenterol.* **105**, 289–297 (2010).
103. Fichera, A. *et al.* Patterns and operative treatment of recurrent Crohn's disease: a prospective longitudinal study. *Surgery* **140**, 649–654 (2006).
104. Rutgeerts, P. *et al.* Natural history of recurrent Crohn's disease at the ileocolonic anastomosis after curative surgery. *Gut* **25**, 665–672 (1984).
105. Fazio, V. W. *et al.* Effect of resection margins on the recurrence of Crohn's disease in the small bowel. A randomized controlled trial. *Ann. Surg.* **224**, 563–571; discussion 571–573 (1996).
106. Speranza, V., Simi, M., Leardi, S. & Del Papa, M. Recurrence of Crohn's disease after resection. Are there any risk factors? *J. Clin. Gastroenterol.* **8**, 640–646 (1986).
107. Geboes, K. & Collins, S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol. Motil.* **10**, 189–202 (1998).
108. Ferrante, M. *et al.* The value of myenteric plexitis to predict early postoperative Crohn's disease recurrence. *Gastroenterology* **130**, 1595–1606 (2006).
109. Sokol, H. *et al.* Plexitis as a predictive factor of early postoperative clinical recurrence in Crohn's disease. *Gut* **58**, 1218–1225 (2009).
110. DeLong, E. R., DeLong, D. M. & Clarke-Pearson, D. L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* **44**, 837–845 (1988).
111. Chambers, T. J. & Morson, B. C. The granuloma in Crohn's disease. *Gut* **20**, 269–274

- (1979).
112. Yamamoto, T. Factors affecting recurrence after surgery for Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* **11**, 3971–3979 (2005).
 113. Ahmed, T., Rieder, F., Fiocchi, C. & Achkar, J.-P. Pathogenesis of postoperative recurrence in Crohn's disease. *Gut* **60**, 553–562 (2011).
 114. Hällgren, R. *et al.* Neutrophil and eosinophil involvement of the small bowel in patients with celiac disease and Crohn's disease: studies on the secretion rate and immunohistochemical localization of granulocyte granule constituents. *Am. J. Med.* **86**, 56–64 (1989).
 115. Holzheimer, R. G., Molloy, R. G. & Wittmann, D. H. Postoperative complications predict recurrence of Crohn's disease. *Eur J Surg* **161**, 129–135 (1995).
 116. Peyrin-Biroulet, L. *et al.* Impact of azathioprine and tumour necrosis factor antagonists on the need for surgery in newly diagnosed Crohn's disease. *Gut* **60**, 930–936 (2011).
 117. Peyrin-Biroulet, L. *et al.* Urinary tract infections in hospitalized inflammatory bowel disease patients: a 10-year experience. *Inflamm. Bowel Dis.* **18**, 697–702 (2012).
 118. Williet, N. *et al.* Incidence of and impact of medications on colectomy in newly diagnosed ulcerative colitis in the era of biologics. *Inflamm. Bowel Dis.* (2011).doi:10.1002/ibd.21932
 119. Van der Sluis, M. *et al.* Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* **131**, 117–129 (2006).
 120. Franke, A. *et al.* Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nat. Genet.* **40**, 713–715 (2008).
 121. Fisher, S. A. *et al.* Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat. Genet.* **40**, 710–712 (2008).
 122. Hugot, J. P. *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 599–603 (2001).
 123. Lesage, S. *et al.* CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 845–857 (2002).
 124. Rosenstiel, P. *et al.* TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**, 1001–1009 (2003).
 125. Kobayashi, K. S. *et al.* Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307**, 731–734 (2005).

126. Abraham, C. & Cho, J. H. Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. *Inflamm. Bowel Dis.* **12**, 641–650 (2006).
127. Wehkamp, J., Schmid, M., Fellermann, K. & Stange, E. F. Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 460–465 (2005).
128. Yamamoto-Furusho, J. K., Barnich, N., Xavier, R., Hisamatsu, T. & Podolsky, D. K. Centaurin beta1 down-regulates nucleotide-binding oligomerization domains 1- and 2-dependent NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **281**, 36060–36070 (2006).
129. Peyrin-Biroulet, L. *et al.* NODs in defence: from vulnerable antimicrobial peptides to chronic inflammation. *Trends Microbiol.* **14**, 432–438 (2006).
130. Naser, S. A. *et al.* Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* **18**, 412–424 (2012).
131. Rioux, J. D. *et al.* Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat. Genet.* **39**, 596–604 (2007).
132. Parkes, M. *et al.* Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* **39**, 830–832 (2007).
133. Singh, S. B., Davis, A. S., Taylor, G. A. & Deretic, V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* **313**, 1438–1441 (2006).
134. Plowey, E. D., Cherra, S. J., 3rd, Liu, Y.-J. & Chu, C. T. Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* **105**, 1048–1056 (2008).
135. Duerr, R. H. *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**, 1461–1463 (2006).
136. Parham, C. *et al.* A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immunol.* **168**, 5699–5708 (2002).
137. Fossiez, F. *et al.* Interleukin-17. *Int. Rev. Immunol.* **16**, 541–551 (1998).
138. Yen, D. *et al.* IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J. Clin. Invest.* **116**, 1310–1316 (2006).
139. Chan, I., Liu, L., Hamada, T., Sethuraman, G. & McGrath, J. A. The molecular basis of lipoid proteinosis: mutations in extracellular matrix protein 1. *Exp. Dermatol.* **16**, 881–890 (2007).
140. Cho, J. H. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat.*

- Rev. Immunol.* **8**, 458–466 (2008).
141. Yang, S. K., Loftus, E. V., Jr & Sandborn, W. J. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Inflamm. Bowel Dis.* **7**, 260–270 (2001).
 142. Halfvarson, J., Bodin, L., Tysk, C., Lindberg, E. & Järnerot, G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* **124**, 1767–1773 (2003).
 143. Hugot, J.-P., Alberti, C., Berrebi, D., Bingen, E. & Cézard, J.-P. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* **362**, 2012–2015 (2003).
 144. Baumgart, M. *et al.* Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J* **1**, 403–418 (2007).
 145. Russel, M. G. *et al.* Inflammatory bowel disease: is there any relation between smoking status and disease presentation? European Collaborative IBD Study Group. *Inflamm. Bowel Dis.* **4**, 182–186 (1998).
 146. Andersson, P. & Sjö Dahl, R. Controversies in surgical treatment of inflammatory bowel disease. *Eur J Surg Suppl* 73–77 (2001).
 147. Okazaki, K. *et al.* A patient with improvement of ulcerative colitis after appendectomy. *Gastroenterology* **119**, 502–506 (2000).
 148. Russel, M. G. *et al.* Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: results of a large case-control study. South Limburg Inflammatory Bowel Disease Study Group. *Gastroenterology* **113**, 377–382 (1997).
 149. Amre, D. K. *et al.* Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *Am. J. Gastroenterol.* **102**, 2016–2025 (2007).
 150. Lee, J. Y. *et al.* Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J. Biol. Chem.* **279**, 16971–16979 (2004).
 151. Plat, J. & Mensink, R. P. Food components and immune function. *Curr. Opin. Lipidol.* **16**, 31–37 (2005).
 152. Klement, E. *et al.* Childhood hygiene is associated with the risk for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 1775–1782 (2008).
 153. Pierik, M. *et al.* Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* **12**, 1–8 (2006).
 154. Xavier, R. J. & Podolsky, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel

- disease. *Nature* **448**, 427–434 (2007).
155. Kastelein, R. A., Hunter, C. A. & Cua, D. J. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 221–242 (2007).
156. Koslowski, M. J. *et al.* Genetic variants of Wnt transcription factor TCF-4 (TCF7L2) putative promoter region are associated with small intestinal Crohn's disease. *PLoS ONE* **4**, e4496 (2009).
157. Wehkamp, J., Koslowski, M., Wang, G. & Stange, E. F. Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal Immunol* **1 Suppl 1**, S67–74 (2008).
158. Nuding, S., Fellermann, K., Wehkamp, J. & Stange, E. F. Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut* **56**, 1240–1247 (2007).
159. Dubuquoy, L. *et al.* PPARgamma as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut* **55**, 1341–1349 (2006).
160. Swidsinski, A. *et al.* Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**, 44–54 (2002).
161. Peyrin-Biroulet, L., Standaert-Vitse, A., Branche, J. & Chamaillard, M. IBD serological panels: facts and perspectives. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 1561–1566 (2007).
162. Valore, E. V. *et al.* Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J. Clin. Invest.* **101**, 1633–1642 (1998).
163. Shi, J. *et al.* Porcine epithelial beta-defensin 1 is expressed in the dorsal tongue at antimicrobial concentrations. *Infect. Immun.* **67**, 3121–3127 (1999).
164. Feng, Z. *et al.* Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by *Candida albicans*. *J. Dent. Res.* **84**, 445–450 (2005).
165. Jurevic, R. J., Bai, M., Chadwick, R. B., White, T. C. & Dale, B. A. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human beta-defensin 1: high-throughput SNP assays and association with *Candida* carriage in type I diabetics and nondiabetic controls. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 90–96 (2003).
166. Standaert-Vitse, A. *et al.* *Candida albicans* is an immunogen for anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody markers of Crohn's disease. *Gastroenterology* **130**, 1764–1775 (2006).
167. Braissant, O., Fougelle, F., Scotto, C., Dauça, M. & Wahli, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* **137**, 354–366 (1996).
168. Kalus, A. A. *et al.* Association of a genetic polymorphism (-44 C/G SNP) in the human

- DEFB1 gene with expression and inducibility of multiple beta-defensins in gingival keratinocytes. *BMC Oral Health* **9**, 21 (2009).
169. Ogino, S. *et al.* Colorectal cancer expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG, PPARgamma) is associated with good prognosis. *Gastroenterology* **136**, 1242–1250 (2009).
170. Jansson, E. A. *et al.* The Wnt/beta-catenin signaling pathway targets PPARgamma activity in colon cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 1460–1465 (2005).
171. Peyrin-Biroulet, L., Loftus, E. V., Jr, Colombel, J.-F. & Sandborn, W. J. Long-term complications, extraintestinal manifestations, and mortality in adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 471–478 (2011).
172. Lee, S. H. *et al.* ERK activation drives intestinal tumorigenesis in Apc(min/+) mice. *Nat. Med.* **16**, 665–670 (2010).
173. Waldner, M. J. *et al.* VEGF receptor signaling links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. *J. Exp. Med.* **207**, 2855–2868 (2010).
174. Rutter, M. D. *et al.* Cancer surveillance in longstanding ulcerative colitis: endoscopic appearances help predict cancer risk. *Gut* **53**, 1813–1816 (2004).
175. Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E. & Karin, M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* **138**, 2101–2114.e5 (2010).
176. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* **10**, 417–426 (2002).
177. Grenier, J. M. *et al.* Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1. *FEBS Lett.* **530**, 73–78 (2002).
178. Allen, I. C. *et al.* The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J. Exp. Med.* **207**, 1045–1056 (2010).
179. Dupaul-Chicoine, J. *et al.* Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity* **32**, 367–378 (2010).
180. Zaki, M. H., Vogel, P., Body-Malapel, M., Lamkanfi, M. & Kanneganti, T.-D. IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *J. Immunol.* **185**, 4912–4920 (2010).
181. Hu, B. *et al.* Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 21635–21640 (2010).
182. Herrera, V. L. M., Bagamasbad, P., Didishvili, T., Decano, J. L. & Ruiz-Opazo, N. Overlapping genes in Nalp6/PYPAF5 locus encode two V2-type vasopressin isoreceptors:

- angiotensin-vasopressin receptor (AVR) and non-AVR. *Physiol. Genomics* **34**, 65–77 (2008).
183. McPherson, R., Pincus, M. & Henry, J. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. (2007).
184. Stabler, S. P. & Allen, R. H. Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 299–326 (2004).
185. Antony, A. C. Vegetarianism and vitamin B-12 (cobalamin) deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**, 3–6 (2003).
186. Chitambar, C. *et al.* *Modern nutrition in health and disease*. (Lippincott William and Wilkins: 2006).
187. Antony, A. Megaloblastic anemia. In *Hoffman R. Hematology: basic principles and practice*. (2009).
188. Birn, H. The kidney in vitamin B12 and folate homeostasis: characterization of receptors for tubular uptake of vitamins and carrier proteins. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **291**, F22–36 (2006).
189. Carmel, R. Ethnic and racial factors in cobalamin metabolism and its disorders. *Semin. Hematol.* **36**, 88–100 (1999).
190. Olteanu, H. & Banerjee, R. Human methionine synthase reductase, a soluble P-450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine synthase activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 35558–35563 (2001).
191. O'Leary, V. B. *et al.* MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *Am. J. Med. Genet.* **107**, 151–155 (2002).
192. Moestrup, S. K. & Verroust, P. J. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu. Rev. Nutr.* **21**, 407–428 (2001).
193. Chakravarty, I. & Sinha, R. K. Prevalence of micronutrient deficiency based on results obtained from the national pilot program on control of micronutrient malnutrition. *Nutr. Rev.* **60**, S53–58 (2002).
194. Misra, A. *et al.* Hyperhomocysteinemia, and low intakes of folic acid and vitamin B12 in urban North India. *Eur J Nutr* **41**, 68–77 (2002).
195. Sirotnak, F. M. & Tolner, B. Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells. *Annu. Rev. Nutr.* **19**, 91–122 (1999).
196. Balamurugan, K. & Said, H. M. Role of reduced folate carrier in intestinal folate uptake. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **291**, C189–193 (2006).

197. Liu, M. *et al.* Structure and regulation of the murine reduced folate carrier gene: identification of four noncoding exons and promoters and regulation by dietary folates. *J. Biol. Chem.* **280**, 5588–5597 (2005).
198. Said, H. M. *et al.* Adaptive regulation of intestinal folate uptake: effect of dietary folate deficiency. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **279**, C1889–1895 (2000).
199. Xiao, S. *et al.* Maternal folate deficiency results in selective upregulation of folate receptors and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-E1 associated with multiple subtle aberrations in fetal tissues. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* **73**, 6–28 (2005).
200. Birn, H. *et al.* Megalin binds and mediates cellular internalization of folate binding protein. *FEBS J.* **272**, 4423–4430 (2005).
201. Antony, A. C. Folate receptors. *Annu. Rev. Nutr.* **16**, 501–521 (1996).
202. Hooijberg, J. H. *et al.* The role of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2 and MRP3 in cellular folate homeostasis. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 765–771 (2003).
203. Kerb, R., Hoffmeyer, S. & Brinkmann, U. ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics* **2**, 51–64 (2001).
204. Kooloos, W. M. *et al.* Functional polymorphisms and methotrexate treatment outcome in recent-onset rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* **11**, 163–175 (2010).
205. van der Heijden, J. W. *et al.* Involvement of breast cancer resistance protein expression on rheumatoid arthritis synovial tissue macrophages in resistance to methotrexate and leflunomide. *Arthritis Rheum.* **60**, 669–677 (2009).
206. Bohanec Grabar, P., Logar, D., Lestan, B. & Dolzan, V. Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **64**, 1057–1068 (2008).
207. Ranganathan, P. *et al.* Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **35**, 572–579 (2008).
208. Takatori, R. *et al.* ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* **24**, 546–554 (2006).
209. da Costa, M., Rothenberg, S. P., Sadasivan, E., Regec, A. & Qian, L. Folate deficiency reduces the GPI-anchored folate-binding protein in rat renal tubules. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **278**, C812–821 (2000).
210. Xiao, X. *et al.* Isolation and characterization of a folate receptor mRNA-binding trans-

- factor from human placenta. Evidence favoring identity with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1. *J. Biol. Chem.* **276**, 41510–41517 (2001).
211. Low, P. S. & Antony, A. C. Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1055–1058 (2004).
212. Matherly, L. H. Molecular and cellular biology of the human reduced folate carrier. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **67**, 131–162 (2001).
213. Matherly, L. H. & Goldman, D. I. Membrane transport of folates. *Vitam. Horm.* **66**, 403–456 (2003).
214. Zhao, R., Diop-Bove, N., Visentin, M. & Goldman, I. D. Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. *Annu. Rev. Nutr.* **31**, 177–201 (2011).
215. Antony, A. Megaloblastic anemias. *Goldman's Cecil medicine* (2012).
216. Suh, J. R., Herbig, A. K. & Stover, P. J. New perspectives on folate catabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **21**, 255–282 (2001).
217. Cook, J. D. Folate metabolism. *homocysteine in health and disease* (2001).
218. McCully, K. S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.* **56**, 111–128 (1969).
219. Wilcken, D. E. & Wilcken, B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J. Clin. Invest.* **57**, 1079–1082 (1976).
220. Boushey, C. J., Beresford, S. A., Omenn, G. S. & Motulsky, A. G. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* **274**, 1049–1057 (1995).
221. Kirke, P. N. *et al.* Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q. J. Med.* **86**, 703–708 (1993).
222. Bell, I. R. *et al.* Plasma homocysteine in vascular disease and in nonvascular dementia of depressed elderly people. *Acta Psychiatr Scand* **86**, 386–390 (1992).
223. Joosten, E. *et al.* Is metabolic evidence for vitamin B-12 and folate deficiency more frequent in elderly patients with Alzheimer's disease? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **52**, M76–79 (1997).
224. McCaddon, A., Davies, G., Hudson, P., Tandy, S. & Cattell, H. Total serum homocysteine in senile dementia of Alzheimer type. *Int J Geriatr Psychiatry* **13**, 235–239 (1998).
225. Riggs, K. M., Spiro, A., 3rd, Tucker, K. & Rush, D. Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **63**, 306–314 (1996).

226. Selhub, J. Homocysteine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **19**, 217–246 (1999).
227. Mudd, S. H., Ebert, M. H. & Scriver, C. R. Labile methyl group balances in the human: the role of sarcosine. *Metab. Clin. Exp.* **29**, 707–720 (1980).
228. Mudd, S. H. & Poole, J. R. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metab. Clin. Exp.* **24**, 721–735 (1975).
229. Eloranta, T. O., Martikainen, V. & Smith, T. K. Adaptation of adenosylmethionine metabolism and methionine recycling to variations in dietary methionine in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **194**, 364–371 (1990).
230. Finkelstein, J. D. & Martin, J. J. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J. Biol. Chem.* **259**, 9508–9513 (1984).
231. Cabrero, C., Duce, A. M., Ortiz, P., Alemany, S. & Mato, J. M. Specific loss of the high-molecular-weight form of S-adenosyl-L-methionine synthetase in human liver cirrhosis. *Hepatology* **8**, 1530–1534 (1988).
232. Balaghi, M., Horne, D. W. & Wagner, C. Hepatic one-carbon metabolism in early folate deficiency in rats. *Biochem. J.* **291** (Pt 1), 145–149 (1993).
233. Miller, J. W., Nadeau, M. R., Smith, J., Smith, D. & Selhub, J. Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine's co-ordinate regulation of homocysteine metabolism. *Biochem. J.* **298** (Pt 2), 415–419 (1994).
234. Miller, J. W. *et al.* Effect of vitamin B-6 deficiency on fasting plasma homocysteine concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* **55**, 1154–1160 (1992).
235. Miller, J. W., Nadeau, M. R., Smith, D. & Selhub, J. Vitamin B-6 deficiency vs folate deficiency: comparison of responses to methionine loading in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* **59**, 1033–1039 (1994).
236. Kang, S. S., Zhou, J., Wong, P. W., Kowalisyn, J. & Strokosch, G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am. J. Hum. Genet.* **43**, 414–421 (1988).
237. Takenaka, T., Shimomura, T., Nakayasu, H., Urakami, K. & Takahashi, K. [Effect of folic acid for treatment of homocystinuria due to 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency]. *Rinsho Shinkeigaku* **33**, 1140–1145 (1993).
238. Selhub, J. & Miller, J. W. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am. J. Clin. Nutr.* **55**, 131–138 (1992).
239. Dudman, N. P. *et al.* Disordered methionine/homocysteine metabolism in premature vascular disease. Its occurrence, cofactor therapy, and enzymology. *Arterioscler. Thromb.*

- 13**, 1253–1260 (1993).
240. Stabler, S. P. *et al.* Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Clin. Invest.* **81**, 466–474 (1988).
241. Brattström, L., Israelsson, B., Lindgärde, F. & Hultberg, B. Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Metab. Clin. Exp.* **37**, 175–178 (1988).
242. Park, Y. K. & Linkswiler, H. Effect of vitamin B6 depletion in adult man on the excretion of cystathionine and other methionine metabolites. *J. Nutr.* **100**, 110–116 (1970).
243. Kostulas, K. *et al.* A methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in ischaemic stroke and in carotid artery stenosis. *Eur. J. Clin. Invest.* **28**, 285–289 (1998).
244. Naurath, H. J. *et al.* Effects of vitamin B12, folate, and vitamin B6 supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations. *Lancet* **346**, 85–89 (1995).
245. Selhub, J., Jacques, P. F., Wilson, P. W., Rush, D. & Rosenberg, I. H. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* **270**, 2693–2698 (1993).
246. Goyette, P., Frosst, P., Rosenblatt, D. S. & Rozen, R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* **56**, 1052–1059 (1995).
247. Kang, S. S., Passen, E. L., Ruggie, N., Wong, P. W. & Sora, H. Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* **88**, 1463–1469 (1993).
248. Goyette, P. *et al.* Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. *Nat. Genet.* **7**, 551 (1994).
249. Frosst, P. *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.* **10**, 111–113 (1995).
250. Jacques, P. F. *et al.* Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* **93**, 7–9 (1996).
251. Christensen, B. *et al.* Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 569–573 (1997).
252. Schwartz, S. M. *et al.* Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine, folate, and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase

- gene. *Circulation* **96**, 412–417 (1997).
253. Refsum, H., Ueland, P. M., Nygård, O. & Vollset, S. E. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu. Rev. Med.* **49**, 31–62 (1998).
254. Kruidenier, L., Kuiper, I., Lamers, C. B. H. W. & Verspaget, H. W. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J. Pathol.* **201**, 28–36 (2003).
255. Outinen, P. A. *et al.* Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* **94**, 959–967 (1999).
256. Dincer, Y. *et al.* Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **52**, 1636–1641 (2007).
257. Wang, G., Woo, C. W. H., Sung, F. L., Siow, Y. L. & O, K. Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia: role of chemokine and adhesion molecules. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 1777–1783 (2002).
258. Jones, S. C. *et al.* Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gut* **36**, 724–730 (1995).
259. Ratter, F., Gassner, C., Shatrov, V. & Lehmann, V. Modulation of tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity by changes of the cellular methylation state: mechanism and in vivo relevance. *Int. Immunol.* **11**, 519–527 (1999).
260. Danese, S. *et al.* Homocysteine triggers mucosal microvascular activation in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **100**, 886–895 (2005).
261. Danese, S. *et al.* Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* **130**, 2060–2073 (2006).
262. Roybal, C. N. *et al.* Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J. Biol. Chem.* **279**, 14844–14852 (2004).
263. Peyrin-Biroulet, L. *et al.* [Folate metabolism and colorectal carcinogenesis]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **28**, 582–592 (2004).
264. Glória, L. *et al.* DNA hypomethylation and proliferative activity are increased in the rectal mucosa of patients with long-standing ulcerative colitis. *Cancer* **78**, 2300–2306 (1996).
265. Fujii, S. *et al.* Methylation of the oestrogen receptor gene in non-neoplastic epithelium as a marker of colorectal neoplasia risk in longstanding and extensive ulcerative colitis. *Gut* **54**, 1287–1292 (2005).

266. Drzewoski, J., Gasiórowska, A., Małécka-Panas, E., Bald, E. & Czupryniak, L. Plasma total homocysteine in the active stage of ulcerative colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 739–743 (2006).
267. Papa, A. *et al.* Hyperhomocysteinemia and prevalence of polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **96**, 2677–2682 (2001).
268. Zazos, P. *et al.* Hyperhomocysteinemia in ulcerative colitis is related to folate levels. *World J. Gastroenterol.* **11**, 6038–6042 (2005).
269. Peyrin-Biroulet, L. *et al.* Vascular and cellular stress in inflammatory bowel disease: revisiting the role of homocysteine. *Am. J. Gastroenterol.* **102**, 1108–1115 (2007).
270. Perła-Kaján, J., Twardowski, T. & Jakubowski, H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* **32**, 561–572 (2007).
271. EDWARDS, F. C. & TRUELOVE, S. C. THE COURSE AND PROGNOSIS OF ULCERATIVE COLITIS. III. COMPLICATIONS. *Gut* **5**, 1–22 (1964).
272. Slot, W. B., van Kasteel, V., Coerkamp, E. G., Seelen, P. J. & van der Werf, S. D. Severe thrombotic complications in a postpartum patient with active Crohn's disease resulting in ischemic spinal cord injury. *Dig. Dis. Sci.* **40**, 1395–1399 (1995).
273. Papa, A. *et al.* Early atherosclerosis in patients with inflammatory bowel disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **10**, 7–11 (2006).
274. Oldenburg, B., Fijnheer, R., van der Griend, R., vanBerge-Henegouwen, G. P. & Koningsberger, J. C. Homocysteine in inflammatory bowel disease: a risk factor for thromboembolic complications? *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 2825–2830 (2000).
275. Guédon, C. *et al.* Prothrombotic inherited abnormalities other than factor V Leiden mutation do not play a role in venous thrombosis in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **96**, 1448–1454 (2001).
276. Danese, S. Inflammation and the mucosal microcirculation in inflammatory bowel disease: the ebb and flow. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **23**, 384–389 (2007).
277. Cattaneo, M. *et al.* A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677T) increases the risk for deep-vein thrombosis in patients with mutant factor V (factor V:Q506). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 1662–1666 (1997).
278. Vasilopoulos, S. *et al.* Terminal ileum resection is associated with higher plasma homocysteine levels in Crohn's disease. *J. Clin. Gastroenterol.* **33**, 132–136 (2001).
279. Halsted, C. H., Gandhi, G. & Tamura, T. Sulfasalazine inhibits the absorption of folates in ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* **305**, 1513–1517 (1981).

280. Saibeni, S. *et al.* Low vitamin B(6) plasma levels, a risk factor for thrombosis, in inflammatory bowel disease: role of inflammation and correlation with acute phase reactants. *Am. J. Gastroenterol.* **98**, 112–117 (2003).
281. Mahmud, N. *et al.* Increased prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T variant in patients with inflammatory bowel disease, and its clinical implications. *Gut* **45**, 389–394 (1999).
282. Bjerregaard, L. T. *et al.* Hyperhomocysteinaemia, coagulation pathway activation and thrombophilia in patients with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **37**, 62–67 (2002).
283. Cattaneo, M. *et al.* High prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with inflammatory bowel disease: a pathogenic link with thromboembolic complications? *Thromb. Haemost.* **80**, 542–545 (1998).
284. Vecchi, M. *et al.* Inflammatory bowel diseases are not associated with major hereditary conditions predisposing to thrombosis. *Dig. Dis. Sci.* **45**, 1465–1469 (2000).
285. Magro, F. *et al.* High prevalence of combined thrombophilic abnormalities in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **15**, 1157–1163 (2003).
286. Peyrin-Biroulet, L. *et al.* Association of MTRR 66A>G polymorphism with superoxide dismutase and disease activity in patients with Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 399–406 (2008).
287. van Ede, A. E. *et al.* Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **41**, 658–665 (2002).
288. Herrlinger, K. R. *et al.* The pharmacogenetics of methotrexate in inflammatory bowel disease. *Pharmacogenet. Genomics* **15**, 705–711 (2005).
289. Melgar, S., Karlsson, A. & Michaëlsson, E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **288**, G1328–1338 (2005).
290. Murthy, S. N. *et al.* Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Dig. Dis. Sci.* **38**, 1722–1734 (1993).
291. Moat, S. J., Bonham, J. R., Cragg, R. A. & Powers, H. J. Elevated plasma homocysteine elicits an increase in antioxidant enzyme activity. *Free Radic. Res.* **32**, 171–179 (2000).
292. Nonaka, H., Tsujino, T., Watari, Y., Emoto, N. & Yokoyama, M. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by

- taurine. *Circulation* **104**, 1165–1170 (2001).
293. Durmaz, A. & Dikmen, N. Homocysteine effects on cellular glutathione peroxidase (GPx-1) activity under in vitro conditions. *J Enzyme Inhib Med Chem* **22**, 733–738 (2007).
294. D’Inca, R. *et al.* Oxidative DNA damage in the mucosa of ulcerative colitis increases with disease duration and dysplasia. *Inflamm. Bowel Dis.* **10**, 23–27 (2004).
295. Durak, I. *et al.* Mucosal antioxidant defense is not impaired in ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* **47**, 1015–1017 (2000).
296. Reimund, J. M., Hirth, C., Koehl, C., Baumann, R. & Duclos, B. Antioxidant and immune status in active Crohn’s disease. A possible relationship. *Clin Nutr* **19**, 43–48 (2000).
297. Korenaga, D. *et al.* Impaired antioxidant defense system of colonic tissue and cancer development in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J. Surg. Res.* **102**, 144–149 (2002).
298. Vijayalakshmi, B., Sesikeran, B., Udaykumar, P., Kalyanasundaram, S. & Raghunath, M. Effects of vitamin restriction and supplementation on rat intestinal epithelial cell apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 1614–1624 (2005).
299. Robert, K. *et al.* Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. *Gastroenterology* **128**, 1405–1415 (2005).
300. Mangiagalli, A. *et al.* Effects of homocysteine on apoptosis-related proteins and antioxidant systems in isolated human lymphocytes. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1671–1676 (2004).
301. Krishna, M., Woda, B., Savas, L., Baker, S. & Banner, B. Expression of p53 antigen in inflamed and regenerated mucosa in ulcerative colitis and Crohn’s disease. *Mod. Pathol.* **8**, 654–657 (1995).
302. Au-Yeung, K. K. W. *et al.* Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells via oxidative stress. *Circ. Res.* **94**, 28–36 (2004).
303. Carluccio, M. A. *et al.* Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H2344–2354 (2007).
304. Barinaga, M. Life-death balance within the cell. *Science* **274**, 724 (1996).
305. Iimura, M. *et al.* Bax is downregulated in inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis. *Gut* **47**, 228–235 (2000).
306. Schreiber, S. *et al.* Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn’s disease. *Lancet* **353**, 459–461 (1999).
307. Targan, S. R. *et al.* A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor

- necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1029–1035 (1997).
308. Waetzig, G. H., Rosenstiel, P., Nikolaus, S., Seegert, D. & Schreiber, S. Differential p38 mitogen-activated protein kinase target phosphorylation in responders and nonresponders to infliximab. *Gastroenterology* **125**, 633–634; author reply 635–636 (2003).
309. Waetzig, G. H., Seegert, D., Rosenstiel, P., Nikolaus, S. & Schreiber, S. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *J. Immunol.* **168**, 5342–5351 (2002).
310. Kyriakis, J. M. & Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* **81**, 807–869 (2001).
311. Kontoyiannis, D. *et al.* Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. *EMBO J.* **20**, 3760–3770 (2001).
312. Peracchi, M., Bamonti Catena, F., Pomati, M., De Franceschi, M. & Scalabrino, G. Human cobalamin deficiency: alterations in serum tumour necrosis factor-alpha and epidermal growth factor. *Eur. J. Haematol.* **67**, 123–127 (2001).
313. Scalabrino, G. *et al.* High tumor necrosis factor-alpha [corrected] levels in cerebrospinal fluid of cobalamin-deficient patients. *Ann. Neurol.* **56**, 886–890 (2004).
314. Börsch-Haubold, A. G. *et al.* Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in platelets is mediated by multiple stress-activated protein kinase pathways. *Eur. J. Biochem.* **265**, 195–203 (1999).
315. Eberhart, C. E. & Dubois, R. N. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **109**, 285–301 (1995).
316. Masferrer, J. L., Seibert, K., Zweifel, B. & Needleman, P. Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3917–3921 (1992).
317. Mitchell, J. A., Larkin, S. & Williams, T. J. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 1535–1542 (1995).
318. Lauritsen, K., Laursen, L. S., Bukhave, K. & Rask-Madsen, J. Effects of topical 5-aminosalicylic acid and prednisolone on prostaglandin E2 and leukotriene B4 levels determined by equilibrium in vivo dialysis of rectum in relapsing ulcerative colitis. *Gastroenterology* **91**, 837–844 (1986).
319. Leoncini, G., Bruzzese, D. & Signorello, M. G. Activation of p38 MAPKinase/cPLA2 pathway in homocysteine-treated platelets. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 209–216 (2006).

320. Beasley, D. & Cooper, A. L. Constitutive expression of interleukin-1alpha precursor promotes human vascular smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Physiol.* **276**, H901–912 (1999).
321. Peyrin-Biroulet, L., Desreumaux, P., Sandborn, W. J. & Colombel, J.-F. Crohn's disease: beyond antagonists of tumour necrosis factor. *Lancet* **372**, 67–81 (2008).
322. Morgenstern, I., Raijmakers, M. T. M., Peters, W. H. M., Hoensch, H. & Kirch, W. Homocysteine, cysteine, and glutathione in human colonic mucosa: elevated levels of homocysteine in patients with inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **48**, 2083–2090 (2003).
323. Chen, M. *et al.* Methyl deficient diet aggravates experimental colitis in rats. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 2486–2497 (2011).
324. Bossenmeyer-Pouricé, C. *et al.* Methyl donor deficiency affects fetal programming of gastric ghrelin cell organization and function in the rat. *Am. J. Pathol.* **176**, 270–277 (2010).
325. Mudter, J. & Neurath, M. F. Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. *Gut* **56**, 293–303 (2007).
326. Ina, K. *et al.* Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J. Immunol.* **163**, 1081–1090 (1999).
327. Zhang, C. *et al.* Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* **276**, 35867–35874 (2001).
328. Henderson, P., van Limbergen, J. E., Schwarze, J. & Wilson, D. C. Function of the intestinal epithelium and its dysregulation in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 382–395 (2011).
329. Roda, G. *et al.* Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* **16**, 4264–4271 (2010).
330. Malo, M. S. *et al.* Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota. *Gut* **59**, 1476–1484 (2010).
331. Peyrin-Biroulet, L. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 8772–8777 (2010).
332. Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469–480 (2006).
333. Scott, I. S. *et al.* A novel immunohistochemical method to estimate cell-cycle phase distribution in archival tissue: implications for the prediction of outcome in colorectal

- cancer. *J. Pathol.* **201**, 187–197 (2003).
334. Giaginis, C., Vgenopoulou, S., Vielh, P. & Theocharis, S. MCM proteins as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. *Histol. Histopathol.* **25**, 351–370 (2010).
335. Stoeber, K. *et al.* DNA replication licensing and human cell proliferation. *J. Cell. Sci.* **114**, 2027–2041 (2001).
336. Park, C. S. *et al.* Modulation of beta-catenin phosphorylation/degradation by cyclin-dependent kinase 2. *J. Biol. Chem.* **279**, 19592–19599 (2004).
337. Battaglia-Hsu, S. *et al.* Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 21930–21935 (2009).
338. Janssens, V. & Goris, J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* **353**, 417–439 (2001).
339. Lu, X. *et al.* Differential regulation of CDX1 and CDX2 gene expression by deficiency in methyl group donors. *Biochimie* **90**, 697–704 (2008).
340. Coskun, M., Troelsen, J. T. & Nielsen, O. H. The role of CDX2 in intestinal homeostasis and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 283–289 (2011).
341. Heazlewood, C. K. *et al.* Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med.* **5**, e54 (2008).
342. Blaise, S. A. *et al.* Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am. J. Pathol.* **170**, 667–679 (2007).
343. Blaise, S. *et al.* Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr. Res.* **57**, 777–782 (2005).
344. Mattson, M. P. & Shea, T. B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* **26**, 137–146 (2003).
345. Zou, T., Yang, W., Hou, Z. & Yang, J. Homocysteine enhances cell proliferation in vascular smooth muscle cells: role of p38 MAPK and p47phox. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **42**, 908–915 (2010).
346. Zou, C.-G. *et al.* Homocysteine promotes proliferation and activation of microglia. *Neurobiol. Aging* **31**, 2069–2079 (2010).
347. Zhang, Q., Zeng, X., Guo, J. & Wang, X. Effects of homocysteine on murine splenic B

- lymphocyte proliferation and its signal transduction mechanism. *Cardiovasc. Res.* **52**, 328–336 (2001).
348. Liu, W.-H. *et al.* Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Am. J. Pathol.* **177**, 2357–2365 (2010).
349. Zhang, H.-S., Cao, E.-H. & Qin, J.-F. Homocysteine induces cell cycle G1 arrest in endothelial cells through the PI3K/Akt/FOXO signaling pathway. *Pharmacology* **74**, 57–64 (2005).
350. Maiorano, D., Cuvier, O., Danis, E. & Méchali, M. MCM8 is an MCM2-7-related protein that functions as a DNA helicase during replication elongation and not initiation. *Cell* **120**, 315–328 (2005).
351. Lallès, J.-P. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr. Rev.* **68**, 323–332 (2010).
352. McGuckin, M. A., Eri, R., Simms, L. A., Florin, T. H. J. & Radford-Smith, G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 100–113 (2009).
353. Tuin, A. *et al.* Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. *Gut* **58**, 379–387 (2009).
354. Hendrickson, B. A., Gokhale, R. & Cho, J. H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 79–94 (2002).
355. Takahashi-Yanaga, F. & Sasaguri, T. The Wnt/beta-catenin signaling pathway as a target in drug discovery. *J. Pharmacol. Sci.* **104**, 293–302 (2007).
356. Yang, Q., Bermingham, N. A., Finegold, M. J. & Zoghbi, H. Y. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* **294**, 2155–2158 (2001).
357. Shroyer, N. F., Wallis, D., Venken, K. J. T., Bellen, H. J. & Zoghbi, H. Y. Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev.* **19**, 2412–2417 (2005).
358. Heller, F. *et al.* Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* **129**, 550–564 (2005).
359. Karlsson, J. *et al.* Regional variations in Paneth cell antimicrobial peptide expression along the mouse intestinal tract. *BMC Immunol.* **9**, 37 (2008).
360. Said, H. M. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease.

Biochem. J. **437**, 357–372 (2011).

361. Quadros, E. V. Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *Br. J. Haematol.* **148**, 195–204 (2010).

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) représentent un groupe de pathologies fréquentes. L'apport de l'analyse anatomopathologique des prélèvements dans le cadre de ces pathologies représente un rôle non négligeable dans la prise en charge des patients atteints par ces maladies, que ce soit du point de vue diagnostique ou du suivi de la maladie. Ainsi dans ce travail nous avons montré que la présence de lésions de pléxite sur la limite proximale de pièces de résection iléocaecale relative à une atteinte par la maladie de Crohn était prédictive d'une rechute de la maladie nécessitant une seconde chirurgie, pouvant ainsi guider le clinicien pour une prise en charge thérapeutique plus adaptée. D'un point de vue physiopathologique, les MICI sont des maladies dont la pathogénie reste encore en partie à élucider. Dans ce travail nous avons montré l'importance de certains acteurs comme PPAR gamma et NRLP6 dans le maintien d'un fonctionnement normal de l'intestin. En effet un déficit d'expression de ces molécules peut prédisposer au développement des MICI. Il en est de même pour une carence en donneurs de méthyles : en effet nous avons démontré qu'une telle carence aggravait les lésions de colite induites par DSS (Dextran Sulfate Sodium) chez le rat. Afin de mieux comprendre comment une carence en donneurs de méthyles pouvait intervenir dans la pathogénie de la maladie de Crohn, nous avons étudié l'impact de cette carence sur le fonctionnement et le développement de l'intestin grêle chez des rats issus de mères carencées en folate et en vitamine B12 durant la gestation et l'allaitement, démontrant ainsi qu'un déficit en donneurs de méthyles entraîne des conséquences sur le fonctionnement de l'intestin grêle, pouvant ainsi créer un état de prédisposition au développement de la maladie de Crohn.

Mots clés : Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales (MICI), Carence en donneurs de méthyles, anatomopathologie, pléxite, Maladie de Crohn.

Inflammatory bowel diseases (IBD) are very frequent. Pathological examination in IBD management is important for the diagnosis and for the follow-up of the disease. In this study we show that submucosal plexitis in the proximal resection margins and early surgical revision after the first ileocecal resection are associated with CD recidive requiring surgical treatment. It could be very important in order to stratify patients according to their risk, identifying those who can benefit from aggressive medication regimen, possibly modifying the natural course of CD. IBD pathogenesis is not completely clarified. We show the importance of molecules as PPAR gamma and NRLP6 in intestinal homeostasis : a reduced expression of PPAR gamma and NRLP6 could predispose of IBD. The same observation is made for methyl donor deficiency (MDD): methyl deficient diet aggravates experimental colitis induced by Dextran Sodium Sulfate in rat. To understand how MDD could play a part in Crohn's disease pathogenesis, we investigated whether MDD may affect development and functions of small intestine in rat pups from dams subjected to the MDD during gestation and lactation. MDD has dual effects on small intestine by producing dramatic effects on enterocyte differentiation and barrier function in rats. Our observations could explain how vitamin B12 and folate deficiency can play a role in Crohn's disease development.

Key words : Inflammatory Bowel Disease (IBD), Methyl Donor Deficiency, pathology, plexitis, Crohn's disease.