

« Université de Bourgogne Franche-Comté-UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques »

Ecole doctorale Environnements-Santé

Evaluation des facteurs issus de l'efferocytose comme médicament innovant dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Thèse

Présentée et soutenue publiquement le 10 Novembre 2017 par

Omayra MARTIN-RODRIGUEZ

En vue du grade de

Docteur

De l'Université de Bourgogne Franche-Comté

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Directeur de thèse : Dr Sylvain Perruche

Jury :

Pr. Xavier ROBLIN

Rapporteur

Dr. Julien MARIE

Rapporteur

Pr. Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT

Examineur -Président du Jury

Dr. Yann PELLEQUER

Examineur

UMR1098

Equipe : Auto-immunité, Transplantation et Inflammation,

Groupe : Modulation des Réponses Immunes

Remerciements

*J'exprime mes plus sincères remerciements aux **Pr Xavier ROBLIN** et **Dr Julien C. MARIE** pour avoir accepté d'expertiser mon travail de thèse et de participer au Jury. Je remercie également le **Pr Marcelo DE CARVALHO-BITTENCOURT** et le **Dr Yann PELLEQUER** pour leur participation au jury, mais aussi pour leurs avis et leurs conseils tout au long de ce projet au sein du comité de suivi de thèse.*

*Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements au **Dr Sylvain PERRUCHE** pour son encadrement pendant ces trois années. Je lui suis reconnaissant de m'avoir apporté son aide, ses encouragements, son dynamisme et enthousiasme pour la recherche, mais également pour m'avoir fait confiance tout au long de ce projet.*

*Je remercie aussi le **Pr Philippe SAAS** pour m'avoir accueilli au sein de l'UMR 1098, pour ses conseils et sa démarche scientifique toujours pertinente et constructive mais aussi par sa gentillesse.*

Je remercie le ministère de l'éducation, l'université Bourgogne-Franche-Comté, l'INSERM ainsi que l'EFS BFC, pour leur soutien financier durant ces trois années de thèse.

Je remercie également toutes les personnes qui ont participées à l'élaboration de ce travail, mes collègues et amis :

***Anna** pour sa gentillesse, sa bonne humeur, sa disposition et son aide inconditionnelle autant dans le domaine professionnelle que personnelle...Tu es une vrai « maman » et je n'oublierai jamais ton plus grand conseil : « Omy rentre chez toi.... ». Je souhaite que cette amitié pourra perdurer dans le temps, on ne sait jamais si un jour je pourrai être embauchée grâce à ta nouvelle et innovante découverte, laquelle de tout mon cœur je souhaite que tu arrives à développer. **Adrien** également pour ta gentillesse, mais surtout pour ta patience au cours de la première année. Pour nous avoir initiés dans la science abstraite et parfois obscure de la cytométrie. Merci également pour tes conseils, ta sincérité et pour la bonne humeur apportée au bureau. **Thierry**, mon compagnon de voyage. Comme tu m'avais dit un jour, ceux qui doivent être remerciés n'ont pas besoin de l'être car ils le savent. Mais je ne peux pas laisser passer cette occasion pour te dire un grand MERCI pour ces cinq années de galères et de réussites. Merci pour toute l'aide, le réconfort ainsi que les encouragements que j'ai pu retrouver auprès de toi. Le NIH à la chance de recruter quelqu'un d'aussi noble, sincère et enthousiaste que toi. Je te souhaite tout la réussite et le bonheur du monde aux USA à côté de ta belle famille. Vous avez été tous les trois un vrai « cadeau » pour le commencement dans cette nouvelle équipe, dans cette nouvelle thématique et surtout dans cette grande aventure.*

***Mélanie** et **Francis**, je vous remercie également pour vos conseils et disponibilités pendant ces trois années, et surtout pour avoir été mes fournisseurs personnels de SuperMApo. Je vous souhaite beaucoup de réussite dans ce beau projet appelé MED'INN'Pharma.*

***Cécile Anaïs** et **Hanane**, aussi bien qu'Anna, Adrien et Thierry ont été un cadeau pour le commencement de la thèse, vous l'avez été pour la fin. Je vous remercie énormément pour votre aide apportée, notamment sur la rédaction du manuscrit de thèse ainsi que pour la préparation de l'oral. Je suis très contente d'avoir eu l'opportunité de partager le bureau pendant cette dernière année avec d'aussi belles personnes. Continuez telles que vous êtes.*

*Je tiens également à remercier **Mymi, Alphonsine et Charline**, pour tout l'aide apportée lors des démarches administratives et surtout pour votre bonne humeur au quotidien.*

***Claire et Faten** pour avoir été des stagiaires brillantes m'ayant bien aidé dans la mise en place et le déroulement de mes expériences, et notamment Claire pour m'avoir initiée dans le passionnant monde de l'intestin.*

*Je remercie également l'équipe technique de l'animalerie **Dom, François et Emmanuelle** pour avoir bien pris soin de mes petites souris, mais également pour toutes les franches rigolades que j'ai pu avoir avec vous. Vos fous rires et votre bonne humeur ont rendu bien des journées plus agréables.*

*Enfin, toutes les personnes côtoyées à l'EFS et à l'IBCT: **Inès, Audrey, Séverine, Emilie, Kiki, Adam, Clémence, Sara, Anne, Sabeha et Patricia**, qui ont pu contribuer de près ou de loin à ce travail, ainsi que pour leur gentillesse et leur amitié. Egalement je tiens à remercier les personnes appartenant au département d'anapaht du CHRU de Besançon et notamment le Pr. Séverine Valmary-Dégano pour leur temps, leur aide, ainsi que pour leur expertise.*

*Finalement, je tiens à exprimer mes chaleureux remerciements à mes amis extérieurs au laboratoire à mon compagnon et à ma famille aussi loin mais aussi présent dans mon cœur. Ce travail n'aurait jamais abouti sans tout l'amour et tout le soutien que vous m'avez transmis. Même si ces dernières années ont été remplies de moments très durs, votre présence et encouragements m'ont transmis la force nécessaire pour surmonter ces difficiles périodes. Parfois notre lumière s'éteint et puis elle est « majestueusement » rallumée par un autre être humain, merci **Quentin**.*

*« Chaque jour, Maman se tient près de moi, et je sais que ce que j'ai pu accomplir dans ma vie l'a été grâce à elle » **Simon Veil**.*

Bien à vous,

Omayra MARTIN-RODRIGUEZ.

RESUME

La clairance des cellules apoptotiques par les macrophages est à l'origine d'un microenvironnement pro-résolutif composé de différents facteurs solubles, permettant de stopper la réaction inflammatoire et d'engager la réparation tissulaire. La résolution de l'inflammation est parfois défailante et concourt au développement de pathologies inflammatoires chroniques, comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Dans ce contexte, nous proposons d'évaluer l'efficacité thérapeutique de l'injection de ces facteurs pro-résolutifs dans le traitement des MICI. Ce produit issu de la culture de macrophages avec des cellules apoptotiques, appelé SuperMApo (*Supernatant issued from Macrophage Apoptotic cell culture*) (Brevet # **WO2014106666-A1**, 2013) contient des facteurs pro-résolutifs semblables à ce que nous retrouvons dans le processus physiologique de résolution de l'inflammation, et qui peuvent être absents ou inefficaces chez ces patients.

Dans ces travaux, nous avons mise en évidence une efficacité thérapeutique des facteurs pro-résolutifs contenus dans SuperMApo, à l'aide de deux modèles expérimentaux de colite. Pour évaluer la pertinence de ces modèles par rapport à la pratique clinique, nous avons mise en place la vidéo-endoscopie souple. Nous avons montré que l'efficacité de SuperMApo se traduit par une diminution des scores clinique, endoscopique et histologique des souris colitiques, accompagnée d'une amélioration de la perméabilité intestinale, et de la cicatrisation muqueuse. Cette efficacité thérapeutique est liée en partie à une reprogrammation des cellules présentatrices d'antigènes (APC) notamment de cellules dendritiques conventionnelles (cDC) et de macrophages qui présentent une moindre réponse aux ligands de TLR, favorisent l'induction de Treg et inhibent la production de Th1. Par ailleurs, SuperMApo induit une cicatrisation nette de la muqueuse intestinale associée à la fois à une activation des myofibroblastes (la forme active des fibroblastes) et des cellules intestinales épithéliales (IEC). Concrètement, SuperMApo augmente les propriétés de migration, de prolifération et de cicatrisation de ces deux types cellulaires. Cet effet dépend en partie des facteurs de croissance au sein de SuperMApo comme le TGF β , l'IGF-I et le VEGF. Enfin des résultats préliminaires montrent que SuperMApo induit un profil réparateur sur des fibroblastes issus de patients atteints de MICI. L'ensemble de ces résultats démontre, que l'injection de ces facteurs pro-résolutifs permet la mise en place de mécanismes capables d'initier le processus de résolution de l'inflammation et ouvre vers une utilisation clinique de cette approche dans le traitement de MICI.

ABSTRACT

Inflammation is a natural body defence reaction in response to injuries. The clearance of apoptotic cells by macrophages is at the origin of a pro-resolving microenvironment composed of various soluble factors, allow the stop of the inflammatory response and to initiate tissue repair. Inflammation resolution is sometimes defective and contributes to the development of chronic inflammatory diseases, such as chronic inflammatory bowel disease (IBD). In this context, we propose to evaluate the therapeutic effect of these pro-resolving factors administration in the treatment of IBD. These factors derived from the culture of macrophages with apoptotic cells, and called SuperMApo (*Supernatant issued from Macrophage Apoptotic cell culture*) (Patent # **WO2014106666-A1**, 2013) contains pro-resolving factors similar to those found in the physiological process of inflammatory resolution, and which maybe absent or ineffective in these patients.

In this work we have demonstrated the therapeutic effect of SuperMApo using two experimental models of colitis. To assess the relevance of these models to clinical practice, we have implemented flexible video-endoscopy. The therapeutic effect of SuperMApo has been shown to decrease the clinical, endoscopic and histological score of colitis mice, accompanied by improved intestinal permeability and mucosal healing *in vivo*. This therapeutic effect is related in part to reprogramming of the antigen presenting cells (APC), in particular on cDC and macrophages. SuperMApo induced a tolerogenic state of APC that exhibit less response to TLR ligands, promoted induction of Treg *ex vivo* and inhibited Th1 production *ex vivo* and *in vivo*. In addition, SuperMApo induced a marked tissue repair of the intestinal mucosa associated with activation of myofibroblasts, the active form of fibroblasts and the epithelial intestinal cells (IEC). Notably, SuperMApo increased the migration, proliferation and wound healing properties of these two cell types. This effect depends in part on the growth factors contained in SuperMApo such as TGF β , IGF-I and VEGF. Finally, preliminary results show that SuperMApo induced a repairing state on fibroblasts from patients with IBD. This opens widely the use of SuperMApo such a clinically approach to propose this new therapeutic option to refractory patients suffering from IBD.

TABLE DES MATIERES

RESUME	4
ABSTRACT	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS	8
ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	11
PARTIE I : PROCESSUS INFLAMMATOIRE ET RESOLUTION	11
1. Initiation de l'inflammation	11
1.1 Les signaux de danger et leur reconnaissance	12
1.2 Régulation des réponses inflammatoires par les PRR	13
1.3 Les médiateurs de la réponse inflammatoire.....	15
1.1 Effecteurs cellulaires de la réponse inflammatoire	18
1.1.1 Phase I : Reconnaissance du danger et recrutement des cellules effectrices.....	18
1.1.2 Phase II : Les neutrophiles induisent le recrutement des monocytes classiques	22
1.1.3 Phase III : Les signaux phagocytaires induisent la résolution de l'inflammation	23
• La mort des neutrophiles.....	27
• Le recrutement des phagocytes et la prise en charge des cellules apoptotiques....	28
1.1.1 Phase IV : Phase de résolution et retour à l'homéostasie.....	29
PARTIE II : DÉRÉGULATION DU PROCESSUS DE RÉOLUTION DE L'INFLAMMATION ET ÉTABLISSEMENT DES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES.....	32
2. Contexte et généralités de la dérégulation du processus de résolution de l'inflammation	32
3. Etapes défaillantes lors du processus de résolution de l'inflammation.....	33
3.1 Défaut du processus d'apoptose.....	33
3.2 Défaillance du processus d'efferocytose.....	34
3.3 Défaut de la reprogrammation des macrophages	35
PARTIE III : MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN, REPARATION TISSULAIRE ET THERAPIES.....	36
4. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	36
4.1 Généralités et historique	36
4.2 Physiopathologie des MICI.....	37
4.1 Epidémiologie et étiologie	38

4.1.1	Facteurs génétiques	40
4.1.2	Facteurs environnementaux.....	42
4.1.3	Facteurs immunologiques	42
	• Rôle de la barrière intestinale muqueuse	42
	• Rôle du microbiote intestinal	47
	• Processus inflammatoire	48
5.	Processus de réparation tissulaire.....	51
5.1	Phase inflammatoire (0-48h).....	53
5.2	Phase proliférative (2 à 10 jours)	56
5.2.1	Etape de réépithélialisation	56
5.2.1	Etape d'angiogenèse.....	59
5.2.2	Fibroplasie	60
5.3	Phase de remodelage (semaines-mois)	61
6.	Mécanismes de résolution de l'inflammation impliqués dans les MICI.....	62
6.1	Généralités	62
6.2	Neutrophiles et résolution de l'inflammation dans les MICI.....	63
6.3	Macrophages résolution de l'inflammation dans les MICI.....	64
6.4	Barrière intestinal épithélial et résolution de l'inflammation dans les MICI.....	64
7.	Traitements des MICI.....	65
7.1	Traitements conventionnels actuels	66
7.1.1	Les salicylés et corticoïdes	66
7.1.2	Les immunosuppresseurs: azathioprine, méthotrexate et cyclosporine.	67
7.1.3	Les biothérapies.....	67
7.2	Thérapies innovantes et pro-résolutives.....	69
CONTEXTE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE		73
RESULTATS		74
I : Mise en place de la vidéo endoscopie dans des modèles expérimentaux de MICI...		74
II : Evaluation des facteurs issus de l'efferocytose comme médicament innovant dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.....		101
III Résultats complémentaires.....		133
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		138
BIBLIOGRAPHIE		149

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Représentation schématique de l'Amplitude temporelle de la réponse inflammatoire	12
Figure 2 : Cinétique des médiateurs cellulaires et moléculaires au cours de la réponse inflammatoire.	15
Figure 3 : Les éléments essentiels de la réponse inflammatoire.	18
Figure 4 : Interaction des phagocytes effecteurs lors de l'inflammation.	19
Figure 5 : Les différentes étapes de l'efferocytose..	29
Figure 6 : Phase post-résolution..	31
Figure 7 : Caractéristiques pathologiques de la maladie de Crohn (MC) et de la rectocolite hémorragique (RCH).	38
Figure 8 : La prévalence mondiale de MICI en 2015.....	39
Figure 9 : Facteurs impliqués dans la physiopathogénie des MICI	40
Figure 10 : Maintenance cellulaire d'une crypte intestinale.	43
Figure 11 : Résolution de l'inflammation intestinale dans de conditions d'homéostasie.	49
Figure 12 : Exhaustion de la réponse inflammatoire intestinale.	50
Figure 13 : Le processus de réparation tissulaire.	53
Figure 14 : Les différents profils des macrophages au cours du processus de réparation tissulaire, de régénération et de fibrose.	55
Figure 15 : Modèle représentatif des mécanismes impliqués dans la réparation de la muqueuse intestinale.	57
Figure 16 : Equilibre entre les mécanismes pro-inflammatoires et pro-résolutifs	65
Figure 17 : Principaux traitements conventionnels actuels des MICI, en fonction de leur sévérité.	66
Figure 18 : Concepts actuels et futurs pour la thérapie de MICI.	71
Figure 17 : SuperMApo diminue l'infiltrat inflammatoire et la polarisation.....	134
Figure 18 : Le traitement par SuperMApo induit des propriétés pro-régulatrices aux macrophages et aux cDC. Les cDC et les macrophages (macro) ont été isolés de la rate des souris colitiques traitées ou non par SuperMApo.	136
Figure 19 : Le traitement SuperMApo induit l'expression de PD-L1 dans les macrophages et les cDC du colon.	137

ABBREVIATIONS

ADN: Acide Désoxyribonucléique	iNOS: inducible Nitric Oxidase Synthase
ARN: Acide Ribonucléique	LB: Lymphocyte B
APC: Antigen Presenting Cell	LPS: Lipopolysaccharide
BAI1: Brain-specific Angiogenesis Inhibitor 1	LT: Lymphocyte T
BMP: Bone Morphogenetic Protein	LXA: Lipoxine A
IEC: Intestinal Epithelial Cell	M-CSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor
CD: Crohn Disease	MC: Maladie de Crohn
CLR : C-Type Lectin Receptor	MDSCs: Myeloid-Derived Suppressor Cells
Col: Collagen	MEC: Matrice Extracellulaire
CSH: Cellules Souches Hématopoïétiques	MFGE: Milk fat globule-EGF factor 8 protein
CSM: Cellules Souches Mésenchymateuses	MLN: Mesenteric Lymph Nodes
DAMP: Damage Associated Molecular Pattern	MTX : Méthotrexate
DC (ou cDC): Classical Dendritic Cell	MICI: Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
DSS: Dextran Sulfate Sodium	MMP: Matrix Métalloprotéases
EGF: Epithelial Growth Factor	SPM: Specialized Pro-resolving Mediators
FGF: Fibroblast Growth Factor	NK: Natural Killer
Fn1: Fibronectin 1	NFκB: Nuclear Factor kappa B
Foxp3: Forkhead Box P3	NLR: NOD-Like-Receptors
Gas6: Growth arrest-specific 6	NO: Nitric Oxide
G-CSF: Granulocyte-Colony-Stimulating Factor	NOD: Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein
GETAID: Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires du tube Digestif	PAF: Platelet Activating Factor
GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor	PAMP: Pathogen Activation Molecular Pattern
GWAS: Genome-Wide Association Study	pDC: plasmacytoid Dendritic Cells
IBD: Inflammatory Bowel Disease	PD-1: Programmed Cell Death 1
1IFN: Interferon	PD-L1: Programmed Cell Death Ligand 1
IGF-1: Insulin Growth Factor-1	PGE2: Prostaglandine E2
IL: Interleukin	PMN: Polymorphonuclear Neutrophils
ILC: Innate Lymphoid Cells	PPAR-γ: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma

PRR: Pattern Recognition Receptor

PtdSer: Phosphatidylsérine

RCH: Rectocolite Hémorragique

REG3 γ : Lectin-Regenerating islet-derived protein III-gamma

RvD: Resolvin

RIG-I: Retinoic acid-Inducible Gene I

RLR: RIG-I-Like Receptors

ROR: Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor

ROS: Reactive Oxygen Species

SuperMApo: Supernatant from Macrophages and Apoptotic cell culture

TGF β : Transforming Growth Factor beta

Th: Lymphocyte T helper

TLR: Toll Like Receptor

TNBS: Trinitro Benzene Sulfonic Acid

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

Treg: Lymphocytes T régulateurs

TSP-1: Thrombospondine 1

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

WT: Wild-Type

α -SMA : alpha-Smooth Muscle Actine

INTRODUCTION

PARTIE I : PROCESSUS INFLAMMATOIRE ET RESOLUTION

En 1794 le chirurgien britannique John Hunter écrit pour la première fois que « l'inflammation en elle-même ne doit pas être considérée comme une maladie mais comme une conséquence de l'opération salutaire à une agression ou une maladie ». Ce point de vue crucial, souligne que le résultat final du programme inflammatoire aigu est la résolution réussie de l'inflammation et la réparation des dommages tissulaires, plutôt que la persistance de la réponse inflammatoire, ce qui peut entraîner un mauvais processus de cicatrisation et une perte de fonction tissulaire et de l'organe à long terme (Gilroy, Lawrence et al. 2004).

De nos jours, la réponse inflammatoire est considérée comme une réponse physiopathologique naturelle de l'organisme contre une infection et/ou une agression. Cette réponse locale et systémique vise à éliminer le stimulus initial, à favoriser la réparation tissulaire et, dans le cas d'une infection, à établir une mémoire immunitaire de sorte que l'hôte puisse répondre de façon plus rapide et plus spécifique lors d'une future rencontre. Cette réponse inflammatoire fait intervenir les deux principales composantes du système de défense de l'hôte : l'immunité innée et l'immunité acquise. Chez les mammifères, les épithéliums constituent la première ligne de défense contre les infections (par exemple, la peau et l'épithélium intestinal). Néanmoins, quand ces premières lignes de défense sont fragilisées, le système immunitaire va gérer le conflit grâce à la réponse immunitaire innée. Par la suite, celle-ci va produire des signaux spécifiques et nécessaires à l'activation et à la modulation d'une réponse immunitaire adaptative fournissant les effecteurs essentiels à la lutte contre le stimulus initiateur.

1. Initiation de l'inflammation

La réponse inflammatoire aiguë est une séquence complexe et coordonnée d'événements impliquant des facteurs moléculaires, cellulaires et des altérations physiologiques. L'évolution temporelle de ce processus inflammatoire dynamique est décrite par une courbe de croissance rapide, suivi d'un plateau et finalement d'une phase de décroissance (**Figure 1**). Cette courbe intègre les trois étapes principales de l'inflammation: l'initiation, la phase inflammatoire et la résolution de l'inflammation. Cette dernière étape implique le recrutement de phagocytes qui éliminent les cellules effectrices mortes, comme les neutrophiles ayant joué leur rôle et devenus apoptotiques. Ce processus de phagocytose génère un microenvironnement pro-

résolutif capable d'induire l'arrêt de la réponse inflammatoire par la régulation négative des facteurs pro-inflammatoires. Ceci réduit l'amplitude et la durée de l'inflammation, favorisant ainsi un retour à l'homéostasie et la réparation tissulaire. Cependant, une réponse inflammatoire prolongée dans le temps ou un problème lors de la résolution peuvent être à l'origine de maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), ou encore certains types de cancer.

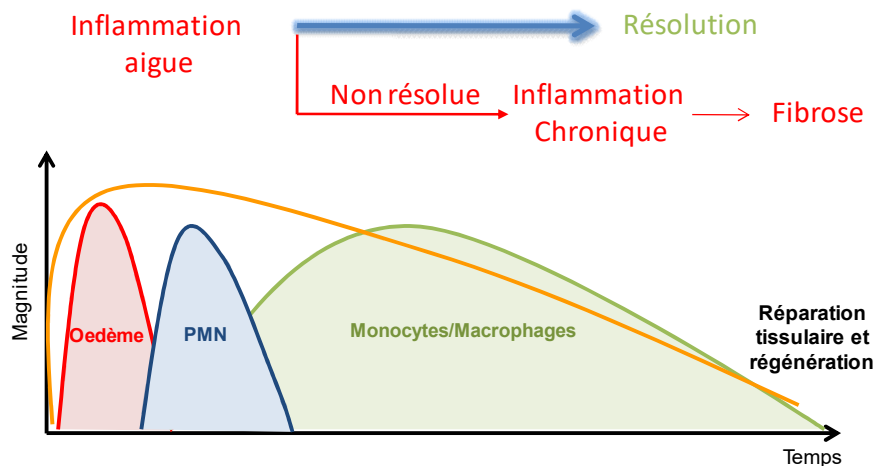


Figure 1 : Représentation schématique de l'Amplitude temporelle de la réponse inflammatoire (courbe orange), comprenant différentes étapes de l'initiation vers la phase de résolution. (1) : exsudation (courbe rouge), (2) : recrutement des neutrophiles (PMN), (3) : apoptose des cellules effectrices (courbe bleue) et (4) : élimination des cellules apoptotiques par les monocytes dérivés en macrophages (courbe verte). Ces flux de leucocytes sont associés au changement de classe des médiateurs lipidiques dans lesquels les médiateurs lipidiques pro-inflammatoires laissent place aux médiateurs lipidiques pro-résolutifs. D'après (Spite, Claria et al. 2014).

1.1 Les signaux de danger et leur reconnaissance

Il existe deux sources principales de danger pour l'organisme : la source exogène et celle endogène. La source exogène inclue des facteurs non microbiens comme les corps étrangers, les allergènes, les molécules irritantes et toxiques, des facteurs microbiens ou motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, *Pathogen-Associated MolecularPattern*) et des facteurs de virulence. Les PAMP sont des composants fonctionnels essentiels des microorganismes qui permettent à la cellule hôte de distinguer le « soi » du « non-soi », favorisant ainsi les signaux associés à l'immunité innée (Janeway and Medzhitov 2002). Il s'agit d'un ensemble de motifs moléculaires très souvent vitaux et conservés dans un groupe large de pathogène (Medzhitov and Janeway 1997).

Les principaux PAMP sont les acides nucléiques microbiens (ADN, ARN bi- et monocaténares, ARN 5'-triphosphate), les lipoprotéines, les glycoprotéines de surface et les

composants membranaires, comme par exemple les peptidoglycanes ou encore le lipopolysaccharide (LPS). Des récepteurs permettant leur reconnaissance ont été développés par l'organisme, notamment les récepteurs de signaux de dangers appelés PRR (*Pattern Recognition Receptors*). Ces récepteurs peuvent également être à l'origine de la reconnaissance des facteurs appartenant à la source endogène, dénommés «alarmines» ou DAMP (*Damage-Associated Molecular Pattern*). Les DAMP sont des molécules dérivées de cellules qui peuvent initier et perpétuer l'immunité en réponse aux traumatismes, à l'ischémie, au cancer et à d'autres paramètres de lésions tissulaires, en absence d'une infection pathogène. Les DAMP peuvent être issus du noyau et du cytoplasme comme HMGB1 (*High-Mobility Group Box 1 protein*), seulement du cytoplasme comme les protéines S100, des exosomes comme les HSP (*Heat Shock Protein*), de la matrice extracellulaire comme l'acide hyaluronique) et de composants du plasma (C3a, C4a et C5a). Il existe également des DAMP non protéiques comme l'ATP, l'acide urique, le sulfate d'héparine, l'ARN et l'ADN. L'augmentation du taux sérique de ces DAMP est associée à des maladies inflammatoires comme la septicémie, l'arthrite, l'athérosclérose, le lupus érythémateux systémique, la maladie de Crohn et le cancer. En 1994, Polly Matzinger a suggéré que le système immunitaire est plus concerné par le « danger » ou le « dommage » que par la distinction entre le « soi » et le « non-soi » (Matzinger 1994). Dans l'hypothèse de Polly Matzinger (Matzinger 2002; Matzinger 2007), les cellules présentatrices d'antigènes (APC) sont activées par les PAMP et DAMP à partir des tissus dysfonctionnels ou lésés, ainsi que par les microbes (Seong and Matzinger 2004).

1.2 Régulation des réponses inflammatoires par les PRR

Le système immunitaire inné a la capacité de faire la différence entre la flore commensale bénéfique et les microorganismes pathogènes, bien qu'exprimant tous deux des PAMP qui peuvent être reconnus par les PRR. Ceci est le résultat de leur reconnaissance en tant qu'organisme pathogène qui va dépendre d'autres caractéristiques supplémentaires comme la capacité d'invasion du microorganisme ainsi que la production de toxines. Des études récentes ont mis en évidence, que seulement une partie très restreinte des microorganismes qui colonisent l'hôte peuvent être considérés comme pathogènes (Belkaid and Naik 2013). Les PRR vont déterminer l'origine des antigènes qui sont reconnus par les lymphocytes T et B, induisant une réponse immunitaire appropriée selon le type de pathogène rencontré. Ainsi, le système immunitaire inné a développé de nombreux PRR capables de détecter tout un panel de dangers exogènes et endogènes. Les PRR se caractérisent par leur expression tissu-

dépendante, ainsi que par leur localisation dans les différents compartiments cellulaires. Leur mode d'expression différent est lié à deux modes généraux de reconnaissance par le système immunitaire inné : (i) la reconnaissance cellulaire intrinsèque qui est médiée par des récepteurs cytosoliques intracellulaires opérant dans les cellules infectées ; et (ii) la reconnaissance cellulaire extrinsèque durant laquelle la cellule exprimant les PRR (cellule spécialisée dans la détection des agents pathogènes) n'est pas nécessairement infectée (Barton and Kagan 2009). Au lieu de cela, les PRR impliqués dans la reconnaissance cellulaire extrinsèque (par exemple TLR et CLR (*C-Type Lectin Receptor*)) sont seulement exprimés dans des cellules spécialisées dans la détection des agents pathogènes, telles que les cellules des épithéliums de surface et les cellules myéloïdes (Barton and Kagan 2009).

Parmi les principales familles de PRR, on retrouve notamment les TLR (*Toll-Like Receptors*) capables de reconnaître un grand nombre de PAMP et de DAMP (Lemaitre, Nicolas et al. 1996; Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997). Chez la souris treize TLR ont été identifiés jusqu'à présent (Akira, Uematsu et al. 2006), dont les principaux sont les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 qui ont une localisation transmembranaire à la surface des cellules, et les TLR3, TLR7 et TLR9 surtout présents à la membrane du réticulum endoplasmique (Barton and Kagan 2009). Ces récepteurs se présentent sous forme de dimères afin d'interagir de façon optimale avec leurs ligands. Malgré la diversité de reconnaissance des PAMP par les TLR, toute liaison du ligand avec son récepteur va déclencher de façon générale une dimérisation du récepteur, aboutissant à une cascade de signalisations qui va induire une réponse inflammatoire. Grâce à ces événements de signalisation des cytokines pro-inflammatoires comme les IFN de type I vont être libérées dans l'environnement, permettant à la fois le recrutement de phagocytes et neutrophiles, ainsi que l'activation des cellules dendritiques qui vont permettre par la suite l'activation de la réponse immunitaire adaptative (Brubaker, Bonham et al. 2015). D'autres types de PRR capables de capter des motifs pathogéniques pour activer les effecteurs de l'immunité innée sont les récepteurs RLR (*retinoic acid-inducible gene I [RIG-I]-like receptors*), ALR (*absent in melanoma [AIM] like receptors*), NLR (*nucleotide-binding oligomerization domain [NOD]-like receptors*) et les récepteurs CLR (Janeway and Medzhitov 2002; Akira, Uematsu et al. 2006; Creagh and O'Neill 2006; Brubaker, Bonham et al. 2015).

Récemment, une famille d'enzymes qui fonctionnent comme récepteurs intracellulaires d'acides nucléiques a été décrite, et comprend les protéines OAS (*oligo adenylate synthetase*) et cGAS (*cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes*) (Takeuchi and Akira

2010; Rathinam, Vanaja et al. 2012). Dans ce contexte, les TLR et les CLR sont localisés à la membrane plasmique et surveillent l'espace extracellulaire. En outre, les CLR se retrouvent aussi en forme soluble permettant l'opsonisation des microorganismes facilitant ainsi leur phagocytose (Brubaker, Bonham et al. 2015). La lumière des endosomes est surveillée par des TLR supplémentaires, tandis que les capteurs d'ADN comme l'IFI16 (*Gamma-interferon-inducible protein*) ou le cGAS se retrouvent dans le noyau. Enfin, le cytosol contient une large gamme de PRR : les RLR, ALR, NLR et cGAS (Takeuchi and Akira 2010). Par ailleurs, un autre récepteur aux signaux de dangers est le récepteur transmembranaire RAGE (*receptor for advanced glycation end-product*), récepteur spécifique de DAMP qui reconnaît les produits terminaux de la glycation, mais aussi des alarmines comme HMGB1, les protéines S100 et la protéine β -amyloïde (Sims, Rowe et al. 2010). Ainsi, cette distribution compartimentée des PRR permet à ces récepteurs de contrôler l'intensité des réponses et que les cellules soient plus efficaces et performantes dans la détection de microorganismes pathogènes. Ensembles, ces PRR reconnaissent des ligands d'origine virale, bactérienne, fongique et possiblement protozoaire.

1.3 Les médiateurs de la réponse inflammatoire

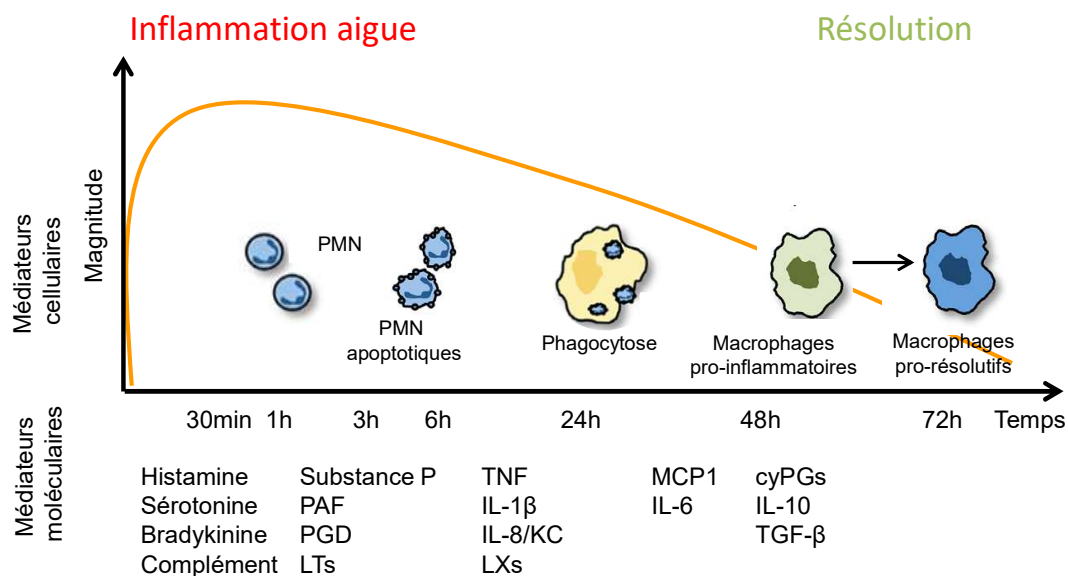


Figure 2 : Cinétique des médiateurs cellulaires et moléculaires au cours de la réponse inflammatoire. Après un dommage un exsudat inflammatoire se forme suivi d'un œdème favorisé par des médiateurs lipidiques. Ensuite, un ralentissement du débit sanguin ainsi qu'une l'augmentation de l'expression de cytokines et de chimiokines vont permettre aux leucocytes circulants, de sortir des vaisseaux sanguins (par diapédèse) et de rejoindre les tissus. Dans les conditions normales et une fois que l'agent pathogène est détruit, les PMN, qui sont les principaux effecteurs de l'inflammation vont rentrer en apoptose afin de mettre fin à la réaction inflammatoire. Ils seront, à la fin, phagocytés par les cellules mononucléées qui vont assurer le nettoyage du foyer inflammatoire et l'élimination des débris cellulaires et tissulaires. Cela va alors permettre la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire.

Après la reconnaissance des signaux de danger, les cellules présentes dans le tissu infecté ou lésé, telles que les phagocytes mononuclés résidents (macrophages et cellules dendritiques) et les mastocytes, vont être les premières cellules activées. En réponse à cette activation, elles libèrent de l'histamine, des cytokines pro-inflammatoires et d'autres composés actifs que nous regrouperons ici sous le terme général de médiateurs de l'inflammation (**Figure 2**). La concentration de ces médiateurs plasmatiques peut être grandement augmentée en phase aiguë de l'inflammation par synthèse hépatique, comme pour la CRP (*C-Reactive Protein*) et le SAP (*Serum Amyloid-P*) qui sont des pentraxines favorisant la phagocytose de pathogènes par les macrophages et/ou la réparation de la lésion tissulaire par remodelage de la matrice extracellulaire (MEC).

Tout d'abord, la mise en place de la réponse inflammatoire va induire la mobilisation des protéines du sérum et des leucocytes en circulation vers le tissu endommagé ou infecté. Dans les 30 minutes qui suivent l'agression, des médiateurs vasoactifs sont relargués, comme l'histamine et la sérotonine. Ceux-ci sont stockés respectivement dans les granules de mastocytes et/ou les basophiles et dans les plaquettes. L'histamine augmente la perméabilité vasculaire et agit au niveau du système nerveux en provoquant la sensation de douleur (Schneider, Rolli-Derkinderen et al. 2002). Parmi les différents peptides vasoactifs, on retrouve la substance P qui est sécrétée par les neurones sensoriels. Il s'agit d'un puissant vasodilatateur qui peut induire la libération d'histamine, de sérotonine et de bradykinine. D'autres peptides peuvent être générés par la cascade de coagulation. Le système du complément est aussi très important lors de ces premiers instants d'induction de l'inflammation. C'est un réseau protéique très conservé qui joue un rôle important dans la défense et l'inflammation de l'hôte. Les protéines du complément peuvent se retrouver sous forme soluble dans la circulation ou sous forme de protéines transmembranaires. Leur activation peut se faire selon trois voies : la voie classique, la voie des lectines ou la voie alternative. Par exemple, les fragments actifs des facteurs C3, C4 et C5, appelés anaphylotoxines, provoquent la dégranulation des mastocytes et des basophiles, et peuvent exercer un pouvoir chimio-attractant sur les neutrophiles et monocytes (Sarma and Ward 2011). Durant les 24 heures qui suivent l'initiation de l'inflammation des médiateurs lipidiques vont participer de façon active au développement de ce processus inflammatoire. L'activation des phagocytes ou mastocytes induit la formation des médiateurs lipidiques grâce à l'activation de la phospholipase A2 *via* la stimulation par le TNF α (*TumorNecrosis Factor α*). Cette enzyme transforme les acides gras de la membrane plasmique de la cellule, comme

par exemple la phosphatidylcholine en acide arachidonique qui va générer les prostaglandines et les thromboxanes. De plus, l'acétylation de l'acide lysophosphatidique va générer le facteur d'activation des plaquettes (PAF). Ces composés sont chimiotactiques pour les neutrophiles et les macrophages, et induisent l'augmentation de la dilatation des vaisseaux et leur perméabilité, facilitant l'arrivée des leucocytes sur le site de l'inflammation (Samuelsson, Dahlen et al. 1987). Par ailleurs, il existe des enzymes participant au processus de remodelage tissulaire lors de l'inflammation. Par exemple, les métalloprotéases (MMP) détruisent la matrice extracellulaire ce qui favorise le remodelage tissulaire, et facilitent ainsi la migration des cellules immunitaires vers le site de l'inflammation (Khokha, Murthy et al. 2013). Enfin, les cytokines et les chimiokines sont des protéines qui vont faire le pont entre la réponse innée et la réponse adaptative. Elles permettent la communication entre les cellules immunes et l'orientation de la réponse en fonction de la nature du signal détecté. Parmi les principales cytokines pro-inflammatoires secrétées dès les premiers signes de l'inflammation, on retrouve le TNF- α , ainsi que les interleukines (IL)-1 et IL-6. Le TNF- α est libéré par les macrophages, les cellules dendritiques résidentes et les mastocytes, où il est stocké au niveau de leurs granules. Il stimule l'expression de molécules d'adhérence et la production de chimiokines par les cellules endothéliales, permettant le recrutement des leucocytes sanguins vers le foyer inflammatoire. Il active aussi les systèmes microbicides des phagocytes et est mitogène pour les lymphocytes T et B, permettant la mise en place de la réponse adaptative si la réponse innée n'est pas suffisante à la résolution de l'inflammation. Il active aussi la production de facteurs de croissance qui seront indispensables à la réparation du tissu endommagé. L'IL-1 est sécrétée par de nombreuses cellules après la reconnaissance des PAMP, dont les leucocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes présents dans tous les tissus. Elle provoque des effets locaux et des symptômes plus généraux (effets systémiques), permettant à l'organisme de combattre la maladie. Comme le TNF- α , l'IL-1 stimule l'expression de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium vasculaire et favorise également l'induction de la fièvre en agissant directement sur les centres de l'hypothalamus qui contrôlent la température corporelle. Quant à l'IL-6 produite par les phagocytes (macrophages et cellules dendritiques) et les cellules endothéliales lors d'une inflammation, elle induit localement leur activation, favorisant le recrutement de monocytes sanguins vers les tissus. Lors de l'activation des PRR, des cytokines secondaires peuvent être produites, comme les IFN, l'IL-12 et l'IL-18.

Dans l'étape précoce de l'inflammation les chimiokines sont essentielles. Elles sont sécrétées par de nombreuses cellules après stimulation par des signaux de danger et forment un gradient, dirigeant ainsi la migration des populations leucocytaires requises vers le tissu enflammé. Les chimiokines se classifient en quatre classes: CXC (cystéine-résidu aléatoire-cystéine), CC (cystéine-cystéine), (X) C et CX₃C. Leurs récepteurs font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (CXCR, CCR, XCR, CX₃CR et récepteurs atypiques) (Zlotnik and Yoshie 2012).

1.1 Effecteurs cellulaires de la réponse inflammatoire

La réaction inflammatoire peut se schématiser de façon très brève par la chaîne suivante :

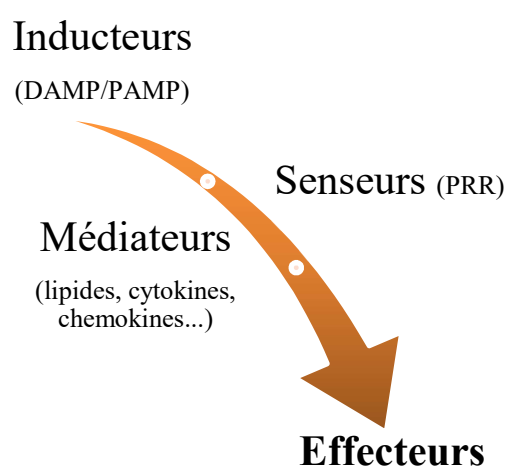


Figure 3 : Les éléments essentiels de la réponse inflammatoire. Il est toutefois difficile de définir quels sont les médiateurs résultant d'un déclencheur particulier sachant que de nombreux médiateurs sont eux même des inducteurs de la production d'autres médiateurs.

Comprendre la hiérarchie fonctionnelle entre ces différents niveaux est un enjeu majeur de la compréhension de la réponse inflammatoire (Medzhitov 2008). Celle-ci peut se diviser en quatre phases distinctes décrites ci-dessous.

1.1.1 Phase I : Reconnaissance du danger et recrutement des cellules effectrices

Tout d'abord, des monocytes sentinelles vont déclencher le début de la réponse inflammatoire. Dans la littérature, il a été décrit l'existence de deux populations distinctes des monocytes circulants avec des fonctions particulières lors de l'homéostasie et de l'inflammation : les monocytes classiques et non classiques (Geissmann, Jung et al. 2003). Les monocytes non classiques, en état d'homéostasie, vont patrouiller du côté luminal de l'endothélium des tissus sains (**Figure 4a**). Après une agression, ces monocytes vont rapidement sortir de la circulation sanguine et migrer pour envahir le tissu endommagé. Ceci

va permettre une réponse initiale à l'agression, qui va être suivie d'une cascade de signaux inflammatoires, grâce à l'expression des protéines antimicrobiennes, des PRR, des cytokines, des chimiokines, ainsi que d'une plus forte expression de gènes impliqués dans la présentation des antigènes (Auffray, Sieweke et al. 2009). Néanmoins, le recrutement des monocytes non classiques est transitoire et rapidement inhibée par le recrutement des neutrophiles et des monocytes classiques (**Figure 4b**) (Soehnlein, Lindbom et al. 2009). Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants dans la circulation sanguine, produits dans la moelle osseuse (MO) à partir de progéniteurs myéloïdes. Leur maturation est contrôlée par le facteur de croissance G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) (Lieschke, Grail et al. 1994), qui est sécrété en réponse à l'IL17 produit par les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les lymphocytes *Natural Killer* (Ley, Smith et al. 2006).

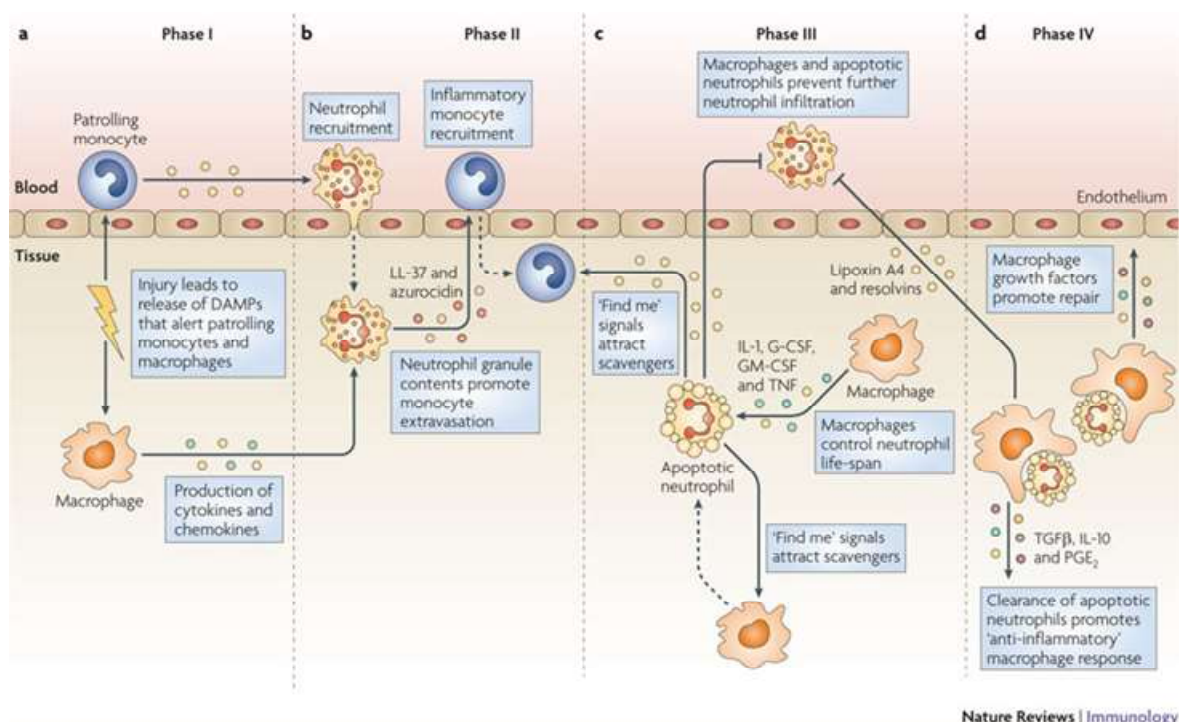


Figure 4 : Interaction des phagocytes effecteurs lors de l'inflammation. **a) Phase I :** Les cellules sentinelles comme les monocytes non classiques et les macrophages résidents des tissus sont les premiers acteurs de la réponse immune à détecter les perturbations dans l'homéostasie tissulaire. Ils vont rapidement exprimer des cytokines et chimiokines pour alerter le système immunitaire et recruter les neutrophiles. **b) Phase II :** Les neutrophiles vont ensuite envahir la zone lésée et vont libérer le contenu de leurs granules, qui va induire le recrutement des monocytes inflammatoires. **c) Phase III :** La durée de vie des neutrophiles émigrés est assez courte et peut-être modifiée par des signaux pro ou anti apoptotiques, dont certains sont produits par des macrophages. Les macrophages et les neutrophiles apoptotiques empêchent l'infiltration supplémentaire des neutrophiles si bien que les neutrophiles favorisent l'afflux continu des monocytes. **d) Phase IV :** La clairance des neutrophiles apoptotiques induit la repolarisation des macrophages vers un état plus pro-tolérologénique et induit le retour à l'homéostasie tissulaire. (Soehnlein and Lindbom 2010).

Les neutrophiles dirigent la première vague de défense de l'hôte contre les infections et les dommages tissulaires après détection du danger *via* la reconnaissance de médiateurs pro-inflammatoires (Futosi, Fodor et al. 2013; Kolaczkowska and Kubes 2013). Les neutrophiles matures vont exprimer alors CXCR4, un récepteur de rétention des cellules dans la MO, et en parallèle CXCR2, un récepteur qui va favoriser leur passage vers la circulation systémique au contact des chimiokines CXCL2, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 et CXCL8 (Nauseef and Borregaard 2014). Les neutrophiles sont des cellules effectrices puissantes qui expriment plus de 30 récepteurs différents qui assurent la détection des médiateurs pro-inflammatoires et la modulation de la migration, de la fonction et du comportement des neutrophiles. Parmi ces récepteurs on retrouve les récepteurs GPCRs (*G protein-coupled receptors*), les récepteurs au Fc, les récepteurs d'adhésion, des cytokines, et des PRRs (Futosi, Fodor et al. 2013). En plus d'activer la migration des neutrophiles, ces récepteurs peuvent contrôler leur activité transcriptionnelle modulant ainsi leur capacité à éliminer les menaces infectieuses par phagocytose, par la libération du contenu de leurs granules cytoplasmiques, par les intermédiaires de mécanismes dépendants de la NADPH oxygénase produisant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et par des protéines antibactériennes telles que la lysozyme ou les cathepsines. Enfin, les neutrophiles très activés vont également produire et sécréter des NETs (*neutrophil extracellular traps*) composés d'ADN lié à des protéines antibactériennes et à des enzymes. Ces NETs vont piéger et empêcher la dissémination des pathogènes dans l'organisme (Kolaczkowska and Kubes 2013).

Parmi les premières molécules qui vont activer le recrutement des neutrophiles, il a été décrit qu'un gradient d'H₂O₂ est établi par les cellules endommagées chez le poisson zèbre, pendant les 30 min qui suivent l'agression, permettant le recrutement des neutrophiles vers la zone enflammée (Niethammer, Grabher et al. 2009). Par ailleurs, il a été également montré que ce gradient d'H₂O₂ favorise le recrutement des neutrophiles humains et murins *in vitro* (Klyubin, Kirpichnikova et al. 1996; Yoo, Starnes et al. 2011). Comme chez le poisson zèbre, le récepteur de la famille SFKs (*SRC family kinases*) détecte directement le gradient de d'H₂O₂ et est nécessaire pour l'attraction des neutrophiles chez l'homme *in vitro* (Yoo, Starnes et al. 2011). Pour maintenir un recrutement de neutrophiles plus soutenu au cours du temps, des signaux à long terme et à longue portée sont émis. Notamment, l'activation des macrophages résidents va induire la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- α , mais aussi celle des chimiokines de la famille de CXCL8 (connue aussi sous le nom d'IL-8), qui vont favoriser le recrutement de neutrophiles. Ces chimiokines sont reconnues par les

neutrophiles grâce aux récepteurs CXCR1 (*GPCRs CXC-chemokine receptor 1*) and CXCR2 qui vont activer la voie de signalisation de VASP (*Vasodilator-stimulated phospho protein*), PI3K and SFKs qui va moduler leur migration (Sai, Raman et al. 2008; Neel, Barzik et al. 2009). Ces cytokines peuvent également être synthétisées par d'autres cellules du système immunitaire comme les neutrophiles et les lymphocytes T, mais aussi, par des cellules non immunitaires comme les cellules endothéliales et épithéliales. Cette cascade de signalisation attirant les neutrophiles peut être boostée grâce au clivage enzymatique de ces chimiokines par des métalloprotéases (MMP). Dans ce contexte, il a été montré que la MMP9, une protéase commune aux neutrophiles, macrophages et cellules endothéliales peut cliver et induire l'activité chimiotactique de CXCL1 et CXCL8, amplifiant ainsi l'infiltration des neutrophiles dans le site inflammatoire (Van den Steen, Proost et al. 2000). De plus, la sécrétion de MMP8 par les macrophages et les neutrophiles est un mécanisme non redondant pour le clivage de CXCL5 et CXCL8, qui sont tous les deux des ligands clés pour le récepteur des neutrophiles CXCR2 (Tester, Cox et al. 2007). Par ailleurs, le collagène de la matrice extracellulaire (MEC) peut être également dégradé par l'activité des MMP dérivées de neutrophiles, produisant des peptides de collagène avec une activité chimiotactique (Afonso, McCann et al. 2013). D'autres molécules comme les composants du complément C5a, le PAF (*platelet activating factor*) et les médiateurs lipidiques sont susceptibles de recruter les neutrophiles. Les macrophages quant à eux sécrètent le leukotriène B4 qui est un puissant chemoattractant de neutrophiles, mais aussi un activateur des neutrophiles permettant la libération de leur granules et la production de ROS par le récepteur BLT1 à la surface du neutrophile (Tager and Luster 2003). Les leukotriènes B4 sont aussi capables de provoquer leur sécrétion autocrine par les neutrophiles. Aussi, les ROS, en plus de leur rôle antibactérien, peuvent induire l'expression de TRPM2 (*transient receptor potential protein M2*), un canal calcique présent sur les monocytes qui active la voie ERK et la translocation de NF- κ B au noyau aboutissant à la sécrétion de chimiokines attractantes des neutrophiles (Yamamoto, Shimizu et al. 2008). L'ensemble des médiateurs inflammatoires synthétisés lors des premiers stades de l'inflammation, en plus du recrutement des neutrophiles, vont permettre l'activation via les PRR, des cellules endothéliales à proximité de la zone enflammée. Ainsi, une cascade d'événements est déclenchée permettant aux leucocytes circulants de reconnaître l'endothélium vasculaire dans le tissu lésé et d'interagir avec les vaisseaux sanguins en plusieurs étapes et entraîne leur migration au travers de la couche de cellules endothéliales vers la blessure (Wolburg, Wolburg-Buchholz et al. 2005; Carman, Sage et al. 2007; Zarbock, Ley et al. 2011; Shen, Delaney et al. 2012; McEver 2015).

En plus du recrutement précoce des neutrophiles, le recrutement des monocytes et macrophages au site inflammatoire peut amplifier la réponse des neutrophiles. Les monocytes et macrophages pro-inflammatoires peuvent être recrutés directement par les DAMPs, mais les neutrophiles peuvent également recruter ces cellules par la production de chimiokines spécifiques des macrophages, et par l'activation des cellules non immunitaires du tissu environnant (Soehnlein and Lindbom 2010).

1.1.2 Phase II : Les neutrophiles induisent le recrutement des monocytes classiques

Après extravasation, les neutrophiles vont libérer de façon progressive des protéines préformées qui se retrouvent à l'intérieur de leurs granules cytoplasmiques. Tout d'abord, ils vont sécréter des vésicules riches en récepteurs membranaires (Faurschou and Borregaard 2003). Ces granulés ont notamment un rôle antibactérien, permettant la dégradation de la MEC pour faciliter la migration des cellules inflammatoires sur le site (Borregaard and Cowland 1997), et présentent un rôle clé dans le recrutement des monocytes selon différents mécanismes (**Figure 4c**). L'azurocidine est une protéine cationique qui permet l'adhésion des monocytes roulant à la surface de l'endothélium grâce à l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (Gautam, Herwald et al. 2000). Cette molécule peut également provoquer la sécrétion de CCL3 par les macrophages qui *via* CCR1 recrute les monocytes inflammatoires (Pahlman et al. 2006). D'autres molécules comme l' α -défensine, la cathepsine G et LL-37 (forme clivée de CAP18 (*cationic antimicrobial protein*)) vont favoriser le recrutement des monocytes. Chez l'humain, trois récepteurs ont été décrits : la cathepsine G et LL-37 vont être reconnus par les récepteurs FPR1 et FPR2 respectivement, néanmoins le récepteur spécifique pour l'azurocidine reste aujourd'hui inconnu (Ye, Boulay et al. 2009). Le récepteur de l' α -défensine sur les monocytes reste également à identifier (Yang, de la Rosa et al. 2009).

Récemment, il a été décrit que les différents types de monocytes sont recrutés par différents mécanismes. Il a été montré que la déplétion des neutrophiles diminue de manière spécifique le recrutement de monocytes classiques inflammatoires (Soehnlein, Xie et al. 2005; Soehnlein, Lindbom et al. 2009), et que cette capacité de recrutement est récupérée avec l'application locale de surnageant provenant de neutrophiles activés (Soehnlein, Xie et al. 2005). Ces données suggèrent donc qu'à différence des monocytes non classiques, les monocytes classiques sont recrutés de façon spécifique dans le lieu de l'inflammation par les

neutrophiles. Ensuite, l'adhérence et la transmigration des monocytes diffèrent de celles des neutrophiles. Bien que les monocytes expriment aussi les $\beta 1$ -intégrines, ils interagissent préférentiellement avec VCAM1 et l'E-selectine sous l'effet de CCL-2. Une autre particularité essentielle dans la compréhension du déroulement du recrutement des leucocytes avec une première vague de neutrophiles puis de monocytes est le rôle de la sécrétion du récepteur soluble de l'IL-6 (sIL-6R). Le sIL-6R va se lier à l'IL-6 libérée par les cellules endothéliales et les macrophages lors de l'inflammation, augmentant l'expression de CCL2 et de VCAM1 à la surface des cellules et améliorant ainsi l'adhésion et la migration des monocytes classiques (Hurst, Wilkinson et al. 2001). Par ailleurs, la protéinase 3 induit une augmentation de l'expression des chimiokines par les cellules voisines, créant ainsi un milieu favorable au recrutement des monocytes. Notamment, la protéinase 3 induit la production de CCL2 par les cellules endothéliales (Taekema-Roelvink, Kooten et al. 2001). Finalement, les sérines protéases des neutrophiles peuvent cliver les chimiokines classiques telles que CCL6, CCL9, CCL15, CCL23 et augmenter ainsi leur capacité à activer CCR1 (Berahovich, Miao et al. 2005). Un mécanisme similaire peut être utilisé par ces protéases pour cliver de chimiokines non classiques comme la pro-chimérine en chimérine chimio attractante des macrophages, des monocytes et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (Zabel, Allen et al. 2005). Egalement, les neutrophiles peuvent sécréter de manière autocrine CCL3, CCL4 et CXCL8 (Gerszten, Garcia-Zepeda et al. 1999).

1.1.3 Phase III : Les signaux phagocytaires induisent la résolution de l'inflammation

Une fois que les neutrophiles, les monocytes classiques et les macrophages inflammatoires ont envahi le site inflammatoire, ils vont participer à l'élimination de l'agresseur, comme par exemple des bactéries. Lorsque la menace est contrôlée, le processus inflammatoire doit cesser et une phase de résolution de l'inflammation doit s'engager afin de retourner à l'état d'homéostasie et ainsi initier le processus de réparation tissulaire. La résolution de l'inflammation est un processus actif qui comporte notamment, un changement dans le profil lipidique local, la libération de molécules constituant des signaux pro-résolutifs (comme l'Annexine1) et une inactivation des cytokines et chimiokines inflammatoires.

Au niveau cellulaire, une des étapes critiques de la résolution de l'inflammation est l'apoptose des neutrophiles et des cellules mononuclées recrutés sur le site de l'inflammation pour contrôler l'agression. L'apoptose est un mécanisme physiologique qui permet l'élimination

des cellules en excès ou devenues indésirables sans induire un phénomène inflammatoire (Cohen, Duke et al. 1992). L'absence d'inflammation et de dommages tissulaires associée à l'apoptose est attribué au fait que, les phagocytes recrutés dans le site inflammatoire prennent en charge rapidement les cellules et les corps apoptotiques, empêchant la libération de protéases et d'autres médiateurs inflammatoires (Savill, Fadok et al. 1993; Savill 1998; Matzinger 2002), comme les alarmines (Lotze, Zeh et al. 2007) ainsi que la nécrose secondaire de ces cellules, autre évènement pro-inflammatoire (Matzinger 2002). Ce mécanisme rapide d'élimination des cellules entrant en apoptose est associé à des mécanismes empêchant l'initiation des réponses immunitaires. Ces mécanismes sont critiques et redondants, puisqu'ils doivent permettre d'éviter la survenue de maladies autoimmunes (Morelli and Larregina 2010). Il est possible de distinguer deux types de mécanismes: ceux directement liés aux cellules apoptotiques et ceux dits indirects liées au leur élimination par les cellules phagocytaires. Ces cellules phagocytaires vont exercer des effets immuno-modulateurs visant à empêcher la mise en place des réponses immunitaires effectrices délétères pour l'hôte. Les effets directs sont liés aux propriétés immuno-modulatrices des cellules apoptotiques notamment en libérant des facteurs anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF β (Gao, Herndon et al. 1998; Chen, Frank et al. 2001). Le TGF β stocké sous forme latente dans des compartiments intracellulaires, est libéré lors du processus apoptotique (Chen, Frank et al. 2001). Les cytokines libérées induisent un microenvironnement immunomodulateur qui va induire l'inhibition de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF et l'IL1 β par les macrophages et les cellules environnantes (Fadok, Bratton et al. 1998; McDonald, Fadok et al. 1999). Ceci va également empêcher le déclenchement d'une réponse immunitaire vis-à-vis de ses propres antigènes et de prévenir les réponses auto-immunes. Concrètement, le rôle du TGF β dans les mécanismes de tolérance immune a été mis en avant par ses implications directes et indirectes dans des pathologies auto-immunes et inflammatoires (Liu, Zhang et al. 2008; Perruche, Zhang et al. 2008; Perruche, Zhang et al. 2009; Zhou, Kong et al. 2011; Singh, Krawetz et al. 2017). Ces cytokines sont notamment critiques pour favoriser l'émergence de cellules suppressives et/ou régulatrices, comme les lymphocytes T régulateurs (Treg) générés en présence de TGF β (Chen, Jin et al. 2003; Singh, Krawetz et al. 2017). Finalement, il a été montré que les neutrophiles apoptotiques surexpriment le récepteur CCR5 permettant de capter certaines chimiokines inflammatoires comme le CCL3, CCL4 ou CCL5, permettant de diminuer ainsi le recrutement des cellules inflammatoires (Ariel, Fredman et al. 2006; Ortega-Gomez, Perretti et al. 2013)

Les effets immuno-modulateurs indirects des cellules apoptotiques sont liés à la seconde étape critique de la résolution de l'inflammation cellulaire. Pendant ce deuxième étape les phagocytes recrutés vont éliminer les cellules devenues apoptotiques, et sécréter de facteurs pro-résolutifs, conduisant à terme à la restauration de la fonction et de la structure tissulaire (Morelli, Larregina et al. 2003; Perruche, Zhang et al. 2008). Ces médiateurs pro-résolutifs inhibent notamment la migration et l'activation des leucocytes, comme par exemple, l'inhibition de l'influx des neutrophiles au lieu de l'inflammation, tout en favorisant l'élimination efficace des cellules inflammatoires devenues apoptotiques. Parmi les médiateurs pro-résolutifs libérés lors des phases initiales de la réparation tissulaire, il semble que les médiateurs lipidiques ont un rôle clé dans l'initiation du processus de résolution (Serhan 2014). En effet, lors de la phase initiale de l'inflammation, les prostaglandines et les leucotriènes, qui vont amplifier la réponse inflammatoire, sont générés par plusieurs types cellulaires, comme les cellules endothéliales, les neutrophiles, les monocytes et les macrophages (Funk 2001). Une fois la réponse inflammatoire mise en place, les prostaglandines E₂ (PGE₂) et D₂ (PGD₂) vont induire de manière graduelle la synthèse de médiateurs anti-inflammatoires et pro-résolutifs comme les lipoxines (Serhan, Chiang et al. 2008). Actuellement, on décrit ce changement lipidique comme la «commutation de classe lipidique» (Levy, Clish et al. 2001). Par ailleurs, il faut souligner l'importance de trois familles de médiateurs lipidiques pro-résolutifs spécialisés (SPM) dérivés de l'acide gras oméga 3, les résolvines, les protectines et les marésines. Les SPM peuvent être générés par biosynthèse intracellulaire et leur synthèse prend place lors de l'élimination des cellules apoptotiques par les macrophages (Dalli and Serhan 2012). De plus, ce processus d'efferocytose peut améliorer la biosynthèse de médiateurs lipidiques pro-résolutifs, qui peuvent agir de façon autocrine et réguler ainsi le processus de phagocytose. De ce fait, les cellules apoptotiques sont rapidement éliminées par les cellules phagocytaires telles que les macrophages et les cellules dendritiques immatures (iDC), arborant ensuite un phénotype plus tolérogène et devenant moins sensibles à des stimuli inflammatoires. Notamment il a été montré qu'en présence de cellules apoptotiques les iDC montrent une dérégulation des marqueurs de maturation comme le MHC de classe II, le CD40, le CD80, CD86 même en présence de LPS ou TNF- α (Takahashi and Kobayashi 2003). De plus, la phagocytose des cellules apoptotiques induit une régulation négative d'IL-12 (Kim, Elkon et al. 2004) par les macrophages et peut aussi bloquer la synthèse de cytokines pro-inflammatoires en interférant avec NF- κ B (Sen, Wallet et al. 2007). L'élimination de neutrophiles apoptotiques inhibe la synthèse de cytokines dites «Th17» comme l'IL-23 et IL-17 par les cellules phagocytaires

(Stark, Huo et al. 2005). Par ailleurs, les phagocytes éliminant des cellules apoptotiques sécrètent une multitude de facteurs dont des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF β (Voll, Herrmann et al. 1997; Albert 2004; Perruche, Zhang et al. 2008). Ces cytokines vont participer à la différenciation des LT CD4⁺. Notamment, il a été montré qu'au niveau des ganglions lymphatiques, des cellules dendritiques ayant vu les cellules apoptotiques pourront interagir avec les LT CD4⁺ naïfs et générer des LT régulateurs (Treg) (Kleinclauss, Perruche et al. 2006; Torchinsky, Garaude et al. 2009). Il a été également suggéré que les cellules dendritiques plasmacytoïdes seraient les APC à l'origine des LT de type Tr1 (Wakkach, Fournier et al. 2003). Néanmoins, ces cellules dendritiques peuvent aussi favoriser la différenciation de Treg exprimant Foxp3 (Sharma, Hou et al. 2009). Il existe d'autres molécules avec une forte activité pro-résolutive : les dérivés peptidiques de l'annexine A1 et la chémérine. Dans des conditions d'homéostasie, les neutrophiles, monocytes et macrophages contiennent une grande quantité d'annexine A1. Lors de l'activation de ces cellules, l'annexine A1 est libérée dans le milieu et va inhiber l'accumulation de neutrophiles dans le tissu enflammé par divers mécanismes, comme la réduction de l'interaction entre les cellules endothéliales et les neutrophiles, diminuant ainsi le processus de diapédèse (Hayhoe, Kamal et al. 2006), et facilitant l'apoptose dans ces cellules (El Kebir, Jozsef et al. 2007). De plus, l'annexine A1 libérée par les neutrophiles apoptotiques va induire l'élimination des neutrophiles apoptotiques par les macrophages (Scannell, Flanagan et al. 2007). Par ailleurs, les dérivés peptidiques de la chémérine présentent des rôles similaires à ceux de l'annexine A1 (Cash, Hart et al. 2008; Cash, Christian et al. 2010).

Un des derniers événements permettant l'induction de la résolution de l'inflammation est l'inhibition de chimiokines et cytokines. Des MMP ont été décrits dans le rôle de l'inactivation de certaines chimiokines par clivage, entraînant une perte de la capacité chimiotactique des neutrophiles. C'est le cas notamment pour la MMP2 qui va cliver CCL7, bloquant ainsi l'induction de la signalisation en aval et limitant ainsi le recrutement des neutrophiles (Dean, Cox et al. 2008). MMP1 et MMP3 présentent des fonctions similaires pour CCL2, 8, et 13 (McQuibban, Gong et al. 2002). Par ailleurs, il a été montré récemment le rôle paradoxal des NET lors du processus inflammatoire. Les neutrophiles affluents libèrent des NET avec des effets pro-inflammatoires et antibactériens. Cependant, lorsque la densité de neutrophiles est suffisamment élevée, les NET agglutinent (AggNET) et dégradent les cytokines inflammatoires présentes, induisant le démantèlement des gradients de chimiokines

inflammatoires dans les tissus, et inhibant le recrutement supplémentaire des neutrophiles (Schauer, Janko et al. 2014).

- **La mort des neutrophiles**

Il a été bien mis en évidence que la mort des neutrophiles (**Figure 4c**) par apoptose influence la modulation de la phase finale de l'inflammation (Scannell, Flanagan et al. 2007; Dalli, Norling et al. 2008). Dans un contexte d'homéostasie, les neutrophiles sanguins ont une durée de vie de quelques heures, un dogme qui est actuellement remis en question (Tak, Tesselaar et al. 2013). Néanmoins, une fois extravasés dans le site inflammatoire, les neutrophiles grâce à des signaux de survie produits, vont augmenter considérablement leur durée de vie. Ces signaux de survie comme l'IL-1 β , G-CSF (*Granulocyte colony-stimulating factor*) et GM-CSF (*granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*) sont produits par les macrophages inflammatoires et retardent l'apoptose de neutrophiles (Kantari, Pederzoli-Ribeil et al. 2008). Les produits bactériens et les faibles taux d'oxygène sont aussi d'autres signaux à l'origine de la survie de neutrophiles (Colotta, Re et al. 1992). Enfin, après avoir joué leur rôle, ces neutrophiles vont, soit quitter le site inflammatoire par la circulation lymphatique par un processus appelé rTEM (*reverse Transendothelial Migration*), soit mourir par apoptose. Les mécanismes de destruction des neutrophiles circulants n'est pas connu avec précision, mais les études de radio-marquage indiquent que les sites de fixation sont la moelle osseuse, le foie et la rate (Furze and Rankin 2008). L'apoptose de neutrophiles est induite par l'absence de facteurs de pro-survie, par la liaison de récepteurs de mort ou encore après phagocytose de pathogènes. Trois voies induisent l'apoptose dans les neutrophiles: la voie extrinsèque (activée par la liaison des récepteurs de mort à la surface cellulaire), la voie intrinsèque (initiée par des dommages membranaires mitochondriaux libérant le cytochrome C et d'autres molécules pro-apoptotiques dans le cytosol) et la voie induite par la phagocytose (accélère la mort des neutrophiles sur les sites d'infection).

Un autre type de mort cellulaire des neutrophiles lors de la résolution de l'inflammation est la NETose. Les NET sont composés d'ADN, d'histones et de composants des granules libérées par les neutrophiles dans un but décrit comme antibactérien (Brinkmann, Reichard et al. 2004). Différentes études ont associé la formation de NET à une mort du neutrophile dans un mécanisme dépendant d'une NADPH oxydase fonctionnelle, de la présence d'élastase et de la myelopéroxydase ainsi que de la citrullination des histones (Fuchs, Abed et al. 2007; Li, Li et al. 2010; Papayannopoulos, Metzler et al. 2010). Les NET peuvent être libérés par une deuxième voie, nommée formation vitale de NET qui, bien que moins fréquente, se produit

par extrusion d'ADN mitochondrial et préservation de l'intégrité cellulaire (Yousefi, Mihalache et al. 2009). En outre, les neutrophiles libèrent des NET lorsqu'ils ne peuvent pas phagocyter le stimulus nocif (Branzk, Lubojemska et al. 2014). De façon surprenante, certains neutrophiles, anucléés après NETose sont capables de poursuivre la phagocytose et la libération de leur contenu cytoplasmique (Yipp, Petri et al. 2012)

D'autres types de mort cellulaires sont également à la base de l'élimination des neutrophiles lors de la résolution de l'inflammation, c'est le cas notamment de la nécroptose ou nécrose primaire, la nécrose secondaire et de l'autophagie (Geering and Simon 2011; Li, McQuade et al. 2012). Une fois le neutrophile entre en apoptose, il va maintenir une boucle de rétrocontrôle négative, permettant d'inhiber l'influx de nouveaux neutrophiles et d'autres effecteurs inflammatoires vers le site inflammatoire. Un exemple déjà décrit préalablement est la libération de l'annexine A1 et ou de la chimérine. La lactoferrine est une autre protéine libérée par les neutrophiles apoptotiques qui est impliquée dans l'inhibition du recrutement des neutrophiles mais favorise la mobilisation des macrophages vers le site inflammatoires, permettant d'éliminer les neutrophiles apoptotiques (Bournazou, Pound et al. 2009). Cette protéine peut être synthétisée *de novo* lors du départ des neutrophiles, ou stockée dans les granules secondaires de neutrophiles, permettant leur libération instantanée lors des processus d'extravasation, d'apoptose ou de NETose (de la Rosa, Yang et al. 2008; Papayannopoulos and Zychlinsky 2009). Finalement, un des derniers mécanismes de rétrocontrôle négatif à long terme décrit est celui médié par l'axe IL17-IL23. L'IL-23 produite par les macrophages et les DC induit la production de IL-17 par les lymphocytes T CD4⁺, les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les cellules *Natural Killer*, induisant également l'expression de G-CSF, la mobilisation et le recrutement des neutrophiles. L'élimination des neutrophiles apoptotiques par les macrophages inhibe ensuite l'expression de IL-23, et donc de l'IL-17 et du G-CSF, mettant un frein à la granulopoïèse (Stark, Huo et al. 2005)

- **Le recrutement des phagocytes et la prise en charge des cellules apoptotiques**

La clairance des neutrophiles apoptotiques est essentielle à la résolution de l'inflammation et à la préservation de la tolérance au soi. Deux types de phagocytes sont décrits, les phagocytes professionnels comme les macrophages et les cellules dendritiques, et les phagocytes non professionnels, notamment les cellules épithéliales. Les études menées ces dernières années mettent en évidence que, lors de l'état précoce de l'apoptose, les cellules mourantes sont capables d'avertir et de recruter des phagocytes locaux et distants, grâce à la libération de molécules de signalisation appelés « trouve-moi » (**Figure 5**). Ensuite, ces phagocytes vont

reconnaitre et engager les cellules apoptotiques par le biais des signaux appelés « mangez-moi ». Il existe aussi des signaux « ne me mangez pas » permettant aux cellules saines d'éviter le processus de phagocytose (Brown, Heinisch et al. 2002). Ensuite, les phagocytes vont déclencher la machinerie nécessaire afin d'internaliser les cellules mourantes pour leur dégradation et leur élimination (Poon, Lucas et al. 2014). Une fois la cellule apoptotique reconnue et ancrée au phagocyte, une réorganisation du cytosquelette d'actine du phagocyte est mise en place afin d'englober la cellule mourante et pouvoir l'internaliser. Après internalisation, la cellule apoptotique se retrouve dans une structure dénommée phagosome (compartiment lié à la membrane contenant la cible phagocytée). Ce phagosome va augmenter son acidité grâce, entre autres, à la fusion avec des lysosomes qui sont de compartiments intracellulaires contenant des enzymes digestives nécessaires à la dégradation du contenu (Kinchin, Doukoumetzidis et al. 2008). La reconnaissance et la dégradation du matériel apoptotique de manière appropriée sont nécessaires afin de maintenir l'homéostasie tissulaire et éviter le déclenchement de réponses auto-immunes.

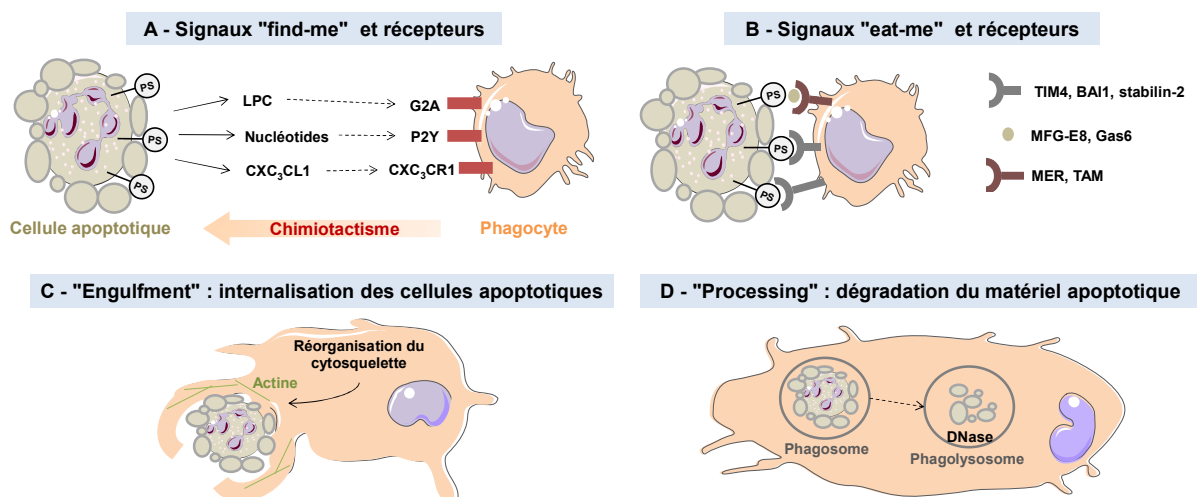


Figure 5 : Les différentes étapes de l'efferocytose. L'efferocytose est divisée en quatre étapes. L'étape « trouvez-moi » ou « *find-me* » qui se produit lorsque les cellules apoptotiques libèrent des chimio attractants solubles qui favorisent le recrutement des phagocytes (A). Le stade « mangez moi » ou « *eat-me* » qui est caractérisé par l'apparition de ligands à la surface de la cellule mourante qui l'identifiant ainsi comme une cible à éliminer par les phagocytes portant des récepteurs de reconnaissance appropriés (B). L'étape de phagocytose se produit lorsque la signalisation en aval des récepteurs de reconnaissance des cellules apoptotiques stimule le réarrangement du cytosquelette (C). Enfin la dégradation du corps cellulaire par voie phagolysosomale (D). LPC, lysophosphatidylcholine; PS, phosphatidylsérine. D'après (Elliott and Ravichandran 2010).

1.1.1 Phase IV : Phase de résolution et retour à l'homéostasie

Les macrophages présentent une énorme plasticité fonctionnelle et phénotypique qui devient très importante lors de la résolution de l'inflammation. Comme décrit préalablement, au cours

de l'efferocytose de cellules apoptotiques, il y a une inhibition de la production de cytokines et de lipides inflammatoires, et la mise en place d'un programme transcriptionnel pro-résolutif avec notamment la libération d'IL-10 et de TGFβ (**Figure 4d**) (Fadok, Bratton et al. 1998). Un retour à l'homéostasie réussi requiert l'initiation d'un programme de réparation tissulaire complexe qui fait intervenir différents partenaires comme les macrophages, les cellules souches et les cellules de la MEC. Une interaction étroite entre ces acteurs majeurs de la réparation tissulaire va permettre un rétablissement de la fonctionnalité optimale de l'organe affecté. Il a été montré que les macrophages pro-résolutifs et réparateurs vont libérer d'autres facteurs de croissance comme le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), totalement nécessaire au processus de réparation tissulaire. Par ailleurs, il y a d'autres acteurs qui vont émerger lors de cette phase et qui ont d'importantes propriétés immunosuppressives nécessaires au rétablissement de l'homéostasie, comme par exemple les cellules MDSCs (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*) et les lymphocytes Treg qui vont lier directement l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les Treg sont une sous-population de lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ qui expriment le facteur de transcription Foxp3 (Hori, Nomura et al. 2003). Ils sont capables de libérer des molécules immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGFβ, modulant ainsi la réponse immunitaire. Ils ont un rôle clé dans la maintenance de l'homéostasie et dans le contrôle de diverses maladies inflammatoires chroniques comme l'arthrite rhumatoïde (Cao, Malmstrom et al. 2003), la sclérose en plaques (Viglietta, Baecher-Allan et al. 2004) et l'athérosclérose (Ait-Oufella, Salomon et al. 2006). Les Treg sont activés de manière antigène-dépendante et vont moduler l'inflammation principalement par l'inhibition des lymphocytes T auto-réactifs et/ou pathogènes par divers mécanismes (Shevach 2009). Des études ont montré que les macrophages anti-inflammatoires induisent des Treg *via* le TGFβ (Savage, de Boer et al. 2008). Les MDSCs sont représentées quant à elles par une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures. Dans des conditions pathologiques, comme une inflammation chronique, leur différenciation est partiellement bloquée, conduisant à leur génération et donc à leur accumulation (Gabrilovich and Nagaraj 2009). Les MDSCs sont caractérisées par la production d'arginase I (ARG1) et/ou iNOS (*inducible Nitric Oxidase Synthase*) permettant la libération d'oxyde nitrique (NO ; *Nitric Oxide*) et d'espèces réactives oxygénées (ROS ; *Reactive Oxygen Species*), impliqués dans l'induction de l'apoptose et d'autres mécanismes immunosuppresseurs (Gabrilovich and Nagaraj 2009). Les MDSCs sont capables de phagocyter des neutrophiles apoptotiques induisant la libération d'IL-10, et participent à l'expansion des Treg *via* l'induction de

l'expression de Foxp3 dépendante des facteurs pro-résolutifs comme l'IL-10, le TGF β et l'ARG1 (Serafini, Mgebroff et al. 2008).

Récemment, il a été suggéré l'existence d'une troisième étape dans la résolution de l'inflammation, connue sous le nom de post-résolution (Fullerton and Gilroy 2016).

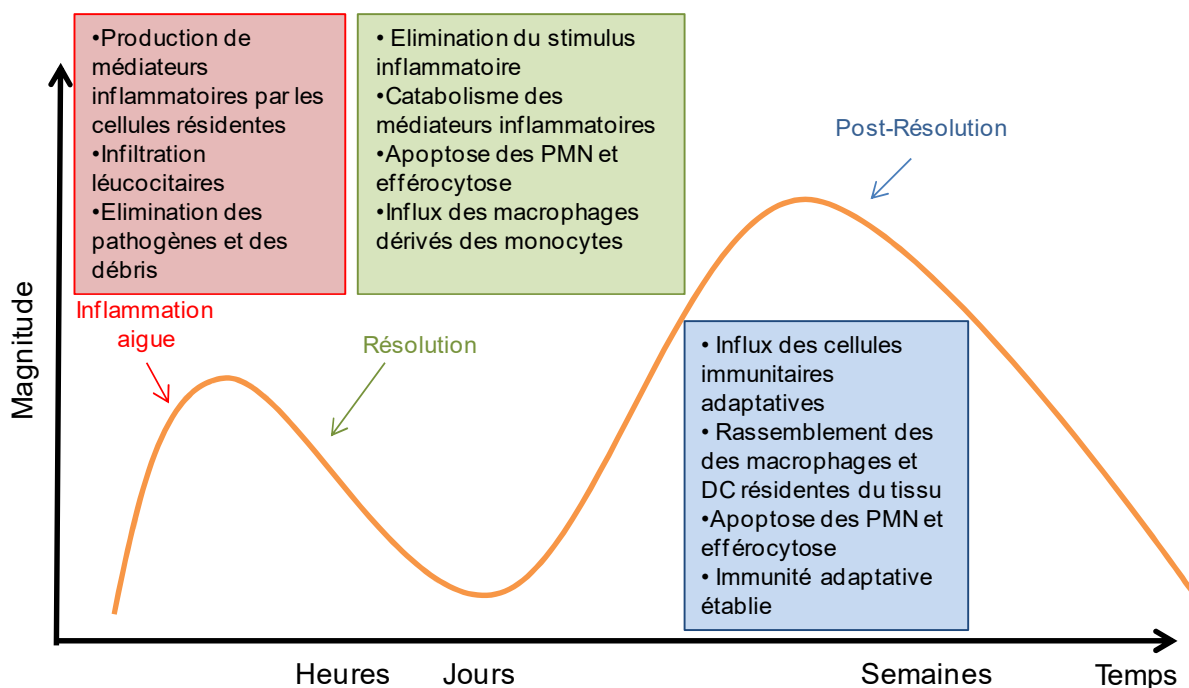


Figure 6 : Phase post-résolution. Il a été récemment montré que la résolution de l'inflammation n'est pas la fin de la réponse immunitaire suite à une infection ou à une blessure, mais plutôt qu'elle agit comme un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, ajoutant ainsi une troisième phase: la phase appelée phase de post-résolution. D'après (Fullerton and Gilroy 2016).

Cette étape de post-résolution a été mise en évidence dans un modèle murin de péritonite induite au zymosan (Newson, Stables et al. 2014). Cette étape persiste pendant des semaines et va être contrôlée par différentes populations cellulaires qui vont moduler le système immunitaire adaptatif (**Figure 5**). En effet, les MDSCs LY6C^{hi}, les DCs et macrophages vont moduler le système immunitaire adaptatif ainsi que la tolérance grâce à la génération des Treg induits. De plus, les MDMs (monocyte-derived-macrophages) vont rester dans le tissu pendant des mois après résolution permettant de contrôler la magnitude et la durée des réponses inflammatoires aiguës innées subséquents (Newson, Stables et al. 2014). D'autres études ont montré que les DCs des voies respiratoires ne reviennent pas à leur état basal après la résolution d'une inflammation de type Th2, au contraire, elles présentent une forte expression de molécules de co-stimulation telle que CD80 et CD86, permettant la maintenance d'un état de maturation en continue essentielle pour une réponse rapide à des nouveaux stimuli jusqu'à un mois après résolution (van Rijt, Vos et al. 2011). Ainsi lors de la

résolution de l'inflammation, un microenvironnement tissulaire est créé afin de faciliter l'interaction entre les deux types de système, promouvant la résolution de l'inflammation, la réparation tissulaire et l'homéostasie. Par ailleurs, les maladies inflammatoires chroniques peuvent résulter d'une résolution incomplète de la réponse aiguë initiale, qui, à son tour, n'engage pas pleinement une réponse immunitaire adaptative appropriée.

PARTIE II : DÉRÉGULATION DU PROCESSUS DE RÉOLUTION DE L'INFLAMMATION ET ÉTABLISSEMENT DES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES.

2. Contexte et généralités de la dérégulation du processus de résolution de l'inflammation

L'inflammation est une réaction naturelle de l'organisme qui est initiée après une infection ou une agression. Des réponses locales et systémiques sont mises en place afin d'éliminer le stimulus initial, induire le processus de cicatrisation et de réparation tissulaire. Dans le cas d'une infection, ces réponses permettent également d'établir une mémoire immunitaire à long terme afin de répondre de manière plus rapide et optimale contre des infections futures. La période comprise entre la première vague de recrutement des cellules inflammatoires, la clairance de ces cellules effectrices une fois leur rôle achevé et le rétablissement de l'homéostasie, est connue sous le nom de résolution de l'inflammation et correspond à une cascade d'événements très coordonnée.

Comme décrit préalablement, ce processus débute par l'élimination de l'agent inflammatoire par les cellules effectrices. Les médiateurs pro-inflammatoires sont ensuite catabolisés et l'expression des cytokines pro-inflammatoires est diminuée, inhibant ainsi la mobilisation de nouvelles cellules inflammatoires. Les leucocytes inflammatoires résidents vont quitter la zone inflammatoire soit en retournant dans la circulation sanguine, soit dans la majorité des cas par un processus d'apoptose. Finalement, les macrophages recrutés dérivés des monocytes vont éliminer les cellules apoptotiques par efferocytose, établissant un microenvironnement pro-résolutif. L'interaction cellulaire ainsi que la balance des médiateurs de la réponse inflammatoire (notamment les lipides bioactifs) vont coordonner de manière très fine ces différentes étapes. La résolution constitue ainsi un réel lien entre l'immunité innée et adaptative et une résolution incomplète de l'inflammation peut engager une réponse immunitaire adaptative inappropriée (Fullerton and Gilroy 2016). Dans ce contexte, il a été montré que le blocage de la réponse persistante de l'interféron de type I au virus de la

chorioméningite lymphocytaire diminue l'activation du système immunitaire innée, restaure l'architecture des ganglions et aboutit à une amélioration de l'élimination du virus par les lymphocytes T CD4⁺. De manière paradoxale, même si la production précoce d'IFN de type I favorise la clairance virale, une exposition chronique à l'IFN déclenche une immunosuppression induite par l'IL-10, PD-L1 et l'indoleamine provoquant l'apoptose des lymphocytes T, altérant collectivement la capacité de l'hôte à développer une immunité spécifique (Gonzalez-Navajas, Lee et al. 2012). De même, l'exposition chronique au TNF diminue les réponses T ou adaptatives. En effet, tandis que, l'injection répétée de TNF chez la souris atténue la réactivité des lymphocytes T, l'utilisation chronique de thérapies anti-TNF améliore la réactivité des lymphocytes T (Cope, Liblau et al. 1997). Ainsi, même si certaines cytokines de type Th1 (*T helper 1*) modulent la survenue de l'inflammation lors de la phase précoce, leur persistance peut paradoxalement altérer la résolution de l'inflammation, ce qui réduit la clairance de l'antigène et empêche le développement optimal de l'immunité adaptative et de la mémoire immunitaire à long terme. D'un point de vue conceptuel, de nombreuses maladies peuvent impliquer une inflammation aiguë permanente en même temps qu'une tentative avortée de développer une immunité adaptative, cette dernière devenant finalement inadaptée. Dans ce contexte, il a été proposé que bien que l'inflammation non-résolue n'est pas la cause primaire des maladies inflammatoires chroniques comme l'athérosclérose, l'obésité, le cancer, la BPCO (Broncho pneumopathie chronique obstructive), l'asthme, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les maladies neurodégénératives, la sclérose en plaques ou l'arthrite rhumatoïde, elle contribue significativement à leur pathogenèse (Nathan and Ding 2010).

3. Etapes défailantes lors du processus de résolution de l'inflammation

La mort cellulaire par apoptose ainsi que l'élimination des cellules apoptotiques par efferocytose sont des étapes majeures dans le processus de résolution. Ces deux phases ont été étudiées attentivement durant ces dernières années, proposant ces étapes comme possibles cibles thérapeutiques dans le développement de nouvelles approches de thérapies pro-résolutives innovantes.

3.1 Défaut du processus d'apoptose

La résolution de l'inflammation fait intervenir majoritairement le processus d'apoptose (Nathan and Ding 2010). Une régulation optimale de la mort des neutrophiles par apoptose est une des premières étapes clé dans l'induction de la résolution de l'inflammation. Les

médiateurs qui prolongent la durée de vie des neutrophiles sont connus pour retarder la résolution de l'inflammation. Parmi les principaux signaux de survie de neutrophiles, on retrouve l'IL-1 β , le G-CSF, et le GM-CSF qui sont produits par les macrophages inflammatoires et retardent l'apoptose des neutrophiles (Kantari, Pederzoli-Ribeil et al. 2008). Ainsi, le G-CSF et le GM-CSF vont activer l'expression de la survivine qui est un inhibiteur d'apoptose (Altnauer, Martinelli et al. 2004). Dans ce contexte, il a été montré que des patients atteints de maladies coronaires présentent une accumulation de neutrophiles dans la zone enflammée avec un retard très marqué du processus apoptotique. Cette survie prolongée des neutrophiles a été mise en lien avec une concentration élevée d'IFN γ , de GM-CSF et de l'IL-1 β dans le sérum des patients par rapport à des individus sains (Garlichs, Eskafi et al. 2004). Par ailleurs, chez des patients arthritiques, il a été montré une relation directe entre l'augmentation de lactoferrine dans le liquide synovial des articulations touchées et le prolongement de la survie des neutrophiles dans ce même liquide lors des étapes tardives de la maladie (Wong, Francis et al. 2009). D'autres signaux à l'origine de la survie de neutrophiles sont les produits bactériens (Colotta, Re et al. 1992), et les faibles teneurs en oxygène. L'hypoxie induit à la fois une fonctionnalité préservée et une augmentation de la durée de vie des neutrophiles grâce à des enzymes sensibles à l'oxygène qui stabilisent les voies du facteur inductible à l'hypoxie, en particulier l'HIF-1 α (Walmsley, Print et al. 2005). Notamment, HIF-1 α induit l'expression des enzymes glycolytiques qui soutiennent la génération d'ATP en conditions hypoxiques (Cramer and Johnson 2003). Le blocage des enzymes impliquées dans cette voie par la diméthylaloylflycine (DMOC) conduit à un retard dans la résolution de l'inflammation due à une apoptose des neutrophiles réduite et à leur rétention accrue au site inflammatoire dans un modèle de poisson zèbre, soulignant l'importance de la concentration d'oxygène dans la bonne régulation des processus inflammatoires (Elks, van Eeden et al. 2011).

3.2 Défaillance du processus d'efferocytose.

La mort par apoptose prévient la fuite du contenu intracellulaire immunogène. Si toutefois les cellules apoptotiques ne sont pas rapidement éliminées, elles subissent une nécrose secondaires entraînant la libération des antigènes intracellulaires et de l'ADN, ce qui provoque à long terme une réponse auto-immune (Munoz, Lauber et al. 2010). Ainsi, une défaillance dans le processus d'efferocytose peut entraîner des maladies inflammatoires chroniques comme l'athérosclérose, le lupus érythémateux, des maladies inflammatoires pulmonaires ou encore le diabète (Szondy, Garabuczi et al. 2014).

Pour assurer une élimination efficace, les cellules apoptotiques recrutent des phagocytes en libérant divers signaux solubles (les molécules « *Find-me* »). Dans ce contexte, des études récentes de « *knock out* » chez la souris ont montré le rôle clé de certaines molécules dans la progression de l'athérosclérose comme MERTK (*MER tyrosine kinase*), MFG-E8 ou la molécule du complément C1q (Thorp 2010). En outre, il a été montré qu'une déficience en C1q est présente chez les patients atteints de lupus érythémateux, suggérant qu'un défaut d'efferocytose pourrait être à l'origine de cette maladie (Lewis and Botto 2006; Munoz, Lauber et al. 2010).

Par ailleurs, les maladies inflammatoires pulmonaires comme la BPCO ou encore la fibrose kystique (FK) peuvent être associées à une défaillance des macrophages alvéolaires dans le processus d'efferocytose. Chez les patients fumeurs atteints de BPCO, il semble qu'une diminution des récepteurs de surface impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques (CD31, CD91 et CD71), est liée à la consommation de tabac (Hodge, Hodge et al. 2007). De même, chez les patients atteints de FK, le défaut d'efferocytose est associé au clivage du récepteur de la phosphatidylsérine à la surface des macrophages, par l'action de l'élastase produite par les neutrophiles. Cela suggère que la perpétuation de l'inflammation dans les voies aériennes des FK peut être induite par des mécanismes de clairance défectueux (Vandivier, Fadok et al. 2002).

Finalement, le diabète de type 2 et l'obésité sont également associés à une phagocytose altérée des cellules β apoptotiques du pancréas chez des rats diabétiques (O'Brien, Fieldus et al. 2002) et chez des souris ob/ob et db/db. Le phénomène semble être lié à une augmentation de la composition en acides gras saturés et/ou ω -3 de la membrane plasmique, ce qui entraîne une diminution de l'activation de la phosphatidylinositol-3-kinase lors de l'absorption de cellules apoptotiques (Li, Sun et al. 2009).

3.3 Défaut de la reprogrammation des macrophages

Il a été suggéré que la reprogrammation des macrophages en réponse aux signaux environnementaux module la capacité d'efferocytose des macrophages. L'activation des récepteurs nucléaires PPAR γ , PPAR δ , LXR et éventuellement RXR α est essentielle à cette reprogrammation (Odegaard, Ricardo-Gonzalez et al. 2007). L'activation de PPAR γ augmente l'expression des récepteurs impliqués dans le processus d'efferocytose à la surface des macrophages et augmente l'expression des molécules de pontage comme l'adiponectine. Ces deux phénomènes aident à augmenter les capacités d'efferocytose des macrophages,

induisant par conséquent une suppression de l'inflammation. Pour certaines populations de macrophages, la signalisation de PPAR γ est induite par IL-4 et IL-13 (Fernandez-Boyanapalli, Frasch et al. 2009). Toutefois, un environnement inflammatoire accru empêche la mise en place des mécanismes impliqués dans la reprogrammation des macrophages. Il a été montré que les souris déficientes en PPAR γ présentent une efferocytose altérée, une diminution de l'expression des récepteurs comme CD36 et MERTK ainsi que une augmentation de la production d'auto-anticorps et de l'inflammation rénale (Roszer, Menendez-Gutierrez et al. 2011). De même, des souris déficientes en PPAR δ et en LXR, développent également une maladie auto-immune systémique associée à une clairance déficiente et une diminution de l'expression des récepteurs ainsi que des molécules de pontage impliquées dans l'efferocytose (Mukundan, Odegaard et al. 2009). Dans un modèle murin de maladie granulomateuse chronique (CGD) qui présente une inflammation chronique et une auto-immunité légère, les macrophages conservent un profil inflammatoire (M1), caractérisé par une production accrue de cytokines pro-inflammatoires, une efferocytose altérée et une diminution de l'expression de PPAR γ , MMR, CD36 et CD14 (Fernandez-Boyanapalli, Frasch et al. 2009).

L'ensemble de ces données suggèrent qu'une efferocytose défaillante lors d'un processus inflammatoire dans un contexte auto-immun et/ou chronique peut induire une activation soutenue des macrophages au cours du temps et/ou un échec de la reprogrammation des macrophages vers un profil pro-résolutif.

PARTIE III : MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN, REPARATION TISSULAIRE ET THERAPIES

4. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

4.1 Généralités et historique

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin regroupent les maladies liées à une inflammation chronique du tube digestif, principalement la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Une troisième entité peut être ajoutée, la « colite indéterminée », présentant les caractéristiques d'une colite idiopathique qui ne peut être classée ni dans la MC, ni dans la RCH. Ces maladies semblent affecter l'être humain depuis plusieurs siècles. En effet, la MC a été observée pour la première fois par le chirurgien allemand Wilhelm Fabry en 1623. En 1932, le Dr. Burrill Bernard Crohn et ses collaborateurs new-yorkais sont analysé, décrit et publié pour la première fois les symptômes de la maladie dénommée à l'époque sous le nom de « iléite régionale » (Crohn, Ginzburg et

al. 1984). Quant à la RCH, elle fut décrite pour la première fois en 1859 par le Dr. Sir Samuel Wilks qui proposa l'appellation de colite ulcéreuse.

4.2 Physiopathologie des MICI

Les MICI sont caractérisées par une inflammation intestinale chronique récurrente avec des symptômes cliniques tels que la diarrhée, des douleurs abdominales, un saignement rectal, et l'apparition d'ulcères dans la muqueuse, impliquant une réponse pathologique à la fois dans le système immunitaire inné et adaptatif, ainsi que dans l'épithélium et l'endothélium intestinal (Baumgart and Carding 2007; Engel and Neurath 2010).

La MC présente un atteinte transmurale de la muqueuse qui peut affecter la totalité du tractus gastro-intestinale, de la bouche jusqu'à la marge annal. Les lésions intestinales sont segmentaires, avec des intervalles de muqueuse saine et des zones inflammatoires (**Figure 7**). Dans 50% des cas, l'inflammation présente une localisation iléo-colique. L'iléon et le colon ne sont atteints de manière isolée que dans 30% et 20% des cas, respectivement. De plus, 10% des patients peuvent présenter une localisation ano-périnéale avec des fissures, fistules et des ulcérations profondes. D'autres lésions rarement présentes sont des érosions ou des ulcérations gastroduodénales. Enfin, la cavité buccale et l'œsophage peuvent également être le siège des ulcérations muqueuses.

La RCH est quant à elle une maladie limitée à la surface de la paroi intestinale, notamment, à la muqueuse et à la sous-muqueuse où l'inflammation est restreinte au niveau du colon et du rectum. Les lésions son homogènes, sans intervalle de muqueuse saine, touchant le rectum et atteignent le colon de manière ascendante dans 95% des cas. Les lésions peuvent entraîner une accumulation de neutrophiles et de monocytes à la base des villosités aboutissant à la destruction des sites importants dans le renouvellement des cellules souches intestinales, traduit par une perte physique et fonctionnelle des cryptes intestinales.

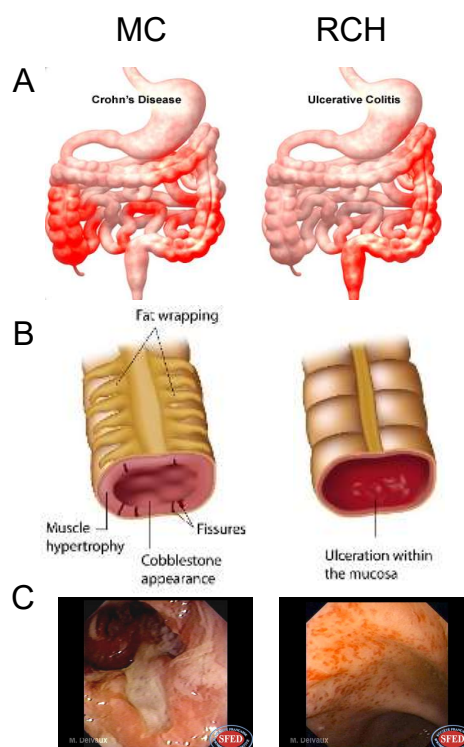


Figure 7 : Caractéristiques pathologiques de la maladie de Crohn (MC) et de la rectocolite hémorragique (RCH). (A) Localisation intestinale des lésions inflammatoires (University). (B) Schéma représentatif des modifications de la muqueuse. MC : épaissement de la paroi intestinale, apparition des fissures transmursales, modification du revêtement épithéliale et dépôt de grasse à la surface de l'intestin. RCH : ulcération de la muqueuse, formation de pseudopolypes et perte des haustrations (IBDrelief). (C) Images d'endoscopie (SFED).

Les MICI peuvent aussi présenter des signes extradiigestifs. Dans la MC, ces symptômes sont observés chez 25% des patients, avec des manifestations rhumatismales, oculaires et cutanées. Les patients de RCH présentent des manifestations extradiigestives similaires, mais on notera une plus forte prévalence pour les atteintes des voies biliaires. Ces manifestations peuvent coïncider avec les poussées évolutives de la maladie, alors que d'autres évoluent de manière indépendante (Caprilli, Gassull et al. 2006; Bourikas and Papadakis 2009).

4.1 Épidémiologie et étiologie

Les MICI affectent aussi bien les hommes que les femmes, préférentiellement le jeune adulte entre 20 et 30 ans. Une plus forte incidence de RCH et de MC est observée dans les pays industrialisés avec une incidence moyenne de 0 à 19.2 nouveaux cas pour 10^5 habitants en Amérique du Nord et de 0,6 à 24,3/ 10^5 en Europe. Ainsi, environ 1,5 millions d'Américains et 2,2 millions d'Européens sont atteints de MICI actuellement (Ananthakrishnan 2015). Il existe une corrélation directe entre le niveau de développement d'un pays et le taux d'incidence de MICI. En effet, tandis que dans les pays développés le nombre de cas à une

tendance à se stabiliser, dans les pays en voie de développement l'incidence a tendance à augmenter (Bernstein 2012).



Figure 8 : La prévalence mondiale de MICI en 2015. Les pays en rouge présentent une prévalence annuelle de $10/10^5$, en jaune une prévalence intermédiaire de $5-10/10^5$ et en bleu une faible prévalence d'environ $4/10^5$. Modifié d'après (Kaplan 2015).

Le développement des MICI est multifactoriel et reste à ce jour non élucidé (Dignass, Van Assche et al. 2010). Plusieurs facteurs sont à la base de ces maladies, en particulier les facteurs génétiques, environnementaux, microbiens et le dysfonctionnement du système immunitaire (**Figure 9**).

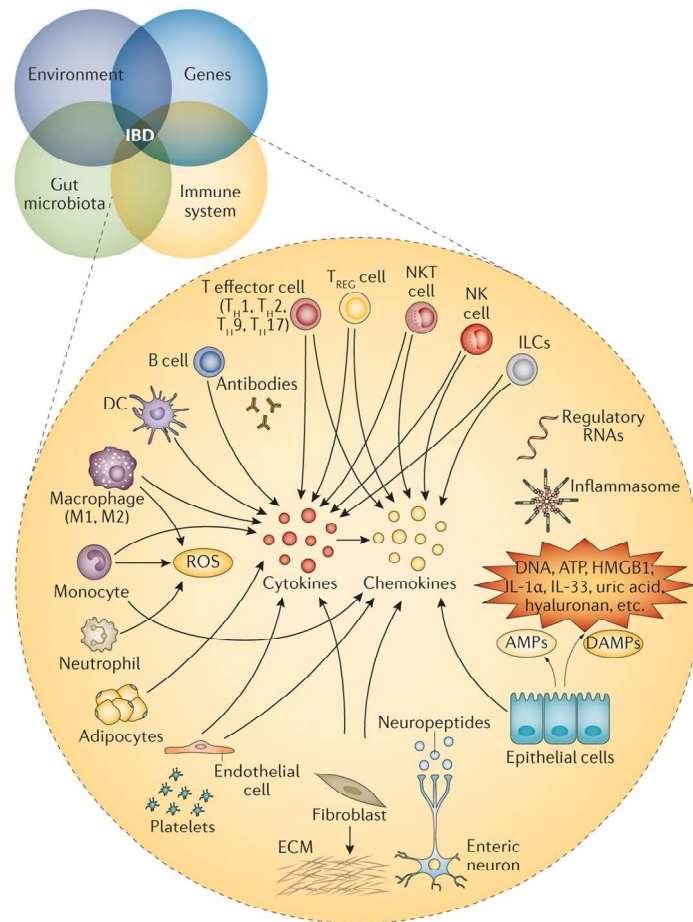


Figure 9 : Facteurs impliqués dans la physiopathogénie des MICI. Les quatre composants doivent être intégrés fonctionnellement afin de déclencher la maladie, car aucun composant de manière indépendante ne peut initier les MICI. Une réponse immunitaire dérégulée représente le bras effecteur de l'inflammation, et comprend différents types cellulaires hématopoïétiques et non hématopoïétiques (myéloïde, lymphoïde, épithéliale, endothéliale, mésenchymateuse, neurogénique) ainsi que leurs produits (cytokines, chimiokines, neuropeptides, ROS, PAMP, DAMP), AMP, antimicrobial peptide; DAMP, damage-associated molecular pattern; DC, dendritic cell; ECM, extracellular matrix; HMGB1, high mobility group box chromosomal protein 1; ILC, innate lymphoid cell; NK cell, natural killer cell; NKT cell, natural killer T cell; ROS, reactive oxygen species; TH, T helper; TREG cell, regulatory T cell (de Souza and Fiocchi 2016).

4.1.1 Facteurs génétiques

La susceptibilité génétique dans le développement des MICI joue un rôle primordial. Des études menées chez des jumeaux ont suggéré un élément héréditaire clé pour le développement des MICI. En effet, le taux de concordance pour la MC est de 20 à 50% pour les jumeaux monozygotes et que de 10% pour les jumeaux dizygotiques. Quant à la RCH, les taux sont estimés à 16% pour les monozygotes et 4% pour les dizygotiques, ce qui suggère une composante héréditaire plus faible pour cette maladie. Dans ce contexte, des études d'association pangénomiques (GWAS) ont montré que parmi les 163 loci génétiques associés jusqu'à présent avec les MICI, 110 loci sont associés aux deux formes de la maladie, 30 sont spécifiques à la MC et 23 à la RCH (Jostins, Ripke et al. 2012). Ces loci sont enrichis en

gènes impliqués dans le développement des maladies immunodéficiences primaires, la fonction des lymphocytes T, la modulation de la production de cytokines et dans les maladies mycobactériennes.

En 1996, le gène *NOD2* (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2*) codant pour la protéine CARD15 (*Caspase Recruitment Domain-containing protein 15*) est identifié comme le premier gène dont les variations génétiques ont un impact direct sur la MC (Hugot, Laurent-Puig et al. 1996). *NOD2* appartient à la famille des récepteurs NLR et code pour le récepteur principal du dipeptide muramyl (MDP) trouvé dans la paroi de toutes les bactéries Gram-négatifs et Gram-positives. *NOD2* se situe dans un point stratégique au niveau de l'interaction hôte-microbiote, participant à la reconnaissance bactérienne, ce qui en fait un acteur majeur dans les réponses immunitaires innées, dans la régulation de la microbiote commensale et dans l'homéostasie intestinale (Shaw, Kamada et al. 2011). La compréhension complète du rôle de *NOD2* dans la MC est confondue avec d'autres activités dépendantes de *NOD2*, y compris l'induction de l'autophagie, l'activation alternative d'autres voies d'activation notamment l'axe IL-23/IL-17 ainsi que la modulation de l'immunité adaptative (Noguchi, Homma et al. 2009).

L'étude GWAS a identifié une association de la MC avec d'autres gènes comme *ATG16L1* (*autophagy-related 16-like 1 [S. cerevisiae]*) et *IRGM* (*Immunity-related GTPase family M protein*), impliqués dans l'autophagie. Divers études ont montré l'importance de l'autophagie dans la reconnaissance et prise en charge des microorganismes pathogènes, mettant en lien direct la défaillance du processus autophagique avec la MC (Saitoh, Fujita et al. 2008; Lassen, Kuballa et al. 2014).

NOD2, *ATG16L1* et *IRGM* sont aujourd'hui considérés comme quelques gènes de susceptibilité parmi une soixantaine des gènes cibles pouvant participer au développement des MICI. L'ensemble des gènes ayant été découverts montre l'implication de nombreuses fonctions biologiques dans la pathogénie des MICI, telles que l'autophagie, le stress du réticulum endoplasmique du au mauvaise repliement de certains types de protéines, l'homéostasie de la barrière intestinale, ainsi que la restauration de l'épithélium. Cependant, la discordance chez les jumeaux à la fois dans le type de MICI ainsi que dans l'histoire naturelle de la maladie, démontrent que la susceptibilité génétique ne suffit pas à elle seule, à expliquer le développement des MICI (Khor, Gardet et al. 2011; Liu and Anderson 2014).

4.1.2 Facteurs environnementaux

L'augmentation progressive de l'incidence des MICI dans les pays industrialisés ou en voie de développement semble indiquer une influence très importante des facteurs environnementaux dans l'éthiopathologie de la maladie. En effet, les agents infectieux, le stress, l'alimentation, l'allaitement maternel, la vaccination et la pollution peuvent augmenter le risque de MICI, ainsi que le tabagisme et l'appendicectomie qui ont un rôle clairement établie dans le développement et l'évolution de la maladie (Andersson, Olaison et al. 2001; Gardenbroek, Eshuis et al. 2012; Cosnes 2016). Une plus faible exposition de l'organisme aux microbes et parasites grâce à l'assainissement des eaux, l'industrialisation alimentaire, l'utilisation d'antibiotiques et des vaccins, contribuent au déclin des maladies infectieuses, favorisant cependant l'apparition des allergies et des maladies dites auto-immunes et inflammatoires telles que les MICI (Singhal, Dian et al. 2011). Environ la moitié des patients souffrant de MICI attribuent le développement de leur maladie à un problème psychosocial ou à un trait de leur personnalité, entretenant ainsi l'idée non fondée d'une origine psychosomatique de l'affection. En effet, il a été montré que le stress peut augmenter l'inflammation intestinale (Bonaz and Bernstein 2013). L'implication d'un agent infectieux dans le développement des MICI n'est toujours pas exclue, comme par exemple pour *Mycobacterium paratuberculosis* et *Escherichia coli* adhérent/invasif (Abraham and Cho 2007; Patel and Shah 2011; Buisson, Bringer et al. 2016).

4.1.3 Facteurs immunologiques

Bien que l'origine des MICI ne soit pas encore totalement élucidée, il est évident que cette maladie survient chez des patients génétiquement prédisposés à une activation inappropriée du système immunitaire intestinale envers la flore intestinale. La plupart des gènes impliqués dans la pathologie des MICI participent à l'intégrité de la barrière intestinale et aux interactions entre les bactéries et le système immunitaire de la muqueuse intestinale.

- Rôle de la barrière intestinale muqueuse

L'épithélium intestinal relie les facteurs pathologiques à la base du développement des MICI comme la flore microbienne, les facteurs environnementaux au le système immunitaire de l'hôte (Okamoto and Watanabe 2016).

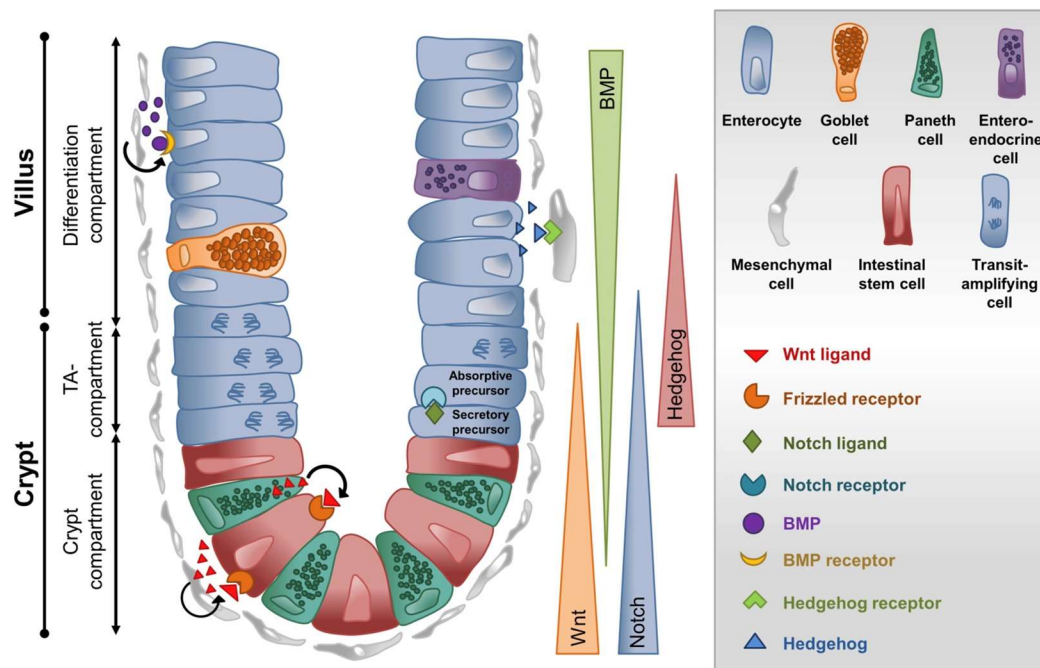


Figure 10 : Maintenance cellulaire d'une crypte intestinale. Les cellules de Paneth et les cellules mésenchymateuses vont produire des ligands Wnt, qui se lient directement aux récepteurs *frizzled* exprimés par les cellules souches intestinales. Les précurseurs des cellules sécrétrices vont libérer des ligands Notch qui se lient aux récepteurs Notch présents à la surface des précurseurs des entérocytes. Les signaux Hedgehog sont produits par les entérocytes et agissent directement sur les cellules mésenchymateuses exprimant le récepteur Hedgehog, en empêchant ainsi la production de BMP, lequel se lie à son récepteur exprimé par les entérocytes, inhibant ainsi la voie Wnt. Tous les types cellulaires intestinaux pertinents et les molécules de signalisation sont représentés dans la boîte grise à droite (Martini, Krug et al. 2017).

L'épithélium intestinal est constitué d'une seule couche de cellules épithéliales intestinales (IEC) étroitement liées par des jonctions serrées. Sa structure tridimensionnelle se caractérise par des invaginations appelées cryptes de Lieberkün, suivies par des protrusions appelées villosités. Les cellules souches intestinales se retrouvent à la base des cryptes, où elles vont se diviser en cellules progénitrices et migrent vers la villosité tout en se différenciant en cellules épithéliales matures (**Figure 10**). Grâce à cette prolifération de cellules souches, l'épithélium intestinal est complètement renouvelé tous les 4 à 5 jours (Barker, van Es et al. 2007). L'homéostasie épithéliale intestinale dépend non seulement du rapport entre la prolifération et la mort cellulaire, mais aussi de l'équilibre entre les cellules en prolifération et en différenciation. Cette différenciation a lieu grâce à un microenvironnement autour des cryptes qui est établi par les IEC comme les cellules de Paneth, ou par les cellules mésenchymateuses voisines comme les fibroblastes. Ces cellules vont sécréter des molécules de signalisation qui vont donner lieu à un gradient de concentration qui régule et préserve ce microenvironnement.

L'épithélium intestinal n'est pas seulement une barrière physique, il a également des propriétés immunitaires pour combattre activement les pathogènes. Les IEC, comme les

cellules caliciformes et les cellules de Paneth, possèdent diverses stratégies de défense contre les bactéries, les champignons et d'autres antigènes existants dans la lumière intestinale. En effet, les cellules caliciformes sécrètent une variété de molécules antimicrobiennes, comme les mucines qui favorisent la formation d'une couche épaisse de mucus permettant de prévenir le contact direct et excessif des bactéries avec l'épithélium intestinale. Les composants principaux du mucus sont la mucine-2 et la mucine-6, des glycoprotéines permettant la construction d'un réseau largement imperméable aux pathogènes invasifs (Kim and Ho 2010). L'épaisseur de la couche de mucus varie entre l'intestin grêle et le côlon (Johansson, Sjovall et al. 2013) ; alors que l'intestin grêle n'est tapissé que d'une seule et fine couche de mucus, le côlon contient deux couches plus épaisses et distinctes. La couche externe n'est pas attachée à l'épithélium et contient les bactéries intestinales, tandis que la couche interne est attachée à la surface épithéliale et possède une fonction protectrice car elle est imperméable aux bactéries lumineuses (Kim and Ho 2010). Des études récentes ont également suggéré l'implication des cellules caliciformes et des mucines dans des fonctions immunitaires complexes telles que la présentation antigénique et la tolérance. Notamment, il a été montré que les cellules caliciformes facilitent le passage d'antigènes luminaux solubles de bas poids moléculaire, comme des antigènes alimentaires, des organismes commensaux et des pathogènes, par transcytose aux cellules dendritiques sous jacentes $CD103^+CD11b^+CX3CR1^-$. Ce processus est lié à une augmentation de la production d'IgA, au priming de lymphocytes intestinaux et à l'expansion des lymphocytes T régulateurs. Ce mécanisme favorise l'homéostasie intestinale et la tolérance (McDole, Wheeler et al. 2012). Une autre étude a également montré que l'interaction directe de MUC2 avec les cellules dendritiques de l'intestin grêle et avec les antigènes luminaux, en particulier les bactéries, permet la fixation au complexe galectine-3, dectine-1 et FcγRIIB, pour supprimer les réponses inflammatoires mais conserver les réponses tolérogéniques des cellules dendritiques. Notamment, MUC2 participe à l'activation d'AKT et GSK3β, conduisant à l'inhibition de la β-catenine et permettant l'activation de la transcription des cytokines tolérogènes telles qu'IL-10, TGFβ et REGIIIγ. Ces effets ont été démontrés à la fois sur les cellules dendritiques $CD103^-CD11b^+CX3CR1^+$ de type macrophage et sur les cellules dendritiques $CD103^+CD11b^+CX3CR1^-$ de type myéloïde (Shan, Gentile et al. 2013). Il est également intéressant de noter que MUC2 administrée par voie orale chez des animaux $Muc2^{-/-}$ restaure l'homéostasie intestinale et augment le potentiel tolérogène des cellules dendritiques intestinales (Farache, Koren et al. 2013).

Par ailleurs, il a été montré que l'autophagie est impliquée dans l'élimination des bactéries et que ce processus est influencé par des PRR comme les TLR et les NLR. Des études ont montré que NOD1 et NOD2 interagissent avec la protéine de l'autophagie ATG16L1, qui est un composant important d'un grand complexe protéique (Atg5-Atg12 / Atg16L1) essentiel pour le processus autophagique (Travassos, Carneiro et al. 2010). Ces NLR recrutent ATG16L1 sur la membrane plasmique où ils peuvent cibler les agents pathogènes intracellulaires (Travassos, Carneiro et al. 2010). Les NLR peuvent donc être impliqués dans la régulation de l'exocytose du mucus dépendant de l'autophagie. Un membre de la famille NLR et de la voie de l'inflammasome, NLRP6, induit la sécrétion de mucus dépendant de l'autophagie à partir de cellules caliciformes. NLRP6 participe à l'activation de l'inflammasome et fournit ainsi une défense contre l'infection et la tumorigenèse entre autres. L'inflammasome est un complexe de protéines qui recrute la protéine adaptatrice ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) et active la caspase-1, qui clive et active ensuite l'IL-1 β et l'IL-18 (Grenier, Wang et al. 2002). Une étude récente a montré que des souris qui étaient déficientes en NLRP6, ASC ou caspase-1 étaient dépourvues de la couche muqueuse interne par rapport aux souris *wild type*, augmentant ainsi leur susceptibilité à l'infection par *C. rodentium*. Les auteurs ont attribué la diminution de l'épaisseur de la couche de mucus à une sécrétion de granules de mucus défailante puisque le nombre de cellules caliciformes chez les souris déficientes en NLRP6 était augmenté et que l'expression du gène de la mucine n'était pas altérée (Wlodarska, Thaïs et al. 2014). L'inflammasome NLRP6 module l'exocytose des granules de mucus et s'est révélé essentiel pour l'autophagie dans les cellules intestinales. NLRP6 est critique pour la conversion optimale de LC3I (*microtubule-associated protein 1 light chain*) à son conjugué de phosphatidyléthanolamine (LC3II), un processus requis pour la formation des autophagosomes (Wlodarska, Thaïs et al. 2014). L'ensemble de ces travaux ont montré que l'inflammasome NLRP6 est essentiel dans le maintien de l'autophagie dans l'épithélium intestinal participe à la sécrétion de mucus et au maintien de la bonne fonctionnalité de la barrière intestinale.

Finalement, il a été également montré que les cellules caliciformes sécrètent d'autres molécules comme le facteur *trefoil 3* qui, conjointement avec la mucine, participe à la restauration et à la conservation des IEC des muqueuses intestinales (Lin, Xu et al. 2013). De plus, lors d'une infection parasitaire par des nématodes, les cytokines de type Th2 peuvent induire l'expression d'une autre molécule aux propriétés immunorégulatrices dans les

cellules caliciformes : la *Resistin-like molecule- β* qui altère les fonctions chimio sensorielles des nématodes (Wang, Shin et al. 2005).

Dans des conditions physiologiques, les cellules caliciformes produisent continuellement des mucines pour reconstituer et maintenir la barrière muqueuse. Cependant, la fonction des cellules caliciformes peut-être perturbée par divers facteurs qui affectent l'intégrité de la barrière muqueuse. Certains de ces facteurs tels que les microbes, les toxines microbiennes et les cytokines peuvent stimuler ou inhiber la production et la sécrétion de mucine, altérer la composition chimique des mucines ou dégrader la couche de mucus. Ces perturbations peuvent compromettre l'intégrité de la barrière de mucus et favoriser l'apparition de conditions pathologiques comme les maladies inflammatoires chroniques (Wlodarska, Thaiss et al. 2014).

Les cellules de Paneth sont également productrices de peptides antimicrobiens, comme les défensines, les lysozymes, ou encore la protéine REG3 γ (*Lectin-Regeneratin islet-derived protein III- γ*) (Bevins and Salzman 2011). Il existe également des cellules spécialisées, appelées cellules M (*Microfold*), qui sont abondantes dans l'épithélium associé aux follicules, mais également tout le long des villosités intestinales. Celles-ci vont absorber les microbes intestinaux et leurs antigènes pour les transmettre aux cellules immunitaires résidentes dans le tissu lymphoïde associé à l'intestin, soutenant ainsi la maturation du système immunitaire (Ohno 2016). Ainsi, l'épithélium intestinal participe à la mise en place de l'homéostasie. La maintenance de cette homéostasie requiert entre autre, une intégrité structurale de cet épithélium qui est dépendante de trois facteurs principalement : i) le taux de prolifération au sein de la crypte qui doit être contrebalancé par le même taux d'élimination cellulaire au niveau de la villosité, ii) les cellules mourantes par apoptose doivent être prises en charge précocement afin d'établir une tolérance et éviter des phénomènes inflammatoires liés au processus d'apoptose tardive ou de nécrose cellulaire, et iii) la perméabilité intestinale doit être maintenue de façon optimale grâce à l'action coordonnée entre les protéines des jonctions serrées et des protéines adhérentes. Il a été montré que les patients atteints de MICI présentent une augmentation de cellules apoptotiques dans l'épithélium intestinal par rapport aux personnes saines ou aux zones non inflammées (Hagiwara, Tanaka et al. 2002; Di Sabatino, Ciccocioppo et al. 2003). L'origine de cette augmentation pourrait être due à une dérégulation de la balance du taux de prolifération/élimination des cellules apoptotiques, ce qui pourrait être expliqué par une altération du processus d'efferocytose.

Récemment, plusieurs travaux ont été menés afin de comprendre les mécanismes d'expulsion des IEC des villosités intestinales vers la lumière intestinale, et le lien avec l'intégrité et la maintenance de la perméabilité intestinale. Grâce à la microscopie multiphotonique, il a été montré que l'expulsion des IEC laisse un espace dans l'épithélium qui ne compromet pas l'intégrité de la barrière intestinale puisqu'il est rapidement fermé, grâce à l'intervention de protéines adhérentes et des jonctions serrées, ainsi qu'à l'action des protéines du cytosquelette qui vont se disposer autour de la membrane basolatérale (Marchiando, Shen et al. 2011). Cet espace est rapidement fermé grâce à l'action de l'occludine et des protéines d'échafaudage associées aux protéines de jonctions serrées comme la protéine ZO1 (*Zonula Occludens-1*) (Watson, Chu et al. 2005; Kiesslich, Goetz et al. 2007). Ces molécules sont ainsi responsables du maintien de l'intégrité de la perméabilité intestinale, dont le défaut pourrait être à l'origine des MICI. En effet, 40% des patients atteints de la MC montrent une perméabilité intestinale altérée (Fries, Renda et al. 2005). Ceci entraîne deux processus physiologiques importants : i) une diffusion anormale d'ions et d'eau du sang vers la lumière intestinale provoquant une diarrhée ; ii) un passage de macromolécules comme des pathogènes et des antigènes provenant de la lumière intestinale qui peuvent être à l'origine d'une réponse immunitaire et inflammatoire prolongée dans le temps (Krug, Schulzke et al. 2014).

- Rôle du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal constitue un écosystème complexe dont l'impact sur la santé de l'homme est aujourd'hui reconnu. Le tractus intestinal abrite la plus grande communauté bactérienne associée au corps humain, atteignant des densités d'environ 10^{12} bactéries par gramme de tissu dans le côlon distal. Le microbiote intestinal d'un individu adulte serait composé de 500 à 1000 espèces bactériennes différentes réparties selon 4 phyla bactériens majoritaires : *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*. Il contribue à la fermentation des sucres et des protéines, et au métabolisme de nombreuses molécules telles que les acides biliaires et les xénobiotiques. Le microbiote participe également à la maturation du système immunitaire et joue un véritable rôle dans la barrière protectrice de l'épithélium intestinal contre l'infection par des micro-organismes pathogènes. Des études ont mis en évidence certaines anomalies du microbiote intestinal au cours des MICI : une forte instabilité du microbiote au cours du temps, la présence d'environ 30% de bactéries inhabituelles, une restriction de la biodiversité généralement aux dépens du phylum *Firmicutes*, et une augmentation de la concentration bactérienne dans la muqueuse (Tannock 2010). Ce déséquilibre dans la composition du microbiote intestinal est appelé dysbiose et a été mis en

évidence dans les MICI. En effet, cette dysbiose pourrait participer à l'activation chronique et inappropriée du système immunitaire intestinal, conduisant au phénomène inflammatoire. Par exemple, des études ont montré une augmentation d'*Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli* et *Shigella*) dans les MICI. La colonisation par *E.coli* avec des propriétés adhérentes et invasives est plus fréquente dans la muqueuse iléale des patients atteints de la MC que chez des individus sains. Ce groupe de bactéries a été identifié plus fréquemment dans les selles de patients atteints d'une MICI active (Darfeuille-Michaud, Boudeau et al. 2004; Chiodini, Dowd et al. 2013). Par ailleurs, d'autres études ont montré qu'il y a une concentration plus élevée de bactéries du genre *Fusobacterium* dans la muqueuse colique de patients atteints de RCH (Lynch and Pedersen 2016).

- Processus inflammatoire

L'homéostasie intestinale dépend d'interactions complexes entre le microbiote intestinal, l'épithélium intestinal et le système immunitaire de l'hôte. Chez les individus sains, le système immunitaire intestinal est représenté par des populations de cellules lymphoïdes et non lymphoïdes, ainsi que par des facteurs humoraux (**Figure 11**).

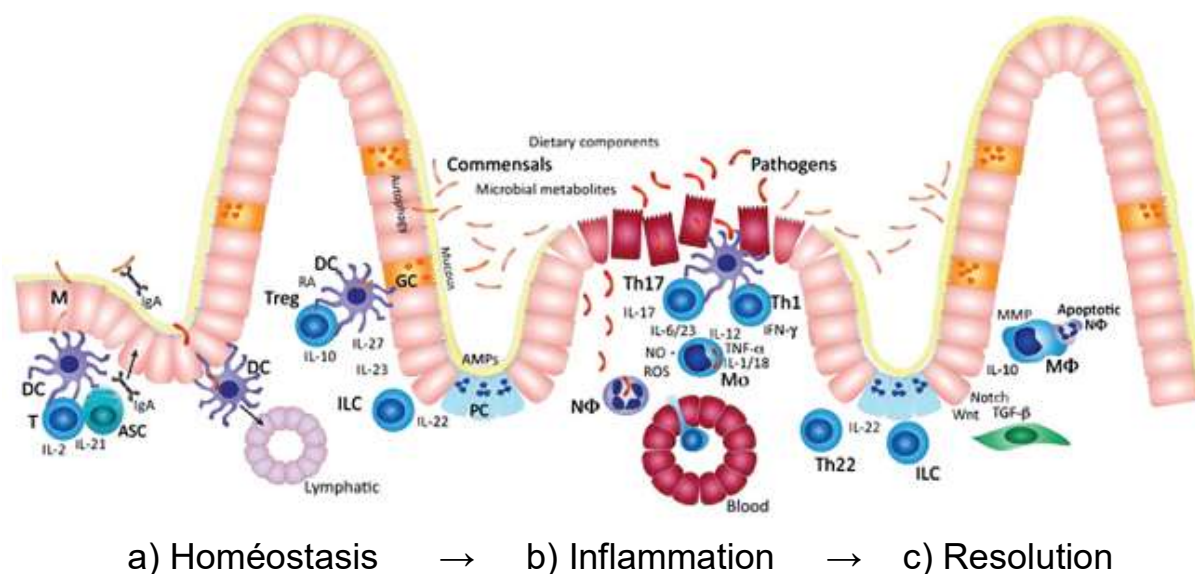


Figure 11 : Résolution de l'inflammation intestinale dans de conditions d'homéostasie. Dans de conditions d'homéostasie, les APC résidents permettent de maintenir une tolérance intestinale vis-à-vis des antigènes de la lumière intestinale grâce, entre autres à la production des Treg (a). Suite à une altération de la barrière intestinale, une réponse inflammatoire est mise en place. Cette réponse fait intervenir le système immunitaire innée et adaptative (notamment les Th1/Th17) afin d'éliminer efficacement l'agresseur (b). Une fois le danger éliminé, une étape de résolution de l'inflammation est initiée (c). Notamment grâce à l'efferocytose des PMN apoptotiques par les macrophages, permet d'établir un microenvironnement plus tolérante qui facilite l'initiation de la réparation tissulaire et le retour à l'homéostasie. M cell (M), antibody secreting cells (ASC), retinoic acid (RA), innate lymphoid cell (ILC), goblet cell (GC), Paneth cell (PC), anti microbial proteins (AMPs), neutrophil (Nø), inflammatory monocyte (Mo), macrophage (Mø), reactive oxygen species (ROS), nitricoxide (NO), and matrix metalloproteinase (MMP) (Ramnik 2014).

Les antigènes luminaux, tels que la flore commensale, les agents pathogènes et les nutriments sont analysés par des APC professionnelles et non professionnelles. Les APC non professionnelles, telles que les IEC, produisent des signaux de co-stimulation en absence d'inflammation, supprimant ou induisant une anergie dans les lymphocytes T de la muqueuse intestinale (Cruickshank, McVay et al. 2004). Les lymphocytes B de la muqueuse intestinale vont se différencier en cellules plasmiques sécrétant des immunoglobulines A qui recouvrent cette muqueuse. Les APC professionnelles, comme les cellules dendritiques, expriment tout le spectre de PRR et de molécules co-stimulatrices. Ces cellules contrôlent les deux types de système immunitaire : la réponse immunitaire adaptative, en modulant la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs (Th1, Th2, Th17) nécessaires à l'élimination des agents pathogènes, et en lymphocytes T régulateurs (Treg, Tr1), et la réponse immunitaire innée, en modulant l'activation des cellules NK (*Natural Killer*). Le rôle de LT effecteurs sera décrit ultérieurement à la fin du paragraphe. En présence de la flore intestinale et en absence d'inflammation, un équilibre entre les sous-populations immunitaires et régulatrices est maintenu grâce à un étroit réseau de cytokines. En effet, les molécules anti-inflammatoires, comme le TGF β et l'IL-10 présentes dans la muqueuse régulent négativement la réponse immunitaire et qui permettent la mise en place d'une tolérance vis-à-vis des microorganismes commensaux ou des antigènes dits « non dangereux ». Des cytokines pro-inflammatoires peuvent également être libérées pour assurer la défense contre les microorganismes pathogènes. Les contacts et les signaux cellulaires sont également d'une grande importance. Divers cellules effectrices secondaires, telles que les granulocytes, les mastocytes, les cellules NK et les macrophages résidents dans le tissu et peuvent aussi lutter contre une agression de manière très contrôlée en évitant au maximum les dégâts collatéraux. Par exemple, la phagocytose des pathogènes par les macrophages et la synthèse de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth participent à la lutte contre les bactéries, limitant ainsi les dommages tissulaires. Ainsi l'équilibre entre les lymphocytes effecteurs (*T helper*) et les lymphocytes régulateurs est continuellement ajusté afin de maintenir l'homéostasie du système immunitaire intestinale (Abraham and Cho 2007).

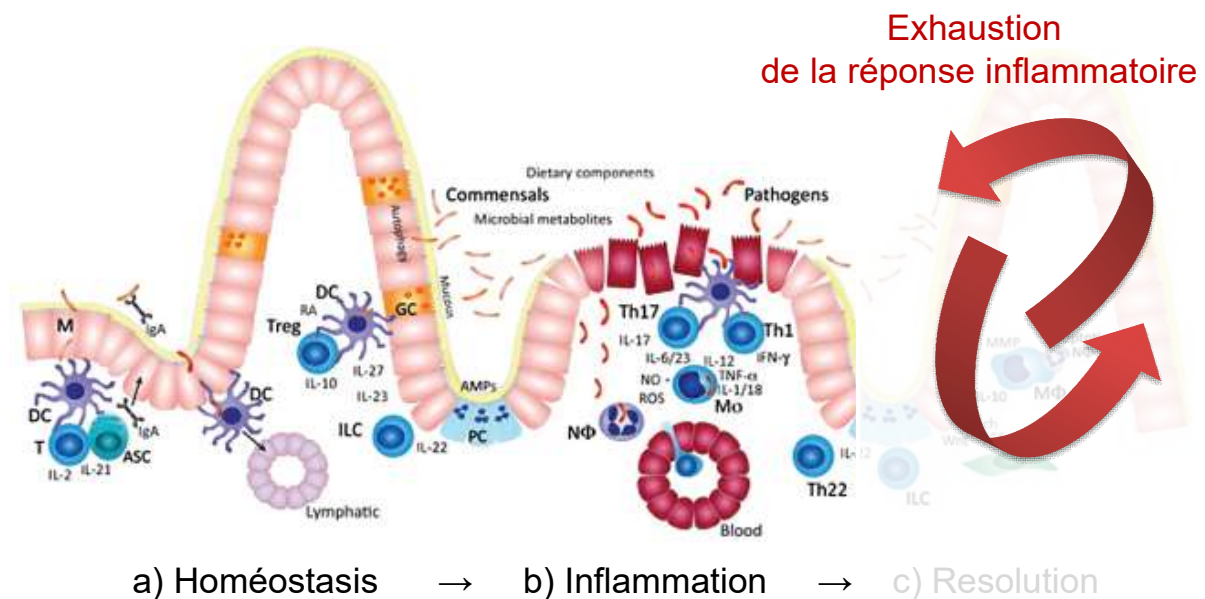


Figure 12 : Exhaustion de la réponse inflammatoire intestinale. Une altération de la barrière intestinale est présente dès le stade précoce de MICI. Cette altération induit par la suite la translocation des bactéries commensales et des produits microbiens depuis la lumière intestinale, ce qui conduit à une activation des cellules immunitaires comme les Th1/Th17 et la production de cytokines pro-inflammatoires (b). Si une inflammation aiguë de la muqueuse ne peut pas être résolue par des mécanismes anti-inflammatoires, une inflammation chronique est mise en place. A son tour, cette inflammation chronique peut entraîner la destruction du tissu et à long terme la mort de l'organe. M cell (M), antibody secreting cells (ASC), retinoic acid (RA), innate lymphoid cell (ILC), goblet cell (GC), Paneth cell (PC), antimicrobial proteins (AMPs), neutrophil (Nø), inflammatory monocyte (Mo), macrophage (Mø), reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO), and matrix metalloproteinase (MMP). Modifié après (Ramnik 2014).

Dans le cas des MICI, la modulation de l'immunité intestinale est altérée à tous les niveaux (**Figure 12**). Tout d'abord, les antigènes luminaux ont accès à la muqueuse sous-jacente du fait de la fragilité de la barrière intestinale causée par la réduction de la sécrétion de mucus, par l'augmentation de la perméabilité membranaire due à la déstabilisation des jonctions serrées, et par des défauts de synthèse des peptides antimicrobiens. Tous ces phénomènes vont contribuer à une augmentation de l'adhérence des bactéries à l'épithélium intestinal. De plus, les mécanismes de reconnaissance des composants bactériens peuvent être altérés, modifiant ainsi la capacité du système immunitaire inné à reconnaître le composant bactérien et à initier une réponse immunitaire adaptée. Dans ce contexte, les cellules immunitaires innées et adaptatives sont beaucoup plus actives et expriment un profil et un nombre différent de PRR. Les antigènes microbiens de la flore commensale peuvent déclencher et maintenir une réponse inflammatoire à travers plusieurs voies. Les cellules dendritiques myéloïdes vont reconnaître de manière anormale la flore intestinale comme un agent pathogène et vont rentrer dans un programme de maturation avec une expression accrue des PRR, des molécules d'histocompatibilité et de co-stimulation, et cesser de migrer. Ceci se poursuit avec une

modification de leur état fonctionnel, passant d'un état de tolérance à un état actif permettant la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs (Th1, Th17 et Th2) et l'activation des lymphocytes NK. De plus, les IEC expriment également des molécules co-stimulatrices. Cette expression leur permet de fonctionner comme des APC et contribuent ainsi à favoriser l'induction de lymphocytes T effecteurs. Dans le contexte inflammatoire des MICI, les lymphocytes Th1, Th2 et Th17 prédominent sur les lymphocytes Treg et Tr1. La MC est caractérisée par une différenciation préférentielles des lymphocytes T CD4⁺ vers un profil Th1/Th17, soit une réorientation lymphocytaire vers un profil cytokinique IFN- γ ⁺ et IL-12⁺ pour les Th1 et IL-17⁺, IL-21⁺ et IL-22⁺ pour les Th17. Néanmoins, les cytokines dérivées des Th17 ne vont pas tous favoriser une inflammation intestinale, au contraire, certaines cytokines comme l'IL-22 semblent jouer un rôle protecteur (Brand, Beigel et al. 2006; Sugimoto, Ogawa et al. 2008).

Récemment, l'implication d'une nouvelle population cellulaire dans la réponse inflammatoire des MICI a été mise en évidence, les ILCs (*Innate Lymphocyte Cells*). Cette population a été identifiée dans la muqueuse des patients atteints de MICI. Chez la souris, trois sous-populations d'ILC ont été identifiées (type 1, 2 et 3). Ces ILC vont avoir un rôle dans la régulation des communautés microbiennes, la modulation de la résistance aux microbes et aux helminthes, ainsi que dans l'inflammation et la réparation tissulaire (Tait Wojno and Artis 2012; Goldberg, Prescott et al. 2015).

Enfin, les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les lymphocytes T effecteurs vont stimuler les macrophages qui vont ainsi sécréter de grandes quantités de TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL-23. Cette cascade de cytokines/chimiokines va attirer de nombreux leucocytes circulants vers la muqueuse intestinale, provoquant la libération supplémentaire de cytokines/chimiokines attirant d'avantage de cellules inflammatoires, amplifiant et perpétuant par conséquent ce cercle vicieux. Ainsi, un déséquilibre de la balance immunologique s'installe en faveur de l'inflammation (Abraham and Cho 2007; Baumgart and Carding 2007).

5. Processus de réparation tissulaire

Le processus de réparation et de régénération tissulaire est un processus biologique fondamental et critique pour la survie des organismes vivants (Das, Sinha et al. 2015). Quand un tissu est endommagé suite à une infection ou une agression chimique ou physique, une réponse inflammatoire est mise en place en réponse aux PAMP et DAMP libérés par les organismes envahisseurs et/ou par les cellules mourantes, respectivement. La réponse

inflammatoire et la réparation tissulaire sont orchestrées par un réseau spatial et temporel de médiateurs moléculaires, caractérisé par le recrutement, la prolifération et l'activation d'une grande variété de cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques, notamment les neutrophiles, les macrophages, les ILC, les lymphocytes NK, les lymphocytes T et B, les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales, ainsi que les cellules souches. La coopération étroite entre ces différents partenaires va permettre la modulation optimale de la réparation tissulaire (Wynn 2008).

Quand la réparation tissulaire est bien modulée, suite à une réponse inflammatoire rapidement résolue, l'architecture normale du tissu est restaurée. Au contraire, si le processus de réparation tissulaire devient chronique ou dérégulé, il peut conduire au développement d'une fibrose pathologique avec une perte de l'architecture tissulaire pouvant altérer la fonction normal du tissu et entraîner finalement une défaillance voire la mort de l'organe affecté. Ainsi, le processus de réparation tissulaire doit être finement régulé (Wynn and Ramalingam 2012). Les facteurs de croissance et médiateurs solubles libérés lors des premiers instants de la résolution de l'inflammation provoquent des changements dynamiques qui impliquent la production d'autres médiateurs solubles, la production de la MEC et la migration et prolifération des cellules parenchymateuses et mésenchymateuses. Les événements cellulaires et biochimiques dans la réparation tissulaire peuvent être divisés en trois phases fondamentales qui se chevauchent au fil du temps, i) la phase inflammatoire, ii) la phase proliférative et enfin iii) la phase de remodelage (**Figure 13**).

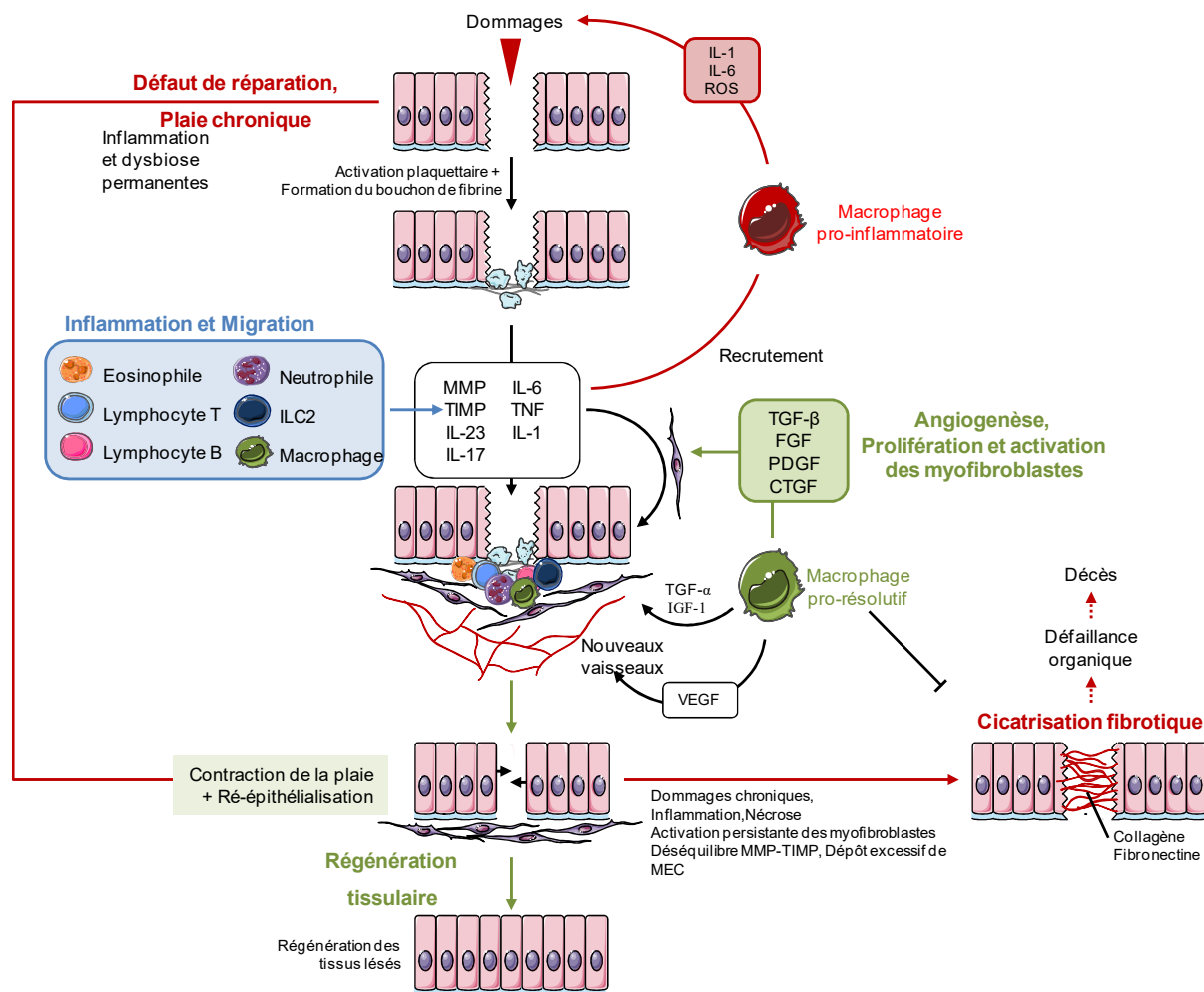


Figure 13 : Le processus de réparation tissulaire. La réparation des tissus est liée aux interactions entre les cellules immunitaires et d'autres types de cellules, comme les IEC, les cellules endothéliales et les fibroblastes. Après une agression, des cascades anti-fibrinolytique et de coagulation sont activées afin de former le caillot de fibrine. Cette étape est suivie d'une étape anti-inflammatoire mise en place grâce au recrutement des leucocytes tels que les monocytes inflammatoires ainsi que les macrophages résidents. Bien que le recrutement et l'activation rapide des macrophages inflammatoires jouent un rôle important dans la réparation des tissus, si ces macrophages inflammatoires ne sont pas rapidement contrôlés ou transformés vers un phénotype anti-inflammatoire ou réparateur, ils peuvent exacerber les lésions du tissu. Par la suite, les macrophages acquièrent un phénotype pro-résolutif qui supprime l'inflammation, élimine l'excès de collagène et des dépôts de fibrine et contribue à restaurer l'architecture des tissus d'origine. Toutefois, lorsque les lésions tissulaires deviennent chroniques, elles peuvent conduire à une défaillance organique et à la mort de l'organe. Par conséquent, le recrutement et l'activation des monocytes et des macrophages doivent être étroitement contrôlés suite à tout type de lésion tissulaire. D'après (Vannella and Wynn 2017).

5.1 Phase inflammatoire (0-48h)

Tout d'abord, les cellules endommagées répondent à l'agression en activant en quelques minutes plusieurs voies dites de « stress ». Les cellules lésées libèrent ainsi des DAMP et des molécules servant de repères d'activation et/ou de facteurs chimiotactiques pour d'autres cellules aux alentours de la blessure. L'une des premières réponses aux blessures découle des dommages causés aux vaisseaux sanguins locaux. Il est nécessaire d'arrêter immédiatement l'hémorragie locale, ce qui se traduit par l'activation et l'agrégation des thrombocytes et des

plaquettes, entraînant la formation d'un caillot de fibrine constitué d'un réseau de fibres de fibrine insolubles contribuant au maintien de l'intégrité du tissu blessé. Le réseau de fibrine, en plus de former une barrière contre l'invasion des microorganismes, organise une matrice temporaire nécessaire pour la fixation des facteurs de croissance et la migration des cellules parenchymateuses et mésenchymateuses vers la lésion (Martin 1997; Nurden, Nurden et al. 2008). Les plaquettes activées sont elles-mêmes une source importante de facteurs de croissance (Bahou and Gnatenko 2004). Ces différents facteurs sont bien connus pour promouvoir divers aspects du processus de réparation y compris l'angiogenèse et la migration des cellules épithéliales et des fibroblastes. En plus des facteurs de croissances dérivés des plaquettes, les cellules sont baignées dans d'autres facteurs sériques comme le TNF- α , l'IFN- γ et d'autres composants qui conduisent ensemble à l'induction du facteur de réponse au sérum (SRF). Le profil transcriptionnel des blessures *in vivo* (Roy, Khanna et al. 2008) et des fibroblastes exposés au sérum *in vitro* (Iyer, Eisen et al. 1999), révèle une réponse immédiate aux blessures où certains gènes sont sur ou sous régulés dans les premiers instants après l'agression. Cinq familles de gènes ont été établies selon leur activation après une lésion: les gènes d'activation très précoce (6 à 12h) modulant le métabolisme des purines; les gènes d'activation précoce (6-24h) qui codent des gènes qui régulent la voie d'interaction cytokine-cytokine récepteur; les gènes à activation précoce-intermédiaire et à activation intermédiaire (12h à 96h) qui comprennent les gènes codant pour la voie d'interaction leucocyte-endothélium et la voie de la phosphorylation oxydante respectivement et finalement, les gènes d'activation tardive (48-96h) qui sont liés aux gènes intervenant dans le cycle cellulaire (Feezor, Paddock et al. 2004; Roy, Khanna et al. 2008). D'autres signaux peuvent déclencher cette première étape de la réparation tissulaire *in vivo*, comme les signaux mécaniques de contraction qui se produisent en réponse à des changements de tension tissulaire (Kippenberger, Bernd et al. 2000). L'exposition à divers microorganismes due aux ruptures dans la barrière épithéliale intestinale entraîne l'activation des TLRs des cellules épithéliales, déclenchant l'expression et la libération de médiateurs pro-inflammatoires et de peptides antimicrobiens (Shaykhiev, Behr et al. 2008). Comme décrit précédemment, la réponse cellulaire au stade inflammatoire se caractérise par l'afflux de leucocytes dans la zone de la plaie. Ceci provoque une sécrétion de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires. Les cellules inflammatoires jouent un rôle important dans la cicatrisation des blessures et contribuent à la libération d'enzymes lysosomales et de ROS permettant le nettoyage des divers débris cellulaires (Medrado, Pugliese et al. 2003). Les neutrophiles recrutés lors de cette première étape influencent d'autres aspects de la réparation tissulaire, comme la

résolution du caillot de fibrine, la formation de la MEC provisoire, et interviennent également dans la promotion de l'angiogenèse et de la re-épithélialisation dans la deuxième phase du processus de réparation tissulaire (Theilgaard-Monch, Knudsen et al. 2004).

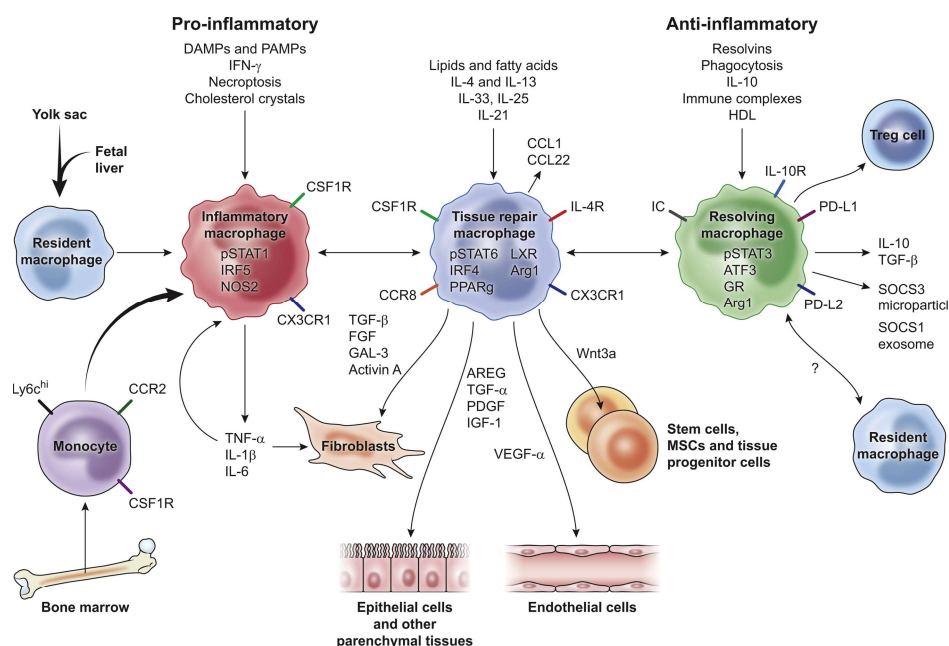


Figure 14 : Les différents profils des macrophages au cours du processus de réparation tissulaire, de régénération et de fibrose. Les macrophages produisent une grande variété de facteurs qui vont induire la prolifération, la différenciation et l'activation de fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales ainsi que les cellules souches facilitant ainsi la réparation tissulaire. Lors des dernières étapes du processus de réparation tissulaire, les macrophages acquièrent un phénotype pro-résolutif qui garantit que la réponse inflammatoire est supprimée et que l'architecture normale des tissus est restaurée (Wynn and Vannella 2016).

Les monocytes circulants ainsi que les macrophages résidents dans le tissu présentent un rôle important durant cette phase inflammatoire de la réparation tissulaire (**Figure 14**) (Wynn and Barron 2010). Les différentes populations de macrophages résidents installés dans les différents tissus sont pour la plupart des macrophages dérivés du sac vitellin lors de l'embryogenèse (Epelman, Lavine et al. 2014; Perdiguero, Klapproth et al. 2015). Ces macrophages résidents apportent des signaux trophiques importants contrôlant les tissus parenchymateux voisins dans un état d'homéostasie (Wynn, Chawla et al. 2013). Cependant, après une agression, un grand nombre des monocytes inflammatoires dits classiques sont attirés de la circulation vers la blessure et vont subir différentes reprogrammations selon leur environnement et leurs stimuli, donnant lieu à différentes sous-populations de macrophages. Les monocytes recrutés dépassent souvent la population de macrophages tissulaires et deviennent la principale source de phagocytes professionnels sur le site inflammatoire (Davies, Jenkins et al. 2013). Lors de l'étape finale de la phase inflammatoire, les monocytes et/ou macrophages présentant un phénotype principalement anti-inflammatoire deviennent la

population dominante (Ramachandran, Iredale et al. 2015). Ces macrophages répondent à l'IL-10 et à d'autres médiateurs inhibiteurs, sécrètent une variété de médiateurs anti-inflammatoires, tels que l'arginase1, l'IL-10 et le TGF β , et expriment des récepteurs de surface cellulaire qui jouent un rôle majeur dans la suppression du système immunitaire et la diminution de l'inflammation (Zigmond, Bernshtein et al. 2014). Bien que les premières recherches sur l'implication des macrophages dans la réparation tissulaire portent sur leur capacité à nettoyer une lésion tissulaire au cours de la phase inflammatoire, il est maintenant clair que les monocytes et les macrophages participent aussi à la réparation des tissus et aux mécanismes de fibrose et de régénération tissulaire (Wynn, Chawla et al. 2013). Par ailleurs, les macrophages sont une source très importante de chimiokines, de MMP, et d'autres médiateurs inflammatoires qui permettent de moduler les phases initiales de l'inflammation et de la réparation après une agression. En effet, si les macrophages sont éliminés artificiellement juste après une blessure, la réponse inflammatoire est souvent fortement diminuée (Duffield, Forbes et al. 2005). De plus, leur élimination peut ralentir la fermeture des lésions et conduire à une réparation et une régénération moins efficace (Zhang, Yao et al. 2012). Le rôle des macrophages lors de la réparation tissulaire sera décrit ultérieurement, notamment dans la phase proliférative de la réparation tissulaire.

5.2 Phase proliférative (2 à 10 jours)

La réponse inflammatoire met en place le cadre nécessaire à la production d'une nouvelle barrière fonctionnelle, produite lors de la phase proliférative. Au cours de cette phase, l'activité cellulaire prédomine. Les principales étapes sont la création d'une barrière de perméabilité (réépithélialisation), l'établissement d'un apport sanguin approprié (l'angiogenèse) et le renforcement du tissu blessé (la fibroplasie). Ces étapes sont régulées par divers facteurs de croissances, par des cytokines immunorégulatrices (Sturm and Dignass 2008; Krishnan, Arnone et al. 2011), ainsi que par la signalisation des TLR qui sont fortement impliqués dans la réparation tissulaire intestinales.

5.2.1 Etape de réépithélialisation

La réépithélialisation est le processus de restauration de l'épithélium après un dommage (**Figure 15a**). Il implique généralement une étape de migration (aussi connu sous le nom de restitution épithéliale), une étape de prolifération et une étape de différenciation du néo-épithélium pour l'acquisition d'un épithélium fonctionnelle. Ces trois étapes sont favorisées par des protéines régulatrices synthétisées pour la plupart par les IEC, comme par exemple les

chimiokines CXCR4 et CXCL12, les défensines, divers facteurs de croissance (TGF β , TGF- α , EGF, FGF), les cytokines IL-1 β , IL-10, IL-6 et IL-22, et les peptides *trefoils* (Dignass and Podolsky 1993; Becker, Fantini et al. 2004; Becker, Fantini et al. 2005; Moyer, Wendt et al. 2007; Sturm and Dignass 2008). Dans les 24h suivant une blessure de la muqueuse intestinale, les IEC adjacentes migrent rapidement dans la zone dénudée pour restaurer l'intégrité de la barrière dans une étape appelée restitution épithéliale (**Figure 15b**).

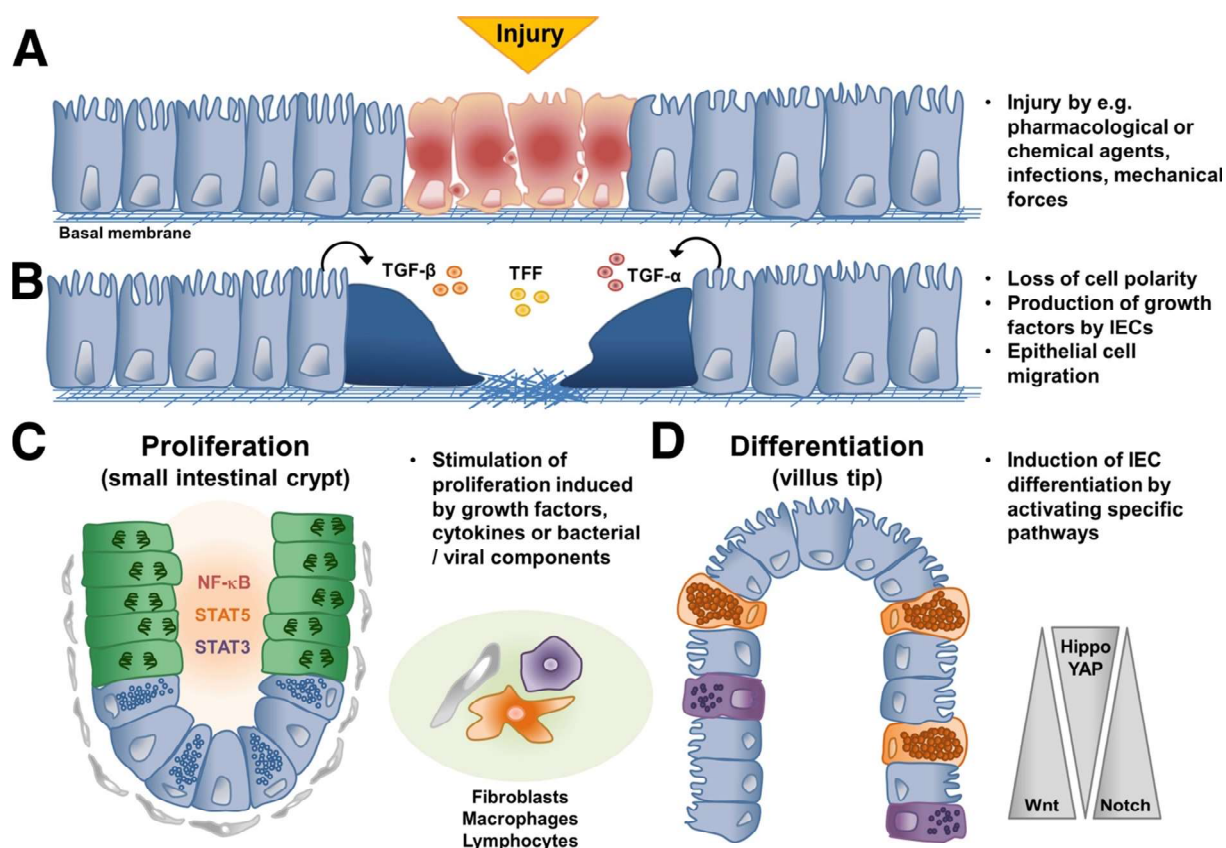


Figure 15 : Modèle représentatif des mécanismes impliqués dans la réparation de la muqueuse intestinale.

Quelques heures après la lésion épithéliale, les cellules épithéliales perdent leur polarité induite par la sécrétion de facteurs tels que le TGF β ou TGF- α , ainsi que le facteur *trefoil* (TFF). Cela induit la migration des cellules épithéliales pour fermer la blessure. Après plusieurs heures, les facteurs de croissance, les cytokines ou les composants bactériens/ viraux induisent la prolifération des IEC dans la crypte intestinale. Dans une phase ultérieure, les IEC se différencient en IEC spécialisées (Martini, Krug et al. 2017).

Plusieurs acteurs vont contribuer à la migration des IEC, comme la MEC provisoire, les intégrines, divers facteurs de croissance et des enzymes matricielles. La migration des IEC vers la blessure a besoin d'un remodelage dynamique et coordonné des protéines d'adhésions entre les cellules et entre les cellules et la MEC. A la surface des IEC se trouvent les intégrines β 1 transmembranaires qui vont moduler l'interaction entre la cellule et la fibronectine de la MEC, induisant des voies de signalisation qui vont permettre la réorganisation et la polarisation du cytosquelette nécessaire pour guider le mouvement des

cellules épithéliales de la MEC vers la blessure. D'autres molécules peuvent influencer cette migration, comme la plasmine et les MMP. La plasmine est dérivée du plasminogène activé dans le caillot de fibrine dans le site de lésion. L'importance du plasminogène lors de la réépithélialisation est essentielle car des souris dépourvues du gène du plasminogène montrent une défaillance de la réparation tissulaire (Green, Almholt et al. 2008). Une des sources principales des MMP sont les macrophages réparateurs (Fallowfield, Mizuno et al. 2007; Pellicoro, Aucott et al. 2012). Comme décrit préalablement les macrophages tissulaires sont une des cellules clés dans le processus réparateur. Ces macrophages se caractérisent notamment, par production de nombreux facteurs de croissance qui favorisent la migration, la prolifération cellulaire et le développement des vaisseaux sanguins, contribuant ensemble à atténuer l'hypoxie locale qui se développe suite à une blessure (Willenborg, Lucas et al. 2012). Ils produisent également des médiateurs solubles qui stimulent les fibroblastes tissulaires locaux et recrutés pour se différencier en myofibroblastes facilitant la contraction et la fermeture de la blessure, ainsi que la synthèse de composants et molécules participant à la remodelation de la MEC comme les MMP (Murray and Wynn 2011). La prolifération et l'expansion des cellules parenchymateuses et stromales voisines sont également modulées par les macrophages, et si la blessure est sévère, les macrophages peuvent activer des cellules souches locales qui participent à la réparation. En effet, ces macrophages peuvent être à l'origine de la synthèse du TGF β et du FGF-2 qui vont activer l'expression des MMP comme les MMP-2 et MMP-9. Ces MMP vont dégrader par la suite le collagène dans la matrice et la lame basale, favorisant ainsi la migration cellulaire (Kalluri and Neilson 2003). Enfin, il a été décrit que l'immunité innée contrôle la restitution épithéliale grâce à la reconnaissance des PAMP par les TLR (Sturm and Dignass 2008). La modulation de la réparation muqueuse par des produits bactériens ou par des microorganismes vivants (probiotiques) apparaît ainsi comme une nouvelle approche thérapeutique contre la colite (Rachmilewitz, Katakura et al. 2004; Lee, Mo et al. 2007; Neurath and Travis 2012). Bien que les lésions de petites tailles de la muqueuse puissent être restaurées de manière efficace par la migration des cellules épithéliales et la contraction du cytosquelette d'actine-myosine, une prolifération épithéliale supplémentaire est nécessaire pour la fermeture des blessures d'une plus grande taille (van der Flier and Clevers 2009). Contrairement aux cellules souches épidermiques, les cellules souches intestinales ne migrent pas directement vers la blessure. Tout d'abord, les IEC vont perdre leur polarisation cryptique et seulement après vont migrer vers la blessure (**Figure 15c**) (Sturm and Dignass 2008). La régénération tissulaire nécessite donc une organisation adéquate des cellules souches pour un rétablissement efficace de l'homéostasie des

muqueuses (Martini, Krug et al. 2017). Ainsi, la cicatrisation de la muqueuse apparaît comme un processus finement régulé et hautement structuré. Les facteurs de croissances TGF- α/β et EGF sont les inducteurs majeurs de la prolifération des cellules souches intestinales (Leydon, Imaizumi et al. 2014). Cependant d'autres facteurs de croissance comme le FGF, IGF et HGF (Beck, Rosenberg et al. 2003; Sturm and Dignass 2008), et les cytokines IL-6, IL-10 et IL-22 (Zindl, Lai et al. 2013; Choi, Kim et al. 2015; Leoni, Neumann et al. 2015) induisent également une activation de la prolifération cellulaire. Par ailleurs, la prolifération constante des cellules souches à la base des cryptes intestinales fournit une force stérique qui contribue à la migration des cellules jusqu'à l'axe de la villosité (Martini, Krug et al. 2017). Lors de cette migration vers le haut de la crypte, les cellules commencent à se différencier (**Figure 15d**), soit en cellules de type sécrétoire (cellules de Paneth, cellules caliciformes et cellules entéro-endocrines), soit en cellules absorbantes (entérocytes) (Noah, Donahue et al. 2011).

5.2.1 Etape d'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus finement coordonné et correspond au développement de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants adjacents à la blessure. Dans la plupart des tissus adultes, le système vasculaire sanguin est quiescent. En réponse à une agression, les cellules endothéliales initient un processus angiogénique qui se caractérise par l'activation des cellules endothéliales (Kalebic, Garbisa et al. 1983), la dégradation locale de leur membrane basale ainsi que la croissance vers le caillot de fibrine (Folkman 1982), une étape de prolifération cellulaire et de formation de structures tubulaires (Form, Pratt et al. 1986; Carmeliet 2003), la reconstruction de la membrane basale (Feng, Clark et al. 1999), et éventuellement la régression et involution des vaisseaux nouvellement formés pour donner place au remodelage du nouveau tissu formé (Marx, Perlmutter et al. 1994; Alkim, Alkim et al. 2015). Plusieurs facteurs de croissance libérés par les macrophages existants dans l'environnement de la blessure jouent un rôle critique dans l'angiogenèse comme le VEGF (Berse, Brown et al. 1992), le TGF β (Rappolee, Mark et al. 1988; Akhurst and Hata 2012) et le FGF (Chujo, Shirasaki et al. 2009). Le VEGF, connu sous le nom de facteur de perméabilité vasculaire est aussi un mitogène très puissant qui induit la migration et la formation de prolongements dans les cellules endothéliales grâce à la modulation de l'expression des divers récepteurs aux intégrines. Il agit également comme un facteur de survie pour l'endothélium (Senger, Claffey et al. 1997).

5.2.2 Fibroplasie

La fibroplasie est un processus d'activation des fibroblastes afin de contribuer à la formation du tissu de granulation. Dans des conditions d'homéostasie, les myofibroblastes existent comme des fibroblastes "inactifs", dont le rôle principal est de maintenir la formation de la MEC, grâce à la synthèse des protéines de cette matrice et des MMP (Darby and Hewitson 2007). Après un dommage dans la muqueuse intestinale, et sous l'influence de cytokines telles que le TGF β , les fibroblastes se différencient en leur forme activée grâce à la synthèse de α -SMA (*α -Smooth Muscle Actine*), et produisent de plus grandes quantités de cytokines et de protéines matricielles pour accélérer la fermeture de la plaie (Tomasek, Gabbiani et al. 2002). De plus, les chimiokines ainsi que les divers facteurs de croissance libérés par les plaquettes et les cellules épithéliales/endothéliales endommagées vont participer au recrutement et à la stimulation des fibroblastes du tissu intact pour envahir la matrice provisoire. C'est à ce stade que les fibroblastes commencent à produire de la fibronectine, ce qui entraîne la formation du tissu de granulation (Hinz 2010). La α -SMA nouvellement formée est incorporée dans les fibres de stress, ce qui les rend plus étendues leur confère une force contractile plus grande. La contraction générée par les fibres de stress dans les myofibroblastes est la force nécessaire pour la fermeture de la blessure, et c'est pour cette raison que les myofibroblastes sont connus comme les cellules effectrices de la réparation tissulaire. Une fois activés, ces myofibroblastes sont eux-mêmes capables de libérer du TGF β (Dabiri, Campaner et al. 2006). Le TGF β joue ainsi un rôle majeur dans l'activation de l'expression de protéines matricielles telles que le collagène et la fibronectine. De plus, les myofibroblastes peuvent favoriser la réparation tissulaire par l'interactions avec d'autres cellules présentes sur le site de la lésion (Werner, Krieg et al. 2007). A la fin du processus de réparation tissulaire, lorsque la structure originale de la MEC est rétablie et que le stimulus activateur est atténué, les myofibroblastes doivent être éliminés afin d'éviter une sur-activation et un processus de fibrose. Trois processus différents peuvent permettre l'élimination des myofibroblastes : l'apoptose (Driesen, Nagaraju et al. 2014), la différenciation réversible (Pohlers, Brenmoehl et al. 2009), et plus récemment décrite, la sénescence (Glasser, Hagood et al. 2016). Cependant, dans un processus de réparation chronique due à une inflammation chronique ou à une agression récurrente, des myofibroblastes actifs vont persister dans le tissu, entraînant une sécrétion continue des constituants de la MEC, et donc une irrégularité de l'architecture tissulaire et du développement des cicatrices. Une défaillance dans la phase de remodelage du tissu affecté

entraîne une incapacité à rétablir la fonction normale de l'organe pouvant amener dans le pire des cas à la mort de l'organe.

5.3 Phase de remodelage (semaines-mois)

La troisième phase de la réparation tissulaire correspond à la re-modélisation du tissu, qui commence deux à trois semaines après le début de l'agression et qui peut durer jusqu'à un an voire plus (Li, Chen et al. 2007). L'objectif principal de la phase de remodelage est d'obtenir une matrice cellulaire basale résistante et définitive, grâce à la réorganisation, la dégradation et la synthèse de la MEC transitoire pour la récupération de la structure normal du tissu (Midwood, Williams et al. 2004). Pour ce faire, le tissu de granulation est progressivement remodelé, formant un tissu cicatriciel qui est moins cellulaire et vasculaire et qui présente une augmentation progressive de la concentration des fibres de collagène de type I et une diminution du collagène de type III (Welch, Odland et al. 1990; Midwood, Williams et al. 2004). Cette étape est marquée par des changements dans la composition de la MEC et la résolution de l'inflammation qui est essentielle pour la restauration de la fonctionnalité et l'apparence « normale » du tissu blessé (Gurtner, Werner et al. 2008). En effet, au cours de la résolution de l'inflammation, il y a une libération de molécules pro-résolutives comme l'IL-10 et le TGF β . La modulation de l'expression et de la synthèse du collagène est contrôlée par un large nombre de facteurs de croissance, et notamment le TGF β (Shah, Foreman et al. 1995). Au cours de ce processus de maturation et de remodelage, la majorité des vaisseaux sanguins, des fibroblastes et des cellules inflammatoires disparaissent de la zone endommagée grâce à l'émigration des cellules ou à l'induction d'apoptose (Greenhalgh 1998). L'échec de la réparation tissulaire dans une blessure chronique a été attribué en partie à la dérégulation des MMP et de leurs inhibiteurs TIMP (*Tissue inhibitor of metalloproteinases*) (Eming, Martin et al. 2014). Une augmentation de l'activité des MMP telles que la collagénase et les gélatinases A et B a été observé dans les blessures chroniques de la peau par rapport aux blessures aiguës (Yager, Zhang et al. 1996). L'augmentation d'activité des MMP interfère dans l'adhésion des cellules épithéliales à la membrane basale ainsi qu'à la MEC, et est également associée à la dégradation de facteurs de croissance et d'autres peptides impliqués dans la réparation tissulaire (Lauer, Sollberg et al. 2000). Ceci donne lieu à des lésions tissulaires à médiation immunitaire telle que celles observées dans les MICI (Castaneda, Walia et al. 2005; Nava, Kamekura et al. 2013).

De possibles perturbations dans les différentes étapes de ce processus peuvent conduire à une réparation aberrante, de sorte que la production incontrôlée de médiateurs inflammatoires et de facteurs de croissance, ou des défaillances dans la génération des macrophages inhibiteurs peuvent contribuer au développement de blessures chroniques, pouvant finalement contribuer à la formation d'une fibrose pathologique.

6. Mécanismes de résolution de l'inflammation impliqués dans les MICI

6.1 Généralités

Les travaux de Serhan de ces dernières années ont permis de mettre en évidence que la résolution de l'inflammation est un processus multi-étapes qui nécessite la production et la régulation fine de plusieurs médiateurs et facteurs pro-résolutifs (Buckley, Gilroy et al. 2014). Parmi eux figurent des protéines et des peptides (par exemple, l'annexine A1, plusieurs cytokines anti-inflammatoires et des facteurs de croissance spécifiques), des petits molécules (comme l'adénosine et le monoxyde de carbone) et des médiateurs lipidiques (comme les résolvines, les protectines, les maresines et les lipoxines). Les cytokines et les facteurs de croissance contribuent à la résolution active de l'inflammation soit directement, soit par l'induction de médiateurs lipidiques. Parmi les cytokines qui limitent l'inflammation, on retrouve l'IL-10 et l'IL-22. Ainsi, les mutations génétiques du récepteur à l'IL-10 favorisent une MC précoce avec une atteinte périanale sévère (Glocker, Kotlarz et al. 2009). L'IL-22, une autre cytokine de la famille de l'IL-10, est principalement produite par les cellules immunitaires innées et adaptatives. Elle contribue à la restauration de l'épithélium et de la fonction de la barrière intestinale (Zindl, Lai et al. 2013) *via* des voies prolifératives et anti-apoptotiques (Sabat, Ouyang et al. 2014). L'intérêt clinique de cette cytokine est encore en cours d'étude. La restauration épithéliale est également induite par des facteurs de croissance tels que les facteurs de croissance épidermique (EGF) et le GM-CSF, entre autres. L'EGF, en plus de stimuler la prolifération et la migration des cellules épithéliales, induit aussi la production de mucine et le transport d'ions associés à une amélioration de la fonction de la barrière intestinale (McCole, Rogler et al. 2005; Wang, Cao et al. 2014). L'EGF a été testé avec succès pour le traitement de la RCH (Farrell 2003), mais le développement clinique a finalement été stoppé à cause du risque potentiel de prolifération épithéliale accrue et de développement ultérieur de cancers colorectaux. Le GM-CSF est connu pour être essentiel à la maturation des cellules myéloïdes et à la différenciation des cellules dendritiques (Egea, Hirata et al. 2010). Il joue également un rôle important dans la pathogenèse des maladies

auto-immunes. Des essais cliniques ont indiqué que l'administration de GM-CSF entraîne amélioration clinique chez les patients atteints de MC (Dieckgraefe and Korzenik 2002). Cependant, les résultats d'une vaste étude rétrospective n'ont montré aucun effet bénéfique de l'administration de GM-CSF et son développement clinique ultérieur a été suspendu (Korzenik, Dieckgraefe et al. 2005)

6.2 Neutrophiles et résolution de l'inflammation dans les MICI.

L'apoptose des neutrophiles est essentielle à la résolution et à l'inhibition de l'inflammation et ce processus semble être altéré dans les MICI. En effet, divers études chez des patients atteints de MICI ont montré que les neutrophiles présentent une fonction altérée et constituent un des acteurs majeurs de l'induction des dommages tissulaires observées lors de l'inflammation intestinale, *via* la production de médiateurs inflammatoires non spécifiques, y compris des espèces réactives de l'oxygène, des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires et des protéases (comme la cathepsine) (Menzel, Hausmann et al. 2006; Fournier and Parkos 2012). La sévérité des dommages tissulaires induits par les neutrophiles semble découler d'un défaut d'apoptose et d'efferocytose (**Figure 16**), favorisant l'allongement de la durée de vie des neutrophiles (Fournier and Parkos 2012). Notamment, cette altération du processus apoptotique est associée en partie à une sur-activation de la voie anti-apoptotique NF- κ B dans ces cellules. Parmi les facteurs qui retardent l'apoptose dans l'intestin figurent le LPS bactérien, l'IL-1, l'IL-8, l'IFN γ et le GM-CSF (Fournier and Parkos 2012).

Par ailleurs, les neutrophiles des patients atteints de MC présentent un défaut de migration par rapport aux individus sains. Cette migration réduite est associée à une diminution de la sécrétion d'IL-8. Une réduction du recrutement des neutrophiles est non seulement associée à une capacité réduite à éliminer les bactéries envahissantes, mais aussi à une diminution des processus de résolution de l'inflammation, laissant la voie libre aux autres types de cellules pro-inflammatoires induisant ainsi une inflammation chronique. En effet, une importante concentration de LPS bactérienne a été quantifiée dans le sang et dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MC (Kosovac, Brenmoehl et al. 2010) les réponses immunitaires innées sont altérées dans les MICI, et en particulière dans la MC. Notamment la mutation de NOD2 induit une perte de différentes fonctions de la cellule qui est associée à un risque élevé de développer une inflammation chronique de l'intestin (Hugot 2006) ce qui indique qu'un défaut dans les réponses appropriées, plutôt qu'une sur activation du système immunitaire inné intestinal pourrait être à l'origine de la MC.

6.3 Macrophages résolution de l'inflammation dans les MICI

Les monocytes et les macrophages sont des composants importants du système immunitaire inné et de la physiopathologie des MICI. Les macrophages tissulaires jouent un rôle important dans la résolution de l'inflammation intestinale. Une de leurs fonctions principales dans le MICI est la phagocytose des bactéries, des composants de la paroi bactérienne et des cellules apoptotiques (comme les neutrophiles)(Chazaud 2014). La plupart des macrophages tissulaires présents dans la muqueuse inflammatoire intestinale présentent un profil M1 avec des propriétés inflammatoire que diffère des macrophages de la muqueuse intestinal des individus saines qui présentent plutôt un profil M2 pro-résolutive et anti-inflammatoire (**Figure 16**) (Zhu, Yu et al. 2014). De plus, les macrophages intestinaux de personnes saines ont une faible expression de molécules de co-stimulation telle que CD80, CD86 ou des récepteurs comme le TLR2 ou 4 (Hausmann, Kiessling et al. 2002) rendant improbable que ces macrophages induisent des réponses T altérées à l'origine d'une inflammation chronique. De même, la différenciation des monocytes envahissant la muqueuse intestinale en macrophages intestinaux avec un profil M2 peut être inhibée par des facteurs comme MCP-1 au cours d'une inflammation aiguë, ce qui peut entraîner une altération de la résolution de l'inflammation (Spoettl, Hausmann et al. 2006). On a déjà décrit que les médiateurs lipidiques pro-résolutifs (comme la résolvine) ainsi que des cytokines pro-résolutives comme le TGFβ et l'IL-10 sont connus pour être impliqués dans la résolution de l'inflammation grâce à la modulation de la différenciation des macrophages pro-inflammatoires vers un profil M2 pro-résolutif (**Figure 16**), mettant ainsi en évidence que ces cellules peuvent être un bonne cible pour le développement thérapeutique des nouveaux médicaments afin de mettre en place des voies pro-résolutives dans un contexte inflammatoire (Titos, Rius et al. 2011).

6.4 Barrière intestinal épithélial et résolution de l'inflammation dans les MICI

Une altération de la barrière intestinale permettant le passage de bactéries et d'antigènes bactériens pouvant contribuer à une résolution de l'inflammation incomplète pouvant être à l'origine des MICI (**Figure 16**) (Lissner, Schumann et al. 2015). Des études cliniques ont montré que la restauration de la barrière muqueuse est associée à une cicatrisation muqueuse visible par endoscopique qui prédit une rémission à long terme et l'absence d'inflammation aiguë ou chronique chez les patients atteints de MICI (Rogler, Vavricka et al. 2013). La fonction de la barrière intestinale se réfère non seulement à la barrière physique maintenue par des jonctions serrées entre les cellules épithéliales, mais aussi aux protéines antimicrobiennes et les mucines synthétisées par les cellules de Paneth et cellules caliciformes respectivement

et qui vont empêcher entre autres l'invasion bactérienne (Pinto and Clevers 2005; Wehkamp, Koslowski et al. 2008). Ainsi une restauration rapide de la barrière épithéliale intestinale contribue également à la résolution de l'inflammation en raison d'une fermeture rapide de la barrière intestinale superficielles qui pourrait autrement permet l'entrée des bactéries. Des différents essais cliniques suggèrent que l'EGF (**Figure 16**) (Farrell 2003) chez l'homme et le HGF chez le rat, induisent une amélioration de la réparation des muqueuses. Ces données mettent en évidence que l'amélioration de la fonction de la barrière de la muqueuse à différents niveau (contact cellulaire, réparation épithéliale, mucus, défensines) contribue à la résolution de l'inflammation dans les MICI (**Figure 16**).

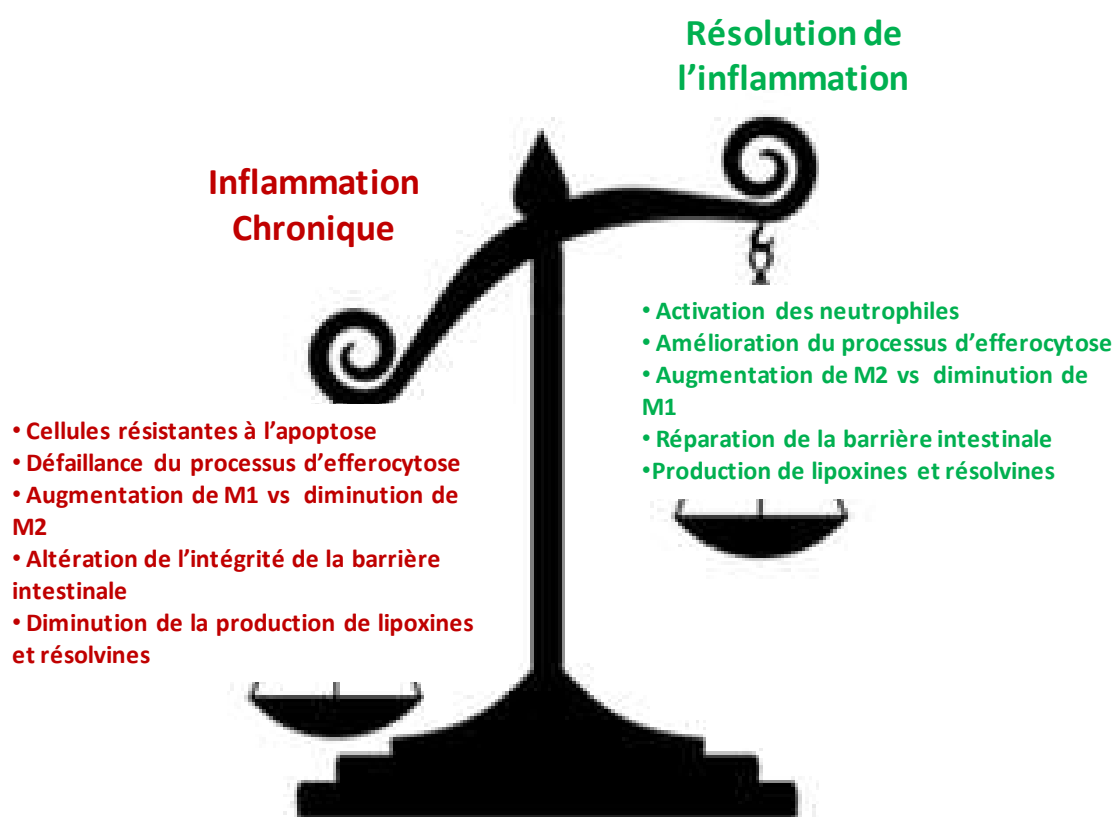


Figure 16 : Equilibre entre les mécanismes pro-inflammatoires et pro-résolutifs La plupart de ces voies impliquent le système immunitaire inné. Modifié d'après (Rogler 2017).

7. Traitements des MICI

Une personne atteinte de MICI doit suivre un traitement à vie et faire l'objet d'un suivi médical pour empêcher l'aggravation de la maladie, voire la diminuer. L'objectif principal des traitements actuels est d'éviter la destruction du tissu intestinal, arrêter le processus de la maladie et/ou l'inflammation et de favoriser la régénération de la muqueuse intestinale. Cette réparation tissulaire est un facteur prédictif d'une rémission à long terme de la maladie et d'un

faible risque de chirurgie chez les patients atteints de MICI (Peyrin-Biroulet, Ferrante et al. 2011; Colombel, Louis et al. 2012; Neurath and Travis 2012; Sandborn, Hanauer et al. 2014). Diverses études randomisées ont montré que la réparation tissulaire est possible seulement avec une petite partie de l'arsenal thérapeutique actuel, et qu'il existe d'importantes différences entre la MC et la RCH dans l'effet de ces différents médicaments sur la cicatrisation (Neurath 2014).

7.1 Traitements conventionnels actuels

Quatre classes médicamenteuses sont actuellement utilisées dans le traitement des MICI : les salicylés (5-ASA), les corticoïdes, les immunomodulateurs (thiopurine, méthotrexate, cyclosporine) et les biothérapies (anticorps [Ac]anti-TNF α et anti-intégrine $\alpha 4\beta 7$) (**Figure 17**).

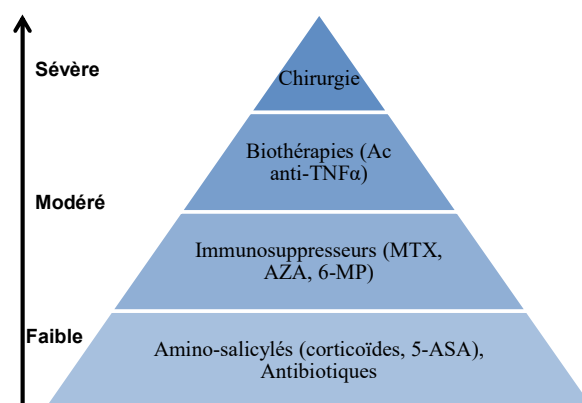


Figure 17 : Principaux traitements conventionnels actuels des MICI, en fonction de leur sévérité. Les traitements de base en cas d'une symptomatologie faible sont les amino-salicylés ainsi que les antibiotiques. Dans le cadre d'une sévérité moyenne les immunosuppresseurs sont les traitements les plus utilisés. Pour les maladies très sévères et difficiles à traiter les biothérapies sont actuellement à la pointe de l'arsenal thérapeutique de MICI. En cas d'échec thérapeutique total les patients suivront en dernier recours une intervention chirurgicale. MTX : méthotrexate ; 5ASA : acide 5 amino salicylique ; AZA : azathioprine ; Ac : anticorps ; 6-MP : 6-Mercaptopurine ; anti-TNF α : anti-tumor necrosis factor alpha.

7.1.1 Les salicylés et corticoïdes

Alors que les corticostéroïdes et le 5-ASA favorisent la cicatrisation de la muqueuse dans la RCH, ils n'ont aucun effet cicatrisant dans la MC. Le 5-ASA est utilisé comme première ligne thérapeutique pour la prise en charge des RCH faibles et/ou modérées, avec un taux de réponse entre 60 et 80%. Le 5-ASA présente des propriétés anti-inflammatoires conduisant notamment à l'inhibition des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires (prostaglandines et leucotriènes) ainsi que du facteur de transcription nucléaire NF κ B. L'utilisation de 5-ASA est restreinte en raison de ses nombreux effets secondaires telles que la fièvre, les nausées, la

céphalée, les réactions allergiques, la thrombopénie, la leucopénie, ou encore la toxicité hépatique, pancréatique et rénale (Curkovic, Egbring et al. 2013).

Les corticoïdes quant à eux représentent un traitement très efficace contre les poussées de RCH ou de MC. Ils permettent une régression rapide des symptômes dans 60 à 90% des cas selon la posologie. Cependant, ils ne peuvent être maintenus à dose élevée que sur des périodes assez courtes en raison de leurs effets indésirables. De plus, lors que les doses sont diminuées, certains patients rechutent (on dit qu'ils sont cortico-dépendants). Parmi les effets secondaires les plus décrits, on retrouve les infections évolutives sévères, le glaucome et la cataracte, ainsi que certaines maladies psychiatriques (GETAID 2011). Il est donc nécessaire de limiter la durée de ce traitement

7.1.2 Les immunosuppresseurs: azathioprine, méthotrexate et cyclosporine.

Les traitements immunosuppresseurs ont un nombre considérable d'effets secondaires graves. C'est pour cette raison que leur utilisation est réservée aux formes de la maladie les plus évolutives et les plus difficiles à traiter, comme les patients cortico-résistants ou cortico-dépendants. Leur activité immunosuppressive repose sur une inhibition de la prolifération et de l'activation des lymphocytes T (Pithadia and Jain 2011). Depuis les années 2000, l'azathioprine est largement et plus précocement prescrite après le diagnostic de la MC ou de la RCH car elle permettrait d'en ralentir l'évolution. Une réponse complète (rémission sans corticoïdes) ou incomplète (rémission avec une dose de corticoïdes plus faible que la dose de cortico-dépendance initiale) est obtenue dans 40 à 70% des cas. Quant au méthotrexate (MTX), il est utilisé principalement pour traiter la MC. Une réponse complète (rémission sans corticoïdes) est obtenue dans 40% des cas. La réponse à ce médicament est souvent assez lente et ne convient pas pour résoudre une situation urgente. Enfin, la cyclosporine est prescrite dans les cas de poussées sévères de RCH, et plus rarement dans les MC. Le traitement nécessite une prise régulière et une surveillance très précise. L'efficacité de la cyclosporine dans la RCH est voisine de 70 à 80% (GETAID 2011). Parmi les effets secondaires les plus graves rencontrés, on retrouve les maladies lymphoprolifératives (lymphome non hodgkinien), avec un risque de 4 à 5 fois plus élevé par rapport aux patients atteints de MICI non exposés aux immunosuppresseurs (Beaugerie, Brousse et al. 2009).

7.1.3 Les biothérapies

Les biothérapies ont été une révolution thérapeutique pour les patients présentant une maladie sévère ou réfractaire aux traitements dits conventionnels. Les biothérapies représentent la

thérapie clinique ayant le plus grand succès dans le traitement des MICI à ce jour, en induisant des taux élevés de guérison intestinale et une amélioration à long terme de la MC ainsi que de la RCH.

L'anticorps anti-TNF- α inhibe directement la cytokine TNF- α qui est connue pour être produite par les cellules inflammatoires de l'organisme lors d'une inflammation en réponse à une infection. Après injection, les anticorps anti-TNF- α restent dans l'organisme pendant 2 à 3 mois avant d'être détruits (GETAID 2014). La famille des anticorps anti-TNF- α comprend l'infliximab (Rémicade[®]), l'adalimumab (Humira[®]) et le golimumab (Simponi[®]).

L'anticorps anti- $\alpha 4\beta 7$, ou vedolizumab (Entyvio[®]), agit en bloquant l'intégrine $\alpha 4\beta 7$. En condition normale, cette intégrine permet aux lymphocytes d'être dirigés spécifiquement vers l'intestin, afin de participer aux défenses naturelles de l'organisme. Au cours de la MC et de la RCH, le recrutement de ces cellules est anormalement élevé, ce qui amplifie et perpétue l'inflammation intestinale. Cet anticorps anti- $\alpha 4\beta 7$ une fois injecté va aussi rester dans l'organisme pendant 3 ou 4 mois avant d'être détruit (GETAID 2014).

Récemment un anticorps qui bloque les cytokines IL-12/IL-23, a été mis sur le marché. Ustekinumab (Stelara[®]) est un anticorps monoclonal qui va lier la sous unité p40 présente sur ces deux cytokines, bloquant à la fois l'effet de ces deux cytokines. En bloquant leur activité, l'ustekinumab réduit l'activité du système immunitaire et les symptômes de la maladie. Depuis 2016 ce nouvel anticorps a obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour traiter la maladie de Crohn chez les patients en échec thérapeutique des anti-TNF (GETAID 2016).

Par ailleurs, divers études sur le ciblage de l'IL-17 (secukinumab) ou de son récepteur (brodalumab) (Targan, Feagan et al. 2016) n'a pas été satisfaisant (Verstockt, Van Assche et al. 2017). Les résultats suggèrent que peut-être toute la population Th17 devrait être ciblée, plutôt qu'une seule de ses cytokines effectrices, bien que beaucoup de cellules et de cytokines de l'axe IL-23/IL-17 semblent avoir des effets inflammatoires comme anti-inflammatoires, selon leur environnement. Cette interaction complexe implique une recherche clinique plus poussée.

Néanmoins, ces biothérapies présentent parfois de nombreux effets indésirables comme l'augmentation d'infections opportunistes sévères et de cancers à long terme, limitant parfois leur utilisation (Colombel, Loftus et al. 2004). L'arsenal thérapeutique reste donc limité. En effet, la moitié des patients atteints de la MC sont encore opérés d'une résection intestinale

dans les 10 premières années après le diagnostique de la maladie (Buisson, Chevaux et al. 2012), et 20% des patients atteints de RCH subissent une colectomie au cours de leur vie (Solberg, Lygren et al. 2009).

7.2 Thérapies innovantes et pro-résolutives

Au cours de la dernière décennie, un nouveau paradigme dans la compréhension du processus inflammatoire a émergé avec une étude et une appréciation plus approfondies des mécanismes génétiques, moléculaires et cellulaires engagés pour résoudre activement l'inflammation. Contrairement aux thérapies conventionnelles qui essaient de supprimer l'initiation et/ou la progression de l'inflammation mais avec des effets collatéraux, les thérapies pro-résolutives envisagent d'améliorer l'élimination des stimuli à l'origine de l'inflammation, et d'orchestrer les différentes voies impliquées dans le processus de résolution de l'inflammation. Ces thérapies ont pour but de mettre fin au processus inflammatoire, d'initier la réparation tissulaire et de favoriser le retour à l'homéostasie. Ainsi, les médicaments pro-résolutifs sont en plein développement, et notamment les thérapies cellulaires ainsi que, très récemment, les thérapies basées sur la modulation des lipides pro-résolutifs, qui ont pour but de rétablir un système immunitaire intact et une réponse tolérogénique à long terme (Nagaishi, Arimura et al. 2015).

En ce qui concerne la modulation des lipides pro-résolutifs, à l'heure actuelle, l'application thérapeutique des SPM n'a été étudiée que dans les cas de maladies parodontales et de greffe de cornée. Dans ce contexte, la société *Resolvyx Pharmaceuticals, Inc.* développe diverses molécules qui miment des SMP pour traiter une gamme variée de maladies inflammatoires. Cette société propose par exemple le RX-10001, un analogue lipidique qui semble protéger les tissus sains lors d'une réponse inflammatoire après une agression, puis de favoriser la résolution de l'inflammation (de Paiva, Schwartz et al. 2012).

Récemment, l'équipe de Monteleone a développé une nouvelle stratégie thérapeutique qui cible les modulateurs en amont de la signalisation du TGF β pour traiter les MICI. Il a été montré dans les MICI, une diminution de l'activité du TGF β , en raison de l'augmentation du taux de SMAD7, un inhibiteur des voies de signalisation habituelles du TGF β . Le mongersen est un oligonucléotide simple brin qui s'hybride avec l'ARN messager du SMAD7 humain et provoque sa dégradation. Dans un essai multicentrique de phase 2, mené en double aveugle contre placebo, les patients ayant reçu la dose la plus élevée de mongersen présentent une rémission clinique significative encore à J28 par rapport à celui des malades sous placebo. De

plus cette approche présente une très bonne tolérance avec des symptômes et complications associés pour la plus part à la MC (Monteleone, Neurath et al. 2015).

Depuis les années 1990, la greffe des cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou mésenchymateuses (CSM) est évaluée dans le traitement des MICI. A ce jour, environ 28 essais cliniques (phases I à III) sont en cours, incluant des thérapies cellulaires concernant la MC luminale et la RCH. Parmi les études les plus récemment publiées ont retrouvés les approches « Ovasave », développée par la société TxCell (lymphocytes Tr1 autologues) (Desreumaux, Foussat et al. 2012), « Prochymal » de chez Osiris (CSM) (Kurtzberg, Prockop et al. 2014) et « PDA-001 » de chez Celgene Cellular Therapeutics (cellules souches dérivées du placenta) (Mayer, Pandak et al. 2013). Ces premiers essais cliniques montrent pour le moment une bonne tolérance de ces produits.

Au niveau expérimental, l'injection de lymphocytes Treg a montré un effet thérapeutique dans un modèle préclinique de colite (Karlsson, Martinez et al. 2013). Par ailleurs, d'autres études ont suggéré l'intérêt d'une thérapie par cellules dendritiques tolérogènes dans la prévention et la réduction des symptômes digestifs dans des modèles précliniques de colites (Cabezon and Benitez-Ribas 2013). Enfin, les propriétés immuno modulatrices des cellules apoptotiques ont également été utilisées comme produit de thérapie cellulaire dans le contrôle de l'inflammation et la réparation tissulaire. En effet, il a été montré que la mort cellulaire par apoptose, ainsi que leur élimination par des phagocytes professionnelles ou non professionnelles (**Figure 18**), auraient un rôle très important dans la promotion de la réparation tissulaire et l'immunomodulation (Li, Huang et al. 2010; Lee, Penberthy et al. 2016). Parmi les différentes thérapies cellulaires existantes, l'administration des cellules apoptotiques a démontré une efficacité dans le contrôle des maladies inflammatoires chroniques, en diminuant l'état pro-inflammatoire et en rétablissant la tolérance aux auto-antigènes par inhibition des réponses T ou B pathogéniques en induisant des lymphocytes T régulateur (Saas, Kaminski et al. 2013; Poon, Lucas et al. 2014; Saas, Daguindau et al. 2016). Un essai clinique dans la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte après allogreffe de cellules hématopoïétiques a montré l'efficacité et la tolérance de cette approche (Mevorach, Zuckerman et al. 2014). D'ailleurs la maladie du greffon contre l'hôte présente de nombreuses similarités avec les MICI au niveau intestinale. Par ailleurs, il a été également démontré que la perfusion de cellules apoptotiques chez la souris peut améliorer nettement la colite au niveau clinique et histologique dans un modèle de DSS (*Dextran Sulfate Sodium*) (Ansary, Ishihara et al. 2014; Grau, Tabib et al. 2015).

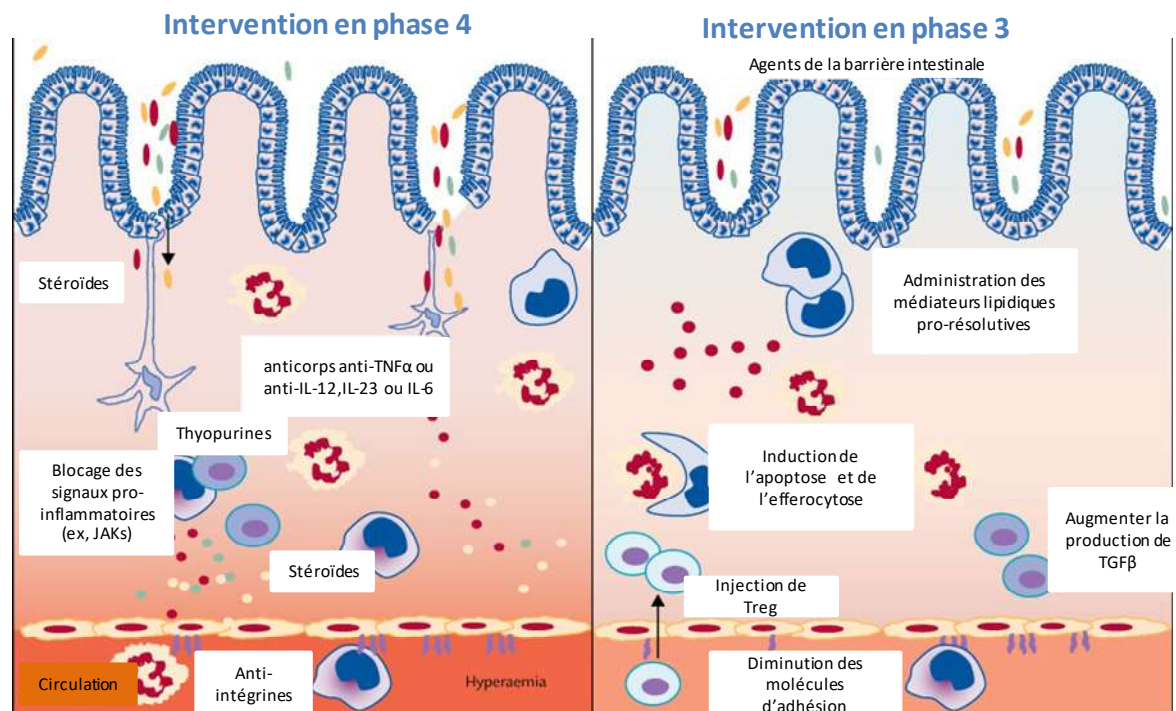


Figure 18 : Concepts actuels et futurs pour la thérapie de MICI. Les approches thérapeutiques actuelles visent uniquement l'inflammation chronique une fois qu'elle est déjà établie (phase 4). Les futures approches thérapeutiques devraient cibler la phase de résolution de l'inflammation aiguë (phase 3). Il existe des évidences que la résolution de l'inflammation peut être cliniquement efficace chez les patients atteints des MICI. Parmi les stratégies appliquées on trouve la restauration de la barrière intestinale après utilisation de probiotiques et des facteurs de croissance. De plus, l'efficacité de l'essai clinique des anticorps anti-intégrine est une preuve de concept du rôle de l'inflammation dans le traitement de MICI. Les anti-intégrines arrêtent le recrutement des cellules inflammatoires dans la muqueuse enflammée, favorisant ainsi la résolution de l'inflammation en modifiant l'équilibre des cellules pro-inflammatoires et pro-résolutives. Cibler les modulateurs en amont de la signalisation du TGFβ comme avec l'oligonucléotide mongersen anti-SMAD7, pourrait représenter un autre mécanisme favorisant la résolution de l'inflammation plutôt que d'être anti-inflammatoire. Cependant, aujourd'hui la plupart des essais cliniques sont encore réalisés avec des substances anti-inflammatoires. Ces substances peuvent cibler des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, IL-12, IL-23 ou encore IL-6. Certaines molécules comme les thiopurines ou les stéroïdes ciblent la suppression des cellules T, tandis que d'autres (par exemple les inhibiteurs de JAK) interfèrent avec la signalisation en aval des récepteurs des cytokines. Modifié d'après (Rogler 2017).

Les taux de réponse élevés rapportés pour le mongersen dans les études de phase 2 (mais pas encore confirmées dans les études de phase 3) sont très encourageants et suggèrent que l'utilisation et l'activation des facteurs pro-résolutives pourraient être plus efficace que l'inhibition directe des médiateurs inflammatoires pour l'induction du processus de résolution. Plusieurs mécanismes doivent être étudiés encore en profondeur, y compris l'induction de l'apoptose, la clairance des neutrophiles, la re-différentiation des macrophages intestinaux (passage du type M1 au type M2), l'induction de cellules régulatrices et l'induction de la réparation tissulaire. Des médicaments supplémentaires visant la résolution de l'inflammation doivent être testés cliniquement dans les MICI. L'idée que la résolution de l'inflammation se

produit spontanément lorsque les facteurs pro-inflammatoires sont neutralisés ou éliminés doit être corrigée.

Dans ce contexte le processus de résolution semble être une opportunité dans le développement de thérapies innovantes pro-résolutives. L'efferocytose étant un processus clef dans la résolution de l'inflammation, notre laboratoire a évalué une approche thérapeutique pouvant favoriser la résolution de l'inflammation par l'utilisation des facteurs solubles issus de l'efferocytose. Ces facteurs sont donc produits suite à la co-culture de macrophages avec des cellules apoptotiques, et est appelé ici SuperMApo (*Supernatant issued from Macrophage Apoptotic cell culture*). Cette surnageant est composé principalement par de lipides, enzymes comme les MMP12 ou encore des enzymes de la glycolyse, des cytokines et chemokines anti-inflammatoires et pro-résolutives (Annexine I, IL-10 et TGF β), molécules du complément comme C1q, des facteurs de croissance (IGF-I et VEGF), ainsi que des molécules de pontage comme TSP-1. L'injection de ces facteurs pro-résolutifs dans un modèle d'arthrite expérimentale induite par le collagène permet un arrêt de la pathologie (Bonney et al., soumis). Dans un modèle de sclérose en plaques chez la souris, l'injection de SuperMApo a aussi permis le contrôle de l'évolution de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (Gauthier et al., soumis). Ces travaux confirment l'utilisation des facteurs issus de l'efferocytose comme approche pro-résolutive et ouvre donc la possibilité de développer cette approche dans le traitement des MICI, pour mettre fin à l'inflammation et permettre une réparation de la muqueuse intestinale.

CONTEXTE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Actuellement, un changement de paradigme dans la prise en charge des maladies inflammatoires chroniques est en train d'émerger. Il a été proposé que certaines maladies associées à une inflammation chronique, comme les MICI, soient maintenues à cause d'une résolution de la réaction inflammatoire défailante. Cette dérégulation peut conduire à une destruction du tissu intestinale et à une perte de fonctionnalité de l'organe (Neurath and Travis 2012; Scheibe, Backert et al. 2017). Le processus de résolution en condition homéostatique et plus précisément l'élimination de cellules apoptotiques par les phagocytes semble permettre le contrôle de la réponse inflammatoire et la restauration de l'intégrité tissulaire. Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse a été d'évaluer l'effet thérapeutique de l'injection des facteurs pro-résolutifs issus de l'efferocytose dans des modèles expérimentaux de colite inflammatoires et de déterminer les mécanismes mis en jeu.

RESULTATS

I : Mise en place de la vidéo endoscopie dans des modèles expérimentaux de MICI

Afin de déterminer le modèle expérimental le plus pertinent par rapport à la maladie humaine et le plus relevant pour l'étude préclinique d'approches innovantes, quatre modèles expérimentaux de MICI ont été évalués par vidéo-endoscopie souple haute définition. Ainsi, les modèles de « transfert de lymphocytes T naïfs », DSS aigu et chronique, et de TNBS ont été suivis cliniquement et au niveau des lésions du colon. Cette technique s'est révélée être facilement réalisable, avec un faible taux de mortalité.

Tout d'abord, le suivi endoscopique de ces différents modèles de MICI a permis une description plus précise de chaque modèle, jusqu'à maintenant évalués la plus part du temps à l'aide de scores cliniques et histologiques. Dans ce contexte, l'évaluation endoscopique de la colite induit au DSS montre que seul le modèle « DSS chronique » présente des lésions intestinales proches de celles observées dans la RCH chez l'Homme, comme les ulcérations superficielles et les saignements. Quant au modèle « TNBS », les lésions observées par endoscopie confirment que ce modèle mime assez bien les lésions de MC. En revanche, ce modèle a révélé une forte hétérogénéité entre les expériences et même au sein des groupes. Enfin, le modèle « transfert de lymphocytes T naïfs » a montré des lésions semblables à celles de la MC, avec des dommages plus étendues, peu de saignement et une atteinte en profondeur de la muqueuse intestinale. Enfin, tous modèles confondus, les lésions endoscopiques ont été corrélées aux scores histologiques, confirmant la fiabilité de l'analyse endoscopique dans ces modèles expérimentaux de MICI.

Chez l'Homme, le suivi endoscopique peut-être un réel atout pour déterminer avec précision l'intérêt des nouvelles thérapies. Nous avons ainsi évalué le traitement par 5-ASA par vidéo-endoscopie dans les modèles « DSS chronique » et « transfert de lymphocytes T naïfs ». L'évaluation endoscopique a ainsi permis une meilleure évaluation de l'efficacité du traitement car cette technique permet de discriminer en temps réel et de manière plus précoce et précise que le score clinique l'évolution des lésions après traitement. Ce travail a permis de mieux documenter les lésions endoscopiques dans 4 modèles précliniques de MICI et mis en avant l'intérêt de cette évaluation pour déterminer plus précocement et plus précisément l'effet d'un traitement sur les lésions intestinales dans ces modèles.

En conclusion, ce travail nous a permis, de choisir les modèles de « DSS chronique » et de « transfert des lymphocytes T naïf » due à leurs ressemblances avec la RCH et la MC respectivement, pour la suite des travaux. De plus, l'utilisation de l'endoscopie s'avérée un vraie atout dans le suivi de la maladie inflammatoire intestinale ainsi que de l'efficacité des thérapies, ce qui nous facilitera par la suite de détecter le moment le plus précoce de la survenue de la maladie et de choisir le jour les plus pertinent pour appliquer le traitement.

Article I (*manuscript in preparation*)

Title: Documentation of experimental mouse models of inflammatory bowel diseases using flexible video endoscopic colon evaluation

Claire Gay^{1,2,3,4,5,*}, Omayra Martin-Rodriguez^{1,2,3,4,*}, Anna Daoui^{1,2,3,4}, Séverine Dégano-Valmary⁵, Lucine Vuitton⁶, Sylvain Perruche^{1,2,3,4}

¹INSERM UMR1098, F-25020 Besançon cedex, France

²Université de Bourgogne Franche-Comté, SFR FED4234, F-25030 Besançon cedex, France

³EFS Bourgogne Franche-Comté, F-25020 Besançon cedex, France

⁴LabEX LipSTIC, ANR-11-LABX-0021, FHU INCREASE, F-25020 Besançon cedex, France

⁵Anatopathology department, Besançon University Hospital, France

⁶Gastroenterology department and Endoscopy unit, Besançon University Hospital, France

*co first authors, C.G. and O.M.R. equally participated to the work

Short title: Video-endoscopic evaluation of IBD models

Address for correspondence: S.P., INSERM UMR1098, EFS BFC, 8 rue du Dr JFX Girod, F-25020 Besançon Cedex, France. Phone: +33 3 81 615 615. Fax: +33 3 81 615 800.
sylvain.perruche@inserm.fr

Abstract:

Background and Aims. The assessment of colitis occurrence using the standard clinical score evaluation is not sufficient to appreciate disease incidence or response to treatment in the most of the relevant preclinical experimental mouse models of inflammatory bowel diseases [IBD]. We evaluated whether the use of flexible video-endoscopy of the colon mucosa would profit to the disease occurrence and response to treatment evaluation in such experimental models. In addition we better documented the colonic lesions specific of each model to better appreciate to which clinical situation each model corresponds to.

Methods. A superslim flexible video ureteroscope was used to evaluate colon lesions and the disease development in mice suffering for acute or chronic DSS-, TNBS- or T cell transfer-induced IBD [a detailed endoscopic protocol is given]. Both a clinical and an endoscopic scoring of the diseases were performed, in addition to histological evaluation.

Results. Colonoscopy evaluation allowed an earlier disease onset determination and a close follow up to better define the chronological development of the diseases. Mucosal lesions such as edema, pseudopolyps and ulcerations were observed in the models of IDB, helping the correlation between chronic DSS-induced colitis with UC and T cell transfer-induced colitis with CD. Moreover endoscopy allowed a better evaluation of therapeutic on mucosal healing and provided a way to optimizing the therapeutic window for developing therapies.

Conclusion. Flexible endoscopy in live mouse models of IBD allows a better knowledge of diseases and mucosal lesions, and can be used to monitor mucosal healing for development of new therapies.

Keywords: inflammatory bowel diseases, experimental models, flexible videoendoscopy

Abbreviations: 5ASA, 5 aminosalicylic acid; CD, Crohn's disease; DSS, dextran sodium sulfate; IBD, inflammatory bowel diseases; MEICS, murine endoscopic index of colitis severity; NBI, narrow band imaging; SEM, standard error of the mean; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid; UC, ulcerative colitis.

Introduction

Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are the two major forms of inflammatory bowel diseases (IBD) of complex etiology. They are characterized by a chronic relapsing intestinal inflammation, with symptoms such as diarrhea, abdominal pain, rectal bleeding, and mucosal ulcerations¹. IBD are chronic, progressive and disabling diseases and the major objective of the treatments is to avoid intestinal destruction and stop the process of the disease. Deep remission, associating clinical relief with endoscopic mucosal healing and remission of biologic markers^{2,3} is associated with lower relapse and hospitalization rates, and with reduced need for surgery⁴⁻⁶. In clinical trials in UC, and more recently in CD, mucosal healing has emerged as a major therapeutic endpoint to assess efficacy of new drugs⁵ and endoscopic scores are key tools⁷ to assess activity of IBD in this purpose. Despite the recent use of biologic agents, a half of patient with CD are still operated on during the first ten years of the disease^{8,9} and 20% of patients with UC undergo a proctocolectomy during their life¹⁰. Some of the patients are refractory to both conventional and biologic therapies^{11,12} and there is a need for new treatments.

In this setting, experimental mouse models allow to obtain new insights into the pathogenesis of IBD and are of interest as preclinical evaluation of innovative therapeutic approaches¹³. Currently, concomitant to the growing use of endoscopic indicators in IBD monitoring, live mice colonoscopy has emerged as a new way to monitor animal models¹⁴. While in human clinical trials endoscopic evaluation has become the gold standard to assess mucosal lesions and their healing⁷, colonoscopy in mice lacks of standardized protocol for implementation and scoring of pathological findings, and clinical evaluation of mouse models alone is not sufficient. This approach also allows to limit the cost and the number of mice used per experiment, in respect to the 3 "R" principle regulation¹⁴. In the report by Becker *et al.*, endoscopies were performed with a mouse specific rigid scope (Coloview mini endoscopic system, Karl Storz) which described a 4 cm progression in the colon^{15,16}. Rigid scopes are the most commonly used¹⁷⁻¹⁹, but some studies reported endoscopic analysis with a flexible system²⁰⁻²². They described a longer progression (up to 6 cm)²¹ and a higher resolution of the picture²⁰ than with rigid scopes. In 2006, Becker *et al.* published an endoscopic colitis score, named murine endoscopic index of colitis severity (MEICS)¹⁶. This score index was based on their observations of mucosal symptoms of inflammation, in a mouse model of dextran sodium sulfate and azoxymethane (DSS-AOM)-induced colitis and colorectal cancer¹⁴. Then, the group of Dr F Cominelli proposed a reproducible scoring system based on validated

published clinical parameters using flexible endoscopy²². This scoring system integrates evaluation of intestinal inflammation using a high level of discrimination with 12 possible grades of inflammation and a novel decimal unit system²².

Many different experimental models of IBD are described and include: chemically-induced models, genetically-engineered models (knockout models), and T cell transfer models¹³. Most popular models are DSS-induced acute or chronic colitis, TNBS-induced colitis and T cell transfer-induced IBD¹³. Despite the increasing use of endoscopic evaluation in experimental mouse models, detailed chronologic endoscopic descriptions of the mucosal lesions observed in each of the experimental models are missing. In this paper we aimed to confirm the feasibility and the usefulness of high resolution flexible video-endoscopy of the colon mucosa in the current most common mouse models of IBD, notably providing pictures of specific lesions, their evolution and healing.

Materials and Methods

Mice

Four to 8 weeks old female C57BL/6 and SWISS mice were obtained from Charles River Laboratories (l'Arbresle, France) and kept in quarantine for at least 1 week before experimental procedure. Transgenic RAG2^{-/-} C57BL/6 mice were bred in our specific pathogen-free rodent facility. Mice were housed at the UMR1098 animal facility (#D25-056-7) in standard plastic cages with cellulose bedding in environmentally controlled and germ free room at 22°C, and under a 12 hours light/dark cycle. Pellet food and sterile tap water (Hydropack, Plexx, Elst, The Netherlands) were available *ad libitum*. Experimentation (#02831) was approved by the local ethic committee (#58) and the French Ministry of Higher Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) and was conducted in accordance with the European Union's Directive 2010/63.

Experimental models of DSS-induced colitis

Acute DSS colitis was induced in C57BL/6 mice with the addition of 3% of DSS (MP biomedical LLC, Santa Ana, California) in drinking water for 6 consecutive days. Then, regular water was given until sacrifice (day 7). In chronic DSS-induced colitis the regular water was given for 10 days after DSS and that procedure was repeated twice for a total of 3 cycles to induce chronic colitis. Controlled mice were given with tap water only. Mice were monitored daily for the clinical assessment of colitis inspired by the scores described by

Mevorach and Cooper^{30, 31} A total score of 0 to 9 was assigned to each animal, which included the sum of evaluation of the body weight loss (0 to 5% of weight loss = 0; 5 to 10% = 1; 10 to 15% = 2; 15 to 20% = 3; >20% = 4), the feces appearance (normal = 0; mild diarrhea = 0.5; diarrhea = 1; bloody stools = 2), and the general comportment (normal = 0; mild alteration = 1; piloerection and motor activity altered = 2; severe alteration = 3). Endoscopic assessment was performed daily during acute DSS-induced colitis and the last day of each 6 day-DSS regimen and twice during the 10 days of regular water.

Experimental model of TNBS-induced colitis

Colitis was induced in SWISS mice by the administration in the colon of 2,4,6-trinitrobenzen sulfonic acid (TNBS; Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri). Briefly, mice were anaesthetized with isoflurane 2% (Aerane; Baxter, Mississauga, Canada), and 100 µL of TNBS (3 mg/mL of 50% ethanol) were administered with a catheter inserted through the anus, up to 4 cm. Controlled mice received ethanol alone. Mice were monitored daily for clinical assessment of colitis according to the previously described scoring system. Endoscopic monitoring was performed at day 1 and 3.

Experimental model of T cell transfer-induced IBD

IBD was induced in transgenic RAG2^{-/-} C57Bl/6 mice by the adoptive transfer of magnetically-sorted CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} naïve T cells issued from wild type C57Bl/6 mice, according to the model described by Fiona Powrie^{32, 33} Naïve T cells were obtained from the spleen and lymph nodes, and isolated by an immunomagnetic sorting protocol (Magnisort Mouse CD4 Naïve T cell Enrichment Kit; eBioscience, San Diego, California) modified to also deplete CD25⁺ cells. A biotinylated anti-CD25 monoclonal antibody (BD biosciences, Le Pont de Claix, France) was added into the antibody mix, before sorting. Sorted CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} naïve T cells were >95% pure as attested by fluorescence activated cell sorting (FACS), and injected in 0.3 mL phosphate buffer saline (PBS) into the tail vein (0.5.10e6 cells/mouse). Mice were monitored daily for clinical assessment of IBD. T cell transfer induced colitis was evaluated by endoscopies twice a week during the whole follow up.

Video-endoscopy procedure

The endoscopic procedures were made on isoflurane-anesthetized animals, without bowel preparation or starving before. We used a superslim 8.4 Fr (2.8 mm) flexible video ureteroscope (URF V2; Olympus, Rungis, France), connected to OTV-S190 and CLV-S190

visera elite monitor system (Olympus, Rungis, France), with narrow band imaging (NBI) system that enhances visibility of vascular structures (**Figure 1**). After anesthesia induction with 2% isoflurane in a box (TemSega, Pessac, France), mice were placed on gas anesthesia table (TemSega, Pessac, France) and equipped with a respiratory mask. During the procedure, plastic flexible feeding needles for rodents (Instech Solomon, Plymouth meeting, Pennsylvania), 1 mL syringes, sterile compresses and sterile water were needed.

The procedure followed the next detailed steps we set up in our lab over 650 colonoscopies on 133 mice:

- 1) Connect the endoscope to the monitor, and turn on the monitor (**Figure 1a-c**).
- 2) Connect the syringe of sterile water to the working channel of the endoscope and clean the endoscope flexible extremity and the working channel with sterile water, and check all the functions of the endoscope before starting the procedure.
- 3) Put the mouse into the induction box, wait 2 or 3 minutes until the mouse is sufficiently anesthetized, and then introduce the mouse into the respiratory mask, in ventral prone position on a clean paper (**Figure 1d,e**).
- 4) Hold the tail and cautiously stretch the skin of the anal verge with your left hand. With your right hand, start first by a detailed examination of the anus, then moisten the anus with water injected through the working channel, gently expand the anus with the plastic flexible feeding needle, and then carefully introduce the endoscope into the rectum. After that, inject a small amount of water (approximately 0.1 mL) to open and slightly distend the bowel. During the whole procedure, less than 1 mL should be injected into the mouse because of the risk of distension of the colon and death.
- 5) Gently push the endoscope up to the caecum, always under visual control. During the progression, stools can be pushed with small repeated pressure of water. Once at the bottom, start a careful examination of the mucosa while slowly withdrawing the endoscope.
- 6) Remove the endoscope, and put the mouse back into the cage. In case of abdominal distension, gently press mouse abdomen to remove water from the bowel.

Animals were observed until their total recover from anesthesia. After each set of procedure a thorough cleansing of the endoscope was performed according to current guideline for human endoscope disinfection³⁴.

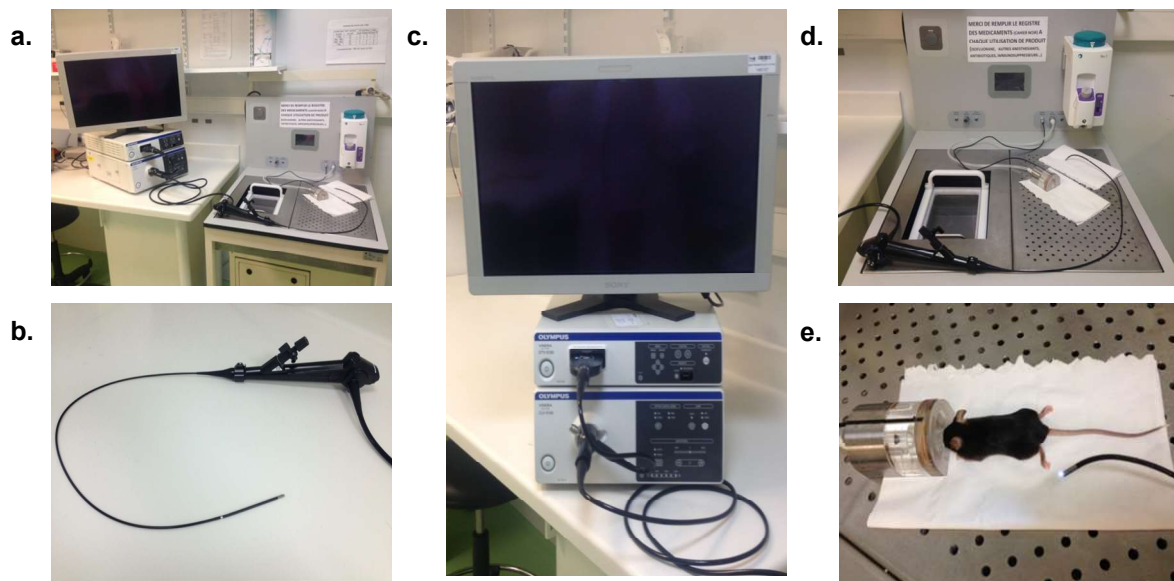


Figure 1: Experimental setup of the flexible video ureteroscope used for colonoscopy in live mice. Our colonoscopy system (a) included a superslim 8.4 Fr (2.8 mm) flexible video ureteroscope (b), connected to OTV-S190 and CLV-S190 visera elite monitor system (c) and an anesthesia table including an induction box and an aspiration table allowing heating to keep mice warm during the procedure (d,e). Mice were equipped with a respiratory mask (e).

Evaluation of colonic lesions by endoscopy

Endoscopic assessment of mucosal inflammation was reported with the MEICS¹⁶, composed of 5 parameters rated from 0 to 3, including: thickening of the colon, changes of the vascular pattern, fibrin deposition, granularity of the mucosal surface, and stool consistency. The index was calculated for each animal after each endoscopic evaluation by two different operators: a gastroenterologist and an immunologic researcher regular with mouse experiments. Additional mucosal lesions absent from the MEICS items were also reported and were defined according to human definition of Crohn's disease endoscopic index of severity (CDEIS)²⁷ Ulcers were defined as an aphthoid ulceration if it was tiny (2-3 mm), raised or flat red lesion with a white center, as a deep ulceration if it was frankly deep and as a superficial ulceration if it was neither aphthoid nor deep. Edema was defined as slight or moderate mucosal swelling. Photographs of each colonic segment and mucosal lesion were recorded for each procedure.

Histological analysis

Immediately after the sacrifice, tissue samples from three segments of the colon (proximal, median and distal parts) were collected and fixed overnight in formalin 5%. Paraffin inclusions were performed on macroscopic injured area, then 4 μ m sections were stained with

hematoxylin-eosin-saffron (HES). Histological evaluation was performed by a blinded experimented pathologist using a score composed of 5 degrees of severity based on inflammatory cell infiltration, erosions and ulcerations, epithelial hyperplasia, and mucin depletion, described by Powrie et al.²⁵: grade 0 = no change observed, grade 1 = minimal scattered mucosal inflammatory cell infiltrates, with or without minimal epithelial hyperplasia, grade 2 = mild scattered to diffuse inflammatory cell infiltrates, sometimes extending into the submucosa and associated with erosions, with minimal to mild epithelial hyperplasia and minimal to mild mucin depletion from goblet cells, grade 3 = mild to moderate inflammatory cell infiltrates that were sometimes transmural, often associated with ulceration, with moderate epithelial hyperplasia and mucin depletion, grade 4 = marked inflammatory cell infiltrates that were often transmural and associated with ulceration, with marked epithelial hyperplasia and mucin depletion, and grade 5 = marked transmural inflammation with severe ulceration and loss of intestinal glands.

Pharmacological treatment

5-aminosalicylate (5-ASA, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri) was dissolved in 100 μ L PBS and 150mg/kg was administered to mice by oral gavages once a day, in order to investigate the ability of colonoscopy in live mice to detect mucosal healing. Four chronic DSS induced colitis mice were treated by 5-ASA once a day during the 3 periods of 6 DSS-days. Five T cell transfer induced colitis mice were treated by 5ASA once a day during 6 days (from day 10 to 16). Treated mice were compared to untreated sick mice, which received only vehicle (PBS).

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM), and were analyzed using adapted statistical tests as indicated, using GraphPad Prism software (5.01 version). A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Flexible video colonoscopy procedure

Totally, 237 endoscopies were performed on 42 mice with a mortality rate associated to our procedure of 4.8% (2 out of 42 mice were found dead 24 hours after the procedure). The mean time of the procedure per mouse, including mouse preparation, anesthesia, colonoscopy and report writing was 4.8 minutes. In healthy mice, the endoscope could be introduced up to 6 cm deep in the colon, until the caecum (**Figure 2a**). At withdrawal, three different parts of the colon were constantly observed: the proximal colon with caecum (**Figure 2b**), and ileum

junction (**Figure 2c**), the medium colon (**Figure 2d**) and the rectum, easily recognized by a 1 cm length distinctive serrated mucosa (**Figure 2e**). In healthy mice vascular pattern was visible all along the colon (**Figure 2f**), enhanced by NBI (**Figure 2g**).

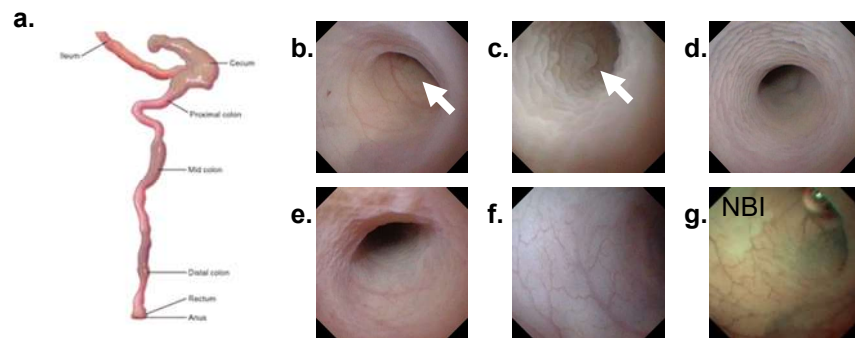
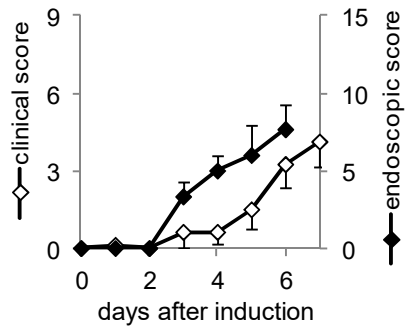


Figure 2: Endoscopic evaluation of the colon. Schematic representation of mice alimentary tract (a). Endoscopic colonic evaluation: proximal colon (b) with caecum (white arrow), ileum (c, white arrow) junctions; medium colon (d); rectum, characterized by a distinctive serrated mucosa (e). Vascular pattern visualization (f), enhanced by Narrow Band Imaging (g).

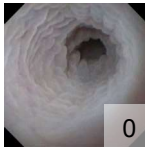
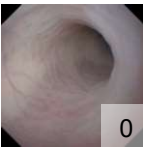
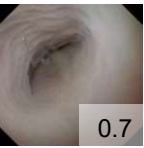
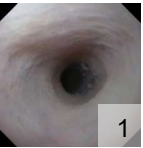
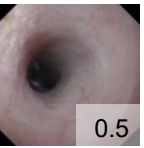
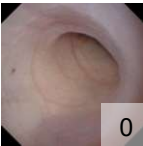
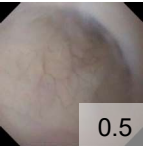
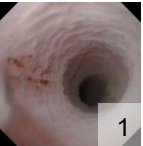
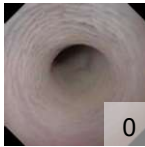
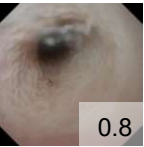
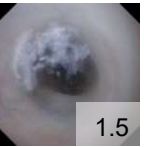
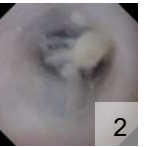
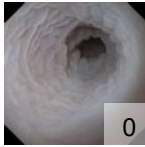
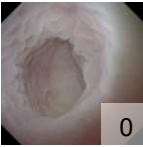
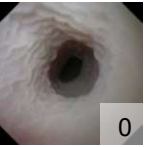
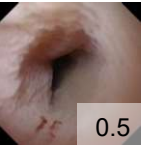
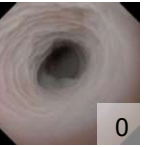
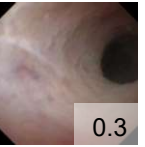
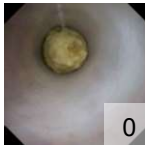
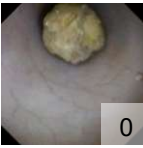
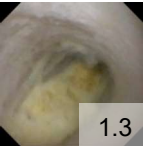
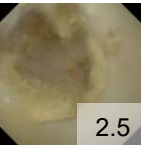
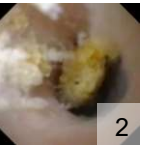
Colonoscopic evaluation and monitoring of experimental DSS-induced acute colitis

We did not observe any clinical manifestation of colitis during the first 4 days, only rectal bleeding was observed from day 5 post-induction (**Figure 3a**). In contrast, using endoscopic evaluation, as soon as day 3 we observed colitis occurrence (**Figure 3a**), with early thickening of the colon mucosa and changes of the vascular pattern, slight fibrin deposition and loose stools (**Figure 3b**). Five days after colitis induction, clinical symptoms occurred, first restricted to stool consistency and weight loss and, then at day 7, mice had bloody liquid stools, and a peaky general aspect (**Figure 3a**). Through the colonoscopic evaluation, we observed from day 6 a degradation of the items, affecting preferentially the rectum's mucosa, including thickening of the mucosa, bleeding, consistent fibrin deposit and loose stools. Ulcerations were also observable using colonoscopy (**Figure 3b**). Mice were then sacrificed and the histological analysis of colon samples found grade 3 lesions with moderate inflammatory cell infiltration in the submucosa, epithelial hyperplasia, and small ulcerations (**Figure 3c**).

a.



b.

MEICS items	Day 0	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
Thickening of the colon /3	 0	 0	 0.7	 1	 0.5	 1
Changes of the vascular pattern /3	 0	 0	 0.5	 1	 2	 2
Fibrin visible /3	 0	 0	 0.8	 0	 1.5	 2
Granularity of the mucosa /3	 0	 0	 0	 0.5	 0	 0.3
Stool consistency /3	 0	 0	 1.3	 2.5	 2	 2.3

c.

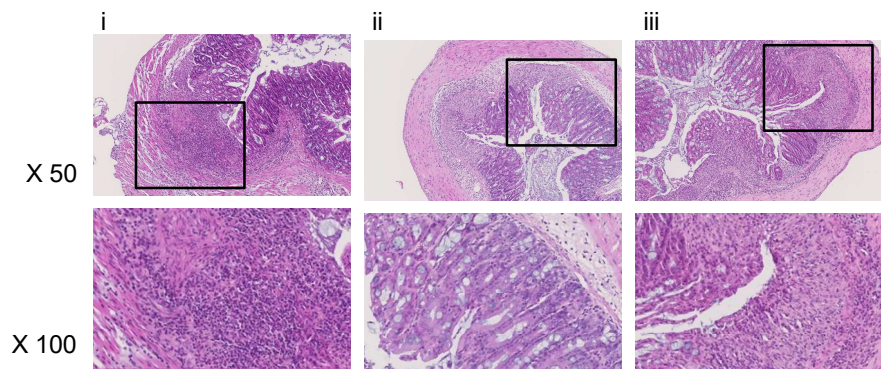
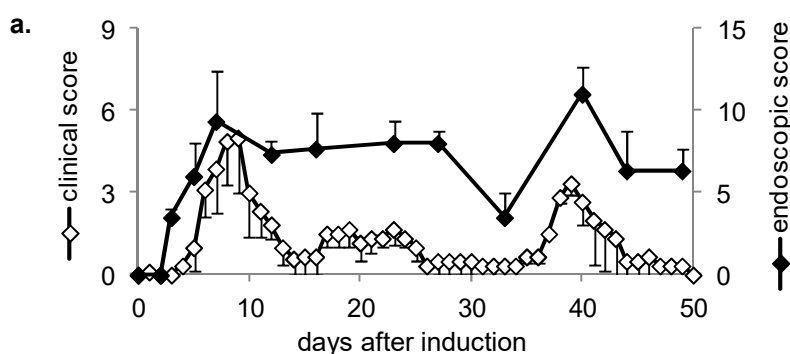


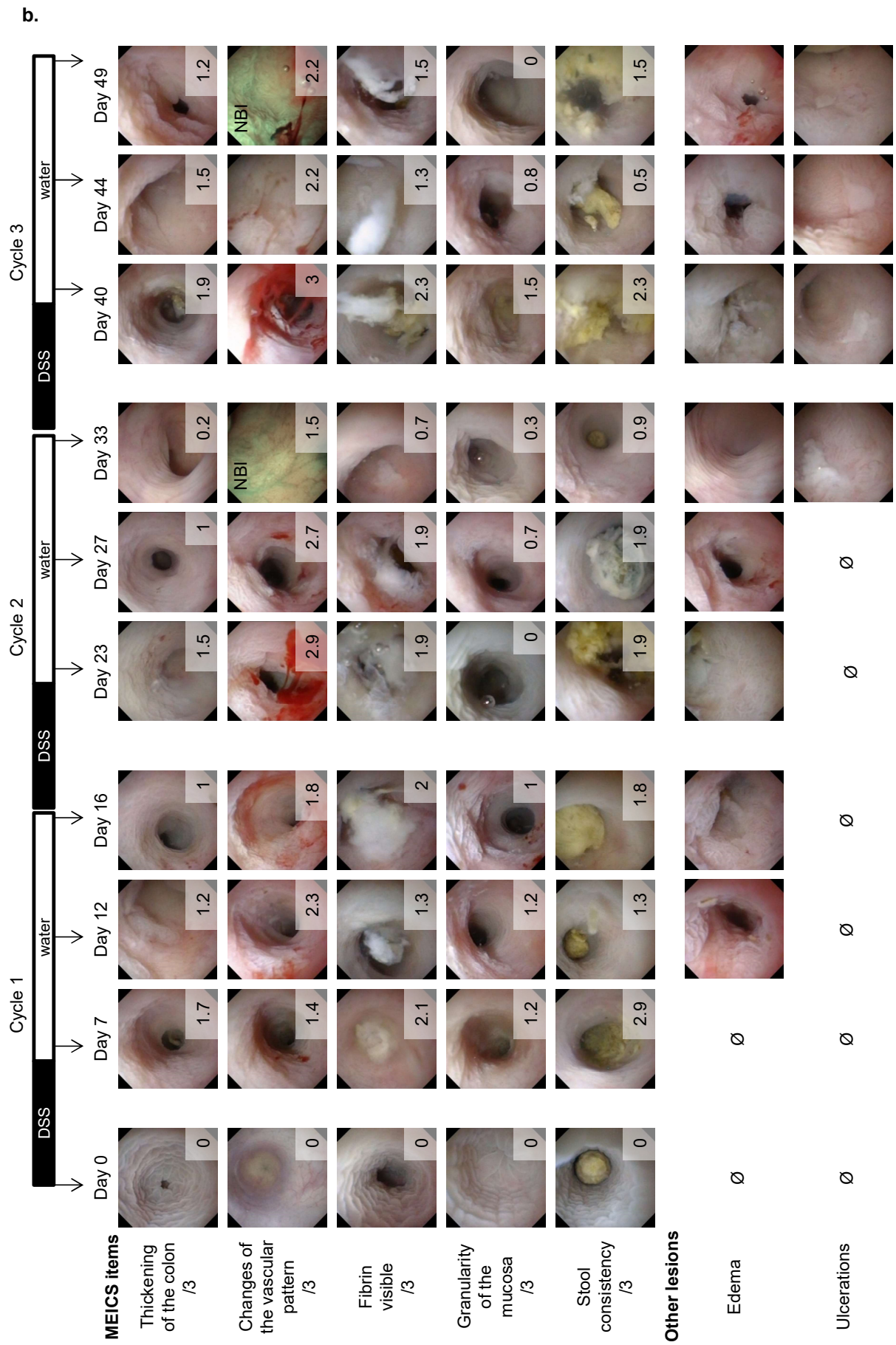
Figure 3: Monitoring of DSS-induced acute colitis. Mice were monitored daily for clinical score and endoscopic assessment according to the murine endoscopic index of colitis severity (MEICS), until sacrifice at day 7. Data are given as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) from 8 mice issued from 2 independent experiments pooled together (a). Representative pictures of endoscopic appearance according to the time are given in (b). For each picture mean MEICS is given on the lower right corner (b). Hematoxylin eosin saffron staining of proximal colon sections (x50 and x100 magnifications) showing a moderate inflammatory cell infiltration in the submucosa (i), a moderate epithelial hyperplasia (ii) and a small ulceration (iii) (Histological grade 3) (c).

Colonoscopic evaluation and monitoring of DSS-induced chronic colitis

As observed in DSS-induced acute colitis, colonoscopy allowed an earlier detection of colitis occurrence (**Figure 4a**) compared to clinical evaluation. For the second DSS-regular water cycle, whereas the clinical score demonstrated a strong decrease, notably in terms of weight regain, endoscopic evaluation demonstrated the persistence of the mucosal lesions, to a median 6/15 endoscopic score at sacrifice (**Figure 4b**). Diarrhea and fibrin appeared first at day 7, the changes of the vascular pattern gradually occurred from day 12 until significant bleedings at day 23 (**Figure 4b**). We also reported non-MEICS items such as mucosal edema that were noticed from day 12, as well as ulcerations that appeared from day 33 (**Figure 4b**). The mucosal surface was more affected in rectum and proximal colon than in medium colon. Importantly, we observed that the thickening and the granularity of the mucosa was improved during the cycles of regular water, whereas changes of vascular pattern and mucosal ulcerations worsened all along the model course (**Figure 4b**). After sacrifice histology showed grade 4 lesions including acute and deep mucosal ulcerations, the presence of fibrin and an important inflammatory cell infiltration of the mucosa and submucosa (**Figure 4c**).



Continuation of the figure next pages



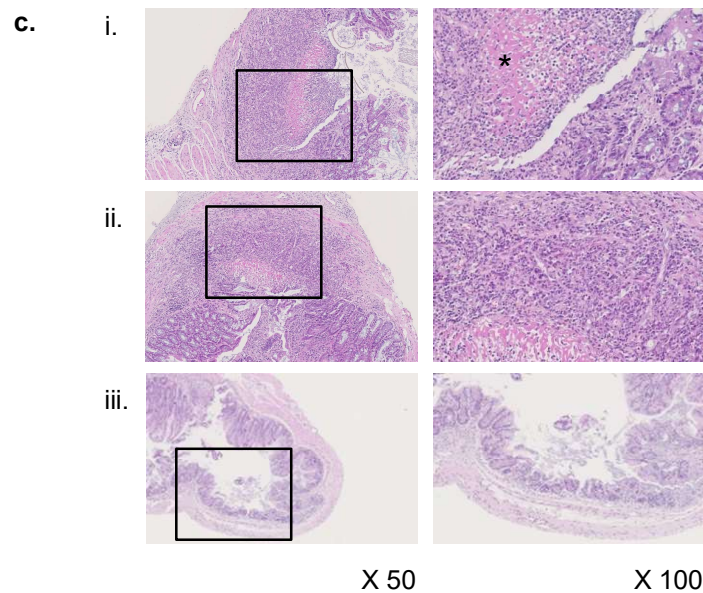


Figure 4: Monitoring of DSS-induced chronic colitis. Mice were monitored daily for clinical score and twice a week for endoscopic assessment according to the murine endoscopic index of colitis severity (MEICS), until sacrifice at day 50. Data are given as mean score $\pm$ standard error of the mean (SEM) from 10 mice issued from 2 independent experiments pooled together (a). Representative pictures of endoscopic appearances according to the time are given in (b). For each picture mean MEICS is given on the lower right corner. NBI indicates when narrow band imaging was used. In addition, pictures of edema and ulcerations are given (b). Hematoxylin eosin saffron staining of proximal and medium colon sections (x50 and x100 magnifications) showing a deep mucosal ulceration (i) with the presence of fibrin (*), an important inflammatory cell infiltration in mucosa and submucosa (ii), and mucosal atrophy (iii) (Histological grade 4) (c).

Colonoscopic evaluation and monitoring of TNBS-induced colitis

TNBS-induced colitis model was associated with a high mortality rate 17% of death (n= 2/12), occurring during the first 48 hours post-induction). In this model, the overall condition was very affected, mice were prostrated and inactive but they had no weight loss, nor diarrhea (**Figure 5a**). In 2 mice, colonic obstruction was observed and couldn't be passed through by the scope. These two mice died in the next 24 hours consecutive to spontaneous digestive perforations attested by post mortem macroscopic analysis. Mucosal lesions appeared quickly and were very intense, with a high mean MEICS ($10 \pm 2/15$) the first 24 hours post-induction (**Figure 5a**). In addition, deep ulcerations and important edema, associated with liquid stools were observed at this time, before redness and congestion of mucosa at day 3 (**Figure 5b**). Of importance, mucosal lesions were exclusively located on the site of the injection of the TNBS. The toxicity of the TNBS on colonic mucosa observed by endoscopy, was confirmed by histological analysis of colon samples that exhibited grade 5 lesions including severe and deep ulcerations, transmural gangrenous necrosis, important inflammatory cell infiltration, and presence of edema in the submucosa (**Figure 5c**).

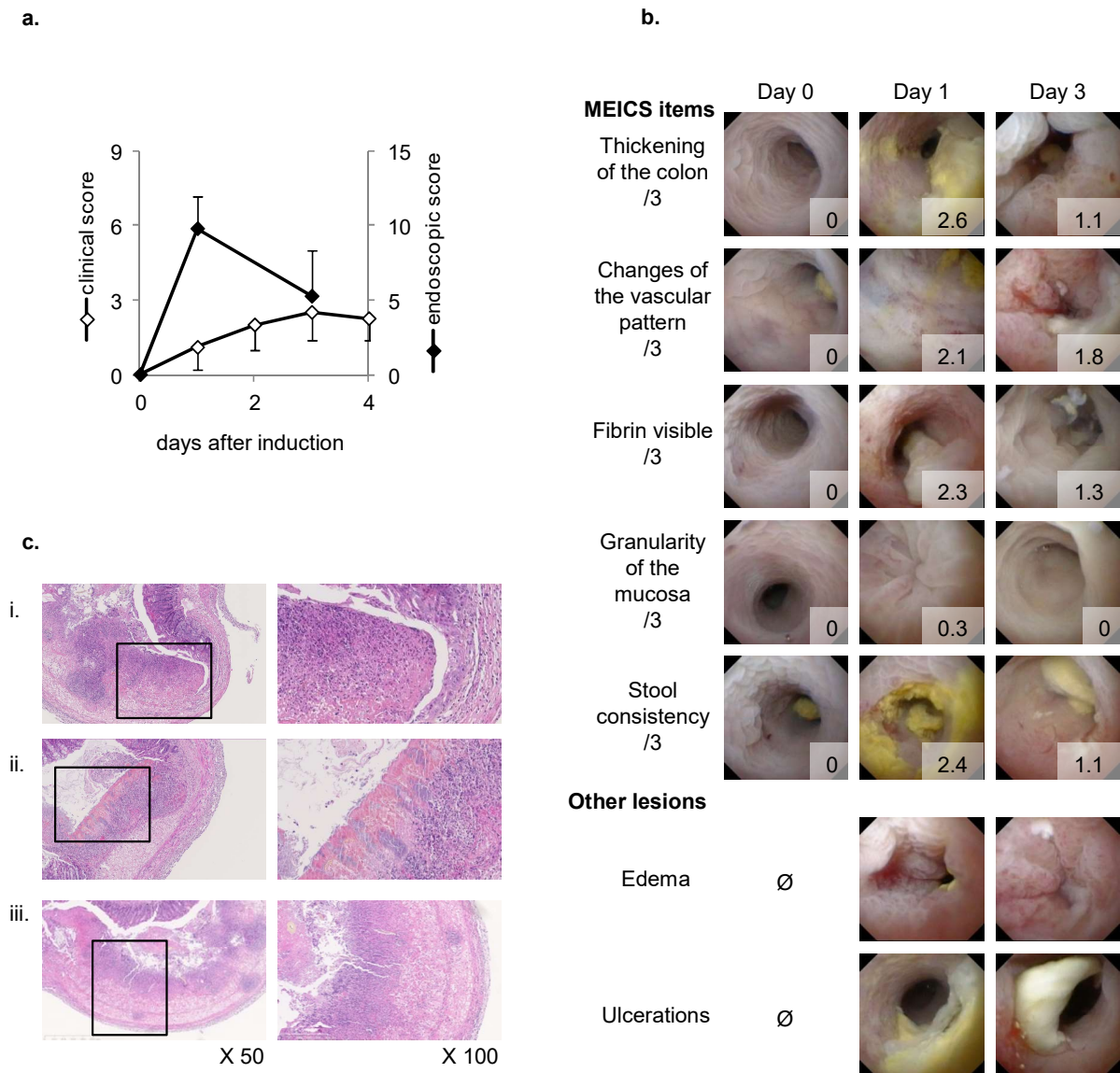


Figure 5: Monitoring of TNBS-induced colitis. Mice were monitored daily for clinical score and at days 1 and 3 for endoscopic assessment according to the murine endoscopic index of colitis severity (MEICS), until sacrifice at day 4. Data are given as mean score $\pm$ standard error of the mean (SEM) from 12 mice issued from 2 independent experiments pooled together (a). Representative pictures of endoscopic appearances according to the time are given in (b) For each picture mean MEICS is given on the lower right corner. In addition, pictures of edema and ulcerations are given (b). Hematoxylin eosin saffron staining of proximal and medium colon sections (x50 and x100 magnifications) showing an important inflammatory cell infiltration with serious deep mucosal ulceration (i), an edema in the submucosa (ii), and a transmural gangrenous necrosis (iii) (Histological grade 5) (c).

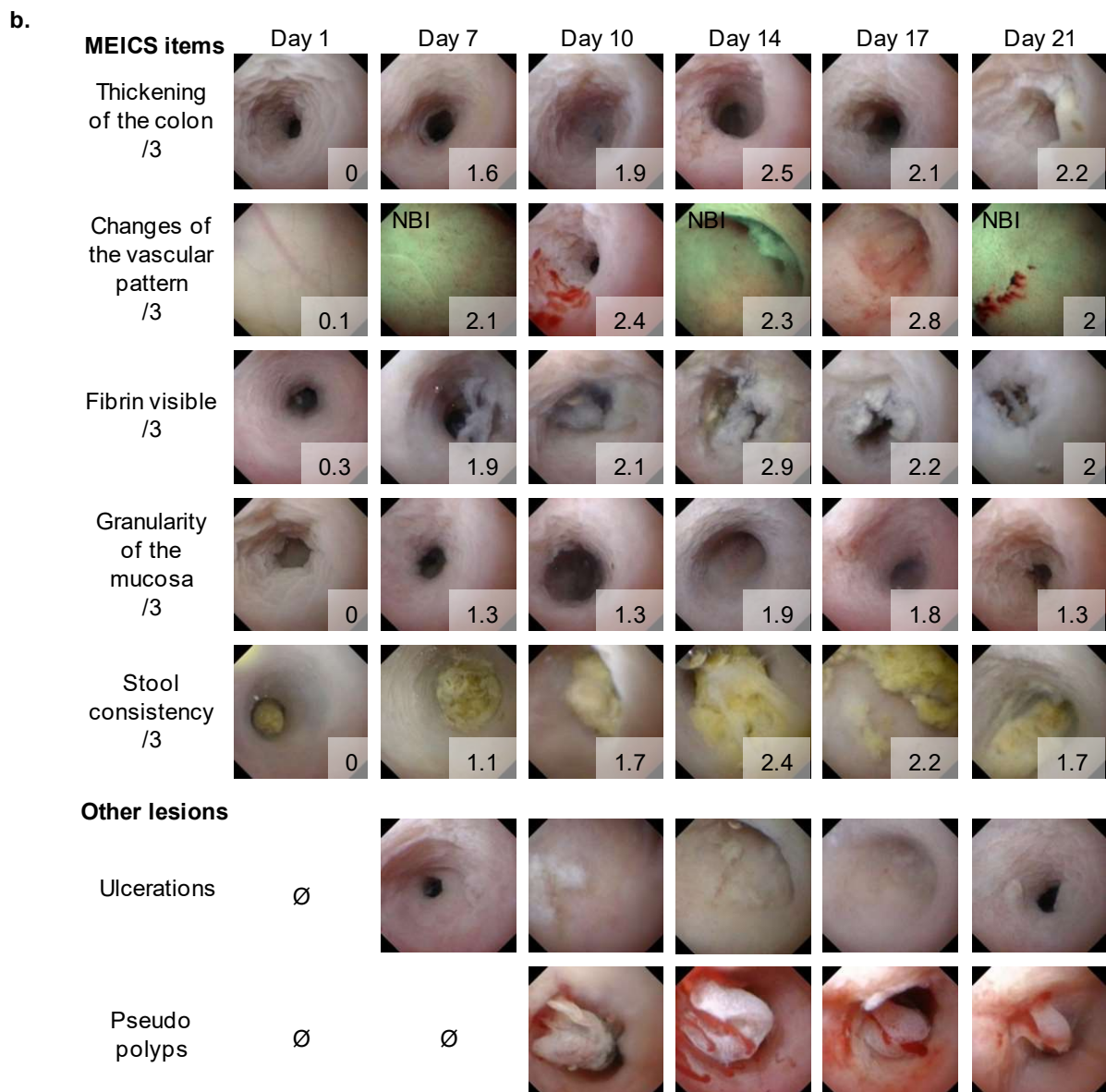
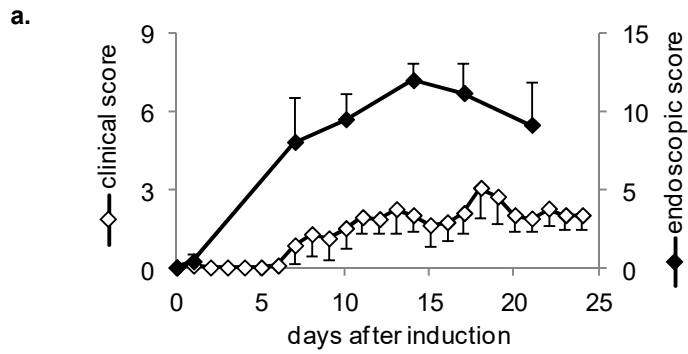
Colonoscopic evaluation and monitoring of T cell transfer-induced colitis.

In this model, the clinical score increased slowly, starting around day 7 with diarrhea and then around day 20 the overall condition of the mice was altered with skinny, prostrated and inactive mice (Figure 6a). Endoscopic evaluation observed distinctly changes 7 days after IBD induction. This included thickening of the colon mucosa, increased granularity and fibrin deposition (Figure 6b). At day 10 post-induction, vessels were thinner and tortuous and then

disappeared around day 15 (**Figure 6b**). One week later, at day 21, the colon was found highly fibrous, thick and static (**Figure 6b**). Importantly, colonoscopic examination on IBD mice allowed us to observe ulcerations from day 7 post-induction as well as pseudo polyps as soon as day 10 (**Figure 6b**). The histological analysis of colon samples were scored grade 4, confirming our observations by endoscopy, with transmural inflammatory cell infiltration, deep transmural ulcerations, cryptic abscesses and epithelial cell hyperplasia (**Figure 6c**).

Endoscopic evaluation after treatment in experimental mouse models of IBD.

The efficacy of 5-ASA treatment was evaluated both in the DSS-induced chronic colitis and in the naive T cell transfer model. First, in the DSS-induced colitis, we observed that 5-ASA treatment significantly reduced the clinical score ($p < 0.001$ [Wilcoxon signed rank test]; **Figure 7a**). At colonoscopic evaluation of these mice we observed as well a significant improvement of mucosal lesions ($p = 0.003$ [paired t test]; **Figure 7b**) in the group receiving 5-ASA treatment compared to untreated mice. In 5-ASA treated mice we could observe an improvement in the thickening of the colon ($p = 0.003$ [paired t test]), and the reduction of fibrin deposition ($p = 0.002$ [paired t test]) (**Figure 7c**). Surprisingly, in T cell transfer-induced colitis mice we observed that 5-ASA treatment deteriorated the clinical score from day 10 post-transfer compared to untreated mice ($p = 0.009$ [paired t test]; **Figure 8a**), affecting mostly mice health and weight. Endoscopic monitoring showed only a slight reduction of colon lesions from day 10 post-transfer (**Figure 8b**). However, thickening of the colon and fibrin deposition were significantly improved ($p < 0.05$ [paired t test]; **Figure 8c**). In addition, healing of ulcerations was observed as well (**Figure 8b, c**).



Continuation of the figure next page.

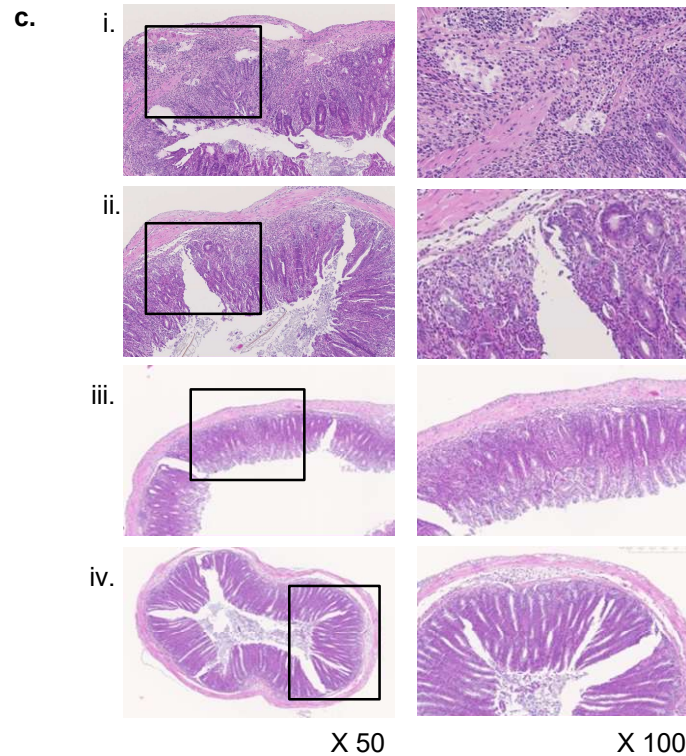
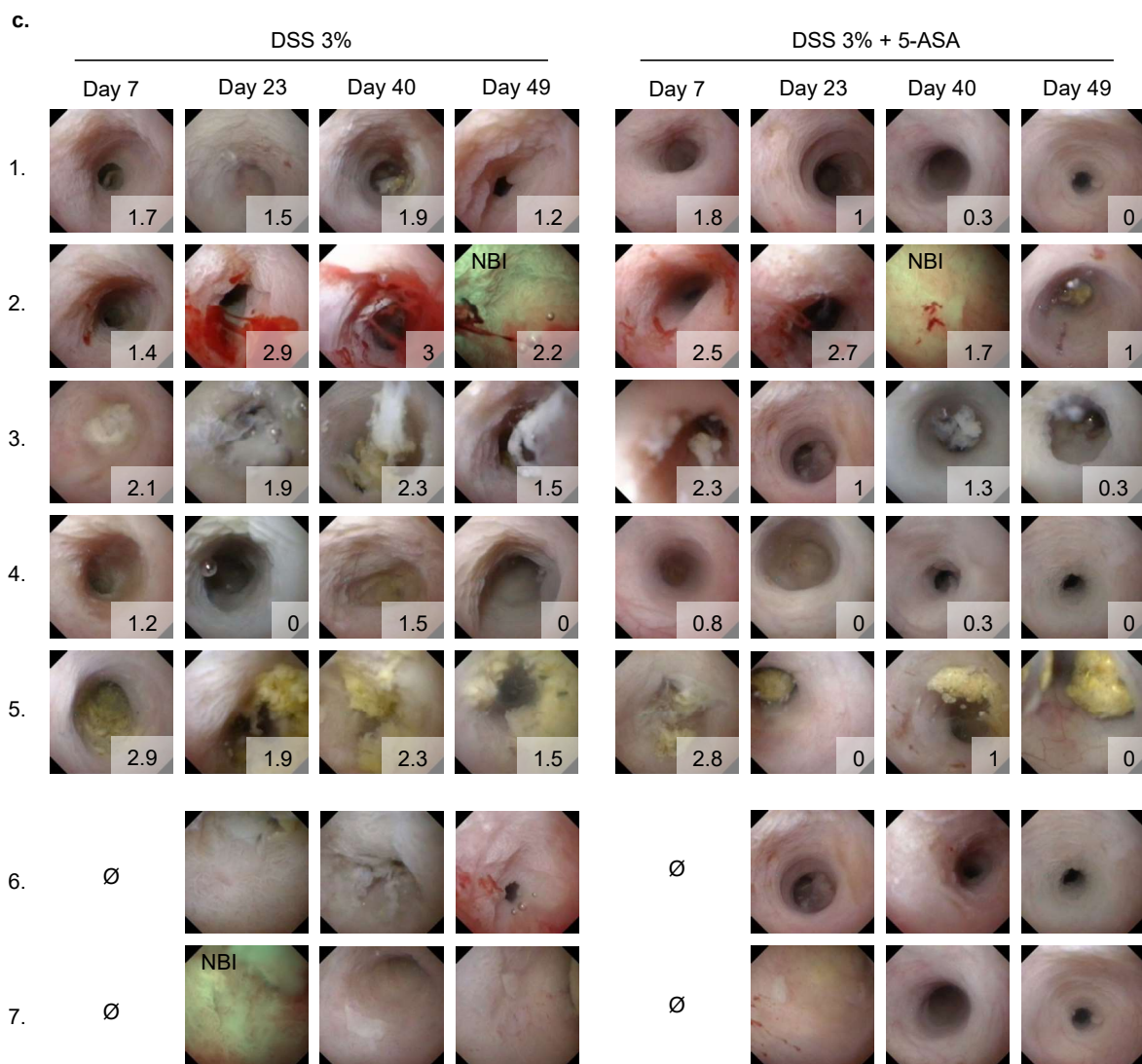
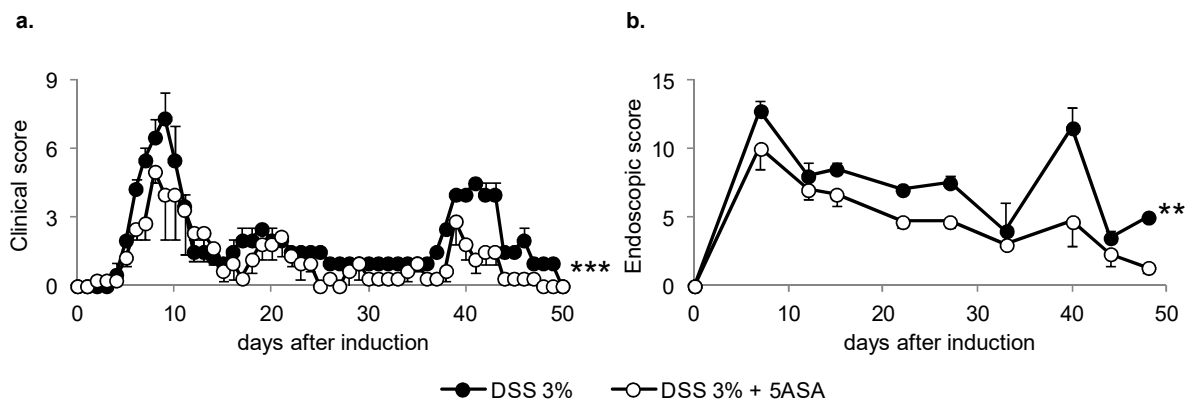


Figure 6: Monitoring of T cell transfer-induced IBD. Mice were monitored daily for clinical score and about every 4 days for endoscopic assessment according to the murine endoscopic index of colitis severity (MEICS), until sacrifice at day 24. Data are given as mean score $\pm$ standard error of the mean (SEM) from 14 mice issued from 3 independent experiments pooled together (a). Representative pictures of endoscopic appearances according to the time are given in (b). For each picture mean MEICS is given on the lower right corner. NBI indicates when narrow band imaging was used. In addition, pictures of ulcerations and pseudo-polyps are given (b). Hematoxylin eosin saffron staining of the proximal colon sections (x50 and x100 magnifications) showing a transmurular inflammatory cell infiltration (i), a deep mucosal ulceration or cracking (ii), a crypt abscess (iii), and epithelial hyperplasia with mucin depletion (iv) (Histological grade 4) (c).

Figure 7: Monitoring of 5-ASA treatment in DSS-induced chronic colitis. Mice were submitted to DSS-induced chronic colitis and received or not 5-ASA treatment during the 3 DSS periods, and were monitored every day for clinical score (a) and once a week for endoscopic assessment according to the murine endoscopic index of colitis severity (MEICS) (b), until sacrifice at day 50. Data are given as mean score $\pm$ standard error of the mean (SEM) from 4 (DSS 3%) and 8 (DSS 3% + 5-ASA) individual mice. **= $p < 0.01$ (paired t-test), ***= $p < 0.001$ (Wilcoxon signed rank test). Representative pictures of endoscopic appearances from the previous mice during endoscopic monitoring are given according to the MEICS parameters including: thickening of the colon (1), change of the vascular pattern (2), fibrin deposition (3), granularity of the mucosa (4), stools consistency (5), as well as other lesions such as edema (6) and ulcerations (7) (c). Numbers in pictures correspond to the mean of the MEICS of each group of mice for each parameter. “NBI” indicates when narrow band imaging was used.

ON THE NEXT PAGE



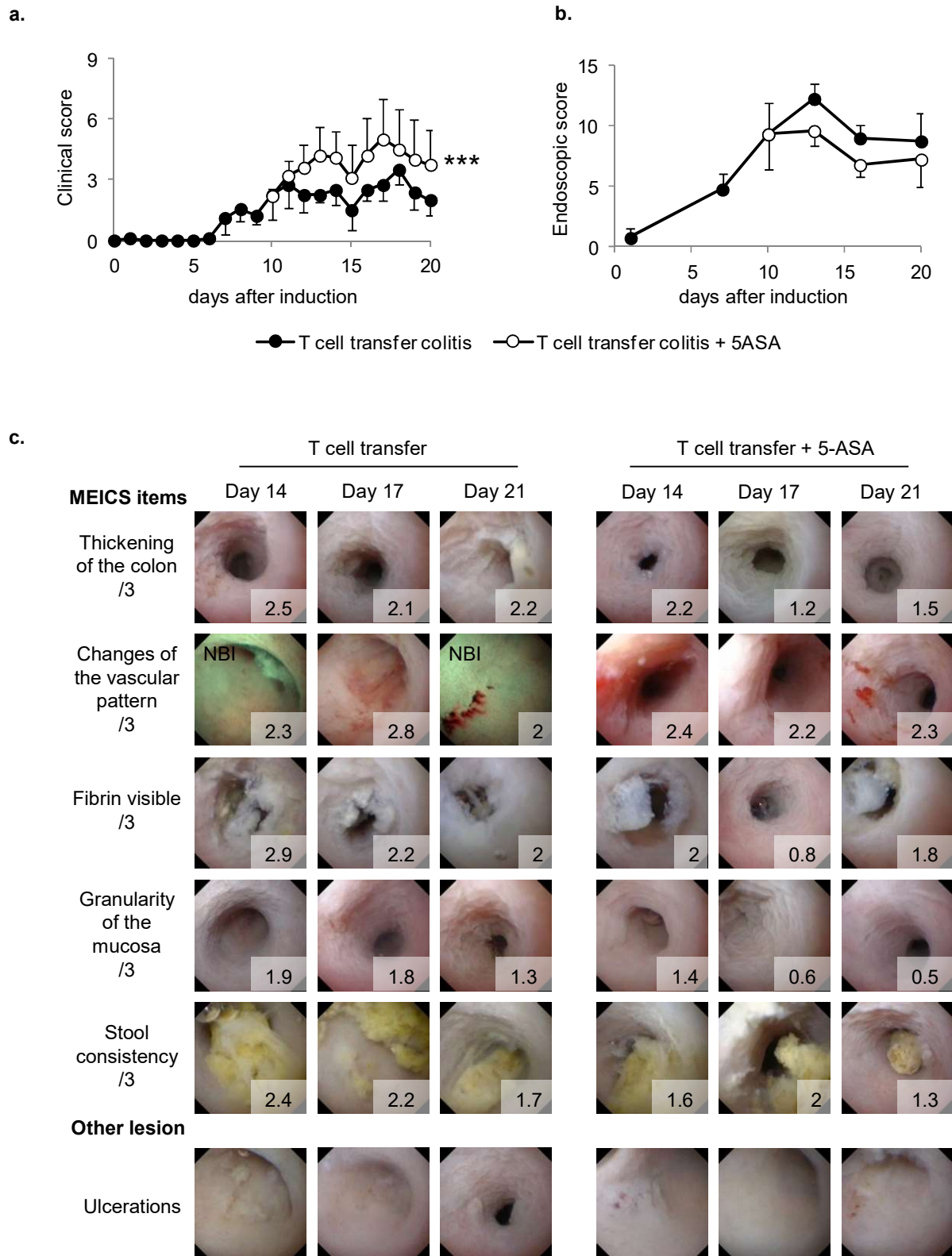


Figure 8: Monitoring of 5-ASA treatment in T cell transfer induced colitis. Mice receiving naïve T cells were treated with 5-ASA from day 10 to 16, or not, and were monitored daily for clinical assessment (**a**) and every 4 days for endoscopic assessment according to the murine endoscopic index of colitis severity (MEICS) (**b**), until sacrifice at day 21. Data are given as mean of score $\pm$ standard error of the mean (SEM) from 4 to 5 individual mice per group. ***= $p < 0.001$ (paired t-test). Representative pictures of endoscopic appearances from the previous mice during endoscopic monitoring are given according to the MEICS parameters (**c**). Numbers in pictures correspond to the mean of the MEICS of each group of mice for each parameter. “NBI” indicates when narrow band imaging was used.

Discussion

We describe here in detail mucosal lesions of the colon in four different experimental models of IBD, by using high resolution flexible colonoscopies in anesthetized live mice. Endoscopy proves to be safe, fast, and repeated without mortality. We confirmed that the use of a flexible superslim high resolution scope to perform endoscopies, allowed a longer progression into the colon, until the opening of the caecum, from 6 cm to anal verge, without intestinal perforations. This technology enables an original and detailed description of normal colonic mucosa in wild type mice, and allows an innovating and comprehensive register of the most common mouse models of IBD and their mucosal lesions over time.

So far, evaluation of colitis severity in mouse models of IBD was usually based on a clinical score confined to overall welfare of the animals, weight loss and stool. In human it was well demonstrated that the clinical Crohn's disease activity index (CDAI)²³, commonly used in clinical trials, does not accurately predict endoscopic or biologic remission²⁴. We observed the same disconnection between clinical symptoms and endoscopic lesions in our study. Endoscopic monitoring in mice allowed an earlier and more accurate detection of the disease. Yet, four endoscopic index of severity has been described in mice^{14, 22, 25, 26}. The most used are the MEICS¹⁶ and the integrated endoscopic scoring system²². Although the MEICS allows objective and repeated measures, it has never been validated and, important mucosal lesions such as ulcerations are not considered. The integrated endoscopic scoring system provides for the first time, a quantitative mechanism for evaluating the presence and induction of tumourous lesions in the context of colonic inflammation. In addition, they include strictures as a parameter during murine endoscopy that it seems to be commonly present in certain animal models of intestinal inflammation. Nevertheless, this endoscopic index of severity does not consider others important inflammatory parameters like the size of the mucosal lesions, granularity of the mucosal surface, fibrin visible and loss of peristalsis. In this study, we were able to identify in the current most-used mouse models mucosal lesions, such as ulcerations, pseudo polyps and edema. These are basic lesions in human IBD constantly used in validated endoscopic scores^{27, 28}. Ulceration, in particular, is a key lesion to determine the severity of the disease²⁹, and its absence predicts mucosal healing and remission.^{5,6}. Our new findings strengthen the usefulness of endoscopic evaluation and monitoring in mouse models of IBD bringing new tools to diagnose mice colitis and to determine treatment targets.

Deep remission with endoscopic evaluated mucosal healing is currently becoming a primary endpoint for developing therapies in humans.⁴ In our study, we showed that endoscopy optimizes the detection of the disease onset and so has to develop and spread in experimental models of IBD, with specific endoscopic index of severity instead of clinical and histological evaluations. With a close endoscopic monitoring of mice, we were able to detect mucosal healing after treatment by 5-ASA in two experimental models of IBD. We noticed a mucosal recovery and the absence of ulceration in treated mice, whereas control mice worsened with deep ulcerations. Endoscopy can optimize the therapeutic window and can be used to developing and innovating therapies. Our data had to be tempered by the small number of treated mice during our experiments. Despite 5-ASA is an old and well known molecule, mucosal healing had to be also detected for more recent and effective compound like anti TNF agents.

Finally, correlations between CD, UC and experimental mouse models of IBD were so far difficult to establish on the basis of clinical symptoms and histological analysis. Of interest, lesions that we observed by endoscopy turned out to be very well correlated to histological analysis (example of ulcerations and fibrin in chronic DSS induced colitis). Thereby, matching clinical features, endoscopic and histological observations we attempted to establish a parallelism between mice and human pathology (**Table 1**). We observed similarities between UC and DSS-induced chronic colitis including superficial ulcerations (endoscopic and histological) and important bleedings. We also noted likenesses between CD and T cell transfer-induced colitis, and notably endoscopic and histological deep ulcerations and deep inflammatory cell infiltration, in spite of the presence of crypt abscesses, more associated to UC. No experimental model fully matches human IBD; however with these cumulative data on mouse models of IBD, we specified experimental models and brought more evidence for researchers to choose the suitable model for each experiment. In summary, flexible high resolution colonoscopies in mouse models of IBD provide a detailed and chronological description of mucosal lesions, including ulcerations and allow a screening of mucosal healing.

Table 1. Comparison of clinical, endoscopic and histological features between mouse experimental models and human IBD

	Mouse				Human	
	acute DSS	chronic DSS	TNB S	T cell- transfer	UC	CD
Clinical						
Time to onset	d5	d5	d2	d15	nd	nd
Diarrhea	+/-	+/-	-	++	++	+/-
General comportment	+	+	++	++	-	+
Bleeding	+/-	+	-	-	++	+/-
Endoscopy						
Time to onset	d3	d3	d1	d7	nd	nd
Edema	-	++	++	-	+	-
Bleeding	+	++	+/-	+/-	++	+/-
Ulceration	-	++	++	+/-	++	++
Thickening and fibrin	+/-	+/-	-	++	-	+
Histology						
Deepcell infiltration	+/-	-	++	++	-	++
Ulceration	+	++	++	+	++	+
Cryptabscess	-	-	-	+	+	-
Continuouslesion	-	-	-	+	+	-

DSS: dextran sodium sulfate; TNBS: 2,4,6-trinitrobenzensulfonic acid; UC: ulcerative colitis; CD: Crohn's disease; d: day; nd: non determined; -: not discriminating; $\pm$: partially discriminating; +: discriminating; ++: strongly discriminating.

Acknowledgments : We thank Dominique Paris and Francois Coulon for mice care. C.G. was supported by a 1-year medical fellowship of the CHRU of Besancon, France and O.M.R. was supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Funding This work was supported by the Etablissement Français du Sang [APR2016-02 to S.P.], the FHU INCREASE, the Agence Nationale de la Recherche [LabexLipSTIC, ANR-11-LABX-0021], and the Conseil Régional de Franche-Comté ["Soutien au LabEXLipSTIC", 2015-0084 & 2015-0069 to S.P.].

Conflicts of interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ananthakrishnan, A.N. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology***12**, 205-217 (2015).
2. Colombel, J.F., Louis, E., Peyrin-Biroulet, L., Sandborn, W.J. & Panaccione, R. Deep remission: a new concept? *Dig Dis***30 Suppl 3**, 107-111 (2012).
3. Sandborn, W.J. *et al.* Treating beyond symptoms with a view to improving patient outcomes in inflammatory bowel diseases. *Journal of Crohn's & colitis***8**, 927-935 (2014).
4. Peyrin-Biroulet, L. *et al.* Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO. I: Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & colitis***5**, 477-483 (2011).
5. Neurath, M.F. & Travis, S.P. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut***61**, 1619-1635 (2012).
6. Colombel, J.F. *et al.* Randomised clinical trial: deep remission in biologic and immunomodulator naive patients with Crohn's disease - a SONIC post hoc analysis. *Alimentary pharmacology & therapeutics***41**, 734-746 (2015).
7. Vuitton, L. *et al.* IOIBD technical review on endoscopic indices for Crohn's disease clinical trials. *Gut***65**, 1447-1455 (2016).
8. Buisson, A., Chevaux, J.B., Allen, P.B., Bommelaer, G. & Peyrin-Biroulet, L. Review article: the natural history of postoperative Crohn's disease recurrence. *Alimentary pharmacology & therapeutics***35**, 625-633 (2012).
9. Peyrin-Biroulet, L. *et al.* Surgery in a population-based cohort of Crohn's disease from Olmsted County, Minnesota (1970-2004). *The American journal of gastroenterology***107**, 1693-1701 (2012).
10. Niewiadowski, O. *et al.* Prospective population-based cohort of inflammatory bowel disease in the biologics era: Disease course and predictors of severity. *Journal of gastroenterology and hepatology***30**, 1346-1353 (2015).
11. Billioud, V., Sandborn, W.J. & Peyrin-Biroulet, L. Loss of response and need for adalimumab dose intensification in Crohn's disease: a systematic review. *The American journal of gastroenterology***106**, 674-684 (2011).
12. Gisbert, J.P. & Panes, J. Loss of response and requirement of infliximab dose intensification in Crohn's disease: a review. *The American journal of gastroenterology***104**, 760-767 (2009).
13. Neurath, M.F. Animal models of inflammatory bowel diseases: illuminating the pathogenesis of colitis, ileitis and cancer. *Dig Dis***30 Suppl 1**, 91-94 (2012).
14. Becker, C. *et al.* In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy. *Gut***54**, 950-954 (2005).
15. Neurath, M.F. *et al.* Assessment of tumor development and wound healing using endoscopic techniques in mice. *Gastroenterology***139**, 1837-1843 e1831 (2010).
16. Becker, V. *et al.* High-resolution miniprobe-based confocal microscopy in combination with video mosaicing (with video). *Gastrointestinal endoscopy***66**, 1001-1007 (2007).
17. Waldner, M.J., Wirtz, S., Neufert, C., Becker, C. & Neurath, M.F. Confocal laser endomicroscopy and narrow-band imaging-aided endoscopy

- for in vivo imaging of colitis and colon cancer in mice. *Nature protocols***6**, 1471-1481 (2011).
18. Mielke, L., Preaudet, A., Belz, G. & Putoczki, T. Confocal laser endomicroscopy to monitor the colonic mucosa of mice. *Journal of immunological methods***421**, 81-88 (2015).
 19. Walldorf, J. *et al.* In-vivo monitoring of acute DSS-Colitis using Colonoscopy, high resolution Ultrasound and bench-top Magnetic Resonance Imaging in Mice. *European radiology***25**, 2984-2991 (2015).
 20. Brenna, O. *et al.* Relevance of TNBS-colitis in rats: a methodological study with endoscopic, histologic and Transcriptomic [corrected] characterization and correlation to IBD. *PloS one***8**, e54543 (2013).
 21. Huang, E.H. *et al.* Colonoscopy in mice. *Surgical endoscopy***16**, 22-24 (2002).
 22. Kodani, T. *et al.* Flexible colonoscopy in mice to evaluate the severity of colitis and colorectal tumors using a validated endoscopic scoring system. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e50843 (2013).
 23. Best, W.R., Beckett, J.M., Singleton, J.W. & Kern, F., Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology***70**, 439-444 (1976).
 24. Peyrin-Biroulet, L. *et al.* Clinical disease activity, C-reactive protein normalisation and mucosal healing in Crohn's disease in the SONIC trial. *Gut***63**, 88-95 (2014).
 25. Ravnic, D.J. *et al.* Murine microvideo endoscopy of the colonic microcirculation. *The Journal of surgical research***142**, 97-103 (2007).
 26. Hamilton, M.J. *et al.* Essential role for mast cell tryptase in acute experimental colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***108**, 290-295 (2011).
 27. Mary, J.Y. & Modigliani, R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). *Gut***30**, 983-989 (1989).
 28. Travis, S.P. *et al.* Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut***61**, 535-542 (2012).
 29. Peyrin-Biroulet, L. Defining Severity in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & hepatology***11**, 474-476 (2015).
 30. Grau, A., Tabib, A., Grau, I., Reiner, I. & Mevorach, D. Apoptotic cells induce NF-kappaB and inflammasome negative signaling. *PloS one***10**, e0122440 (2015).
 31. Khokha, R., Murthy, A. & Weiss, A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nature reviews. Immunology***13**, 649-665 (2013).
 32. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L. & Powrie, F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine***190**, 995-1004 (1999).
 33. Ostanin, D.V. *et al.* T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology***296**, G135-146 (2009).

34. Anon La désinfection du matériel en endoscopie digestive - Desinfectmat_endodig.pdf. Available at: http://www.sfed.org/sites/sfed.prod/files/documents_sfed/files/recommandations/Desinfectmat_endodig.pdf.(2015).

II : Evaluation des facteurs issus de l'efferocytose comme médicament innovant dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Dans la littérature, il a été suggéré qu'une défaillance dans la résolution de l'inflammation pouvait être à l'origine des MICI (Nathan and Ding 2010; Steinbach and Plevy 2014). L'objectif thérapeutique majeur actuel dans le traitement de MICI est la modulation durable de l'inflammation digestive permettant d'établir et maintenir une cicatrisation muqueuse et une réparation tissulaire à long terme. Les biothérapies représentent une révolution thérapeutique dans la prise en charge de ces patients, cependant, un tiers des patients sont non répondeurs aux anticorps anti-TNF α , et un tiers des répondeurs auront une perte de réponse au traitement au cours du temps (Rutgeerts, Feagan et al. 2004; Colombel, Sandborn et al. 2010). De plus, ces biothérapies présentent de nombreux effets indésirables, comme un risque augmenté d'infections opportunistes sévères, et un risque augmenté de cancers, notamment cutanés et lympho-prolifératifs, à long terme (Lichtenstein, Feagan et al. 2006; Lichtenstein, Feagan et al. 2012), d'ici l'importance de développer des nouvelles thérapies.

Le processus de résolution en condition homéostatique et plus précisément l'élimination de cellules apoptotiques par les phagocytes semble permettre le contrôle de la réponse inflammatoire et la restauration de l'intégrité tissulaire. Dans ce contexte, nous avons évalué l'effet thérapeutique et les mécanismes liés à l'injection des facteurs pro-résolutifs issus de l'efferocytose dans le modèle de colite induite par transfert de lymphocytes T naïfs, caractérisé dans l'étude précédente.

Nous montrons ainsi que l'injection de SuperMApo permet de contrôler le score clinique et endoscopique de souris colitiques. Cette amélioration est liée à une nette amélioration de la cicatrisation de la muqueuse intestinale et notamment de la barrière intestinale épithéliale *in vivo*. SuperMApo permet une polarisation des fibroblastes et des IEC vers un profil cicatrisant réparateur en stimulant notamment leurs capacités migratoires et prolifératives. De plus, ce sécrétome semble induire la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et d'augmenter leur capacités contractile. Au sein de SuperMApo, les facteurs de croissance TGF β , l'IGF-I et VEGF jouent un rôle primordial dans la polarisation vers un profil réparateur des fibroblastes et des IEC. Dans leur ensemble, ces travaux démontrent que l'injection de facteurs pro-résolutifs issus de l'efferocytose permet de diminuer les symptômes cliniques et endoscopiques d'une colite en cours, en améliorant les capacités réparatrices des principales cellules en charge de la réparation tissulaire. Ces travaux devraient aussi permettre

le développement pharmaceutique du médicament SupeMApo afin de le proposer comme nouvelle option thérapeutique dans le traitement des MICI, et notamment dans la maladie de Crohn.

Efferocytosis factor infusion therapy dampens inflammation and promotes healing of the intestinal mucosa

Omayra Martin-Rodriguez¹, Thierry Gauthier¹, Anna Daoui^{1,#}, Francis Bonnefoy¹, Cécile Chague¹, Séverine Valmary-Degano², Claire Gay³, Philippe Saas¹, Mélanie Couturier¹ and Sylvain Perruche^{1,#}

¹Université Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, Fédération Hospitalo-Universitaire INCREASE, LabEx LipSTIC, F-25000 Besançon, France; ²Besancon University Hospital, Pathology department, F-25000 Besançon, France; ³Besancon University Hospital, Gastroenterology department, F-25000 Besançon, France.

[#]Current addresses: A.D., Animal Facility, Medical School Department, University of Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France; S.P., MED'INN'Pharma, Besancon, France.

*Correspondence should be addressed to S.P. (sylvain.perruche@inserm.fr)

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) demonstrates evidences of resolution dysregulation. Efferocytosis is mandatory for resolution achievement through the release of pro-resolutive factors. Here we demonstrated that injection of efferocytosis factors (or SuperMApo for *supernatant issued from macrophages and apoptotic cell culture*) significantly decreases clinic, endoscopic and histologic colitis scores in an ongoing experimental model of IBD. Improvement in intestinal permeability and mucosal healing was observed as well. Indeed, mucosal healing was enhanced through fibroblasts and intestinal epithelial cell modulation which gained in proliferation, contractility and migration properties. In particular, TGFβ, IGF-I and VEGF growth factors contained in SuperMApo were responsible for enhanced healing properties. Altogether, these data demonstrate for the first time the beneficial role of the pro-resolutif efferocytosis secretome to both control intestinal inflammation and enhance tissue repair, therefore highlighting SuperMApo as a new therapeutic option in the treatment of IBD.

Introduction

The pathogenesis of inflammatory bowel diseases (IBD) is caused by the interplay of many factors involving a dysregulated response in the innate and adaptive immune system, as well as the intestinal epithelium and endothelium. The resolution of inflammation is a coordinated and active process aiming to control and eliminate the threat and restore tissue integrity and function¹. Under normal homeostatic conditions, once innate cells and in particular neutrophils have control and eliminate the menace, they undergo apoptosis at the inflamed site², which attacked monocytes and, together with tissue resident phagocytes, monocytes-derived macrophages cleared apoptotic cells by a process called efferocytosis³. In addition to a lipid shift, efferocytosis triggers resolution, favoring homeostasis and tissue repair. Factors produced during efferocytosis will promote wound repair which consists on a balance between migration, proliferation and differentiation of different cell types including macrophages, fibroblasts and intestinal epithelial cells (IEC)^{4, 5}. While the secretome issued from efferocytosis demonstrate the capability to terminate inflammation and restore tissue homeostasis, these factors have never been addressed for their therapeutic properties in the treatment of IBD.

The principal goal of the current treatments in IBD is to avoid intestinal destruction, stop inflammation, and promote regeneration of the intestinal mucosa (called “mucosal healing”). These treatments may achieve to obtain long-term remission and avoid surgery⁶⁻⁹. In this context, new cell-based therapies are emerging, such as regulatory T cell therapy¹⁰. Thus, we speculated that SuperMApo which contains important quantities of pro-resolutive factors like TGF β would ameliorate inflammation and stimulate tissue repair in experimental colitis models.

Here we provide evidences that reintroducing efferocytosis factors, called here SuperMApo, allowed to control inflammation and enhanced mucosal healing in experimental models of colitis. This was supported in part through fibroblasts and IECs, which acquired pro-resolutive properties during ongoing inflammation. We show that the growth factors like TGF β , IGF-I and VEGF part of SuperMApo strongly mediated recovery and mucosal healing *in vivo* reliving the importance of these factors in the tissue repair process after treatment. Our findings reveal that SuperMApo is an important modulator of inflammation and mucosal healing promoting mechanisms that restore the intestinal epithelial lining and mucosal integrity, and suggest this secretome as a therapeutic potential in the treatment of IBD.

Results

Efferocytosis factors trigger healing properties in myofibroblasts and epithelial cells

We first evaluate primary fibroblast response to efferocytosis factors, first in term of activation. We first observed that fibroblasts purified from the colon expressed α -SMA in the presence of efferocytosis factors (**Fig. 1a**), attesting of fibroblast activation. In contrast, decreased mRNA levels of extracellular matrix-associated genes coding for fibronectin, collagen type I and III (*Fn1*, *Colla1* and *Col3a1*, respectively) were observed (**Fig. 1b**). In the presence of efferocytosis factors, fibroblasts demonstrated an enhanced proliferation (**Supplementary Fig. 1d**), and increased migratory properties (**Supplementary Fig. 1e**). This was further confirmed in a scratch assay where fibroblasts demonstrated enhanced wound healing properties in the presence of SuperMApo (**Fig. 1e**). Because wound healing implicates the contraction of myofibroblasts^{4, 11}, we addressed this properties using floating collagen gel containing fibroblasts and demonstrated that SuperMApo strongly increased fibroblast contraction capacities (**Fig. 1d**). Concerning epithelial cells, the second major cell type involved in wound healing, the similar gain in healing properties was observed using the MODE-K intestinal immortalized epithelial cell line, notably increased proliferation and migratory capacities, as well as an increased wound closure capacity (**Supplementary Fig. 1a-c**). In addition to enhanced wound healing capacities, MODE-K epithelial cells in the presence of SuperMApo acquired phagocytic capacities and thus engulfed apoptotic cells (**Fig. 1e**). The data demonstrate that efferocytosis factors facilitate the acquisition of wound healing properties to intestinal fibroblasts and epithelial cells, in addition to phagocytic capacities to intestinal epithelial cells.

Efferocytosis growth factors TGF β , IGF-I and VEGF consent wound healing properties to intestinal epithelial cells and fibroblasts

Wound repair macrophages are characterized by their production of numerous growth factors¹² and they might derived from resolute macrophages clearing apoptotic cells. We therefore addressed whether SuperMApo contained growth factors and whether they would provide fibroblasts and epithelial cells with pro-healing properties. First, TGF β , IGF-I and VEGF were quantified in SuperMApo in significant higher quantities than in the supernatant of macrophages or in the one from apoptotic cells, and EGF and FGF were never detected

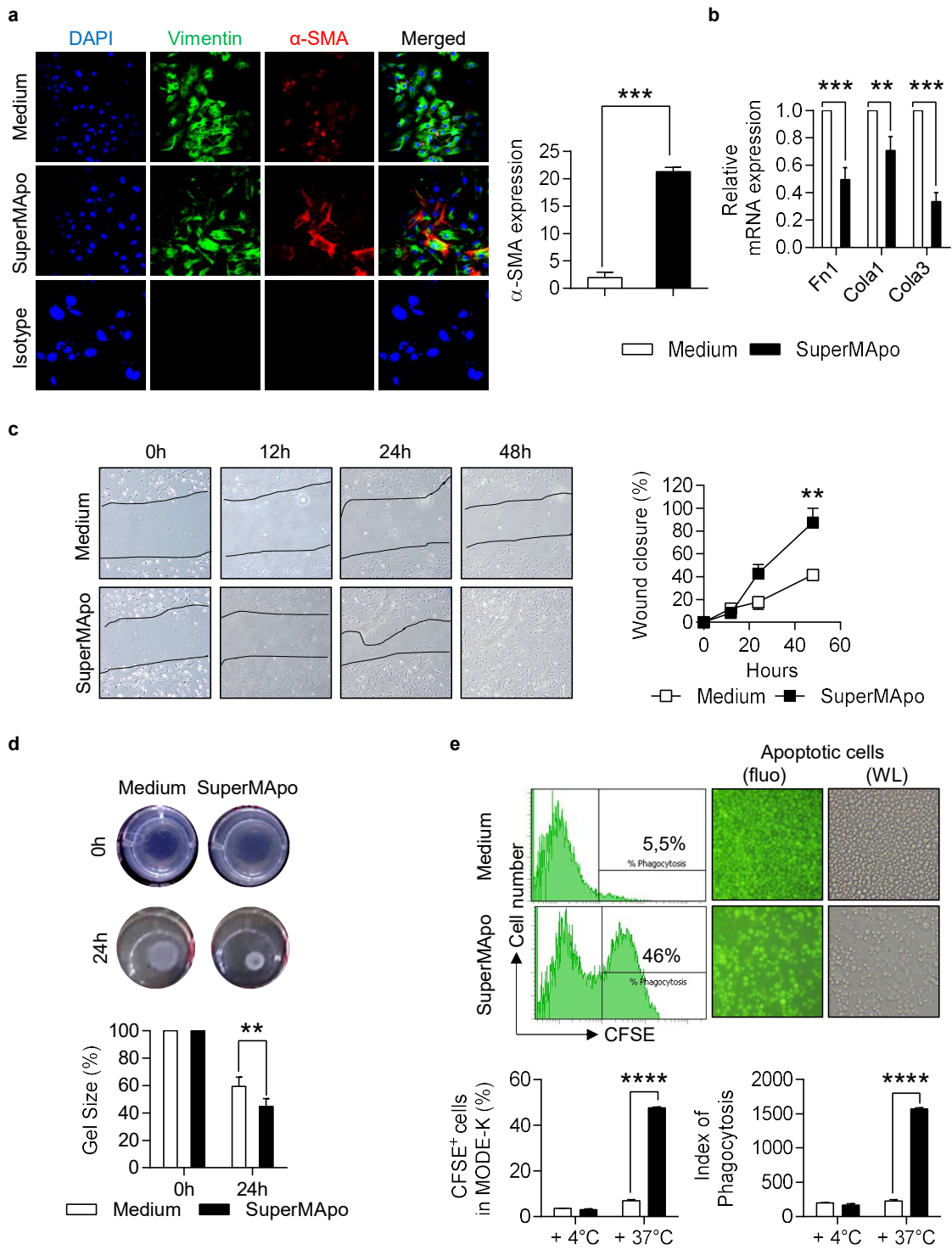
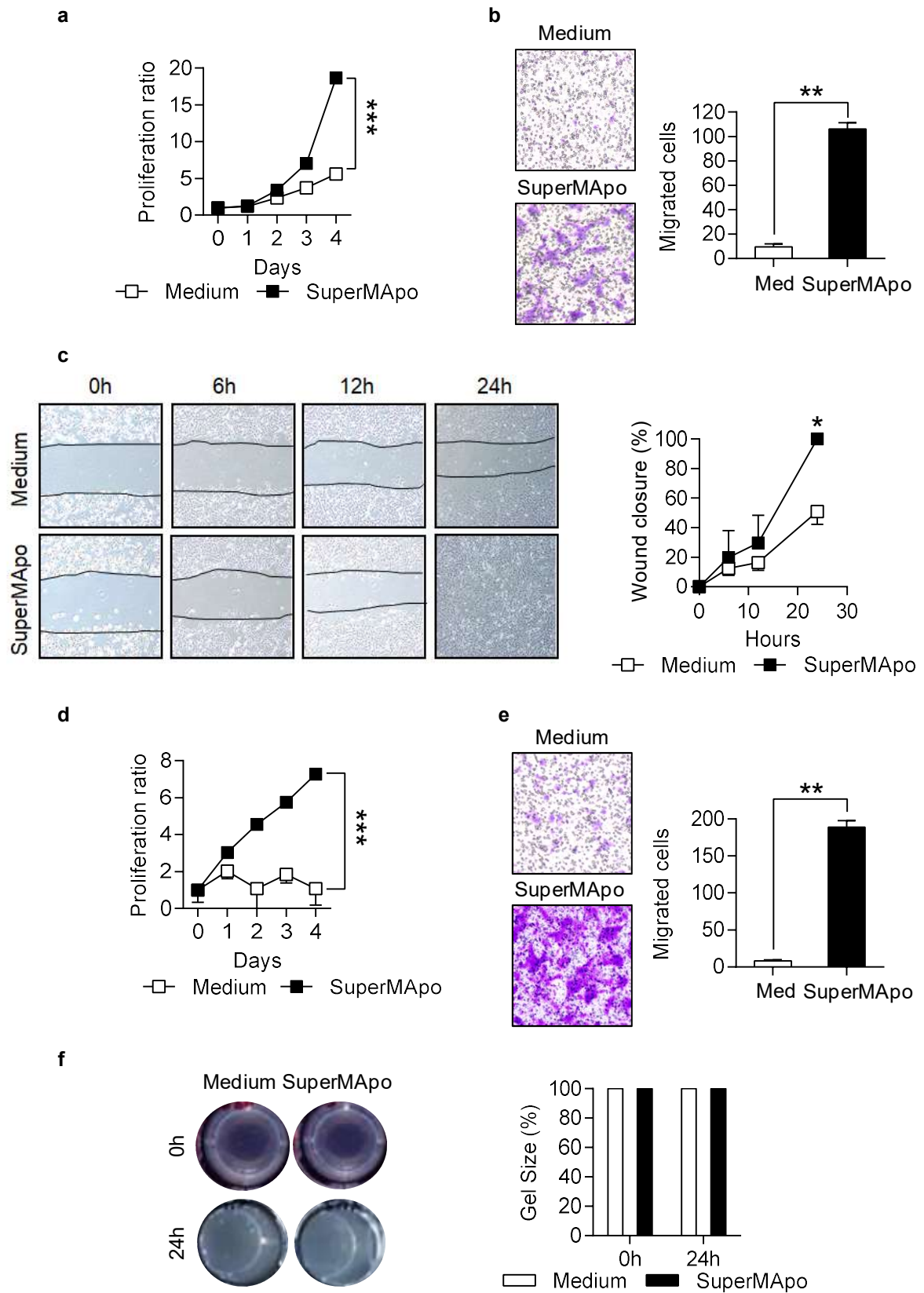


Figure 1: Efferocytosis factors induce pro-repair properties in colonic fibroblasts and in epithelial cell line. (a) Immunofluorescence expression of vimentin, alpha-smooth muscle actine (α -SMA) and DAPI staining in primary fibroblasts from colon tissue grown in control medium (X-VIVO™) or with SuperMApo. Representative pictures are given as well as cumulated data representative from three independent experiments, as mean $\pm$ s.e.m *** $P < 0.001$ (unpaired student's t test). (b) mRNA expression of collagen type I (Col1a1), and III (Col3a1) and fibronectin (Fn1) in fibroblasts cultured in medium or with SuperMApo for 24 h. Data are expressed as mean of duplicate per group $\pm$ s.e.m from three independent experiments pooled together. *** $P < 0.001$ (unpaired student's t test). (c) Migration of fibroblasts in wound-healing scratch assays in control medium or in the presence of SuperMApo. Data are expressed as mean of duplicated per group $\pm$ s.e.m. from one representative experiment out of three independent experiments. ** $P < 0.01$ (two-way ANOVA with Bonferroni post-test). (d) Contraction of fibroblasts in collagen gels containing medium or SuperMApo. Representative pictures are shown, as well as cumulated data as mean $\pm$ s.e.m. from one representative experiment out of three independent experiments. ** $P < 0.01$ (two-way ANOVA with Bonferroni post-test). (e) Engulfment of apoptotic cells by MODE-K cell line determined by FACS after 6h of co-culture I control medium or in SuperMApo. Data are expressed as mean of duplicated per group $\pm$ s.e.m. from one representative experiment out of three independent experiments; **** $P < 0.0001$ (nonparametric Mann-Whitney test).

Supplementary Figure 1: SuperMApo activated pro-repair properties of MODE-K cell line and fibroblasts *in vitro*. Intestinal epithelial MODE-K cell line grown in standard cell culture conditions. (a) MODE-K cell line was treated with Meidum (X-VIVO™) or SuperMApo and cell proliferation was monitored by MTT assay for 4 days. Data are expressed as mean of 8 replicates per group $\pm$ s.e.m. Data are representative of three independent experiments; ***= $p < 0.001$ (two-way analysis of variance with Bonferroni post-test). (b) Migration of MODE-K cell line treated with X-VIVO™ or SuperMApo was determine by trans-wells membranes assay during 24h and (c) by *in vitro* wound-healing scratch assay at 0h,6,12h and 24h. Data are expressed as mean of duplicated per group $\pm$ s.e.m. Data are representative of three independent experiment; **= $p < 0.01$ (nonparametric Mann-Whitney test) *= $p < 0.05$ (two-way analysis of variance with Bonferroni post-test). (d) Proliferation of fibroblasts was monitored by MTT assay for 4 days. Data are expressed as mean of 8 replicates per group $\pm$ s.e.m. Data are representative of three independent experiments; ***= $p < 0.001$ (two-way analysis of variance with Bonferroni post-test). (e) Migration of fibroblasts was determined by trans-wells membranes assay during 24h. Data are expressed as mean of duplicated per group $\pm$ s.e.m. Data are representative of three independent experiments. **= $p < 0.01$ (nonparametric Mann-Whitney test). (d) Collagen gel contraction by medium or SuperMApo without cells. Data are representative of one independent experiment.

ON THE NEXT PAGE



Supplementary Figure 1

(**Fig. 2a**). Interestingly, blocking TGF β or VEGF prevented SuperMApo-induced α -SMA expression in primary fibroblasts (**Fig. 2b**) and did not modify *Colla1*, *Col3a1* or *Fnl* mRNA expression (**Supplementary Fig. 2a**). While SuperMApo-induced proliferation was discreetly lowered by IGF-I or TGF β neutralization with MODE-K but not with fibroblasts (**Supplementary Fig. 2b**), cell migration induced by SuperMApo was strongly reduced with the neutralization of TGF β , IGF-I or VEGF in fibroblasts and intestinal epithelial cells (**Fig. 2c**). Fibroblast contractility enhanced by SuperMApo was not affected by TGF β , IGF-I or VEGF blockage (**Supplementary Fig. 2c**). The data demonstrate that the growth factors TGF β , IGF-I and VEGF produced during efferocytosis enhance fibroblast differentiation into myofibroblasts and, fibroblast and epithelial cell migration. The data demonstrate as well that fibroblast and epithelial cell enhanced proliferation is not dependent on TGF β , IGF-I and VEGF, but probably on other efferocytosis factors. Together the data highlight that efferocytosis factors are able to promote healing notably triggering fibroblast and epithelial cell wounding properties.

SuperMApo injection promotes mucosal wound healing and modulates ongoing intestinal inflammation

The properties of efferocytosis factors (i.e. SuperMApo) to enhance fibroblast and epithelial cell wound healing properties were thus addressed *in vivo*, in healing colonic mucosa wound induced using biopsy forceps. Through video colonoscopy we observed that SuperMApo i.p. injection significantly accelerated wound healing in the colon mucosa, compared to control mice receiving vehicle (**Fig. 3a**). Since resolutive factors are considered to promote inflammation termination as well, we then challenged SuperMApo injection in the model of naïve T cell transfer-induced colitis. SuperMApo was injected twice i.p. (with 48 h of interval) in colitis mice presenting a murine endoscopic index of clinical severity (MEICS) score of 6-7 out of 15. Soon after injection, the progression of colonic lesion was stopped (**Fig. 3b**) whereas aggravated mucosal inflammation was observed in vehicle-treated mice showing a thickening of the colon mucosa, increased granularity, highly fibrin deposition and thinner and tortuous blood vessels SuperMApo injection also prevented colitis mice from weight loss and strongly reduced the colitis clinical score (**Fig. 3c,d**). In line with this, macroscopic examination revealed a reduced colon inflammation, as attested by a higher length, compared to vehicle-treated mouse colons which were severely inflamed, hyperemic and with fewer feces due to massive diarrhea (**Fig. 3e**).

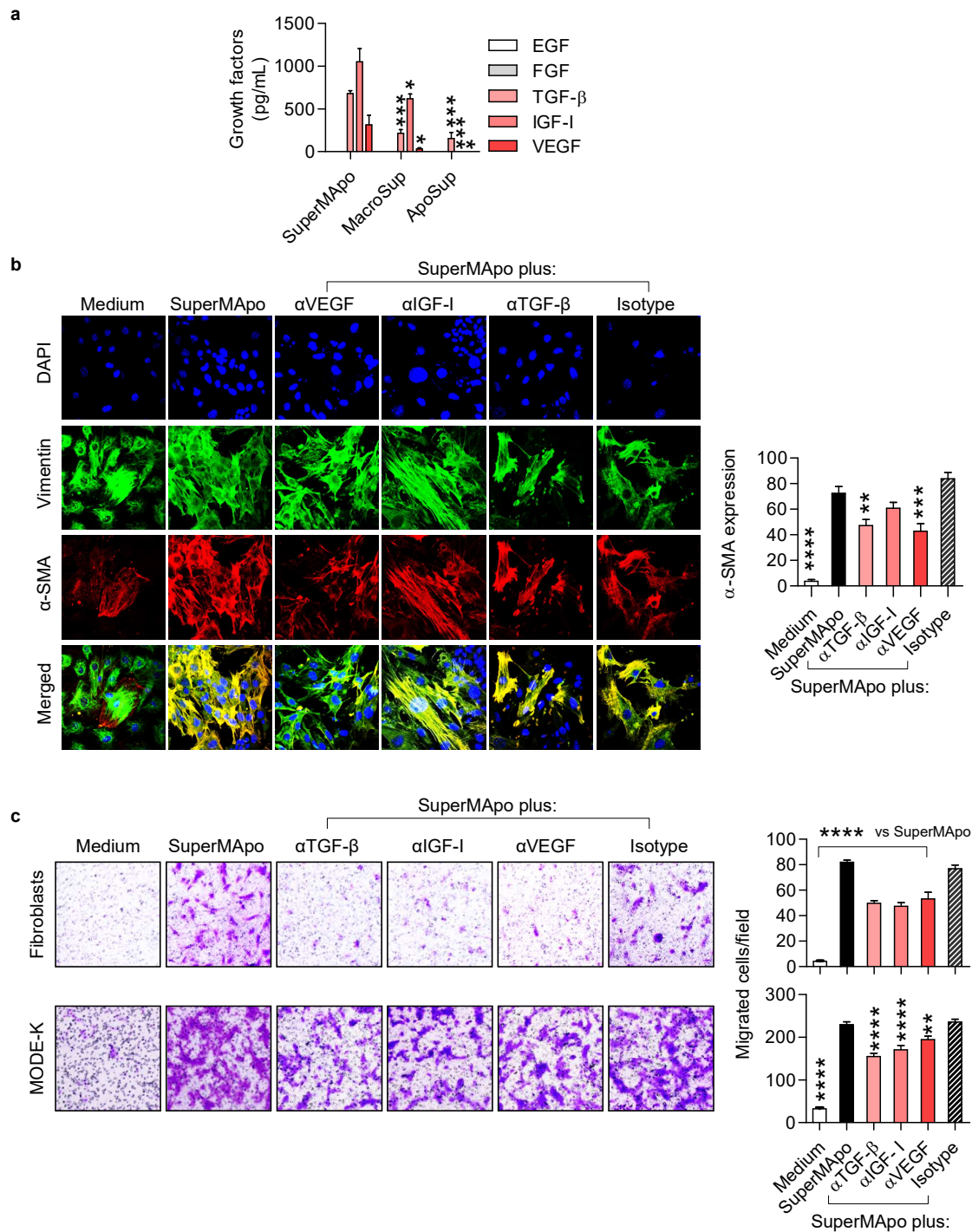
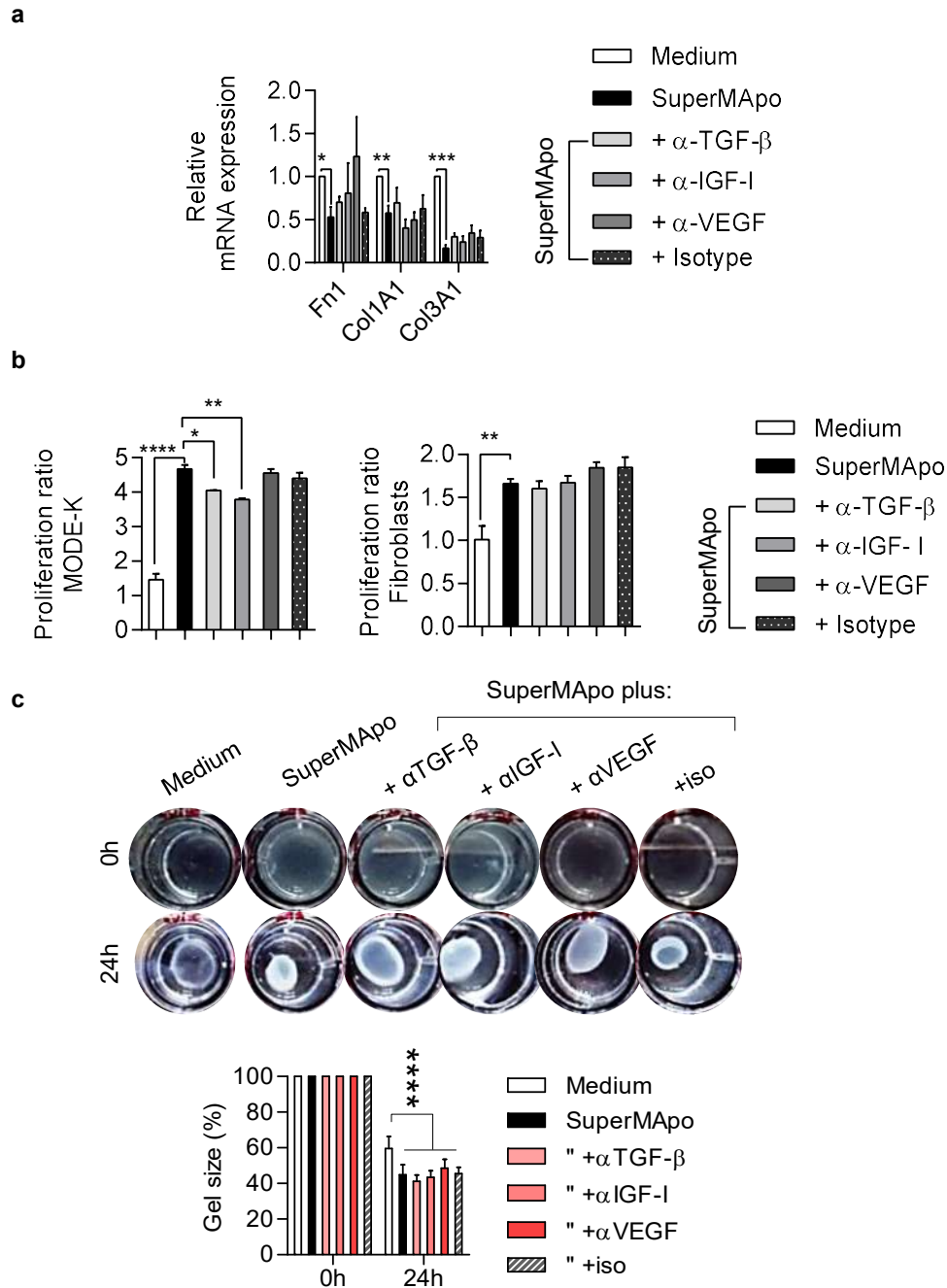


Figure 2: Pro repair properties of fibroblasts and MODE-K *in vitro* are slightly regulated by growth factors contains in SuperMApo. (a) Peritoneal macrophages release TGFβ, IGF-I and VEGF, during apoptotic cell clearance was quantified by ELISA. Data are representative of pool of six independents experiments; ** = $p < 0.01$ (nonparametric student's t test). Primary fibroblasts were harvested from uninflamed mice colon mucosa and MODE-K grown in standard cell culture conditions. (b) Primary colonic fibroblasts from wild type mice received medium or SuperMApo, with or without different neutralizing growth factors antibodies (α -TGFβ, α -IGF-I, and α -VEGF) and differentiation of fibroblasts into myofibroblasts were determine by quantification of α -SMA expression by confocal. Data are expressed as mean of 3 replicates per group $\pm$ s.e.m. ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ (Unpaired student's t test). (c) Fibroblasts and MODE-K were incubated with medium or SuperMApo in presence or not of different growth factors blocking antibodies and migration was determined by trans-wells membranes assay during 24h. Data are expressed as mean of duplicated per group $\pm$ s.e.m. Data are representative of three independent experiments. ** = $p < 0.01$, **** = $p < 0.0001$ (nonparametric Mann-Whitney test).



Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 2: Pro-repair properties in fibroblasts as ECM gene expression, proliferation or contraction *in vitro* are not regulated by growth factors contains in SuperMApo. Primary fibroblasts were harvested from uninflamed mice colon mucosa and grown in standard cell culture conditions. Primary colonic fibroblasts from wild type mice were treated with medium or SuperMApo, with or without different neutralizing growth factors antibodies (α -TGF β , α -IGF-I, and α -VEGF). **(a)** mRNA expression levels of Collagen type I (Col1a1), Collagen type III (Col3a1) and Fibronectin (Fn1) was analyzed by RT-qPCR. Data are expressed as mean of duplicate per group $\pm$ s.e.m. Pool of data from three independent experiments, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ (Unpaired student's t test). **(b)** Proliferation of fibroblasts and MODE-K were monitored by MTT assay for 4 days. Data are expressed as mean of 3 replicates per group $\pm$ s.e.m. Data are representative of three independent experiments; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$, **** = $p < 0.0001$ (two-way analysis of variance with Bonferroni post-test). **(c)** Collagen gel contraction. Data are representative of three independent experiment; **** = $p < 0.01$ (two-way analysis of variance with Bonferroni post-test).

Histologically, we observed reduced inflammatory cell mucosal infiltration and tissue damage in SuperMApo-treated mice (**Fig. 3f**). So far the data demonstrated that the injection of efferocytosis factors terminated ongoing colitis and enhanced colon healing. The colitis therapeutic properties of SuperMApo were further challenged in the model of dextran sulfate sodium (DSS)-induced chronic colitis. SuperMApo treatment at the time of colitis induction induced a strong reduction of the clinical score with a null clinical score observed at day 50, 48 days after treatment (**Supplementary Fig. 3a**). SuperMApo treatment demonstrated a significant improvement of colonic lesions notably in thickening and integrity of the mucosa, whereas vehicle-treated mice exhibited presence of fibrin, thickened and bleached mucosa with spontaneous bleeding, superficial ulceration and edema (**Supplementary Fig. 3b**). Weight loss was strongly prevented during the first peak of the disease after the first DSS cycle, and at day 50 colitis mice receiving SuperMApo demonstrated a superior weight, but not significant than vehicle-treated colitis mice (**Supplementary Fig. 3c**). Macroscopic and histologic examinations confirmed mucosa improvement in mice receiving SuperMApo (**Supplementary Fig. 3d,e**). Altogether our data demonstrate that the injection of efferocytosis factors strongly alters ongoing colitis and enhanced mucosal lesion healing.

SuperMApo treatment triggers epithelial cells and fibroblasts to restore intestinal barrier integrity

Intestinal permeability is a key event in IBD pathogenesis¹³ thus, FITC-Dextran was given orally and quantified in the serum of mice with T cell-induced colitis at different time points. We observed that the systemic levels of FITC-Dextran were significantly low in SuperMApo-treated colitis mice compared to controls (**Fig. 4a**). This attests for a regain in permeability of the mucosa as supported by a low MEICS score (**Fig. 3b**). Quantification of the regenerating islet-derived protein 3 γ (REG3 γ), a marker of intestinal barrier integrity^{14, 15}, was also reduced in colitis mice treated with SuperMApo (**Fig. 4b**). These first data support the restoration of the intestinal permeability by efferocytosis factors injection. At the colon mucosa of colitis mice treated with SuperMApo, a marked proliferation of intra-epithelial cells (IECs) and an increased expression of α -SMA in colonic fibroblasts were observed, compared to control mice (**Fig. 4c,d**), supporting restoration of the intestinal barrier. Interestingly, SuperMApo treatment markedly decreased colon mRNA expression of fibronectin, collagen type I and III extracellular matrix-associated genes as well as of TGF β which is an inducer of the previous (**Fig. 4e**). Thus, our data demonstrate that SuperMApo injection facilitates colitis treatment

with the restoration of the intestinal permeability through facilitating fibroblast activation and the proliferation of IECs.

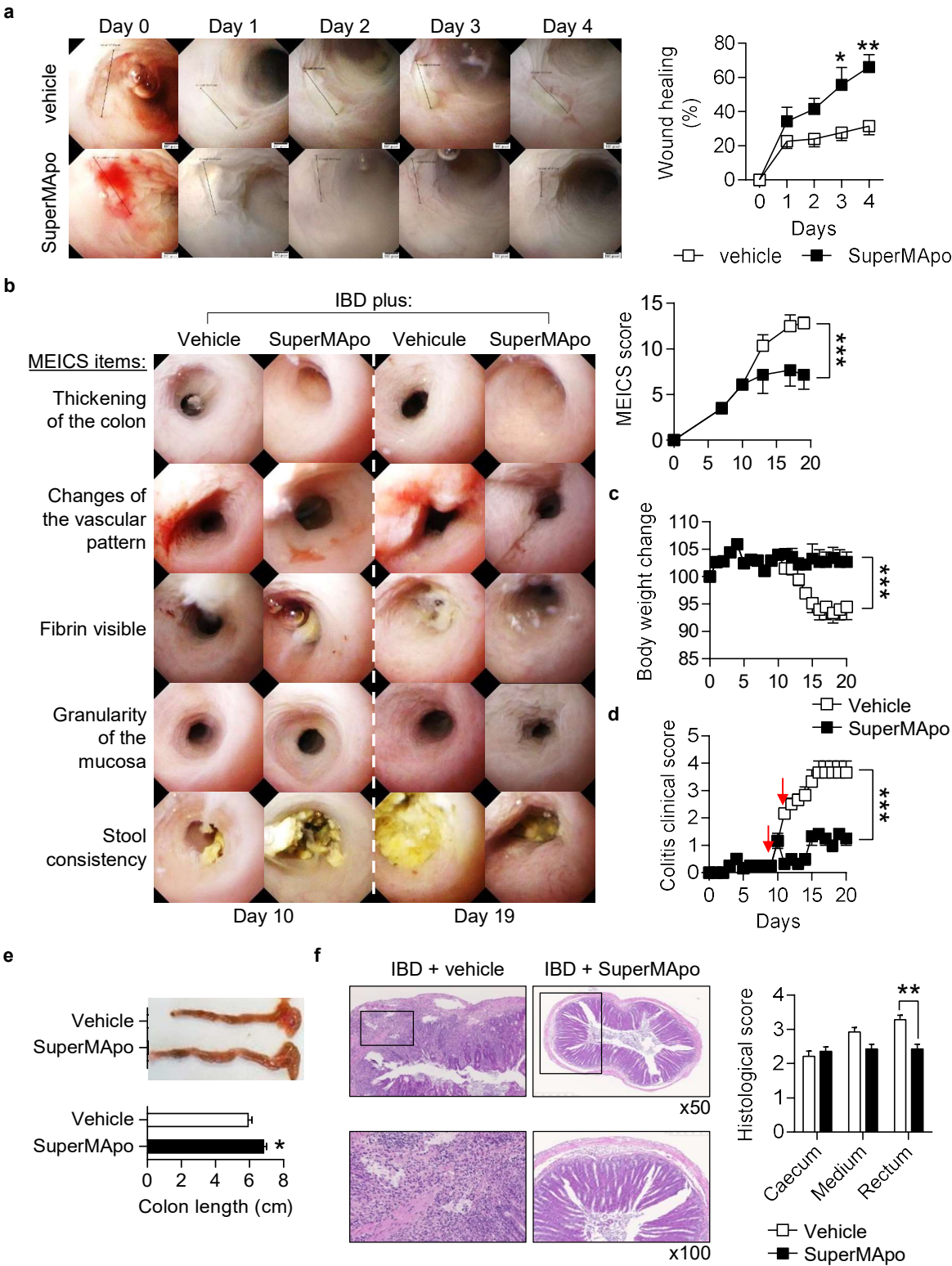
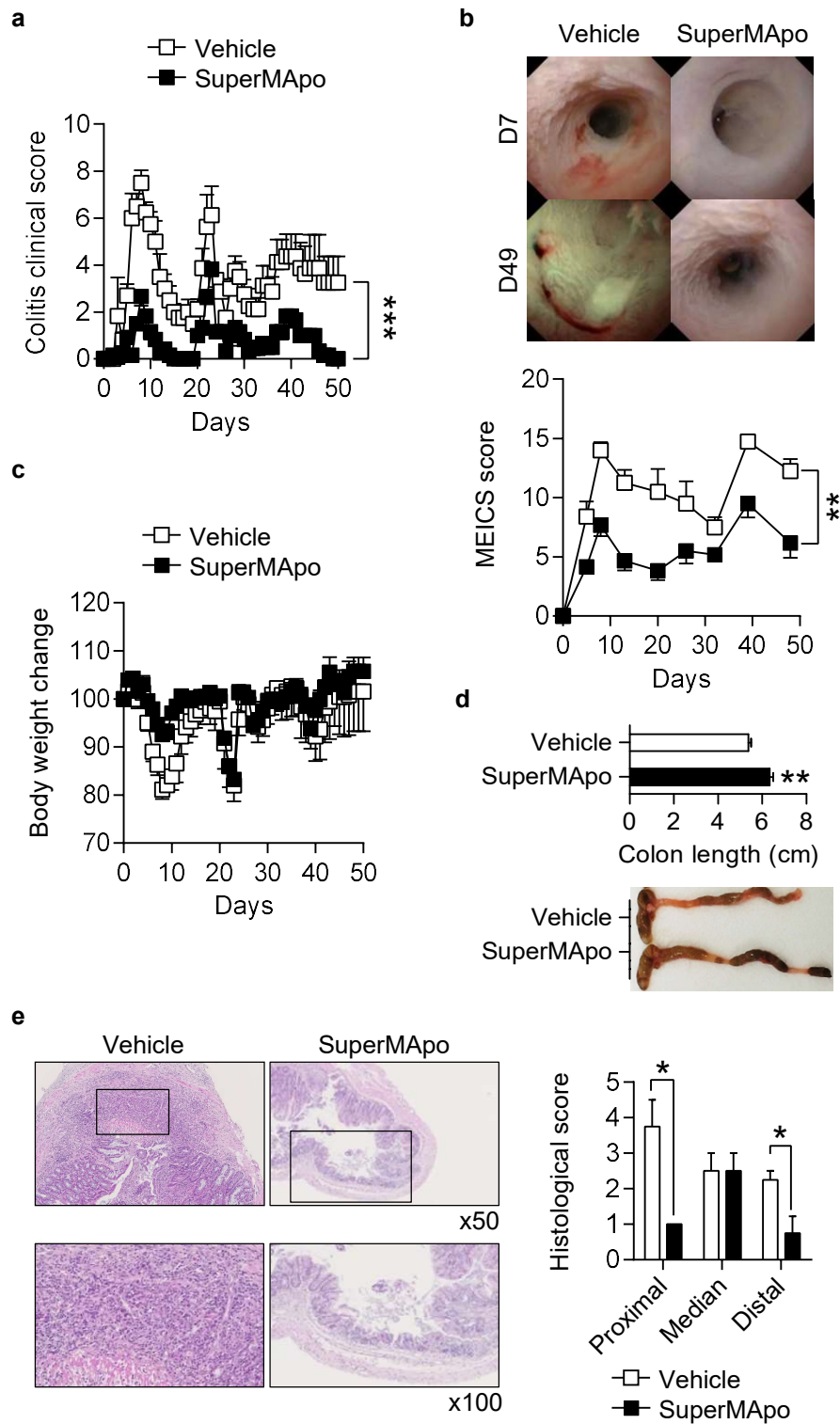


Figure 3: Efferocytosis pro-resolutif factors promote mucosal wound healing *in vivo* and attenuate experimental colitis. (a) In vivo wounding in the colon was elicited by targeted biopsies in wild type C57BL/6 treated with X-VIVO™ (vehicle) or SuperMApo. Mucosal healing was monitored by mini colonoscopy. Arrows highlight the margins of the mucosal lesions. Representatives' images are displayed from day 0 to day 4. Data are representatives of three independent experiments. Data are expressed as mean of group $\pm$ s.e.m from 5 to 6 animals per groups; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ (two-way analysis of variance with Bonferroni post-test). Colitis was induced by transfer of naïve CD4+CD25-CD45RBhi T cells into C57BL6/ Rag 2^{-/-} mice, when they showed an MEICS score of 6-7, the mice were treated twice by SuperMApo or vehicle at 48h of interval and monitored daily. Mice were scarified at 10 days after SuperMApo treatment and compared with vehicle treated mice. (b) Endoscopic assessment according to the murine endoscopic index of colitis severity (MEICS). Representative's images of mini colonoscopy at day 19 on left. (c) Clinical score changes and (d) body weight loss among T cell transfer induced colitis groups (b-d) Data are expressed as mean of group $\pm$ s.e.m from 5 to 6 animals per groups. Data are representative of three independent experiments; *** = $p < 0.001$ (two-way analysis of variance with Bonferroni post-test). (e) Colon length (cm) and representative colon images in Vehicle and SuperMApo treated mice. Data are expressed as mean of group $\pm$ s.e.m from 5 to 6 animals per groups. Data are representative of three independent experiments; * = $p < 0.05$ (nonparametric Mann-Whitney test). (f) Representative H&E staining of paraffin-embedded sections of the colonic tissues from vehicle and SuperMApo treated mice. Histological scores are shown on right. Data are expressed as mean of group $\pm$ s.e.m from 5 to 6 animals per groups. Pool of three independent experiments; * = $p < 0.05$ (nonparametric Mann-Whitney test).

Supplementary Figure 3: SuperMApo modulates the severity of Dextran sodium sulfate (DSS) induced chronic colitis. Mice were subjected to three cycles of DSS (3% w/v) drinking water (7 days/cycle) followed by regular drinking water (10 days/cycle) into C57BL6 mice. The mice were treated at J0 twice by SuperMApo at 48h of interval and monitored daily. Mice were analyzed at day 50 after SuperMApo treatment and compared with vehicle treated mice. (a) Clinical score changes and (c) body weight loss among DSS induced colitis groups. Body weight did not differ significantly among control groups. (b) Endoscopic assessment according to the murine endoscopic index of colitis severity (MEICS). Representative's images of mini colonoscopy at day 49 on right. (a-c) Data are expressed as mean of group $\pm$ s.e.m from 5 to 6 animals per groups. Data are representative of two independent experiments; *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$ (two-way analysis of variance with Bonferroni post-test). (d) Colon length (cm) and representative colon images in vehicle and SuperMApo treated mice. Data are expressed as mean of group $\pm$ s.e.m from 5 to 6 animals per groups. Data are representative of two independent experiments; * = $p < 0.05$ (nonparametric Mann-Whitney test) (e) Representative H&E staining of paraffin-embedded sections of the colonic tissues from vehicle and SuperMApo treated mice observed at x50 magnifications. Histological scores are shown on right. Data are expressed as mean of group $\pm$ s.e.m from 5 to 6 animals per groups. Data are representative of one independent experiments; *** = $p < 0.001$; * = $p < 0.05$ (nonparametric Mann-Whitney test).

ON THE NEXT PAGE



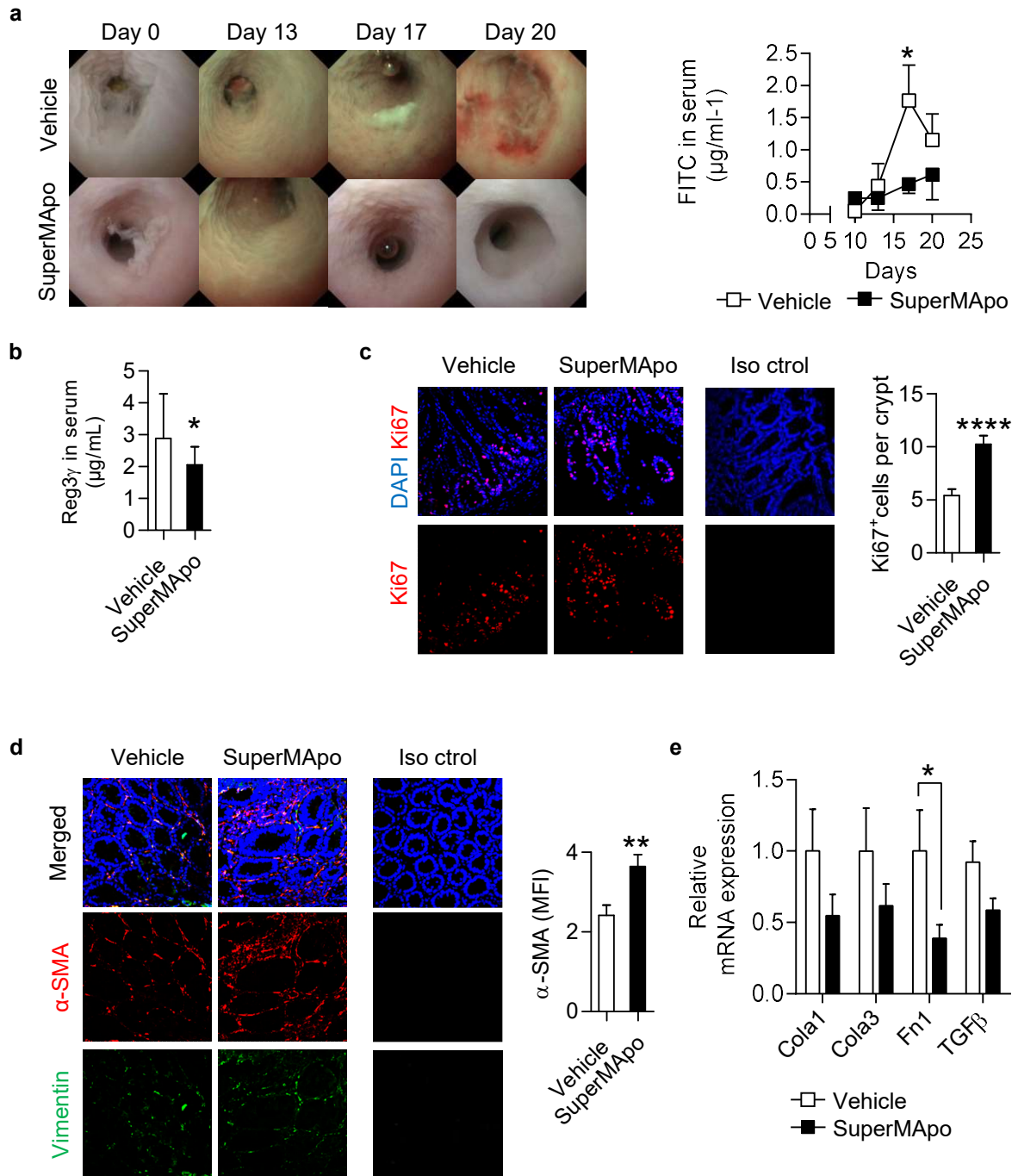
Supplementary Figure 3

SuperMApo-induced intestinal mucosa healing depends on growth factors

Since TGF β , IGF-I and VEGF growth factors within SuperMApo enhanced fibroblast differentiation and epithelial cell migration, we depleted TGF β , IGF-I and VEGF from SuperMApo before its injection in T cell-induced colitis mice. Interestingly, whereas mucosa lesion healing induced by SuperMApo treatment was strongly abrogated by the absence of growth factor in SuperMApo, colitis clinical score reduction and weight loss prevention by SuperMApo were only slightly affected by the absence of growth factor in SuperMApo (**Fig. 5a-c**). The data allow the dissociation during colitis resolution between the termination of inflammation which is not dependent on efferocytosis growth factors and tissue healing which is dependent on TGF β , IGF-I and VEGF. Our data demonstrate that the growth factors produced during efferocytosis promote intestinal mucosa healing in the context of colitis resolution.

Figure 4: SuperMApo treatment contributes to preserve intestinal barrier integrity and improve tissue repair. The intestinal barrier integrity of T cells transfer induced colitis mice receiving or not SuperMApo treatment was monitored by **(a)** Orally gavaged FITC particles detection and **(b)** the quantification of Regenerating islet-derived protein 3 gamma (REG3 γ) respectively in the serum. **(a-b)** Data are expressed as mean of group $\pm$ s.e.m from 5 to 6 animals per groups. FITC-Dextran data are representative of two independent experiment; *= p<0.05 (two-way analysis of variance with Bonferroni post-test. REG3 γ are the pool of four experiments *= p<0.05 (Unpaired student's t test). **(c)** Intestinal epithelial cells proliferation and **(d)** fibroblasts differentiation into myofibroblasts *in vivo* was determine by Ki-67 and α -SMA positives intestinal epithelial cells and fibroblast expression respectively in the colon of naïve T cells transfer model mice by IF at day of sacrifice. **(e)** The and Collagen type I (Col1a1), Collagen type III (Col3a1), Fibronectin (Fn1) and TGF β expression in colonic fibroblasts after Vehicle or SuperMApo treatment in colitis mice were determined by analyzing the expression of mRNA expression levels by RT-qPCR. **(c-e)** Data are expressed as mean of group $\pm$ s.e.m from 5 to 6 animals per groups. Data are representative of two independent experiments; *=p<0.05 (Unpaired student t test), **= p<0.01; ***= p<0.01 (nonparametric Mann-Whitney test).

ON THE NEXT PAGE



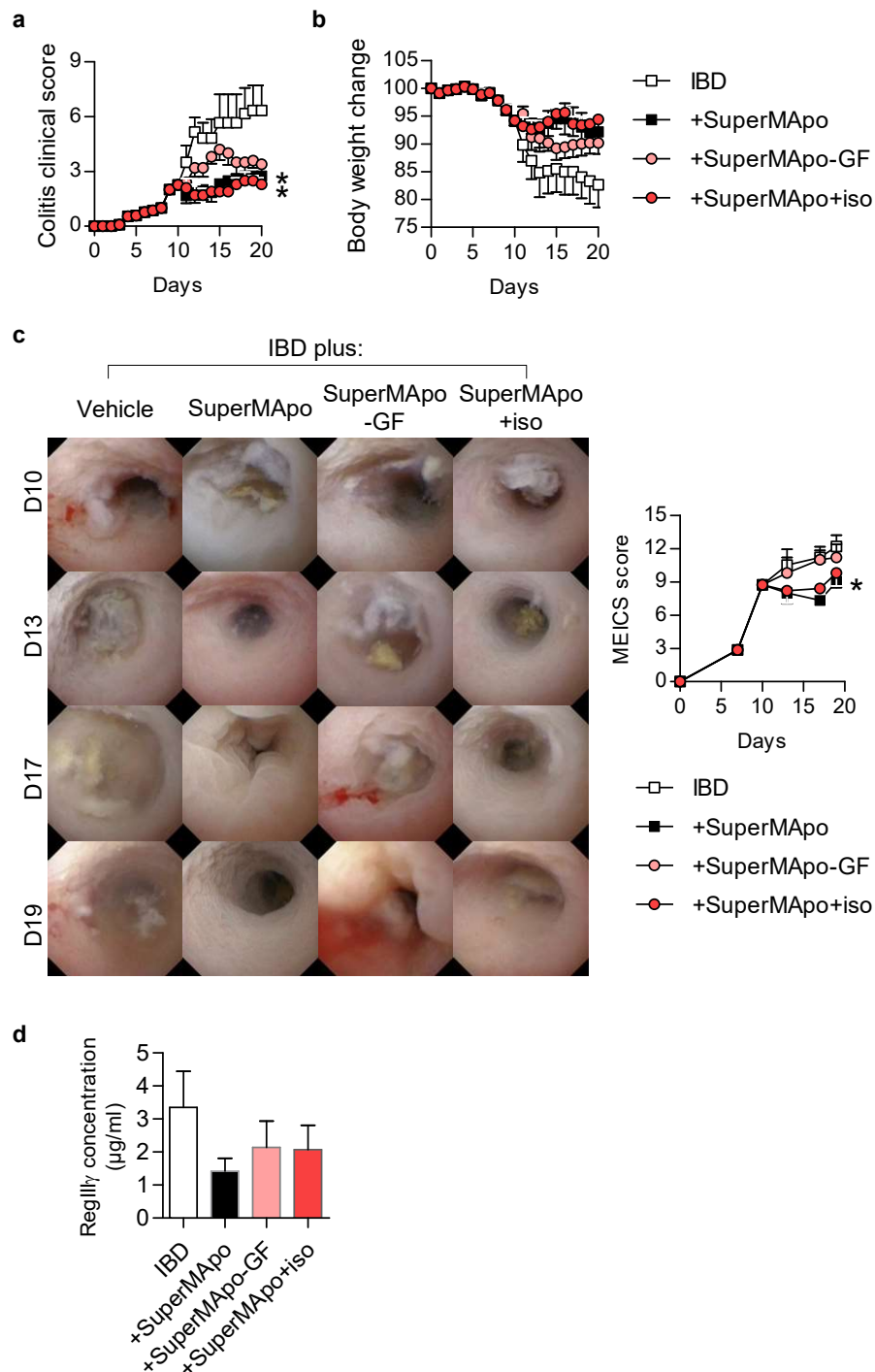


Figure 5: TGF β , IGF-I and VEGF contained in SuperMApo slightly modulate the severity of T cells transfer induced colitis. Colitis was induced by transfer of naïve CD4+CD25-CD45RB^{hi} T cells into C57BL/6 Rag 2^{-/-} mice, when they showed an endoscopic score of 6-7, the mice were treated twice by SuperMApo, SuperMApo depleted in TGF β , IGF-I and VEGF (SuperMApo – GF) or isotypes and vehicle (X-VIVO™) at 48h of interval and monitored daily. Mice were scarified at 10 days after treatments and compared with vehicle or isotype control mice. **(a)** Clinical score changes and **(b)** body weight loss among T cell transfer induced colitis groups. **(c)** Endoscopic assessment according to the murine endoscopic index of colitis severity (MEICS). Representative's images of mini colonoscopy at day 19 on left. **(a-c)** Data are expressed as mean of group $\pm$ s.e.m from 5 to 6 animals per groups. Data are representative of three independent experiments; * = $p < 0.05$ (two-way analysis of variance with Bonferroni post-test). **(d)** Quantification of regenerating islet-derived protein 3 gamma (REG3 γ) in the serum. Data are expressed as mean of group $\pm$ s.e.m from 5 to 6 animals per groups. Pool of three independents experiments.

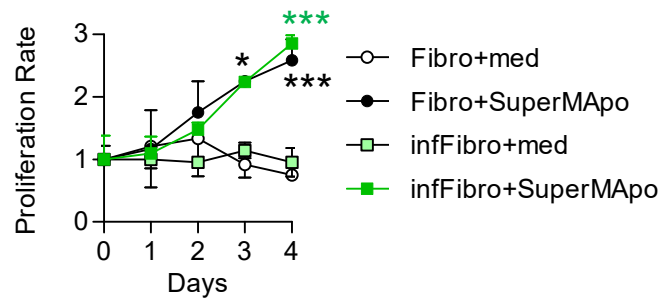
Human SuperMApo promotes proliferation and migration of IBD lesion fibroblasts

Because our data demonstrated obvious therapeutic opportunities of SuperMApo in the treatment of colonic inflammation, we developed a protocol to produce human efferocytosis factors using cells issued from healthy blood donors. Human SuperMApo was therefore evaluated on human fibroblasts isolated from colon biopsies (from inflamed lesions and control tissues) from patient diagnosed with IBD. We observed that the proliferation of fibroblasts was strongly increased in the presence of ^{Hu}SuperMApo and that, independently of whether fibroblasts were isolated from inflamed or non-inflamed tissues (**Fig. 6a**). Then, using a wound healing scratch assay, we observed that fibroblasts isolated from inflamed tissue timidly regained in term of wound filling in the presence of ^{Hu}SuperMApo, but to a lesser extent than fibroblast isolated from non-inflamed tissue (**Fig. 6b**). The data demonstrate that human efferocytosis factors (i.e. ^{Hu}SuperMApo) enhanced colonic fibroblast proliferation and migratory properties and rescued such properties from inflamed colonic fibroblasts, thus permitting to envisage the therapeutic use of SuperMApo approach to circumvent inflammation and trigger tissue healing.

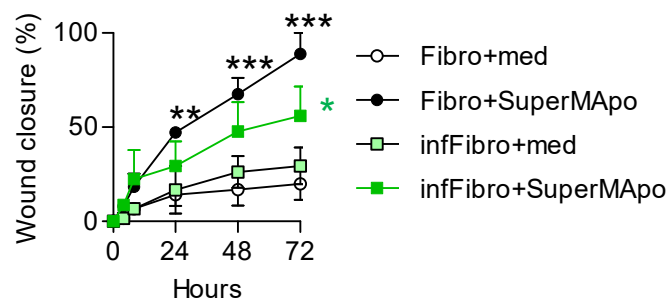
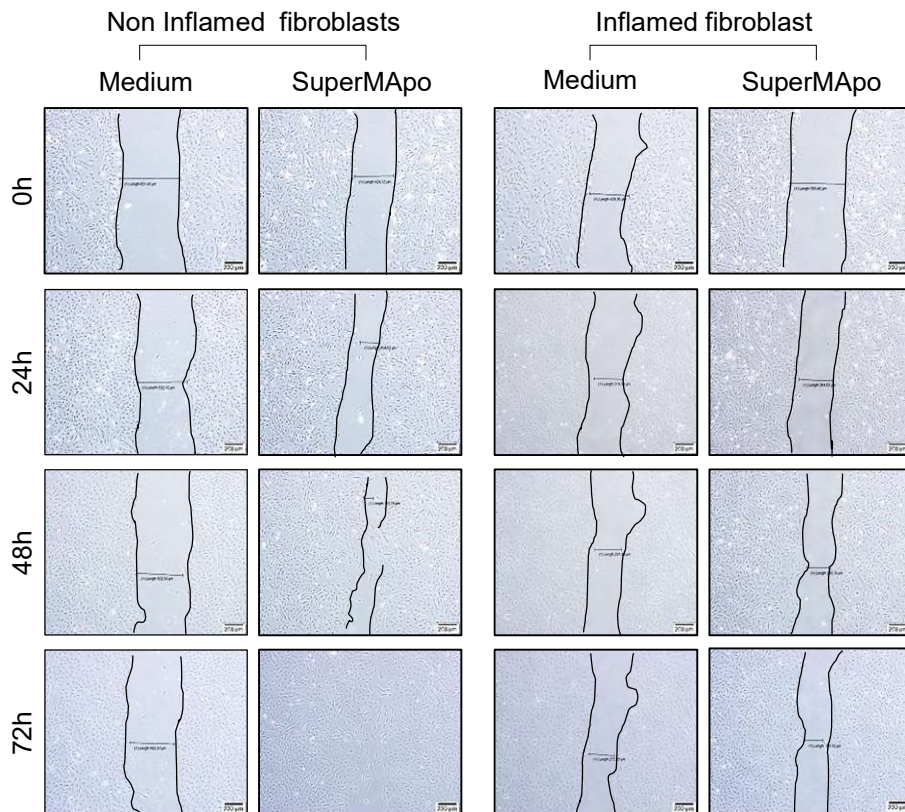
Figure 6: Human SuperMApo promote primary human fibroblasts proliferation and wound healing *in vitro*. Primary fibroblasts harvested from biopsy of unflamed or inflamed colon tissue were grown in standard cell culture conditions. **(a)** The proliferation capacity of fibroblasts *in vitro* after treatment with SuperMApo was determined by MTT assay after 4 days of treatment. Data are expressed as mean of group $\pm$ s.e.m. Data are representative of one independent experiment; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$ (two-way analysis of variance with Bonferroni post-test). **(b)** Migration of fibroblasts isolated from uninflamed and inflamed colon mucosa biopsy, incubated with SuperMApo was determine *in vitro* wound-healing scratch assay at 0h, 4h, 8h, 24h, 48h and 72h. Data are expressed as mean of duplicated per group $\pm$ s.e.m. Data are representative of one independent experiment; ** = $p < 0.01$ * = $p < 0.05$ (two-way analysis of variance with Bonferroni post-test).

ON THE NEXT PAGE

a



b



Discussion

IBD patients who achieve and maintain mucosal healing have more favorable long-term outcomes than patients who do not, highlighting mucosal healing as an emerging critical endpoint in clinical trials and practice¹⁶. Apoptosis and efferocytosis constitute major steps of the resolution of inflammation and provide numerous opportunities for pro-resolution drug development¹⁷. Thus we developed SuperMApo constituted of all the factors issued from efferocytosis and provide here evidences that SuperMApo triggers resolution of ongoing inflammation as well as enhanced healing. In context of bowel inflammation, we demonstrated that SuperMApo treatment favored the definitive control of inflammation and healing of the intestinal mucosa giving fibroblasts and epithelial cells pro-healing properties.

Collectively, the data presented in this work provide several key insights. First, we demonstrated *in vitro* that SuperMApo stimulated the wound healing properties of fibroblasts and MODE-K cells lines, the main cells types orchestrating the tissue repair process¹⁸. The treatment of these cells with SuperMApo resulted in the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts, increasing α -SMA expression, and promoted the proliferation, migration and wound healing properties of MODE-K and fibroblasts. Indeed, SuperMApo ameliorated the collagen gel contraction capacity of fibroblast, but surprisingly decrease the expression of the extracellular matrix genes related to wound-healing. The data suggest therefore that fibroblast in the presence of resolute factors may polarize through pre-healing fibroblast, not totally differentiate in active fibroblasts. This was true *in vivo* with fibroblasts cultured in the presence of efferocytosis factors but also *in vivo* when extracellular matrix genes were analyzed in colon tissue after SuperMApo treatment. A transcriptomic analysis of pro-resolutive fibroblasts and healing fibroblasts would provide interesting findings to decipher functions and origins of both populations. This result is correlated with a decrease of TGF β mRNA expression in the colon of SuperMApo treated mice. TGF β is the most important regulatory molecule of myofibroblasts properties¹⁹⁻²². TGF β is produced by a variety of cell types; however, several studies raise macrophages as the critical source of TGF β in fibrosis²³. In this context, we hypothesized that SuperMApo enhance myofibroblasts properties to improve early wound healing, but decrease the expression of extracellular matrix genes maybe by a TGF β depend mechanism, thus reducing the risk to develop an excessive process of fibrosis. Further studies will be necessary to elucidate alternatives mechanisms of regulation of myofibroblasts by SuperMApo. Notably it will be interesting to study the induction of senescence in myofibroblasts after SuperMApo treatment. Indeed, senescence

has been described as a mechanism regulating the fate of myofibroblasts after wound healing to avoid fibrosis process^{24, 25}.

Secondly, we have demonstrated that SuperMApo treatment enhanced the restoration of the IEC barrier after forceps-induced injury of the intestinal mucosa in WT mice, demonstrating the contribution of efferocytosis factors to mucosal healing *in vivo*. This was further confirmed in two models of intestinal inflammation. Injections of SuperMApo at 48 h of interval modulate the ongoing inflammation and enhance the process of tissue repair, restoring epithelial permeability. Mucosal epithelial permeability is also suspected to augment mucosal inflammation²⁶. In T cell transfer model the presence of colitis was shown to correlate with high expression of IFN- γ . Indeed, IFN- γ has been shown to have direct effects on epithelial cells, increasing the permeability of a colonic epithelial cell line²⁷. In the T cell transfer model, a recovery of the intestinal barrier permeability has been observed 7 days after SuperMApo treatment. This effect could be explained, at least in part, by the involvement of colonic fibroblasts in tissue repair in the gastro intestinal tract²⁸. In the colon, based on their localization just beneath the IEC and their net-like structures, intestinal fibroblasts seem to be perfectly located for sensing damage signals resulting from disintegration of the IEC layer²⁹. Following injury, adjacent IEC rapidly migrate into the denuded area to restore barrier integrity (epithelial restitution). Proliferation of IECs then increases the number of enterocytes to resurface the defect. Further, IEC differentiation is needed to restore mucosal barrier and epithelial function^{30, 31}. Thus, our *in vivo* data confirms that pro-resolutive factors contained in SuperMApo could initiate mucosal healing. Notably, SuperMApo increased migration and activation of fibroblasts into myofibroblasts facilitating immediate wound closure and supporting migration and proliferation of IEC and structural repair of wound.

Thirdly, the different phases of wound healing are facilitated and controlled by regulatory proteins synthesized mainly by macrophages, IEC and mesenchymal cells close to the injury area¹⁸. The major described proteins driving tissue repair process are chemokines (CXCR4 and CXCL12)³², various growth factors, (TGF β , IGF)¹² and cytokines IL-1 β , IL-2, IL-6 and IL-22^{30, 33-35}. In line with these observations, we have demonstrated that growth factors TGF β , IGF-I and VEGF, contained in SuperMApo, controlled notably the differentiation of myofibroblasts and the migration of MODE-K and fibroblasts *in vitro*. In addition, amelioration of mucosal aspect induced by SuperMApo treatment was abolished by growth factors depletion. Colitis clinical score reduction and weight loss prevention by SuperMApo were only slightly affected by the absence of growth factors, indicating that these factors modulate specifically the wound healing process, but did not show strong immunomodulatory

properties. Therefore, the others factors contained in SuperMApo seemed to have a synergic effect in order to improve the resolution of inflammation and the wound healing observed after SuperMApo treatment.

Fourthly, the capacity of MODE-K to eliminate apoptotic cells *in vitro* has been improve after treatment with SuperMApo compared to untreated cells. A lack of apoptotic cells clearance has been observed in many inflammatory diseases³⁶. The data here suggest that SuperMApo favored resolution by giving IEC phagocytic capacities to clear inflammatory lesions contributing to restore homeostasis in the mucosa. Our results are in concordance with this of Lee *et al.* that reveals a new functionally relevant role for colonic epithelial cells in engulfing their dying neighbors. This study suggests that the increased number of apoptotic cells and/or a defect in cell clearance within the colon could be additional contributing factors to colonic inflammation³⁷. In this context, an interesting extrapolation of this work is that improving cell clearance by gut epithelial cells at the early stages of IBD could potentially help to reduce the inflammatory responses seen in later stages of the disease.

In summary, this work demonstrated that SuperMApo promotes mucosal healing by activating wound healing properties in colonic fibroblasts and IECs. This data suggested that SuperMApo signaling in fibroblasts and IECs is an important pathway for the restoration of epithelial integrity upon acute mucosal injury. Nevertheless, further studies will be needed to determine the molecular mechanisms underlying the cross talk between the immune system and tissue repair after SuperMApo treatment. Thus the pro-resolutive properties of SuperMApo together with its pro-healing properties highlight SuperMApo as a potential therapeutic strategy for in the treatment of IBD.

Methods

Mice

Four to 8 week-old female C57BL/6 mice were obtained from Charles River Laboratories and kept in quarantine for at least 1 week before experimental procedure. Transgenic RAG-2^{-/-} C57BL/6 mice were bred in our specific pathogen-free rodent facility. Mice were housed at the UMR1098 animal facility (#D25-056-7) in standard plastic cages with cellulose bedding in environmentally controlled and germ free room at 22°C, and under a 12 hours light/dark cycle. Pellet food and sterile tap water (Hydropack; Plexx) were available *ad libitum*. Experimentation (#02831) was approved by the local ethic committee (#58) and the French

Ministry of Higher Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) and was conducted in accordance with the European Union's Directive 2010/63.

Experimental model of T cell transfer and DSS-induced colitis

Naïve CD25⁻CD45^{RB}^{high}CD4⁺ T cells were sorted by flow cytometry (cells sorter SH800Z, SONY) from magnetically enriched CD4⁺ spleen and lymph node cell suspensions (EasySep Mouse CD4⁺ T Cell Isolation Kit; StemCell Technology) to a purity of >95%. According to the model described by Fiona Powrie³⁸, 5.10e5 naïve T cells were injected into the tail vein of C57BL/6 RAG-2^{-/-} mice to induce colitis. Chronic DSS colitis was induced in C57BL/6 mice with the addition of 3% of DSS (MP biomedical LLC) in drinking water for 6 consecutive days. Then, regular water was given for the next 10 days and this, was repeated twice for a total of 3 cycles. Control mice were given with tap water only. Mice were monitored daily for the clinical assessment of colitis using scores previously described.^{23,24} Briefly, a total clinical score of 0 to 9 was assigned to each animal, which included the sum of evaluation of the body weight loss (0 to 5% of weight loss = 0; 5 to 10% = 1; 10 to 15% = 2; 15 to 20% = 3; >20% = 4), the feces appearance (normal = 0; mild diarrhea=0.5 ; diarrhea = 1; bloody stools = 2), and the general behavior (normal = 0; mild alteration = 1; piloerection and motor activity altered = 2; severe alteration = 3). Endoscopic assessment was performed twice a week by video-endoscopy in T-cell transfer model and in the DSS model, endoscopy was assessed the last day of each 6 day-DSS regimen and twice during the 10 days of regular water.

In vivo wounding procedure

Mucosal wounding *in vivo* was performed as previously described³⁹. To generate the wound into C57BL/6 mice, a biopsy forceps was inserted into the working channel of the endoscope and introduced into the colon of an anaesthetized mouse. Under visual control, a small piece of mucosa was carefully removed. The process of wound healing was subsequently monitored by daily endoscopies.

Video-endoscopy and lesion scoring

The endoscopic procedures were made on 2% isoflurane-anesthetized animals, without bowel preparation or starving before the procedure. Colon inflammation and wound healing were studied *in vivo* using the superslim 8.4 Fr (2.8 mm) flexible video ureteroscope (URF V2; Olympus), connected to OTV-S190 and CLV-S190 visera elite monitor system (Olympus), with narrow band imaging (NBI) system that enhances visibility of vascular structures. Endoscopic assessment of mucosal inflammation was reported with the MEICS¹⁶, composed

of 5 parameters rated from 0 to 3, including: thickening of the colon, changes of the vascular pattern, fibrin deposition, granularity of the mucosal surface, and stool consistency.

Efferocytosis factor (SuperMApo) production

For the production of human SuperMApo (^{Hu}SuperMApo), macrophages were derived from monocytes by culturing freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors in RPMI medium containing 1% penicillin/streptomycin, and 100 ng/mL of M-CSF during 7 days at 37°C 5% CO₂. Apoptotic cells were generated using PBMC from the same donor, PBMC were kept at 4°C for 7 days, irradiated at 35 Gy and co-cultured with monocyte-derived macrophages for 48 h in MEM medium at a ratio of 1 macrophage for 5 apoptotic cells in 1 mL. Supernatant was then collected, 0.22 µm-filtered and stored at -80°C. ^{Hu}SuperMApo were pooled together to provide homogeneity between batches. For mouse SuperMApo production, peritoneal macrophages from C57BL/6 mice were elicited using thioglycollate 3%. Apoptotic cells were obtained from the thymus of naïve C57BL/6 mice after 35-Gy dose of x-ray cell irradiation (Raycell blood irradiator; Best Theratronic, Ottawa, ON, Canada) followed by 6 h of culture in DMEM (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) completed with 10% of heat-inactivated FCS (Life Technologies), 1% of penicillin/streptomycin, 10 mM of HEPES buffer (Sigma Aldrich), 10 mM of non-essential amino acids (Invitrogen), and 0.05 mM of 2-mercaptoethanol (Sigma Aldrich). Apoptosis was confirmed using fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE)-conjugated annexin V staining and 7-aminoactinomycin D (7-AAD) exclusion (BD Biosciences) and flow cytometry analysis^{40, 41}. Macrophages were cultured with apoptotic cells at a final ratio of one macrophage for five apoptotic cells in X-vivo 15 medium (Lonza) during 48 h and supernatant were collected and stored at -80°C after a 0.2 µm filtration. In some experiments, VEGF (AF493NA), TGFβ(MAB240) and IGF-I (AF791) neutralizing antibodies or control anti-goat IgG (AB-108-C) or anti-mouse IgG1 (MAB002), were used in addition to SuperMApo in cultures (all from R&D systems). Growth factors were also immunomagnetically depleted from SuperMApo according to manufacturer's instruction. Briefly, 10 µg/ml of VEGF (AF493NA; R&D systems) and IGF-I (AF791; R&D systems) and 50 µg/ml of TGFβ (2G7 clone; provided by Prof. L. Chatenoud) antibodies were incubated during 1 h with SuperMApo at room temperature. Then, the goat anti-mouse IgG (Polysciences Europe GMBH) or rabbit anti-goat IgG (Rockland) coated magnetic beads were incubated separately with pre-formed Ag-Ab complex for 20 min or 1 h, respectively, at room temperature. The Ag-Ab complex were then captured using a magnetic separator. Protein levels of FGF, EGF,

TGF β , IGF-I and VEGF in SuperMApo were determined by ELISA (all from R&D systems), according to the manufacturer's protocols.

Histological analysis and immunofluorescence

Immediately after the sacrifice, tissue samples from proximal, median and distal parts of the colon were collected and fixed overnight in 5% formalin. Paraffin inclusions were performed on macroscopic injured area, then 4 μ m sections were stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES). Histological evaluation was performed by a experimented pathologist blinded to the nature of the mice being examined using a score composed of 5 degrees of severity based on inflammatory cell infiltration, erosions and ulcerations, epithelial hyperplasia, and mucin depletion, as previously described⁴². Cytofix/Cytoperm buffer (eBioscience) was applied for the detection of nuclear staining. Primary antibodies for immunostaining of mouse tissue and primary fibroblasts were: rabbit anti mouse Ki-67 (clone SP6; Abcam), rabbit anti-human α -Smooth muscle actin (polyclonal; Abcam) and Alexa 488-conjugated rabbit anti-vimentin (Clone D21H3; Cell signaling). Secondary antibody was Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Life Technologies). Nuclei were counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich). Fluorescence analysis was performed with Olympus IX81 and Fluoview FV1000 software (Olympus). For quantitative analyses, at least four to five representative high power fields (HPF, 40X) per section were evaluated in a blinded fashion.

Ex vivo analysis of T cells and antigen presenting cells

Lymphoid organs, spleen and mesenteric lymph nodes (MLN) were harvested and dissociated, and erythrocytes were removed by osmotic shock. In brief, colons were longitudinally opened, cut into 1 cm pieces, and incubated twice in HBSS (Life Technologies) with 10% of FBS and 5 mM of EDTA (Life Technologies) at 37°C during 20 min to remove epithelial cells. The tissue was then digested with 10 mg/ml of type VIII collagenase D (Roche) in HBSS during 45 min at 37°C. The isolated cells were layered on a Percoll (Sigma Aldrich) gradient 40/80% and centrifuged for 20 min at 600 g, and the interface was recovered. After washing with PBS, lymphoid cells were directly stained for viability with viability dye FvS (BD Biosciences). In addition, T cell subsets were stained using CD4 (clone RM4-5; BD Biosciences), CD25 (clone 7D4; Miltenyi), IFN γ (clone REA 638; Miltenyi), IL-17A (clone TC11-18H10; Miltenyi) and Foxp3 (clone FJK-16; eBioscience) monoclonal antibodies (mAb) following manufacturer's instructions. To analyze APC subsets, CD11b (clone M1/70; BD Biosciences), CD11c (clone N418; Miltenyi), mPDCA (clone JF05-1C2.4.1; Miltenyi), Siglec H (clone 551.3D3; Miltenyi), CD19 (clone 6D5; Miltenyi), PD-L1

(clone 10F.962; BD Biosciences), IL-10R (clone 1B1.3a; Biologend) and polyclonal Arginase (R&D systems) mAb were used. Stained cells were then analyzed using a FACS Canto II cytometer with Diva software (BD Biosciences). Spleen DC (CD11c⁺) and macrophages (CD11b⁺) were analyzed *ex vivo* for the expression of costimulatory molecules CD40 (clone 3/23; Biologend), CD80 (clone 16-10A1; BD Biosciences) and CD86 (clone GL1, Biologend) by FACS, or after a 24 h culture in the presence of lipopolysaccharide (LPS) 1 µg/mL (Sigma Aldrich). DC and macrophages were isolated from the spleen using CD11c or CD11b magnetic microbeads (Miltenyi Biotec) and for some experiments cultured with allogeneic naïve CD25⁻CD4⁺ T cells isolated from C57BL/6 OTII/Rag-2^{-/-} transgenic mice (5.10e4 APC for 1.10e5 T cells) in presence of 2 µg/mL of OVA peptide (Invivogen) for 5 to 7 days and Foxp3, IL-17A and IFN-γ intracellular expressions were evaluated by FACS in CD4⁺ T cells according to manufacturer's instructions.

RNA isolation and q RT-PCR analysis

Total RNA were extracted from tissue or cells with using the RNeasy mini kit (Qiagen). One to 2 µg of RNA was reversed-transcribed into cDNA using the High Capacity RNA-to cDNA kit (Applied Biosystems). Then, cDNA was quantified by real time RT-PCR using the power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) using *Foxp3* (Mm00475156_m1), *ROR-γ* (Mm00441139_m1), *Tbet* (Mm00450960_m1), *IL-10* (Mm00439616_m1), *Colla1* (Mm0080 1666_m1), *Col3a1* (Mm0125 4476_m1), *Fnl* (Mm0125 6744_m1) and *G6PDH* primers (from Applied Biosystems). Relative mRNA levels were determined using the $\Delta\Delta C_t$ method. Values were expressed relative to *gapdh* levels.

In vivo permeability evaluation

Mice were submitted to gavage with fluorescein isothiocyanate-dextran (MW 4000; Sigma-Aldrich) at 80 mg/kg of body weight, 5 h prior blood collection through retro orbiter puncture. The fluorescence intensity in the serum was measured at 520 nm (Perkin Elmer). Fluorescein isothiocyanate-dextran concentrations were determined from a standard curve generated by a serial dilution of fluoresceine isothiocyanate-dextran. In parallel, regenerating islet derived protein 3-γ in plasma was determined by ELISA (Cloud clone corp.).

Cell isolation, culture and assays

Fibroblastes were isolated from C57BL/6 mice colon mucosa or from human colon biopsy⁴³. Briefly, mucosal sheets were treated with 5 mM of EDTA (life technologies) in Ca²⁺-free HBSS (life technologies) five times at 37°C for 15 min to remove the epithelial layer. The mucosal sheet without epithelial cells was then cut into small pieces and cultured in RPMI-1640 (Life technologies) containing 10% of FBS (Life technologies), 1% of

antimycotic/antibiotic and 10 mg/mL of collagenase D (Roche), at 37°C in 5% CO₂ for 60 min. Isolated myofibroblasts were cultured in RPMI-1640 containing 10% of FBS, 1% of antimycotic/antibiotic, 10 mM of sodium pyruvate (Lonza), 1 mM of non-essential amino acids (Lonza) and 0.05 mM of 2 beta mercaptoethanol (Sigma Aldrich). The cultured fibroblasts were used for experiments after two to four passages. The mouse small intestinal cell line MODE-K was obtained from INSERM U1111⁴⁴. Cells were cultured in RPMI-1640 containing 10% FBS, 1% antimycotic/antibiotic, 1% Sodium Pyruvate, 1% non-essential amino acids and 0.05 mM of 2 beta mercaptoethanol at 37°C in 5% CO₂. Cell proliferation was determined by the mitochondrial activity using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay according to manufacturer's instructions. For wound-healing scratch assay, cells were seeded in 6 well plates (5.10e5 cells per well) and grown to confluence. Then linear mechanical scratch wounds were performed in each well using a 1000 µl plastic pipette tip and the rate of cell migration was measured by determining the surface empty of cells immediately after wounding (t=0) and at different times as indicated. For migration assays, 8 µm pore size trans wells were used (Greiner) with cells seeded in the top of the trans well, incubated for 24 h at 37°C. Then after removing cells from the top using a cotton bud, cells in the bottom of the well were fixed with 100% of ethanol, stained with 2% of crystal violet and pictures from each membrane were taken. Finally, the invasive cells located in the lower chamber were counted manually. For phagocytic assays, apoptotic cells were stained with Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Invitrogen) according to the manufacturer's protocol, and co-cultured with MODE-K cells for 6 h. Phagocytosis was determined by FACS. Concerning contraction assays, collagen gel culture was prepared as previously described⁴⁵. Briefly, collagen was prepared by mixing 0.1% of acetic acid with rat tail type 1 collagen (Corning®) to 3 mg/mL. Then 400 µL of cell suspension was mixed with 200 µL of collagen solution in a 24-well plate. Quickly 1 M of NaOH was added to the well for gel solidification. After 20 min, the gel was finally detached from the bottom of the well and incubated during 24 h at 37°C and 5% CO₂. Gel contractions were determined collagen disk diameters at different time points as indicated.

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (s.e.m), and were analyzed using adapted statistical tests, as indicated, using GraphPad Prism software (5.01 version). A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgements

We thank Lucienne Chatenoud (Hopital Necker, Paris, FR) for providing us with TGFβ antibody and Dominique Kaiserlian (Inserm-U1111, Lyon, FR) for providing us with MODE-K cell line. We also thank Dominique Paris, Francois Coulon and Emmanuel Salvado for taking care of the mice.

The work was funded by the Etablissement Français du Sang (2016-02 to S.P.), the Conseil Régional de Franche-Comté (“Soutien au LabEX LipSTIC” 2014/2015 to P.S. and AAP 2013-2017 to S.P.), and by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-LABX-0021 to Labex LipSTIC). O.M.R. is supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l’Education Nationale, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche, and T.G. by a doctoral fellowship from the Etablissement Français du Sang and from the Labex LipSTIC.

Author contributions

O.M.R. designed and performed most of the experiments, analyzed and interpreted the data. T.G., A.D., F.B., C.C. and M.C. contributed to some experiments. S.V.D. performed the histological analysis and scoring of the tissues. C.G. participated to endoscopy procedures. O.M.R., P.S. and S.P. wrote the manuscript. All authors discussed the results and the manuscript. S.P. supervised the study with the help of M.C.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interest.

References

1. Baumgart, D.C. & Carding, S.R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet***369**, 1627-1640 (2007).
2. de Oliveira, S., Rosowski, E.E. & Huttenlocher, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nature reviews. Immunology***16**, 378-391 (2016).
3. Ortega-Gomez, A., Perretti, M. & Soehnlein, O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO molecular medicine***5**, 661-674 (2013).
4. Hinz, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *The Journal of investigative dermatology***127**, 526-537 (2007).
5. Wong, J.W. *et al.* Wound healing in oral mucosa results in reduced scar formation as compared with skin: evidence from the red Duroc pig model and humans. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society***17**, 717-729 (2009).

6. Colombel, J.F., Louis, E., Peyrin-Biroulet, L., Sandborn, W.J. & Panaccione, R. Deep remission: a new concept? *Dig Dis***30 Suppl 3**, 107-111 (2012).
7. Peyrin-Biroulet, L. *et al.* Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO. I: Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & colitis***5**, 477-483 (2011).
8. Sandborn, W.J. *et al.* Treating beyond symptoms with a view to improving patient outcomes in inflammatory bowel diseases. *Journal of Crohn's & colitis***8**, 927-935 (2014).
9. Neurath, M.F. & Travis, S.P. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut***61**, 1619-1635 (2012).
10. Desreumaux, P. *et al.* Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterology***143**, 1207-1217 e1201-1202 (2012).
11. Grinnell, F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *The Journal of cell biology***124**, 401-404 (1994).
12. Vannella, K.M. & Wynn, T.A. Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annual review of physiology***79**, 593-617 (2017).
13. Teshima, C.W., Dieleman, L.A. & Meddings, J.B. Abnormal intestinal permeability in Crohn's disease pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences***1258**, 159-165 (2012).
14. Cayatte, C. *et al.* Biomarkers of Therapeutic Response in the IL-23 Pathway in Inflammatory Bowel Disease. *Clinical and translational gastroenterology***3**, e10 (2012).
15. Marafini, I. *et al.* Serum regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of mucosal enteropathies. *Alimentary pharmacology & therapeutics***40**, 974-981 (2014).
16. Neurath, M.F. New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases. *Mucosal immunology***7**, 6-19 (2014).
17. Fullerton, J.N. & Gilroy, D.W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature reviews. Drug discovery***15**, 551-567 (2016).
18. Martini, E., Krug, S.M., Siegmund, B., Neurath, M.F. & Becker, C. Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology***4**, 33-46 (2017).

19. Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. & Gabbiani, G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of cell biology***122**, 103-111 (1993).
20. Desmouliere, A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell biology international***19**, 471-476 (1995).
21. Postlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., Moses, H.L. & Kang, A.H. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *The Journal of experimental medicine***165**, 251-256 (1987).
22. Montesano, R. & Orci, L. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***85**, 4894-4897 (1988).
23. Wynn, T.A. & Barron, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Seminars in liver disease***30**, 245-257 (2010).
24. Glasser, S.W. *et al.* Mechanisms of Lung Fibrosis Resolution. *The American journal of pathology***186**, 1066-1077 (2016).
25. Hinz, B. *et al.* Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *The American journal of pathology***180**, 1340-1355 (2012).
26. Laukoetter, M.G. *et al.* JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *The Journal of experimental medicine***204**, 3067-3076 (2007).
27. Powrie, F. *et al.* Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity***1**, 553-562 (1994).
28. Neufert, C. *et al.* Tumor fibroblast-derived epiregulin promotes growth of colitis-associated neoplasms through ERK. *The Journal of clinical investigation***123**, 1428-1443 (2013).
29. Stappenbeck, T.S. & Miyoshi, H. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science***324**, 1666-1669 (2009).
30. Sturm, A. & Dignass, A.U. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology***14**, 348-353 (2008).
31. Dise, R.S., Frey, M.R., Whitehead, R.H. & Polk, D.B. Epidermal growth factor stimulates Rac activation through Src and phosphatidylinositol 3-kinase to promote colonic epithelial cell migration. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology***294**, G276-285 (2008).

32. Werner, L., Guzner-Gur, H. & Dotan, I. Involvement of CXCR4/CXCR7/CXCL12 Interactions in Inflammatory bowel disease. *Theranostics***3**, 40-46 (2013).
33. Choi, J.S., Kim, K.H. & Lau, L.F. The matricellular protein CCN1 promotes mucosal healing in murine colitis through IL-6. *Mucosal immunology***8**, 1285-1296 (2015).
34. Lindemans, C.A. *et al.* Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature***528**, 560-564 (2015).
35. Scheibe, K. *et al.* IL-36R signalling activates intestinal epithelial cells and fibroblasts and promotes mucosal healing in vivo. *Gut***66**, 823-838 (2017).
36. Nagata, S., Hanayama, R. & Kawane, K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell***140**, 619-630 (2010).
37. Lee, C.S. *et al.* Boosting Apoptotic Cell Clearance by Colonic Epithelial Cells Attenuates Inflammation In Vivo. *Immunity***44**, 807-820 (2016).
38. Ostanin, D.V. *et al.* T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology***296**, G135-146 (2009).
39. Neurath, M.F. *et al.* Assessment of tumor development and wound healing using endoscopic techniques in mice. *Gastroenterology***139**, 1837-1843 e1831 (2010).
40. Perruche, S. *et al.* CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nature medicine***14**, 528-535 (2008).
41. Bonnefoy, F. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells play a major role in apoptotic leukocyte-induced immune modulation. *J Immunol***186**, 5696-5705 (2011).
42. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L. & Powrie, F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine***190**, 995-1004 (1999).
43. Khalil, H., Nie, W., Edwards, R.A. & Yoo, J. Isolation of primary myofibroblasts from mouse and human colon tissue. *Journal of visualized experiments : JoVE* (2013).
44. Vidal, K., Grosjean, I., evillard, J.P., Gespach, C. & Kaiserlian, D. immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene. Phenotypic and immune characterization of the MODE-K cell line. *J Immunol Methods***166**, 63-73 (1993).
45. Su, S. & Chen, J. Collagen Gel Contraction Assay.(2015).

III Résultats complémentaires

L'injection des facteurs issus de l'efferocytose contrôle l'inflammation intestinale en modulant la réponse T

Les cellules apoptotiques et leur efferocytose génèrent un microenvironnement pro-résolutif riche en SPM et molécules anti-inflammatoires comme le TGF β . Ce dernier peut orienter drastiquement la réponse adaptative et notamment la polarisation des lymphocytes T vers un profil régulateur (Chen, Frank et al. 2001; Perruche, Zhang et al. 2008; Serhan 2014; Chiurciu, Leuti et al. 2016). En s'intéressant aux sous-populations des lymphocytes T effecteurs 10 jours après injection de SuperMApo chez les souris colitiques (modèle de transfert de lymphocytes T naïfs), nous avons tout d'abord observé que l'infiltrat inflammatoire était significativement réduit dans le colon par rapport aux souris ayant reçues du milieu contrôle (**Figure 17a**). Une réduction importante du nombre de splénocytes a aussi été observée (**Figure 17a**). Les pourcentages des lymphocytes T CD4⁺, et de Th1, Th17 et de Treg ne sont en revanche pas été modifiés au niveau des organes lymphoïdes périphériques (rate et ganglions mésentériques [MLN]) (**Figure 17b**). Cependant, on observe une diminution significative des Th1 au niveau du colon des souris traitées (**Figure 17b**). Ces données ont été confirmées au niveau transcriptomique par l'analyse de l'expression des facteurs de transcription T-bet, ROR- γ et Foxp3 dans le colon des souris traitées (**Figure 17c**). Ces données montrent que l'injection des facteurs pro-résolutifs (SuperMApo) permet de réduire l'infiltrat cellulaire au niveau de la rate et du colon et de limiter la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ vers un profil Th1 inflammatoire au niveau du colon.

Chefs d'orchestre de la réponse immunitaire, nous nous sommes ensuite intéressés aux APC. En effet, les cDC et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont sensibles à l'immunomodulation induite par les cellules apoptotiques, favorisant leur acquisition de propriétés pro-Treg (Perruche, Zhang et al. 2008; Bonnefoy, Perruche et al. 2011). De la même manière, après l'efferocytose des cellules apoptotiques les macrophages acquièrent un phénotype plus protoléroïque avec une forte production des molécules immunomodulatrices comme TGF β , IL-10 (Voll, Herrmann et al. 1997; Fadok, Bratton et al. 1998). De plus, le processus d'efferocytose induit la production des médiateurs lipidiques (SPM) par les macrophages, participant à l'inhibition du recrutement des neutrophiles et à l'induction de l'élimination des microbes et cellules apoptotiques (Serhan, Chiang et al. 2008). Dix jours

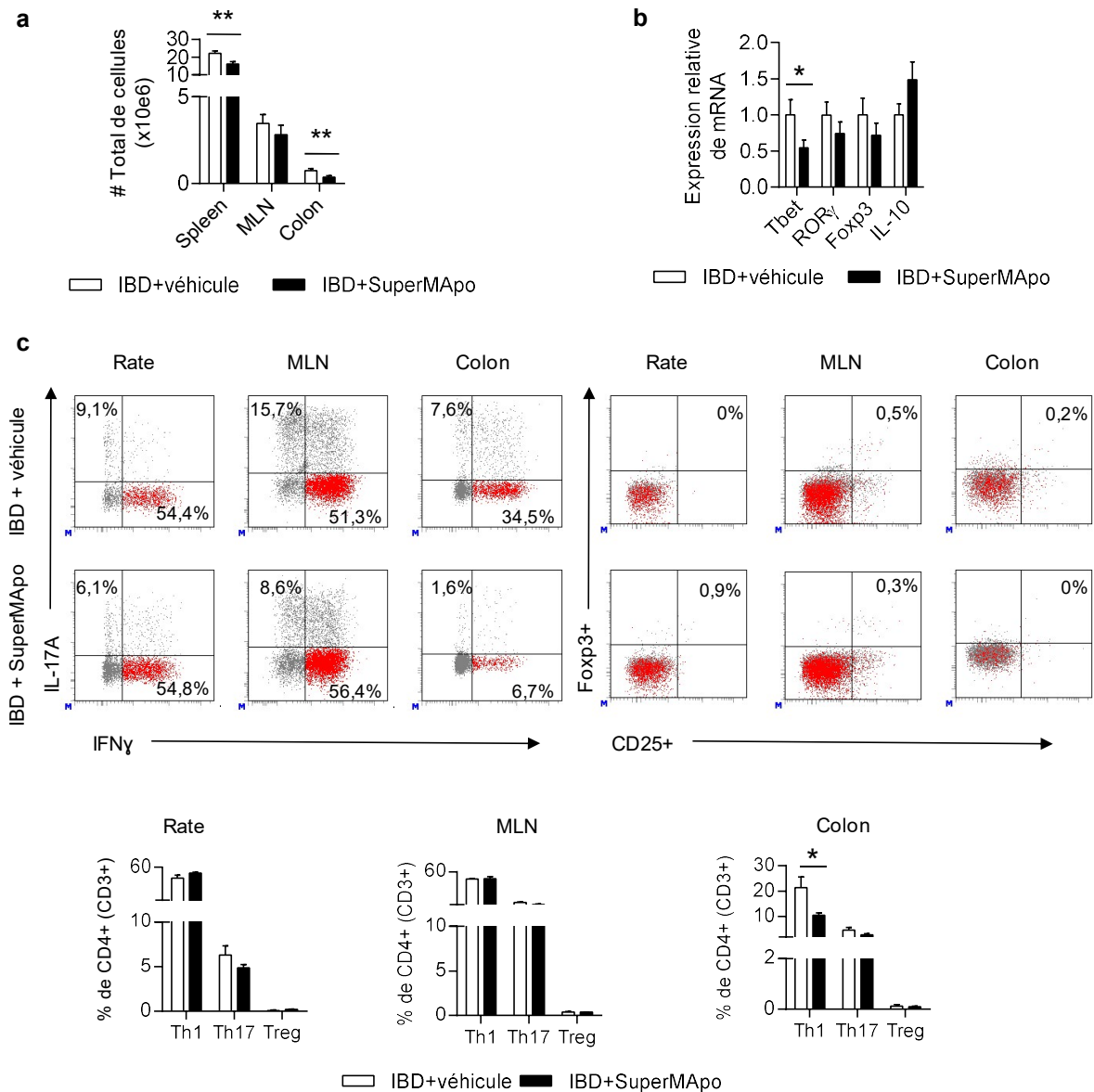


Figure 19 : SuperMApo diminue l'infiltrat inflammatoire et la polarisation Th1 colique. Les cellules provenant de la rate, des ganglions lymphatiques mésentériques (MLN) et du côlon de souris colitiques induites par transfert de LTn, traitées ou non par SuperMApo ont été isolées au moment du sacrifice. **(a)** Le nombre total de cellules et **(b)** le pourcentage de lymphocytes T effecteurs ont été analysés. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM de groupe de 4 à 6 animaux. Les données sont issues d'une expérience représentative parmi 7; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ (Test t de Student, non paramétrique). **(c)** L'expression de Foxp3, Tbet, ROR γ et IL-10 a été évaluée par PCR quantitative dans le colon. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM de groupe de 5 à 6 animaux, et issues de trois expériences indépendantes; * = $p < 0,05$ (test t de Student, non paramétrique).

Après l'injection de SuperMApo, dans un contexte de cellularité réduite des rates, nous avons observé un pourcentage accru des macrophages, et pas des cDC (**Figure 18a**). Dans les MLN, une diminution du pourcentage de cDC et pas de changement pour celui des macrophages a été observé (données non montrées). *Ex vivo* les macrophages et les cDC issus de la rate des souris colitiques traitées par SuperMApo montrent une plus forte expression des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40 après traitement (**Figure 18b**). Une fois stimulées 24h

avec LPS, ces cellules montrent une réponse réduite avec une expression plus faible des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40 (**Figure 18c**). Ceci soit une anergie des APC soit une maturation trop importante masquant une réponse secondaire à un ligand de TLR. Nous avons ainsi cultivé les macrophages et des cDC issus des souris colitiques traitées ou non, avec des lymphocytes T CD4⁺ issus de souris OTII en présence du peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉. L'analyse de la polarisation des lymphocytes T montre que les macrophages et les cDC issues des souris traitées sont capables de stimuler la polarisation T et d'orienter vigoureusement cette dernière vers un profil régulateur (acquisition du facteur de transcription Foxp3) au dépend d'une polarisation Th1 (**Figure 18d**). Ces données montrent que l'injection de SuperMApo module la fonction des APC et notamment des macrophages et des cDC *in vivo* et leur confèrent des propriétés pro-régulatrices.

Au niveau du colon, le pourcentage de cDC est diminué et non celui des macrophages chez les souris colitiques traitées avec les facteurs pro-résolutifs (**Figure 19a**). De plus, ces cellules présentent une plus forte expression de PD-L1 (**Figure 19b**). En revanche aucune surexpression du récepteur à l'IL-10 ou de l'arginase 1 (Arg1) a été observée (**Figure 19b**). Ces résultats s'ajoutent aux précédents et renforcent la polarisation pro-toléro-gène des macrophages et des cDC après traitement par SuperMApo.

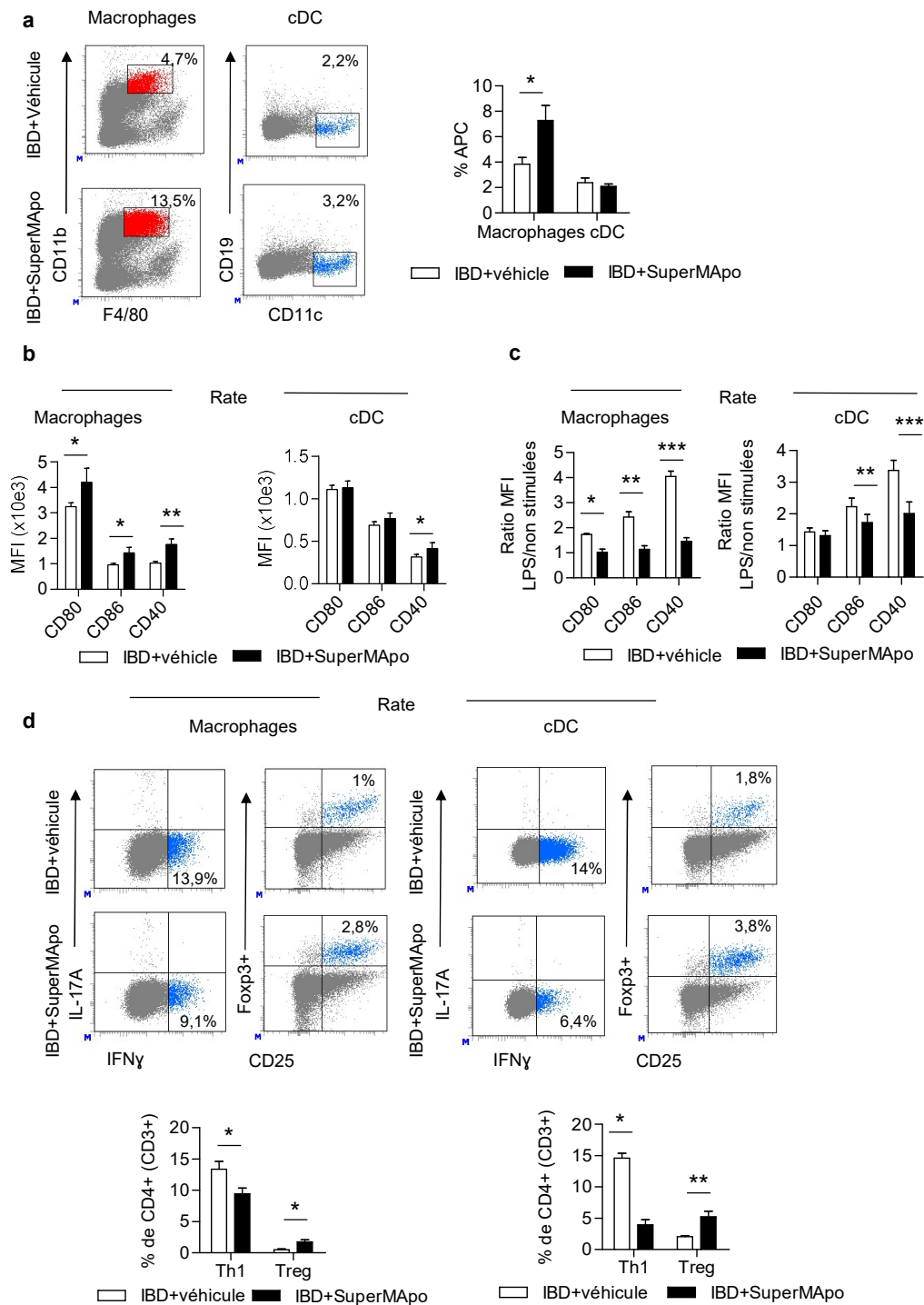


Figure 20 : Le traitement par SuperMApo induit des propriétés pro-régulatrices aux macrophages et aux cDC. Les cDC et les macrophages (macro) ont été isolés de la rate des souris colitiques traitées ou non par SuperMApo. (a) Pourcentages de macrophages et de cDC spléniques et expression des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40 à leur surface avant (b) ou après (c) stimulation par LPS, déterminés par FACS. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM par groupe de 5 à 6 animaux et sont représentatives d'une expérience parmi 4; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ (test t de Student non paramétrique et non apparié). (c) Co-culture de lymphocytes T CD4 $^+$ OT-II avec les macrophages ou les cDC issues des rate des souris colitiques traités ou non par SuperMApo et analyse par FACS de la polarisation des lymphocytes grâce à l'expression de l'IL-17A (Th17) de l'IFN- γ (Th1) et de Foxp3 (Treg). Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM de triplicata de groupe de 5 animaux et sont issues d'une expérience représentative parmi 2. ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$ (test t de Student, non paramétrique et non apparié).

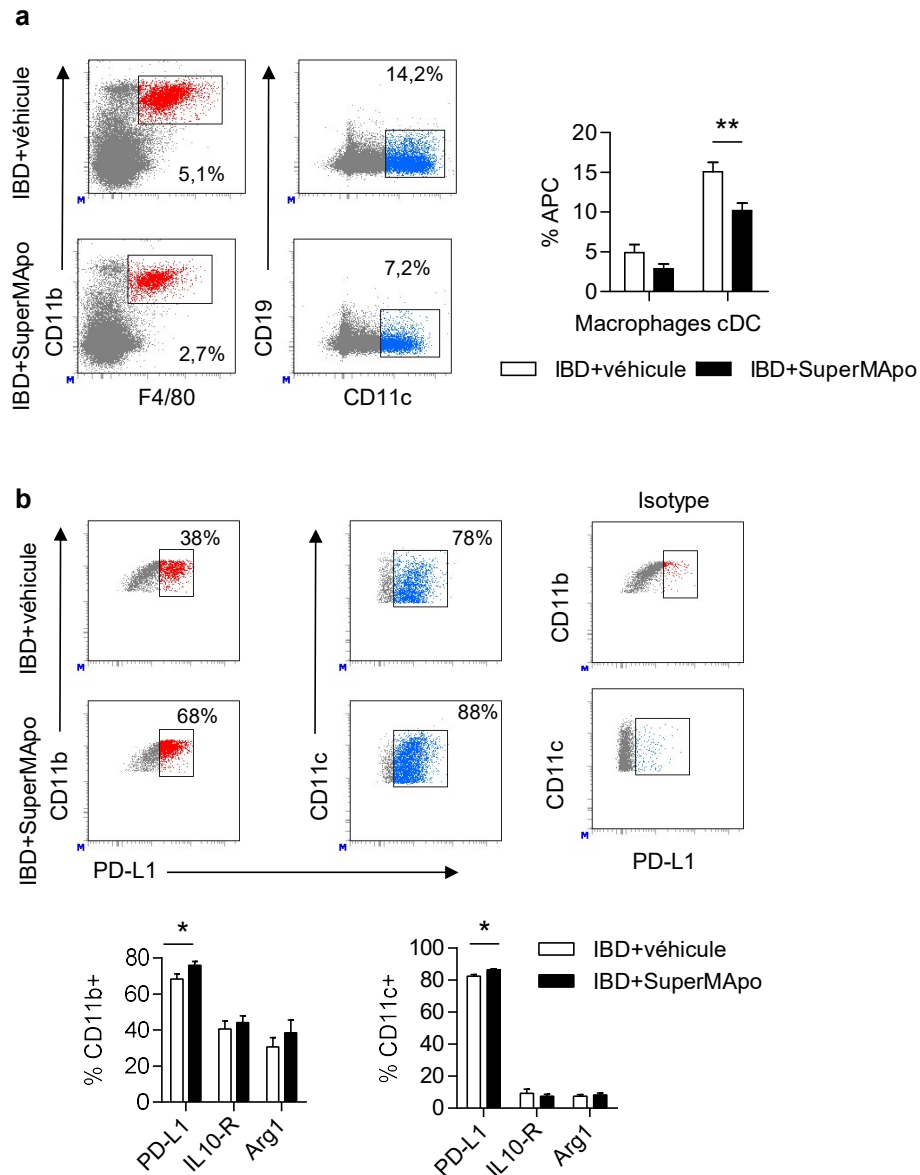


Figure 21 : Le traitement SuperMApo induit l'expression de PD-L1 dans les macrophages et les cDC du colon. Les cDC et les macrophages ont été isolés du côlon des souris colitiques induites par transfert des LTn traitées ou non par SuperMApo. **(a)** Pourcentage d'APC colique et **(b)** évaluation de l'expression des molécules pro-résolutives comme PD-L1, IL-10R ou Arginase 1 par FACS. **(a-b)** Les données sont exprimées en moyenne par groupe $\pm$ SEM de 5 à 6 animaux par groupe. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes; * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$ (test non apparié non paramétrique).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La réaction inflammatoire est une réponse naturelle de l'organisme contre une agression (Matzinger 1994) qui se termine d'elle-même suite à l'efferocytose des cellules effectrices entrées en apoptose (Albert 2004) et crée un microenvironnement pro-résolutif qui aboutit à la réparation tissulaire. De plus en plus de données tendent à démontrer qu'une défaillance dans cette résolution est à l'origine de nombreuses maladies inflammatoires chroniques dont les MICI. Bien que les biothérapies induisent des taux élevés de guérison intestinale et améliorent la rémission de la maladie à long terme, la résistance aux traitements actuels chez certains patients, le besoin d'une intervention chirurgicale plusieurs années après le diagnostic (Solberg, Lygren et al. 2009) ainsi que les multiples effets secondaires indésirables soulignent l'importance de développer de nouvelles thérapies.

L'émergence de la pharmacologie pro-résolutive qui entend traiter le défaut de résolution de l'inflammation plutôt que d'agir sur ses conséquences ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques dans les maladies inflammatoires chroniques. Si de nombreuses données établies dans différents modèles expérimentaux admettent clairement que l'effet des cellules apoptotiques dans le traitement de ces maladies passe notamment par leur élimination par les macrophages, il n'a toutefois jamais été évalué si la réintroduction des facteurs pro-résolutifs sécrétés par ces derniers suite à l'efferocytose pouvait avoir un effet thérapeutique. Ce travail montre pour la première fois le potentiel thérapeutique de SuperMApo, issu de la culture de macrophages et de cellules apoptotiques, dans les MICI et son effet sur la réparation tissulaire.

1. Apport de l'endoscopie dans l'optimisation de modèles murins expérimentaux de colite

Tout d'abord, nous avons mis en place différents modèles précliniques de MICI afin de sélectionner le plus pertinent par rapport à la pratique clinique ainsi qu'à l'évaluation thérapeutique de SuperMApo grâce à l'utilisation de l'endoscopie. Lors de notre étude, la technique d'endoscopie à lumière blanche s'est révélée être facilement réalisable, avec un faible taux de mortalité. L'originalité de notre travail repose sur l'évaluation par vidéo-endoscopie des différents modèles de colite, de leurs symptômes cliniques et histologiques, ainsi que de leur comparaison par rapport aux maladies humaines.

La colonoscopie à lumière blanche est un outil indispensable pour la visualisation directe de la muqueuse intestinale murine et reste à ce jour la plus utilisée en expérimentation animale. Ceci permet d'évaluer la réparation tissulaire au quotidien et à long terme sans besoin d'euthanasier l'animal. De plus, l'endoscopie permet d'administrer des agents de diagnostic ou thérapeutiques ainsi que d'obtenir des biopsies muqueuses. Elle peut être utilisée un nombre illimité de fois au cours d'une même intervention permettant ainsi une analyse plus exhaustive et pertinente des lésions (Waldner, Wirtz et al. 2011; Bruckner, Lenz et al. 2014)(Waldner, Wirtz et al. 2011), ce qui fait de l'endoscopie un vrai atout dans l'évaluation de nouvelles thérapies.

Dans notre étude, le suivi endoscopique des différents modèles de MICI a permis une description plus précise de chaque modèle, fréquemment décrit uniquement par des scores cliniques et histologiques. De plus, cette étude endoscopique montre que le modèle de colite aiguë induite au DSS mime relativement bien la RCH, et que le modèle de colite induite au TNBS mime assez bien les lésions de la MC. Par ailleurs, les lésions endoscopiques observées sont corrélées au score histologique (données non montrées). Les caractéristiques de chaque modèle sont bien distinctes en analyse histologique avec un infiltrat polymorphe sous-muqueux et des ulcérations superficielles dans la colite chronique induite au DSS, et une atteinte transmurale, granulomateuse, avec des ulcérations profondes dans la colite induite par transfert de lymphocytes T naïfs. Cette dichotomie est semblable à celle observée chez l'Homme entre la RCH et la MC.

Grâce à l'amélioration des techniques d'imagerie, certaines lésions peuvent être décrites avec beaucoup plus de précision. En effet, l'équipe de Becker *et al.* en 2005 a utilisé un mini-endoscope rigide (*Coloview*) pour décrire l'actuel score endoscopique seulement en utilisant les lésions observées dans un modèle de colite induite au DSS et dans lequel il n'est pas décrit l'apparition d'ulcères intestinaux (Becker, Fantini et al. 2005). Des scores plus récents ont été publiés (Ravnic, Konerding et al. 2007; Hamilton, Sinnamon et al. 2011; Kodani, Rodriguez-Palacios et al. 2013). Le « *integrated endoscopic scoring system* », publié par l'équipe du Dr F Cominelli, décrit pour la première fois un score qui regroupe la présence et l'induction des tumeurs dans un contexte inflammatoire (Kodani, Rodriguez-Palacios et al. 2013). Néanmoins, ce score ne considère pas d'autres paramètres inflammatoires importants présents dans les scores de MICI humaines, comme la taille des lésions muqueuses, la granularité muqueuse, la présence de fibrine ainsi que la perte de péristaltisme (Mary and Modigliani 1989; Travis, Schnell et al. 2012). C'est pour cette raison que nous avons commencé à

élaborer un nouveau score endoscopique plus adapté aux modèles expérimentaux de colites, en prenant en compte les spécificités de chacun.

L'endoscopie peut donc optimiser l'évaluation de nouveaux médicaments et peut être utilisée pour développer de nouvelles thérapies innovantes. Les modèles «DSS chronique» et «transfert de lymphocytes T naïfs » semblent donc les plus pertinents et seront donc utilisés pour l'évaluation thérapeutique du traitement SuperMApo.

2. SuperMApo et effet thérapeutique dans les modèles précliniques de MICI.

Nos résultats ont montré l'efficacité de SuperMApo sur les modèles « DSS chronique » et « transfert de lymphocytes T naïfs » qui miment respectivement la RCH et la MC humaines chez la souris. La posologie utilisée est celle déjà établie préalablement dans notre laboratoire pour traiter des souris arthritiques. Il est à noter que d'autres modalités de posologie ont été testées dans nos différents modèles de MICI mais n'ont pas montré d'amélioration dans l'effet thérapeutique de notre produit (données non montrées). Cette posologie de SuperMApo est fixée à 1mL de surnageant administré à 48h d'intervalle. Ce volume de SuperMApo est issu de la co-culture de 5 millions de cellules apoptotiques avec un million de macrophages, correspondant à la dose thérapeutique de cellules apoptotiques à laquelle des effets immunomodulateurs ont été observés après injection (Saas, Kaminski et al. 2013). Dans les deux modèles expérimentaux de colite, il semble qu'un traitement précoce de la maladie augmente l'effet thérapeutique de SuperMApo. Pour le modèle de transfert des lymphocytes T naïf, dès la première injection de SuperMApo, les souris présentent rapidement une amélioration des symptômes cliniques de la colite (reprise de poids, disparition des diarrhées et des saignements liés à une amélioration de l'apparence générale de la muqueuse intestinale. Ces données sont corroborées en partie par l'analyse histologique. Dans le modèle de DSS chronique, nous avons opté pour un traitement préventif. Les données cliniques et endoscopiques montrent une amélioration modérée de la sévérité de la maladie après traitement par SuperMApo, en particulier durant le premier et le dernier pic de la maladie (correspondants aux cycles de DSS). De façon intéressante, les souris montrent un effet thérapeutique se maintenant au cours du temps, suggérant un effet tolérogène de SuperMApo à long terme.

Diverses études ont montré que la capture des cellules apoptotiques par des macrophages et sous-populations des cellules dendritiques induisent une tolérance périphérique de manière immunosuppressive (Fadok, Bratton et al. 1998; Ariel, Fredman et al. 2006; Krispin, Bledi et

al. 2006). Notre équipe a montré précédemment (Bonnefoy, Perruche et al. 2011; Bonnefoy, Daoui et al. 2016) que le microenvironnement produit lors de l'efferocytose des cellules apoptotiques par les macrophages *in vivo* favorise l'expansion des Treg spécifiques de l'antigène, *via* les pDC qui peuvent contrôler à terme l'inflammation (Bonnefoy, Couturier et al. 2011). Par ailleurs, une étude a montré *in vitro* que les cellules dendritiques ayant capté des cellules apoptotiques ne répondaient pas au lipopolysaccharide (Stuart, Lucas et al. 2002). En effet, nous avons observé que les cDC et les macrophages issus de la rate de souris colitiques traitées par SuperMApo présentent un profil plus pro-tolérologique avec moins de réponses aux ligands des TLR *ex vivo*. De plus, la co-culture de ces mêmes cellules avec des lymphocytes T naïfs favorisent l'induction de Treg et inhibent la production de Th1 *ex vivo*. L'amélioration des symptômes au cours d'une colite après traitement avec des anticorps anti-TNF α , anti-IFN- γ et anti-IL-1 β suggèrent une inhibition de la voie NF- κ B et de l'inflammasome dans les cDC et les macrophages de la *lamina propria* (Cadwell, Patel et al. 2010; Bauer, Duell et al. 2012). Depuis des années, il est bien admis que les cellules apoptotiques peuvent inhiber la voie de signalisation du TLR et/ou de NF- κ B entraînant une diminution de la réponse inflammatoire (Lucas, Stuart et al. 2006; Amarillyo, Verbovetski et al. 2010). Récemment ces données ont été confirmées *in vivo* dans un modèle de colite induite au DSS (Grau, Tabib et al. 2015). Il serait donc très intéressant d'étudier la régulation des voies inflammatoires, notamment la voie NF- κ B et ou NLRP3 sur les APC intestinales issues de souris colitiques après traitement par SuperMApo.

Lors de notre étude, nous avons également montré que les macrophages et les cDC obtenus à partir de la muqueuse intestinale après 10 jours post-traitement, présentent une forte expression de PD-L1 (*programmed cell death ligand-1*) par rapport aux souris non traitées. PD-L1, exprimé également par des cellules de la lignée non myéloïdes comme les IEC et les fibroblastes (Freeman, Long et al. 2000), joue un rôle majeur dans le contrôle de l'inflammation intestinale (Scandiuizi, Ghosh et al. 2014) du système immunitaire adaptatif, et participe à l'atténuation de la réponse inflammatoire et à l'établissement d'une tolérance périphérique (Dong, Zhu et al. 1999). Concrètement, il a été montré que PD-L1 module l'inflammation, notamment en diminuant l'expression du TNF- α et au contraire en induisant celle d'IL-22 sur les cellules CD11c⁺CD11b⁺ issues de la lamina propria (Scandiuizi, Ghosh et al. 2014). Une perte de PD-1, récepteur de PD-L1, est à l'origine d'une rupture de tolérance et d'une induction de maladies auto-immunes (Nishimura, Nose et al. 1999). PD-L1 est décrit comme un important marqueur à la surface des macrophages pro-résolutifs (Zigmond,

Bernshtein et al. 2014) et induit une forte inhibition de la prolifération de lymphocytes T effecteurs et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Freeman, Long et al. 2000). L'augmentation de l'expression de PD-L1 à la surface des APC est en lien avec une diminution significative de l'infiltrat inflammatoire au niveau de la muqueuse intestinale observée après traitement par SuperMApo, sans changement au niveau des Treg. Ainsi, il serait intéressant d'étudier si PD-L1 est surexprimé dans les fibroblastes et les IEC issus du côlon des souris colitiques après traitement par SuperMApo, ainsi que leur implication dans le contrôle de la réparation tissulaire.

Vu la complexité de la physiopathologie des MICI, il semble très pertinent d'élargir l'étude de SuperMApo vers d'autres types cellulaires, notamment les cellules B. Récemment, il a été montré que l'IL-33, une alarmine produite lors d'un dommage tissulaire (Palmer and Gabay 2011), induit des lymphocytes B régulateurs (Breg) producteurs d'IL-10 qui est fondamentale pour la modulation de l'inflammation (Sattler, Ling et al. 2014). De plus, il a été montré *in vivo* et *in vitro* que les Breg sont nécessaires pour l'induction et l'expansion des Treg (Wang, Ray et al. 2015) formant ensemble une boucle de rétrocontrôle positive afin de maintenir l'homéostasie et de moduler l'inflammation intestinale. Une absence de cellules B dans notre modèle pourrait expliquer le fait qu'aucune variation dans le pourcentage des Treg n'a été observée après traitement par SuperMApo.

Enfin, l'effet de ce nouvel outil thérapeutique pourrait encore être testé sur les ILC (*innate lymphoid cells*) récemment découvertes et ayant un rôle très important dans la régulation de l'homéostasie intestinale (Diefenbach, Colonna et al. 2014). Tandis que les ILC1 (Klose, Flach et al. 2014) et ILC3 (Klose, Kiss et al. 2013) jouent un rôle inflammatoire, les ILCreg favorisent la résolution de l'inflammation. De plus, le TGF β induit les ILCreg et leur maintenance de manière autocrine (Wang, Xia et al. 2017).

3. SuperMApo et l'induction de la réparation tissulaire.

Les MICI sont caractérisées par une inflammation intestinale chronique récurrente avec l'apparition d'ulcères dans la muqueuse, impliquant une réponse pathologique à la fois dans le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif, ainsi que dans l'épithélium et l'endothélium intestinal (Baumgart and Carding 2007; Engel and Neurath 2010). Ceci suggère le besoin de nouvelles approches thérapeutiques qui modulent spécifiquement ces deux composants à l'origine de la maladie, l'inflammation et la réparation des tissus (Neurath 2014). Récemment, l'importance primordiale de la barrière épithéliale intestinale dans la

modulation de l'homéostasie intestinale a été mise en évidence (Okamoto and Watanabe 2016). En effet, l'épithélium intestinal relie les facteurs pathologiques à la base du développement des MICI (flore microbienne, facteurs environnementaux) en interagissant directement avec ces différents facteurs (Cadwell 2010; Okamoto and Watanabe 2016). Il a été décrit qu'une altération primaire de la barrière intestinale pourrait être à l'origine des MICI (Madsen, Malfair et al. 1999; Groschwitz and Hogan 2009; Bischoff 2011; Camilleri, Madsen et al. 2012) sans savoir si cette altération est une cause (Arrieta, Madsen et al. 2015) ou une conséquence (Lissner, Schumann et al. 2015).

Une rupture de la tolérance, due en partie à l'altération de la barrière intestinale, est induite dans notre modèle de transfert de lymphocytes T naïfs (Powrie, Leach et al. 1994). Celle-ci implique les cellules de l'immunité innée qui induisent une polarisation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs vers un profil Th1, suite à leur contact avec la flore et les antigènes intestinaux ; Nous avons montré que SuperMApo induit une diminution du pourcentage de Th1, une des principales sources d'IFN- γ lors de l'inflammation intestinale (Powrie, Leach et al. 1994; Powrie and Leach 1995). Cette diminution de Th1 est en lien direct avec une amélioration de l'aspect de la muqueuse intestinale et une récupération de la perméabilité intestinale chez les souris colitiques. Cette amélioration peut être expliquée par deux faits : la diminution du pourcentage de Th1 dans la muqueuse intestinale et l'activation des capacités réparatrices des acteurs majeurs de la réparation tissulaire tels que les fibroblastes et les IEC. En effet il a été montré une corrélation significative entre l'induction de la colite par transfert des lymphocytes T naïfs et une forte concentration en IFN- γ . Cette cytokine peut avoir des effets directs sur les IEC, comme une amélioration de la transmigration des PMN et une perméabilité accrue des IEC (Powrie, Leach et al. 1994; Beurepaire, Smyth et al. 2009).

Quant à l'implication de SuperMApo dans l'activation de la réparation tissulaire, il a été montré que les fibroblastes coliques sont impliqués de manière critique dans la cicatrisation des lésions dans le tractus gastro-intestinal (Neufert, Becker et al. 2013). Nous avons pu montrer une augmentation de la migration, de la prolifération et de la cicatrisation *in vitro* des fibroblastes primaires et des MODE-K après traitement par SuperMApo. De plus, une augmentation des myofibroblastes, la forme active des fibroblastes, et de leur capacité contractile *in vitro* a été également observée. De manière surprenante, les fibroblastes traités par SuperMApo *in vitro* présentent une diminution de l'expression des gènes participant à la synthèse de la MEC, notamment les collagènes de type I et III ainsi que la fibronectine. Ainsi, les facteurs pro-résolutifs pourraient induire une reprogrammation des myofibroblastes vers

un phénotype pro-réparateur qui permettrait aux myofibroblastes d'acquérir des capacités réparatrices comme la migration, la prolifération et la contraction, mais aussi induire une diminution de l'expression de certains gènes impliqués dans la formation de la MEC afin de prévenir le processus de fibrose. Les fibroblastes, situées principalement en-dessous de la monocouche des IEC et des cryptes intestinales, possèdent une localisation privilégiée leur permettant de détecter les signaux issus des dommages de la barrière intestinale de façon rapide et optimale. Suite à leur activation (Tomasek, Gabbiani et al. 2002), ces cellules vont migrer rapidement vers la zone blessée, puis proliférer et permettre d'initier le processus de réparation tissulaire (Murray and Wynn 2011). De plus, leur capacité contractile vont renforcer la fermeture de la blessure (Stappenbeck and Miyoshi 2009). Après une agression, la prolifération et la différenciation des IEC augmentent dans les cryptes intestinales afin de restituer rapidement la zone dénudée et restaurer l'intégrité et la fonctionnalité de la barrière intestinale (Dise, Frey et al. 2008; Sturm and Dignass 2008). Ainsi, nos données *in vitro* sont conformes à celles de la littérature.

Ces données sont en lien avec les données obtenues *in vivo*. En effet, il semble que la désintégration cellulaire de la barrière intestinale après un stress mécanique dans un modèle de blessure cicatrisation chez la souris, est restaurée après traitement par SuperMApo. Cette capacité réparatrice de SuperMApo a également été confirmée dans un contexte inflammatoire en utilisant le modèle de transfert de lymphocytes T naïfs. Ce modèle nous a ainsi permis d'observer un lien entre le rétablissement de la perméabilité de la barrière intestinale après traitement avec une activation de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et la prolifération des IEC.

Dans le cadre de notre étude, nous avons observé que les colons de souris ayant été traitées par SuperMApo présentent une diminution de l'expression de gènes de la MEC, (notamment de la Fn1) et du TGF β . Récemment, il a été montré que l'utilisation des cellules apoptotiques comme traitement dans un modèle expérimental de fibrose pulmonaire induit l'expression de PPAR- γ et diminue l'expression de marqueurs de fibrose, notamment le collagène $\alpha 2$ et la fibronectine (Yoon, Kim et al. 2015). De plus, dans un modèle expérimental de réparation tissulaire de la peau, les myofibroblastes recrutés lors de la phase finale de cicatrisation deviennent sénescents, arrêtent de proliférer, et augmentent l'expression des MMP tandis qu'ils diminuent celle du collagène et/ou du TGF β (Jun and Lau 2010).

Comme déjà montré par nombreuses travaux (Postlethwaite, Keski-Oja et al. 1987; Montesano and Orci 1988; Desmouliere, Geinoz et al. 1993; Desmouliere 1995) le TGF β a un rôle essentiel dans le control des myofibroblastes, il semble donc très pertinent d'étudier le lien entre la diminution de l'expression du TGF β et des gènes codant pour les protéines de la MEC comme observé après traitement par SuperMApo. De plus, afin de mieux déterminer le rôle anti-fibrotique des facteurs pro-résolutives contenus dans SuperMApo, il serait intéressant d'étudier le niveau d'expression de PPAR- γ ainsi que l'état métabolique des fibroblastes issus du côlon de souris colitiques après traitement par SuperMApo. L'évaluation de l'expression et de l'activité des MMP sécrétées par les fibroblastes et les macrophages en présence de SuperMApo pourrait également présenter un intérêt certain, tout comme la capacité de remodelage de la MEC et de contraction des blessures par les fibroblastes en inhibant/bloquant les différentes espèces de MMP.

Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que les facteurs pro-résolutifs contenus dans SuperMApo pourraient initier les mécanismes effectifs d'une réparation tissulaire optimale de la muqueuse intestinale en activant les fibroblastes du côlon, les IEC et éventuellement d'autres cellules fortement impliquées dans le processus de réparation tissulaire comme les macrophages (Zigmond, Bernshtein et al. 2014).

Les différentes phases de la réparation tissulaire sont facilitées par des protéines régulatrices sécrétées par les cellules environnantes à la blessure. Parmi les principales protéines synthétisées, on y retrouve les chimiokines (CXCR4 et CXCL12)(Werner, Guzman-Gur et al. 2013), les défensines (Kim 2014), les peptides *trefoils* (Dignass, Lynch-Devaney et al. 1994), divers facteurs de croissance (TGF β , l'EFG, le FGF, l'IGF et le VEGF)(Krishnan, Arnone et al. 2011) et certaines cytokines (l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL-6, l'IL-22, l'IL-36 et le TNF- α)(Sturm and Dignass 2008; Neurath and Travis 2012; Choi, Kim et al. 2015; Lindemans, Calafiore et al. 2015; Scheibe, Backert et al. 2017). Durant notre travail, nous nous sommes intéressés aux facteurs de croissance sécrétés par les macrophages lors de la clairance des cellules apoptotiques et contenus dans SuperMApo. Des taux significativement élevés de TGF β , IGF-I et VEGF ont été quantifiés au sein du SuperMApo par rapport au surnageant des macrophages ou des cellules apoptotiques seules. De nombreuses études ont montré que les macrophages pro-résolutifs et pro-réparateurs produisent, entre autres, de grandes quantités d'IGF-I et de VEGF, qui induisent principalement la prolifération cellulaire ainsi que la formation des nouveaux vaisseaux sanguins. Les macrophages produisent également des médiateurs solubles comme le TGF β qui induit le recrutement et la différenciation des fibroblastes en

myofibroblastes, permettant la contraction des lésions ainsi que la synthèse de la MEC (Akhurst and Hata 2012). Le blocage de ces facteurs dans le SuperMApo nous a permis de mettre en évidence leur importance dans l'acquisition de certaines caractéristiques réparatrices des fibroblastes et des MODE-K *in vitro*. En effet, l'effet prolifératif de SuperMApo sur les cellules épithéliales est légèrement dépendant du TGF β et d'IGF-I, néanmoins le blocage de ces trois facteurs ne semble pas affecter la prolifération des myofibroblastes, si bien que le blocage du TGF β et du VEGF inhibent fortement leur différenciation. De plus, l'induction de la migration observée sur les fibroblastes et MODE-K après traitement avec SuperMApo est perdue après les blocages des facteurs de croissance. En lien avec les données *in vitro*, nous montrons que le blocage de ces trois facteurs semble abolir l'effet cicatrisant de SuperMApo observé par endoscopie. Néanmoins, cela ne permet pas une perte totale de l'effet de SuperMApo, particulièrement au niveau du score clinique et la perte de poids ainsi que la protection de la barrière intestinale, suggérant que ces facteurs ne sont pas les seuls responsables de cet effet. En effet, il semble pertinent de penser que ces facteurs jouent un rôle synergique avec d'autres molécules pro résolutive présentes dans ce sécrétome. Ainsi, des données préliminaires montrent que le TGF β interagit avec la thrombospondine existante dans le SuperMApo (données non montrées). La thrombospondine intervient, entre autres, dans l'induction de l'efferocytose (Savill, Dransfield et al. 1990), la modulation de différentes molécules comme le TGF β (Sweetwyne and Murphy-Ullrich 2012), les MMPs (Bein and Simons 2000) et leurs inhibiteurs (TIMPs) (John, Hu et al. 2009) ainsi que dans l'angiogenèse (Jimenez, Volpert et al. 2000). Il semble donc intéressant d'étudier le rôle de la thrombospondine dans le mécanisme de réparation tissulaire observé après traitement par SuperMApo.

Enfin, les médiateurs lipidiques pourraient avoir un rôle résolutif essentiel au sein de notre sécrétome. Au cours de ces dernières années, les travaux de l'équipe du Dr Serhan ont mis en évidence qu'un changement de classe lipidique, induit lors du processus d'efferocytose est une étape clé dans la résolution de l'inflammation (Serhan 2004; Serhan, Brain et al. 2007; Serhan, Chiang et al. 2008; Serhan, Yang et al. 2009; Serhan 2014). Dans ces travaux, l'ensemble de ces lipides pro-résolutifs sont connus sous le nom de médiateurs pro-résolutifs spécialisés (SPM). Les SPM vont moduler de nombreux processus lors de la résolution de l'inflammation, notamment l'induction de l'apoptose des neutrophiles (El Kebir, Gjorstrup et al. 2012) et des cellules de l'immunité adaptative (Ariel, Li et al. 2005; Ariel, Fredman et al. 2006), l'inhibition du recrutement des neutrophiles (Spite, Norling et al. 2009), l'amélioration

du processus d'efferocytose (Ohira, Arita et al. 2010) ainsi que de la phagocytose des pathogènes par les macrophages (Chiang, Fredman et al. 2012; Lucas, Dorward et al. 2014) et la modulation des médiateurs inflammatoires (Chiang, Fredman et al. 2012; Dalli, Winkler et al. 2013), notamment les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8 (Cox, Phillips et al. 2015). Finalement, les SPM présentent un rôle très important au cours de la régénération tissulaire et la cicatrisation, notamment en favorisant le processus de re-épithélialisation de manière macrophage-dépendante (Wang, Hu et al. 2012; Tang, Zhang et al. 2013). Tous ces résultats font des SPM un très bon candidat pour expliquer une partie des effets pro-résolutifs induits par SuperMApo et feront l'objet d'une étude approfondie.

4. SuperMApo et l'induction de l'efferocytose des IEC

Par ailleurs, la capacité de phagocytose des cellules apoptotiques par les MODE-K *in vitro* a été améliorée après traitement par SuperMApo. Il est largement reconnu que l'élimination des cellules apoptotiques par des phagocytes professionnels induit une tolérance immunitaire (Ortega-Gomez, Perretti et al. 2013; Saas, Kaminski et al. 2013; Saas, Daguindau et al. 2016). Il existe de nombreuses maladies inflammatoires où une défaillance dans l'élimination des cellules apoptotiques a été décrite (Nagata, Hanayama et al. 2010). De plus, les patients atteints de MC ou RCH présentent une augmentation des cellules apoptotiques dans l'épithélium intestinal par rapport aux personnes saines ou aux zones enflammées (Hagiwara, Tanaka et al. 2002; Di Sabatino, Ciccocioppo et al. 2003). Les résultats présentés ici suggèrent que SuperMApo est capable d'augmenter la clairance des cellules apoptotiques *in vitro*. Nos résultats sont en concordance avec ceux de Lee *et al.* qui ont mis en évidence un nouveau rôle fonctionnel des IEC coliques. En effet, ces cellules peuvent contribuer à la clairance des cellules intestinales apoptotiques voisines. Cette étude suggère qu'une accumulation et/ou un défaut dans l'élimination des cellules apoptotiques par phagocytose dans le côlon pourrait être une cause supplémentaire dans l'inflammation colique (Lee, Penberthy et al. 2016). Différentes protéines de pontage participant à la prise en charge des cellules apoptotiques lors de l'efferocytose ont été mises en évidence au sein de SuperMApo (données non montrées). Parmi ces protéines, on trouve la trombospondine-1 (Savill, Dransfield et al. 1990), le C1q (Ogden, deCathelineau et al. 2001) et le MFG-E8 (Hanayama, Tanaka et al. 2002; Nagata, Hanayama et al. 2010). Ces protéines pourraient être les principales responsables de l'augmentation de la prise en charge des cellules apoptotiques par les MODE-K, et non une reprogrammation comme cela a été décrit pour d'autres types cellulaires. En effet, dans notre étude, les cellules présentent un plus fort pourcentage de

phagocytose lorsqu'elles sont mises en co-culture avec les cellules apoptotiques en présence de SuperMApo. Néanmoins, le taux de phagocytose ne varie pas lorsque les cellules sont prétraitées avec SuperMApo puis mises en culture avec les cellules apoptotiques (données non montrées). Une extrapolation intéressante de ce travail est que l'amélioration de la clairance cellulaire par les cellules épithéliales intestinales aux premiers stades des MICI pourrait potentiellement aider à réduire les réponses inflammatoires observées et à augmenter le processus de réparation tissulaire dans les derniers stades de la maladie. Ce processus peut être une possible cible pour développer de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement de certains troubles inflammatoires.

En conclusion, les résultats présentés dans l'ensemble de ces travaux montrent qu'en plus d'un effet immunomodulateur à travers la reprogrammation des APC vers un état plus tolérogène, SuperMApo a un rôle très important dans l'induction du processus de cicatrisation et de réparation tissulaire en partie associé aux facteurs de croissance TGF β , IGF-I et VEGF. SuperMApo va également permettre aux cellules épithéliales de mieux nettoyer la zone lésée en augmentant leur capacité phagocytaire. Dans l'ensemble, ces résultats confirment l'effet pro-résolutif du médicament SuperMApo dans un modèle expérimental de MC. De plus, des données préliminaires montrent que des fibroblastes primaires issus des patients atteints de MC développent des propriétés cicatrisantes *in vitro* après traitement par SuperMApo, encourageant ainsi son développement et son utilisation chez l'Homme, notamment dans le traitement des MICI.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, C. and J. H. Cho (2007). "Bugging of the intestinal mucosa." N Engl J Med **357**(7): 708-710.
- Afonso, P. V., C. P. McCann, et al. (2013). "Discoidin domain receptor 2 regulates neutrophil chemotaxis in 3D collagen matrices." Blood **121**(9): 1644-1650.
- Ait-Oufella, H., B. L. Salomon, et al. (2006). "Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice." Nat Med **12**(2): 178-180.
- Akhurst, R. J. and A. Hata (2012). "Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease." Nat Rev Drug Discov **11**(10): 790-811.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Albert, M. L. (2004). "Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation?" Nat Rev Immunol **4**(3): 223-231.
- Alkim, C., H. Alkim, et al. (2015). "Angiogenesis in Inflammatory Bowel Disease." Int J Inflam **2015**: 970890.
- Altnauer, F., S. Martinelli, et al. (2004). "Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by survivin in terminally differentiated neutrophils." J Exp Med **199**(10): 1343-1354.
- Amarilyo, G., I. Verbovetski, et al. (2010). "iC3b-opsonized apoptotic cells mediate a distinct anti-inflammatory response and transcriptional NF-kappaB-dependent blockade." Eur J Immunol **40**(3): 699-709.
- Ananthakrishnan, A. N. (2015). "Epidemiology and risk factors for IBD." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **12**(4): 205-217.
- Andersson, R. E., G. Olaison, et al. (2001). "Appendectomy and protection against ulcerative colitis." N Engl J Med **344**(11): 808-814.
- Anon (2015). "La désinfection du matériel en endoscopie digestive - Desinfectmat_endodig.pdf. Available at: http://www.sfed.org/sites/sfed.prod/files/documents_sfed/files/recommandations/Desinfectmat_endodig.pdf."
- Ansary, M. M., S. Ishihara, et al. (2014). "Apoptotic cells ameliorate chronic intestinal inflammation by enhancing regulatory B-cell function." Inflamm Bowel Dis **20**(12): 2308-2320.
- Ariel, A., G. Fredman, et al. (2006). "Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression." Nat Immunol **7**(11): 1209-1216.
- Ariel, A., P. L. Li, et al. (2005). "The docosatriene protectin D1 is produced by TH2 skewing and promotes human T cell apoptosis via lipid raft clustering." J Biol Chem **280**(52): 43079-43086.
- Arrieta, M. C., K. L. Madsen, et al. (2015). "Increasing small intestinal permeability worsens colitis in the IL-10-/- mouse and prevents the induction of oral tolerance to ovalbumin." Inflamm Bowel Dis **21**(1): 8-18.
- Asseman, C., S. Mauze, et al. (1999). "An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation." J Exp Med **190**(7): 995-1004.
- Auffray, C., M. H. Sieweke, et al. (2009). "Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells." Annu Rev Immunol **27**: 669-692.
- Bahou, W. F. and D. V. Gnatenko (2004). "Platelet transcriptome: the application of microarray analysis to platelets." Semin Thromb Hemost **30**(4): 473-484.
- Barker, N., J. H. van Es, et al. (2007). "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5." Nature **449**(7165): 1003-1007.
- Barton, G. M. and J. C. Kagan (2009). "A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization." Nat Rev Immunol **9**(8): 535-542.
- Bauer, C., P. Duewell, et al. (2012). "Protective and aggravating effects of Nlrp3 inflammasome activation in IBD models: influence of genetic and environmental factors." Dig Dis **30 Suppl 1**: 82-90.
- Baumgart, D. C. and S. R. Carding (2007). "Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology." Lancet **369**(9573): 1627-1640.
- Beaugerie, L., N. Brousse, et al. (2009). "Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study." Lancet **374**(9701): 1617-1625.

- Beaurepaire, C., D. Smyth, et al. (2009). "Interferon-gamma regulation of intestinal epithelial permeability." J Interferon Cytokine Res **29**(3): 133-144.
- Beck, P. L., I. M. Rosenberg, et al. (2003). "Transforming growth factor-beta mediates intestinal healing and susceptibility to injury in vitro and in vivo through epithelial cells." Am J Pathol **162**(2): 597-608.
- Becker, C., M. C. Fantini, et al. (2004). "TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling." Immunity **21**(4): 491-501.
- Becker, C., M. C. Fantini, et al. (2005). "In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy." Gut **54**(7): 950-954.
- Becker, C., M. C. Fantini, et al. (2005). "IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer." Cell Cycle **4**(2): 217-220.
- Becker, V., T. Vercauteren, et al. (2007). "High-resolution miniprobe-based confocal microscopy in combination with video mosaicing (with video)." Gastrointest Endosc **66**(5): 1001-1007.
- Bein, K. and M. Simons (2000). "Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity." J Biol Chem **275**(41): 32167-32173.
- Belkaid, Y. and S. Naik (2013). "Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals." Nat Immunol **14**(7): 646-653.
- Berahovich, R. D., Z. Miao, et al. (2005). "Proteolytic activation of alternative CCR1 ligands in inflammation." J Immunol **174**(11): 7341-7351.
- Bernstein, C. N. (2012). "Why and where to look in the environment with regard to the etiology of inflammatory bowel disease." Dig Dis **30 Suppl 3**: 28-32.
- Berse, B., L. F. Brown, et al. (1992). "Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors." Mol Biol Cell **3**(2): 211-220.
- Best, W. R., J. M. Beckett, et al. (1976). "Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study." Gastroenterology **70**(3): 439-444.
- Bevins, C. L. and N. H. Salzman (2011). "Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis." Nat Rev Microbiol **9**(5): 356-368.
- Billioud, V., W. J. Sandborn, et al. (2011). "Loss of response and need for adalimumab dose intensification in Crohn's disease: a systematic review." Am J Gastroenterol **106**(4): 674-684.
- Bischoff, S. C. (2011). "'Gut health': a new objective in medicine?" BMC Med **9**: 24.
- Bonaz, B. L. and C. N. Bernstein (2013). "Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease." Gastroenterology **144**(1): 36-49.
- Bonnefoy, F., M. Couturier, et al. (2011). "TGF-beta-exposed plasmacytoid dendritic cells participate in Th17 commitment." J Immunol **186**(11): 6157-6164.
- Bonnefoy, F., A. Daoui, et al. (2016). "Apoptotic cell infusion treats ongoing collagen-induced arthritis, even in the presence of methotrexate, and is synergic with anti-TNF therapy." Arthritis Res Ther **18**(1): 184.
- Bonnefoy, F., S. Perruche, et al. (2011). "Plasmacytoid dendritic cells play a major role in apoptotic leukocyte-induced immune modulation." J Immunol **186**(10): 5696-5705.
- Borregaard, N. and J. B. Cowland (1997). "Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte." Blood **89**(10): 3503-3521.
- Bourikas, L. A. and K. A. Papadakis (2009). "Musculoskeletal manifestations of inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **15**(12): 1915-1924.
- Bournazou, I., J. D. Pound, et al. (2009). "Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin." J Clin Invest **119**(1): 20-32.
- Brand, S., F. Beigel, et al. (2006). "IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290**(4): G827-838.
- Branzk, N., A. Lubojemska, et al. (2014). "Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens." Nat Immunol **15**(11): 1017-1025.
- Brenna, O., M. W. Furnes, et al. (2013). "Relevance of TNBS-colitis in rats: a methodological study with endoscopic, histologic and Transcriptomic [corrected] characterization and correlation to IBD." PLoS One **8**(1): e54543.
- Brinkmann, V., U. Reichard, et al. (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." Science **303**(5663): 1532-1535.
- Brown, S., I. Heinisch, et al. (2002). "Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment." Nature **418**(6894): 200-203.
- Brubaker, S. W., K. S. Bonham, et al. (2015). "Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective." Annu Rev Immunol **33**: 257-290.
- Bruckner, M., P. Lenz, et al. (2014). "Murine endoscopy for in vivo multimodal imaging of

- carcinogenesis and assessment of intestinal wound healing and inflammation." J Vis Exp(90).
- Buckley, C. D., D. W. Gilroy, et al. (2014). "Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation." Immunity **40**(3): 315-327.
- Buisson, A., M. A. Bringer, et al. (2016). "Macrophages Versus Escherichia coli: A Decisive Fight in Crohn's Disease." Inflamm Bowel Dis **22**(12): 2943-2955.
- Buisson, A., J. B. Chevaux, et al. (2012). "Review article: the natural history of postoperative Crohn's disease recurrence." Aliment Pharmacol Ther **35**(6): 625-633.
- Cabezón, R. and D. Benítez-Ribas (2013). "Therapeutic potential of tolerogenic dendritic cells in IBD: from animal models to clinical application." Clin Dev Immunol **2013**: 789814.
- Cadwell, K. (2010). "Crohn's disease susceptibility gene interactions, a NOD to the newcomer ATG16L1." Gastroenterology **139**(5): 1448-1450.
- Cadwell, K., K. K. Patel, et al. (2010). "Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine." Cell **141**(7): 1135-1145.
- Camilleri, M., K. Madsen, et al. (2012). "Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease." Neurogastroenterol Motil **24**(6): 503-512.
- Cao, D., V. Malmstrom, et al. (2003). "Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis." Eur J Immunol **33**(1): 215-223.
- Caprilli, R., M. A. Gassull, et al. (2006). "European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations." Gut **55** Suppl 1: i36-58.
- Carman, C. V., P. T. Sage, et al. (2007). "Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes." Immunity **26**(6): 784-797.
- Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." Nat Med **9**(6): 653-660.
- Cash, J. L., A. R. Christian, et al. (2010). "Chemerin peptides promote phagocytosis in a ChemR23- and Syk-dependent manner." J Immunol **184**(9): 5315-5324.
- Cash, J. L., R. Hart, et al. (2008). "Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23." J Exp Med **205**(4): 767-775.
- Castaneda, F. E., B. Walia, et al. (2005). "Targeted deletion of metalloproteinase 9 attenuates experimental colitis in mice: central role of epithelial-derived MMP." Gastroenterology **129**(6): 1991-2008.
- Cayatte, C., B. Joyce-Shaikh, et al. (2012). "Biomarkers of Therapeutic Response in the IL-23 Pathway in Inflammatory Bowel Disease." Clin Transl Gastroenterol **3**: e10.
- Chazaud, B. (2014). "Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration." Immunobiology **219**(3): 172-178.
- Chen, W., M. E. Frank, et al. (2001). "TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu." Immunity **14**(6): 715-725.
- Chen, W., W. Jin, et al. (2003). "Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." J Exp Med **198**(12): 1875-1886.
- Chiang, N., G. Fredman, et al. (2012). "Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements." Nature **484**(7395): 524-528.
- Chiodini, R. J., S. E. Dowd, et al. (2013). "Crohn's disease may be differentiated into 2 distinct biotypes based on the detection of bacterial genomic sequences and virulence genes within submucosal tissues." J Clin Gastroenterol **47**(7): 612-620.
- Chiurchiu, V., A. Leuti, et al. (2016). "Proresolving lipid mediators resolvins D1, resolvins D2, and maresin 1 are critical in modulating T cell responses." Sci Transl Med **8**(353): 353ra111.
- Choi, J. S., K. H. Kim, et al. (2015). "The matricellular protein CCN1 promotes mucosal healing in murine colitis through IL-6." Mucosal Immunol **8**(6): 1285-1296.
- Chujo, S., F. Shirasaki, et al. (2009). "Role of connective tissue growth factor and its interaction with basic fibroblast growth factor and macrophage chemoattractant protein-1 in skin fibrosis." J Cell Physiol **220**(1): 189-195.
- Cohen, J. J., R. C. Duke, et al. (1992). "Apoptosis and programmed cell death in immunity." Annu Rev Immunol **10**: 267-293.
- Colombel, J. F., E. V. Loftus, Jr., et al. (2004). "The safety profile of infliximab in patients with Crohn's disease: the Mayo clinic experience in 500 patients." Gastroenterology **126**(1): 19-31.
- Colombel, J. F., E. Louis, et al. (2012). "Deep remission: a new concept?" Dig Dis **30** Suppl 3: 107-111.
- Colombel, J. F., W. Reinisch, et al. (2015). "Randomised clinical trial: deep remission in biologic and immunomodulator naive patients with Crohn's disease - a SONIC post hoc analysis." Aliment Pharmacol Ther **41**(8): 734-746.

- Colombel, J. F., W. J. Sandborn, et al. (2010). "Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease." N Engl J Med **362**(15): 1383-1395.
- Colotta, F., F. Re, et al. (1992). "Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products." Blood **80**(8): 2012-2020.
- Cope, A. P., R. S. Liblau, et al. (1997). "Chronic tumor necrosis factor alters T cell responses by attenuating T cell receptor signaling." J Exp Med **185**(9): 1573-1584.
- Cosnes, J. (2016). "Smoking and Diet: Impact on Disease Course?" Dig Dis **34**(1-2): 72-77.
- Cox, R., Jr., O. Phillips, et al. (2015). "Resolvins Decrease Oxidative Stress Mediated Macrophage and Epithelial Cell Interaction through Decreased Cytokine Secretion." PLoS One **10**(8): e0136755.
- Cramer, T. and R. S. Johnson (2003). "A novel role for the hypoxia inducible transcription factor HIF-1 α : critical regulation of inflammatory cell function." Cell Cycle **2**(3): 192-193.
- Creagh, E. M. and L. A. O'Neill (2006). "TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity." Trends Immunol **27**(8): 352-357.
- Crohn, B. B., L. Ginzburg, et al. (1984). "Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer." JAMA **251**(1): 73-79.
- Cruickshank, S. M., L. D. McVay, et al. (2004). "Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation." Gut **53**(5): 678-684.
- Curkovic, I., M. Egbring, et al. (2013). "Risks of inflammatory bowel disease treatment with glucocorticosteroids and aminosalicylates." Dig Dis **31**(3-4): 368-373.
- Dabiri, G., A. Campaner, et al. (2006). "A TGF- β 1-dependent autocrine loop regulates the structure of focal adhesions in hypertrophic scar fibroblasts." J Invest Dermatol **126**(5): 963-970.
- Dalli, J., L. V. Norling, et al. (2008). "Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles." Blood **112**(6): 2512-2519.
- Dalli, J. and C. N. Serhan (2012). "Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators." Blood **120**(15): e60-72.
- Dalli, J., J. W. Winkler, et al. (2013). "Resolvin D3 and aspirin-triggered resolvin D3 are potent immunoresolvents." Chem Biol **20**(2): 188-201.
- Darby, I. A. and T. D. Hewitson (2007). "Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis." Int Rev Cytol **257**: 143-179.
- Darfeuille-Michaud, A., J. Boudeau, et al. (2004). "High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease." Gastroenterology **127**(2): 412-421.
- Das, A., M. Sinha, et al. (2015). "Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration." Am J Pathol **185**(10): 2596-2606.
- Davies, L. C., S. J. Jenkins, et al. (2013). "Tissue-resident macrophages." Nat Immunol **14**(10): 986-995.
- de la Rosa, G., D. Yang, et al. (2008). "Lactoferrin acts as an alarmin to promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses." J Immunol **180**(10): 6868-6876.
- de Oliveira, S., E. E. Rosowski, et al. (2016). "Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse." Nat Rev Immunol **16**(6): 378-391.
- de Paiva, C. S., C. E. Schwartz, et al. (2012). "Resolvin E1 (RX-10001) reduces corneal epithelial barrier disruption and protects against goblet cell loss in a murine model of dry eye." Cornea **31**(11): 1299-1303.
- de Souza, H. S. and C. Fiocchi (2016). "Immunopathogenesis of IBD: current state of the art." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **13**(1): 13-27.
- Dean, R. A., J. H. Cox, et al. (2008). "Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx." Blood **112**(8): 3455-3464.
- Desmouliere, A. (1995). "Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis." Cell Biol Int **19**(5): 471-476.
- Desmouliere, A., A. Geinoz, et al. (1993). "Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts." J Cell Biol **122**(1): 103-111.
- Desreumaux, P., A. Foussat, et al. (2012). "Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease." Gastroenterology **143**(5): 1207-1217 e1201-1202.
- Di Sabatino, A., R. Ciccocioppo, et al. (2003). "Increased enterocyte apoptosis in inflamed

- areas of Crohn's disease." Dis Colon Rectum **46**(11): 1498-1507.
- Dieckgraefe, B. K. and J. R. Korzenik (2002). "Treatment of active Crohn's disease with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." Lancet **360**(9344): 1478-1480.
- Diefenbach, A., M. Colonna, et al. (2014). "Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells." Immunity **41**(3): 354-365.
- Dignass, A., K. Lynch-Devaney, et al. (1994). "Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway." J Clin Invest **94**(1): 376-383.
- Dignass, A., G. Van Assche, et al. (2010). "The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management." J Crohns Colitis **4**(1): 28-62.
- Dignass, A. U. and D. K. Podolsky (1993). "Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta." Gastroenterology **105**(5): 1323-1332.
- Dise, R. S., M. R. Frey, et al. (2008). "Epidermal growth factor stimulates Rac activation through Src and phosphatidylinositol 3-kinase to promote colonic epithelial cell migration." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **294**(1): G276-285.
- Dong, H., G. Zhu, et al. (1999). "B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion." Nat Med **5**(12): 1365-1369.
- Driesen, R. B., C. K. Nagaraju, et al. (2014). "Reversible and irreversible differentiation of cardiac fibroblasts." Cardiovasc Res **101**(3): 411-422.
- Duffield, J. S., S. J. Forbes, et al. (2005). "Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair." J Clin Invest **115**(1): 56-65.
- Egea, L., Y. Hirata, et al. (2010). "GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine." Expert Rev Gastroenterol Hepatol **4**(6): 723-731.
- El Kebir, D., P. Gjorstrup, et al. (2012). "Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(37): 14983-14988.
- El Kebir, D., L. Jozsef, et al. (2007). "Aspirin-triggered lipoxins override the apoptosis-delaying action of serum amyloid A in human neutrophils: a novel mechanism for resolution of inflammation." J Immunol **179**(1): 616-622.
- Elks, P. M., F. J. van Eeden, et al. (2011). "Activation of hypoxia-inducible factor-1alpha (Hif-1alpha) delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model." Blood **118**(3): 712-722.
- Elliott, M. R. and K. S. Ravichandran (2010). "Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease." J Cell Biol **189**(7): 1059-1070.
- Eming, S. A., P. Martin, et al. (2014). "Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation." Sci Transl Med **6**(265): 265sr266.
- Engel, M. A. and M. F. Neurath (2010). "New pathophysiological insights and modern treatment of IBD." J Gastroenterol **45**(6): 571-583.
- Epelman, S., K. J. Lavine, et al. (2014). "Origin and functions of tissue macrophages." Immunity **41**(1): 21-35.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (1998). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF." J Clin Invest **101**(4): 890-898.
- Fallowfield, J. A., M. Mizuno, et al. (2007). "Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis." J Immunol **178**(8): 5288-5295.
- Farache, J., I. Koren, et al. (2013). "Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation." Immunity **38**(3): 581-595.
- Farrell, R. J. (2003). "Epidermal growth factor for ulcerative colitis." N Engl J Med **349**(4): 395-397.
- Faurschou, M. and N. Borregaard (2003). "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation." Microbes Infect **5**(14): 1317-1327.
- Feezor, R. J., H. N. Paddock, et al. (2004). "Temporal patterns of gene expression in murine cutaneous burn wound healing." Physiol Genomics **16**(3): 341-348.
- Feng, X., R. A. Clark, et al. (1999). "Fibrin and collagen differentially regulate human dermal microvascular endothelial cell integrins: stabilization of alphav/beta3 mRNA by fibrin1." J Invest Dermatol **113**(6): 913-919.
- Fernandez-Boyanapalli, R. F., S. C. Frasch, et al. (2009). "Impaired apoptotic cell clearance in CGD due to altered macrophage programming is reversed by phosphatidylserine-dependent production of IL-4." Blood **113**(9): 2047-2055.

- Folkman, J. (1982). "Angiogenesis: initiation and control." Ann N Y Acad Sci **401**: 212-227.
- Form, D. M., B. M. Pratt, et al. (1986). "Endothelial cell proliferation during angiogenesis. In vitro modulation by basement membrane components." Lab Invest **55**(5): 521-530.
- Fournier, B. M. and C. A. Parkos (2012). "The role of neutrophils during intestinal inflammation." Mucosal Immunol **5**(4): 354-366.
- Freeman, G. J., A. J. Long, et al. (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." J Exp Med **192**(7): 1027-1034.
- Fries, W., M. C. Renda, et al. (2005). "Intestinal permeability and genetic determinants in patients, first-degree relatives, and controls in a high-incidence area of Crohn's disease in Southern Italy." Am J Gastroenterol **100**(12): 2730-2736.
- Fuchs, T. A., U. Abed, et al. (2007). "Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps." J Cell Biol **176**(2): 231-241.
- Fullerton, J. N. and D. W. Gilroy (2016). "Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier." Nat Rev Drug Discov **15**(8): 551-567.
- Funk, C. D. (2001). "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology." Science **294**(5548): 1871-1875.
- Furze, R. C. and S. M. Rankin (2008). "The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse." FASEB J **22**(9): 3111-3119.
- Futosi, K., S. Fodor, et al. (2013). "Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways." Int Immunopharmacol **17**(3): 638-650.
- Gabrilovich, D. I. and S. Nagaraj (2009). "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system." Nat Rev Immunol **9**(3): 162-174.
- Gao, Y., J. M. Herndon, et al. (1998). "Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis." J Exp Med **188**(5): 887-896.
- Gardenbroek, T. J., E. J. Eshuis, et al. (2012). "The effect of appendectomy on the course of ulcerative colitis: a systematic review." Colorectal Dis **14**(5): 545-553.
- Garlichs, C. D., S. Eskafi, et al. (2004). "Delay of neutrophil apoptosis in acute coronary syndromes." J Leukoc Biol **75**(5): 828-835.
- Gautam, N., H. Herwald, et al. (2000). "Signaling via beta(2) integrins triggers neutrophil-dependent alteration in endothelial barrier function." J Exp Med **191**(11): 1829-1839.
- Geering, B. and H. U. Simon (2011). "Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils." Cell Death Differ **18**(9): 1457-1469.
- Geissmann, F., S. Jung, et al. (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." Immunity **19**(1): 71-82.
- Gerszten, R. E., E. A. Garcia-Zepeda, et al. (1999). "MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions." Nature **398**(6729): 718-723.
- GETAID (2011). Groupe d'Étude Thérapeutique des Affections Inflammatoires du Tube Digestif. <https://www.getaid.org/>.
- GETAID (2014). Groupe d'Étude Thérapeutique des Affections Inflammatoires du Tube Digestif. <https://www.getaid.org/>.
- GETAID (2016). "Groupe d'Étude Thérapeutique des Affections Inflammatoires du Tube Digestif." <https://www.getaid.org/>.
- Gilroy, D. W., T. Lawrence, et al. (2004). "Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery." Nat Rev Drug Discov **3**(5): 401-416.
- Gisbert, J. P. and J. Panes (2009). "Loss of response and requirement of infliximab dose intensification in Crohn's disease: a review." Am J Gastroenterol **104**(3): 760-767.
- Glasser, S. W., J. S. Hagood, et al. (2016). "Mechanisms of Lung Fibrosis Resolution." Am J Pathol **186**(5): 1066-1077.
- Glocker, E. O., D. Kotlarz, et al. (2009). "Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor." N Engl J Med **361**(21): 2033-2045.
- Goldberg, R., N. Prescott, et al. (2015). "The unusual suspects--innate lymphoid cells as novel therapeutic targets in IBD." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **12**(5): 271-283.
- Gonzalez-Navajas, J. M., J. Lee, et al. (2012). "Immunomodulatory functions of type I interferons." Nat Rev Immunol **12**(2): 125-135.
- Grau, A., A. Tabib, et al. (2015). "Apoptotic cells induce NF-kappaB and inflammasome negative signaling." PLoS One **10**(3): e0122440.
- Green, K. A., K. Almholt, et al. (2008). "Profibrinolytic effects of metalloproteinases during skin wound healing in the absence of plasminogen." J Invest Dermatol **128**(8): 2092-2101.
- Greenhalgh, D. G. (1998). "The role of apoptosis in wound healing." Int J Biochem Cell Biol **30**(9): 1019-1030.
- Grenier, J. M., L. Wang, et al. (2002). "Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-

- kappaB and caspase-1." *FEBS Lett* **530**(1-3): 73-78.
- Grinnell, F. (1994). "Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction." *J Cell Biol* **124**(4): 401-404.
- Groschwitz, K. R. and S. P. Hogan (2009). "Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis." *J Allergy Clin Immunol* **124**(1): 3-20; quiz 21-22.
- Gurtner, G. C., S. Werner, et al. (2008). "Wound repair and regeneration." *Nature* **453**(7193): 314-321.
- Hagiwara, C., M. Tanaka, et al. (2002). "Increase in colorectal epithelial apoptotic cells in patients with ulcerative colitis ultimately requiring surgery." *J Gastroenterol Hepatol* **17**(7): 758-764.
- Hamilton, M. J., M. J. Sinnamon, et al. (2011). "Essential role for mast cell tryptase in acute experimental colitis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(1): 290-295.
- Hanayama, R., M. Tanaka, et al. (2002). "Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes." *Nature* **417**(6885): 182-187.
- Hausmann, M., S. Kiessling, et al. (2002). "Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation." *Gastroenterology* **122**(7): 1987-2000.
- Hayhoe, R. P., A. M. Kamal, et al. (2006). "Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement." *Blood* **107**(5): 2123-2130.
- Hinz, B. (2007). "Formation and function of the myofibroblast during tissue repair." *J Invest Dermatol* **127**(3): 526-537.
- Hinz, B. (2010). "The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell." *J Biomech* **43**(1): 146-155.
- Hinz, B., S. H. Phan, et al. (2012). "Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling." *Am J Pathol* **180**(4): 1340-1355.
- Hodge, S., G. Hodge, et al. (2007). "Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Cell Mol Biol* **37**(6): 748-755.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* **299**(5609): 1057-1061.
- Huang, E. H., J. J. Carter, et al. (2002). "Colonoscopy in mice." *Surg Endosc* **16**(1): 22-24.
- Hugot, J. P. (2006). "CARD15/NOD2 mutations in Crohn's disease." *Ann N Y Acad Sci* **1072**: 9-18.
- Hugot, J. P., P. Laurent-Puig, et al. (1996). "Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16." *Nature* **379**(6568): 821-823.
- Hurst, S. M., T. S. Wilkinson, et al. (2001). "Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation." *Immunity* **14**(6): 705-714.
- IBDrelief "https://www.ibdrelief.com/learn/what-is-ibd."
- Iyer, V. R., M. B. Eisen, et al. (1999). "The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum." *Science* **283**(5398): 83-87.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216.
- Jimenez, B., O. V. Volpert, et al. (2000). "Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1." *Nat Med* **6**(1): 41-48.
- Johansson, M. E., H. Sjovall, et al. (2013). "The gastrointestinal mucus system in health and disease." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**(6): 352-361.
- John, A. S., X. Hu, et al. (2009). "Thrombospondin-1 (TSP-1) up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) production in human tumor cells: exploring the functional significance in tumor cell invasion." *Exp Mol Pathol* **87**(3): 184-188.
- Jostins, L., S. Ripke, et al. (2012). "Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease." *Nature* **491**(7422): 119-124.
- Jun, J. I. and L. F. Lau (2010). "Cellular senescence controls fibrosis in wound healing." *Aging (Albany NY)* **2**(9): 627-631.
- Kalebic, T., S. Garbisa, et al. (1983). "Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells." *Science* **221**(4607): 281-283.
- Kalluri, R. and E. G. Neilson (2003). "Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis." *J Clin Invest* **112**(12): 1776-1784.
- Kantari, C., M. Pederzoli-Ribeil, et al. (2008). "The role of neutrophils and monocytes in innate immunity." *Contrib Microbiol* **15**: 118-146.
- Kaplan, G. G. (2015). "The global burden of IBD: from 2015 to 2025." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**(12): 720-727.
- Karlsson, F., N. E. Martinez, et al. (2013). "Therapeutic evaluation of ex vivo-generated versus natural regulatory T-cells in a mouse model of chronic gut inflammation." *Inflamm Bowel Dis* **19**(11): 2282-2294.

- Khalil, H., W. Nie, et al. (2013). "Isolation of primary myofibroblasts from mouse and human colon tissue." *J Vis Exp*(80).
- Khokha, R., A. Murthy, et al. (2013). "Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity." *Nat Rev Immunol* **13**(9): 649-665.
- Khor, B., A. Gardet, et al. (2011). "Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Nature* **474**(7351): 307-317.
- Kiesslich, R., M. Goetz, et al. (2007). "Identification of epithelial gaps in human small and large intestine by confocal endomicroscopy." *Gastroenterology* **133**(6): 1769-1778.
- Kim, J. M. (2014). "Antimicrobial proteins in intestine and inflammatory bowel diseases." *Intest Res* **12**(1): 20-33.
- Kim, S., K. B. Elkon, et al. (2004). "Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells." *Immunity* **21**(5): 643-653.
- Kim, Y. S. and S. B. Ho (2010). "Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress." *Curr Gastroenterol Rep* **12**(5): 319-330.
- Kinchen, J. M., K. Doukometzidis, et al. (2008). "A pathway for phagosome maturation during engulfment of apoptotic cells." *Nat Cell Biol* **10**(5): 556-566.
- Kippenberger, S., A. Bernd, et al. (2000). "Signaling of mechanical stretch in human keratinocytes via MAP kinases." *J Invest Dermatol* **114**(3): 408-412.
- Kleinclaus, F., S. Perruche, et al. (2006). "Intravenous apoptotic spleen cell infusion induces a TGF-beta-dependent regulatory T-cell expansion." *Cell Death Differ* **13**(1): 41-52.
- Klose, C. S., E. A. Kiss, et al. (2013). "A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-RORgammat+ innate lymphoid cells." *Nature* **494**(7436): 261-265.
- Klose, C. S. N., M. Flach, et al. (2014). "Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages." *Cell* **157**(2): 340-356.
- Klyubin, I. V., K. M. Kirpichnikova, et al. (1996). "Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils." *Eur J Cell Biol* **70**(4): 347-351.
- Kodani, T., A. Rodriguez-Palacios, et al. (2013). "Flexible colonoscopy in mice to evaluate the severity of colitis and colorectal tumors using a validated endoscopic scoring system." *J Vis Exp*(80): e50843.
- Kolaczowska, E. and P. Kubes (2013). "Neutrophil recruitment and function in health and inflammation." *Nat Rev Immunol* **13**(3): 159-175.
- Korzenik, J. R., B. K. Dieckgraefe, et al. (2005). "Sargramostim for active Crohn's disease." *N Engl J Med* **352**(21): 2193-2201.
- Kosovac, K., J. Brenmoehl, et al. (2010). "Association of the NOD2 genotype with bacterial translocation via altered cell-cell contacts in Crohn's disease patients." *Inflamm Bowel Dis* **16**(8): 1311-1321.
- Krishnan, K., B. Arnone, et al. (2011). "Intestinal growth factors: potential use in the treatment of inflammatory bowel disease and their role in mucosal healing." *Inflamm Bowel Dis* **17**(1): 410-422.
- Krispin, A., Y. Bledi, et al. (2006). "Apoptotic cell thrombospondin-1 and heparin-binding domain lead to dendritic-cell phagocytic and tolerizing states." *Blood* **108**(10): 3580-3589.
- Krug, S. M., J. D. Schulzke, et al. (2014). "Tight junction, selective permeability, and related diseases." *Semin Cell Dev Biol* **36**: 166-176.
- Kurtzberg, J., S. Prockop, et al. (2014). "Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (remestemcel-L, Prochymal) as a rescue agent for severe refractory acute graft-versus-host disease in pediatric patients." *Biol Blood Marrow Transplant* **20**(2): 229-235.
- Lassen, K. G., P. Kuballa, et al. (2014). "Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(21): 7741-7746.
- Lauer, G., S. Sollberg, et al. (2000). "Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds." *J Invest Dermatol* **115**(1): 12-18.
- Laukoetter, M. G., P. Nava, et al. (2007). "JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo." *J Exp Med* **204**(13): 3067-3076.
- Lee, C. S., K. K. Penberthy, et al. (2016). "Boosting Apoptotic Cell Clearance by Colonic Epithelial Cells Attenuates Inflammation In Vivo." *Immunity* **44**(4): 807-820.
- Lee, J., J. H. Mo, et al. (2007). "Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells contributes to colonic homeostasis." *Curr Opin Gastroenterol* **23**(1): 27-31.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults." *Cell* **86**(6): 973-983.
- Leoni, G., P. A. Neumann, et al. (2015). "Wound repair: role of immune-epithelial interactions." *Mucosal Immunol* **8**(5): 959-968.
- Levy, B. D., C. B. Clish, et al. (2001). "Lipid mediator class switching during acute inflammation:

- signals in resolution." Nat Immunol **2**(7): 612-619.
- Lewis, M. J. and M. Botto (2006). "Complement deficiencies in humans and animals: links to autoimmunity." Autoimmunity **39**(5): 367-378.
- Ley, K., E. Smith, et al. (2006). "IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes." Immunol Res **34**(3): 229-242.
- Leydon, C., M. Imaizumi, et al. (2014). "Epithelial cells are active participants in vocal fold wound healing: an in vivo animal model of injury." PLoS One **9**(12): e115389.
- Li, F., Q. Huang, et al. (2010). "Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration." Sci Signal **3**(110): ra13.
- Li, J., J. Chen, et al. (2007). "Pathophysiology of acute wound healing." Clin Dermatol **25**(1): 9-18.
- Li, J., T. McQuade, et al. (2012). "The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis." Cell **150**(2): 339-350.
- Li, P., M. Li, et al. (2010). "PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps." J Exp Med **207**(9): 1853-1862.
- Li, S., Y. Sun, et al. (2009). "Defective phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in atherosclerotic lesions of ob/ob mice and reversal by a fish oil diet." Circ Res **105**(11): 1072-1082.
- Lichtenstein, G. R., B. G. Feagan, et al. (2006). "Serious infections and mortality in association with therapies for Crohn's disease: TREAT registry." Clin Gastroenterol Hepatol **4**(5): 621-630.
- Lichtenstein, G. R., B. G. Feagan, et al. (2012). "Serious infection and mortality in patients with Crohn's disease: more than 5 years of follow-up in the TREAT registry." Am J Gastroenterol **107**(9): 1409-1422.
- Lieschke, G. J., D. Grail, et al. (1994). "Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization." Blood **84**(6): 1737-1746.
- Lin, N., L. F. Xu, et al. (2013). "The protective effect of trefoil factor 3 on the intestinal tight junction barrier is mediated by toll-like receptor 2 via a PI3K/Akt dependent mechanism." Biochem Biophys Res Commun **440**(1): 143-149.
- Lindemans, C. A., M. Calafiore, et al. (2015). "Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration." Nature **528**(7583): 560-564.
- Lissner, D., M. Schumann, et al. (2015). "Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD." Inflamm Bowel Dis **21**(6): 1297-1305.
- Liu, J. Z. and C. A. Anderson (2014). "Genetic studies of Crohn's disease: past, present and future." Best Pract Res Clin Gastroenterol **28**(3): 373-386.
- Liu, Y., P. Zhang, et al. (2008). "A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells." Nat Immunol **9**(6): 632-640.
- Lotze, M. T., H. J. Zeh, et al. (2007). "The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity." Immunol Rev **220**: 60-81.
- Lucas, C. D., D. A. Dorward, et al. (2014). "Downregulation of Mcl-1 has anti-inflammatory pro-resolution effects and enhances bacterial clearance from the lung." Mucosal Immunol **7**(4): 857-868.
- Lucas, M., L. M. Stuart, et al. (2006). "Requirements for apoptotic cell contact in regulation of macrophage responses." J Immunol **177**(6): 4047-4054.
- Lynch, S. V. and O. Pedersen (2016). "The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease." N Engl J Med **375**(24): 2369-2379.
- Madsen, K. L., D. Malfair, et al. (1999). "Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora." Inflamm Bowel Dis **5**(4): 262-270.
- Marafini, I., A. Di Sabatino, et al. (2014). "Serum regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of mucosal enteropathies." Aliment Pharmacol Ther **40**(8): 974-981.
- Marchiando, A. M., L. Shen, et al. (2011). "The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding." Gastroenterology **140**(4): 1208-1218 e1201-1202.
- Martin, P. (1997). "Wound healing--aiming for perfect skin regeneration." Science **276**(5309): 75-81.
- Martini, E., S. M. Krug, et al. (2017). "Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease." Cell Mol Gastroenterol Hepatol **4**(1): 33-46.
- Marx, M., R. A. Perlmutter, et al. (1994). "Modulation of platelet-derived growth factor receptor expression in microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis." J Clin Invest **93**(1): 131-139.
- Mary, J. Y. and R. Modigliani (1989). "Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective

- multicentre study. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID)." Gut **30**(7): 983-989.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.
- Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." Science **296**(5566): 301-305.
- Matzinger, P. (2007). "Friendly and dangerous signals: is the tissue in control?" Nat Immunol **8**(1): 11-13.
- Mayer, L., W. M. Pandak, et al. (2013). "Safety and tolerability of human placenta-derived cells (PDA001) in treatment-resistant crohn's disease: a phase 1 study." Inflamm Bowel Dis **19**(4): 754-760.
- McCole, D. F., G. Rogler, et al. (2005). "Epidermal growth factor partially restores colonic ion transport responses in mouse models of chronic colitis." Gastroenterology **129**(2): 591-608.
- McDole, J. R., L. W. Wheeler, et al. (2012). "Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine." Nature **483**(7389): 345-349.
- McDonald, P. P., V. A. Fadok, et al. (1999). "Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells." J Immunol **163**(11): 6164-6172.
- McEver, R. P. (2015). "Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall." Cardiovasc Res **107**(3): 331-339.
- McQuibban, G. A., J. H. Gong, et al. (2002). "Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo." Blood **100**(4): 1160-1167.
- Medrado, A. R., L. S. Pugliese, et al. (2003). "Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts." Lasers Surg Med **32**(3): 239-244.
- Medzhitov, R. (2008). "Origin and physiological roles of inflammation." Nature **454**(7203): 428-435.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." Curr Opin Immunol **9**(1): 4-9.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-397.
- Menzel, K., M. Hausmann, et al. (2006). "Cathepsins B, L and D in inflammatory bowel disease macrophages and potential therapeutic effects of cathepsin inhibition in vivo." Clin Exp Immunol **146**(1): 169-180.
- Mevorach, D., T. Zuckerman, et al. (2014). "Single infusion of donor mononuclear early apoptotic cells as prophylaxis for graft-versus-host disease in myeloablative HLA-matched allogeneic bone marrow transplantation: a phase I/IIa clinical trial." Biol Blood Marrow Transplant **20**(1): 58-65.
- Midwood, K. S., L. V. Williams, et al. (2004). "Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix." Int J Biochem Cell Biol **36**(6): 1031-1037.
- Mielke, L., A. Preaudet, et al. (2015). "Confocal laser endomicroscopy to monitor the colonic mucosa of mice." J Immunol Methods **421**: 81-88.
- Monteleone, G., M. F. Neurath, et al. (2015). "Mongersen, an oral SMAD7 antisense oligonucleotide, and Crohn's disease." N Engl J Med **372**(12): 1104-1113.
- Montesano, R. and L. Orci (1988). "Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(13): 4894-4897.
- Morelli, A. E. and A. T. Larregina (2010). "Apoptotic cell-based therapies against transplant rejection: role of recipient's dendritic cells." Apoptosis **15**(9): 1083-1097.
- Morelli, A. E., A. T. Larregina, et al. (2003). "Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production." Blood **101**(2): 611-620.
- Moyer, R. A., M. K. Wendt, et al. (2007). "Rho activation regulates CXCL12 chemokine stimulated actin rearrangement and restitution in model intestinal epithelia." Lab Invest **87**(8): 807-817.
- Mukundan, L., J. I. Odegaard, et al. (2009). "PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance." Nat Med **15**(11): 1266-1272.
- Munoz, L. E., K. Lauber, et al. (2010). "The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity." Nat Rev Rheumatol **6**(5): 280-289.
- Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." Nat Rev Immunol **11**(11): 723-737.
- Nagaishi, K., Y. Arimura, et al. (2015). "Stem cell therapy for inflammatory bowel disease." J Gastroenterol **50**(3): 280-286.

- Nagata, S., R. Hanayama, et al. (2010). "Autoimmunity and the clearance of dead cells." *Cell* **140**(5): 619-630.
- Nathan, C. and A. Ding (2010). "Nonresolving inflammation." *Cell* **140**(6): 871-882.
- Nauseef, W. M. and N. Borregaard (2014). "Neutrophils at work." *Nat Immunol* **15**(7): 602-611.
- Nava, P., R. Kamekura, et al. (2013). "Cleavage of transmembrane junction proteins and their role in regulating epithelial homeostasis." *Tissue Barriers* **1**(2): e24783.
- Neel, N. F., M. Barzik, et al. (2009). "VASP is a CXCR2-interacting protein that regulates CXCR2-mediated polarization and chemotaxis." *J Cell Sci* **122**(Pt 11): 1882-1894.
- Neufert, C., C. Becker, et al. (2013). "Tumor fibroblast-derived epiregulin promotes growth of colitis-associated neoplasms through ERK." *J Clin Invest* **123**(4): 1428-1443.
- Neurath, M. F. (2012). "Animal models of inflammatory bowel diseases: illuminating the pathogenesis of colitis, ileitis and cancer." *Dig Dis* **30 Suppl 1**: 91-94.
- Neurath, M. F. (2014). "New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases." *Mucosal Immunol* **7**(1): 6-19.
- Neurath, M. F. and S. P. Travis (2012). "Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review." *Gut* **61**(11): 1619-1635.
- Neurath, M. F., N. Wittkopf, et al. (2010). "Assessment of tumor development and wound healing using endoscopic techniques in mice." *Gastroenterology* **139**(6): 1837-1843 e1831.
- Newson, J., M. Stables, et al. (2014). "Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity." *Blood* **124**(11): 1748-1764.
- Niethammer, P., C. Grabher, et al. (2009). "A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish." *Nature* **459**(7249): 996-999.
- Niewiadomski, O., C. Studd, et al. (2015). "Prospective population-based cohort of inflammatory bowel disease in the biologics era: Disease course and predictors of severity." *J Gastroenterol Hepatol* **30**(9): 1346-1353.
- Nishimura, H., M. Nose, et al. (1999). "Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor." *Immunity* **11**(2): 141-151.
- Noah, T. K., B. Donahue, et al. (2011). "Intestinal development and differentiation." *Exp Cell Res* **317**(19): 2702-2710.
- Noguchi, E., Y. Homma, et al. (2009). "A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1." *Nat Immunol* **10**(5): 471-479.
- Nurden, A. T., P. Nurden, et al. (2008). "Platelets and wound healing." *Front Biosci* **13**: 3532-3548.
- O'Brien, B. A., W. E. Fieldus, et al. (2002). "Clearance of apoptotic beta-cells is reduced in neonatal autoimmune diabetes-prone rats." *Cell Death Differ* **9**(4): 457-464.
- Odegaard, J. I., R. R. Ricardo-Gonzalez, et al. (2007). "Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance." *Nature* **447**(7148): 1116-1120.
- Ogden, C. A., A. deCathelineau, et al. (2001). "C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells." *J Exp Med* **194**(6): 781-795.
- Ohira, T., M. Arita, et al. (2010). "Resolvin E1 receptor activation signals phosphorylation and phagocytosis." *J Biol Chem* **285**(5): 3451-3461.
- Ohno, H. (2016). "Intestinal M cells." *J Biochem* **159**(2): 151-160.
- Okamoto, R. and M. Watanabe (2016). "Role of epithelial cells in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease." *J Gastroenterol* **51**(1): 11-21.
- Ortega-Gomez, A., M. Perretti, et al. (2013). "Resolution of inflammation: an integrated view." *EMBO Mol Med* **5**(5): 661-674.
- Ostanin, D. V., J. Bao, et al. (2009). "T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**(2): G135-146.
- Palmer, G. and C. Gabay (2011). "Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases." *Nat Rev Rheumatol* **7**(6): 321-329.
- Papayannopoulos, V., K. D. Metzler, et al. (2010). "Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps." *J Cell Biol* **191**(3): 677-691.
- Papayannopoulos, V. and A. Zychlinsky (2009). "NETs: a new strategy for using old weapons." *Trends Immunol* **30**(11): 513-521.
- Patel, A. and N. Shah (2011). "Mycobacterium avium subsp paratuberculosis--incidences in milk and milk products, their isolation, enumeration, characterization, and role in human health." *J Microbiol Immunol Infect* **44**(6): 473-479.
- Pellicoro, A., R. L. Aucott, et al. (2012). "Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase

- (MMP-12) during experimental liver fibrosis." Hepatology **55**(6): 1965-1975.
- Perdiguerro, E. G., K. Klapproth, et al. (2015). "The Origin of Tissue-Resident Macrophages: When an Erythro-myeloid Progenitor Is an Erythro-myeloid Progenitor." Immunity **43**(6): 1023-1024.
- Perruche, S., P. Zhang, et al. (2008). "CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells." Nat Med **14**(5): 528-535.
- Perruche, S., P. Zhang, et al. (2009). "Lethal effect of CD3-specific antibody in mice deficient in TGF-beta1 by uncontrolled flu-like syndrome." J Immunol **183**(2): 953-961.
- Peyrin-Biroulet, L. (2015). "Defining Severity in Inflammatory Bowel Disease." Gastroenterol Hepatol (N Y) **11**(7): 474-476.
- Peyrin-Biroulet, L., M. Ferrante, et al. (2011). "Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO. I: Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease." J Crohns Colitis **5**(5): 477-483.
- Peyrin-Biroulet, L., W. S. Harmsen, et al. (2012). "Surgery in a population-based cohort of Crohn's disease from Olmsted County, Minnesota (1970-2004)." Am J Gastroenterol **107**(11): 1693-1701.
- Peyrin-Biroulet, L., W. Reinisch, et al. (2014). "Clinical disease activity, C-reactive protein normalisation and mucosal healing in Crohn's disease in the SONIC trial." Gut **63**(1): 88-95.
- Pinto, D. and H. Clevers (2005). "Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium." Exp Cell Res **306**(2): 357-363.
- Pithadia, A. B. and S. Jain (2011). "Treatment of inflammatory bowel disease (IBD)." Pharmacol Rep **63**(3): 629-642.
- Pohlars, D., J. Brenmoehl, et al. (2009). "TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints." Biochim Biophys Acta **1792**(8): 746-756.
- Poon, I. K., C. D. Lucas, et al. (2014). "Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential." Nat Rev Immunol **14**(3): 166-180.
- Postlethwaite, A. E., J. Keski-Oja, et al. (1987). "Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta." J Exp Med **165**(1): 251-256.
- Powrie, F. and M. W. Leach (1995). "Genetic and spontaneous models of inflammatory bowel disease in rodents: evidence for abnormalities in mucosal immune regulation." Ther Immunol **2**(2): 115-123.
- Powrie, F., M. W. Leach, et al. (1994). "Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells." Immunity **1**(7): 553-562.
- Rachmilewitz, D., K. Katakura, et al. (2004). "Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis." Gastroenterology **126**(2): 520-528.
- Ramachandran, P., J. P. Iredale, et al. (2015). "Resolution of liver fibrosis: basic mechanisms and clinical relevance." Semin Liver Dis **35**(2): 119-131.
- Ramnik, G. a. (2014). "Microbial Ecology in States of Health and Disease." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK184832/>
- Rappolee, D. A., D. Mark, et al. (1988). "Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping." Science **241**(4866): 708-712.
- Rathinam, V. A., S. K. Vanaja, et al. (2012). "Regulation of inflammasome signaling." Nat Immunol **13**(4): 333-342.
- Ravnic, D. J., M. A. Konerding, et al. (2007). "Murine microvideo endoscopy of the colonic microcirculation." J Surg Res **142**(1): 97-103.
- Rogler, G. (2017). "Resolution of inflammation in inflammatory bowel disease." Lancet Gastroenterol Hepatol **2**(7): 521-530.
- Rogler, G., S. Vavricka, et al. (2013). "Mucosal healing and deep remission: what does it mean?" World J Gastroenterol **19**(43): 7552-7560.
- Roszer, T., M. P. Menendez-Gutierrez, et al. (2011). "Autoimmune kidney disease and impaired engulfment of apoptotic cells in mice with macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma or retinoid X receptor alpha deficiency." J Immunol **186**(1): 621-631.
- Roy, S., S. Khanna, et al. (2008). "Characterization of the acute temporal changes in excisional murine cutaneous wound inflammation by screening of the wound-edge transcriptome." Physiol Genomics **34**(2): 162-184.
- Rutgeerts, P., B. G. Feagan, et al. (2004). "Comparison of scheduled and episodic treatment strategies of infliximab in Crohn's disease." Gastroenterology **126**(2): 402-413.
- Saas, P., E. Daguindau, et al. (2016). "Concise Review: Apoptotic Cell-Based Therapies-Rationale, Preclinical Results and Future Clinical Developments." Stem Cells **34**(6): 1464-1473.
- Saas, P., S. Kaminski, et al. (2013). "Prospects of apoptotic cell-based therapies for transplantation and inflammatory diseases." Immunotherapy **5**(10): 1055-1073.

- Sabat, R., W. Ouyang, et al. (2014). "Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system." *Nat Rev Drug Discov* **13**(1): 21-38.
- Sai, J., D. Raman, et al. (2008). "Parallel phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-dependent and Src-dependent pathways lead to CXCL8-mediated Rac2 activation and chemotaxis." *J Biol Chem* **283**(39): 26538-26547.
- Saitoh, T., N. Fujita, et al. (2008). "Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production." *Nature* **456**(7219): 264-268.
- Samuelsson, B., S. E. Dahlen, et al. (1987). "Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects." *Science* **237**(4819): 1171-1176.
- Sandborn, W. J., S. Hanauer, et al. (2014). "Treating beyond symptoms with a view to improving patient outcomes in inflammatory bowel diseases." *J Crohns Colitis* **8**(9): 927-935.
- Sarma, J. V. and P. A. Ward (2011). "The complement system." *Cell Tissue Res* **343**(1): 227-235.
- Sattler, S., G. S. Ling, et al. (2014). "IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (Breg(IL-33)) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut." *J Autoimmun* **50**: 107-122.
- Savage, N. D., T. de Boer, et al. (2008). "Human anti-inflammatory macrophages induce Foxp3+ GITR+ CD25+ regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1." *J Immunol* **181**(3): 2220-2226.
- Savill, J. (1998). "Apoptosis. Phagocytic docking without shocking." *Nature* **392**(6675): 442-443.
- Savill, J., I. Dransfield, et al. (1990). "Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis." *Nature* **343**(6254): 170-173.
- Savill, J., V. Fadok, et al. (1993). "Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis." *Immunol Today* **14**(3): 131-136.
- Scandiuizzi, L., K. Ghosh, et al. (2014). "Tissue-expressed B7-H1 critically controls intestinal inflammation." *Cell Rep* **6**(4): 625-632.
- Scannell, M., M. B. Flanagan, et al. (2007). "Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages." *J Immunol* **178**(7): 4595-4605.
- Schauer, C., C. Janko, et al. (2014). "Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines." *Nat Med* **20**(5): 511-517.
- Scheibe, K., I. Backert, et al. (2017). "IL-36R signalling activates intestinal epithelial cells and fibroblasts and promotes mucosal healing in vivo." *Gut* **66**(5): 823-838.
- Schneider, E., M. Rolli-Derkinden, et al. (2002). "Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis." *Trends Immunol* **23**(5): 255-263.
- Sen, P., M. A. Wallet, et al. (2007). "Apoptotic cells induce Mer tyrosine kinase-dependent blockade of NF-kappaB activation in dendritic cells." *Blood* **109**(2): 653-660.
- Senger, D. R., K. P. Claffey, et al. (1997). "Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13612-13617.
- Seong, S. Y. and P. Matzinger (2004). "Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses." *Nat Rev Immunol* **4**(6): 469-478.
- Serafini, P., S. Mgebroff, et al. (2008). "Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells." *Cancer Res* **68**(13): 5439-5449.
- Serhan, C. N. (2004). "A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution." *Histochem Cell Biol* **122**(4): 305-321.
- Serhan, C. N. (2014). "Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology." *Nature* **510**(7503): 92-101.
- Serhan, C. N., S. D. Brain, et al. (2007). "Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms." *FASEB J* **21**(2): 325-332.
- Serhan, C. N., N. Chiang, et al. (2008). "Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators." *Nat Rev Immunol* **8**(5): 349-361.
- Serhan, C. N., R. Yang, et al. (2009). "Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions." *J Exp Med* **206**(1): 15-23.
- SFED Société Française d'Endoscopie Digestive; <http://www.sfed.org/>.
- Shah, M., D. M. Foreman, et al. (1995). "Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring." *J Cell Sci* **108 (Pt 3)**: 985-1002.
- Shan, M., M. Gentile, et al. (2013). "Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals." *Science* **342**(6157): 447-453.
- Sharma, M. D., D. Y. Hou, et al. (2009). "Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-

- draining lymph nodes." Blood **113**(24): 6102-6111.
- Shaw, M. H., N. Kamada, et al. (2011). "The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation." Trends Immunol **32**(2): 73-79.
- Shaykhiiev, R., J. Behr, et al. (2008). "Microbial patterns signaling via Toll-like receptors 2 and 5 contribute to epithelial repair, growth and survival." PLoS One **3**(1): e1393.
- Shen, B., M. K. Delaney, et al. (2012). "Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction." Curr Opin Cell Biol **24**(5): 600-606.
- Shevach, E. M. (2009). "Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression." Immunity **30**(5): 636-645.
- Sims, G. P., D. C. Rowe, et al. (2010). "HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer." Annu Rev Immunol **28**: 367-388.
- Singh, B., M. D. Krawetz, et al. (2017). "Role of TGF-beta in Self-Peptide Regulation of Autoimmunity." Arch Immunol Ther Exp (Warsz).
- Singhal, S., D. Dian, et al. (2011). "The role of oral hygiene in inflammatory bowel disease." Dig Dis Sci **56**(1): 170-175.
- Soehnlein, O. and L. Lindbom (2010). "Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation." Nat Rev Immunol **10**(6): 427-439.
- Soehnlein, O., L. Lindbom, et al. (2009). "Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment." Blood **114**(21): 4613-4623.
- Soehnlein, O., X. Xie, et al. (2005). "Neutrophil-derived heparin-binding protein (HBP/CAP37) deposited on endothelium enhances monocyte arrest under flow conditions." J Immunol **174**(10): 6399-6405.
- Solberg, I. C., I. Lygren, et al. (2009). "Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study)." Scand J Gastroenterol **44**(4): 431-440.
- Spite, M., J. Claria, et al. (2014). "Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases." Cell Metab **19**(1): 21-36.
- Spite, M., L. V. Norling, et al. (2009). "Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis." Nature **461**(7268): 1287-1291.
- Spoettl, T., M. Hausmann, et al. (2006). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) inhibits the intestinal-like differentiation of monocytes." Clin Exp Immunol **145**(1): 190-199.
- Stappenbeck, T. S. and H. Miyoshi (2009). "The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair." Science **324**(5935): 1666-1669.
- Stark, M. A., Y. Huo, et al. (2005). "Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17." Immunity **22**(3): 285-294.
- Steinbach, E. C. and S. E. Plevy (2014). "The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD." Inflamm Bowel Dis **20**(1): 166-175.
- Stuart, L. M., M. Lucas, et al. (2002). "Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation." J Immunol **168**(4): 1627-1635.
- Sturm, A. and A. U. Dignass (2008). "Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **14**(3): 348-353.
- Su, S. and J. Chen (2015). "Collagen Gel Contraction Assay."
- Sugimoto, K., A. Ogawa, et al. (2008). "IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis." J Clin Invest **118**(2): 534-544.
- Sweetwyne, M. T. and J. E. Murphy-Ullrich (2012). "Thrombospondin1 in tissue repair and fibrosis: TGF-beta-dependent and independent mechanisms." Matrix Biol **31**(3): 178-186.
- Szondy, Z., E. Garabuczi, et al. (2014). "Impaired clearance of apoptotic cells in chronic inflammatory diseases: therapeutic implications." Front Immunol **5**: 354.
- Taekema-Roelvink, M. E., C. Kooten, et al. (2001). "Proteinase 3 enhances endothelial monocyte chemoattractant protein-1 production and induces increased adhesion of neutrophils to endothelial cells by upregulating intercellular cell adhesion molecule-1." J Am Soc Nephrol **12**(5): 932-940.
- Tager, A. M. and A. D. Luster (2003). "BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **69**(2-3): 123-134.
- Tait Wojno, E. D. and D. Artis (2012). "Innate lymphoid cells: balancing immunity, inflammation, and tissue repair in the intestine." Cell Host Microbe **12**(4): 445-457.
- Tak, T., K. Tesselaar, et al. (2013). "What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited." J Leukoc Biol **94**(4): 595-601.
- Takahashi, M. and Y. Kobayashi (2003). "Cytokine production in association with phagocytosis of apoptotic cells by immature dendritic cells." Cell Immunol **226**(2): 105-115.

- Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell **140**(6): 805-820.
- Tang, Y., M. J. Zhang, et al. (2013). "Proresolution therapy for the treatment of delayed healing of diabetic wounds." Diabetes **62**(2): 618-627.
- Tannock, G. W. (2010). "The bowel microbiota and inflammatory bowel diseases." Int J Inflam **2010**: 954051.
- Targan, S. R., B. Feagan, et al. (2016). "A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Study of Brodalumab in Patients With Moderate-to-Severe Crohn's Disease." Am J Gastroenterol **111**(11): 1599-1607.
- Teshima, C. W., L. A. Dieleman, et al. (2012). "Abnormal intestinal permeability in Crohn's disease pathogenesis." Ann N Y Acad Sci **1258**: 159-165.
- Tester, A. M., J. H. Cox, et al. (2007). "LPS responsiveness and neutrophil chemotaxis in vivo require PMN MMP-8 activity." PLoS One **2**(3): e312.
- Theilgaard-Monch, K., S. Knudsen, et al. (2004). "The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing." J Immunol **172**(12): 7684-7693.
- Thorp, E. B. (2010). "Mechanisms of failed apoptotic cell clearance by phagocyte subsets in cardiovascular disease." Apoptosis **15**(9): 1124-1136.
- Titos, E., B. Rius, et al. (2011). "Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype." J Immunol **187**(10): 5408-5418.
- Tomasek, J. J., G. Gabbiani, et al. (2002). "Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(5): 349-363.
- Torchinsky, M. B., J. Garaude, et al. (2009). "Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation." Nature **458**(7234): 78-82.
- Travassos, L. H., L. A. Carneiro, et al. (2010). "Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry." Nat Immunol **11**(1): 55-62.
- Travis, S. P., D. Schnell, et al. (2012). "Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS)." Gut **61**(4): 535-542.
- University, T. <https://moulder.temple.edu/research-areas/inflammatory-bowel-disease-ibd>.
- Van den Steen, P. E., P. Proost, et al. (2000). "Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact." Blood **96**(8): 2673-2681.
- van der Flier, L. G. and H. Clevers (2009). "Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium." Annu Rev Physiol **71**: 241-260.
- van Rijt, L. S., N. Vos, et al. (2011). "Persistent activation of dendritic cells after resolution of allergic airway inflammation breaks tolerance to inhaled allergens in mice." Am J Respir Crit Care Med **184**(3): 303-311.
- Vandivier, R. W., V. A. Fadok, et al. (2002). "Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis." J Clin Invest **109**(5): 661-670.
- Vannella, K. M. and T. A. Wynn (2017). "Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages." Annu Rev Physiol **79**: 593-617.
- Verstockt, B., G. Van Assche, et al. (2017). "Biological therapy targeting the IL-23/IL-17 axis in inflammatory bowel disease." Expert Opin Biol Ther **17**(1): 31-47.
- Vidal, K., I. Grosjean, et al. (1993). "Immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene. Phenotypic and immune characterization of the MODE-K cell line." J Immunol Methods **166**(1): 63-73.
- Viglietta, V., C. Baecher-Allan, et al. (2004). "Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis." J Exp Med **199**(7): 971-979.
- Voll, R. E., M. Herrmann, et al. (1997). "Immunosuppressive effects of apoptotic cells." Nature **390**(6658): 350-351.
- Vuitton, L., P. Marteau, et al. (2016). "IOIBD technical review on endoscopic indices for Crohn's disease clinical trials." Gut **65**(9): 1447-1455.
- Wakkach, A., N. Fournier, et al. (2003). "Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo." Immunity **18**(5): 605-617.
- Waldner, M. J., S. Wirtz, et al. (2011). "Confocal laser endomicroscopy and narrow-band imaging-aided endoscopy for in vivo imaging of colitis and colon cancer in mice." Nat Protoc **6**(9): 1471-1481.
- Walldorf, J., M. Hermann, et al. (2015). "In-vivo monitoring of acute DSS-Colitis using Colonoscopy, high resolution Ultrasound and bench-top Magnetic Resonance Imaging in Mice." Eur Radiol **25**(10): 2984-2991.

- Walmsley, S. R., C. Print, et al. (2005). "Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF-kappaB activity." *J Exp Med* **201**(1): 105-115.
- Wang, L., H. Cao, et al. (2014). "Activation of epidermal growth factor receptor mediates mucin production stimulated by p40, a Lactobacillus rhamnosus GG-derived protein." *J Biol Chem* **289**(29): 20234-20244.
- Wang, L., A. Ray, et al. (2015). "T regulatory cells and B cells cooperate to form a regulatory loop that maintains gut homeostasis and suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis." *Mucosal Immunol* **8**(6): 1297-1312.
- Wang, M. L., M. E. Shin, et al. (2005). "Regulation of RELM/FIZZ isoform expression by Cdx2 in response to innate and adaptive immune stimulation in the intestine." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**(5): G1074-1083.
- Wang, S., P. Xia, et al. (2017). "Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation." *Cell*.
- Wang, S. B., K. M. Hu, et al. (2012). "Estrogen negatively regulates epithelial wound healing and protective lipid mediator circuits in the cornea." *FASEB J* **26**(4): 1506-1516.
- Watson, A. J., S. Chu, et al. (2005). "Epithelial barrier function in vivo is sustained despite gaps in epithelial layers." *Gastroenterology* **129**(3): 902-912.
- Wehkamp, J., M. Koslowski, et al. (2008). "Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease." *Mucosal Immunol* **1 Suppl 1**: S67-74.
- Welch, M. P., G. F. Odland, et al. (1990). "Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction." *J Cell Biol* **110**(1): 133-145.
- Werner, L., H. Guzman-Gur, et al. (2013). "Involvement of CXCR4/CXCR7/CXCL12 Interactions in Inflammatory bowel disease." *Theranostics* **3**(1): 40-46.
- Werner, S., T. Krieg, et al. (2007). "Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing." *J Invest Dermatol* **127**(5): 998-1008.
- Willenborg, S., T. Lucas, et al. (2012). "CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair." *Blood* **120**(3): 613-625.
- Wlodarska, M., C. A. Thaiss, et al. (2014). "NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion." *Cell* **156**(5): 1045-1059.
- Wolburg, H., K. Wolburg-Buchholz, et al. (2005). "Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact." *Acta Neuropathol* **109**(2): 181-190.
- Wong, J. W., C. Gallant-Behm, et al. (2009). "Wound healing in oral mucosa results in reduced scar formation as compared with skin: evidence from the red Duroc pig model and humans." *Wound Repair Regen* **17**(5): 717-729.
- Wong, S. H., N. Francis, et al. (2009). "Lactoferrin is a survival factor for neutrophils in rheumatoid synovial fluid." *Rheumatology (Oxford)* **48**(1): 39-44.
- Wynn, T. A. (2008). "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis." *J Pathol* **214**(2): 199-210.
- Wynn, T. A. and L. Barron (2010). "Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis." *Semin Liver Dis* **30**(3): 245-257.
- Wynn, T. A., A. Chawla, et al. (2013). "Macrophage biology in development, homeostasis and disease." *Nature* **496**(7446): 445-455.
- Wynn, T. A. and T. R. Ramalingam (2012). "Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease." *Nat Med* **18**(7): 1028-1040.
- Wynn, T. A. and K. M. Vannella (2016). "Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis." *Immunity* **44**(3): 450-462.
- Yager, D. R., L. Y. Zhang, et al. (1996). "Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids." *J Invest Dermatol* **107**(5): 743-748.
- Yamamoto, S., S. Shimizu, et al. (2008). "TRPM2-mediated Ca²⁺-influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration." *Nat Med* **14**(7): 738-747.
- Yang, D., G. de la Rosa, et al. (2009). "Alarmins link neutrophils and dendritic cells." *Trends Immunol* **30**(11): 531-537.
- Ye, R. D., F. Boulay, et al. (2009). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family." *Pharmacol Rev* **61**(2): 119-161.
- Yipp, B. G., B. Petri, et al. (2012). "Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo." *Nat Med* **18**(9): 1386-1393.
- Yoo, S. K., T. W. Starnes, et al. (2011). "Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo." *Nature* **480**(7375): 109-112.
- Yoon, Y. S., S. Y. Kim, et al. (2015). "PPARgamma activation following apoptotic cell instillation promotes resolution of lung inflammation and

- fibrosis via regulation of efferocytosis and proresolving cytokines." Mucosal Immunol **8**(5): 1031-1046.
- Yousefi, S., C. Mihalache, et al. (2009). "Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps." Cell Death Differ **16**(11): 1438-1444.
- Zabel, B. A., S. J. Allen, et al. (2005). "Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades." J Biol Chem **280**(41): 34661-34666.
- Zarbock, A., K. Ley, et al. (2011). "Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow." Blood **118**(26): 6743-6751.
- Zhang, M. Z., B. Yao, et al. (2012). "CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury." J Clin Invest **122**(12): 4519-4532.
- Zhou, X., N. Kong, et al. (2011). "Therapeutic potential of TGF-beta-induced CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells in autoimmune diseases." Autoimmunity **44**(1): 43-50.
- Zhu, W., J. Yu, et al. (2014). "Disequilibrium of M1 and M2 macrophages correlates with the development of experimental inflammatory bowel diseases." Immunol Invest **43**(7): 638-652.
- Zigmond, E., B. Bernshtein, et al. (2014). "Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis." Immunity **40**(5): 720-733.
- Zindl, C. L., J. F. Lai, et al. (2013). "IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(31): 12768-12773.
- Zlotnik, A. and O. Yoshie (2012). "The chemokine superfamily revisited." Immunity **36**(5): 705-716.