



**ÉTUDE DU RÔLE DE L'ÉPITHELIUM DANS  
L'INITIATION ET LA PROGRESSION DE LA  
FIBROSE INTESTINALE RENCONTRÉE DANS LA  
RECTOCOLITE ULCÉRO-HÉMORRAGIQUE**

**MICELI Eva**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Master en Sciences  
Biomédicales à finalité approfondie en Recherche Multidisciplinaire

Année académique 2023-2024

**Promoteur et Co-Promoteur :**

**Marie-Alice Meuwis  
Marty Stepniak**

# Remerciements

---

En préambule de ce travail, je souhaite remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Edouard Louis, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir fait découvrir un nouveau sujet sur un domaine qui m'intéressait déjà beaucoup et qui a renforcé ce sentiment.

Je remercie également ma promotrice, le Docteur Marie-Alice Meuwis, pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire, le temps consacré à m'expliquer les fondamentaux de ce mémoire, son soutien, sa bienveillance, son écoute et ses précieux conseils qui m'ont beaucoup aidés dans la réalisation de ce travail.

Je remercie particulièrement Marty Stepniak, pour sa patience, son écoute, ses conseils, sa disponibilité, mais également pour le partage de son expérience. J'ai appris énormément de choses durant ces 6 mois, qui me seront toujours utiles. Il m'a aidé à avoir plus en confiance en moi et mes capacités, c'est pourquoi je voulais particulièrement le remercier.

Je remercie Pierre Adam, pour son aide durant certaines expériences, ses réponses aux questions les plus bêtes, mais aussi sa bonne humeur toujours présente. Je le remercie également pour son soutien infaillible lorsque j'étais démoralisée par des échecs de manip.

Je remercie Catherine Salée et Charlotte Massot pour leur gentillesse, leurs précieuses explications et leur temps consacré à mon égard.

Je remercie aussi Juliette Beuriot, Alyssia Mesdagh, Florian Fonzé, Caroline Shadouh, Sophie Vieujean et Nicolas Pierre, ainsi que toute l'équipe de Rhumatologie pour leur accueil chaleureux, leur gentillesse et leur soutien durant ces 6 mois.

Je remercie tout particulièrement mes parents, mon frère et ma sœur pour leur soutien depuis le début de mes études. Ils ont toujours été là pour moi, à m'encourager lors de mes moments de doutes, toujours là pour me booster et me faire prendre confiance en moi.

Enfin, je tiens à remercier mon copain, Walter, qui depuis deux ans, n'a jamais douté de moi, m'a toujours soutenue et consolée quand ça n'allait pas. Je le remercie également pour sa patience, pour m'avoir supportée, tout comme mes parents, mon frère et ma sœur durant mes périodes de stress, je n'étais pas toujours un cadeau, je le sais.

# Résumé

---

La rectocolite ulcéro-hémorragique est l'une des principales maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Elle se caractérise par des troubles du système digestif et une inflammation chronique. Son étiologie reste toujours méconnue, mais la combinaison de facteurs génétiques, environnementaux et immunitaires semblent contribuer au développement de l'inflammation intestinale. Cette maladie touche principalement l'épithélium et se caractérise par une inflammation diffuse au niveau du rectum et du côlon. En 2023, sa prévalence était estimée à 5 millions de cas dans le monde. Une de ses complications les plus importantes est la fibrose intestinale. Elle se caractérise par l'accumulation incontrôlée de MEC et de myofibroblastes en réponse à une inflammation chronique ou une réparation tissulaire altérée. Bien que sa fréquence soit plus faible par rapport à la maladie de Crohn (30% vs 5,1%), sa présence a été démontrée (notamment au niveau de la sous-muqueuse) dans 100% des tissus de résection chirurgicale montrant de l'inflammation chronique. Il n'existe actuellement aucun traitement contre cette fibrose, c'est pourquoi son étude est importante. Pour répondre à ce besoin, un modèle d'organoïdes pro-fibrosant est généré dans ce travail, à partir de biopsies de patients atteints de RCUH, mais aussi de sujets sains. Le but de ce travail est de mettre au point un modèle d'organoïdes pro-fibrosant en traitant les organoïdes par un inducteur de SRE et d'évaluer la réponse de l'épithélium à ce stress. L'expression des protéines de SRE et d'autres cibles spécifiques (TGF- $\beta$ , Muc2, AGR2), ainsi que les résultats d'un test fonctionnel sur des fibroblastes CCD18-Co ont été réalisés. Deux inducteurs de SRE (Tm et TuBHq) ont été testés à différentes doses. Les résultats montrent une augmentation des protéines de SRE lors de l'induction du stress par les deux inducteurs. Le test fonctionnel réalisé sur les fibroblastes humains CCD18-Co montre un phénomène de TFM plus marqué avec la Tm et la dose optimale est de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Le faible nombre de réplicats réalisés dans ce travail sera compensé dans la suite de ce projet, où le modèle d'organoïdes traités de façon standardisée et dérivant de patients RCUH (n=10) seront utilisés.

# Abstract

---

Ulcerative colitis is one of the main chronic inflammatory bowel diseases. It is characterized by digestive system disorders and chronic inflammation. Its etiology is still poorly understood, but a combination of genetic, environmental and immune factors appear to contribute to the development of intestinal inflammation. The disease mainly affects the epithelium and is characterized by diffuse inflammation of the rectum and colon. In 2023, its prevalence was estimated at 5 million cases worldwide. One of its most important complications is intestinal fibrosis. It is characterized by the uncontrolled accumulation of ECM and myofibroblasts in response to chronic inflammation or altered tissue repair. Although its frequency is lower than in Crohn's disease (30% vs. 5.1%), its presence has been demonstrated (notably in the submucosa) in 100% of surgically resected tissues showing chronic inflammation. There is currently no treatment for this fibrosis, which is why its study is important. To address this need, a pro-fibrosing organoid model is generated in this work, using biopsies from patients with RCUH, but also from healthy subjects. The aim of this work is to develop a pro-fibrosing organoid model by treating organoids with an SRE inducer and to assess the epithelial response to this stress. The expression of SRE proteins and other specific targets (TGF- $\beta$ , Muc2, AGR2), as well as the results of a functional assay on CCD18-Co fibroblasts were performed. Two SRE inducers (Tm and TuBHq) were tested at different doses. Results showed an increase in SRE proteins upon stress induction by both inducers. The functional assay performed on CCD18-Co human fibroblasts shows a more pronounced FMT phenomenon with Tm, and the optimal dose is 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The low number of replicates performed in this work will be compensated for in the remainder of this project, where the model of organoids treated in a standardized way and derived from RCUH patients (n=10) will be used.

# Liste des abréviations

---

<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Alpha-smooth muscle actin
<b>(e)AGR2</b>	Anterior Gradient 2 (extracellular)
<b>5-ASA</b>	5-aminosalicylates
<b>Ac</b>	Anticorps
<b>ADN(c)</b>	Acide désoxyribonucléique (complémentaire)
<b>ARN(m)</b>	Acide Ribonucléique (messager)
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messager
<b>ATF</b>	Activating transcription factor
<b>ATF6-N</b>	Activating transcription factor 6 (cytoplasmic)
<b>ATG16L1</b>	Autophagy related 16 like 1
<b>BiP</b>	Binding immunoglobulin protein
<b>BME</b>	Basal Membrane Extract
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>Caco-2</b>	Cancer Co Li-2
<b>CARD15</b>	Caspase recruitment domain-containing protein 15
<b>CDH-1</b>	Cadherin 1
<b>CF</b>	Calprotectine fécale
<b>CHOP</b>	CEBP homologous protein
<b>CML</b>	Cellule musculaire lisse
<b>CRP</b>	C-reactive protein
<b>DAMP</b>	Damage-associated molecular patterns
<b>DSS</b>	Sulfate de dextrane sodique
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>E.Coli</b>	Escherichia coli
<b>ECL</b>	Enhanced ChemiLuminescence
<b>EDTA</b>	Acide éthylènediaminetétraacétique
<b>eIF2-<math>\alpha</math></b>	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1
<b>ERAD</b>	Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
<b>ERP72</b>	Endoplasmic reticulum protein 72
<b>FBS</b>	Fœtal bovin serum
<b>GNA12</b>	G Protein Subunit Alpha 12
<b>Grp78</b>	Glucose-regulated protein 78
<b>HBSS</b>	Hank's Balanced Salt Solution
<b>HnF4<math>\alpha</math></b>	Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$
<b>HRP</b>	Peroxydase de Raifort
<b>HSPA5</b>	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5
<b>IF</b>	Immunofluorescence
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IL-12RB1</b>	Interleukin 12 receptor, beta 1 subunit
<b>IL23R</b>	Récepteur aux interleukines 23
<b>IRE1</b>	Inositol requiring enzyme 1
<b>JAK</b>	Janus kinase
<b>JAK/STAT</b>	Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway
<b>LB</b>	Lymphocyte B
<b>LT<sub>(h)</sub></b>	Lymphocyte T (helper)
<b>MadCAM-1</b>	Molécule d'adhésion cellulaire muqueuse 1
<b>MC</b>	Maladie de Crohn
<b>MDP</b>	Muramyl-dipeptide
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>MEI</b>	Manifestations extra-intestinales

<b>MICI</b>	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
<b>MMP</b>	Matrix MetalloProteinase/métalloprotéinase matricielle
<b>Muc2</b>	Mucine 2
<b>NFκB</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>NK</b>	Natural killer
<b>NOD</b>	Nucleotide-binding oligomerization domain
<b>PAM</b>	Peptide antimicrobien
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>PDI</b>	Protéine disulfide isomérase
<b>PERK</b>	PKR-like ER protein kinase
<b>PFA</b>	Paraformaldéhyde
<b>PRR</b>	Pattern recognition receptor
<b>PVDF</b>	PolyVinylidene Fluoride
<b>qPCR</b>	Quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>rcf</b>	Relative Centrifugal Force
<b>RCUH</b>	Rectocolite ulcéro-hémorragique
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>RT</b>	Reverse transcription
<b>rt</b>	Room temperature
<b>RTqPCR</b>	Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>S1P, S2P</b>	Site-1 protease, Site-2 protease
<b>SERCA</b>	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
<b>SRE</b>	Stress du réticulum endoplasmique
<b>TBS-T</b>	Tris-buffered saline-Tween 20
<b>TEM</b>	Transition épithélio-mésenchymateuse
<b>TFM</b>	Transition fibro-myofibroblastique
<b>TGF-β</b>	Transforming growth factor beta
<b>Thg</b>	Thapsigargine
<b>Tm</b>	Tunicamycine
<b>Tm</b>	Tunicamycine
<b>TNF-α</b>	Tumor necrosis factor α
<b>Tris</b>	Trisaminométhane
<b>TuBHq</b>	2,5-di-tert-butylhydroquinone
<b>UCEIS</b>	Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity
<b>ULA</b>	Ultra Low Attachment
<b>UPR</b>	Unfolded protein response
<b>VCAM-1</b>	Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1
<b>WB</b>	Western Blot
<b>XBP1(s)</b>	X-box binding protein 1 (forme épissée)

# Table des matières

---

<b>Introduction.....</b>	<b>.....</b>
<b>1. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).....</b>	<b>1</b>
1.1 Définitions et aspects cliniques .....	1
1.2 Epidémiologie.....	1
1.3 Etiologie .....	1
1.3.1 Facteurs génétiques .....	2
1.3.2 Facteurs environnementaux .....	2
1.3.3 Facteurs immunologiques .....	3
1.4 Comparaison entre la RCUH et la MC.....	4
<b>2. La rectocolite ulcéro-hémorragique.....</b>	<b>5</b>
2.1 Physiopathologie de la RCUH.....	5
2.1.1 Le stress du réticulum endoplasmique .....	6
2.1.2 Modèle d'étude du SRE en culture <i>in vitro</i> .....	8
2.2 Histologie de l'intestin .....	9
2.2.1 Histopathologie dans la RCUH.....	9
2.3 La fibrose intestinale .....	11
2.4 Méthodes de diagnostic des MICI.....	13
2.5 Traitements .....	14
<b>3. Les modèles utilisés pour la recherche dans les MICI .....</b>	<b>16</b>
3.1 Modèles murins .....	16
3.2 Modèles cellulaires.....	16
3.2.1 Modèle 2D.....	16
3.2.2 Modèle d'organoïdes intestinaux 3D .....	17
3.2.2.1 Organoïde intestinal de polarité basal-out.....	17
3.2.2.2 Organoïde intestinal de polarité apical-out.....	18
<b>Contexte et objectifs du mémoire.....</b>	<b>20</b>
<b>Stratégie expérimentale.....</b>	<b>.....</b>
<b>4. Culture des organoïdes.....</b>	<b>21</b>
4.1 Organoïdes basal-out.....	21
4.2 Organoïdes apical-out.....	21
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>.....</b>
<b>5. Culture cellulaire .....</b>	<b>23</b>
5.1 Culture d'organoïdes 3D basal-out.....	23
5.2 Modèle d'organoïdes apical-out pro-fibrosants.....	23
<b>6. Analyses western blot .....</b>	<b>25</b>
6.1 Dosage protéique .....	25

6.2	Western Blot.....	25
<b>7.</b>	<b>Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction (RTqPCR).....</b>	<b>27</b>
7.1	Extraction d'ARN.....	27
7.2	Transcription inverse (RT) .....	27
7.3	Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR).....	28
<b>8.</b>	<b>Test fonctionnel de TFM sur les fibroblastes CCD18-Co .....</b>	<b>29</b>
8.1	Détection d' $\alpha$ -SMA par immunofluorescence et imagerie confocale.....	29
<b>Résultats.....</b>		
<b>9.</b>	<b>Caractérisation des marqueurs de SRE et de TEM exprimés en réponse au SRE et de la protéine AGR2 présente dans les surnageants de culture produits par les organoïdes inversés induits au SRE.....</b>	<b>30</b>
9.1	Sujets sains .....	30
9.1.1	SRE induit par la Tm – dose-réponse (organoïdes - patient 1).....	30
9.1.2	SRE induit par la Tm – dose-réponse (organoïdes - patient 2).....	31
9.1.3	SRE induit par le TuBHq - dose-réponse patient (organoïdes – patient 2).....	32
9.1.4	SRE induit par le TuBHq – time course (organoïdes - patient 2).....	33
9.2	Patient RCUH.....	34
9.2.1	SRE induit par la Tm - stimulation 2 $\mu$ g/mL Tm (organoïdes - patient 3) .....	34
9.2.2	SRE induit par la Tm - stimulation 2 $\mu$ g/mL Tm (organoïdes - patient 4) .....	35
<b>10.</b>	<b>Mise en évidence du caractère pro-fibrosant des organoïdes traités au SRE et de leur effet paracrine sur CCD18-Co.....</b>	<b>36</b>
10.1	Stimulation Tm – dose-réponse Tm (organoïdes - patient 1).....	36
10.2	Stimulation Tm – dose-réponse Tm (organoïdes - patient 2).....	37
<b>Discussion.....</b>		<b>38</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>		<b>45</b>
<b>Bibliographie.....</b>		<b>46</b>



# Introduction

# **1. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)**

## **1.1 Définitions et aspects cliniques**

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), regroupent principalement la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite ulcéro-hémorragique (RCUH). Ces maladies sont caractérisées par des troubles inflammatoires chroniques du système digestif.<sup>(1)</sup> Il s'agit de maladies multifactorielles, résultant de l'interaction entre facteurs environnementaux, génétiques et immunologiques.<sup>(2)</sup> Ce sont des maladies qui évoluent avec une alternance de phases actives (poussée) et de phases de rémissions le plus souvent obtenue suite à un traitement médical.<sup>(3)</sup>

## **1.2 Epidémiologie**

Les MICI touchent principalement les adolescents et les jeunes adultes âgés entre 15 et 35 ans et les personnes âgées (à partir de 65 ans)<sup>(4)</sup>, aussi bien les femmes que les hommes.<sup>(5)</sup> Ces dernières années, leur incidence a fortement augmentée dans les pays industrialisés, en particulier dans les pays d'Amérique du Nord et d'Europe Occidentale et du Nord.<sup>(2,6)</sup> Environ 1,6 millions d'Américains sont touchés par une MICI, avec une plus grande proportion présentant une RCUH.<sup>(2)</sup> La RCUH est plus fréquente que la MC, elle touche environ 1,2 millions de personnes en Amérique du Nord et 2,6 millions de personnes en Europe.<sup>(1)</sup> En 2023, sa prévalence a été estimée à environ 5 millions de cas dans le monde et se déclare généralement entre 25 et 35 ans.<sup>(2,7)</sup> La maladie de Crohn, affecte 20 nouveaux cas sur 100.000 habitants annuellement et se déclare généralement un peu plus tôt dans la vie, en moyenne entre 15 et 25 ans.<sup>(2,4)</sup> Les MICI sont plus fréquentes en zones urbaines, plutôt qu'en zones rurales.<sup>(1)</sup> La prévalence des MICI est plus faible chez les Nord africains et plus élevée chez les populations du Moyen-Orient, ce qui suggère une association avec des caractéristiques ethniques et génétiques.<sup>(8,9)</sup> Les facteurs environnementaux ont également certainement un impact sur les différences d'incidences entre les différentes régions géographiques au niveau mondial. A ce jour, l'incidence et la prévalence de ces maladies sont en augmentation et ces dernières représentent un problème de santé majeur, car elles affectent des jeunes personnes actives dans la société, qui malgré la prise de traitements, impactent la qualité de vie. Elles peuvent également entraîner des complications graves comme le cancer colorectal. Elles présentent donc un poids pour la société et les soins de santé et ne possèdent à ce jour aucun traitement médical permettant leur guérison<sup>(10)</sup>

## **1.3 Etiologie**

Aujourd'hui, l'étiologie de ces maladies reste encore mal connue et la combinaison de facteurs génétiques, environnementaux dont le microbiote intestinal et immunologiques, contribuent à leur développement. Ensemble, ces facteurs aboutissent à une réponse immunitaire incontrôlée et induisent une réaction inflammatoire chronique.<sup>(1,2)</sup>

### 1.3.1 Facteurs génétiques

Les MICI sont polygéniques. Une étude réalisée par Heyman portant sur les jumeaux, a démontré un lien entre la génétique et ces maladies, avec un plus grand impact de celle-ci dans la MC contrairement à la RCUH, concernant le nombre de gènes associés à ces maladies.<sup>(11)</sup> L'existence d'une prévalence plus élevée dans certains groupes ethniques renforce cette hypothèse.<sup>(8,9)</sup>

Des études d'association du génome ont mis au jour plus de 200 gènes comme étant associés aux MICI dont un tiers spécifique de la MC, un tiers spécifique de la RCUH et un tiers commun aux deux maladies.<sup>(6)</sup> Parmi ceux-ci, on peut citer le gène *NOD2/CARD15* (« *nucleotide-binding oligomerization domain 2/caspase recruitment domain-containing protein 15* »), qui est le premier gène de prédisposition découvert comme étant associé à la MC. Ce gène code pour la protéine NOD2, faisant partie de la famille des récepteurs de types nucleotide oligomerization domain (NOD), une classe des récepteurs pattern recognition receptor (PRR) reconnaissant les constituants de la paroi structurale des bactéries pathogènes. Il joue donc un rôle dans la réponse immunitaire innée, via la détection de pathogènes et a donc un rôle dans les défenses des muqueuses. Ce récepteur est exprimé au niveau des cellules épithéliales intestinales, des cellules de Paneth, des lymphocytes de la *lamina propria*, des monocytes et macrophages. Ce récepteur est capable de reconnaître le muramyl-dipeptide (MDP), un composant peptidoglycane, exprimé au niveau de la paroi bactérienne. Ce composé bactérien joue un rôle dans l'activation des cellules via la voie NFκB, impliquée dans la réponse immune et l'inflammation. Par conséquent, une mutation de ce gène au niveau des cellules de Paneth, modifie leur capacité à reconnaître les pathogènes intracellulaires, ce qui entraîne le développement de lésions inflammatoires au niveau de l'intestin. Il existe plusieurs variantes des mutations de ce gène et environ 50% des patients avec une MC possèdent une de ces mutations sur un de leur chromosome et 15% montrent une de ces mutations sur leurs deux chromosomes.<sup>(3,6,12,13)</sup>

Parmi les gènes de prédisposition associés aux MICI, on peut aussi remarquer l'*IL23R* ou encore *ATG16L1*, étant impliqué respectivement dans l'immunité et l'autophagie.<sup>(3)</sup>

### 1.3.2 Facteurs environnementaux

En plus de l'association de la localisation géographique dans la prévalence des MICI, d'autres facteurs environnementaux interviennent dans leur développement dont l'alimentation. Un régime alimentaire occidental, riche en graisses et en protéines, corrèle avec l'augmentation du risque de survenue de ces maladies.<sup>(14)</sup> Les aliments transformés, les additifs, les médicaments, les contraceptifs oraux sont associés à une augmentation du risque de développer une MICI.<sup>(15)</sup> La cigarette joue un rôle prépondérant dans le développement de la MC et possède un impact négatif sur cette dernière. Tandis qu'elle jouerait un rôle protecteur dans la RCUH. Une apparition significative de cas de RCUH chez d'anciens fumeurs a été rapportée et pourrait s'expliquer par un effet anti-inflammatoire du tabac qui proviendrait de l'augmentation de la saturation en monoxyde de carbone des tissus.<sup>(16)</sup> Enfin, une étude

réalisée sur la population Danoise, incluant 1,7 millions de sujets, a révélé que l'appendicectomie précoce (avant 20 ans) serait également un facteur protecteur de la RCUH, mais ce lien reste encore assez flou.<sup>(17)</sup>

### 1.3.3 Facteurs immunologiques

Une réponse immunitaire altérée de l'hôte, semble contribuer au développement des MICI. En situation normale, la barrière intestinale est intacte et protège des contacts directs entre les antigènes luminaux et les cellules immunitaires sous-jacentes. Chez les patients MICI, cette dernière est endommagée et provoque une augmentation de la perméabilité de la muqueuse et favorise le contact entre les antigènes de la lumière intestinale et les cellules immunitaires sous-jacentes. Ces contacts sont responsables de l'initiation des réponses immunitaires innées et adaptatives. Les cellules de l'immunité innée activent différentes voies cellulaires, qui provoquent un déséquilibre de la balance entre les facteurs pro- et anti-inflammatoires, avec un penchant pour les facteurs pro-inflammatoires, conduisant à une hyperactivation de certains éléments menant à l'inflammation au sein des tissus et au niveau systémique.<sup>(6,18)</sup> La résultante est une augmentation des réponses médiées par les lymphocytes T helper (LT<sub>h</sub>). Dans la MC, c'est une amplification des LT<sub>h</sub>1 et des LT<sub>h</sub>17, qui provoque la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-17, IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ . Tandis que dans la RCUH, l'inflammation est due à l'amplification des LT<sub>h</sub>2, qui provoque la sécrétion de la cytokine IL-5. Cela engendre une activation plus efficace des lymphocytes B (LB) et des cellules natural killer (NK). Ces dernières vont à leur tour produire la cytokine anti-inflammatoires IL-13.<sup>(2,15)</sup> Ce mécanisme de rétrocontrôle est altéré chez le MICI, provoquant une exacerbation de l'inflammation qui devient chronique.

Enfin, le déclenchement des MICI peut également être causé par une dysbiose du microbiote intestinal. Le microbiote joue un rôle important dans le métabolisme de l'hôte.<sup>(19)</sup> La dysbiose (imbalance entre les différentes espèces de bactéries qui composent le microbiote) peut avoir un effet d'augmentation de la perméabilité intestinale, ce qui induit une réponse du système immunitaire et déclenche de l'inflammation qui peut devenir chronique.<sup>(2,20)</sup> La composition de la flore commensale est différente entre les patients MICI et les sujets sains.<sup>(21)</sup> De même, elle est différente entre les patients avec une MC et une RCUH. En effet, ces patients MICI ont une diminution de la diversité de leur microbiome, qui se traduit globalement par une diminution des bactéries ayant un effet anti-inflammatoires et une augmentation des bactéries à effets pro-inflammatoires sur la muqueuse intestinale.<sup>(15)</sup> On observe par exemple, une diminution des *Firmicutes* et plus particulièrement des espèces *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia* et *Phascolarctobacterium*, qui sont connues comme ayant des propriétés anti-inflammatoires. En revanche, on a une augmentation des *Bacteroidetes* et des

*Proteobacteria*, telle que *E.Coli*, connues pour produire des effets pro-inflammatoires sur la muqueuse.<sup>(2,15,20)</sup>

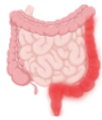

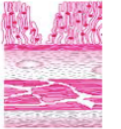

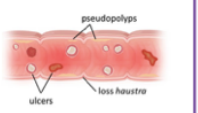
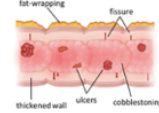



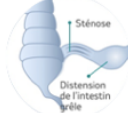
#### **1.4 Comparaison entre la RCUH et la MC**

La RCUH et la MC bien que développant des symptômes similaires, montrent chacune un tableau clinique différent. Dans la RCUH, la localisation de la maladie débute toujours au niveau du rectum et peut s'étendre au reste du côlon, tandis que la MC touche tout le tractus digestif, de la bouche à l'anus. L'inflammation dans la RCUH est diffuse et continue, tandis que dans la MC, l'inflammation et les zones avec des lésions tissulaires sont discontinues, hétérogènes et d'aspect « *patchy* ». Enfin, la RCUH est initiée au niveau superficiel et touche la muqueuse, c'est-à-dire l'épithélium et la *lamina propria*, néanmoins il a été montré dans la littérature qu'elle peut progresser dans la sous-muqueuse.<sup>(16)</sup> La MC, est une maladie transmurale, car l'inflammation peut toucher toutes les couches de la paroi intestinale.<sup>(1,2,22)</sup>

Les symptômes associés à ces deux pathologies, sont assez semblables, même si certains symptômes plus spécifiques existent. Les douleurs abdominales, diarrhées, la fièvre, perte de poids ou encore la fatigue, font partie des symptômes communs et classiques de ces deux maladies.<sup>(1,10,20)</sup> Le symptôme typique de la RCUH est la diarrhée sanglante (rectorragie). Hormis chez les patients dont la maladie à un début précoce, la majorité des patients RCUH développent ce symptôme les différenciant.<sup>(2)</sup>

Dans les cas les plus sévères, la maladie peut toucher la couche musculaire et aboutir à un mégacôlon toxique. Cette complication est rare et peut être mortelle si elle n'est pas traitée. Elle se caractérise par une forte dilatation du côlon (totale ou segmentaire) et est souvent accompagnée d'une distension abdominale.<sup>(1,23)</sup> Une autre complication est la colite fulminante. Comme le mégacôlon toxique, elle est présente chez environ 15% des patients RCUH. Ces deux complications peuvent entraîner des perforations intestinales, un choc septique et nécessite donc une chirurgie d'urgence.<sup>(1,2)</sup> Les complications les plus courantes dans les MICI, sont la fibrose intestinale et les sténoses dont nous parlerons plus loin.

On peut également retrouver des manifestations extra-intestinales (MEI), touchant principalement les yeux (uvéite, épisclérite, iritis), la peau (érythème noueux, pyoderma gangrenosum, aphtes buccaux), les articulations (rhumatisme) ou encore les voies hépatiques (cholangite sclérosante primitive) ou biliaires. Elles sont plus fréquentes dans la MC contrairement à la RCUH.<sup>(2,6)</sup> Bien que les arthropathies inflammatoires et la cholangite sclérosante primitive, sont plus fréquentes dans la RCUH.<sup>(24)</sup> Ce sont ces MEI qui sont en majorité responsables de la morbidité et de la mortalité chez les patients MICI.<sup>(25)</sup> Les patients RCUH ont également 4,5% de chance de développer un cancer 20 ans après le début de la maladie et ont un risque 1,7 fois plus important de développer un cancer par rapport aux personnes normales.<sup>(26)</sup>

	RCUH	Crohn
Localisation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rectum → Côlon</li> <li>• Inflammation continue</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tout le tractus digestif</li> <li>• Inflammation discontinue</li> </ul> 
Histologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inflammation superficielle (muqueuse, sous-muqueuse)</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inflammation transmurale</li> </ul> 
Colonoscopie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ulcères</li> <li>• Pseudopolypes</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Graisse rampante</li> <li>• Ulcères</li> </ul> 
Selles	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diarrhées sanglantes</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diarrhées aqueuse</li> </ul> 
Complications	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mégacôlon toxique</li> <li>• Fibrose</li> <li>• Sténoses</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sténoses</li> <li>• Fistules</li> <li>• Abscès</li> </ul> 

**Figure 1** : Tableau non exhaustif reprenant les caractéristiques de la RCUH et de la MC.  
Adapté de AMBOSS®, une ressource médicale numérique créée par des médecins.

## 2. La rectocolite ulcéro-hémorragique

### 2.1 Physiopathologie de la RCUH

A l'heure actuelle la physiopathologie de la RCUH est encore floue. Cependant, comme déjà évoqué, la RCUH montre une perturbation de la réponse immunitaire qui implique une composante auto-immune et une réaction inappropriée vis-à-vis des bactéries de la flore commensale.<sup>(27)</sup> Chez les patients RCUH, des polymorphismes génétiques ont été découverts comme ayant un impact négatif sur la perméabilité de la barrière épithéliale. Le rôle majeur de cette barrière est d'empêcher l'entrée du contenu luminal à travers l'épithélium intestinal, il s'agit de la première ligne de défense. Parmi ces altérations de la barrière, on peut citer une diminution de la sécrétion des peptides antimicrobiens (PAM), comme l' $\alpha$ -défensine, qui est produite par les cellules de Paneth. Les damage associated molecular patterns (DAMPs) sont modifiés et augmentés, alors que la couche de mucus qui sert à lubrifier et limiter le contact entre les bactéries commensales et les cellules épithéliales est diminuée.<sup>(16,28)</sup> On observe également une altération de la morphologie des cellules épithéliales, dans laquelle est impliqué le gène de susceptibilité *hepatocyte nuclear factor 4a* (*Hnf4a*), mais aussi des défauts au niveau des jonctions adhérentes et serrées où les gènes de la E-cadhérine (*CDH-1*) ; et la protéine de liaison aux nucléotides guanine alpha 12 (*GNA12*) sont respectivement impliqués. Toutes ces modifications ont pour résultat d'augmenter la perméabilité intestinale, ce qui augmente le contact des antigènes luminaux avec les cellules immunitaires présentes dans la muqueuse. La résultante est une

réponse exacerbée et un emballement dû à un défaut de rétrocontrôle des réponses immunitaires innées et adaptatives et de l'inflammation qui en découle.<sup>(16,28,29)</sup>

Les intervenants de la réponse innée sont : les neutrophiles, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NK. En temps normal, ces cellules se trouvent dans la *lamina propria*, mais chez les patients RCUH, une infiltration importante de ces cellules est observée dans la muqueuse et la sous-muqueuse. Il en résulte donc une production de cytokines, telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-23 qui vont induire la réponse immunitaire adaptative, médiée par les lymphocytes T et B. L'amplification des LT CD4<sup>+</sup> et plus particulièrement du sous-groupe LT<sub>h</sub>2, qui provoque notamment la sécrétion de l'IL-5 et de l'IL-13. Un polymorphisme du gène du récepteur de l'IL-23 (*IL-23R*) est lié à la fois à la MC et à la RCUH.<sup>(30)</sup> L'IL-23 qui est constituée des sous-unités p19 et p40, active la voie de signalisation JAK-STAT, en se liant à son récepteur hétérodimérique, composé de l'IL-23R et de l'IL-12RB1. L'activation de cette voie va permettre la transcription de plusieurs gènes impliqués notamment dans l'immunité, la croissance, la prolifération et la survie cellulaire.<sup>(28)</sup>

La sécrétion de l'IL-23 par les cellules dendritiques et les macrophages, induit le développement de l'inflammation chronique, via la production accrue de l'IL-17 et l'IL-6 par les LT<sub>h</sub>17.<sup>(28,31,32)</sup>

Enfin, la RCUH est également caractérisée par un dysfonctionnement mitochondrial. Des études ont démontré que l'ADN mitochondrial est reconnu comme un agoniste du système immunitaire inné. En effet, la présence d'une lésion tissulaire, déclenche un stress mitochondrial, qui entraîne la libération d'ADN mitochondrial. Ce dernier se lie aux PRR des cellules immunitaires, libérant des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6), entraînant le développement d'une inflammation aiguë et également chronique.<sup>(33,34)</sup> D'autres processus cellulaires et voies de signalisation ont été impliqués dans l'étiologie des MICI, dont le stress du réticulum endoplasmique (SRE) décrit ci-dessous.

### 2.1.1 Le stress du réticulum endoplasmique

En conditions physiologiques, la muqueuse intestinale possède une activité sécrétrice importante via les cellules caliciformes et les cellules de Paneth. Elle est donc impliquée dans la sécrétion de nombreuses protéines, qui nécessitent un repliement correct par le réticulum endoplasmique (RE) pour pouvoir être fonctionnelles. Le SRE est causé par une accumulation des protéines mal/non-repliées dans le RE, suite à une forte demande cellulaire et via la contribution de certains facteurs environnementaux tels que des métabolites microbiens, l'hypoxie ou des toxines, ou suite à des processus tels que l'inflammation ou des perturbations du métabolisme cellulaire.

Dans ces conditions particulières, le besoin important en protéines correctement repliées accentue encore d'avantage cette boucle SRE/processus inflammatoires inhérents aux MICI.<sup>(35,36)</sup>

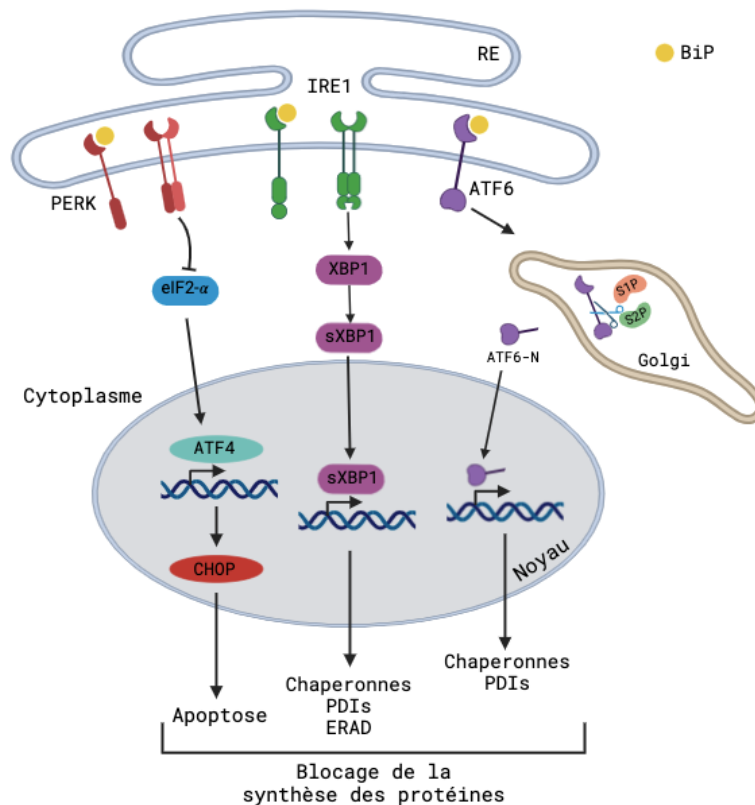
Une des stratégies cellulaires qui permet la résolution du SRE est l'augmentation de l'expression des protéines de l'unfolded protein response (UPR) qui est observée chez les patients MICI en phase active et parfois même en rémission, en absence d'inflammation.<sup>(36,37)</sup> Cette UPR permet de rétablir

l'homéostasie au sein du RE, en augmentant la production, le recrutement de protéines chaperonnes qui assurent le repliement correct des protéines via leur activité phospho-disulfide isomérase. L'UPR implique aussi une diminution de la synthèse de nouvelles protéines, via l'activation de trois protéines transmembranaires du RE : Inositol requiring enzyme 1 (IRE1), PKR-like ER protein kinase (PERK) et activating transcription factor 6 (ATF6). Ces protéines agissent sur les protéines mal repliées, en agissant avec la protéine chaperonne Grp78 (glucose-regulated protein 78), plus communément connue sous le nom de BiP (Binding immunoglobulin protein) (*HSPA5*), qui est l'élément clé, nécessaire à l'activation des différentes voies de l'UPR. En condition d'équilibre, ces protéines sont maintenues à l'état inactif, grâce à leur liaison avec BiP.<sup>(36)</sup> Une fois activée, chaque protéine va ensuite déclencher une voie de signalisation précise, dans le but de répondre à ce stress et donc de rétablir l'équilibre cellulaire.<sup>(35,37)</sup> La protéine PERK, une protéine kinase, est impliquée dans la voie traductionnelle en inhibant l'eukaryotic translation-initiation factor 2- $\alpha$  (eIF2- $\alpha$ ), un facteur d'initiation de la traduction. Cet arrêt de la traduction des protéines, permet de ralentir l'afflux de nouvelles protéines dans le RE. De plus, l'inhibition d'eIF2- $\alpha$  va également induire la production du facteur de transcription ATF4, qui joue un rôle dans l'activation de l'apoptose, via le facteur de transcription CEBP homologous protein (CHOP). Ensuite, les protéines activating transcription factor 6 (ATF6) et inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) jouent sur la transcription. IRE1 présente deux iso-formes,  $\alpha$  et  $\beta$ , dont  $\alpha$  qui est spécifique de l'intestin et est une ribonucléase, qui libérée de l'inhibition de BiP, produit la forme épissée de l'ARNm du facteur de transcription X-box binding protein 1 (XBP1). Contrairement à la forme non-épissée, qui ne possède aucune activité transcriptionnelle, la forme épissée (sXBP1) va être impliquée dans la synthèse des protéines chaperonnes, des protéines disulfides isomérases (PDI) ou encore des composants de l'endoplasmic-reticulum-associated protein degradation (ERAD). L'ERAD est une voie de dégradation des protéines qui a pour conséquence de diminuer les besoins en repliement de protéines au niveau du RE.

Enfin, la protéine ATF6 migre vers l'appareil de Golgi, où il va être clivé par les protéases (S1P et S2P), afin de produire une forme tronquée, ATF6-N. ATF6-N est capable de migrer vers le noyau pour induire la transcription des gènes codant pour la production de chaperonnes et donc d'autres PDI.<sup>(35,36,38)</sup> (**Figure 2**)

Bien que ces trois voies présentent des fonctions distinctes, elles agissent de manière coordonnées afin de rétablir l'homéostasie du RE. Si malgré ces réponses, le SRE est toujours présent, l'UPR entraîne la mort de la cellule via l'apoptose.<sup>(39)</sup>





**Figure 2 : Activation de l'UPR**

Schéma qui représente l'activation des différentes voies de signalisation dans l'UPR.

« Unfolded protein response » (UPR), réticulum endoplasmique (RE), Binding immunoglobulin protein (BiP), PKR-like ER protein kinase (PERK), Inositol requiring enzyme 1 (IRE1), activating transcription factor 6 (ATF6), eukaryotic translation-initiation factor 2- $\alpha$  (eIF2- $\alpha$ ), activating transcription factor 4 (ATF4), CEBP homologous protein (CHOP), X-box binding protein 1 (XBP1), forme épissée de XBP1 (sXBP1), forme tronquée ATF6 (ATF6-N), site-1 protease (S1P), site-2 protease (S2P), protéines disulfides isomérasés (PDIs), endoplasmic-reticulum-associated protein degradation (ERAD)

### 2.1.2 Modèle d'étude du SRE en culture *in vitro*

Il est possible d'induire un SRE sur des cellules via l'utilisation d'inducteurs de SRE, comme la thapsigargine (Thg), le 2,5-di-tert-butylhydroquinone (TuBHq) et la tunicamycine (Tm).

La thapsigargine est une substance naturelle qui provient de la plante *Thapsia garganica*. Elle possède une activité pharmacologique importante, comme inhibiteur de la pompe SERCA (Sarcoendoplasmic Reticulum Calcium ATPase). Cette pompe joue un rôle crucial dans le transport actif du calcium à l'intérieur du réticulum endoplasmique, permettant de maintenir l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$ . Son inhibition par la thapsigargine entraîne une fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  vers le cytoplasme, ce qui entraîne une perte de l'homéostasie, suivie d'un SRE via l'accumulation de protéines mal repliées et le processus d'UPR. Si le SRE perdure, cela peut conduire à l'apoptose.<sup>(40,41)</sup>

Le TuBHq quant à lui, est un composé synthétique qui possède la même action pharmacologique que la thapsigargine, à savoir un inhibiteur de la pompe SERCA, mais possède une affinité pour sa cible bien moindre que cette dernière.<sup>(42)</sup>

Enfin, la tunicamycine est un antibiotique naturel produit par certaines souches de bactéries du genre *Streptomyces*. Il inhibe la N-glycosylation des protéines en cours de synthèse dans le RE. Ce qui entraîne une surcharge de protéines mal repliées dans le RE et l'apparition d'un SRE par accumulation de ces protéines.<sup>(43,44)</sup>

## **2.2 Histologie de l'intestin**

Tout le tractus digestif, est composé de 4 couches principales : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. En fonction de la localisation, on observe des différences au niveau de la composition et de l'épaisseur de ces couches. Par exemple, dans le côlon, la muqueuse est lisse et plate et est constituée de cryptes. Tandis que dans l'intestin grêle, elle a un aspect plutôt irrégulier en raison de la présence de cryptes mais également de plis, de villosités et de microvillosités, qui augmentent la surface d'absorption.<sup>(45)</sup> La muqueuse est constituée de 3 couches qui sont, l'épithélium, la *lamina propria* (=chorion) et la *muscularis mucosae*. L'épithélium est composé d'une simple couche de cellules jointives, qui sont les cellules souches se trouvant à la base des cryptes, et également des cellules matures (entérocytes, cellules caliciformes, cellules entéro-endocrines, cellules de Paneth). On retrouve les cellules caliciformes, qui sécrètent le mucus qui sert notamment à protéger et lubrifier la muqueuse et agit à la fois comme barrière physique, mais également comme barrière chimique.<sup>(37,46)</sup> Les cellules de Paneth, ont une fonction antimicrobienne via la production de PAM tels que les défensines. Ces cellules sont principalement présentes dans les cryptes de l'iléon et dans le côlon droit.<sup>(46)</sup> Les cellules entéro-endocrines sécrètent différentes hormones peptidiques.<sup>(37)</sup> A la base des cryptes, les cellules M sont des cellules spécialisées dans le transport et la présentation des antigènes luminaux aux cellules immunocompétentes de la *lamina propria*. Cette seconde couche de la muqueuse est séparée de l'épithélium par la membrane basale et est constituée de matrice extracellulaire (MEC), de cellules immunitaires et de fibroblastes. La *muscularis mucosae*, sépare la muqueuse de la sous-muqueuse.

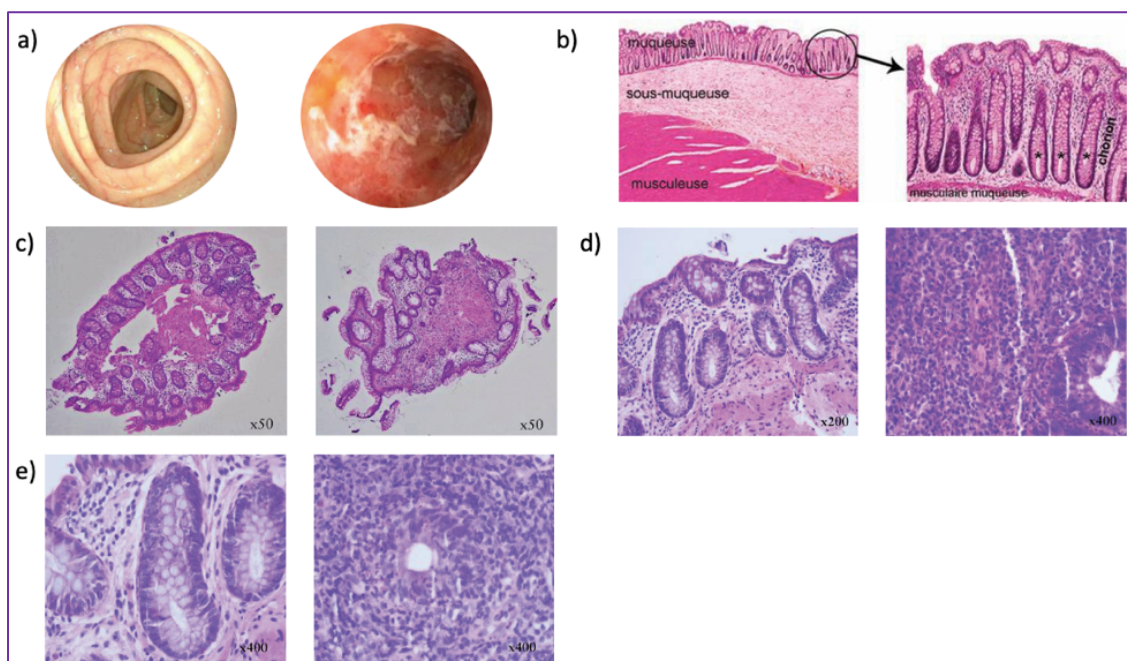
La sous-muqueuse est une couche de tissu conjonctif contenant à la fois des vaisseaux sanguins et lymphatiques.<sup>(45)</sup> Elle contient aussi le plexus de Meissner, un tissu nerveux jouant un rôle dans le péristaltisme intestinal.<sup>(46,47)</sup> Enfin la couche la plus interne est la musculuse, qui est constituée de cellules musculaires lisses adoptant deux conformations : une couche circulaire interne et une autre longitudinale externe. Entre ces deux couches se trouve le plexus nerveux myentérique d'Auerbach, qui participe également au péristaltisme. Vient enfin la couche séreuse, une couche de tissu conjonctif et d'adipocytes.<sup>(45)</sup> **(Voir figure 3)**

### **2.2.1 Histopathologie dans la RCUH**

Dans la RCUH, les lésions tissulaires varient en fonction de l'activité de la maladie. De manière générale, on observe des lésions inflammatoires limitées à la muqueuse et la couche superficielle de la sous-muqueuse. Au niveau macroscopique, la muqueuse est érythémateuse, d'aspect granuleux avec

une disparition de la trame des vaisseaux sanguins sous-muqueux et des zones hémorragiques.<sup>(6,45)</sup> Dans les cas un peu plus sévères, la muqueuse peut être le siège d'un infiltrat inflammatoire intense qui contribue à la formation d'une érosion des tissus et à la présence d'ulcères de différentes tailles, voire d'exsudats purulents avec des saignements spontanés. Une fois ces ulcères cicatrisés, des pseudo-polypes peuvent apparaître. Ces pseudo-polypes sont des nodules rougeâtres sessiles surélevés, généralement de petite taille qui peuvent être nombreux. Ces lésions apparaissent le plus souvent dans le côlon sigmoïde et descendant.

Au niveau histologique, une infiltration de la *lamina propria* par les cellules immunitaires est caractéristique des RCUH, avec une grande quantité de plasmocytes à la base de la muqueuse (plasmocytose basale), mais aussi d'éosinophiles et de neutrophiles. Ces derniers peuvent être également présents dans l'épithélium des cryptes, entraînant des cryptites ou abcès des cryptes. On observe également des lésions plus structurelles : la perte de la couche de mucus, une métaplasie des cellules de Paneth, un épaississement de la couche musculuse et une diminution de l'épaisseur de la muqueuse due au raccourcissement des cryptes, voire de leur perte totale caractérisant les ulcères.<sup>(45,48)</sup> **(Figure 3)** La fibrose intestinale est également observée dans la RCUH, bien que les lésions de type sténoses, fissures et fistules et granulomes sont très rares dans cette maladie et beaucoup plus courante dans la MC.<sup>(45)</sup>



**Figure 3 :** Vues par endoscopie et coupes histologiques (avec coloration Hématoxiline-Eosine) du côlon

**a)** Vue en endoscopie muqueuse d'aspect normal (gauche) et d'un patient RCUH en poussée inflammatoire (droite) **b)** Coupe transversale dans le côlon en zone normale (gauche), muqueuse normale (droite) **c)** Biopsie colique en zone normale (gauche), zone malade inflammatoire avec remaniement de la *muscularis mucosae* (droite) **d)** Muqueuse colique normale sans infiltrat inflammatoire dans la *lamina propria* (gauche) muqueuse RCUH avec infiltrat inflammatoire dans la *lamina propria* (droite) **e)** Muqueuse colique normale sans infiltrat inflammatoire dans les cryptes (gauche) muqueuse RCUH avec infiltrat inflammatoire dans les cryptes (droite)

### **2.3 La fibrose intestinale**

Une des complications des MICI est la fibrose intestinale, qui résulte de l'accumulation incontrôlée de matrice extracellulaire riche en collagène et de myofibroblastes, suite à une inflammation chronique. Ce remplacement progressif du tissu fonctionnel par un tissu de type cicatriciel est à l'origine de la perte de fonction de l'organe.<sup>(49)</sup> La fibrose est un processus physiologique normal, intervenant dans la réparation tissulaire, suite à des lésions aiguës et se traduit par une augmentation du pool de cellules d'origine mésenchymateuses : fibroblastes, myofibroblastes et cellules musculaires lisses, et une production de MEC conduisant à la formation d'un tissu cicatriciel.<sup>(50,51)</sup> Une fois la lésion guérie, la MEC est dégradée par les métalloprotéinases matricielles (MMP) et les cellules mésenchymateuses sont éliminées par apoptose ou reviennent à un état inactivé.<sup>(51)</sup> Dans certains cas où l'inflammation chronique persiste, le tissu cicatriciel n'est pas résorbé et la MEC, les myofibroblastes, s'accumulent dans la muqueuse et sous-muqueuse menant à la fibrose intestinale pathologique pouvant conduire à une perte de fonction du tissu, voire de l'organe.<sup>(51)</sup> La fibrose pathologique est responsable de la formation de sténoses (rétrécissements de la lumière intestinale), qui sont assez rares dans la RCUH comparativement à la MC, respectivement 5,1% et 30%.<sup>(49,51)</sup> Dans la RCUH, ces sténoses sont en majorité bénignes et réversibles.<sup>(52)</sup> Néanmoins, la fibrose dans la RCUH est responsable d'une rigidité accrue de la paroi, ce qui provoque de nombreux symptômes liés aux anomalies de la motilité du côlon : selles molles et diarrhée, une gêne abdominale et douleurs, ou encore un dysfonctionnement ano-rectal, voire une incontinence anale, même en l'absence d'inflammation. La fibrose est un facteur certainement impliqué dans le développement de la RCUH.<sup>(43,44)</sup>

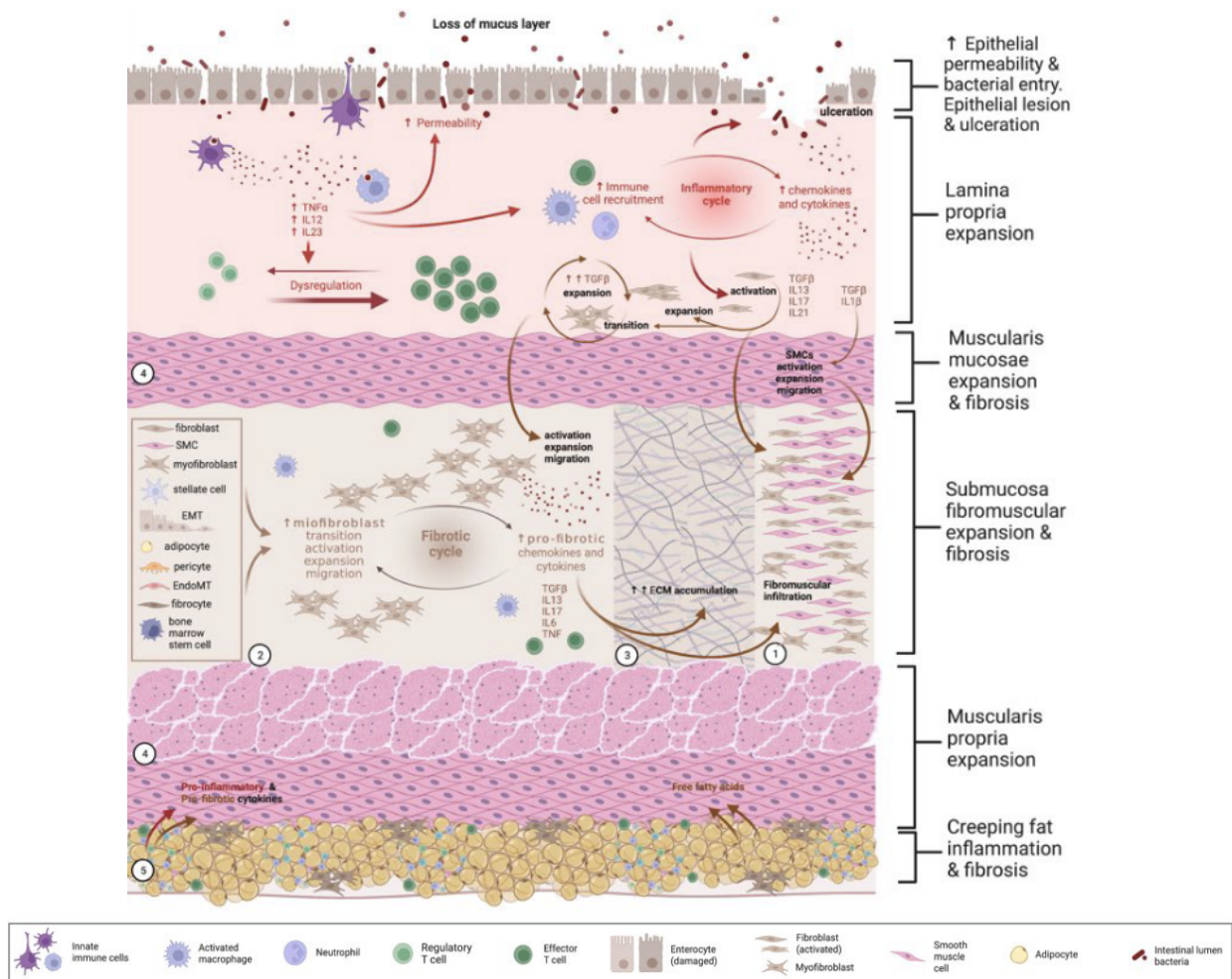
Au niveau histologique, dans la RCUH, on remarque la présence de fibrose au niveau de la muqueuse et un épaississement de la *muscularis mucosae* et de la *lamina propria*. Il a dernièrement été démontré que la fibrose est également présente dans la sous-muqueuse dans quasi 100% des tissus de résections chirurgicales montrant une inflammation chronique. Dans les cas les plus graves, l'atteinte tissulaire est plus profonde et on peut donc avoir un épaississement des couches circulaires interne et externe de la musculaire. Ainsi, la RCUH montre des signes histopathologiques au-delà de la muqueuse. Il a également été démontré que le degré d'inflammation est corrélé au niveau de fibrose. En effet la fibrose est plus importante dans les tissus présentant une inflammation chronique, par rapport à ceux présentant une inflammation active. L'inflammation est essentielle dans le développement de la fibrose, mais n'est pas nécessaire pour sa récurrence, même après une résection chirurgicale.<sup>(50)</sup>

Les cytokines produites par les cellules immunitaires peuvent également avoir un effet profibrotique : IL-13, IL-17, IL-21 et TGF- $\beta$ , sont impliquées dans la migration et l'activation des myofibroblastes qui sécrètent un excès de MEC. Le TGF- $\beta$  joue un rôle anti-inflammatoire mais est pro-fibrosant, il est considéré comme un facteur clé dans la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et donc dans la fibrose.<sup>(51,53)</sup> Les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales,

endothéliales, les cellules souches et les péricytes sont des autres sources de fibroblastes via des phénomènes cellulaires impliquant une dédifférenciation et re-différenciation telles que la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), suivie d'une transition des fibroblastes en myofibroblastes (TFM). La TEM se traduit par la perte des caractéristiques épithéliales (E-cadhérine et cytokératine) et par l'acquisition des caractéristiques mésenchymateuses (vimentine,  $\alpha$ -SMA).<sup>(53)</sup> La TFM se traduit par un changement morphologique des fibroblastes intestinaux, une synthèse des protéines du collagène et de la protéine  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA).

La MEC est une structure dynamique et trophique impliquée dans la communication entre les différents types de cellules, dont les fibroblastes. L'interaction entre la matrice et les fibroblastes, se fait via des complexes d'adhésion focale qui se trouvent au niveau de la membrane basale. Dans les MICI, les cytokines pro-fibrotiques jouent un rôle dans la réticulation des composants de la MEC, la rendant plus rigide. Ces modifications vont par la suite activer des voies de signalisation pro-fibrotiques induisant la TFM. Il a été démontré en l'absence d'inflammation, que la rigidité tissulaire peut favoriser la progression de la fibrose.<sup>(51,54)</sup> Pour résumer, une augmentation de la rigidité de la MEC soutient la fibrogenèse via l'activation des cellules mésenchymateuses, qui vont à leur tour favoriser les processus de TEM et TFM.

Un des types cellulaires utilisés en recherche pour étudier la fibrose, est le fibroblaste humain intestinal CCD18-Co. Il s'agit d'une lignée de fibroblastes intestinaux coliques isolés chez un patient sain et donc normaux. Ils sont utilisés pour objectiver une TFM, notamment grâce à leur stimulation par le TGF- $\beta$  (utilisé comme contrôle positif). Leur transformation en myofibroblastes s'évalue sur base d'une augmentation du marqueur  $\alpha$ -SMA, spécifique des cellules myofibroblastiques et musculaires.<sup>(55)</sup>



**Figure 4 : Fibrogenèse dépendante de l'inflammation**

Schéma représentant le développement de la fibrose intestinale, en réponse à une inflammation chronique causée notamment par une perméabilité accrue de l'épithélium, facilitant la pénétration des antigènes luminaux.

1) Expansion fibromusculaire de la sous-muqueuse causée par une infiltration de fibroblastes, cellules musculaires lisses (CML) et myofibroblastes activés. 2) Recrutement de myofibroblastes activés à la suite de la production de médiateurs pro-fibrotiques synthétisés par les myofibroblastes activés. 3) Accumulation chronique et intense des composants de la MEC synthétisés par les fibroblastes activés, les CML et surtout les myofibroblastes. 4) Épaississement des couches musculaires suite à l'activation et l'expansion des CML sur la muqueuse. 5) La graisse rampante est une source de médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques, de même que les acides gras libres, conduisant à l'inflammation et à la fibrose à travers la graisse rampante et les couches adjacentes de la paroi intestinale.

ECM: extracellular matrix; EMT: epithelial-to-mesenchymal transition; IL: interleukin; SMCs: smooth muscle cells; TGFβ: transforming growth factor β.

Schéma repris de De Sousa.

## 2.4 Méthodes de diagnostic des MICI

Il n'existe actuellement aucun outil de diagnostic spécifique des MICI. Le diagnostic actuel repose sur l'évaluation du **tableau clinique** (symptômes), des **antécédents cliniques** et **familiaux**, et l'examen histologique de biopsies de la muqueuse. Les symptômes doivent être présents depuis au moins 4 semaines, afin d'être défini comme potentiellement causés par la RCUH.<sup>(24)</sup>

Lors d'une suspicion de MICI, une confirmation **au laboratoire** est réalisée via un examen sérologique et une culture de selles, pour évaluer les marqueurs inflammatoires, tels que respectivement la protéine C réactive (CRP) et la calprotectine fécale (CF). La CF est un bon marqueur pour différencier une MICI d'un trouble fonctionnel non inflammatoire, mais n'est pas spécifique à ces maladies. Il s'agit

d'un marqueur inflammatoire corrélé à l'infiltrat inflammatoire de la muqueuse intestinale, ainsi c'est un marqueur d'activité clinique de la RCUH.<sup>(2,24,48,56)</sup>

Une **endoscopie** suivie d'une **analyse histologique** des biopsies est nécessaire pour confirmer le diagnostic. L'endoscopie permet de voir différentes caractéristiques de la RCUH, comme une atteinte diffuse de la muqueuse, une érosion de la muqueuse avec des possibles saignements au contact de l'endoscope ou encore la présence d'ulcères et/ou d'un exsudat purulent. Le score de Mayo est utilisé afin d'évaluer le risque en fonction de l'activité de la maladie.<sup>(26)</sup> Ce score est semblable au score de Harvey-Bradshaw utilisé dans la MC, et mesure l'activité de la RCUH. Ce score est calculé sur base du ressenti du patient par rapport à sa maladie (fréquence des selles, douleurs, rectoragie). Le score ainsi obtenu donne une estimation de la gravité de la RCUH. En effet, plus ce dernier est élevé, plus la maladie est avancée.<sup>(57)</sup> Le score UCEIS (Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity) est également utilisé pour évaluer l'activité de la maladie. Il s'établit sur d'autres paramètres et ne se concentre que sur l'aspect endoscopique de la maladie (saignements, érosions et ulcères, trame vasculaire).<sup>(58)</sup>

La présence d'un grand nombre de cellules immunitaires dans la *lamina propria*, une diminution des cellules caliciformes ou encore des altérations des cryptes intestinales sont utilisées pour caractériser les tissus.<sup>(24)</sup> Le score de Geboes est un score histologique utilisé en recherche, pour déterminer le niveau d'inflammation et ainsi la présence d'ulcères.<sup>(50,59)</sup>

## **2.5 Traitements**

Les MICI sont des maladies actuellement incurables, pour lesquelles il existe différents traitements afin de réduire les symptômes et d'améliorer la qualité de vie du patient. On peut citer :

- les **anti-inflammatoires**, avec les aminosalicylates et les corticostéroïdes. Le principal aminosalicylates est le 5-aminosalicylates (5-ASA), que l'on retrouve dans la *sulfasalazine*. Il est le traitement de première intention dans les cas légers à modérés de RCUH. Il a pour but d'induire une rémission en diminuant l'inflammation et les symptômes et prévenir les rechutes.<sup>(1,60,61)</sup> Les corticostéroïdes, comme le *prednisone* sont prescrits en cas d'échec avec les 5-ASA. Ils ont également pour but d'induire une rémission, mais ne sont cependant pas utilisés pour la maintenir en raison d'un manque d'efficacité à long terme et leurs effets secondaires importants.<sup>(62)</sup>
- les **antibiotiques**, montrent une efficacité dans l'induction d'une rémission via la suppression des bactéries nocives responsables de l'inflammation. La combinaison *amoxicilline*, *tétracycline*, *métronidazole* a montré une amélioration des symptômes et des marqueurs inflammatoires chez les patients RCUH. Cependant un taux d'effets secondaires (fièvre) de 52,4% a été observé causé par la *tétaracycline*, c'est pourquoi elle a été remplacée par la *fosfomycine*.<sup>(63,64)</sup>

- les **immunosuppresseurs**, parmi lesquels on retrouve la ciclosporine et les thiopurines (*azathioprine* ou *6-mercaptopurine*) sont prescrits pour les cas modérés à sévères qui répondent aux corticostéroïdes. Leur but est de réduire la réaction du système immunitaire, afin de réduire l'inflammation.<sup>(62)</sup> La ciclosporine quant à elle, est prescrite chez les patients avec des poussées sévères de RCUH ne répondant pas aux corticoïdes.<sup>(65)</sup>
- les **anticorps anti-TNF- $\alpha$**  (facteur de nécrose tumoral  $\alpha$ ), tels que l'*Infliximab* ou l'*Adalimumab*. Ils sont actuellement prescrits de plus en plus tôt dans la prise en charge comme traitement, afin d'éviter l'utilisation des stéroïdes et le développement de dépendances. Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la pathogenèse des MICI. Elle est sécrétée en excès par les macrophages, augmentant le recrutement des leucocytes dans les vaisseaux et donc augmenter l'inflammation. Ces anticorps ont pour but d'inhiber le TNF- $\alpha$  et diminuer le niveau d'inflammation. Ce traitement peut induire rémission clinique et endoscopique chez le patient, car il permet la cicatrisation de la muqueuse intestinale.<sup>(66)</sup> Cependant, tous les patients ne répondent pas à cette thérapie ou peuvent développer une certaine intolérance.
- les traitements de seconde intention, tels que les **inhibiteurs des JAK kinases** (*Tofacitinib*). Les protéines JAK sont importantes dans la réponse immunitaire inflammatoire, en régulant notamment la prolifération des lymphocytes.<sup>(67)</sup> Le *Tofacitinib* inhibe de manière réversible et spécifique JAK1 et JAK3, ce qui va bloquer l'effet et la synthèse de plusieurs cytokines pro-inflammatoires. Ce médicament est utilisé pour induire et maintenir la rémission clinique et endoscopique chez les patients RCUH avec une maladie modérée à sévère.<sup>(66,68)</sup> D'autres inhibiteurs de JAK existent, comme l'*Upadacitinib* et le *Filgotinib*. Ce sont tous les deux des inhibiteurs sélectifs de JAK1 et sont des médicaments de deuxième génération.<sup>(69)</sup>
- les **inhibiteurs d'interleukines**, comme l'*Ustékinumab*, qui est un anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité p40, commune à l'IL-12 et l'IL-23. Ces dernières jouent un rôle dans la différenciation des LT<sub>H1</sub> et LT<sub>H17</sub>. Cet inhibiteur réduit donc l'activation des LT. Il est utilisé également pour les maladies modérées à sévères et lors de l'échec du traitement par anti-TNF $\alpha$  ou traitements conventionnels. Il montre la même efficacité que l'anti-TNF $\alpha$  sur l'amélioration des symptômes.<sup>(66,68)</sup>
- les **inhibiteurs d'intégrines**, tels que le *Védolizumab* et le *Natalizumab*, qui impactent le trafic des leucocytes vers les tissus intestinaux (extravasation). Le *Védolizumab* a pour rôle de se lier sur l'intégrine  $\alpha4\beta7$  des lymphocytes, empêchant ainsi sa liaison avec la molécule d'adhésion cellulaire muqueuse (MadCAM-1), spécifique des tissus intestinaux. Le *Natalizumab*, va lui se fixer sur la sous-unité  $\alpha4$  de l'intégrine bloquant à la fois les intégrines  $\alpha4\beta7$  et  $\alpha4\beta1$ . Cette dernière étant spécifique du système nerveux central. Ces médicaments ont donc pour rôle d'empêcher la migration des lymphocytes vers l'intestin. Le *Natalizumab* empêche également



la migration des lymphocytes vers le système nerveux central, en bloquant l'interaction entre  $\alpha 4\beta 1$  et la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire (VCAM-1).<sup>(66,68)</sup>

Malgré le développement de ces nouvelles lignes de traitement, aucun traitement n'a prouvé son efficacité afin de prévenir ou de limiter le développement de la fibrose intestinale. **Ainsi, la recherche de nouvelle(s) cible(s) thérapeutique(s) capable(s) d'avoir un effet inhibiteur sur le processus de fibrose intestinale reste un besoin clinique non rencontré.**

### **3. Les modèles utilisés pour la recherche dans les MICI**

#### **3.1 Modèles murins**

Pour étudier la pathogenèse des MICI en laboratoire et développer des outils thérapeutiques, plusieurs modèles murins ont été développés. Entre autre : les **souris knock-out Muc2** ( $Muc2^{-/-}$ ) qui développent une colite suite à la perte de la couche de mucus, qui engendre une inflammation.<sup>(70)</sup> Les **souris chimiquement induites par le DSS** (sulfate de dextrane sodique), un polysaccharide sulfaté qui endommage les cellules épithéliales coliques, facilitant l'entrée des antigènes luminaux, ce qui provoque une inflammation aiguë du côlon.<sup>(71,72)</sup> Les **souris knock-out IL-10** ( $IL-10^{-/-}$ ), qui développent des colites spontanément dès l'âge de 3 mois.<sup>(71,73)</sup>

Le modèle murin présente des avantages, comme la reproductibilité du modèle qui permet d'évaluer un organisme entier avec des individus génétiquement proches, la similitude des symptômes et des caractéristiques histologiques de l'épithélium intestinal avec ceux de l'humain. Cependant, il est assez coûteux et prend beaucoup de temps pour développer la maladie et pose des complications liées à l'expérimentation animale d'un point de vue éthique. De plus, les réponses aux traitements et aux médicaments peuvent dans certains cas, être différentes par rapport à l'Homme, de même que la physiologie et la génétique peuvent varier en fonction du modèle choisi.

#### **3.2 Modèles cellulaires**

##### **3.2.1 Modèle 2D**

Il n'existe actuellement aucune lignée commerciale de cellules épithéliales intestinales humaines normales. Seules des lignées cancéreuses sont disponibles, comme par exemple :

- les cellules **Caco-2** (Cancer Co Li-2) sont, des cellules d'adénocarcinome colorectal humain, possédant une morphologie et une fonctionnalité semblables à celles des entérocytes intestinaux. De plus, elles se différencient spontanément, se polarisent, forment des dômes et possèdent une bordure en brosse dans des conditions de culture classiques. Elles sont utilisées pour étudier les différents modes d'absorption intestinaux et évaluer la perméabilité des

candidats médicaments, car elles possèdent un grand nombre de transporteurs à leur surface. L'inconvénient est qu'elles ne possèdent pas de couche de mucus.<sup>(74)</sup>

- les cellules **HT29**, dérivent également des cellules d'adénocarcinome humain. Elles possèdent aussi une structure semblable à celle des entérocytes intestinaux et sont utilisées pour l'étude du cancer ou l'absorption et test d'effet de médicaments.<sup>(75)</sup>
- les cellules **HCT-116**, sont des cellules de cancer colorectal utilisées pour étudier la biologie du cancer et le mécanisme moléculaire des métastases.<sup>(76)</sup>

Ce type de culture s'organise en une monocouche de cellules adhérentes. Ces cellules vont être recouvertes d'un milieu de culture riche en nutriments et en facteurs de croissance, permettant la prolifération homogène des cellules et leur croissance, grâce à un accès équivalent à ces facteurs, ce qui constitue leur plus gros avantage. Ce modèle est souvent utilisé par les chercheurs en raison de sa facilité, de son efficacité et du gain de temps. Cependant il présente plusieurs inconvénients comme le fait qu'il ne représente pas les conditions physiologiques que l'on retrouve en *in vivo*, ce qui nuance la pertinence des résultats. Néanmoins, l'architecture des cellules est différente de ce que l'on retrouve *in vivo* puisque les cellules sont normalement entourées d'autres cellules de type différent et de MEC, ce qu'on ne retrouve pas avec le modèle 2D classique.<sup>(77,78)</sup>

### 3.2.2 Modèle d'organoïdes intestinaux 3D

Le modèle d'organoïdes épithéliaux intestinaux représente un moyen translationnel pour étudier le phénotype épithélial puisqu'ils dérivent directement de cellules intestinales isolées chez les patients. Il récapitule donc le profil génétique et épigénétique du patient, ce qui permet de voir leur potentiel effet sur le développement des MICI et d'étudier les variations inter-individuelles.<sup>(79)</sup> Ce modèle de culture *ex-vivo* et *in-vitro*, se base sur la capacité des cellules souches intestinales du fond des cryptes à proliférer et se différencier lorsqu'elles sont placées dans certains milieu de culture. Les organoïdes peuvent adopter plusieurs configurations suivant les conditions de culture.

Le modèle de culture 3D a pour gros avantage de représenter plus fidèlement l'architecture et le microenvironnement des cellules *in vivo*.<sup>(78)</sup> Un des modèle de culture cellulaire 3D est le modèle d'organoïdes apical-out.

#### 3.2.2.1 Organoïde intestinal de polarité basal-out

Les organoïdes de polarité basal-out, vont être générés en cultivant des cryptes intestinales isolées à partir de la muqueuse de patients RCUH ou de contrôles sains. Ces cryptes principalement composées de cellules souches multipotentes, sont alors disposées dans une matrice extracellulaire qui fournit un support trophique à leur prolifération. Ces cellules se multiplient dans tous les plans et donnent le caractère 3D à la culture. La polarité basal-out, signifie que le pôle basal des cellules se situe

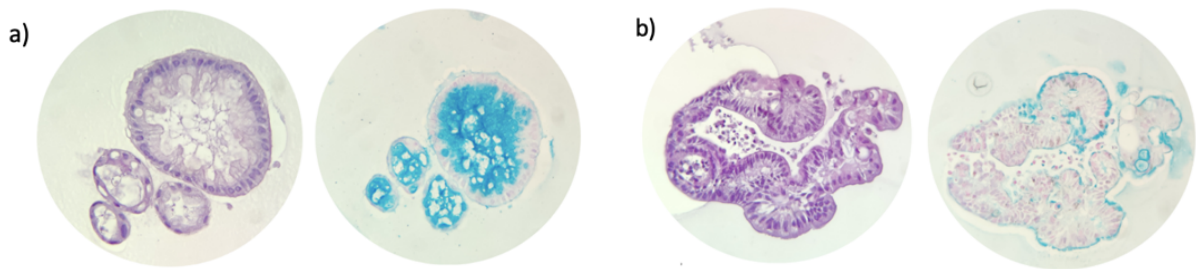
vers l'extérieur, orienté vers le milieu de culture. Le pôle apical, luminal, et de ce fait, l'ensemble du secrétome dont le mucus, est piégé à la fois au sein de l'organoïde, mais également dans la matrice du dôme. Dans ce cas de figure, étudier un effet paracrine est relativement complexe, voire impossible. L'avantage du modèle 3D, est qu'il conserve les fonctions de l'épithélium, notamment l'intégrité de la barrière, l'architecture ainsi que la richesse cellulaire une fois ces organoïdes différenciés. De plus, ces organoïdes ont une longue durée de vie en culture, ils peuvent survivre plusieurs mois en subissant de multiples passages. Enfin, ces organoïdes vont permettre notamment d'étudier les réponses épithéliales lors des interactions hôte-pathogène ou encore de tester différentes stratégies thérapeutiques.<sup>(80)</sup>

### 3.2.2.2 Organoïde intestinal de polarité apical-out

Dans le corps humain, le pôle apical des cellules épithéliales intestinales est en contact avec le contenu de la lumière du tube digestif. Les organoïdes de polarité apical-out, également appelés « organoïdes inversés » ont été créés afin d'étudier plus facilement les fonctions et propriétés de l'épithélium intestinal humain. Ils sont générés à partir des organoïdes basal-out après passage et culture sans matrice extracellulaire. Ils sont cultivés en suspension et le pôle apical des cellules se trouve à l'extérieur de l'organoïde, orienté vers le milieu de culture. Lors du retrait de la matrice, les organoïdes se réorganisent et s'inversent de manière autonome. La culture passe donc d'une architecture 3D basal-out cultivée en dôme de matrigel® ou basal membrane extract (BME), à une architecture apical-out libre dans le milieu de culture dépourvu de matrice. Les avantages de ce modèle sont donc un maintien de la barrière épithéliale, le pôle apical qui est en contact direct avec le milieu de culture dans lequel on peut ajouter différentes molécules ou inducteurs à tester. Cela évite un effet de gradient dans le dôme de matrice très probable dans le cas des organoïdes basal-out. Il permet de s'affranchir du besoin de réaliser des micro-injections dans la lumière des organoïdes, comme dans le cas du modèle basal-out. Ensuite, ces organoïdes, libèrent leurs sécrétions directement dans le milieu de culture, facilement analysable sans contamination par excès de MEC. De plus, ces derniers se différencient de manière spontanée une fois leur inversion achevée. Les inconvénients de ce type de culture est qu'elle est chronophage et techniquement complexe à mettre en place. Les organoïdes inversés possèdent également une durée de vie limitée d'environ 7 à 9 jours et ne peuvent pas être passés puisqu'ils se différencient en cellules matures et perdent une bonne partie de leur capacité proliférative et de pluripotence.<sup>(79,80)</sup> Le fait d'éliminer la MEC des cultures, permet également de pouvoir éliminer un composant gênant qui pourrait interférer avec l'étude de la fibrose. En effet, celle-ci est objectivée en partie par des molécules pro-fibrosantes qui peuvent être aussi piégées dans la matrice extracellulaire commerciale utilisée pour la culture en dômes.

En conclusion, les organoïdes apical-out, offrent une méthode innovante pour étudier l'implication de l'épithélium intestinal mature et de phénotype non cancéreux dans le développement

de pathologies digestives telles que les MICI. Leur polarité inversée permet un contact facile avec les inducteurs de SRE et une sécrétion dans le milieu de culture, facilitant les analyses en aval. De plus, grâce à l'utilisation des cellules de patients, il prend en compte les caractéristiques génétiques et épigénétiques propres à celui-ci et est ainsi un outil de recherche translationnelle, permettant de réaliser des tests fonctionnels.



**Figure 5 :** Colorations histologiques d'organoïdes basal-out et apical-out

a) Coloration histologique hématoxyline éosine (gauche) et au bleu alcian (droite) d'organoïdes basal-out. b) Coloration histologique hématoxyline éosine (gauche) et au bleu alcian (droite) d'organoïdes apical-out. Images de Marty Stepniak.

# Contexte et objectifs du mémoire

Sophie Vieujean a démontré que le SRE provoque le relargage d'une protéine chaperonne (PDI), impliquée dans l'UPR et que cette protéine (eAGR2) est impliquée dans la fibrose intestinale associée à la MC.<sup>(53)</sup> En bloquant cette protéine avec un anticorps commercial, elle a pu démontrer son effet pro-fibrosant sur le modèle de fibrose CCD18-Co. Ce mémoire s'intègre dans le travail de thèse de doctorat de Marty Stepniak qui fait suite à la thèse de Sophie Vieujean et s'intéresse à la fibrose intestinale rencontrée dans les MICI. L'objectif du projet de M. Stepniak, est de mieux comprendre l'implication de l'épithélium dans l'initiation et la progression de la fibrose intestinale dans un contexte de rectocolite ulcéro-hémorragique. Mais également de faire le lien entre cette fibrose pathologique et le stress du réticulum endoplasmique spécifiquement dans cette MICI. La RCUH étant une maladie dite « de muqueuse », elle constitue un bon modèle pathologique pour étudier l'impact de l'épithélium dans le processus pro-fibrosant. De plus, la fibrose intestinale pourrait être une des complications fréquemment observée, expliquant certains symptômes chez les patients. Il a été observé que 100% des tissus de résections chirurgicales issus de patients RCUH, sont porteurs de signes de fibrose dans la muqueuse et sous-muqueuse et sont souvent associés à des signes d'inflammation chronique.

Dans ce contexte, mon travail de mémoire a pour objectif la **mise au point d'un modèle d'organoïdes 3D apical-out dérivant de sujets sains et de patients atteints de RCUH, présentant un phénotype pro-fibrosant induit par un SRE**. Pour ce faire, je développerai les conditions expérimentales qui permettront d'obtenir ce phénotype pro-fibrosant (SRE induit) par comparaison à un phénotype normale (SRE non induit). Ces développements impliquent la caractérisation et comparaison des réponses obtenues suite aux différentes conditions d'induction du SRE utilisées. Ceci permettra *in fine*, d'obtenir un modèle de laboratoire pour l'étude de la réponse épithéliale suite à un SRE et les changements associés et démontrés comme ayant un effet fibrogénique sur le modèle de fibrose intestinale : la TFM des CCD18-Co.

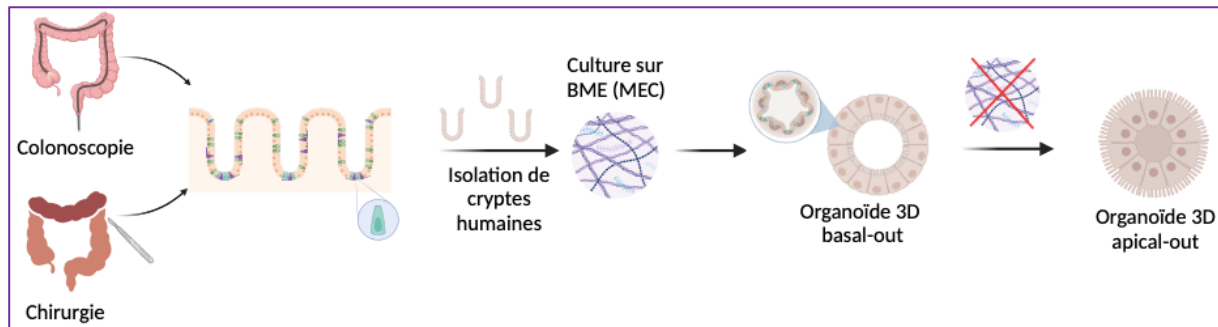
Concrètement, nous allons faire varier les conditions d'induction de ce stress en jouant sur les concentrations d'inducteurs : Tm et TuBHq (doses-réponses) et la durée de la phase de culture de récupération post-SRE (recovery), afin de choisir les conditions optimales et de standardiser l'obtention du phénotype pro-fibrosant sur des organoïdes inversés dérivant d'un sujet sain. Cette analyse sera complétée par le résultat d'un test fonctionnel réalisé sur une culture de fibroblastes humains CCD18-Co (ATCC CRL-1459<sup>TM</sup>), où l'effet paracrine produit par les organoïdes induits ou non au SRE sera évalué sur la TFM. Ce modèle étant reconnu dans la littérature comme un modèle cellulaire de fibrose intestinale.<sup>(53)</sup> Une fois standardisé, le modèle sera appliqué à des organoïdes dérivés de patients RCUH afin d'évaluer la répétabilité des conditions standardisées.

# Stratégie expérimentale

## 4. Culture des organoïdes

### 4.1 Organoïdes basal-out

Les fragments de muqueuse de patients sont obtenus soit, à la suite d'une colectomie sur la pièce chirurgicale non fixée, soit durant une colonoscopie, par biopsies ou à l'aide d'une ablation à l'anse froide. Ensuite les cryptes intestinales composées principalement de cellules souches multipotentes sont isolées. Les cellules sont ensuite incluses dans une matrice de BME, afin de permettre la croissance d'organoïdes basal-out.



**Figure 4** : Génération des organoïdes 3D apical-out, à partir des échantillons de patients

### 4.2 Organoïdes apical-out

La prolifération des organoïdes est réalisée sous polarité basal-out et une fois ces organoïdes matures, le processus d'inversion des organoïdes est réalisé et comprend les phases d'inversion et de différenciation.

Le phénotype pro-fibrosant est obtenu par induction du SRE avec 3 étapes : déprivation, stimulation et une phase de récupération (recovery), où la réponse au SRE transitoire subie par les cellules épithéliales matures de l'organoïde sera évaluée.

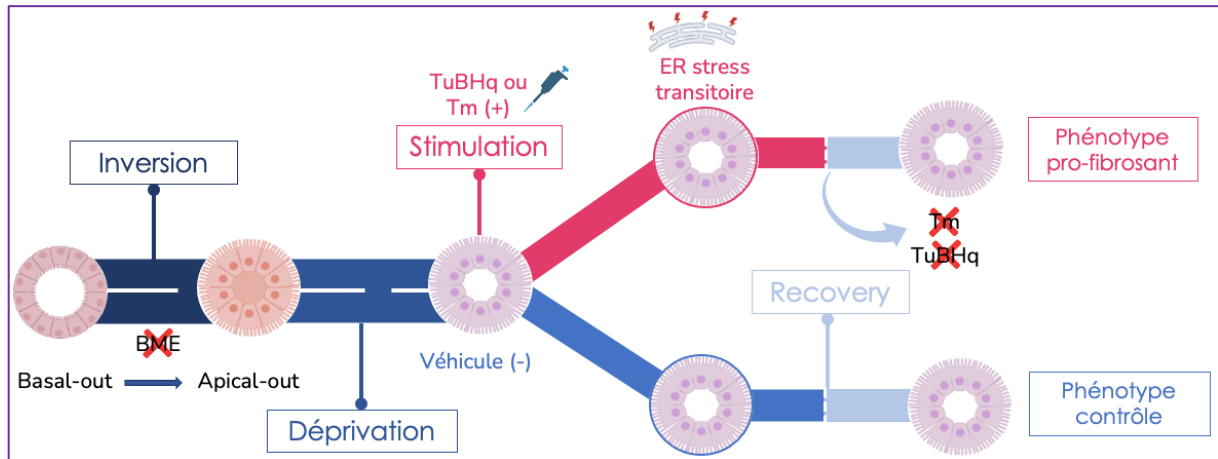
La première étape correspond à l'**inversion** des organoïdes basal-out. Ces derniers sont isolés de leur milieu de prolifération à passage 3 ou 4. Dès le retrait de la matrice, l'inversion spontanée des organoïdes débute. Ces derniers sont remis en culture dans un milieu de différenciation, afin de parfaire la différenciation cellulaire, déjà entamée par le processus d'inversion.

La phase de **déprivation** correspond à la mise en culture des organoïdes apical-out dans un milieu de différenciation sans FBS. Le but étant de mettre les organoïdes dans les mêmes conditions et de s'affranchir des composants inconnus du FBS et d'obtenir une meilleure réponse à la suite de l'induction du SRE appliqué sur les organoïdes inversés.



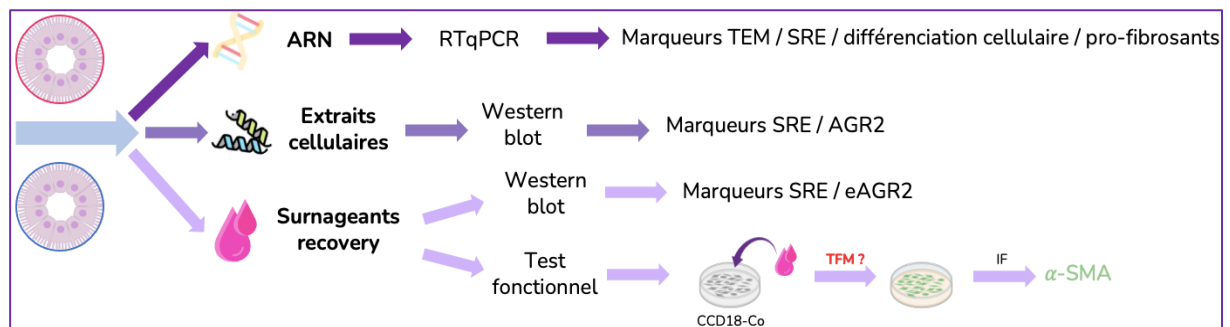
Une fois la phase de déprivation terminée, les organoïdes inversés sont divisés en deux conditions : une partie reçoit l'inducteur de SRE (Tm ou TuBHq) et l'autre le véhicule (condition contrôle). Cette phase d'induction de SRE est transitoire et dure 12 heures.

Enfin, l'étape de **recovery** correspond à une période durant laquelle les organoïdes sont débarrassés de leur milieu contenant l'inducteur de SRE (et véhicule) et remis dans un milieu frais.



**Figure 5** : Différentes phases de culture du modèle : inversion (24 heures), déprivation (24 heures), stimulation (12 heures) par TuBHq ou Tm, recovery (32 heures)

Après cette étape de recovery, 3 types d'échantillons seront récoltés : l'ARN, les extraits protéiques et les surnageants de culture.



**Figure 6** : Workflow des différentes analyses moléculaires après étape de recovery

Une caractérisation moléculaire sur ces 3 échantillons est réalisée et un test fonctionnel cellulaire est également réalisé avec les surnageants de culture collectés, afin d'objectiver ou non une transition myofibroblastique (TFM) sur une culture de fibroblastes intestinaux humains CCD18-Co. Ce test permettra d'objectiver le caractère pro-fibrosant des organoïdes traités par le SRE par opposition au contrôle (véhicule). La TFM est mise en évidence par une augmentation de l'expression du marqueur  $\alpha$ -SMA des CCD18-Co détectée par immunofluorescence associée à un changement morphologique des cellules, comme décrit dans le papier de Sophie Vieujean.

# Matériels et méthodes

## 5. Culture cellulaire

### 5.1 Culture d'organoïdes 3D basal-out

Les échantillons de muqueuse obtenus sont directement placés dans du PBS (Westburg® réf : LO BE17-516F) à 4°C, avec des antibiotiques (gentamicine 50 µg/mL, pénicilline/streptavidine 100 µg/mL, amphotéricine 2,5 µg/mL). Après découpage des tissus, plusieurs lavages avec du PBS froid sont réalisés. Ils sont ensuite incubés dans une solution chélatante (eau déminéralisée, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,6 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mM, NaCl 96,2 mM, KCl 1,6 mM, Sucrose 43,4 mM, d-sorbitol 54,9 mM, DTT 0,5 mM) supplémentée d'EDTA, afin de rompre les liaisons cellules/matrice, puis remis en suspension dans une solution chélatante sans EDTA. Après avoir laissé sédimenter cinq fois l'homogénat de tissus et récupéré les cinq fractions de surnageants contenant les cryptes intestinales, ceux-ci sont centrifugés à 500 rcf et à rt. Le culot est resuspendu dans une solution composée de 50% de milieu pré-conditionné WRN complet de prolifération (**Annexe 1**) et de 50% de BME (Biotechne® réf : 3533-005-02) à 4°C. Les dômes sont formés par dépôts de 50 µL de la suspension cellulaire à raison d'une goutte par puits et laissé à polymériser 15 min à 37°C, sous 5% CO<sub>2</sub> dans l'incubateur de culture. Une fois polymérisé, les dômes sont immergés dans 500 µL de milieu de prolifération. Les dômes d'organoïdes 3D basal-out sont ainsi obtenus et incubés afin que les organoïdes y prolifèrent, puis soient passés de façon similaire jusqu'à avoir assez de matériel (après 3 passages, ce qui prend environ 3 semaines) avec 3 changements de milieu par semaine.

### 5.2 Modèle d'organoïdes apical-out pro-fibrosants

Ce protocole a été créé et adapté à partir de l'article de Sato.<sup>(81)</sup>

Pour réaliser l'**inversion**<sup>1</sup>, retirer le milieu de prolifération du puits et ajouter 1 mL de PBS à 4°C pendant 1 minute. Retirer le PBS et « flusher » le dôme d'organoïdes avec la solution de PBS/EDTA (1 mL/puits) 5 mM pH 7,5 glacée (BioWORLD® réf : 40120779-2) et filtrée (filtre 0,45 µm VWR chemicals® réf : 514-4123). Laisser incuber 30 secondes à 1 minute et homogénéiser délicatement (5-6 aspirations-refoulements) à l'aide de tips coupés. Transférer à l'aide de tips coupés dans un falcon 15 mL et refaire un rinçage du puits avec 1 mL de PBS/EDTA glacé. Transférer dans le falcon et ajuster le volume de PBS/EDTA glacé (V<sub>f</sub>=8 mL). Réaliser des inversions des tubes manuellement pour pré-dissocier mécaniquement le dôme. Laisser agiter 45 minutes dans la glace sous agitation faible, en s'assurant que les tubes soient complètement sous la glace et horizontaux. Centrifuger 4 minutes à 230 rcf, à 4°C et sans frein. Jeter le surnageant et resuspendre le culot dans 8 mL de solution de PBS/EDTA glacée et dissocier le culot par inversions-retournements. Remettre agiter dans la glace pendant 15 minutes, centrifuger 4 minutes à 230 rcf, à 4°C et sans frein, et éliminer le surnageant. Resuspendre le culot dans une solution d'HBSS+ions/FBS 10% (8 mL/tube) afin de stopper le pouvoir chélatant de

<sup>1</sup> Durant toutes les phases de culture d'organoïdes, tous les tips et tubes doivent être coatés avec la solution HBSS/FBS 10%

l'EDTA. Centrifuger 4 minutes à 210 rcf, à 4°C et sans frein. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans le volume désiré de milieu de différenciation (10% FBS ; 500  $\mu$ L/puit) (**Annexe 1**). Disposer à l'aide de tips coupés, les organoïdes dans une plaque 24 puits Ultra Low Attachment (ULA) (Corning® réf : 3473) et mettre incuber à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub> pendant 24 heures.

Pour dépriver les organoïdes inversés (milieu différenciation 0% FBS) (**Annexe 1**), prélever les organoïdes inversés en suspension à l'aide de tips coupés et les mettre dans un falcon 15 mL. Pooler plusieurs puits ensemble (maximum 12 puits/falcon) et ajouter 6 mL de PBS à 37°C. Centrifuger durant 4 minutes, sans frein, à rt et à une vitesse de 210 rcf. Pendant ce temps, rincer les puits de culture avec 1 mL de PBS. Prélever ensuite le surnageant délicatement, en faisant attention à ne pas décrocher le culot. Resuspendre les organoïdes dans le milieu de déprivation avec des tips coupés. Homogénéiser la suspension d'organoïdes avant chaque dépôt (500  $\mu$ L/puits) et incuber à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub> durant 24 heures.

Pour l'étape de **stimulation**, les organoïdes sont rassemblés par conditions de stimulation (4 puits/condition, voir **figure 7** ci-dessous) dans un falcon 15 mL. Centrifuger à 200 rcf, sans frein, durant 4 minutes et à rt. Eliminer le surnageant. Rincer la plaque de culture au PBS. Resuspendre les organoïdes dans les volumes adéquats de milieu de stimulation (1% FBS) (**Annexe 1**) supplémenté avec l'inducteur de SRE. La tunicamycine (Sigma-Aldrich® réf : T7765) est redissoute dans un tampon Tris (VWR Chemicals® réf : 103156X), afin d'obtenir une concentration finale de 1 mg/mL (solution stock). Des dilutions intermédiaires sont réalisées afin de stimuler les organoïdes aux concentrations de : 1, 2, 4 et 6  $\mu$ g/mL. Le tampon Tris pH 11 (véhicule) est la condition contrôle non stimulée. Le TuBHq (Thermo Scientific™ réf : 150840010) est mis en solution dans l'éthanol absolu (VWR chemicals® réf : 20821.321), pour obtenir une solution stock de 62,5 mM. Des dilutions intermédiaires permettront de stimuler les organoïdes à 10, 20, 40, 60 et 80  $\mu$ M de concentration finale dans le milieu. Disposer à l'aide tips coupés, 500  $\mu$ L/puits/condition de milieu de stimulation et mettre incuber à 37°C C sous 5% CO<sub>2</sub> durant 12 heures (durée du SRE transitoire).

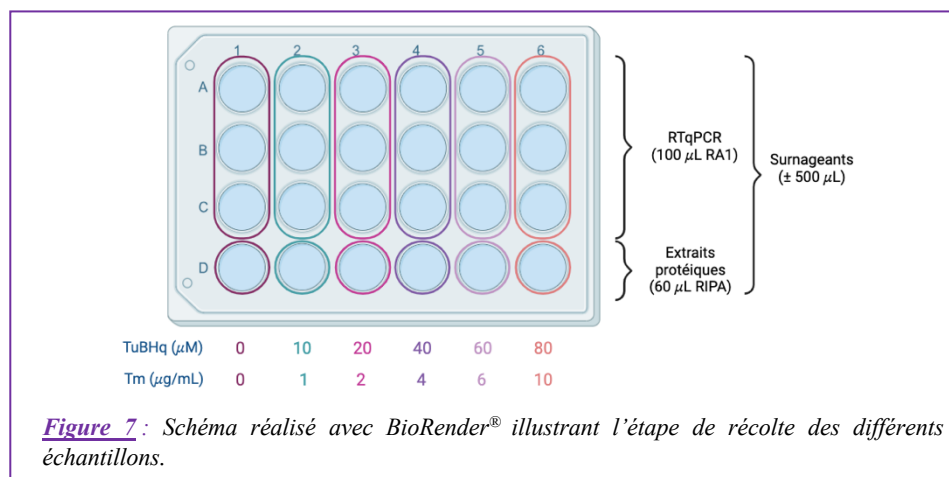
Pour changer le milieu de stimulation par le milieu de **recovery** (**Annexe 1**), préparer un falcon 15 mL par condition et récolter les puits de la même condition (4 puits/falcon) et ajouter 8 mL de PBS. Centrifuger à 210 rcf, sans frein, durant 4 minutes et à rt. Rincer deux fois les puits de culture au PBS. Eliminer le surnageant. Resuspendre les organoïdes dans le milieu de recovery (0% FBS). Disposer à l'aide tips coupés, 500  $\mu$ L/puits de milieu de recovery contenant les organoïdes et incuber à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub> 32 heures ou 8, 12 et 24 heures pour la réalisation du time course avec le TuBHq.

L'**extraction** est réalisée après l'étape de recovery. Pour ce faire, préparer un eppendorf ULA (Corning® réf : MCT-175-C) pour chaque puits contenant des organoïdes. Préparer également un eppendorf stérile non coaté pour chaque puits, afin de récolter les surnageants qui seront utilisés pour les tests fonctionnels sur CCD18-Co et pour les WB.

Prélever et disposer les organoïdes inversés dans l'eppendorf ULA, à l'aide de tips ULA coupés (Axygen Maximum Recovery™ réf :TF1000LRS). Centrifuger à 430 rcf, sans frein, 4 minutes, à rt. Récolter les

surnameants et disposer dans des eppendorf stériles. Resuspendre les culots dans 1 mL de PBS pour effectuer un rinçage et centrifuger de nouveau avec les mêmes paramètres.

Eliminer le surnageant et procéder comme suit : 100  $\mu\text{L}$ /puits de tampon RA1, pour récolter l'ARN ou 60  $\mu\text{L}$ /puits de tampon RIPA (Hepes 25 mM; NaCl 150 mM; Triton 0,5%; Glycérol 10% ; DTT 1 mM ; Sodium vanadate 1 mM ;  $\beta$ -glycérophosphate 25 mM ; Sodium fluorure 50 mM ; 1 pastille d'inhibiteur de protéase complet EDTA free) pour l'extraction protéique. Vortexer 5 secondes et centrifuger rapidement avant congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour les ARNm et  $-20^{\circ}\text{C}$  pour les extraits protéiques et les surnageants.



## 6. Analyses western blot

### 6.1 Dosage protéique

Le dosage protéique permet de déterminer la quantité en protéines totales par échantillon à charger sur gel. Le kit Pierce™ BCA Protein Assay Thermo Scientific (réf : 23227) a été utilisé en suivant le protocole du fabricant, adapté au format 96 puits. Décongeler sur glace les échantillons d'extraits protéiques préalablement suspendus dans le tampon RIPA et centrifuger durant 10 minutes, à 16 000 rcf, à  $4^{\circ}\text{C}$  et avec frein. Une courbe standard de bovine serum albumin (BSA) et le BCA working reagent ( $V_f = (X \text{ éch} + X \text{ standards}) \times (X \text{ réplicat}) \times (200 \mu\text{L})$ ) sont réalisés. Le BCA working reagent se prépare avec les solutions A et B (50:1 = solution A:B). Charger la plaque 96 puits avec 25  $\mu\text{L}$ /puits de standard (BSA en concentration connue) et avec les échantillons en duplicat. Ensuite ajouter 200  $\mu\text{L}$ /puits de BCA working reagent et mettre la plaque à agiter pendant 30 secondes. Incuber 30 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$ , puis mesurer l'absorbance à 560 nm au lecteur SpectraMax Plus (Molecular Devices®).

### 6.2 Western Blot

Les surnageants pré-conditionnés et les extraits protéiques collectés à la fin de la période de recovery sont analysés par western blot afin de mettre en évidence des protéines de SRE (BiP, ERP72), la protéine d'intérêt (AGR2, eAGR2) et une protéine ubiquitaire et témoin de lyse cellulaire (GAPDH)

utilisée pour la normalisation relative des signaux obtenus. Les extraits protéiques préalablement dosés, sont dilués et dénaturés dans du laemmli buffer 5X (Bleu de bromophénol 1,25 g/L ; SDS 100 g/L ; Tris 1M pH 6,8, 312 mM; Glycérol 2,5 mL ; eau déminéralisée ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 1,79M), vortexés et chauffés 5 minutes à 99°C, avant centrifugation et dépôt sur gels de polyacrylamide 12%, (1,5 mm d'épaisseur). La quantité de protéines chargée est de 10  $\mu$ g/puits. Décongeler les surnageants sur glace et centrifuger durant 10 minutes, à 16 000 rcf, à 4°C et avec frein. Prélever sous hotte de culture, le surnageant et le remettre dans un eppendorf stérile. De ce nouvel eppendorf, prélever 40  $\mu$ L de surnageant et le remettre dans un eppendorf classique et rajouter 10  $\mu$ L de laemmli buffer 5X afin d'avoir un volume final de 50  $\mu$ L, qui sera chargé sur gel. Chauffer 5 minutes à 99°C avant de charger les gels.

La migration des protéines se fait dans un premier temps à 10 mA/gel (stacking), puis à 20 mA/gel dans un tampon de migration TGS (solution stock : 25mM Tris ; 192mM Glycine ; 0,1% SDS) (BioRad<sup>®</sup> réf : 1610772) à diluer 10 fois. Le transfert se fait overnight à 40 mA sur membrane de PVDF (cut-off membrane 0,45  $\mu$ m) (Thermo Scientific<sup>TM</sup> réf : 88518), et dans un tampon de transfert (Tris 3,025 g/L ; Glycine 14,4 g/L ; eau déminéralisée ; méthanol 19,7%). La membrane est pré-activée dans du méthanol (VWR chemicals<sup>®</sup> réf : 20903.368), rincée à l'eau déminéralisée et équilibrée dans le tampon de transfert, avant d'être mise en contact avec le gel à transférer.

Le blocage de la membrane se fait avec du TBS-T (Tris 2,42 g/L ; NaCl 0,8 g/L ; Tween 20, 10 mL ; eau déminéralisée) + lait (Régilait<sup>®</sup> écrémé) 10% (3g/30 mL) pendant une heure à rt, sur une plaque agitante. Laver la membrane 5 minutes avec la solution TBS-T. Ensuite, incuber la membrane 2 heures à rt, avec l'anticorps (Ac) primaire dilué dans du TBS-T + lait 10% (ou overnight à 4°C sous agitation dans un falcon). Laver 3x5 minutes avec du TBS-T. Incuber la membrane 1 heure à rt, avec l'Ac secondaire dilué dans du TBS-T + lait 10%. Laver 3x10 minutes avec du TBS-T.

La révélation se fait par chimiluminescence grâce à l'Enhanced ChemiLuminescence (ECL) kit (Thermo Scientific<sup>TM</sup> réf : 32106), un mélange composé de luminol et de peroxyde d'hydrogène, qui est le substrat de la peroxydase de raifort (HRP), couplée à l'Ac secondaire. La chimiluminescence générée est captée sur un film d'autoradiographie (Fujifilm<sup>®</sup> SuperRX-N réf : 4741019289). Un bleu de Coomassie (Bio-rad<sup>®</sup> réf : 161-0406) été réalisé selon les prescriptions fournisseurs.

Les protéines et anticorps commerciaux utilisés sont les suivants :

Protéines ciblées	Anticorps utilisés	Fabricant	Référence	Espèce	Dilution	Diluant
<b>AGR2</b>	Anti-AGR2 mAb	Abnova	H00010551-K	Souris	1/2000	TBS-T + Lait 10%
<b>BiP</b>	BiP rabbit mAb	Cell Signaling	C50B12	Lapin	1/500	TBS-T + Lait 10%
<b>GAPDH</b>	GAPDH rabbit mAb	Cell signaling	D16H11	Lapin	1/5000	TBS-T + Lait 10%
<b>ERP72</b>	ERp 72 rabbit mAb	Cell Signaling	D70D12	Lapin	1/2000	TBS-T + Lait 10%

Anticorps secondaires :

Anticorps	Fabricant	Référence	Espèce	Dilution	Diluant
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Ab	Cell Signaling	7074S	Chèvre	1/1000	TBS-T + Lait 10%
Anti-mouse IgG, HRP-linked Ab	Cell Signaling	7076S	Cheval	1/1000	TBS-T + Lait 10%

**7. Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction (RTqPCR)**

Les échantillons récoltés sont placés dans du tampon RA1 du kit NucleoSpin<sup>®</sup> RNA XS (Macherey-Nagel<sup>®</sup> réf : 740902.250), permettant la lyse cellulaire via ses propriétés dénaturantes, ainsi que la stabilisation de l'ARN durant 4 heures à température ambiante. Les analyses sont réalisées sous forme de triplicats biologiques pour chaque condition.

**7.1 Extraction d'ARN**

L'extraction de l'ARN se fait grâce à l'utilisation du kit NucleoSpin<sup>®</sup> RNA XS (Macherey-Nagel<sup>®</sup> réf : 740902.250). Le protocole fabricant a été suivi. Le volume d'élution final est de 10  $\mu$ L. Les échantillons sont ensuite congelés à -80°C.

Réactifs du kit :

Réactif	Fonction
TCEP	Agent réducteur spécifique des liaisons disulfures
Carrier RNA (ARN poly A)	Lie l'ARN et facilite sa fixation à la colonne
rDNase	Digestion de l'ADN
Lysis Buffer RA1	Facilite la lyse cellulaire
Wash Buffer RA2	Inactivation de l'enzyme rDNase
Wash Buffer RA3 (concentrate)	Élimine les contaminants et améliore la pureté de l'ARN
Membrane Desalting Buffer (MDB)	Désalinisation
Reaction Buffer for rDNase	Tampon nécessaire pour l'utilisation de l'enzyme rDNase
RNase-free H <sub>2</sub> O	/
NucleoSpin <sup>®</sup> Filters (violet rings)	Filtre le lysat cellulaire
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA XS Columns (light blue rings – plus collection Tubes)	Fixe l'ARN
Collection Tubes (1,5 et 2 mL)	/

**7.2 Transcription inverse (RT)**

La transcription inverse est réalisée en utilisant le kit FastGene<sup>®</sup> Scriptase II cDNA synthesis Kit (NIPPON Genetics<sup>®</sup> réf : LS63). Le protocole fabricant a été suivi et les échantillons d'ARN ont été dosés avec le Nanodrop 1000 (ThermoFisher<sup>®</sup>) à la longueur d'onde de 260 nm, ce qui permet d'obtenir la concentration en ARN présente dans l'échantillon. Les ratios A260/A280 et A260/A230 ont également été vérifiés.

Réactifs du kit :

Réactif	Fonction
FastGene® Scriptase II	Synthèse de cDNA à partir d'ARN
5x FastGene® RT buffer	Permet à l'enzyme d'agir
DTT	Déstabilise les liaisons disulfures
dNTP Mixture	Nucléotides
Sterile water (RNase free)	/
RNase Inhibitor	Inhibiteur de ribonucléase
Oligo dT Primer	Se lie spécifiquement à la queue poly-A
Random hexamer	Amorce l'ARN simple brin

La RT est réalisée sur un ThermoFisher VIRITI® avec les programmes suivants :

- 50 minutes à 42°C (la gamme de températures d'activité de l'enzyme (FastGene® Scriptase II) va de 42 à 50°C)
- 15 minutes à 70°C (pour inactiver l'enzyme)

Après le cycle, les échantillons sont conservés à -20°C.

### **7.3 Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)**

La qPCR est réalisée en utilisant le kit FastGene® IC Green 2 x qPCR Universal Mix (Nippon Genetics® réf : LS4005). Le protocole commercial a été suivi. Les échantillons d'ADNc, sont dispensés à une concentration de 1,5625 ng/μL par réaction. Les séquences des amorces utilisées sont présentes en annexe. (**Annexe 2**)

Les plaques PCR 96 puits à fond blanc, sont chargées avec un volume final de 20 μL/puits (16 μL mix + 4 μL ADNc) et centrifugées quelques secondes à la vitesse de 600 ref. Les 40 cycles sont ensuite effectués sur le LightCycler®480 II (Roche). Un cycle comprend 3 étapes : dénaturation de l'ADN (95°C), hybridation des amorces (50-65°C) et élongation (72°C).

Chaque mélange réactionnel de PCR contient le FastGene® IC Green, un fluorophore intercalant qui se lie uniquement à l'ADN double brin, en émettant de la fluorescence, mesurée après chaque cycle. Cette dernière est proportionnelle à la quantité d'amplicons générés. Afin de pouvoir comparer les conditions de stimulation entre elles, un gène de normalisation est utilisé (ARN18s). La quantification relative est réalisée par la méthode des ΔΔCT. Les graphiques sont réalisés à l'aide du logiciel Graph Pad Prism® version 10.2.3.

#### Préparations du mélange réactionnel des mix PCR :

Mix PCR	Concentration finale (volume total par puits = 20 μL)	1 puits
2X FastGene IC Green	Pas précisé	10 μL
H <sub>2</sub> O	/	5,2 μL
Mix Primer F + R	400 nM	0,8 μL



## 8. Test fonctionnel de TFM sur les fibroblastes CCD18-Co

Le test fonctionnel est réalisé en exposant les fibroblastes CCD18-Co ayant atteint 40-50% de confluence, au milieu de culture pré-conditionné, collecté à partir des organoïdes inversés stimulés ou non (contrôle négatif) lors de la phase de recovery. Ou à du milieu de culture frais supplémenté en TGF- $\beta$  (Biotechne<sup>®</sup> réf : 240-B-010) à 1 ng/mL (contrôle positif). La stimulation des CCD18-Co est réalisée 48 heures, après quoi les CCD18-Co sont traités comme décrit ci-dessous, afin de mettre en évidence la TFM.

### 8.1 Détection d' $\alpha$ -SMA par immunofluorescence et imagerie confocale

Les cellules sont cultivées sur des lames IBIDI<sup>®</sup> 8 puits (réf : 80804), à raison d'une condition par puits. Après la stimulation (48 heures) des CCD18-Co (ATCC CRL-1459<sup>TM</sup>) par les surnageants pré-conditionnés ou non, collectés lors de la phase de recovery, ou le milieu de culture frais supplémenté de TGF- $\beta$ . Le milieu de culture est retiré et les cellules lavées 3x5 minutes, au PBS à rt, sous agitation. Les cellules sont ensuite fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4%/PBS (VWR chemicals<sup>®</sup> réf : 11699404) pendant 10 minutes, sous hotte, ensuite lavées au PBS 3x5 minutes, à rt et sous agitation. La perméabilisation des cellules et le blocage sont ensuite réalisés avec un mélange BSA 1%, FBS 5%, Triton 0,1% final dans du PBS pendant 30 minutes à rt. Les anticorps primaires sont dilués dans la solution de blocage (200  $\mu$ L/puits) et incubés overnight à 4°C. Ensuite, la solution contenant l'anticorps primaire est éliminée et le puits rincé au PBS, Tween 20 à 0,2% final, 3x3 minutes, à rt et sous agitation. L'anticorps secondaire dilué (1/500) est ensuite utilisé à 200  $\mu$ L/puits et incubé dans le noir, 1 heure, à rt. La solution d'anticorps secondaire est éliminée et le puits est lavé 3x10 minutes dans du Tween 20 à 0,2% final dans du PBS, dans le noir, à rt.

La lecture des IBIDI<sup>®</sup> est réalisée au microscope confocal Leica Stellaris<sup>®</sup>. Le fluorochrome Alexa Fluor<sup>®</sup> est excité à 495nm et la lecture est effectuée à 519 nm. Le traitement numérique des images a été réalisé par le logiciel ImageJ<sup>®</sup>.

#### Anticorps utilisés :

Type	Anticorps	Fabricant	Référence	Espèce	Dilution	Diluant
Primaire	Anti-alpha smooth muscle Actin	abcam	ab124964	Lapin	1/1000	BSA 1%, FBS 5%, Triton 0,1%, PBS
Secondaire	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	abcam	ab150077	Chèvre	1/500	BSA 1%, FBS 5%, Triton 0,1%, PBS

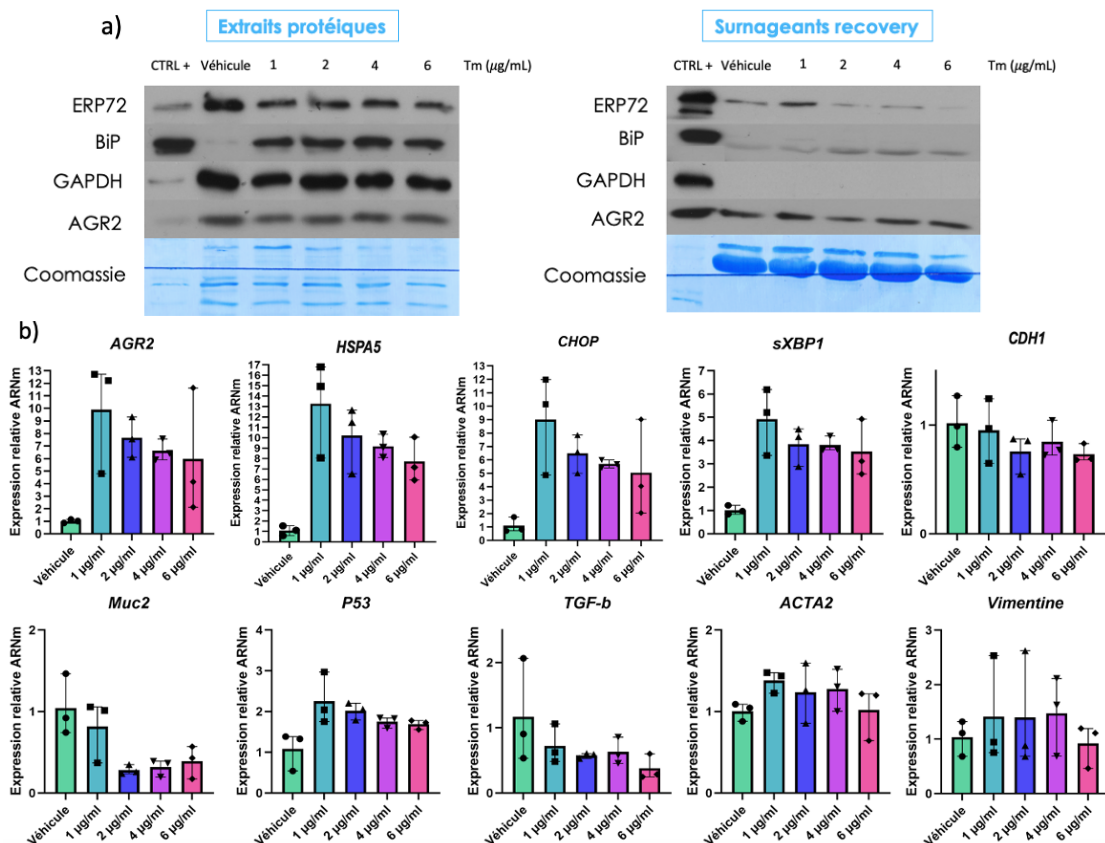
# Résultats

## 9. Caractérisation des marqueurs de SRE et de TEM exprimés en réponse au SRE et de la protéine AGR2 présente dans les surnageants de culture produits par les organoïdes inversés induits au SRE

La variation de l'expression des marqueurs de SRE et l'expression des marqueurs de TEM a été évaluée par WB et/ou RTqPCR. Les différentes expériences décrites ci-dessous ont toutes été réalisées sur des organoïdes apical-out à passage 3, provenant de sujets sains (patients 1 et 2) ou de patients atteints de RCUH (patients 3 et 4). Ces derniers ont été stimulés (ou non, véhicule) avec différentes concentrations de Tm ou TuBHQ. Les gammes de concentrations testées ont été tirées de la littérature.<sup>(53)</sup> Une dose-réponse a été réalisée afin de choisir la dose optimale qui sera par la suite utilisée dans le projet. A mon arrivée au laboratoire, la durée du stress transitoire et de la phase de recovery avaient déjà été mise au point dans le cas du SRE induit avec la Tm et partiellement dans le cas du TuBHQ.

### 9.1 Sujets sains

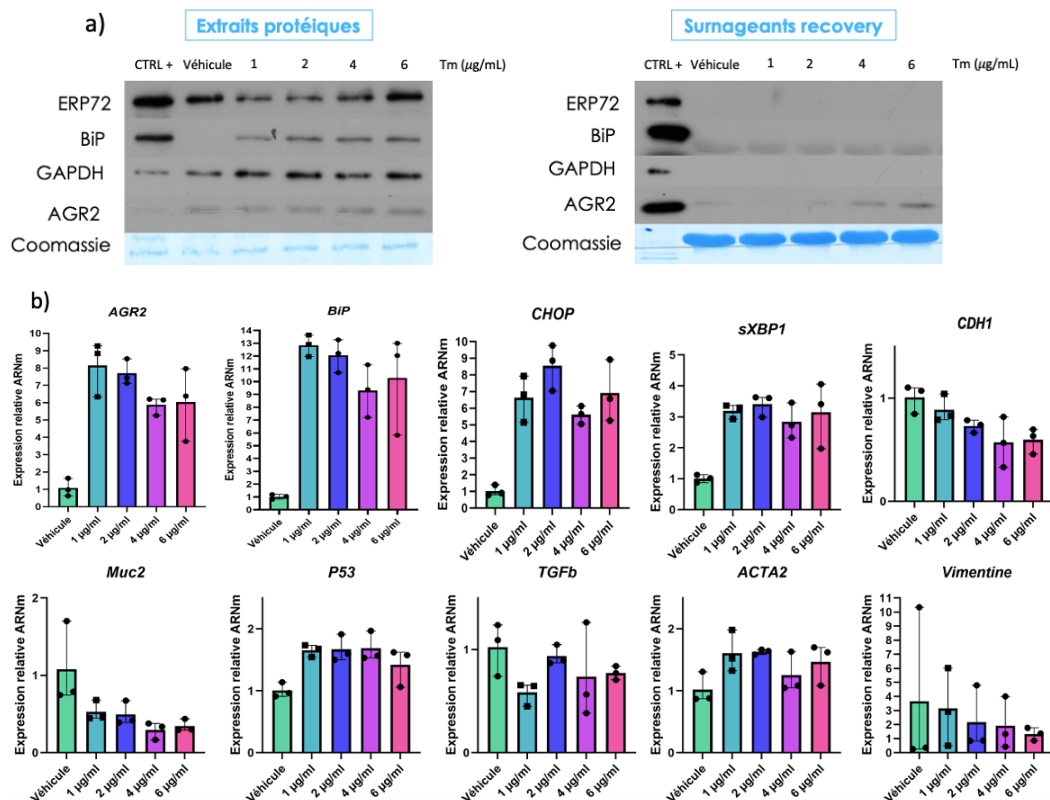
#### 9.1.1 SRE induit par la Tm – dose-réponse (organoïdes - patient 1)



**Figure 8 : Dose-réponse Tm appliquée sur organoïdes inversés dérivant du sujet sain 1** a) Analyses WB : Mise en évidence de ERP72, BiP, GAPDH et AGR2 dans les extraits protéiques et les surnageants de recovery après 32h et SRE transitoire obtenu à différentes concentrations de Tm/Tris pendant 12 heures. CTRL+ : Le contrôle positif de charge, correspond à un extrait cellulaire HT29 stimulé à la Tm à 10 µg/puits (10 µg protéines totales/dépôt). Le véhicule correspond à du Tris. Le bleu de Coomassie est présenté comme le contrôle de normalisation pour les surnageants de culture. La quantité de protéines totales chargée par puits pour les extraits est de 10 µg et un volume constant de 50 µL de surnageant a été utilisé. b) Analyses RTqPCR : Expression relative des transcrits pour AGR2, HSPA5, CHOP, sXBP1, CDH1, Muc2, P53, TGF-β, ACTA2 et vimentine, avec ou sans stimulation par différentes concentrations de Tm/Tris. Le véhicule correspond à la condition contrôle Tris. La barre représente les coefficients de variations obtenus sur des triplicats de culture.

Les extraits protéiques ne montrent pas de différence de signal des protéines de SRE aux différentes concentrations testées, sauf pour BiP lorsqu'on compare les conditions Tm et véhicule. Les surnageants de culture montrent un signal WB pour BiP et ERP72 dans toutes les conditions. eAGR2 est présent dans les surnageants, dans toutes les conditions, avec un signal légèrement plus important dans les conditions stimulées à 1, 4 et 6 µg/mL Tm par rapport à la condition véhicule. Les résultats RTqPCR montrent une augmentation de l'expression des protéines de SRE (*HSPA5*, *CHOP*, *sXBP1*), mais également de *AGR2* lors de l'induction à la Tm et ce à toutes les concentrations par rapport à la condition véhicule. Une diminution de *CDH1*, *Muc2* et de *TGF-β* est observée. *P53* est faiblement augmenté lors de la stimulation Tm. La *vimentine* produit un signal ininterprétable en raison des coefficients de variation obtenus trop élevés. Sur base des résultats de la RTqPCR et des marqueurs de SRE en WB, la stimulation Tm semble avoir partiellement fonctionnée. Mais le niveau de base d'eAGR2 est déjà important sans stimulation du SRE et les surnageants montrent un relargage de BiP et ERP72, sans détecter de signal pour la GAPDH. Concernant les surnageants, le bleu de coomassie confirme bien que le même volume d'échantillon a été chargé.

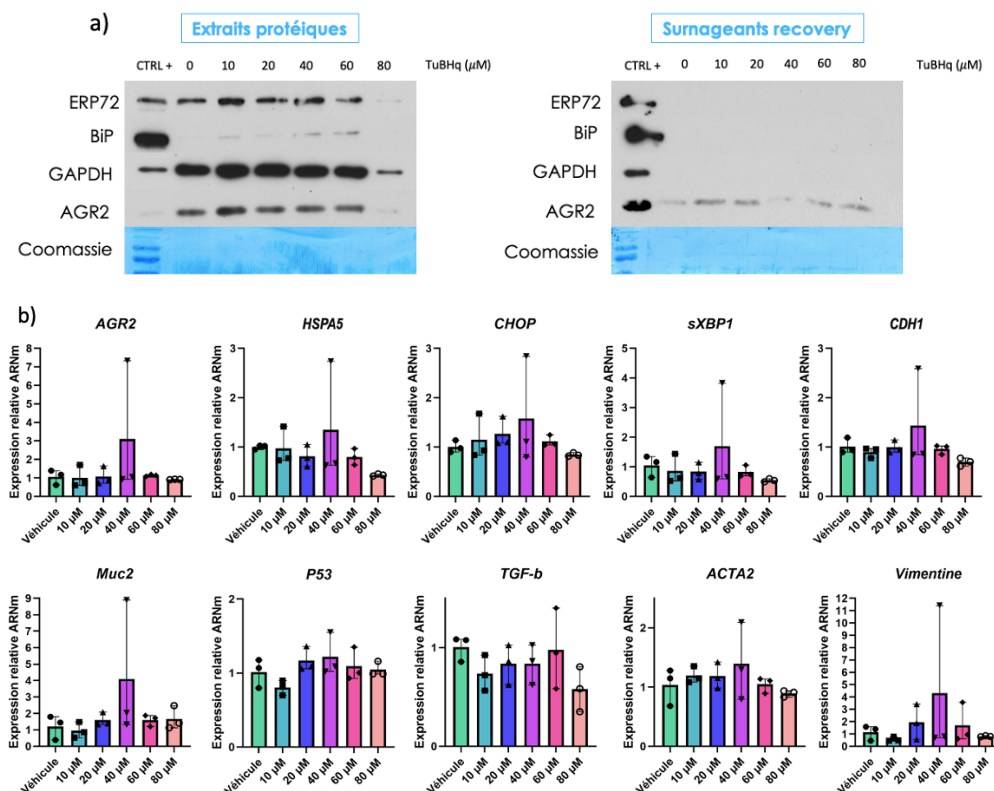
### 9.1.2 SRE induit par la Tm – dose-réponse (organoïdes - patient 2)



**Figure 9 : Dose-réponse Tm appliquée sur organoïdes inversés dérivant du sujet sain 2** a) Analyses WB : Mise en évidence de ERP72, BiP, GAPDH et AGR2 dans les extraits protéiques et les surnageants de recovery après 32h et SRE transitoire obtenue à différentes concentrations de Tm/Tris pendant 12 heures. CTRL+ : Le contrôle positif de charge, correspond à un extrait cellulaire HT29 stimulé à la Tm à 10 µg/puits (10 µg protéines totales/dépôt). Le véhicule correspond à du Tris. Le bleu de Coomassie est présenté comme le contrôle de normalisation pour les surnageants de culture. La quantité de protéines totales chargée par puits pour les extraits est de 10 µg et un volume constant de 50 µL de surnageant a été utilisé. b) Analyses RTqPCR : Expression relative des transcrits pour AGR2, HSPA5, CHOP, sXBP1, CDH1, Muc2, P53, TGF-β, ACTA2 et vimentine, avec ou sans stimulation par différentes concentrations de Tm/Tris. Le véhicule correspond à la condition contrôle Tris. La barre représente les coefficients de variations obtenus sur des triplicats de culture.

Les extraits protéiques montrent une diminution du signal pour ERP72 aux conditions stimulées par rapport au véhicule, sauf à la concentration de 6  $\mu\text{g/mL}$ . Le signal de BiP est augmenté par rapport au véhicule et plus fortement à partir de 2  $\mu\text{g/mL}$ . Le signal d'AGR2 montre un faible effet dose-réponse. Dans les surnageants de culture, eAGR2 est présent à partir de 2  $\mu\text{g/mL}$  de Tm et montre un effet dose-réponse jusqu'à 6  $\mu\text{g/mL}$ . Les résultats RTqPCR montrent une augmentation de l'expression des protéines de SRE (*HSPA5*, *CHOP*, *sXBP1*), mais également de *AGR2* lors de l'induction à la Tm et ce à toutes les concentrations par rapport à la condition véhicule. Ils montrent également une diminution de *CDH1*, *Muc2* et de *TGF- $\beta$* . *P53* et *ACTA2* sont faiblement augmentés par rapport au véhicule. Les effets de cette induction sur les différents marqueurs du SRE convergent entre eux et l'augmentation de l'expression de BiP et AGR2 sont plus importante que pour les organoïdes dérivants du patient 1. Le relargage de AGR2 dans le surnageant de culture est constaté dès 2  $\mu\text{g/mL}$  sans détecter de signal pour ERP72, BiP, ni la GAPDH, indiquant l'absence de signes de souffrance cellulaire dans ces conditions (ainsi qu'à de plus fortes expositions de film WB). Concernant les surnageants, le bleu de coomassie confirme bien que le même volume d'échantillon a été chargé.

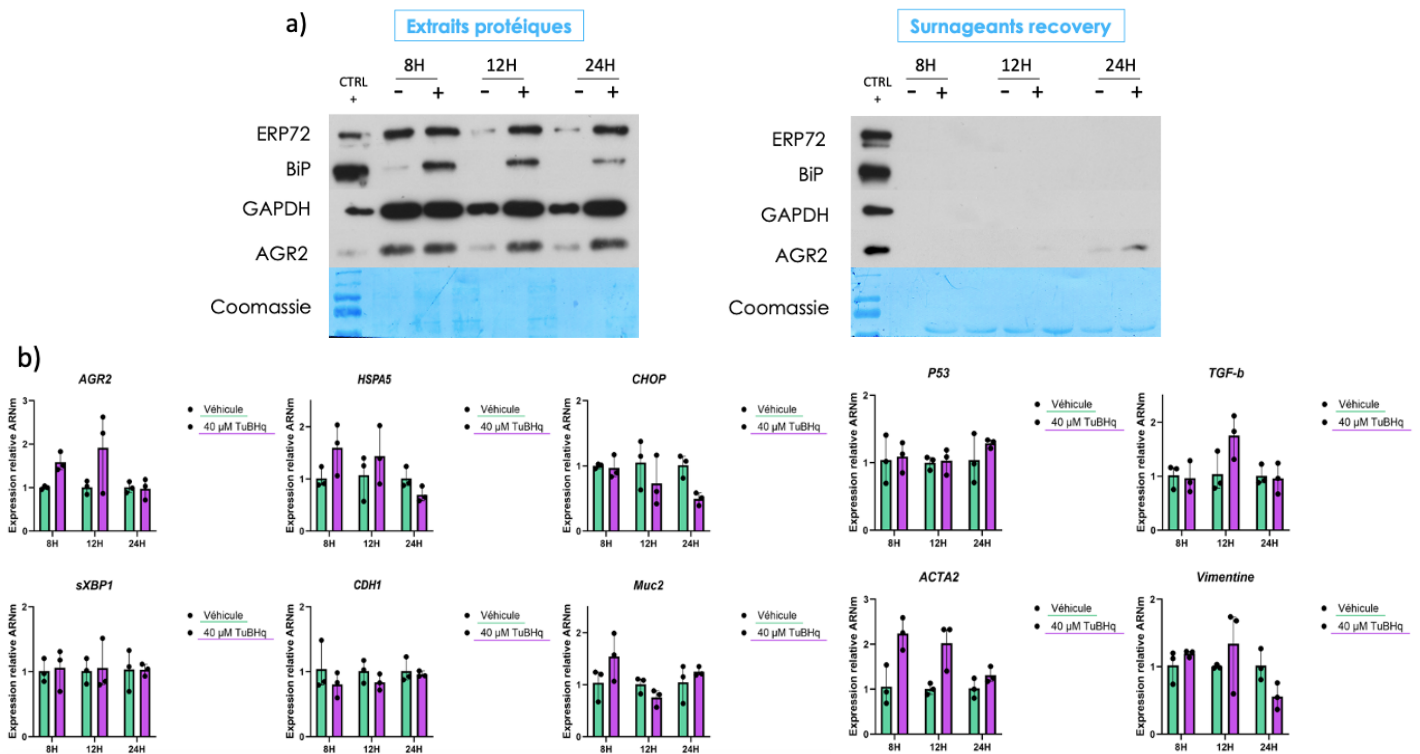
### 9.1.3 SRE induit par le TuBHq - dose-réponse patient (organoïdes – patient 2)



**Figure 10 :** Dose-réponse TuBHq appliquée sur organoïdes inversés dérivant d'un sujet sain 2 a) Analyses WB : Mise en évidence de ERP72, BiP, GAPDH et AGR2 dans les extraits protéiques et les surnageants de recovery après 32h et SRE transitoire obtenue à différentes concentrations de TuBHq pendant 12 heures. CTRL+ : Le contrôle positif de charge correspond à un extrait cellulaire HT29 stimulé à la Tm à 10  $\mu\text{g/puits}$  (10  $\mu\text{g}$  protéines totales/dépôt). Le véhicule correspond à de l'éthanol absolu (EtOH 100%). Le bleu de Coomassie est présenté comme le contrôle de normalisation pour les surnageants de culture. La quantité de protéines totales chargée par puits pour les extraits est de 10  $\mu\text{g}$  et un volume constant de 50  $\mu\text{L}$  de surnageant a été utilisé. b) Analyses RTqPCR : Expression relative des transcrits pour AGR2, BiP, CHOP, sXBP1, CDH1, Muc2, P53, TGF- $\beta$ , ACTA2 et vimentine, avec ou sans stimulation par différentes concentrations de TuBHq. Le véhicule correspond à la condition contrôle EtOH 100%. La barre représente les coefficients de variations obtenus sur des triplicats de culture.

Les extraits protéiques montrent une augmentation du signal de ERP2 et BiP par rapport au véhicule, sauf à la concentration de 80  $\mu$ M. AGR2 montre un signal à toutes les concentrations sauf à 80  $\mu$ M et ne montre pas d'effet dose-réponse. Les surnageants de culture montrent un signal faible pour eAGR2, à toutes les concentrations. La RTqPCR ne montre pas d'augmentation d'expression des protéines de SRE (*HSPA5*, *CHOP*, *sXBP1*), ni des autres gènes testés dont *AGR2*, par rapport au véhicule. La vimentine ne donne pas non plus de résultats interprétables. Ces résultats montrent une réponse partielle et très faible au SRE transitoire. Les surnageants montrent un faible relargage d'eAGR2, sans autres protéines du SRE ou de la GAPDH détectables dans les conditions testées. La coloration au bleu de coomassie des membrane strippées montre une faible quantité en protéines totales chargée sur gel par rapport aux autres expériences sur les surnageants des patients 1 et 2 stimulés à la Tm.

### 9.1.4 SRE induit par le TuBHq – time course (organoïdes - patient 2)



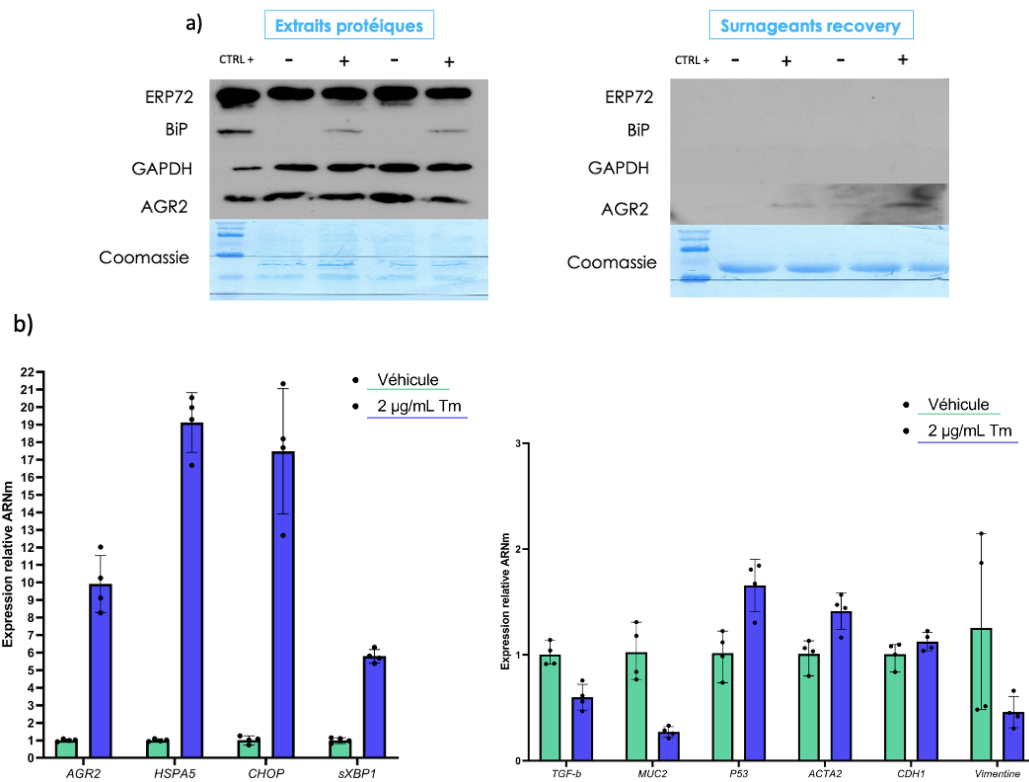
**Figure 11 :** Time course TuBHq appliqué sur organoïdes inversés dérivant du sujet sain 2 a) Analyses WB : Mise en évidence de ERP72, BiP, GAPDH et AGR2 dans les extraits protéiques et les surnageants de recovery après 8h, 12h et 24h et SRE transitoire obtenu à la concentration de 40  $\mu$ M de TuBHq (+) ou véhicule (-) pendant 12 heures. CTRL+ : Le contrôle positif de charge correspond à un extrait cellulaire HT29 stimulé à la Tm à 10  $\mu$ g/puits (10  $\mu$ g protéines totales/dépôt). Le véhicule correspond à de l'éthanol absolu (EtOH 100%). Le bleu de Coomassie est présenté comme le contrôle de normalisation pour les surnageants de culture. La quantité de protéines totales chargée par puits pour les extraits est de 10  $\mu$ g et un volume constant de 50  $\mu$ L de surnageant a été utilisé. b) Analyses RTqPCR : Expression relative des transcrits pour *AGR2*, *HSPA5*, *CHOP*, *sXBP1*, *CDH1*, *Muc2*, *P53*, *TGF-β*, *ACTA2* et vimentine, avec et sans stimulation par 40  $\mu$ M de TuBHq. Le véhicule correspond à la condition contrôle EtOH 100%. La barre représente les coefficients de variations obtenus sur des triplicats de culture.

Les différents temps de recovery utilisés ont été choisis suite à d'autres tests antérieurs à mon arrivée au laboratoire. Suite aux résultats de la dose-réponse TuBHq du patient 2, nous nous sommes interrogés sur l'adéquation de la fenêtre de réponse, soit la durée de la phase de recovery sélectionnée pour cet

inducteur. Ainsi, nous avons testé 3 durées (8h, 12h, 24h) pour celle-ci avec une dose intermédiaire de 40µM/mL TuBHq. Les extraits protéiques montrent une augmentation des signaux pour ERP72, BiP et AGR2 aux conditions stimulées (+) par rapport au véhicule (-) sauf à 8 heures, où il n’y a pas de différence entre les deux conditions pour ERP72 et AGR2. Les surnageants de culture ne montrent qu’un léger signal pour AGR2 pour la condition stimulée (+) seulement à partir de 12 heures de recovery. Le signal est plus élevé à 24 heures pour la condition stimulée (+) par rapport au véhicule. Les résultats RTqPCR ne montrent pas de différences d’expression des différents gènes testés entre les conditions stimulées et le véhicule, quel que soit la durée de la phase de recovery. *ACTA2* montre une légère augmentation d’expression aux conditions stimulées par rapport au véhicule. Seuls les marqueurs de SRE détectés par WB, montrent que la stimulation a fonctionnée avec une meilleure réponse à 24 heures de recovery. La discordance entre les résultats des analyses RTqPCR et WB est observée pour chaque test réalisé avec cet inducteur de SRE.

## 9.2 Patient RCUH

### 9.2.1 SRE induit par la Tm - stimulation 2 µg/mL Tm (organoïdes - patient 3)

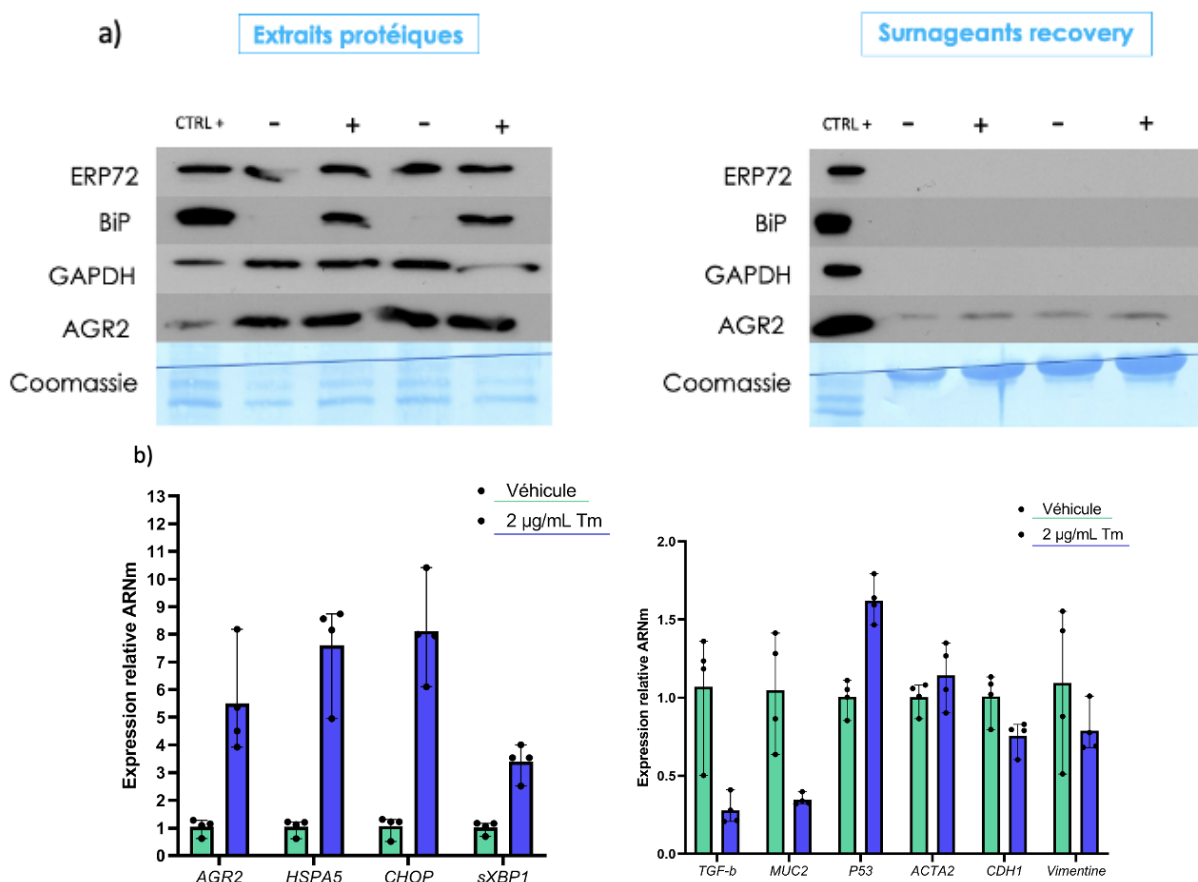


**Figure 12 :** Stimulation 2 µg/mL Tm appliquée sur organoïdes inversés dérivant du patient RCUH 3 a) Analyses WB : Mise en évidence de ERP72, BiP, GAPDH et AGR2 dans les extraits protéiques et les surnageants de recovery après 32h, et SRE transitoire obtenue à la concentration de 2 µg/mL de Tm/Tris (+) ou véhicule (-) pendant 12 heures. Le contrôle positif de charge correspond à un extrait cellulaire HT29 stimulé à la Tm à 10 µg/puits (10 µg protéines totales/dépôt). Le véhicule correspond à du Tris. Deux dépôts ont été réalisés. Le bleu de Coomassie est présenté comme le contrôle de normalisation pour les surnageants de culture. La quantité de protéines totales chargée par puits pour les extraits est de 10 µg et un volume constant de 50 µL de surnageant a été utilisé. b) Analyses RTqPCR : Expression relative des transcrits AGR2, HSPA5, CHOP, sXBP1, TGF-β, Muc2, P53, ACTA2, CDH1 et vimentine, avec ou sans stimulation par 2 µg/mL de Tm/Tris. Le véhicule correspond à la condition contrôle Tris. La barre représente les coefficients de variations obtenus sur des quadruplicats de culture.

Etant donné les résultats positifs acquis sur les organoïdes dérivant du sujet sain 2, nous avons opté pour une dose de 2µg/mL Tm pour la suite des tests sur patients RCUH.

Les extraits protéiques ne montrent pas de différence de signal pour ERP72 et AGR2, entre le véhicule (-) et la condition stimulée (+). Par contre le signal de BiP est augmenté lors de l'induction d'un SRE. Les surnageants de culture montrent un faible signal de eAGR2 uniquement sous stimulation Tm. La RTqPCR montre une augmentation de l'expression des protéines de SRE (*HSPA5*, *CHOP*, *sXBP1*), de *AGR2* et plus faiblement de *ACTA2* et *P53*. L'expression de *TGF-β* et *Muc2* semble diminuer par rapport à la condition contrôle (véhicule). Certains indicateurs montrent un effet positif que la stimulation a fonctionnée. Le niveau de base d'AGR2 est déjà important sans stimulation du SRE.

### 9.2.2 SRE induit par la Tm - stimulation 2 µg/mL Tm (organoïdes - patient 4)



**Figure 13 :** Stimulation 2 µg/mL Tm appliquée sur organoïdes inversés dérivant du patient RCUH 4 a) Analyses WB : Mise en évidence de ERP72, BiP, GAPDH et AGR2 dans les extraits protéiques et les surnageants de recovery après 32h, et SRE transitoire obtenu à la concentration de 2 µg/mL de Tm/Tris (+) ou véhicule (-) pendant 12 heures. Le contrôle positif de charge correspond à un extrait cellulaire HT29 stimulé à la Tm à 10 µg/puits (10 µg protéines totales/dépôt). Le véhicule correspond à du Tris. Deux dépôts ont été réalisés. Le bleu de Coomassie est présenté comme le contrôle de normalisation pour les surnageants de culture. La quantité de protéines totales chargée par puits pour les extraits est de 10 µg et un volume constant de 50 µL de surnageant a été utilisé. b) Analyses RTqPCR : Expression relative des transcrits AGR2, HSPA5, CHOP, sXBP1, TGF-β, Muc2, P53, ACTA2, CDH1 et vimentine, avec ou sans stimulation par 2 µg/mL de Tm/Tris. Le véhicule correspond à la condition contrôle Tris. La barre représente les coefficients de variations obtenus sur des quadruplicats de culture.



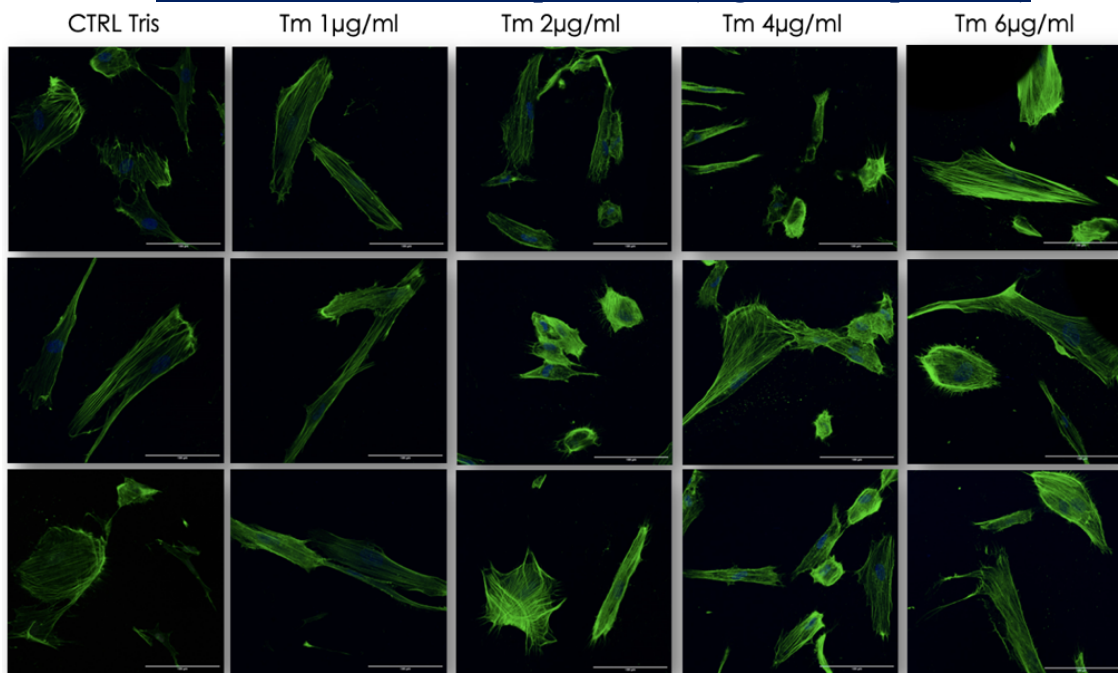
Les extraits protéiques montrent une légère augmentation du signal de ERP72 et d'AGR2 en condition stimulée (+) par rapport à la condition contrôle (-), alors que BiP augmente fortement. Les surnageants de culture montrent une faible augmentation du signal d'eAGR2 dans la condition Tm par rapport au véhicule. La RTqPCR montre une augmentation de l'expression des protéines de SRE (*HSPA5*, *CHOP*, *sXBPI*), de *AGR2* et de *P53*. L'expression de *TGF-β*, *Muc2*, *CDH1* semble diminuer par rapport à la condition contrôle (véhicule).

Les expériences menées sur des organoïdes dérivant de deux patients RCUH convergent et révèlent que la réponse au SRE transitoire appliquée à 2µg/mL Tm durant 12 heures et captée après 32h de recovery, produit une majoration du signal de quasi toutes les protéines du SRE, ainsi que du signal eAGR2 dans le sécrétome, sans détection notable d'autres protéines purement cytoplasmiques.

## **10. Mise en évidence du caractère pro-fibrosant des organoïdes traités au SRE et de leur effet paracrine sur CCD18-Co**

Un test fonctionnel a été réalisé sur des fibroblastes CCD18-Co afin de mettre en évidence le rôle potentiel du SRE au niveau de l'épithélium et de ses effets paracrines sur la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Pour évaluer cet impact, une immunofluorescence a été réalisée dans le but d'évaluer l'expression du marqueur  $\alpha$ -SMA, mais également d'un changement morphologique des cellules. Ce changement consiste en une réduction du volume cellulaire et une modification de morphologie sous stimulation avec des surnageants de culture pré-conditionnés, obtenus après stimulation transitoire au SRE sur le modèle d'organoïdes.

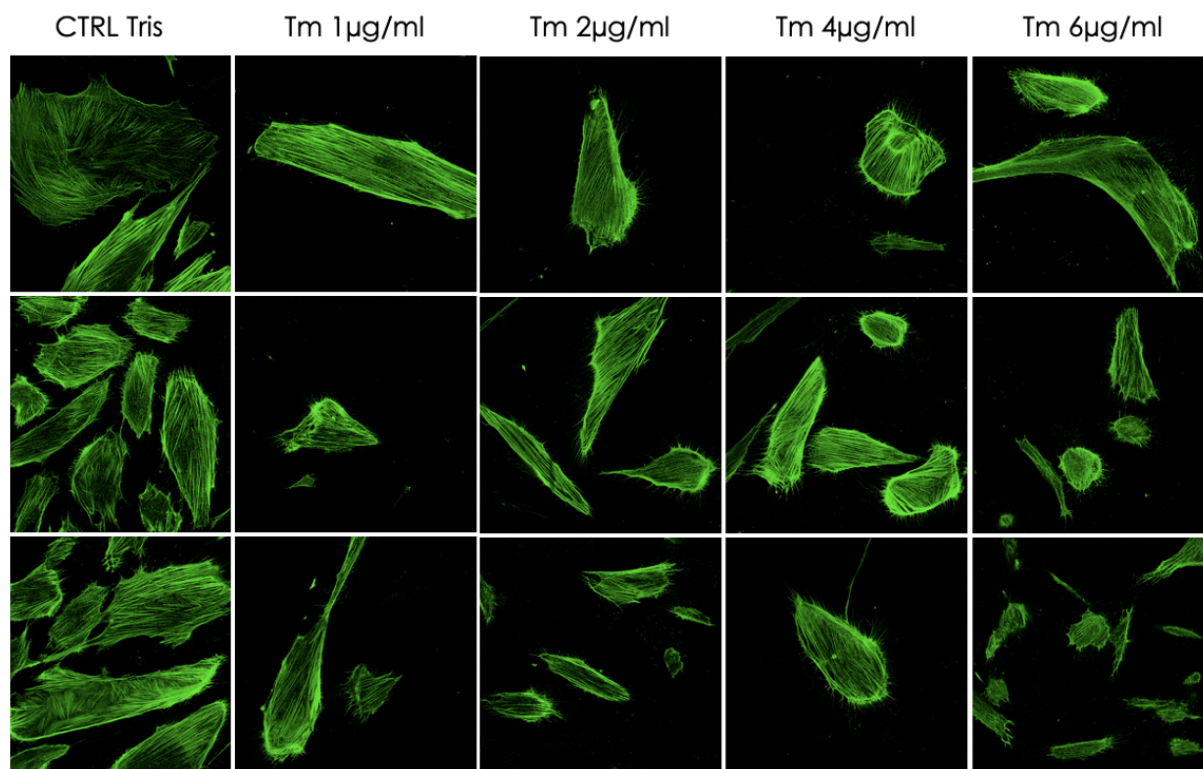
### **10.1 Stimulation Tm – dose-réponse Tm (organoïdes - patient 1)**



**Figure 14 :** Image représentant le signal d' $\alpha$ -SMA mis en évidence par IF et imagerie confocale. Les fibroblastes CCD18-Co sont traités 48 heures avec les surnageants de recovery pré-conditionnés obtenus après un SRE transitoire induit à différentes concentrations de Tm/Tris. Grossissement 40X.

Les résultats montrent un effet dose-réponse, avec une augmentation claire de la fluorescence dès la dose de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Tm. Le changement morphologique des cellules, avec l'adoption d'une conformation plus arrondie de ces dernières, ainsi que l'apparition de projections cytoplasmiques sont également visibles et plus fréquents en présence de Tm. Les contrôles positifs et négatifs pour le TGF- $\beta$  se trouvent en annexe. (Annexe 3.a)

### 10.2 Stimulation Tm – dose-réponse Tm (organoïdes - patient 2)



**Figure 15 :** Image représentant le signal d' $\alpha$ -SMA mis en évidence par IF et imagerie confocale. Les fibroblastes CCD18-Co sont traités 48 heures avec les sunageants de recovery pré-conditionnés obtenus après un SRE transitoire induit à différentes concentrations de Tm/Tri. Grossissement 40X.

Ces résultats ne montrent pas d'effet fonctionnel concluant, car le niveau de base d' $\alpha$ -SMA détectable dans la condition contrôle non stimulée (CTRL Tris) est déjà élevé. Aucune différence de fluorescence entre les différentes conditions de stimulation n'est observée. Néanmoins, un changement morphologique des cellules est constaté, s'objectivant par une diminution du volume cellulaire ainsi que par l'apparition de projections cytoplasmiques. Les contrôles positifs et négatifs pour le TGF- $\beta$  se trouvent en annexe. (Annexe 3.b)

# Discussion

L'objectif de ce travail était de développer un modèle d'organoïdes apical-out pro-fibrosant à partir de biopsies intestinales de sujets sains et de patients atteints de RCUH. Ce modèle devant servir à étudier le rôle de l'épithélium dans l'initiation et la progression de la fibrose intestinale dans un contexte de rectocolite ulcéro-hémorragique. Pour ce faire, nous avons traité des organoïdes inversés par différents agents inducteurs de SRE et contrôlé l'expression des protéines de SRE, de la TEM, une protéine liée à l'apoptose (P53) et la cytokine pro-fibrosante TGF- $\beta$  par WB et/ou RTqPCR.

Une étude antérieure du laboratoire a mis évidence sur des tissus issus de patients, une association entre la fibrose intestinale et l'augmentation dans l'épithélium analysé proche des zones fibrosées, de certaines PDI dont AGR2. Ce même travail a démontré une augmentation de l'expression de plusieurs PDI, dont AGR2 lors de l'induction d'un SRE transitoire sur des cellules HT29 et un effet pro-fibrosant obtenu sur le modèle de fibrose utilisé au laboratoire (TFM).<sup>(53)</sup> Ce test fonctionnel a également été réalisé dans ce travail de mémoire, dans le but d'objectiver une TFM sur des fibroblastes CCD18-Co, en évaluant l'augmentation d'expression du marqueur  $\alpha$ -SMA par immunofluorescence suite au contact avec le sécrétome des organoïdes générés, avec et sans stimulation au SRE. Ainsi, notre but dans ce projet est d'adapter les conditions utilisées sur les cellules HT29, aux organoïdes inversés dérivant de sujets sains et de patients atteints de RCUH. Par rapport au travail de Vieujean *et al.*, nous avons testé en plus de la Tm, le TuBHq comme agent capable d'induire un SRE transitoire. Les concentrations de TuBHq utilisées, ont été tirées de la littérature. Étant donné le peu de références sur cette molécule et l'utilisation de plusieurs concentrations dans les différentes études, nous avons choisi une fourchette de concentrations s'étalant de 10 à 80  $\mu$ M.

Les résultats obtenus par WB montrent de manière générale que la majorité des protéines produites en réponse à un SRE, sont exprimées et augmentées lors de l'induction par les deux inducteurs (Tm et TuBHq). Ceci est clairement visible pour la Tm sur les organoïdes dérivant de cellules souches intestinales de sujets sains et de patients atteints de RCUH. Les extraits protéiques des WB montrent dans tous les cas une augmentation de l'expression de la protéine BiP lorsque les organoïdes sont stimulés par la Tm ou le TuBHq par rapport au véhicule. Par contre, concernant les protéines ERP72 et AGR2, seuls les résultats utilisant le TuBHq, montrent une augmentation de leur expression aux conditions stimulées par rapport au véhicule. Les autres résultats ne montrent pas de différence entre ces deux conditions. La présence de ces protéines à l'état basal suggère une éventuelle souffrance des organoïdes, générée par les différentes manipulations.

Dans les surnageants de culture ou sécrétome, il n'a jamais été mis en évidence ERP72, BiP ou GAPDH, qui sont des protéines strictement intracellulaires. Cela semble indiquer que durant la phase de recovery, aucune lyse cellulaire n'est détectable dans les conditions utilisées et donc que la protéine AGR2 retrouvée dans ces surnageants de culture serait la forme sécrétée par les organoïdes et non pas

issue du pool d'AGR2 intra-cytoplasmique relarguée dans le milieu suite à de la mort cellulaire. Cependant, certains résultats montrent un relargage d'AGR2 (eAGR2) dans le milieu de culture dans la condition contrôle. Ceci est attendu car AGR2 est exprimée dans les cellules à l'état basal et dans ces organoïdes inversés, elle est déversée par les cellules caliciformes dans le surnageant de culture, tout comme Muc2. Le résultat de la dose-réponse par la Tm sur le sujet sain 1 (Figure 8) montre un faible signal pour ERP72 et BiP en plus de celui d'AGR2 dans les surnageants de culture aux conditions stimulées. Par contre il n'y a aucun signal pour GAPDH qui est la protéine de normalisation et est utilisée ici comme indicateur de lyse cellulaire. Or ERP72 et BiP ne sont pas décrites dans la littérature comme détectée sous une forme extracellulaire, ce qui est une observation unique et nécessite confirmation.

Les résultats de RTqPCR montrent également l'augmentation de l'expression de certaines protéines de SRE (*HSPA5*, *CHOP*, *sXBP1*) et d'AGR2, lors de la stimulation par la Tm. Les résultats concernant le TuBHq, ne montrent pas de différence d'expression de ces protéines entre les conditions stimulées et le véhicule, indiquant que la réponse générée par un stress transitoire est plus efficace avec la Tm qu'avec le TuBHq dans les conditions testées.

L'expression du *TGF-β* quant à elle diminue par rapport au véhicule lors de la stimulation par la Tm, ce qui suggère que la TFM observée dans le test fonctionnel ne serait pas due à l'augmentation et la libération dans le milieu de culture de cette cytokine pro-fibrosante. Ceci est un avantage, car nous désirons pouvoir identifier d'autres molécules ou facteurs capables de produire ou de participer à l'effet paracrine pro-fibrosant produit par l'épithélium en réponse au SRE et une augmentation d'expression du *TGF-β* aurait pu expliquer l'effet fonctionnel obtenu sur la TFM. Ici, l'effet fonctionnel serait peut-être dû en partie à eAGR2 ou bien d'autres molécules encore à identifier et étudier. *In vivo*, d'autres molécules ayant un effet additionnel au côté des cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrosantes, participent peut-être au mécanisme complexe indiqué dans la fibrose intestinale telle eAGR2.

Pour toutes les expériences utilisant la Tm comme inducteur de SRE, l'expression de Muc2 diminue par rapport au véhicule, tandis que celle d'AGR2 est augmentée. Cette observation montre un découplage entre l'expression d'AGR2 et Muc2. En conditions normales, AGR2 évolue en parallèle avec la production de Muc2, étant donné le rôle de cette protéine chaperonne du RE.<sup>(82)</sup> En condition de SRE, AGR2 qui fait partie des mécanismes de réponses et de l'UPR, joue un autre rôle additionnel que celui de simple chaperonne, de par son activité PDI au sein du RE. Elle est augmentée et est probablement sécrétée dans le milieu extracellulaire, où elle a certainement d'autres effets. Parmi ceux-ci, on lui connaît un effet pro-métastatique lorsqu'elle est produite par des cellules cancéreuses colorectales et dans le cas de cellules normales, elle aurait un rôle pro-fibrosant. Celui-ci est suggéré par les tests de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes activés, témoignant d'un effet pro-fibrogénique.

Mais le mécanisme d'action de cette protéine et de ses éventuels partenaires, restent à découvrir et à étudier précisément dans le contexte de la RCUH notamment.

Le marqueur de mort cellulaire *P53* est également légèrement augmenté par rapport au véhicule, lorsque les organoïdes sont stimulés par la Tm, probablement car cet inducteur induit un SRE des organoïdes qui perdure dans le temps. Cela pourrait également s'expliquer par la très forte affinité de la Tm pour sa cible, dont nous parlerons plus loin. De cette manière, les organoïdes sont toujours légèrement stimulés et donc stressés, même lorsque du milieu frais est utilisé dans la phase de recovery. Ceci pourrait expliquer que dans certaines expériences réalisées dans ce travail, une lyse cellulaire partielle est suspectée.

La présence du phénomène de TEM est utilisée dans la littérature afin d'objectiver l'effet pro-fibrosant sur les organoïdes. Dans ces expériences, la TEM des organoïdes n'est pas clairement établie. Les caractéristiques épithéliales (marqueur E-cadhérine, *CDH1*) et mésenchymateuses (*vimentine*) sont non conclusives ou ne montrent pas de changement d'expression de la condition Tm par rapport au véhicule. *ACTA2* montre toutefois une augmentation d'expression, parfois assez faible, mais pas une tendance franche dans tous les résultats. De plus, les résultats obtenus entre les sujets sains et les patients RCUH sont relativement similaires.

De façon générale, c'est le test de TFM qui permet de mettre en évidence l'effet pro-fibrogénique des surnageants de culture produit par les organoïdes et donc permet de vérifier leur phénotype pro-fibrosant. Ainsi, lorsque AGR2 a été observé dans les surnageants de culture (eAGR2) en condition de recovery, ces derniers ont été utilisés pour réaliser le test fonctionnel sur les fibroblastes intestinaux (CCD18-Co). L'augmentation du signal d' $\alpha$ -SMA permet de mettre en évidence la TFM.

La dose de Tm qui induit la réponse au SRE capable de produire la plus forte augmentation de la fluorescence d' $\alpha$ -SMA sur CCD18-Co, est observée à 2  $\mu$ g/mL (Figure 14). En plus de cette expression accrue de la protéine  $\alpha$ -SMA (augmentation de la fluorescence), on observe un changement morphologique des cellules déjà observé dans Vieujean *et al.*. Ces dernières semblent se contracter et adoptent une forme plus arrondie plutôt qu'allongée. De plus, on peut également voir l'apparition de petites projections cytoplasmiques autour des cellules assez caractéristiques, non observées dans le cas de la TFM induite par le TGF- $\beta$ . La condition contrôle induite au TGF- $\beta$  montre également un changement morphologique des fibroblastes, avec l'adoption d'une conformation plus arrondie.

Aucun des tests fonctionnels sur fibroblastes réalisés avec les surnageants de culture pré-conditionnés obtenus par induction des organoïdes au TuBHq n'a fonctionné. On n'observe pas de différence de signal d' $\alpha$ -SMA entre la condition contrôle et les différentes doses testées.

Dans ce travail, nous avons seulement évalué le signal d' $\alpha$ -SMA de façon qualitative par microscopie confocale. Or, *in vivo*, ce phénotype myofibroblastique est capable de sécréter de la matrice extracellulaire et par extension, participe au processus de fibrose intestinale.

Dans ce travail, il a été décidé de tester deux inducteurs Tm et TuBHq, car leurs propriétés physicochimiques induisent un SRE suivant deux mécanismes différents. Chaque inducteur agit sur des cibles différentes et comparer la réponse du SRE induit de deux façon différentes, permet de générer des résultats complémentaires, bien que différents des conditions physiologiques rencontrées dans les MICI où la composante inflammatoire est importante.<sup>(51)</sup> Néanmoins, induire un SRE sans cette composante est intéressant afin de voir comment différentes perturbations du RE affectent les cellules épithéliales et de comparer leurs effets.

La Tm est un antibiotique naturel qui inhibe la N-glycosylation des protéines en cours de synthèse dans le RE. Cette modification post-traductionnelle étant indispensable pour le bon repliement et le bon fonctionnement des protéines, son inhibition provoque donc une accumulation de protéines mal/non repliées dans le RE, ce qui engendre un SRE.<sup>(43,44)</sup> Le TuBHq quant à lui, est un inhibiteur de la pompe calcique SERCA, qui joue un rôle dans le transport actif du calcium à l'intérieur du RE. Son inhibition provoque une fuite de calcium vers le cytoplasme, entraînant une perte de l'homéostasie du calcium et donc un SRE.<sup>(42)</sup>

Les résultats obtenus mettent en évidence une différence entre les réponses observées suite au SRE induit par les deux molécules. De manière générale, les protéines du SRE bien connues comme BiP, CHOP, sXBP1 et ERP72, se trouvent augmentées lors d'un SRE transitoire généré via la Tm et dans une moindre mesure, voire pas du tout par le TuBHq. Les résultats obtenus avec le TuBHq, peuvent s'expliquer par le fait que le temps de recovery utilisé est de 32 heures et n'est peut-être pas la durée adéquate où l'effet maximal est détectable avec cet inducteur. Ce délai a été choisi au départ, sur base de la fenêtre idéale mise au point pour la Tm. En fonction des premiers résultats obtenus, nous avons testé les différentes périodes de recovery, afin de préciser la fenêtre où la réponse au SRE induite par le TuBHq était la plus importante. (voir la figure 11) Bien que les résultats RTqPCR ne montrent pas de différence entre les conditions stimulées et le véhicule. On voit sur le WB dans les surnageants de recovery un relargage d'AGR2 plus important après 24 heures en condition stimulée. Pour vraiment confirmer ce résultat et la durée de recovery, il faudrait réaliser une dose-réponse avec 24 heures de recovery.

La seconde raison qui pourrait expliquer cette différence entre les réponses produites suite au traitement de chaque inducteur, est la différence de leurs propriétés biochimiques. La Tm a une affinité beaucoup plus élevée pour sa cible. Donc après le changement de milieu de culture pour la phase recovery, il est possible qu'il y ait toujours de la Tm liée à sa cible et donc une induction prolongée du SRE et une réponse adaptée des cellules épithéliales à ce stress prolongé. Le TuBHq quant à lui, possède une affinité plus faible pour sa cible et l'effet sur les pompes SERCA est plus facilement réversible car le

TuBHq est plus efficacement éliminé lors du changement de milieu avant la phase de recovery. Le SRE induit par le TuBHq serait donc plus transitoire et limité dans le temps. Ceci peut expliquer pourquoi l'expression protéique des marqueurs du SRE durant la phase de recovery, est plus faible que dans le modèle induit à la Tm.

Les conditions retenues pour établir le modèle pro-fibrosant sont différentes en fonction de l'inducteur de SRE choisi. Pour une stimulation par la Tm, la concentration d'inducteur retenue est celle de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En effet, elle semble montrer en extraits protéiques, un effet clair de la réponse au SRE, se traduisant par une augmentation plus importante de BiP et ERP72 par rapport à la condition contrôle (véhicule). Cette dose permet également de retrouver eAGR2 dans les surnageants de recovery, majoritairement dans les conditions stimulées et sans lyse cellulaire détectable. En immunofluorescence, on observe une expression plus importante d' $\alpha$ -SMA par rapport à la condition contrôle et un changement morphologique des cellules lors de la stimulation des fibroblastes CCD18-Co. Le temps de stimulation est fixé à 12 heures et la durée de la période de recovery est de 32 heures.

Pour induire un SRE transitoire avec le TuBHq, la concentration d'inducteur retenue est de 40  $\mu\text{M}$ , bien qu'il n'y ait pas de certitude quant à l'augmentation de l'expression des protéines de SRE par RTqPCR. On obtient néanmoins une expression de ces dernières dans les extraits protéiques, de même qu'un relargage d'AGR2 dans les surnageants de recovery, sans lyse cellulaire détectable. Le temps de stimulation a également été fixé à 12 heures et a été décidé par le laboratoire, avant mon arrivée. Le temps de recovery retenu est de 24 heures, car l'accumulation d'eAGR2 dans le surnageant de culture de recovery y est déjà visible. Par précaution, le temps le plus court où eAGR2 est obtenue est également le temps choisi. Le milieu de culture de recovery étant relativement très peu riche en nutriments, la survie cellulaire prime sur la quantité d'eAGR2 obtenue.

Les points forts du modèle d'organoïdes 3D apical-out, sont l'architecture 3D que les cellules adoptent et qui ressemble à celle de cryptes *in vivo* malgré l'absence de BME. De plus, ils conservent les caractéristiques génétiques et épigénétiques des patients, ce qui permet d'étudier la réponse propre au patient. Cet avantage permet d'utiliser ce modèle comme outil de recherche translationnelle et permettra de faire une étude en incluant la diversité des réponses des patients au SRE induit. C'est pourquoi nos résultats ne sont pas identiques d'un patient à l'autre et particulièrement entre organoïdes dérivant de sujets sains et de patients atteints de RCUH. L'avantage du modèle apical-out, contrairement au basal-out, est que le pôle apical des cellules épithéliales et particulièrement des cellules caliciformes et donc sécrétoire, est orienté vers le milieu de culture, ce qui facilite les contacts directs avec les inducteurs solubles dans le milieu de culture et les analyses sécrétomiques et fonctionnelles possibles avec les surnageants de culture. Par ailleurs, celui-ci dans ces conditions est peu contaminé par de la matrice extracellulaire, puisqu'elle n'est pas requise après inversion des organoïdes. Or la MEC



participe aux phénomènes pro-fibrosant *in vivo* et serait potentiellement un souci pour les tests fonctionnels sur les CCD18-Co.

Cependant ce modèle possède tout de même plusieurs inconvénients d'un point de vue pratique. Notamment le temps de génération des organoïdes inversés, qui est assez long. Il faut compter environ 1 mois entre la décongélation des échantillons de patients et la fin des analyses. Ce qui explique le faible nombre de patients étudiés dans ce travail. De plus, une fois les organoïdes apical-out obtenus, les différentes étapes de culture pour la stimulation avec les inducteurs de SRE sont également assez longues, les durées de chaque phase sont très précises et doivent être respectées. Il s'agit également d'un modèle qui est assez difficile à réaliser, à cause de la fragilité des organoïdes, cela demande donc beaucoup de patience, de délicatesse et de dextérité.

La principale limitation du modèle inversé, est la faible majoration des protéines de SRE et le fait que le test fonctionnel est nécessaire afin d'objectiver l'effet pro-fibrosant. Cela peut s'expliquer notamment par ce mode de culture qui requiert à chaque changement de milieu de culture, un temps relativement long durant lequel les organoïdes sont sortis de l'incubateur. De plus ces changements de milieu impliquent la centrifugation et le culottage des organoïdes inversés, ce qui engendre un stress cellulaire impliquant vraisemblablement certaines protéines de SRE. Cela rend donc parfois le différentiel entre la condition contrôle et les conditions stimulées difficiles à objectiver clairement. C'est dans ces conditions que les résultats des WB, RTqPCR et le test fonctionnel sont importants et se complètent afin de caractériser finalement la réponse des organoïdes à l'induction au SRE.

La force de ce travail réside dans le fait que les tests fonctionnels montrent un effet objectivable éclairant les données de biologies moléculaires accumulées sur le matériel collecté sur les organoïdes (lysats cellulaires et surnageants). La protéine AGR2 présente dans le surnageant de culture est un marqueur utilisable pour caractériser le phénotype pro-fibrosant. Mais ce profil doit être complété par le test de TFM et ne peut pas être utilisé comme seul indicateur. Les marqueurs témoignant d'un SRE au niveau tissulaire sont multiples et permettent de caractériser ce stress et son amplitude dans chaque organoïde dérivant des patients.

Enfin, les limitations de ce travail de mémoire sont le faible nombre de réplicats et les résultats parfois discordants obtenus, qui peuvent s'expliquer en partie par la variabilité inter-individuelle présente entre les sujets sains et les patients atteints de RCUH. Afin de confirmer les conditions de culture qui ont été actuellement choisies, il faudrait réaliser ces expériences sur un nombre plus important de patients. Le peu de connaissance sur l'utilisation du modèle d'organoïdes 3D apical-out, fait qu'il n'y a pas vraiment de comparaison avec d'autres études utilisant ce même modèle dans ce même contexte.

Nous avons choisi d'étudier la fibrose intestinale sur le modèle d'organoïdes 3D apical-out, car ce dernier permet d'isoler la composante épithéliale et d'étudier spécifiquement la réponse de l'épithélium au SRE. Ceci pourra permettre d'identifier spécifiquement un phénomène, une molécule, protéine qui intervient de façon adjuvante à l'inflammation en cas de SRE prolongé et en lien avec la fibrose intestinale observée chez les patients. L'utilisation des organoïdes inversés induits, a pour avantage d'être une alternative plus éthique aux modèles murins et de tenir compte de la variabilité individuelle du patient et d'adresser cette étude de façon translationnelle, afin d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles impliquées dans le processus de fibrose intestinale des MICI.

Ce travail a permis de choisir l'inducteur de SRE et la concentration qui sera utilisée dans la suite de ce projet de recherche. Nous avons pu répliquer partiellement les résultats observés sur les cellules HT29, ayant permis de montrer le lien de cause à effet entre AGR2 et son action pro-fibrosante. Cet aspect reste encore à démontrer sur les surnageants pro-fibrosants générés par des organoïdes. Le lien éventuel entre le SRE, l'UPR, les protéines AGR2 et eAGR2, le phénomène de TEM, sont actuellement peu étudiés dans la fibrose intestinale liée à la RCUH et restent donc à approfondir.

# Conclusion et perspectives

Mon travail a permis d'aider dans la mise au point d'un modèle d'organoïdes apical-out pro-fibrosant, via l'induction d'un SRE grâce à l'utilisation de deux inducteurs de SRE : Tm et TuBHq. Au vu des résultats obtenus, l'inducteur qui semble le plus approprié, est la Tm en raison d'une meilleure réponse au stress induit se traduisant par une plus forte expression des protéines de SRE, mais aussi de l'effet fonctionnel obtenu sur le modèle de TFM. La Tm induit une réponse chez les organoïdes où le relargage d'eAGR2 est objectivé. Les conditions retenues sont une concentration de 2  $\mu\text{g/mL}$ , un temps de stimulation et de recovery de respectivement 12 et 32 heures.

Cependant, il est prématuré de tirer une conclusion définitive quant à l'efficacité du modèle induit au TuBHq, car les résultats des stimulations devraient être confirmés par d'autres expériences similaires en prioritant probablement, les organoïdes dérivant des patients RCUH afin de clarifier certains résultats non convergents obtenus dans ce travail. Recommencer les expériences avec cet inducteur en réalisant une dose-réponse avec 24 heures de recovery à la place de 32 heures, permettrait de mieux évaluer la réponse au stress. Mais également le test fonctionnel qui permettra de trancher sur l'effet paracrine pro-fibrosant obtenu.

En guise de perspective générale, il serait également utile de réaliser un test d'inhibition du phénotype pro-fibrosant lors du test de TFM, à l'aide d'anticorps commerciaux anti-AGR2, afin de confirmer le rôle pro-fibrosant d'eAGR2 produit par des organoïdes dérivant des patients RCUH. Cependant des études supplémentaires sur le rôle d'AGR2 seront nécessaires, dans le but de développer par la suite des traitements contre la fibrose intestinale dans le cas de rectocolite ulcéro-hémorragique, mais également de la maladie de Crohn. Car les traitements ayant un effet anti-fibrotique sont toujours un besoin médical non rencontré.

Une fois le modèle standardisé et définitivement établi, le travail de thèse se poursuivra en augmentant dans un premier temps le nombre de patients atteints de RCUH, afin de générer des organoïdes apical-out traités ou non traités au SRE (n=10 couples). Ces derniers serviront par la suite à réaliser des analyses « OMICS ». Le but de ces analyses est de mettre en évidence des biomarqueurs ou des cibles thérapeutiques potentielles et de documenter les changements moléculaires se produisant au niveau épithélial et accompagnant le changement de phénotype (non fibrosant versus pro-fibrosant).

Enfin, les associations entre ces biomarqueurs et cibles potentielles et la fibrose intestinale observée dans la RCUH seront confirmées sur une cohorte de tissus (fixés et emparaffinés) provenant de patients atteints de RCUH, et montrant différents degrés d'inflammation et de fibrose.

## **Bibliographie**

1. Seyedian SS, Nokhostin F, Malamir MD. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *J Med Life*. 2019;12(2):113–22.
2. Flynn S, Eisenstein S. Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. *Surg Clin North Am*. 2019 Dec;99(6):1051–62.
3. Jarmakiewicz-Czaja S, Zielińska M, Sokal A, Filip R. Genetic and Epigenetic Etiology of Inflammatory Bowel Disease: An Update. *Genes*. 2022 Dec 16;13(12):2388.
4. Roda G, Chien Ng S, Kotze PG, Argollo M, Panaccione R, Spinelli A, et al. Crohn's disease. *Nat Rev Dis Primer*. 2020 Apr 2;6(1):22.
5. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet*. 2007 May 12;369(9573):1641–57.
6. Michel Meurisse, Edouard Louis, Paul Meunier, Philippe Delvenne, Pierre Bonnet. *Pathologie médico-chirurgicale, imagerie et anatomopathologie du système digestif*. Université de Liège; 2018.
7. Le Berre C, Honap S, Peyrin-Biroulet L. Ulcerative colitis. *Lancet Lond Engl*. 2023 Aug 12;402(10401):571–84.
8. Molinié F, Gower-Rousseau C, Yzet T, Merle V, Grandbastien B, Marti R, et al. Opposite evolution in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut*. 2004 Jun;53(6):843–8.
9. Acheson ED. The distribution of ulcerative colitis and regional enteritis in United States veterans with particular reference to the Jewish religion. *Gut*. 1960 Dec;1(4):291–3.
10. Sairenji T, Collins KL, Evans DV. An Update on Inflammatory Bowel Disease. *Prim Care*. 2017 Dec;44(4):673–92.
11. Heyman MB, Kirschner BS, Gold BD, Ferry G, Baldassano R, Cohen SA, et al. Children with early-onset inflammatory bowel disease (IBD): Analysis of a pediatric IBD consortium registry. *J Pediatr*. 2005 Jan 1;146(1):35–40.
12. Negroni A, Pierdomenico M, Cucchiara S, Stronati L. NOD2 and inflammation: current insights. *J Inflamm Res*. 2018;11:49–60.
13. Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jan;14(1):9–23.
14. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol*. 2011 Apr;106(4):563–73.
15. Ramos GP, Papadakis KA. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. *Mayo Clin Proc*. 2019 Jan;94(1):155–65.
16. Porter RJ, Kalla R, Ho GT. Ulcerative colitis: Recent advances in the understanding of disease pathogenesis. *F1000Research*. 2020;9:F1000 Faculty Rev-294.
17. Andersen NN, Gørtz S, Frisch M, Jess T. Reduced risk of UC in families affected by appendicitis: a Danish national cohort study. *Gut*. 2017 Aug 1;66(8):1398–402.
18. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007 Jul;448(7152):427–34.

19. Becker C, Neurath MF, Wirtz S. The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *ILAR J*. 2015 Aug 31;56(2):192–204.
20. Haneishi Y, Furuya Y, Hasegawa M, Picarelli A, Rossi M, Miyamoto J. Inflammatory Bowel Diseases and Gut Microbiota. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 14;24(4):3817.
21. Glassner KL, Abraham BP, Quigley EMM. The microbiome and inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Jan 1;145(1):16–27.
22. Petagna L, Antonelli A, Ganini C, Bellato V, Campanelli M, Divizia A, et al. Pathophysiology of Crohn's disease inflammation and recurrence. *Biol Direct*. 2020 Nov 7;15(1):23.
23. Skomorochow E, Pico J. Toxic Megacolon. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Feb 6]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547679/>
24. Conrad K, Roggenbuck D, Laass MW. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4–5):463–6.
25. Greuter T, Vavricka SR. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease - epidemiology, genetics, and pathogenesis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Apr;13(4):307–17.
26. Gros B, Kaplan GG. Ulcerative Colitis in Adults: A Review. *JAMA*. 2023 Sep 12;330(10):951–65.
27. Ford AC, Moayyedi P, Hanauer SB. Ulcerative colitis. *BMJ*. 2013 Feb 5;346(feb05 2):f432–f432.
28. Abraham C, Cho JH. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med*. 2009 Nov 19;361(21):2066–78.
29. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009 Nov;9(11):799–809.
30. Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Cárcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, et al. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):559–70.
31. Kobayashi T, Siegmund B, Le Berre C, Wei SC, Ferrante M, Shen B, et al. Ulcerative colitis. *Nat Rev Dis Primer*. 2020 Sep 10;6(1):74.
32. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1310–6.
33. Haberman Y, Karns R, Dexheimer PJ, Schirmer M, Somekh J, Jurickova I, et al. Ulcerative colitis mucosal transcriptomes reveal mitochondriopathy and personalized mechanisms underlying disease severity and treatment response. *Nat Commun*. 2019 Jan 3;10(1):38.
34. West AP, Shadel GS. Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. *Nat Rev Immunol*. 2017 Jun;17(6):363–75.
35. Kaser A, Adolph TE, Blumberg RS. The Unfolded Protein Response and Gastrointestinal Disease. *Semin Immunopathol*. 2013 May;35(3):307–19.
36. Kaser A, Blumberg RS. Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation. *Mucosal*

Immunol. 2010 Jan;3(1):11–6.

37. Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014 Feb 7;20(5):1165–79.
38. McGuckin MA, Eri RD, Das I, Lourie R, Florin TH. ER stress and the unfolded protein response in intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Jun;298(6):G820-832.
39. Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 $\alpha$ . *Physiol Rev*. 2011 Oct;91(4):1219–43.
40. Viskupicova J, Rezbarkova P. Natural Polyphenols as SERCA Activators: Role in the Endoplasmic Reticulum Stress-Related Diseases. *Mol Basel Switz*. 2022 Aug 10;27(16):5095.
41. Andersen TB, López CQ, Manczak T, Martinez K, Simonsen HT. Thapsigargin--from Thapsia L. to mipsagargin. *Mol Basel Switz*. 2015 Apr 8;20(4):6113–27.
42. Chao AC, Kouyama K, Heist EK, Dong YJ, Gardner P. Calcium- and CaMKII-dependent chloride secretion induced by the microsomal Ca(2+)-ATPase inhibitor 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-hydroquinone in cystic fibrosis pancreatic epithelial cells. *J Clin Invest*. 1995 Oct;96(4):1794–801.
43. Yamamoto K, Ichikawa S. Tunicamycin: chemical synthesis and biosynthesis. *J Antibiot (Tokyo)*. 2019 Dec;72(12):924–33.
44. Yoon D, Moon JH, Cho A, Boo H, Cha JS, Lee Y, et al. Structure-Based Insight on the Mechanism of N-Glycosylation Inhibition by Tunicamycin. *Mol Cells*. 2023 Jun 30;46(6):337–44.
45. Geboes K. Histopathology of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2003 Jan 1;
46. Laurent Beaugerie, Harry Sokol. Les fondamentaux de la pathologie digestive. In Elsevier; 2014. (Elsevier).
47. Neckel PH. Annotated translation of Georg Meissner's first description of the submucosal plexus. *Neurogastroenterol Motil*. 2023;35(3):e14480.
48. Villanacci V, Reggiani-Bonetti L, Salviato T, Leoncini G, Cadei M, Albarello L, et al. Histopathology of IBD Colitis. A practical approach from the pathologists of the Italian Group for the study of the gastrointestinal tract (GIPAD). *Pathologica*. 2021 Feb 1;113(1):39–53.
49. Io G, N A, Jr G, C F, F R. Fibrosis in ulcerative colitis: mechanisms, features, and consequences of a neglected problem. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2014 Nov [cited 2023 Nov 21];20(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24892966/>
50. Io G, N A, E W, Jr G, R L, D A, et al. Fibrosis in ulcerative colitis is directly linked to severity and chronicity of mucosal inflammation. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2018 Apr [cited 2023 Nov 21];47(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29411405/>
51. Tavares de Sousa H, Magro F. How to Evaluate Fibrosis in IBD? *Diagn Basel Switz*. 2023 Jun 27;13(13):2188.
52. Goulston SJ, McGovern VJ. The nature of benign strictures in ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 1969 Aug 7;281(6):290–5.
53. Vieujean S, Hu S, Bequet E, Salee C, Massot C, Bletard N, et al. Potential Role of Epithelial Endoplasmic Reticulum Stress and Anterior Gradient Protein 2 Homologue in Crohn's Disease Fibrosis.

J Crohns Colitis. 2021 Oct 7;15(10):1737–50.

54. Johnson LA, Rodansky ES, Sauder KL, Horowitz JC, Mih JD, Tschumperlin DJ, et al. Matrix Stiffness Corresponding to Strictured Bowel Induces a Fibrogenic Response in Human Colonic Fibroblasts. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Apr;19(5):891–903.
55. Specia S, Rousseaux C, Dubuquoy C, Rieder F, Vetuschi A, Sferra R, et al. Novel PPAR $\gamma$  Modulator GED-0507-34 Levo Ameliorates Inflammation-driven Intestinal Fibrosis. *Inflamm Bowel Dis*. 2016 Feb;22(2):279–92.
56. Sands BE. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2004 May;126(6):1518–32.
57. SGI. Mesure de la gravité de la MII [Internet]. Société gastro-intestinale | [www.mauxdeventre.org](http://www.mauxdeventre.org). [cited 2024 Jan 22]. Available from: <https://badgut.org/centre-information/sujets-de-a-a-z/mesure-gravite-mii/?lang=fr>
58. Travis SPL, Schnell D, Krzeski P, Abreu MT, Altman DG, Colombel JF, et al. Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut*. 2012 Apr;61(4):535–42.
59. Jauregui-Amezaga A, Geerits A, Das Y, Lemmens B, Sagaert X, Bessissow T, et al. A Simplified Geboes Score for Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis*. 2017 Mar 1;11(3):305–13.
60. Ford AC, Achkar JP, Khan KJ, Kane SV, Talley NJ, Marshall JK, et al. Efficacy of 5-aminosalicylates in ulcerative colitis: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2011 Apr;106(4):601–16.
61. Le Berre C, Roda G, Nedeljkovic Protic M, Danese S, Peyrin-Biroulet L. Modern use of 5-aminosalicylic acid compounds for ulcerative colitis. *Expert Opin Biol Ther*. 2020 Apr 2;20(4):363–78.
62. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF. Ulcerative colitis. *Lancet Lond Engl*. 2017 Apr 29;389(10080):1756–70.
63. Nishikawa Y, Sato N, Tsukinaga S, Uchiyama K, Koido S, Ishikawa D, et al. Long-term outcomes of antibiotic combination therapy for ulcerative colitis. *Ther Adv Chronic Dis*. 2021 Jul 6;12:20406223211028790.
64. Ohkusa T, Kato K, Terao S, Chiba T, Mabe K, Murakami K, et al. Newly developed antibiotic combination therapy for ulcerative colitis: a double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Am J Gastroenterol*. 2010 Aug;105(8):1820–9.
65. Nakase H. Acute Severe Ulcerative Colitis: Optimal Strategies for Drug Therapy. *Gut Liver*. 2023 Jan 15;17(1):49–57.
66. Pugliese D, Felice C, Papa A, Gasbarrini A, Rapaccini GL, Guidi L, et al. Anti TNF- $\alpha$  therapy for ulcerative colitis: current status and prospects for the future. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017 Mar;13(3):223–33.
67. Danese S, Grisham M, Hodge J, Telliez JB. JAK inhibition using tofacitinib for inflammatory bowel disease treatment: a hub for multiple inflammatory cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016 Feb 1;310(3):G155-162.
68. Na SY, Moon W. Perspectives on Current and Novel Treatments for Inflammatory Bowel



Disease. *Gut Liver*. 2019 Nov 15;13(6):604–16.

69. Liu E, Aslam N, Nigam G, Limdi JK. Tofacitinib and newer JAK inhibitors in inflammatory bowel disease—where we are and where we are going. *Drugs Context*. 2022 Apr 8;11:2021-11–4.
70. Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, Velcich A, Meijerink JPP, Van Goudoever JB, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*. 2006 Jul;131(1):117–29.
71. Baydi Z, Limami Y, Khalki L, Zaid N, Naya A, Mtairag EM, et al. An Update of Research Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. *ScientificWorldJournal*. 2021;2021:7479540.
72. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr Protoc Immunol Ed John E Coligan Al*. 2014 Feb 4;104:Unit-15.25.
73. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993 Oct 22;75(2):263–74.
74. Panse N, Gerk PM. The Caco-2 Model: Modifications and enhancements to improve efficiency and predictive performance. *Int J Pharm*. 2022 Aug 25;624:122004.
75. McCoy R, Oldroyd S, Yang W, Wang K, Hoven D, Bulmer D, et al. In Vitro Models for Investigating Intestinal Host–Pathogen Interactions. *Adv Sci*. 2023 Dec 28;11(8):2306727.
76. Ishizu K, Sunose N, Yamazaki K, Tsuruo T, Sadahiro S, Makuuchi H, et al. Development and characterization of a model of liver metastasis using human colon cancer HCT-116 cells. *Biol Pharm Bull*. 2007 Sep;30(9):1779–83.
77. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*. 2017 Jul;32(4):266–77.
78. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014 May;12(4):207–18.
79. Co JY, Margalef-Català M, Li X, Mah AT, Kuo CJ, Monack DM, et al. Controlling Epithelial Polarity: A Human Enteroid Model for Host-Pathogen Interactions. *Cell Rep*. 2019 Feb 26;26(9):2509-2520.e4.
80. Co JY, Margalef-Català M, Monack DM, Amieva MR. Controlling the polarity of human gastrointestinal organoids to investigate epithelial biology and infectious diseases. *Nat Protoc*. 2021 Nov;16(11):5171–92.
81. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, Van Es JH, Van den Brink S, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett’s epithelium. *Gastroenterology*. 2011 Nov;141(5):1762–72.
82. Pierre AS, Gavriel N, Guilbard M, Ogier-Denis E, Chevet E, Delom F, et al. Modulation of Protein Disulfide Isomerase Functions by Localization: The Example of the Anterior Gradient Family. *Antioxid Redox Signal*. 2024 Apr 3;

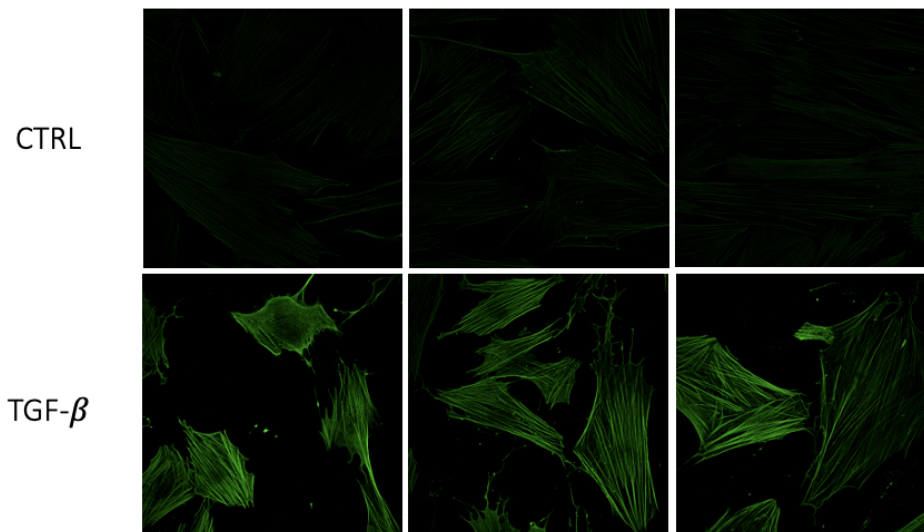
## Annexe 1

<u>Facteurs</u>	<u>Fabricant</u>	<u>Référence</u>	<u>Milieu de prolifération IGF/FGF2</u>	<u>Milieu différenciation (10% FBS)</u>	<u>Milieu différenciation (0% FBS) (déprivation)</u>	<u>Milieu de stimulation (1% FBS)</u>	<u>Milieu de recovery (0% FBS)</u>
<b>Nicotinamide</b>	Sigma	N0636	10 nM	/	/	/	/
<b>B27</b>	Fisher Scientific	11500446	50X	50X	50X	/	/
<b>N-acétyl cystéine</b>	Sigma	A7250	1 mM	1 mM	1 mM	/	/
<b>EGF</b>	PeproTech	AF-100-15	50 ng/mL	50 ng/mL	50 ng/mL	/	/
<b>Gastrine</b>	Sigma	G9145	10 nM	10 nM	10 nM	/	/
<b>A83-01</b>	Sigma	SML0788	500 nM	500 nM	500 nM	/	/
<b>CHIR99021</b>	Sigma	SML1046	250 nM	/	/	/	/
<b>Y27632</b>	PeproTech	1293823	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	/	/
<b>IGF</b>	PeproTech	100-11	100 ng/mL	/	/	/	/
<b>FGF2</b>	PeproTech	100-18B	50 ng/mL	/	/	/	/
<b>Hepes</b>	ThermoFisher	15630080	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
<b>Pen/Strep</b>	Sigma	P4458	/	100 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL
<b>Glucose</b>	Gibco	A24940-01	/	3151 mg/L	3151 mg/L	3151 mg/L	4500 mg/L
<b>Glutamax</b>	Fisher Scientific	11574466	/	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
<b>Noggin</b>	Fisher Scientific	17840123	/	100 ng/mL	100 ng/mL	/	/
<b>DAPT</b>	Sigma	565770	/	5 $\mu$ M	5 $\mu$ M	/	/
<b>FBS</b>	Gibco	A5256701	/	10%	/	1%	/
<b>Milieu LWRN</b>	/	ATCC CRL-3276	14,2 mL	/	/	/	/
<b>Milieu DMEM/F12</b>	ThermoFisher	12634010	/	12,765 mL	14,265 mL	14,535 mL	14,629 mL

## Annexe 2

<u>Gène</u>	<u>Séquence reverse</u>	<u>Séquence Forward</u>	<u>Fabricant</u>	<u>Références</u>
<b>Muc 2</b>	5'-GTG TCT CCG TAT GTG CCG TTG T-3'	5'-ACT CTC CAC ACC CAG CAT C-3'	Integrated DNA Technologies	R : 477359675 F : 477359674
<b>E-cadhérine</b>	5'-GAT AGA TTC TTG GGT TGG GTC G-3'	5'-AGC CTC AGG TCA TAA ACA TCA TTG-3'	Eurogentec	R : 6417091 F : 6417090
<b>Vimentine</b>	5'-GGG CTG CAA CTG CCT AAT GA-3'	5'- CGC CAA GGA CCG TGA GAT TG-3'	Eurogentec	R : 6318583 F : 6318582
<b>ACTA2</b>	5'-ACC GCC TGG ATA GCC ACA TAC A-3'	5'-CGT GTT GCC CCT GAA GAG CAT-3'	Eurogentec	R : 6346907 F : 6346906
<b>P53</b>	5'-TGG ATG GTG GTA CAG TCA GAG C-3'	5'-CCT CAG CAT CTT ATC CGA GTG G-3'	Integrated DNA Technologies	R : 233851288 F : 233851287
<b>AGR2</b>	5'-GTG GGC ACT CAT CCA AGT GA-3'	5'-TAC CAC AGT CAA ACC TGG AGC-3'	Eurogentec	R : 6417095 F : 6417094
<b>BiP</b>	5'-CGT CAA AGA CCG TGT TCT CG-3'	5'-CAT CAC GCC GTC CTA TGT CG-3'	Eurogentec	R : 6417097 F : 6417096
<b>sXBP1</b>	5'-GCT GGC AGG CTC TGG GGA AG-3'	5'-TGC TGA GTC CGC AGC AGG TG-3'	Eurogentec	R : 6417101 F : 6417100
<b>CHOP</b>	5'-CGG GCT GGG GAA TGA CC-3'	5'-CTG GCT TGG CTG ACT GAG GAG-3'	Eurogentec	R : 6417093 F : 6417092
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	5'-AGA GCA ACA CGG GTT CAG GTA-3'	5'-AAC CCA CAA CGA AAT CTA TGA CAA G-3'	Eurogentec	R : 1219563 F : 6249893
<b>ARN 18s</b>	5'-GCC TCA CTA AAC CAT CCA ATC GG-3'	5'-ACC CGT TGA ACC CCA TTC GTG A-3'	Integrated DNA Technologies	R : 32449779 F : 232449778

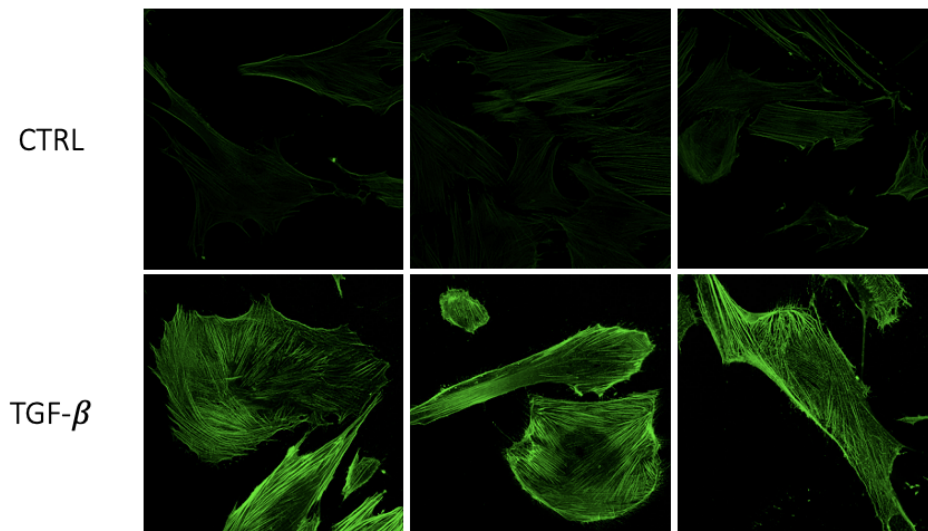
### Annexe 3.a :



*Figure 14 bis: Image représentant le signal d' $\alpha$ -SMA mis en évidence par IF et imagerie confocale. Les fibroblastes CCD18-Co sont traités 48 heures avec du milieu de culture frais supplémenté ou non en TGF- $\beta$  (CTRL et TGF- $\beta$ ). Grossissement 40X.*

Les résultats montrent une augmentation de la fluorescence d' $\alpha$ -SMA lors de la stimulation des fibroblastes par le TGF- $\beta$ . Un changement morphologique des cellules, avec l'adoption d'une conformation plus arrondie est également observé. Cependant, l'apparition de projections cytoplasmiques n'est pas constatée.

### Annexe 3.b :



*Figure 15 bis: Image représentant le signal d' $\alpha$ -SMA mis en évidence par IF et imagerie confocale. Les fibroblastes CCD18-Co sont traités 48 heures avec du milieu de culture frais supplémenté ou non en TGF- $\beta$  (CTRL et TGF- $\beta$ ). Grossissement 40X.*

Les résultats montrent une augmentation de la fluorescence d' $\alpha$ -SMA lors de la stimulation des fibroblastes par le TGF- $\beta$ . Un changement morphologique des cellules, avec l'adoption d'une conformation plus arrondie est également observé. Cependant, l'apparition de projections cytoplasmiques n'est pas constatée.