



HAL
open science

Optimisation de la prise en charge de la rectocolite hémorragique : de la théorie à la pratique

Guillaume] Bouguen

► **To cite this version:**

Guillaume] Bouguen. Optimisation de la prise en charge de la rectocolite hémorragique : de la théorie à la pratique. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2014. Français. NNT : 2014REN1B006 . tel-01057295

HAL Id: tel-01057295

<https://theses.hal.science/tel-01057295>

Submitted on 22 Aug 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Science de la santé

Ecole doctorale VAS

présentée par

Guillaume Bouguen

Préparée à l'unité de recherche INSERM UMR 991 et SMAD
Unité Foie, métabolismes et cancer et Service des Maladies de l'Appareil Digestif
Université de Rennes 1 et Centre Hospitalier Universitaire de Pontchaillou, Rennes

**Optimisation de la prise en
charge de la
Rectocolite hémorragique :
de la théorie à la pratique**

**Thèse soutenue à Rennes
le 26 Juin 2014**

devant le jury composé de :

Mr Benoit COFFIN

PU-PH, Université Denis Diderot Paris 7, *rapporteur*

Mr Michel NEUNLIST

Directeur de recherche, Université de Nantes, *rapporteur*

Mr Jean-François BRETAGNE

PU-PH, Université Rennes 1, *examineur*

Mme Marie-Dominique GALIBERT

PU-PH, Université Rennes 1, *examineur*

Mme Anne CORLU

Directeur de recherche, Université Rennes 1, *examineur*

Mr Emmanuel CORON

PU-PH, Université de Nantes, *examineur*

Mr Laurent DUBUQUOY

Chargé de recherche, Université Lille 2, *co-directeur de thèse*

Mr Laurent SIPROUDHIS

PU-PH, Université Rennes 1, *co-directeur de thèse*

Au Professeur Benoit Coffin

Vous me faites l'honneur de participer au Jury de soutenance et de juger mon travail.
Je vous en remercie profondément

Au Dr Michel NEUNLIST

Vous me faites l'honneur de participer au Jury de soutenance et de juger mon travail.
Je vous en remercie sincèrement.

Mr Jean-François BRETAGNE

Il y a dix ans, je quittais mon Finistère natal pour une nouvelle aventure et vous avez été la première personne à m'accueillir. La notion de Maître me semblait alors désuète, signature d'une médecine du passé. En raison de vos enseignements directs ou indirects, de votre soutien indéfectible, de votre accompagnement tout au long de ces dix années au sein de votre équipe, j'appréhende toute la dimension de ce terme. Cher Maître, vous me faites l'honneur une fois de plus de juger mon travail, je vous témoigne toute ma gratitude et mes remerciements.

Mme Marie-Dominique GALIBERT

Mme le Professeur, Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre soutien, vos encouragements et vos conseils avisés que vous m'avez fournis au cours de ces dernières années.

Mme Anne CORLU

Anne, sans toi et Fabrice cette thèse n'aurait aucun sens. Sans me connaître, vous m'avez accueilli dans votre unité, encouragé et soutenu tout au long de ces années. Tu me fais l'honneur de juger ce travail, accepte tous mes remerciements et ma profonde gratitude.

Mr Emmanuel CORON

Mr Le Professeur, vous me faites l'honneur, au pied levé, de juger ce travail, Je vous en remercie profondément.

Mr Laurent DUBUQUOY

Laurent, tu as été l'initiateur de mon parcours dans le domaine fondamental et de cette thèse. A posteriori, je m'aperçois la difficulté de cette tâche lorsqu'elle s'adresse à des personnes n'ayant pas choisi spontanément la voie du laboratoire. Je te remercie pour ton soutien, ta disponibilité et ton amitié. C'est un honneur que de t'avoir rencontré et que tu juges aujourd'hui ce travail.

Mr Laurent SIPROUDHIS

Mr le Professeur, vous m'aviez permis le tutoiement après ma première soutenance. Ce tutoiement n'était finalement pas anodin mais le signal de départ d'une équipe. Tu es mon plus grand soutien de ces dernières années et je t'en remercie sincèrement. Ta présence et ton accompagnement incessants, ta capacité à remotiver les troupes dans les moments de doute est incroyable. C'est ma plus grande fierté que de travailler avec toi et d'appartenir à ton équipe. Tu me fais l'honneur de diriger ce travail et de le juger, merci.

A Benjamin et Audrey, merci d'être là.

A toute l'équipe du Service des Maladies de l'Appareil Digestif, c'est un grand honneur de pouvoir travailler avec vous et de partager la prise en charge souvent difficile de nos patients.

A Bruno Clément et à toute l'équipe 2, vous m'avez offert l'opportunité de travailler avec vous toujours dans la bonne humeur. Un remerciement particulier à Claudine qui me fait rebondir dans les périodes difficiles et m'a permis de toujours aller de l'avant.

A toute ma famille,

« *Ibant obscuri sola sub nocte per umbra* », Grâce à vous, il n'y a jamais eu de descente aux enfers, jamais seul, un jardin de printemps devant moi.

A Elodie,
A Louise,
A Aurèle,
... Au p'tit biscuit

SOMMAIRE

PARTIE 1 : LA RECTOCOLITE HÉMORRAGIQUE, LES ENJEUX

1.1. Introduction, rappel historique	8
1.2. Données épidémiologiques.....	9
1.3. Présentation clinique de la rectocolite hémorragique.....	10
1.3.1. Phénotype	10
1.3.2. Symptômes Cliniques.....	11
1.3.2.1. Symptômes digestifs et lésions endoscopiques.....	11
1.3.2.2. Symptômes extradiigestifs.....	14
1.3.3. Qualité de vie.....	14
1.4. Evolutions et complications de la rectocolite hémorragique.....	15
1.4.1. Evolutions.....	15
1.4.2. Morbi-mortalité.....	17
1.4.3. Complications.....	17
1.5. Approches thérapeutiques.....	18
1.5.1. Stratégies médicales.....	18
1.5.1.1. Les principaux traitements.....	18
1.5.1.1.1. 5-aminosalicylés.....	18
1.5.1.1.2. Glucocorticoïdes.....	19
1.5.1.1.3. Thiopurines.....	19
1.5.1.1.4. Anti-TNF α	19
1.5.2. Stratégies thérapeutiques.....	20
1.5.3. Recours à la chirurgie.....	22
1.6. Enjeux des thérapeutiques au cours de la Rectocolite Hémorragique.....	23

PARTIE 2 : APPROCHE THEORIQUE DE L'OPTIMISATION DES

THERAPEUTIQUES AU COURS DE LA RECTOCOLITE HEMORRAGIQUE

2.1. Généralité sur Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).....	25
2.2. Le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes gamma (PPAR γ).....	26
2.2.1. Structure de PPAR γ	26
2.2.2. Mode d'action	27
2.3. Propriétés anti-inflammatoires de PPAR γ	28
2.4. PPAR γ au cours de la RCH.....	29
2.5. Mécanismes de régulation de PPAR γ	29

Manuscrit n°1 *INTESTINAL STEROIDOGENESIS CONTROLS PPAR γ EXPRESSION IN THE COLON* 31

AND IS IMPAIRED DURING ULCERATIVE COLITIS

Manuscrit n°2 *MODULATION DE L'EXPRESSION DE PPAR γ PAR L'HYPOXIE AU COURS DE LA* 61

RECTOCOLITE HEMORRAGIQUE ET EFFET DU SILDENAFIL SUR SON EXPRESSION

PARTIE 3 : OPTIMISATION DE LA PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE

3.1. Traiter au-delà des symptômes : concept du « treat to target »	83
3.1.1. Origine du concept.....	83
3.1.2. Cicatrisation muqueuse : la cible ultime ?.....	84

Manuscrit n°3 *FEASIBILITY OF ENDOSCOPIC ASSESSMENT AND TREATING TO TARGET TO ACHIEVE* 86

MUCOSAL HEALING IN ULCERATIVE COLITIS

3.2. L'infliximab : un anti-TNF α	109
--	-----

3.2.1. Efficacité de l’infliximab.....	109
3.2.1.1. Les colites chroniques corticodépendantes ou corticorésistantes modérées à sévères.....	109 112
3.2.1.2. La colite aiguë grave.....	113
3.2.1.3. Intérêt de la combothérapie.....	114
3.2.2. Effets secondaires, sécurité d’emploi.....	115
3.3. Limite de l’utilisation l’infliximab au cours de la RCH.....	116
 <i><u>Manuscrit n°4</u> INFLIXIMAB FOR REFRACTORY PROCTITIS</i>	 118
<i><u>Manuscrit n°5</u> LONG-TERM OUTCOMES OF ULCERATIVE COLITIS TREATED WITH INFLIXIMAB</i>	 135
 <u>PARTIE 4</u> : DISCUSSION-CONCLUSION	 151
Références	

PARTIE 1 : LA RECTOCOLITE HÉMORRAGIQUE, LES ENJEUX

1.1.Introduction, rappel historique

Il reste difficile de remonter aux premières descriptions de la rectocolite hémorragique (RCH). Il semblerait cependant que l'hypothèse d'une telle maladie ait émergé au cours du siècle de la théorie microbienne. Sir Samuel Wilks décrit en effet au XIX^{ème} le cas d'une femme de 42 ans décédée après plusieurs mois de diarrhée et présentant une inflammation colique. (Wilks 1859) Il observa un cas similaire quelques années plus tard. Au début du 20^{ème} siècle, un peu plus de 300 patients avaient été admis pour RCH alors appelée colite ulcéreuse au London Hospital. (De Dombal 1968) Des conséquences de la maladie étaient déjà décrites comme l'augmentation de la prévalence des cancers du côlon chez ces patients.(De Dombal 1968) La course à la recherche d'une solution thérapeutique en vue de diminuer les conséquences morbides et parfois mortelles de la RCH débutait avec pour première proposition des instillations coliques per-appendiculaire.(Hutchinson 1905) Il faudra attendre quelques décennies pour observer l'émergence de thérapeutiques efficaces, la découverte de la sulfasalazine par Ana Svartz en 1942, la voie du cortisol dans les années 50, les bases puriques dans les années 70, les biothérapies au début du XIX^{ème} siècle. Depuis les années 1990 ces maladies sont une préoccupation majeure de la gastroentérologie avec le développement d'une recherche intensive, épidémiologique, thérapeutique et fondamentale. Néanmoins de nombreuses inconnues persistent et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) restent une entité nosologique complexe où le rôle de plusieurs facteurs, génétiques, immunologiques, environnementaux semblent interférer sur l'incidence et le phénotype de la maladie.

1.2.Données épidémiologiques

A l'échelle mondiale, les MICI (maladie de Crohn et RCH) restent un problème de santé publique des pays dit industrialisés où la prévalence est forte, principalement en Europe et en Amérique du Nord où elles touchent plus d'un habitant sur 1000. (Colombel J-F et al. 2007) L'incidence de la RCH varie de 1,2 à 20,3 cas pour 100000 habitants par an, alors que la prévalence varie de 7,6 à 246 cas pour 100000 habitants par an (Loftus 2004) Cette variabilité de l'incidence de la RCH est en partie liée à un gradient nord-sud retrouvé de façon constante avec, pour exemple en Europe, une incidence beaucoup plus forte dans les pays nordiques en comparaison aux pays du pourtour Européen. (Molodecky et al. 2012, Shivananda et al. 1996)

En France près de 200000 personnes souffrent d'une MICI. Après l'observation d'une augmentation de son incidence dans les années 1980, l'incidence de la RCH est plutôt stable voire diminue depuis le début des années 2000. (Chouraki et al. 2011, Molodecky et al. 2012) L'incidence est de 4 pour 100000 habitants. La prévalence de la RCH est estimée à 60 pour 100000 habitants. Au total 40000 personnes seraient atteintes de RCH avec 2500 à 3000 nouveaux cas par an. (Molinie et al. 2004) En Bretagne, le registre ABERMAD constitué entre 1994 et 1997 a permis d'estimer une incidence plus faible que dans le reste de la France de 2,9 pour 100000 habitants.(Pagenault et al. 1997)

Le pic d'incidence se situe principalement entre 20 et 29 ans, avec dans certaines études un second pic inconstant entre 50 et 60 ans.(Charpentier et al. 2014) En France, selon les données du registre en population EPIMAD des nouveaux cas de MICI, il existerait une légère prédominance masculine de la maladie, non retrouvée dans toutes les études à l'échelle mondiale. (Gower-Rousseau et al. 1994, Molodecky et al. 2012)

Ainsi la RCH est une maladie fréquente atteignant principalement les jeunes adultes.

1.3.Présentation clinique de la rectocolite hémorragique

1.3.1. Phénotype

L'atteinte digestive au cours de la RCH est restreinte au côlon et l'extension des lésions muqueuses est toujours rétrograde avec une atteinte systématique du rectum associée ou non à une extension au reste du côlon, faisant distinguer 3 formes : la rectite, la colite gauche et la pancolite (tableau 1). (Satsangi et al. 2006) L'atteinte est dans tous les cas continue, d'un seul tenant du rectum jusqu'à une limite proximale colique souvent nette. Cette localisation n'est pas figée et la proportion des rectites évoluant vers des formes étendues diffère avec à 10 ans, une extension colique gauche variant de 12 à 49 % et une atteinte pancolique dans 6 à 34 % des cas dans des séries hospitalières.(Ayres et al. 1996, Farmer et al. 1993, Powell-Tuck et al. 1977) Cette variabilité est observée également dans les études de population probablement en raison de l'ancienneté du recrutement pour certaines, évaluant l'extension colique par des moyens radiologiques (Langholz et al. 1996) ou du fait de l'évaluation de l'extension à temps fixe pour d'autres, sous-estimant l'extension chez les patients asymptomatiques au moment de l'endoscopie.(Solberg et al. 2009) Cette dernière étude de population observait un taux d'extension des proctites vers des colites gauche de 28% et vers les formes pancoliques de 14%. (Solberg et al. 2009)

Tableau 1: Classification de Montréal (extension de la RCH)

Extension de la maladie selon la classification de Montréal		
Extension		Anatomie
E1	Rectite	Atteinte limitée au rectum en aval de la jonction rectosigmoïdienne
E2	Colite gauche	Atteinte rectocolite en aval de l'angle colique gauche
E3	Pancolite	Atteinte rectocolite avec atteinte débutant en amont de l'angle colique gauche

1.3.2. Symptômes Clinique

1.3.2.1.Symptômes digestifs et lésions endoscopiques

En raison de l'atteinte inflammatoire de tout ou partie du côlon, dont la muqueuse est érythémateuse, dépolie, granitée, et hémorragique, et parfois le siège d'ulcérations plus ou moins larges, la symptomatologie est marquée par des diarrhées sévères, des douleurs abdominales et des rectorragies. L'extension colique de la maladie et le degré d'altération pariétale, étroitement corrélés, conditionnent le tableau clinique. Cependant l'atteinte constante du rectum induit un syndrome rectal très invalidant responsable de faux besoins, impériosité fécale, ténésme et épreintes. En raison de cette atteinte rectale, l'incontinence n'est pas rare et 74% des patients atteints de RCH auront l'expérience d'un épisode d'incontinence au cours de poussées de leur maladie, incontinence sévère et répétée dans 9% des cas. (Norton et al. 2013) Dans les formes plus sévères peuvent apparaître une fièvre, une altération de l'état général avec dénutrition et asthénie. Les nombreux scores proposés pour rendre compte de l'activité de la maladie et de la sévérité de la maladie (Simple Clinical Activity Index, Score de Mayo [Tableau 2] ...) sont ainsi principalement basés sur la fréquence des selles et l'importance des rectorragies.

L'examen endoscopique reste actuellement le moyen le plus fiable pour juger de la sévérité d'une maladie. Les lésions observées témoignent soit d'une activité inflammatoire de la maladie comme la modification de la trame vasculaire, le caractère friable et fragile de la muqueuse, les saignements provoqués ou spontanés dans la lumière digestive et les ulcérations. Le score le plus largement utilisé reste le score de Mayo (figure 1). Pour exemple, l'UCEIS (Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity) a récemment été décrit pour homogénéiser la description des lésions de façon reproductible en incluant les items ayant la meilleure reproductibilité inter et intra observateur représentés par les modifications de la

trame vasculaire du colon, la présence et l'intensité de l'hémorragie muqueuse, et la présence d'ulcération.(Travis S. P. et al. 2012)

Tableau 2 : Score de Mayo pour l'évaluation de l'activité clinique de la RCH

Score partiel de MAYO	
Fréquence des selles (en plus du nombre habituel)	
0	0
1 à 2	1
3 à 4	2
5 ou plus	3
Rectorragies	
Absentes	0
Stries de sang dans les selles moins de 50 % du temps	1
Sang dans les selles plus de 50 % du temps	2
Exonérations purement sanglantes	3
Appréciation clinique	
Rémission	0
Maladie légère	1
Maladie modérée	2
Endoscopie	
Aspect normal ou cicatriciel	0
Anomalie légère (érythème, diminution de la vascularisation, légère fragilité)	1
Anomalie modérée (érythème franc, vascularisation non visible, fragilité, érosions)	2
Anomalie sévère (saignement spontané, ulcérations)	3

Figure 1 : Exemple de lésions observées en endoscopie au cours de la rectocolite hémorragique classées en fonction de leur sévérité selon le score endoscopique de Mayo (Pineton de Chambrun, et al 2010)



0 : Normal ou RCH inactive



1 : RCH légère (érythème, réduction du réseau vasculaire, légère friabilité)



2 : RCH modérée (érythème marqué, absence de réseau vasculaire, friabilité, érosions)



3 : RCH sévère (saignements spontanés, ulcérations)

1.3.2.2.Symptômes extradigestifs

A ces symptômes digestifs directement induits par l'atteinte colique peuvent s'associer dans 21 à 39 % des cas des manifestations extra-intestinales diverses et variées (tableau 3) : atteintes cutanées, ophtalmologiques ou encore du système hépatobiliaire. (Arora et al. 2010, Vavricka et al. 2011, Veloso et al. 1996) Les spondylarthropathies associées aux MICI particulièrement fréquentes augmentent et aggravent en particulier le handicap présenté par ces patients en raison des raideurs et douleurs articulaires.

Tableau 3 : Prévalence des manifestations extra-intestinales (MEI) observée au cours des MICI dans une cohorte en population (n=370). (Vavricka et al. 2011)	
Fréquences des MEI	113/370 (30,5 %)
Nombre des MEI :	
1	85 (23 %)
2	23 (6,2 %)
3	3 (0,8 %)
4	2 (0,5 %)
5	0
MEI type et fréquence	
Arthrite	79 (21,3 %)
Uvéite	14 (3,8 %)
Pyoderma gangrenosum	8 (2,2 %)
Erythème noueux	12 (3,2 %)
Aphtes/Stomatite	13 (3,5 %)
Spondylarthrite Ankylosante	6 (1,6 %)
Cholangite sclérosante primitive	13 (3,5 %)
Psoriasis	3 (0,8 %)

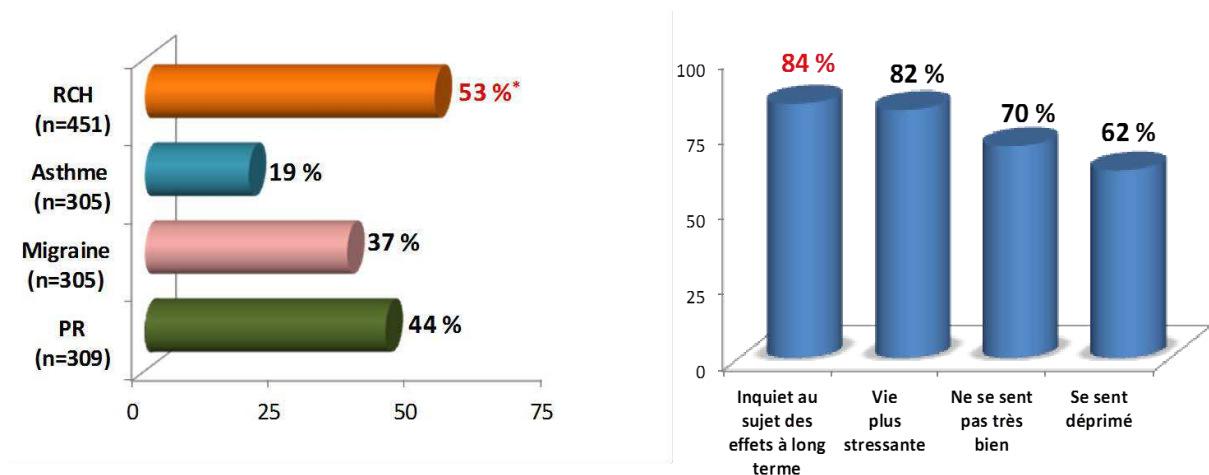
1.3.3. Qualité de vie

L'ensemble de ces symptômes digestifs et parfois extradigestifs impactent directement la qualité de vie des patients. Dans une cohorte de 1370 patients, 53% des patients jugeait que la maladie impactait directement leur qualité de vie en comparaison à d'autres pathologies chroniques (figure 2). (Rubin et al. 2010) Cette qualité de vie est dégradée en raison d'une diminution de leurs activités quotidiennes sociales et familiales tels que les sorties, le sport, les voyages et surtout l'activité professionnelle ou la scolarité, pour les plus jeunes, source d'absentéisme. (Reinisch et al. 2007) En effet, le retentissement social est majeur avec plus

d'un quart des patients en incapacité temporaire ou permanente de travail en lien directe avec leur RCH. (Siebert et al. 2013)

Cette maladie peut être difficile à accepter et avoir des répercussions psychologiques sur les patients ainsi qu'un impact sur la vie sexuelle. Deux tiers des patients atteints de RCH présentent des sentiments dépressifs, et dans plus de 80 % une inquiétude par rapport à leur devenir et leur avenir. (Rubin et al. 2010)

Figure 2 : Ressentiment de l'influence négative de la maladie au cours de maladies chroniques (panel de gauche) et impact psychologique de la RCH (panel de droite)



1.4. Evolutions et complications de la rectocolite hémorragique

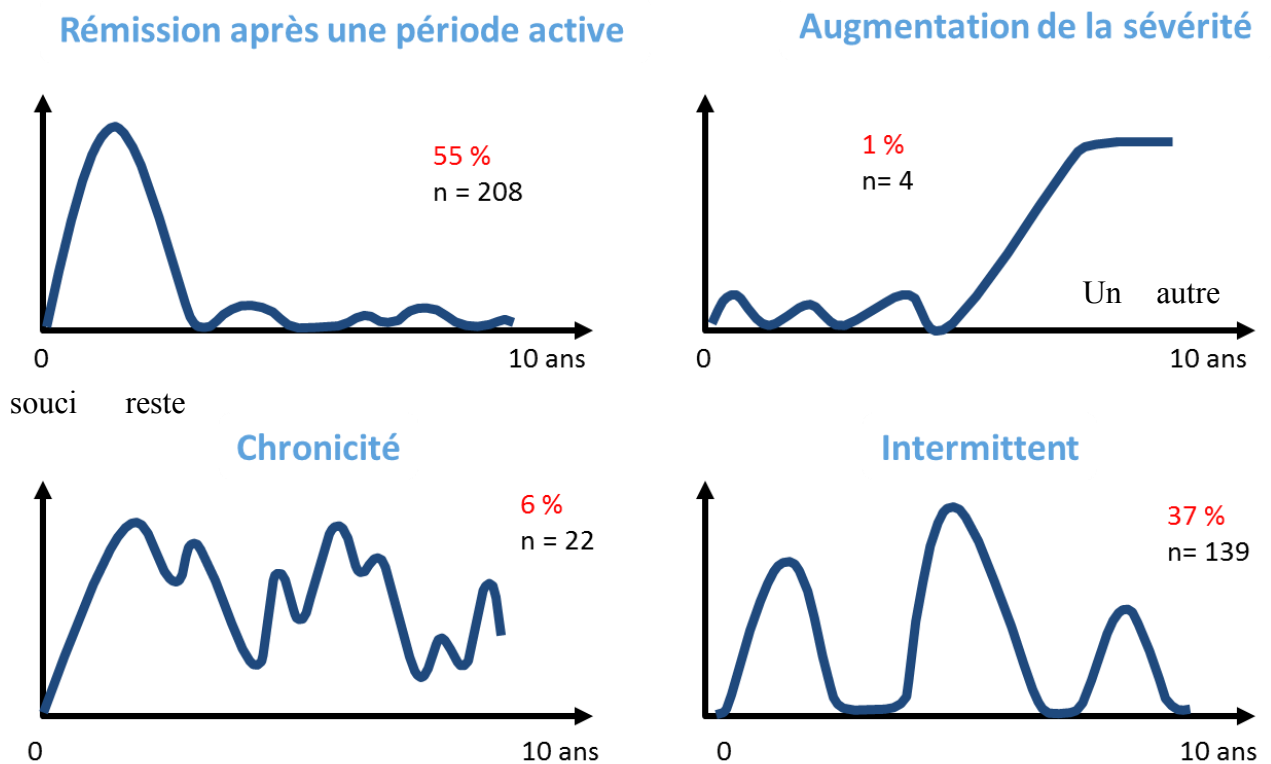
1.4.1. Evolutions

- clinique

L'évolution des MICI est variable mais se fait schématiquement par une succession de « poussées » (sous-entendu d'inflammation colique où le patient sera symptomatique) entrecoupées de phases de rémission. Dans les faits, l'évolution ne suit pas cette dichotomie

et est étroitement liée à la prise en charge thérapeutique. Dans une cohorte en population prospective sur 10 ans ayant tenté d'évaluer le profil évolutif de ces patients, 55 % des patients présentaient une première poussée de la maladie marquée suivi d'une phase paucisymptomatique, 37 % des patients présentaient des poussées intenses intermittentes et moins de 10 % des patients présentaient une évolution chronique active et incontrôlée de la maladie qui auront pour principal risque, le recours à la chirurgie (figure 3).(Solberg et al. 2009)

Figure 3: Mode évolutif de la rectocolite hémorragique selon les données d'une étude en population



l'extension La

- phénotypique

L'extension des lésions sur le cadre colique, facteur pronostic majeur de coloproctectomie, varie en fonction du type de cohorte de 28 à 96,5 %.(Meucci et al. 2000, Solberg et al. 2009)

Certains éléments peu pertinents tels que la fréquence et l'intensité des rechutes, le jeune âge, un tabagisme, ou encore la présence de manifestations extra-intestinales rhumatologiques, ont

été associés dans différents travaux sur cohorte hospitalière comme facteurs de risque d'extension proximale de la maladie.(Ayres et al. 1996, Farmer et al. 1993, Meucci et al. 2000) Cependant, quelque soit l'étude, les patients présentant au diagnostic une rectite et ayant une extension pancolique est un facteur indépendant de coloproctectomie

1.4.2. Morbi-mortalité

Peu d'études se sont intéressées à l'analyse de la morbi-mortalité spécifique chez les malades atteints de MICI. Les morbidités dépendantes de la maladie ou des traitements instaurés sont de plus en plus souvent abordées comme le soulignent les résultats récents de la cohorte CESAME retrouvant une augmentation du risque de lymphome chez les patients sous immunosuppresseurs. (Beaugerie et al. 2009) Les données concernant la mortalité sont très variables dans la littérature. Les cohortes hospitalières, anciennes rapportent une surmortalité au cours de la RCH. Inversement, les données récentes sont plutôt rassurantes et ne retrouvent pas de diminution de l'espérance de vie chez les patients atteints de RCH.(Card et al. 2003, Hoie et al. 2007a, Winther et al. 2003) Il semble cependant persister une augmentation de la mortalité dans la première année du diagnostic. (Jess et al. 2013) Egalement, certaines complications spécifiques de la maladie pouvant être à l'origine d'une augmentation de la mortalité comme au cours de la colite aiguë grave, de la surinfection à clostridium difficile ou encore le post-opératoire d'une coloproctectomie.

1.4.3. Complications

Deux complications sont principalement redoutées en cas de rectocolite hémorragique : la colite aiguë grave et le cancer du côlon.

La colite aiguë grave est marquée par une inflammation fulminante du colon avec syndrome de réponse inflammatoire systémique pouvant se compliquer d'un mégacôlon toxique où la

colectasie peut conduire à une perforation diastatique du colon. Cette forme reste une urgence chirurgicale, la colectomie sub-totale devant être discutée avant et après toute tentative médicale, le délai de prise en charge chirurgicale conditionnant directement la mortalité post-opératoire.(Danese and Fiocchi 2011)

En cas de RCH, il existe par ailleurs un risque situé entre 2 et 3 fois plus que la population générale de développer un cancer colorectal. (Jess et al. 2012a, Jess et al. 2012b) Cette augmentation du risque est directement induite par l'inflammation chronique. Ainsi certaines conditions comme une maladie pancolique, non contrôlée avec la persistance d'une activité histologique et ancienne ou encore l'association de la RCH à une cholangite sclérosante primitive augmente d'autant plus le risque de néoplasie colique.(Rutter et al. 2004) La chirurgie est alors le principal recours.

1.5.Approches thérapeutiques

1.5.1. Stratégies médicales

1.5.1.1.Les principaux traitements

1.5.1.1.1. 5-aminosalicylés

Les dérivés salicylés sont les premiers traitements efficaces de la RCH, découverts par Anna Svartz en 1942. Initialement développés pour la prise en charge des maladies inflammatoires rhumatologiques, son efficacité sur les colites associées aux spondylarthropathies a été à l'origine de son développement dans la RCH. La sulfasalazine initialement décrite est composée d'une partie sulfamide, toxique et du principe actif la mésalazine. La mésalazine (mesalamine, 5-aminosalicylés, 5-ASA) est actuellement le principal traitement utilisé. La tolérance est le plus souvent bonne sans effet secondaire majeure. La mésalazine est

disponible sous forme orale ou en topique de type suppositoire ou lavement. Enfin il s'agit d'un des traitements les moins onéreux.

1.5.1.1.2. Glucocorticoïdes

Les corticoïdes sont utilisés depuis les années 50. Les voies d'actions des corticoïdes ne sont pas toutes connues incluant des effets génomiques et des effets non-génomiques. Plus de 70 % des patients ont une réponse à la corticothérapie. Cependant au long cours, seul un patient sur deux sera en rémission, les autres seront corticodépendants ou opérés.(Faubion et al. 2001) L'utilisation au long cours des corticoïdes est constamment associé à une augmentation de la morbi-mortalité au cours des MICI.(Lichtenstein et al. 2012a)

1.5.1.1.3. Thiopurines

L'utilisation des thiopurines (6-mercaptopurine et azathioprine, pro-drogue de la 6-thioguanine composé actif) n'est pas étayée par des essais thérapeutiques robustes, de type randomisé contrôlé contre placebo. Leur efficacité est cependant observée dans une récente méta-analyse pour le maintien de la rémission particulièrement en cas de corticodépendance.(Timmer et al. 2012) Elles ne semblent pas efficaces pour induire la rémission. A l'image des immunosuppresseurs, ils augmentent le risque d'infections, en particulier opportunistes, mais également de certains cancers, en première ligne les lymphomes et les cancers cutanés. (Beaugerie et al. 2009, Peyrin-Biroulet et al. 2011)

1.5.1.1.4. Anti-TNF α

Ces biothérapies (infliximab, IFX ; adalimumab, ADA ; golimumab, GLM) sont des anticorps monoclonaux de type IgG1 κ chimérique (fraction Fab murine ou humaine, fraction Fc humaine) fixant le TNF α soluble et transmembranaire. Contrairement aux autres traitements, leur administration est effectuée, soit par voie intraveineuse en hospitalisation, soit par injection sous cutanée à domicile. Elles ont la capacité d'induire rapidement et de

maintenir la rémission. (Rutgeerts et al. 2005) Elles constituent actuellement le traitement le plus efficace de la RCH.(Panaccione et al. 2014) Leur efficacité est d'autant plus importante lorsqu'elles sont associées à un immunosuppresseur « traditionnel ».(Panaccione et al. 2014) Leur efficacité n'est malheureusement pas absolue et seuls 39,7 % des patients seront en rémission de leur maladie : cela signifie donc que 60 % des patients sont non répondeurs ou répondeurs partiels au plus efficace des traitements disponibles au cours de la RCH. A l'image des immunosuppresseurs, ils augmentent le risque d'infection et possiblement le risque de mélanome.(Lichtenstein et al. 2012a) Cette classe thérapeutique reste le traitement le plus onéreux pour un prix annuel variant entre 15000 et 20000 euro.

1.5.2. Stratégies thérapeutiques

L'ensemble des thérapeutiques, sujet principal de ce travail sera revu au travers du manuscrit. Les décisions thérapeutiques dans la prise en charge de la RCH fait schématiquement intervenir quatre facteurs : le degré de sévérité de la maladie, les effets secondaires des traitements et en conséquence le risque iatrogénique, la localisation de la maladie, la notion de traitement d'induction et d'entretien

- **La localisation de la maladie** : La RCH est essentiellement une maladie muqueuse et la présence d'une atteinte localisée au rectum ou au colon gauche peut conduire à l'utilisation de l'instillation locale du produit actif par suppositoire ou lavement, pas toujours accepté par le patient. Il est à noter que les excipients (ethylcellulose, MMX, metacrylate) utilisés pour la mésalazine entraînent à la différence des médicaments habituels une libération colique pour une action topique et non systémique induite par l'absorption jejuno-iléale.

- **Sévérité de la maladie** : en cas de maladie sévère, mettant en jeu le pronostic vital, les thérapeutiques les plus efficaces et efficace rapidement (quelques jours voire quelques heures) seront nécessaires et privilégiées pour induire rapidement une diminution de l'orage inflammatoire. Par exemple en cas de colite aiguë grave, le choix se portera sur un traitement anti-TNF α ou l'utilisation de ciclosporine.
- **Traitement d'induction et traitement d'entretien** : sur le principe d'une maladie chronique les traitements seront indiqués pour induire puis maintenir une rémission. Certains traitements comme les aminosalicylés induisent et entretiennent la rémission. Les corticoïdes sont efficaces pour induire une rémission clinique mais ne peuvent être poursuivis au long cours en raison de leurs effets secondaires. Inversement, les thiopurines n'ont pas d'efficacité en traitement d'induction mais essentiellement pour maintenir une rémission.
- **Effets secondaires** : aucun médicament ne peut se vanter de ne pas avoir d'effet secondaire. Cependant le degré de iatrogénie entre les différentes classes thérapeutiques peut varier de façon conséquente. Au cours de la rectocolite hémorragique il existe globalement deux grands cadres thérapeutiques, les traitements immunosuppresseurs/ immunomodulateurs (analogues des bases puriques, anti-TNF α , glucocorticoïdes de synthèse à forte dose) et les traitements non immunosuppresseurs représentés quasi essentiellement par les dérivés 5-aminosalicylés. Les aminosalicylés sont le plus souvent très bien tolérés avec peu d'effets secondaires. Les immunosuppresseurs peuvent à l'opposé être responsables de complications plus sévères comme l'augmentation de la fréquence des infections et du risque d'infections sévères et opportunistes, les lymphomes induits sous thiopurine, ou encore les cancers cutanés.

Les modalités thérapeutiques des MICI ont beaucoup évolué au cours du temps et depuis les années 1990, les stratégies thérapeutiques sont en cours de mutation avec un recours accru

aux immuno-suppresseurs et le développement des biothérapies (anticorps anti-TNF α depuis 2006 dans la RCH). Les traitements immunosuppresseurs sont de plus en plus souvent utilisés au cours de la RCH, et de plus en plus tôt au cours de l'histoire naturelle. (Cosnes et al. 2005) Ce glissement thérapeutique est la conséquence des phénomènes de cortico-dépendance ou de cortico-résistance fréquemment observés au cours des MICI et de la fréquence élevée des effets secondaires des corticoïdes. (Faubion et al. 2001, Stein and Hanauer 2000) Cette tendance est observée depuis les années 90 pour les analogues des bases puriques et plus récemment pour les anticorps anti-TNF. Par ailleurs, ces attitudes thérapeutiques sont de nature à modifier l'histoire naturelle des MICI dans la population générale.

1.5.3. Recours à la chirurgie

La coloproctectomie, seule solution après échec des thérapeutiques médicamenteuses, constitue une chirurgie « curatrice » de cette maladie. Les taux de recours à la chirurgie varient en fonction des différentes études : les études les plus anciennes retrouvent des taux importants proche de 20 % à 5 ans, de 31 à 34 % à 20 ans alors que les études plus récentes constatent des taux inférieurs de 7,5 % et 8,7 % à 5 et 10 ans respectivement. (Farmer et al. 1993, Henriksen et al. 2006, Hoie et al. 2007b) Cependant cette chirurgie n'est pas dénuée de morbidité et deux tiers des malades présenteront des complications après anastomose iléo-anale. (Fazio et al. 1995) Ces complications sont représentées essentiellement par les sepsis pelviens postopératoires chez près d'un patient sur 4, les pochites pour 23,5 à 45,5 % des malades, les troubles sexuels et de la fertilité, invalidants pour cette jeune population, et enfin un risque d'iléostomie définitive évalué à 6 %. (Fazio et al. 1995) En moyenne les patients auront, au décours d'une coloproctectomie, 4 à 6 selles par jour, une selle nocturne et 30 % de risque d'incontinence nocturne. En dépit des complications et des effets secondaires, il faut noter que le taux de satisfaction globale est excellent : 98 % des malades sont à même de

recommander une coloproctectomie avec anastomose iléo-anale à un autre malade. (Delaney et al. 2003)

1.6.Enjeux des thérapeutiques au cours de la Rectocolite Hémorragique

Ainsi, la RCH est une maladie très invalidante au quotidien pour les patients, responsable d'un retentissement familial, social et professionnel important. Sévère en terme de retentissement sur la qualité de vie, elle peut l'être également d'un point de vue médical en cas de complications graves et parfois mortelles. En dépit de plusieurs révolutions thérapeutiques au cours des dernières décennies, leurs effets restent suspensifs parfois inexistantes ou partiels et parfois sources de complications. Ainsi, l'optimisation de stratégies thérapeutiques actuelles est un enjeu majeur pour augmenter leur efficacité tout en contenant la iatrogénie potentielle. Plusieurs chemins peuvent être arpentés pour atteindre cet objectif, adaptés au phénotype et à la sévérité de la maladie.

Une première voie pour améliorer l'obtention et le maintien d'une rémission sans en augmenter la iatrogénie est de potentialiser des médicaments efficaces et bien tolérés représentés par les 5-ASA. Une des cibles de la mésalazine est le récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes gamma (PPAR γ) dont l'expression est diminuée de façon constitutive au cours de la rectocolite hémorragique. Rétablir son niveau d'expression permettrait de potentialiser l'action des 5-ASA sans en augmenter les effets secondaires. Cette quête a fait l'objet de la partie 2 de cette thèse.

Une seconde voie consiste à améliorer les stratégies thérapeutiques et l'utilisation des traitements disponibles. Par exemple, l'infliximab, anticorps anti-TNF α a obtenu son autorisation de mise sur le marché pour le traitement des colites gauches et pancolites et non des rectites, exclues des essais thérapeutiques. L'étude de son efficacité dans ce phénotype

particulier impactant sévèrement la qualité de vie des patients lorsqu'elles sont réfractaires permettrait d'en élargir l'indication. Egalement, les essais de phase III se limitent souvent à la première année de traitement voire aux 6 premiers mois. La RCH étant une maladie chronique nécessitant des traitements au long cours pour le maintien de la rémission, il reste nécessaire d'évaluer l'efficacité et la tolérance des différents traitements à long terme.

Enfin, il est probable que la modification de nos objectifs thérapeutiques est une voie nécessaire pour l'obtention d'une rémission profonde et prolongée. Les objectifs de rémission clinique, bien qu'importants, pour le patient sont probablement insuffisants pour le contrôle au long cours de sa maladie. L'obtention d'une rémission profonde définie par une disparition complète de l'inflammation au minimum endoscopique et/ou histologique devient un des objectifs thérapeutiques primordial. Ainsi, il est possible que l'adaptation des thérapeutiques, non en fonction des symptômes mais de l'aspect endoscopique, permette de modifier l'histoire naturelle de cette maladie. Cependant, il reste à prouver l'efficacité et la faisabilité d'une telle stratégie.

PARTIE 2 : APPROCHE THEORIQUE D'OPTIMISATION DES THERAPEUTIQUES AU COURS DE

LA RECTOCOLITE HEMORRAGIQUE

2.1.Généralité sur les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

L'origine des MICI est actuellement inconnue mais elle est probablement multifactorielle faisant intervenir des facteurs environnementaux, génétiques et immunologiques. Néanmoins, le mécanisme le plus communément admis est celui d'une réponse immunitaire intestinale anormale vis-à-vis de tout ou partie de la flore intestinale conduisant à des lésions intestinales chez des sujets génétiquement déterminés.(Danese and Fiocchi 2011) Cette hypothèse a été renforcée par la mise en évidence en 1999 d'un lien entre des mutations dans les gènes de deux récepteurs des bactéries (Nod2/CARD15, et Nod1/CARD4) et la maladie de Crohn.(Hugot et al. 2001) Cette rupture de la tolérance de la flore intestinale conduit à l'activation des voies de l'inflammation et une surexpression de nombreux facteurs pro-inflammatoires.

Cependant, les MICI englobent deux maladies différentes à la fois d'un point de vue clinique et physiopathologique. Par exemple, le rôle des bactéries semble moins prépondérant en raison d'une faible prévalence des anticorps antimicrobiens au cours de la RCH et d'une absence d'efficacité de l'antibiothérapie. A l'inverse, on questionne l'efficacité possible des probiotiques dans ce champ.(Danese and Fiocchi 2011) Par ailleurs et à la différence de l'atteinte transmurale observée au cours de la maladie de Crohn, la RCH est principalement marquée par une atteinte superficielle de la muqueuse et des cellules épithéliales. D'un point de vue immunologique, il n'existe pas de réponse de type Th1 mais plutôt une réponse de type Th2 avec une forte présence de cellule T natural killer : celle-ci est une source majeure d'interleukine 13, responsable d'une toxicité épithéliale et d'un dysfonctionnement de la barrière épithéliale. (Danese and Fiocchi 2011)

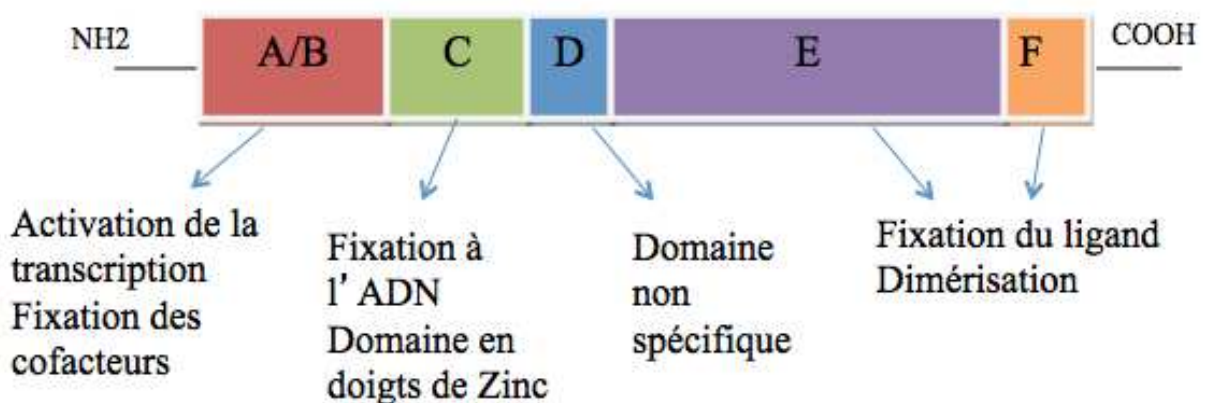
Ainsi, au cours de la RCH, la cellule épithéliale colique joue un rôle prépondérant dans la genèse et l'entretien de la réponse inflammatoire colique observée. Un des marqueurs fort du rôle de la muqueuse a été l'observation d'un déficit de l'expression épithéliale du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes gamma (PPAR γ) spécifique à la rectocolite hémorragique. Ce récepteur nucléaire est un acteur cellulaire clé en raison de ces actions anti-inflammatoires.

2.2. Le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes gamma (PPAR γ)

2.2.1. Structure de PPAR γ

PPAR γ appartient à la famille des récepteurs nucléaires, dont on connaît environ 70 membres. Ces facteurs de transcription sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques, telles que la prolifération, la différenciation, le développement et l'homéostasie.

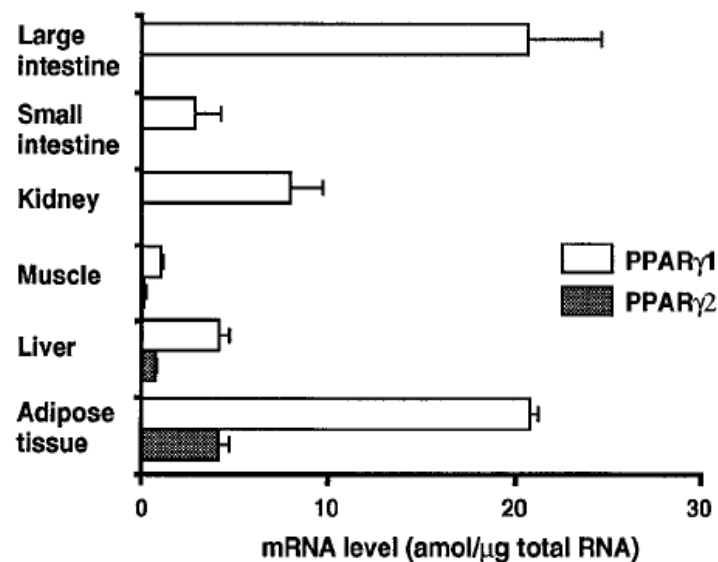
Le rôle de PPAR γ a été particulièrement étudié dans l'adipocyte et la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, la sensibilité à l'insuline, l'inflammation et la prolifération cellulaire. La structure de la protéine se décompose schématiquement en 4 domaines dont voici une représentation :



Il existe chez l'homme deux isoformes protéiques de PPAR γ , γ 1 et γ 2. PPAR γ 2 possède 30 AA supplémentaires en position N-terminale formant une hélice alpha qui lui conférerait un

potentiel d'activation ligand-indépendante supérieur à celui de PPAR γ 1. (Zieleniak et al. 2008)

Des régions promotrices différentes et un épissage alternatif sont à l'origine de ces 2 isoformes dont l'expression tissulaire et possiblement l'activation différent. PPAR γ 1 est ubiquitaire mais largement exprimé au niveau du tissu adipeux et colique. Son expression est quantitativement plus importante que celle de PPAR γ 2, qui lui, est retrouvé essentiellement au niveau adipeux.(Fajas et al. 1997, Lefebvre et al. 1999)



2.2.2. Mode d'action

Dans le noyau, PPAR γ s'hétérodimérise avec le récepteur X des rétinoïdes α (RXR α). La liaison d'un ligand déplace des co-répresseurs et recrute des co-activateurs, permettant, après fixation à un élément de réponse de type PPRE (PPAR Response Element) situé au niveau de la région promotrice, la régulation de la transcription des gènes cibles. (Schoonjans et al. 1997) Cet hétérodimère est fortement exprimé dans le côlon par les cellules épithéliales et les macrophages.(Fajas et al. 1997, Lefebvre et al. 1999)

Au-delà de cette cis-activation traditionnelle d'un récepteur nucléaire, des mécanismes de « trans-répression » ont été décrits avec PPAR γ . Dans cette configuration, PPAR γ joue un le

rôle de « chélateur » du second récepteur nucléaire bloquant ainsi son action. Ce mécanisme a été décrit en particulier avec le récepteur nucléaire NF- κ B, récepteur aux fortes propriétés pro-inflammatoires.

2.3. Propriétés anti-inflammatoires de PPAR γ

Dans plusieurs modèles expérimentaux, il a été observé un contrôle global de la réponse inflammatoire par PPAR γ au niveau du lymphocyte T avec une diminution de la production d'interféron-gamma et d'IL-17, la diminution de synthèse de l'IL12 et de chémokines par la cellule dendritique, une diminution de l'activation du macrophage ou encore une diminution du recrutement cellulaire par la diminution de synthèse de VCAM-1 par la cellule endothéliale.

Au niveau de la cellule épithéliale colique, de grandes voies de l'inflammation sont antagonisées par PPAR γ seul ou hétérodimérisé à RXR α , en particulier NF- κ B, AP-1, STAT (Ricote et al., 1998), mais aussi des kinases tel que c-Jun, et p38. (Desreumaux et al. 2001) Par ailleurs, PPAR γ -RXR α réprime la transcription de cytokines inflammatoires comme l'interleukine IL-1 β et le TNF α (Dubuquoy et al. 2003) et induit l'expression de cytokines anti-inflammatoires tel que l'IL10. (Thompson et al. 2007)

Au niveau du colon, son rôle dans la régulation de l'inflammation est connu et particulièrement intéressant au cours des MICI. Plusieurs travaux ont mis en évidence l'impact des propriétés anti-inflammatoires de PPAR γ *in vivo*, sa stimulation par des agonistes sélectifs diminuant par exemple l'intensité de colites chimiques induites chez les rongeurs. (Desreumaux et al. 2001, Su et al. 1999) De même, les souris hétérozygotes PPAR γ $-/+$ sont plus sensibles à l'induction d'une colite. (Rousseaux et al. 2005)

2.4.PPAR γ au cours de la RCH

Deux éléments font de PPAR γ un acteur capital de la rectocolite hémorragique. Le premier est thérapeutique. L'utilisation d'agoniste synthétique de PPAR γ (glitazone) induit la rémission chez les patients atteints de RCH.(Lewis et al. 2008b) Il a été montré également que PPAR γ est la cible des 5-ASA, médicament largement utilisé en raison de leur efficacité au cours de la RCH. Par ailleurs Dubuquoy et al, ont montré une perte majeure de l'expression épithéliale de PPAR γ au cours de la RCH. Ce déficit, absent au cours de la maladie de Crohn, est constaté autant en muqueuse saine que lésée, suggérant son implication dans la genèse de la maladie. L'origine de ce déficit n'est à ce jour pas expliquée.

2.5.Mécanismes de régulation de PPAR γ

La compréhension de cette perte d'expression permettrait une meilleure compréhension de la physiopathologie de la RCH et surtout permettre une optimisation thérapeutique soit par la création d'agoniste puissant et spécifique soit par le rétablissement de son expression. Restaurer une expression physiologique de PPAR γ permettrait de potentialiser les effets des 5-ASA, de renforcer ainsi leur efficacité et diminuer le risque de rechute d'un patient en rémission.

Les mécanismes de régulation de l'expression de PPAR γ sont mal connus. Le récepteur nucléaire est modestement inductible et son expression semble en partie contrôlée par l'environnement cellulaire. *In vivo*, l'expression en ARN messager et en protéine de PPAR γ est régulée négativement par un régime hypocalorique prolongé, le jeûne et le diabète insulino-dépendant. Inversement, l'obésité et un régime riche en acide gras augmente son expression.(Rieusset et al. 1999, Vidal-Puig et al. 1997) *In vitro*, les bactéries de la flore intestinale sont capables d'induire l'expression de PPAR γ , notamment par l'intermédiaire du toll-like récepteur 4 (TLR4). (Dubuquoy et al. 2003) Deux autres mécanismes, connus pour réguler l'expression de PPAR γ , ont été étudiés en utilisant principalement des lignées de

cellules adipocytaires : l'induction par les corticoïdes de l'expression de PPAR γ et une régulation négative de l'expression de PPAR γ en condition hypoxique.

Ce sont ces deux derniers mécanismes de régulation de l'expression de PPAR γ , par les corticoïdes et par les conditions de normoxie ou d'hypoxie qui ont été abordés dans le travail de thèse.

Intestinal steroidogenesis controls PPAR γ expression in the colon and is impaired during ulcerative colitis

Journal:	<i>Gut</i>
Manuscript ID:	Draft
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Bouguen, Guillaume; Université Lille Nord de France, Inserm U995 Langlois, Audrey; Université Lille Nord de France, Inserm U995 Djouina, Madjid; Université Lille Nord de France, Inserm U995 Branche, Julien; Université Lille Nord de France, Inserm U995 Koriche, Dine; Université Lille Nord de France, Inserm U995 Dewaeles, Edmone; Université Lille Nord de France, Inserm U995 Mongy, Alice; Université Lille Nord de France, Inserm U995 Auwerx, Johan; Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Laboratory of Integrative and Systems Physiology Colombel, Jean-Frederic; Icahn School of Medicine at Mount Sinai, Department of Gastroenterology Desreumaux, Pierre; Université Lille Nord de France, Inserm U995 Dubuquoy, Laurent; University Hospital, INSERM U995; Université Lille Nord de France, Inserm U995 Bertin, Benjamin; Inserm, Inserm U995
Keywords:	ULCERATIVE COLITIS, BASIC SCIENCES, INTESTINAL EPITHELIUM, MOLECULAR BIOLOGY, SIGNALING

**INTESTINAL STEROIDOGENESIS CONTROLS PPAR γ EXPRESSION IN THE COLON AND IS
IMPAIRED DURING ULCERATIVE COLITIS**

Short title: colonic cortisol defect during ulcerative colitis.

Guillaume Bouguen^{1,2,5,8,9,12}, Audrey Langlois^{1,2,8}, Madjid Djouina^{1,2}, Julien Branche^{1,3}, Dine Koriche^{1,7}, Edmone Erdual^{1,2}, Alice Mongy^{1,2}, Johan Auwerx^{6,10}, Jean-Frederic Colombel^{1,2,3,11}, Pierre Desreumaux^{1,2,3}, Laurent Dubuquoy^{1,2}, Benjamin Bertin^{1,2,4,12}

¹Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

²Inserm U995, F-59045 Lille, France

³CHU Lille, Service des Maladies de l'Appareil Digestif et de la Nutrition, Hôpital Claude Huriez, F-59037 Lille, France

⁴UDSL, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, F-59006 Lille, France

⁵Service des Maladies de l'Appareil digestif, University Hospital of Rennes, Pontchaillou, France

⁶Institut Clinique de la souris, F-67404 Illkirch, France

⁷CHU Lille, Service de Chirurgie Digestive et Transplantations, Hôpital Claude Huriez, F-59037 Lille, France

Grant support: This work was supported by research grants from Ferring, the Association François Aupetit and BREMICI (Shering-Plough).

Abbreviations: 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3 β HSD1; 5-aminosalicylic acids, 5-ASA; 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase 1, 11 β HSD1; colonic epithelial cells, CEC; Crohn's disease, CD; glucocorticoid, GC; liver receptor homolog-1, LRH-1; peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR; peroxisome proliferator response element, PPRE; ulcerative colitis, UC

¹²Correspondence to

Dr. Guillaume Bouguen, MD, Service des Maladies de l'Appareil Digestif, C.H.R.U. Pontchaillou, 35000 Rennes, France ; Phone: + 33 2 99 28 43 17/ Fax: + 33 2 99 28 43 17 ; Email address: gbouguen@free.fr

Or to

Benjamin Bertin, PhD., Inserm U995, Amphi J&K, Boulevard du Prof. Jules Leclercq, 59045 Lille cedex, France ; Phone +33 3 20 97 42 08 / Fax +33 3 20 97 42 32 ; Email address: benjamin.bertin-2@univ-lille2.fr

⁸These authors contributed equally to the work

⁹Current address: Inserm, UMR991, Liver Metabolism and Cancer, France; Université de Rennes 1, France; CHU Rennes, F-35033 Rennes, France; Service des Maladies de l'Appareil Digestif, University Hospital of Rennes, Pontchaillou, France.

CONFLICT OF INTEREST

GB received lecture fees from Ferring, MSD pharma, Abbvie.

AL, MD, JB, DK, EE, AM, JA, LD and BB has no conflict of interest to disclose.

PD has the following conflicts of interest for consulting fees, lecture fees or grant supports in the field of PPAR with Giuliani SpA, Milano, Italy, Procter and Gamble, London, UK, Shire Pharmaceuticals, USA and Lesaffre, Marcq en Baroeul, France.

J-F C received consulting fees from Giuliani SpA.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GB, AL, PD, LD, BB designed the study – GB, AL, MD, JB, EE, AM, LD, BB performed experiments and analysis of the data – GB, JFC, PD, LD, BB wrote the paper and participated to the critical reading of the manuscript – DK, JFC managed and provided human surgical samples – JA managed and provided transgenic mice.

ETAT DE SOUMISSION DU PAPIER

Manuscrit soumis à GUT en cours de révision mineure

ABSTRACT

Background & aims: Immune tolerance breakdown during ulcerative colitis (UC) is poorly understood but involves the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), a key factor of gut homeostasis. The mechanism of primary impaired expression of PPAR γ in colonic epithelial cells (CEC) during UC remains unknown. We hypothesized that glucocorticoids (GCs) production by CEC control epithelial expression of PPAR γ and a decreased GCs production may participate to the impaired expression of PPAR γ in UC.

Methods: Activation of PPAR γ in the colon was evaluated using transgenic mice for the luciferase gene under PPAR control (PPRE-Luc mice). Protein and mRNA expression of PPAR γ were evaluated from colon fragments and purified CEC of mice. Both cortisol production and steroidogenic factor expression were quantified in humans CEC of patients with UC and controls. Gene expression knock-down by short hairpin RNA strategy in Caco-2 cells was used for functional studies.

Results: GCs were able to raise luciferase activity in PPRE-Luc mice. Both in colon mice and in Caco-2 cells, PPAR γ expression was increased either with GCs or with an inducer of steroidogenesis and decreased after treatment with steroidogenesis inhibitor. Cortisol production and steroidogenic factor expression, such as liver receptor homolog-1(LRH-1), were decreased in CEC isolated from UC patients, which correlated with PPAR γ expression. Experiment on Caco-2 cells lacking LRH-1 expression confirmed that PPAR γ expression is indirectly under the control of LRH-1 through regulation of GC synthesis in CEC.

Conclusions: These results demonstrate the control of PPAR γ expression by intracellular CEC production of cortisol, and impaired CEC steroidogenesis may participate towards the decreased expression of PPAR γ in UC.

Key words: ulcerative colitis ; PPAR γ ; glucocorticoids ; LRH-1 ; intestinal epithelial cells

INTRODUCTION

Inflammatory bowel diseases, namely ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are chronic, relapsing immune-mediated disorders of the gastrointestinal tract of unknown etiology. Despite sharing some clinical manifestations, UC and CD are distinct pathophysiological diseases. In contrast to CD, inflammation during UC is mainly restricted to colonic mucosa. (Danese and Fiocchi 2011) Recent studies suggest that intestinal epithelial cell dysfunction may actively participate in the pathogenesis of UC. (Danese and Fiocchi 2011) Such dysfunction may be attributed to abnormal expression of inflammatory regulators in the colons of patients with UC, such as peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ).

The colon is a major tissue expressing PPAR γ , primarily in epithelial cells. (Dubuquoy et al. 2003, Fajas et al. 1997) PPAR γ belongs to the nuclear receptor superfamily of ligand-inducible transcription factors that has been described as a main regulator of adipocyte differentiation as well as a factor of insulin sensitization. (Tontonoz and Spiegelman 2008) In addition, PPAR γ is a critical regulator of the inflammatory response, (Jiang et al. 1998, Tontonoz and Spiegelman 2008) involving positive gene regulation by binding of the PPAR γ -RXR heterodimer to the peroxisome proliferator response element (PPRE) located in the promoter of target genes. PPAR γ also interferes with transcription factors involved in the inflammatory response, such as NF- κ B, AP-1 or ROR γ t, a mechanism often referred to as "transrepression". (Glass and Saijo 2010)

Evidences suggest a key anti-inflammatory role of PPAR γ during intestinal inflammation, where PPAR γ ligands inhibit inflammation and reduce disease severity in various experimental models of colitis. (Desreumaux et al. 2001, Rousseaux et al. 2005, Su et al. 1999) Conversely, disruption of PPAR γ expression in mouse colonic epithelial cells increases susceptibility to DSS-induced colitis. (Adachi et al. 2006) In patients with mild-to-moderate

UC, administration of PPAR γ agonists such as thiazolidinediones and 5-aminosalicylic acids (5-ASA) induced and maintained clinical remission.(Feagan and Macdonald 2012, Lewis et al. 2008b, Pedersen and Brynskov 2010) Of note, an impaired expression of PPAR γ mRNA and protein in the colonic epithelial cells was observed in patients with UC but not CD.(Dubuquoy et al. 2003, Pedersen and Brynskov 2010) Given the role of PPAR γ in colonic homeostasis and its therapeutic implications, this defect observed in inflamed and healthy colons of patients with UC suggests a primary role of colonic PPAR γ impairment in the pathophysiology of UC.(Dubuquoy et al. 2003) Importantly, the lack of PPAR γ expression may prevent the optimal efficacy of PPAR γ agonist. Thus, restoring normal levels of expression of this receptor in the colon of patients with UC may improve thiazolidinediones or 5-ASA treatment. However, etiology of impaired PPAR γ expression in colonic epithelial cells is still unknown.

This study investigates the regulation of expression of intestinal PPAR γ *in vitro* and *in vivo*. Given that glucocorticoids (GCs) increase PPAR γ expression in adipocytes and that epithelial cells of the intestinal crypts are a significant source of extra-adrenal endogenous GC in mice, the ability of GCs to control the expression of PPAR γ in the colon was assessed.(Cima et al. 2004) Our findings support the hypothesis that extra-adrenal production of GCs by the CEC controls PPAR γ expression. A defect in GC synthesis in colonic epithelial cells, related to specific liver receptor-homologue 1 (LRH-1) deficiency, is involved in the impaired expression of PPAR γ in UC. These results provide new insights into UC pathophysiology and steroid mechanisms of action, suggesting new therapeutic strategies.

MATERIAL AND METHODS

Animal procedure

Animal experiments were performed in the accredited Institution of Pasteur animal care facility (Institut Pasteur de Lille, France) according to governmental guidelines and animal ethical committee approval (n° B59-35009). Specific pathogen-free male C57BL/6 mice (7-8 weeks old) were obtained from Janvier Company (France). PPRE-Luc transgenic mice (7-11 weeks old) were obtained from the animal facility of the Pasteur Institute in Lille (France). Mice were housed 5 animals/cage, fed with a standard laboratory diet and given autoclaved tap water ad libitum. They were kept in an air-conditioned room with controlled temperature ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), humidity (65-70%), and day/night cycle (12h light, 12h dark). Mice were acclimated for 1 week before entering the study.

For methylprednisolone (Pfizer) treatment, mice received i.p. injection of 50 mg/kg dissolved in saline, whereas the control group received i.p. injections of saline solution alone. Injections were administered once a day for 4 days. Colon and ileum were dissected and snap frozen for RNA and protein isolation. Colonic epithelial cells isolated from mouse and human tissue were purified (described below). The colons of mice were pooled in each study group before purification in order to obtain adequate amounts of colonic epithelial cells.

For *in vivo* blocking of steroidogenesis, mice received metyrapone (Sigma-Aldrich[®], France) at a dose of 100 mg/kg in a volume of 100 μL of 0.9% saline solution (Sigma-Aldrich[®], France). Injections were performed once a day for three days at 5:00 pm and at 10:00 am on the fourth day. ((Is the reported time necessary here? So long as you say below that mice were equally sacrificed 4 hours after the last injection, I don't think it's necessary))The control group received saline solution. Mice were sacrificed 4 hours after the last injection. Colons were dissected out and snap frozen for further extractions.

Experiments with LPS and *ex-vivo* treatment with metyrapone were completed as previously described (Noti et al. 2010). Briefly, mice were treated with an i.p. injection of 100 µg LPS and sacrificed 3 hours later. The entire large intestine was removed, opened longitudinally and washed once with PBS/2% steroid free serum. Colonic tissue was cut into small pieces, randomly distributed to 4 wells of a 24-well plate and cultured for 2 or 6 h at 37°C in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) containing 10% of steroid free serum in the presence of either metyrapone (200 µg/ml) or DMSO.

Experiment on PPRE-luc mice.

In order to study PPAR activation *in vivo*, a transgenic mouse model expressing the luciferase gene after PPAR activation was created. The construction of this model is described elsewhere. (El-Jamal et al. 2013) PPRE-Luc mice received orally either methylprednisolone (1mg/kg, Pfizer) dissolved in RPMI medium (Roswell Park Memorial Institute medium, Invitrogen™, Cergy-Pontoise, France) or RPMI medium alone (vehicle). After a 7 days of treatment, 5-aminosalicylic acid dissolved in RPMI was intrarectally administered for an (in RPMI, intrarectal route) additional 5 days. Bioluminescence was measured at baseline, day 0, day 7 and day 12. Bioluminescence reporter imaging was assessed by a charge-coupled device camera (IVIS Imaging System 100 Series, Caliper Life Sciences). Mice received an i.p. injection of 120 mg/kg D-luciferin (Euromedex) 10 min before bioluminescence quantification under isofluran (2%) anesthesia. Mice were placed in the light-tight chamber where a grayscale photo of the animals was first taken with dimmed light. Photon emission was then integrated over a period of 5 min. Images were processed using Living Image®3.2 Software (Caliper Life Sciences, France). Luminescence measurements are expressed as the integration of the average brightness/pixel unit expressed as photon counts per second (p/s) on a surface representative to the rodent abdomen.

Patients and tissue

A local ethics committee approved the study and all subjects gave informed consent. Colonic samples were obtained from patients with an established diagnosis of UC according to international criteria and from control patients (patients underwent surgery for colorectal cancer and patients for diverticulitis of the sigmoid).

Intestinal epithelial cells were isolated from resected colonic specimens as previously described (Dubuquoy et al. 2003, Toy et al. 1997). Mucosal layers were dissected away from the muscular and serosal layers and incubated in RPMI medium 1640 containing 0.5 mmol/L dithiothreitol. Mucosal fragments were rinsed in calcium- and magnesium-free Hank's balanced salt solution supplemented with heat-inactivated fetal calf serum (5%), L-glutamine, and 500 mmol/L EDTA. The epithelial cells were collected at the interface of a Percoll gradient. The viability of epithelial cells was evaluated by Trypan blue staining, which was greater than 85%. After several washes, cells were frozen at -80°C. Purity was evaluated by PCR using A33, cytokeratin-18 and CD3 β oligonucleotides.

Cell culture

Caco-2 cells (ATCC n°CRL-2102) were cultured in drug-free Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) (Invitrogen™, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 20% heat-inactivated fetal-calf serum and 1% penicillin-streptomycin. The medium of Caco-2 cells was also supplemented with 1% MEM Non-essential Amino Acid Solution (Invitrogen™, Cergy-Pontoise, France).

PPAR γ knock-out IECs were obtained using the pSUPER.retro system (OligoEngine). Forward and reverse target sequences corresponding to nucleotides 105-123 of the human PPAR γ 1 mRNA (5'-GCCCTTCACTACTGTTGAC-3') and to nucleotides 653-671 of the

human LRH-1 variant1 mRNA (5'-AGGATCCATCTTCCTGGTT-3') were cloned into the BglII/XhoI restriction sites of the pSUPERretro vector (pRS) giving the ShPPAR and ShLRH-1 construct, respectively. A negative control pRS plasmid containing the sequence 5'-ACGCTGAGTACTTCGAAAT-3' targeted against the luciferase gene was also generated (ShLuc construct). Each construction was transfected in Caco-2 cells using Nucleofector technology from Amaxa Biosystems, according to the manufacturer's protocol. Stably transfected clones were selected 24h post-transfection with complete culture medium supplemented with puromycin (5µg/ml). The silencing of PPAR γ expression was checked by quantitative RT-PCR and western-blot analysis. The silencing of LRH-1 expression was checked by quantitative RT-PCR. Once established, ShPPAR, ShLRH-1 and ShLuc cell lines were maintained in complete medium supplemented with 2.5µg/ml puromycin.

Caco-2 stimulation experiments were conducted in 6-well culture plate at 37°C in a 5 % CO₂ atmosphere. Cells were seeded one day before stimulation and synchronized overnight with serum starvation for 16h. Medium was then removed and replaced by serum-free medium containing either steroid (dexamethasone 1µM; Sigma-Aldrich[®], France), metyrapone at 200 µg/mL (Sigma-Aldrich[®], France), or both. Serum-free medium supplemented with DMSO (0.1%) was used as control. After 24 hours of stimulation, the wells were rinsed three times with sterile PBS and cells were lysed with 1ml of TRIzol[®] reagent (Invitrogen[™], Cergy Pontoise, France). The plates were frozen at -80°C for subsequent RNA and protein extraction. In one experiment, cell treatment was continued during 24h in serum-free medium +/- dexamethasone (1µM) prior to extraction.

RNA and protein analysis

RNA and protein were isolated with the TRIzol® reagent according to the manufacturer's instructions. After treatment with DNase I Ribonuclease-free (Invitrogen™) at 37°C for 10 minutes, 1 µg of RNA was reverse-transcribed into complementary DNA using High Capacity cDNA reverse Transcription kit (Applied Biosystems). The retrotranscription reaction mixture was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using sense and anti-sense primers and SYBR® Green PCR master mix (Applied Biosystems). The samples were subjected to 40 PCR cycles using ABIPRISM 7700 instrument.

Total proteins obtained after TRIzol extractions were separated by polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotted on nitrocellulose membrane. PPAR γ was detected using a monoclonal rabbit antibody (C26H12) as primary antibody (Cell Signaling Technology®) and goat anti-rabbit IgG peroxydase conjugate (Jackson ImmunoResearch). After PPAR γ detection, nitrocellulose membranes were stripped and reprobed with a mouse monoclonal anti- β actin antibody (Sigma-Aldrich®, France) to assess equal protein loading.

Cortisol dosage

Intracellular cortisol was measured in intestinal epithelial cells from patients using the The DetectX® Cortisol Immunoassay kit (ArborAssays, MI, USA). Epithelial Cell pellets were resuspended in 300µl of dichloromethane and air-dried overnight under a chemical hood. The pellets were solubilized in 100µl of the provided Assay Buffer and cortisol was dosed in duplicate according to manufacturer's instructions. Epithelial cortisol concentration was determined using a cortisol standard curve and normalized with cell number.

For measuring cortisol in culture media, cortisol was first concentrated by freeze-drying. One ml of culture media was freeze-dried, resuspended in 100µl of assay buffer and cortisol was dose in duplicate according to manufacturer's instructions.

Statistical analysis

All graphics were drawn and analyzed with the GraphPad Prism 5 Software (GraphPad Software, San Diego, CA) and the StatXact v.7.0 (Cytel Studio) software using a nonparametric Wilcoxon-Mann-Whitney test. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. Correlation test were made using the nonparametric Spearman test. In each Figure *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

RESULTS

The association of steroids with 5-aminosalicylic acids increases the bioluminescent activity of transgenic PPRE-luc mice.

In order to approach both temporal and spatial regulation of PPAR γ expression and activation *in vivo*, PPRE-Luc mice were used to assess a potential relationship between steroids and PPAR γ expression *in vivo*. In this genetic model, luciferase activity from PPRE-Luc mice is a marker of PPAR γ activation. Based on the hypothesis that GCs induce PPAR γ expression without triggering its biological activity, we used a combination of methylprednisolone and a PPAR γ agonist (5-ASA) to determine whether GC is able to induce PPAR γ expression. As shown in Figure 1, intra-abdominal luciferase activity was significantly enhanced in co-treated mice compared to mice treated with vehicles or 5-ASA alone. This result suggested induction of PPAR γ expression in the abdominal cavity of mice by GC and its activation by 5-ASA leading to increase the overall activity of bioluminescence in PPRE-luc mice. Given the intrarectal administration of the PPAR γ agonist and the low bioavailability of 5-ASA, our results suggested that GC increased PPAR γ expression in the colon.

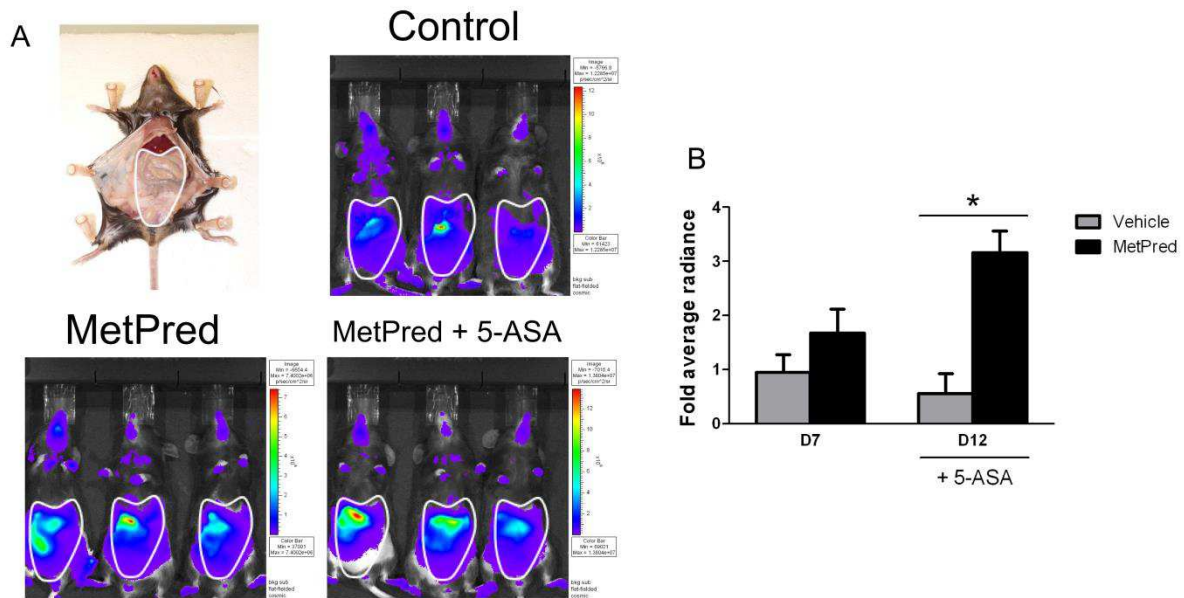


Figure 1: The combination of methylprednisolone and 5-aminosalicylate (5-ASA) increased the colonic bioluminescent activity of the PPRE-Luc mice. Bioluminescence activity from transgenic PPRE-luc mice were assessed by a charge-coupled device camera (CCD camera) to obtain optical imaging and photon counting of the luciferase activity of male PPRE-Luc mice after intra-peritoneal injection of 120 mg/kg of D-luciferin. **(A)** Pictures show the luminescence distribution of representative mice treated with RPMI (control), methylprednisolone (MetPred, day 7); RPMI + 5-ASA (5-ASA, day 12) and methylprednisolone + 5-ASA (Metpred+5-ASA, day 12). **(B)** Photon emission was quantified using an electronic grid drawn in the abdomen area below the liver area in mice treated with RPMI (vehicle) or methylprednisolone (MetPred). Results represent the mean±SEM. of the fold average radiance (photons/sec/cm²/sr) using bioluminescent activity measured at day 0 as a reference (n=3 animals per group; *, p=0.05).

Glucocorticoids control PPAR γ expression in epithelial colonic cells

To further explore regulation of PPAR γ expression by GC in the colon, variations of PPAR γ expression in the colon of C57BL/6 wild-type mice were assessed. Mice treated with methylprednisolone displayed a significant rise of PPAR γ mRNA expression restricted to the colon, without any variation in PPAR γ mRNA levels in small bowel of mice treated either with methylprednisolone or with vehicle (Figure 2A). Western blot analysis of colon samples showed that PPAR γ protein was also enhanced by steroid treatment (Figure 2B). These results indicate that GCs increased PPAR γ expression in the colon. The relationship between GCs and PPAR γ was confirmed using metyrapone, a well-known potent inhibitor of GC synthesis. As shown in Figure 2C, PPAR γ mRNA expression was significantly decreased in colon samples of mice treated with metyrapone compared to controls (Figure 2C), confirming the control of colonic expression of PPAR γ by GCs *in vivo*.

In order to determine whether GCs are able to regulate PPAR γ in colonic epithelial cells (CEC), CEC were isolated from mice treated with or without methylprednisolone and assessed for PPAR γ expression. The purity of isolated cells was assessed by PCR amplification of CEC markers (cytokeratin 18 and A33) and lymphocyte markers (CD3 ϵ) (supplementary Figure 1). Figures 2D and 2E show that both PPAR γ mRNA ($p < 0.05$) and PPAR γ protein were increased in purified colonic epithelial cells from methylprednisolone treated mice compared to untreated mice.

Taken together, the results demonstrate that GCs (endogenous and synthetic) control *in vivo* PPAR γ expression in the colon and this regulation occurred, at least in part, in colonic epithelial cells.

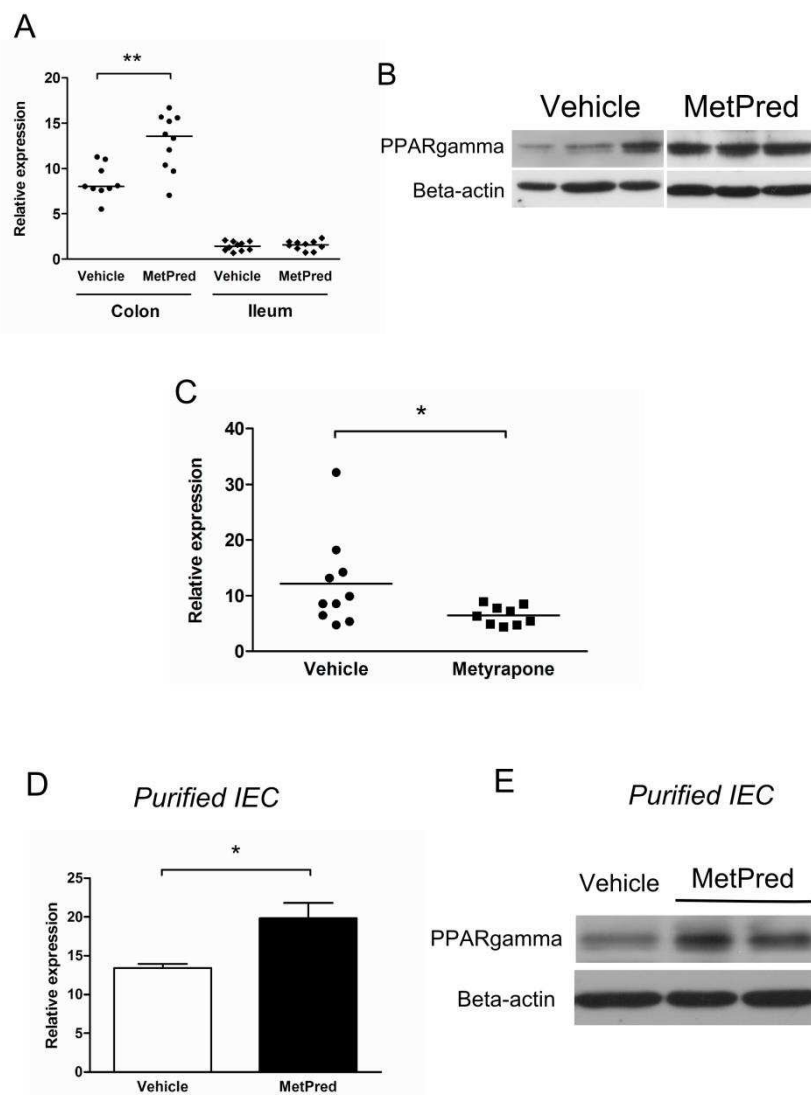


Figure 2: Up-regulation of colonic PPAR γ expression by glucocorticoids. (A) mRNA expression of PPAR γ in the colon and ileum of mice treated with methylprednisolone (n=10, MetPred) and compared to control animals (n=9, Vehicle). (B) Representative immunoblots of the colon of mice treated with methylprednisolone or vehicle showing that PPAR γ expression is increased in the colon of mice treated with methylprednisolone. Vehicle and MetPred samples were run in the same conditions in two separate gels. (C) mRNA expression level of PPAR γ in the colon following *in vivo* treatment of mice with metyrapone (100mg/kg; n=10). (D and E) Colonic epithelial cells were purified from mice treated with methylprednisolone (n=10, MetPred) or vehicle (n=10, Vehicle). The colons from 5 mice were pooled to ensure enough material for extraction. The expression of PPAR γ was analyzed at the mRNA (D) and protein levels (E). In each experiment, the mRNA expression of PPAR γ was assessed by quantitative RT-PCR and β -actin was used to normalize expression level. In dot plots, horizontal bar indicates the median value. In panel D, results represent the mean \pm SD. *, p<0.05; **, p<0.01.

CEC production of GCs regulates CEC PPAR γ expression.

Intestinal epithelial cells have recently been shown to be a significant source of extra-adrenal GC synthesis.(Cima et al. 2004, Sidler et al. 2011) *Ex vivo* fragments of mice colon were first stimulated with metyrapone and evaluated for PPAR γ expression to assess whether intestinal epithelial GC could be involved in the regulation of expression of PPAR γ in the colon. As shown in Figure 3A, the inhibition of steroidogenesis by metyrapone in colon fragments resulted in a decrease in PPAR γ protein expression as compared to DMSO treated colons, suggesting that intestinal steroidogenesis is involved in the regulation of PPAR γ expression. Next, PPAR γ expression was modulated by controlling CEC steroidogenesis using LPS, which induces intestinal GC synthesis.(Noti et al. 2010) Colonic tissues were harvested and stimulated *ex vivo* with or without metyrapone for 2 or 6 h to block GC synthesis. Results showed that LPS treatment led to a strong and significant rise in PPAR γ mRNA level in mouse colon (Figure 3B grey bars). When *in situ* GC synthesis was blocked with metyrapone, PPAR γ mRNA returned to its basal level within 2 h, demonstrating that colonic production of GC is able to regulate PPAR γ expression (Figure 3B black bar). After 6h, PPAR γ mRNA expression returned to its basal level in DMSO-treated tissue and remained lower in metyrapone-stimulated *ex vivo* colonic fragments. PPAR γ protein expression in colonic tissue was decreased in the entire colon at 6 hours following metyrapone treatment (Figure 3C). Importantly, there was a robust decrease in the PPAR γ protein level in intestinal epithelial cells purified from *ex vivo*-stimulated colonic tissues (Figure 3C), highlighting the control of PPAR γ expression specifically by CEC steroidogenesis.

Besides being a model of CEC, the Caco-2 colorectal cancer cell line expresses steroidogenic enzymes and produces significant amounts of cortisol which could be blocked with metyrapone.(Sidler et al. 2011) Stimulation of Caco-2 cells with metyrapone strongly impaired PPAR γ protein expression (Figure 3D). This reduction was reversible and normal levels of PPAR γ protein were recovered after changing the medium containing metyrapone

with fresh medium lacking steroidogenic blocker (Figure 3D). This recovery was even stronger when dexamethasone (a synthetic GC) was added to the fresh medium (Figure 3D). In addition, co-treatment of Caco-2 cells with dexamethasone and metyrapone was able to reverse the PPAR γ protein deficiency induced by metyrapone alone (Figure 3E). Altogether, these data suggest that intestinal GCs (cortisol in human or corticosterone in mice) produced by colonic epithelial cells are involved in the regulation of expression of PPAR γ within colonic epithelial cells.

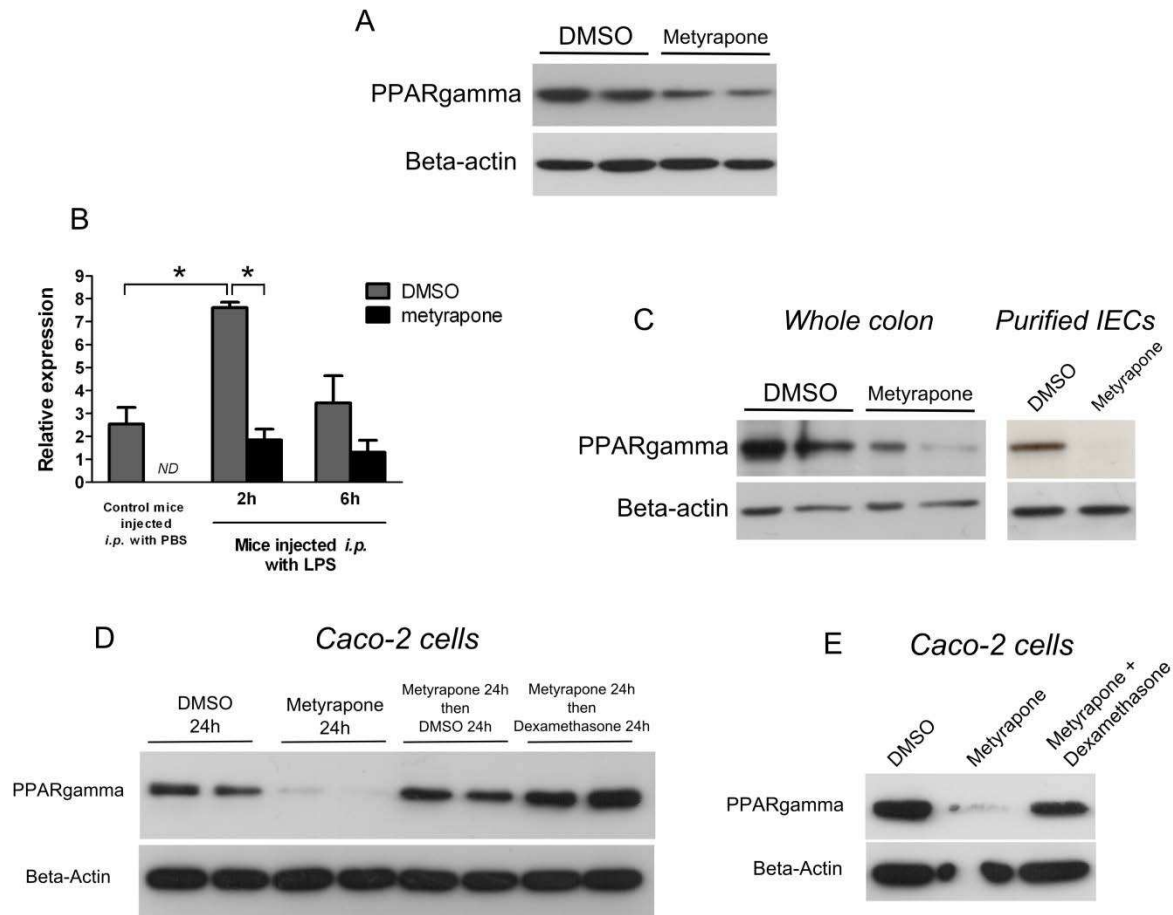


Figure 3: Glucocorticoids controlled PPAR γ expression in epithelial colonic cells (A) Detection of PPAR γ protein in mice colon stimulated *ex-vivo* with metyrapone. Proteins were extracted from fragments of colon stimulated with metyrapone (200 μ g/ml) or DMSO during 12 hours. **(B and C)** Detection of PPAR γ in the colon of mice that received intra-peritoneal injection of LPS prior *ex-vivo* treatment with metyrapone (200 μ g/ml) or DMSO **(B)** Modulation of expression of PPAR γ mRNA assessed by quantitative RT-PCR in the whole colon. Results represent the mean \pm SD of the relative PPAR γ expression normalized to β -actin level (*, $p < 0.05$). **(C)** Detection of PPAR γ protein in the colon of mice that received intra-peritoneal injection of LPS prior *ex-vivo* treatment with metyrapone (200 μ g/ml) or DMSO. Protein extracts were obtained from whole colons or purified intestinal epithelial cells. Protein extracts from purified IEC were obtained from two to three pooled colons. **(D and E)** Modulation of expression of PPAR γ assessed by western-blot in Caco-2 colorectal cancer cell line; **(D)** Analysis of protein extracts from Caco-2 cells treated with metyrapone (200 μ g/ml) or DMSO during 24h in steroid-free medium and further cultured 24h with DMSO or dexamethasone (a synthetic glucocorticoid) **(E)** Analysis of protein extracts from Caco-2 cells treated with metyrapone alone or concomitant to dexamethasone stimulation.

Patients with UC display a cortisol deficiency in intraepithelial cells.

Based on our previous results, a defect of endogenous cortisol synthesis in human CEC could impact PPAR γ expression in patients with UC. To test this hypothesis, epithelial cells were isolated from surgical specimens of patients with and without UC (Figure 4A). A significant decrease of expression of PPAR γ in CEC from UC specimens compared to controls was confirmed. Considering CEC cortisol production, intraepithelial cortisol concentrations from isolated CEC from UC specimens were significantly lower than these from cells purified from controls specimens (Figure 4B). Based on previous results demonstrating the ability of GC to regulate PPAR γ expression, this lack of cortisol strongly supports the link between colonic epithelial cortisol production deficiency and impaired PPAR γ expression during UC.

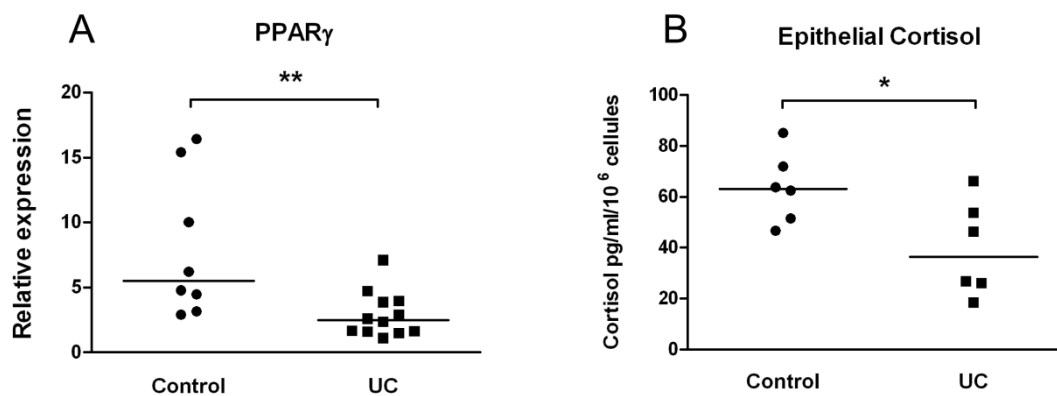


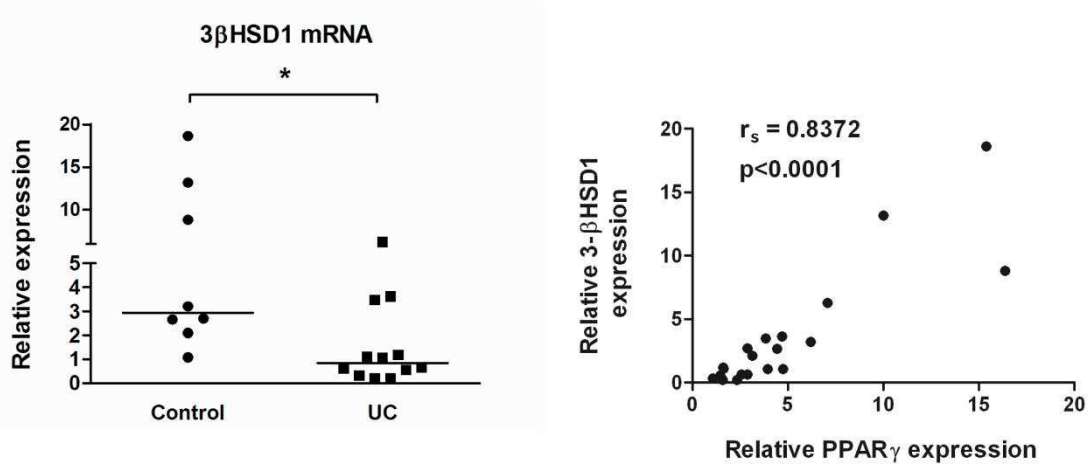
Figure 4: Defective epithelial expression of PPAR γ and production of cortisol by intestinal epithelial cells in patient with ulcerative colitis. (A) Intestinal epithelial cells were purified from resected colon specimens of controls subject (n=8) or untreated patients with UC (n=12). Quantitative expression of PPAR γ mRNA was assessed by real-time PCR and normalized to β -actin level (**, p<0.01). (B) Intestinal epithelial cells were purified from resected colon specimens of controls subject (n=6) or untreated patients with UC (n=6). Intracellular cortisol quantity was measured by ELISA as described in methods section and normalized to the cell count. Horizontal bar indicates the median value. *, p<0.05; **, p<0.01.

Decreased PPAR γ expression in patients with UC is correlated with LRH-1, and enzyme involved in steroidogenesis.

To strengthen the relationship between intestinal epithelium steroidogenesis and PPAR γ expression, the potential correlation between PPAR γ and other factors involved in the cortisol synthesis was assessed (see supplementary Figure 2 for a description of the cortisol synthesis pathway). Colonic UC specimens displayed an overall decrease of nearly all steroidogenesis enzymes compared to control specimens, with a significant decrease in mRNA expression of 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 (3 β HSD1, 3 β HSD2) and 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11 β HSD1) (Figure 5A and supplementary Figure 3). A strong correlation between the expression level of PPAR γ and 3 β HSD1 was observed ($r_s = 0.8372$; $p < 0.0001$) (Figure 5A). Liver receptor homologue-1 (LRH-1, NR5a2) is a nuclear receptor characterized as being a critical regulator of steroidogenic enzyme. (Mueller et al. 2006) In this study, LRH-1 expression was significantly decreased specifically in purified colonic epithelial cells from patients with UC ($p < 0.001$), and correlated with PPAR γ mRNA impaired expression ($r_s = 0.8191$; $p < 0.0001$) (Figure 5B). Transcription levels of impaired steroidogenic enzymes in UC patients correlated with those from LRH-1 ($r_s = 0.7729$, $p < 0.0001$ between 3 β HSD-1 and LRH-1; $r_s = 0.6321$, $p < 0.05$ between LRH-1 and 3 β HSD-2; $r_s = 0.6397$, $p < 0.01$ between LRH-1 and 11 β HSD1) (see supplementary Figure 3).

These data demonstrate that the steroidogenic pathway is disrupted in colonic epithelial cells of patients with UC with a direct impact on PPAR γ expression. They also suggest that LRH-1 could be indirectly involved in the control of PPAR γ expression by regulating cortisol production.

A. 3 β HSD1



B. LRH-1

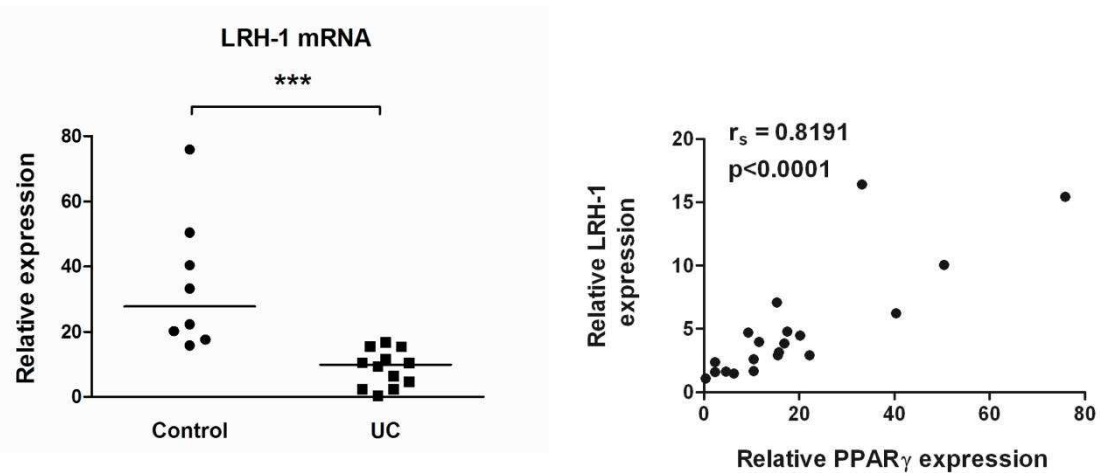


Figure 5: Defective epithelial expression of steroidogenic factors in patient with ulcerative colitis. In addition to the lack of PPAR γ expression in colonocytes of patients with UC, a decrease of (A) 3- β HSD1 and (B) LRH-1 was observed. Intestinal epithelial cells were purified from resected colon specimens of control subjects (n=8) or untreated patients with UC (n=12). Quantitative expression of mRNA was assessed by real-time PCR and normalized to β -actin level. Horizontal bar indicates the median value. (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

LRH-1 regulates PPAR γ expression via GC synthesis in CEC.

In order to provide evidence of LRH-1 involvement in the control of PPAR γ expression through GC production, LRH-1 expression in Caco-2 cells was down-regulated using RNA interference. A short hairpin RNA strategy was used to create a stable cell line in which the expression of LRH-1 was reduced by 80% compared to the control cell line (named ShLuc), which expressed a control shRNA directed against the luciferase gene (Figure 6A). Downregulation of LRH-1 resulted in a reduction of cortisol synthesis and release (Figure 6B). The ShLRH-1 cell line expressed low level of 3 β HSD1 (reduction of 75%) and 3 β HSD2 (reduction of 80%) enzymes as compared to ShLuc control cells (Figure 6C), confirming the ability of LRH-1 to control the expression of 3 β HSD enzymes as suggested in CEC from patients with UC. In addition, downregulation of LRH-1 led to a nearly 40% reduction in mRNA expression encoding PPAR α resulting in a strong decrease of PPAR γ protein production (Figure 6D). In order to assess whether decreased expression of PPAR γ in LRH-1 deficient cells was due to the lack of cortisol synthesis rather than a direct control of PPAR γ gene expression by LRH-1, ShLRH-1 cells were treated with an exogenous GC that aimed to restore a normal expression of PPAR γ . Treatment with dexamethasone on ShLRH-1 cells reestablished both mRNA and protein expression level of PPAR γ to a normal state (Figure 6E).

It could be argued that PPAR γ would be upstream of LRH-1, regulating LRH-1 expression which would further impact steroidogenic enzyme expression. The same ShRNA strategy was therefore used to create a stable Caco-2 cell line in which PPAR γ expression was strongly reduced (Figure 7A). As shown in Figure 7B and 7C, neither the expression of LRH-1 nor the expression of 3 β HSD1 and 2 were changed in ShPPAR γ cell line as compared to ShLuc control cells, supporting that PPAR γ does not control the expression of LRH-1 and steroidogenic enzymes. These results confirm the regulation pathway identified in colonic

epithelial cells in UC patients, in which LRH-1 is upstream to PPAR γ and controls the cortisol synthesis regulation expression that ultimately regulates PPAR γ expression.

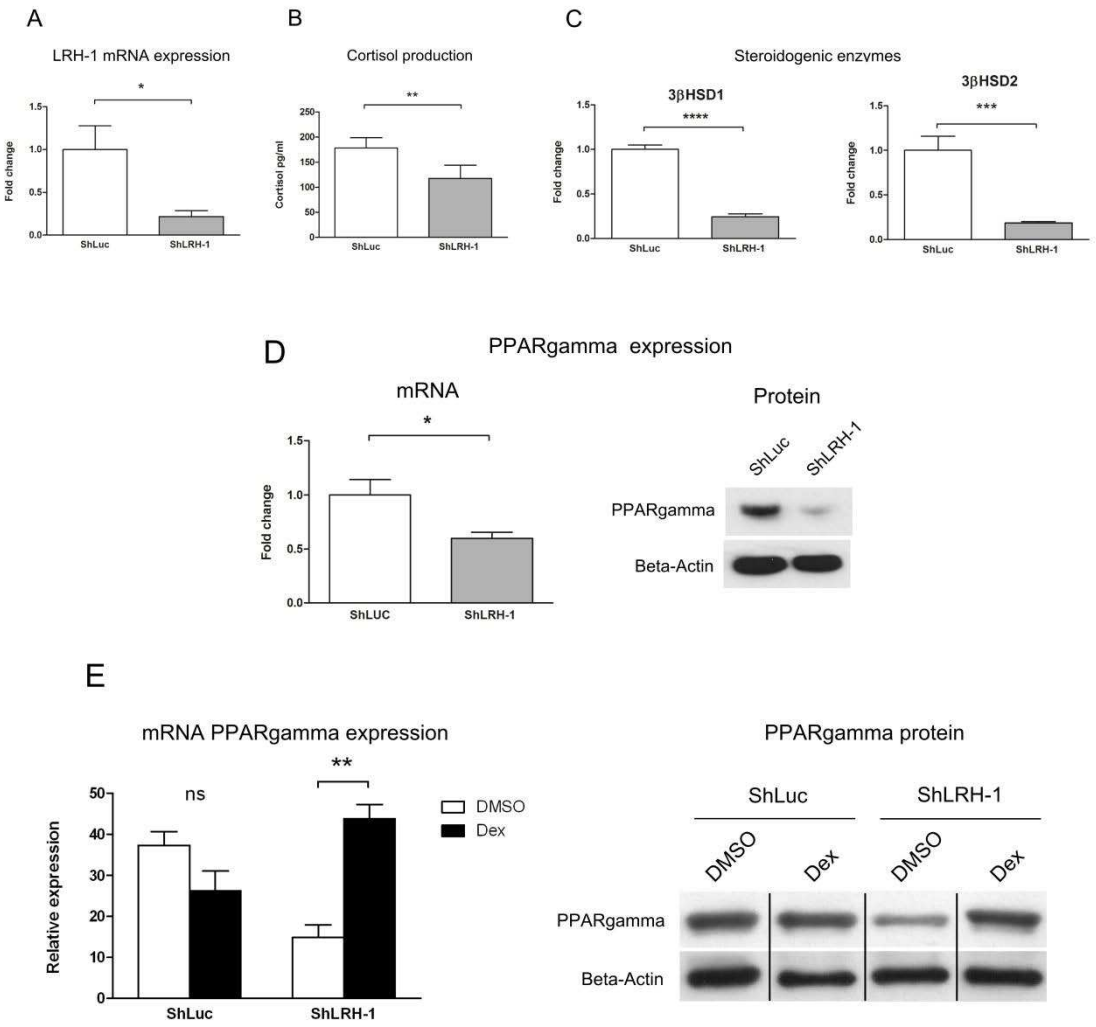


Figure 6: LRH-1 knock-down in Caco-2 cells led to PPAR γ decrease through GC synthesis control. ShRNA technology was used to create stable Caco-2 colorectal cell line knock-down for LRH-1 gene expression (ShLRH-1). Control cell line (ShLuc) expressed shRNA directed against the luciferase gene. **(A)** ShLRH-1 cell line expressed significantly less transcripts of LRH-1. (*, $p < 0.05$). **(B)** ShLRH-1 cell line produced significantly less cortisol than ShLuc cell line. Cortisol was measured in culture supernatant as described in methods section. **(C)** ShLRH-1 cell line expressed significantly less transcripts of 3 β HSD1 and 3 β HSD2 (***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$). **(D)** ShLRH-1 cell line expressed significantly less PPAR γ than ShLuc cell line (*, $p < 0.05$). **(E)** PPAR γ expression level was restored by stimulation of ShLRH-1 cells with dexamethasone (1 μ M during 24h) (**, $p < 0.01$).

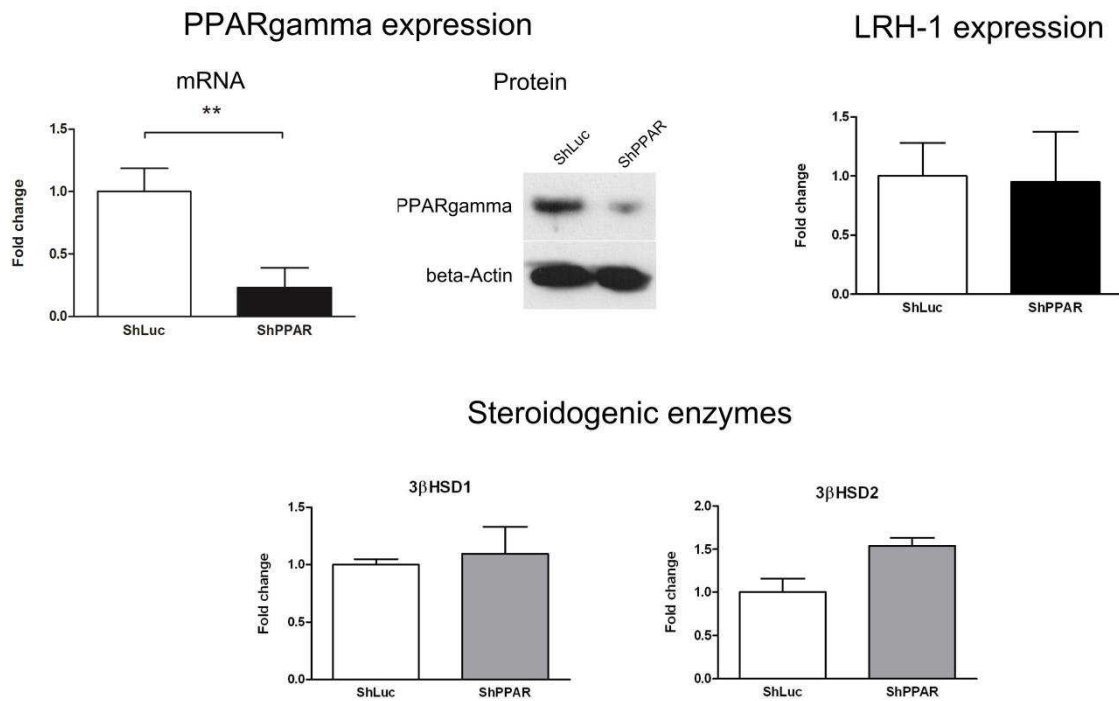


Figure 7: PPAR γ did not control steroidogenic enzyme expression nor the expression of LRH-1 (A) ShRNA technology was used to create a stable Caco-2 colorectal cell line knock-out for PPAR γ gene expression. ShPPAR γ cell line expressed significantly less transcripts of PPAR γ (**, $p < 0.01$). Quantitative expression of PPAR γ mRNA was assessed by real-time PCR. Result represents the mean values of sixplicate \pm SD of the fold change of PPAR γ expression normalized to β -actin level. The expression level measured in ShLuc cells was used as a reference and set to one. PPAR γ protein level was assessed by western-blot. (B) and (C) The expression levels of LRH-1, 3 β HSD1 and 3 β HSD2 were not modulated in ShPPAR γ cells compared to ShLuc cells. Quantitative expression of mRNA was assessed by real-time PCR. Result represents the mean values of sixplicate \pm SD of the fold change of of LRH-1, 3 β HSD1 and 3 β HSD2 expressions normalized to β -actin level. The expression levels measured in ShLuc cells were used as a reference and set to one.

DISCUSSION

This study demonstrated that PPAR γ expression in CEC is directly regulated by glucocorticoids *in vitro* and *in vivo* and provides a key role of extra adrenal source of cortisol in human CEC. It also highlighted the defect of cortisol production by colonocytes as a potential key molecular event involved in the pathophysiology of UC.

Since the 1950's, immunosuppressive and anti-inflammatory properties of GCs have been well recognized and used to treat inflammatory and immune-mediated disorders, although the mechanism of action remains to be understood.(De Bosscher and Haegeman 2009) GCs may have rapid non-genomic effects, such as non-specific interactions of GCs with cytoplasmic and mitochondrial membranes, or mediated by the cytosolic GC receptor and by a membrane-bound GC receptor.(Stahn et al. 2007) However, the main effect of GCs is to control the expression of several genes through activation of the GC receptor that bind specific GC response elements (GRE) in the promoter region of steroid-sensitive genes. (Stahn et al. 2007) *In silico* analysis of the PPAR γ promoter region reveals several putative GREs with high probability of affinity, suggesting that GR might regulate PPAR γ expression by direct binding on the promoter region. However, further investigations are required to fully understand the link between PPAR γ and GC. Indeed, it seems that only few genes regulated by GC contain GRE in their promoter region, making it difficult to identify the *bona fide* GC target genes.(De Bosscher and Haegeman 2009)

Upstream of cortisol, the specific decrease of LRH-1 in CEC is of particular interest. First, lack of LRH-1 expression has been associated with an increased susceptibility of induced colitis in mice and LRH-1 level is reduced in mucosa of patients with UC.(Coste et al. 2007) Second, a recent meta-analysis of genome-wide association scans identified 163 loci associated with IBD. A single nucleotide polymorphism of LRH-1 was found to be associated with UC.(Jostins et al. 2012) The current study strengthens the role of LRH-1 during UC

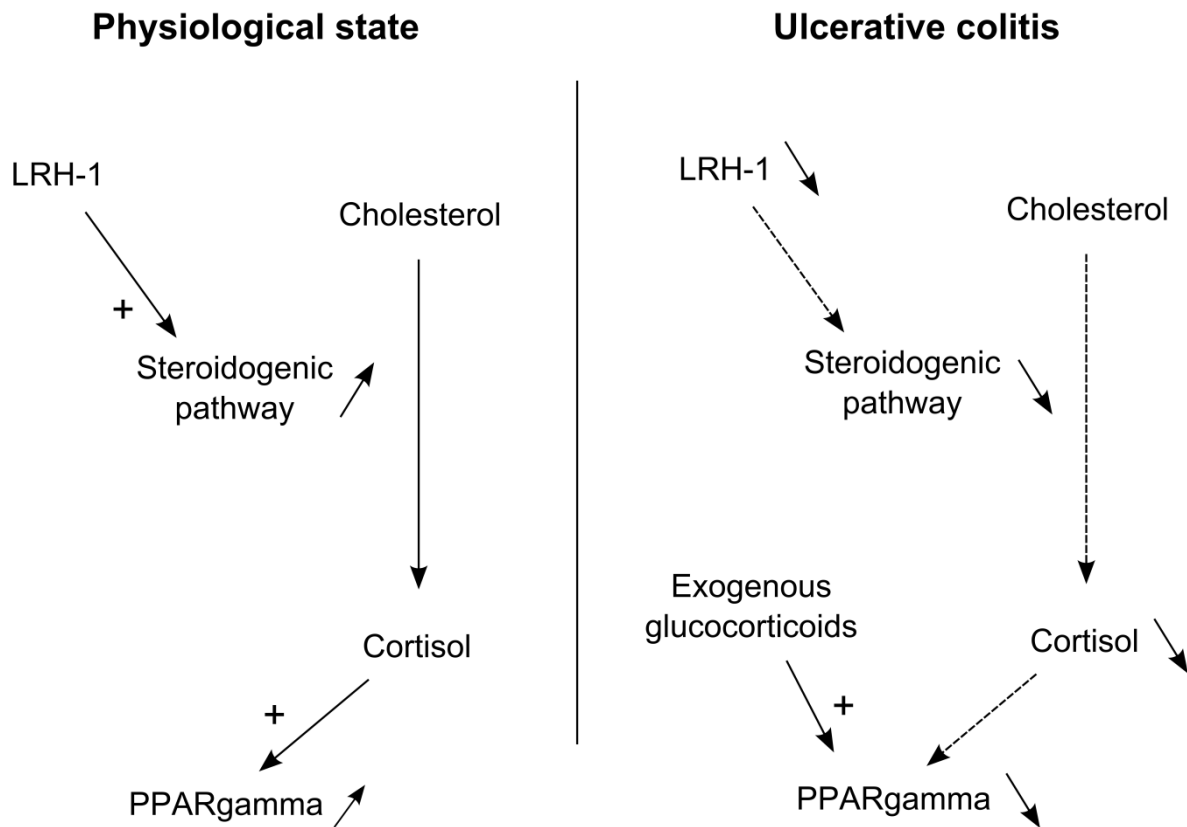
pathophysiology and supports an indirect relationship between two nuclear receptors in the colonic epithelial cells. LRH-1 is a transcription factor critically involved in glucocorticoid synthesis.(Mueller et al. 2006) Initially, LRH-1 was found to regulate CYP11A1 in CEC, enzyme converting cholesterol to pregnenolone, and CYP11B1, an enzyme catalyzing inactive 11-deoxycorticosterone to active corticosterone. (Mueller et al. 2006) Additionally, the control of two other enzymes involved in the steroidogenesis was observed in caco-2 cells lacking LRH-1, namely 3- β HSD1 and 3- β HSD2 which convert (17-OH-)pregnenolone to (17-OH-)progesterone, consistent with findings in ovarian cells. (Peng et al. 2003) These results extend the control of LRH-1 as the main factor of steroidogenic enzyme expression and ultimately cortisol production in CEC. Beyond the model, these results were reproducible in patients with UC, showing decreased cortisol production and ultimately PPAR γ expression.

Endogenous local glucocorticoids from CEC are of growing interest with an increased insight to their numerous properties, particularly by the ability to maintain immune homeostasis in the intestinal mucosa. Absence of endogenous GC leads to increase disease severity in experimental models of colitis.(Coste et al. 2007) Immunoregulatory properties have been assigned to this extra-adrenal source of GC, such as modulation of intestinal T lymphocyte activation upon viral infection, (Cima et al. 2004) or suppression of T-cell activation and apoptosis promotion. (Sidler et al. 2011) Recently, endogenous GC has been shown to alleviate endoplasmic reticulum stress that triggers and maintains inflammation in patients with active inflammatory bowel disease.(Das et al. 2013, Kaser et al. 2008) However, none of these studies described cortisol production in humans and the impact of its deficiency in epithelial cells in UC specimens. The link between endogenous glucocorticoid synthesis and PPAR γ expression in CEC opens a new outlook on understanding gut homeostasis. Because of anti-inflammatory properties and involvement in UC onset, maintaining expression of PPAR γ in CEC is critical. (Dubuquoy et al. 2003) As a ligand-inducible transcription factor, activity of PPAR γ is related both to the level of expression and the presence of a ligand. An

important aspect of the biology of PPAR γ is the ability to be activated by several natural ligands such as fatty acids, their metabolites and their eicosanoid derivatives usually present in human gut.(Bull et al. 2003, Itoh et al. 2008) Restoring PPAR γ expression is a potential target to overcome treatment failure and maintain remission for patients with UC.(Pedersen and Brynskov 2010)

PPAR γ ligands, such as 5-ASA or glitazone, and glucocorticoids are effective in induction of clinical remission as well as mucosal healing in patients with UC. Moreover, a growing body of evidence suggests that combination therapy with oral or rectally administered 5-ASA agents and corticosteroids may result in a higher rate of remission compared to monotherapy in patients with UC.(Regueiro et al. 2006a, b) The combination of beclomethasone dipropionate, a synthetic corticosteroid and oral or enema of mesalamine (a 5-ASA) were significantly better compared to monotherapy with either corticosteroid or 5-ASA to achieve clinical, endoscopic and histological remission among patients with active UC.(Mulder et al. 1996) Although the higher efficacy of combination therapy may be due in part to the additive effects of the two drugs, our results also support that the efficacy of the combination therapy may be due to their synergistic effects. Highlighted on PPRE-luc mice, synthetic GC potentiates the effect of 5-ASA by up-regulating the expression of PPAR γ , leading to enhance its activity and efficacy of 5-ASA. Adverse events associated with systemic corticosteroid therapy preclude their use except for budesonide, a synthetic corticoid that targets the intestinal mucosa and acts as a topical steroid due to first-pass metabolic processes leading to minimal systemic effects.(Edsbacker et al. 1987) New tablet coatings such as multimatrix structure allow the release of the drug throughout the colon, targeting specifically CEC.(Sandborn et al. 2012, Travis S. P. et al. 2014) While budesonide MMX[®] is effective in inducing and maintaining remission in UC,(Sandborn et al. 2012, Travis S. P. et al. 2014) this study suggests better outcomes with combination therapy and new therapeutic approaches to avoid systemic steroid side effects by targeting the cortisol production of CEC.

Impaired intraepithelial steroidogenesis in the human colon led to the impaired expression of PPAR γ in UC patients. A new anti-inflammatory property of GC and a new mechanism of action for PPAR γ expression regulation in CEC were identified. Restoring PPAR γ expression in epithelial cells by acting on intraepithelial steroidogenesis could be an alternative strategy for patients with UC alone or in addition to PPAR γ ligand.



Schematic representation of the control of PPAR γ expression by LRH-1 through intracellular cortisol production in intestinal epithelial cell. In physiological state, (left panel) normal LRH-1 expression maintain extra-adrenal production of cortisol able to maintain PPAR γ expression in intestinal epithelial cells. During ulcerative colitis (right panel) lack of LRH-1 leads to decrease the mitochondrial production of cortisol by colonocyte that ultimately impact on PPAR γ expression. Reestablishment of PPAR γ expression occurs in case corticosteroid use.

**MODULATION DE L'EXPRESSION DE PPAR γ PAR L'HYPOXIE AU COURS DE
LA RECTOCOLITE HÉMORRAGIQUE ET EFFET DU SILDÉNAFIL SUR SON
EXPRESSION**

G. Bouguen^{1,2}, J-B Delobel^{1,2}, C. Corlu², C. Rauch², B. Clement², L. Siproudhis^{1,2}, L. Dubuquoy³

1. Service des Maladies de l'Appareil Digestif, CHU Pontchaillou, Rennes, France,

2. INSERM U991, université de Rennes 1, France,

3. Inserm U995, Université Lille Nord de France, Lille, France

Résumé

Introduction: En raison de ses propriétés anti-inflammatoires, la diminution primitive de l'expression des proliférateurs de peroxyosomes γ (PPAR γ) est impliquée dans la genèse et le maintien de la réponse inflammatoire au cours de la rectocolite hémorragique (RCH). Les raisons de ce déficit restent mal déterminées. L'hypoxie muqueuse contribue également à la physiopathologie de la RCH. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'impact de l'hypoxie sur l'expression épithéliale de PPAR γ et d'appréhender les mécanismes moléculaires sous-jacents, en particulier l'implication de microRNA induit en hypoxie (miR-27a) et de HIF-1 α , protéine de réponse au stress hypoxique

Matériels et Méthodes: *In vitro*, l'expression ARNm et protéique de PPAR γ étaient quantifiée sur différentes lignées cellulaires épithéliales après 1) mise en condition hypoxique à 1%, 2) après induction chimique de HIF-1 α , 3) après stimulation par le sildénafil et 4) Après transfection de miR-27a ou de miR-27a antisens. L'expression de miR-27a était évaluée par RT-PCR. *Ex vivo*, les variations de l'expression de PPAR γ étaient étudiées à partir de muqueuses de pièces opératoires coliques de sujets contrôles (n = 10) ou de malades avec RCH (n = 7). **Résultats:** *In vitro*, l'hypoxie sur les lignées cellulaires Caco-2 et HT29 diminuait de plus de 50% l'expression de PPAR γ (mRNA et protéine) à 48h par rapport à la condition normoxique. L'hypoxie à 1% induisait également l'expression de miR-27-a. Par contre, l'induction chimique de HIF-1 α n'impactait ni l'expression de PPAR γ , ni celle de miR-27a, soulignant le caractère HIF indépendant de la modulation de leur expression en hypoxie. La surexpression de miR-27a par transfection de cellules HT29 en condition normoxique diminuait l'expression de PPAR γ . Inversement, l'inhibition de la surexpression en hypoxie de miR-27a par miR-antisens prévenait la diminution de l'expression de PPAR γ . *Ex vivo*, la diminution de l'expression muqueuse de PPAR γ au cours de la rectocolite hémorragique était confirmée et miR-27a tendait à être surexprimé chez les patients atteints de RCH par rapport aux sujets contrôles. Fait intéressant, *in vitro*, l'utilisation de sildénafil sur culture cellulaire en condition hypoxique augmentait l'expression de PPAR γ . L'augmentation de l'expression de PPAR γ était dose dépendante. En parallèle, l'utilisation de sildénafil diminuait la surexpression de miR-27a en hypoxie

Conclusion

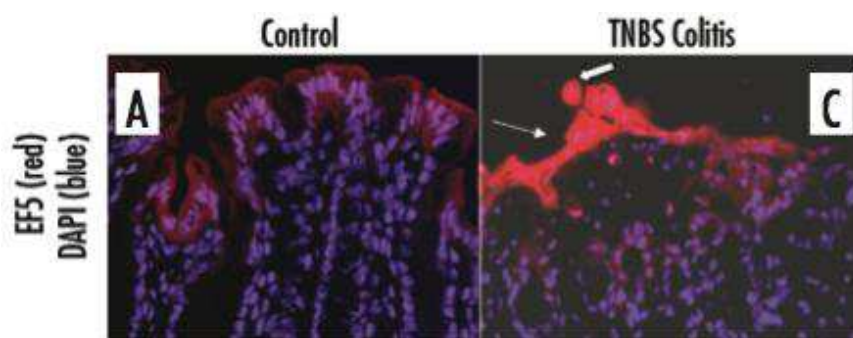
L'hypoxie diminue l'expression épithéliale colique de PPAR γ . MiR-27a est un des principaux modulateurs de l'expression de PPAR γ en condition hypoxique et semble augmenté au cours de la RCH. Le sildénafil semble restaurer l'expression épithéliale de PPAR γ ce qui en fait une piste thérapeutique très intéressante pour la prise en charge de la RCH.

- **Rectocolite hémorragique : une maladie vasculaire ?**

Il peut paraître surprenant de s'intéresser à l'hypoxie au cours de la RCH. Cependant, de nombreux arguments mettent en exergue l'hypothèse d'une hypoxie muqueuse à l'origine de la maladie. L'atteinte macroscopique au cours de la rectocolite hémorragique est continue et la colite résultante présente toujours une limite nette avec la muqueuse saine sus jacente, appelée zone de démarcation, à l'image des pathologies vasculaires ischémiques du colon. L'hypothèse d'une dysfonction vasculaire a été évoquée du fait de l'atteinte et de la distribution des lésions au cours de la RCH. Celle-ci concerne plus particulièrement la microvascularisation muqueuse, et elle est corrélée à l'étendue et la sévérité de l'atteinte, le défaut de cicatrisation muqueuse participant à l'évolution chronique. Son implication dans la genèse de la maladie reste néanmoins controversée.

Pour explorer cette hypothèse, des études anciennes basées sur la (micro)angiographie de pièces opératoires ont identifié des anomalies de l'architecture des moyens et petits vaisseaux suggérant une relation entre l'anatomie vasculaire, la colite et la zone de démarcation proximale des lésions muqueuses au cours de la RCH.(Hamilton et al. 1995) D'autres données basées sur des techniques de lavage de radio-isotopes vont dans ce sens en montrant une diminution du flux sanguin en situation d'inflammation chronique au cours des MICI. (Hulten et al. 1977) Par ailleurs, l'implication d'une dysfonction endothéliale liée à un défaut de production de NO (conduisant à un défaut de relaxation de la musculature lisse vasculaire) a été clairement identifiée chez ces patients. Cette dysfonction a été mise en évidence à distance du côlon atteint, et à un stade très précoce de la maladie, suggérant sa participation à la pathogénie de la RCH. Enfin, l'analyse par spectrométrie de réflectance de la saturation en oxygène de l'hémoglobine a montré une baisse significative de l'oxygénation muqueuse chez les patients atteints de RCH par rapport à des sujets contrôles.(Tsuji et al. 1995)

Plus récemment, la biologie moléculaire et l'immunohistochimie ont apporté des arguments forts en faveur du rôle de l'hypoxie au cours de la RCH. Karhausen et al, ont ainsi montré l'existence d'une hypoxie physiologique localisée au niveau de l'épithélium intestinal.(Karhausen et al. 2005) En cas d'inflammation, cette composante hypoxique se majore considérablement comme en témoigne l'accumulation de nitroimidazole, un colorant dont le métabolisme intracellulaire dépend de la concentration en oxygène et qui s'accumule en cas d'hypoxie.



Ces données sont à mettre en parallèle avec l'augmentation, au cours de la RCH, de l'expression de HIF-1 α , facteur de transcription nucléaire et véritable chef d'orchestre de l'adaptation cellulaire à l'hypoxie. (Giatromanolaki et al. 2003) Par ailleurs, plusieurs études ont identifié par microarray, sur un modèle de cellules épithéliales coliques, un groupe de gènes dont l'expression varie en situation d'hypoxie. Ces gènes ont été identifiés par la suite comme d'importants acteurs du maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale, dont l'expression étaient régulée par HIF-1 α .

L'ensemble de ces données moléculaires (anomalies induites par l'hypoxie) et anatomiques (anomalie de l'architecture vasculaire) suggère la présence d'une hypoxie au sein de la muqueuse des patients atteints de RCH possiblement primitive, et il est de plus en plus clair

que l'inflammation et l'hypoxie constituent un cercle vicieux au sein duquel elles interfèrent l'une avec l'autre et participent à l'aggravation de l'atteinte muqueuse.

- **Hypoxie et PPAR γ**

La régulation de l'expression de PPAR γ par l'hypoxie a été peu étudiée. A notre connaissance, deux précédents travaux ont mis en évidence ce lien entre hypoxie et PPAR γ sur des modèles non épithéliales coliques. En condition hypoxique, l'expression de PPAR γ était significativement réprimée, et associée à une diminution de son activité anti-inflammatoire évaluée par l'expression de MCP-1 au niveau des cellules tubulaires rénales.(Li et al. 2007) Dans un second travail sur l'adipocyte, il existait également une forte diminution de l'expression de PPAR γ bloquant alors la différenciation adipocytaire. Le mécanisme de régulation de l'expression de PPAR γ en hypoxie reste à établir précisément mais pourrait impliquer HIF-1 α ou une famille de microRNA, les miR-27a et b. Dans les travaux sur l'adipocyte, la surexpression de miR-27 inhibait l'induction de PPAR γ en hypoxie.(Lin et al. 2009) En outre, il semble que l'expression de miR27 soit fortement augmenté dans les muqueuses des patients atteints de RCH, mais n'a pas été étudié précisément dans la cellule épithéliale colique. (Van der Goten et al. 2012)

L'étude de cette relation entre hypoxie et PPAR pourrait également ouvrir de nouvelles opportunités thérapeutiques. Sur l'adipocyte, il a été montré que la stimulation de cellule 3T3L1 par le sildénafil (inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5 connu pour ses propriétés vasodilatatrices) favorisait l'adipogénèse en parallèle d'une induction franche et dose-dépendante de PPAR γ .(Zhang et al. 2010) De plus, cette molécule, du fait de ses propriétés vasodilatatrices, a été utilisée avec succès dans le traitement des troubles de la fonction érectile et l'hypertension artérielle pulmonaire. Sa capacité à potentialiser l'effet du

NO et donc, potentiellement, la vascularisation tissulaire associée à l'induction de PPAR γ dont on a vu les propriétés protectrices au niveau colique en font une molécule d'intérêt.

Notre hypothèse est que l'hypoxie observée au cours de la RCH pourrait être en partie à l'origine de la perte d'expression de PPAR γ dans cette maladie et d'appréhender les mécanismes de cette association.

MATERIELS ET METHODE

Culture cellulaire

Initialement, 2 lignées cellulaires digestives issues d'adénocarcinome colique humain ont été étudiées, caco-2 et HT29-5F7, afin de s'assurer que les résultats obtenus n'étaient pas modèle-dépendant. Par la suite, nous nous sommes focalisées sur la sous population 5F7 des cellules HT29 (T. Lesuffleur, Paris).

Les cellules caco-2 étaient cultivées dans des flasques Falcon de 75 cm² contenant du milieu d'Eagle Modifié par Dulbecco (DMEM) supplémenté par 25 mM de glucose et complété avec 10% de sérum de cheval dont le complément est inactivé (56°C, 1 h), 100 U/ml pénicilline (1%), 100 μ g/ml streptomycine (1%), et 1% acides aminés non essentiels (Gibco, Invitrogen Corp., Cergy Pontoise, France).

Les cellules HT29-5F7 étaient également cultivées en utilisant du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplémenté avec 10 % de SVF et 1% de Pénicilline-streptomycine 5ml/l.

Ces cellules étaient cultivées en monocouche confluente à 37°C sous atmosphère humidifiée, contrôlée à 5% de CO₂ et 18% d'O₂. Chaque semaine, la monocouche confluente était traitée à la trypsine (Invitrogen) puis repiquée après dilution au 1/10ème.

Pour les expériences de stimulation, les cellules étaient placées dans des plaques 6 puits, à une densité de 10^6 cellules par puit.

Recueil des échantillons de muqueuse colique

Cette étape est en cours de réalisation : une biobanque est en cours de constitution sous le protocole RECOX, ayant reçu les autorisations des autorités compétentes en novembre 2013.

Les échantillons de tissus sont des biopsies coliques réalisées au cours d'une endoscopie digestive basse. Pour la constitution de cette biobanque, des patients témoins (sans MICI connue), ayant une maladie de Crohn (distinction des biopsies prélevées en muqueuse inflammatoire et saine) et ayant une RCH (distinction des biopsies prélevées en zone saine, en zone inflammatoire et au niveau de la zone de démarcation) ont été inclus. Les biopsies effectuées sont directement congelées dans l'azote liquide afin de limiter l'hypoxie muqueuse du prélèvement non vascularisés puis stockés au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Rennes à -80°C . Actuellement, 33 patients ont été prélevés, 13 contrôles, 13 atteints de maladie de Crohn et 7 présentant une RCH.

Réactifs et protocoles expérimentaux

Les stimulations ont été réalisées avec 3 inducteurs chimiques de HIF-1 α : le chlorure de cobalt (Sigma), le DMOG (Sigma), 2 inhibiteurs des prolyl hydroxylases qui induisent une stabilisation de HIF-1 α en empêchant son hydroxylation et sa dégradation protéosomale et la desferrioxamine. Le DMOG a été utilisé à 2 doses de 1 et 2 mM, alors que le chlorure de cobalt était utilisé à la dose de 50 μM .

Pour la stimulation par hypoxie, les cellules étaient transférées dans un incubateur trois gaz (miniGalaxy A, Biotech) permettant une hypoxie contrôlée à 1% d'O₂, 5% de CO₂ et 94% de N₂, à 37°C pour 6, 24 et 48h.

Les stimulations étaient réalisées un jour après la mise en puit, et réalisées en triplicate au cours d'au moins deux expériences indépendantes.

Après stimulation, les puits étaient rincés à 2 reprises par du PBS stérile à 4°C. Les cellules étaient ensuite lysées dans un tampon spécifique pour extraction de l'ARN total, des petits ARN et des protéines, aliquotées puis congelées à -80°C pour extraction ultérieure.

Les cellules, soumises aux conditions d'hypoxie sus-décrites, pouvaient être stimulées par Citrate de Sildenafil 10 à 40uM pour évaluer son effet sur l'expression de PPAR γ , et des microRNA.

L'extraction de l'ARN total était réalisée à l'aide du kit commercial NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Hoerd, France), en suivant les instructions du fabricant. Brièvement, les cellules étaient reprises dans un tampon de lyse (RA1 + 1 % de β -mercaptoéthanol (Sigma)). Les lysats étaient filtrés puis, après adjonction d'éthanol à 70%, les acides nucléiques étaient adsorbés sur une colonne de silice. Après élimination des sels contenus dans la membrane, l'acide désoxyribonucléique (ADN) génomique était digéré au moyen d'une désoxyribonucléase (DNase I, Macherey-Nagel). Après lavage, les ARN totaux étaient élués à l'aide de 60 μ l d'eau sans ribonucléase. La quantité d'ARN extraite ainsi que le ratio DO260 / DO280 nm (indiquant la qualité de l'acide nucléique) étaient estimés par spectrophotométrie (nanodrop ND-1000, nanodrop Technologies).

L'étude des microARN a nécessité l'utilisation du kit commercial Ambion MirVana PARIS (Life Technologies) selon les instructions du fabricant. La procédure permettant un enrichissement en petits ARN a été utilisée. Schématiquement, cette procédure combine les avantages de l'extraction organique et de l'extraction sur phase solide pour produire un lysat très riche en ARN de moins de 200 bases. Après addition de chloroforme et centrifugation, les ARN totaux du surnageant étaient recueillis et une première addition d'une faible quantité

d'éthanol permettait la précipitation des ARN de plus de 200b qui étaient ensuite filtrés et écartés ; le filtrat était lui récupéré, enrichi en ethanol 100% et à nouveau filtré pour immobiliser cette fois les petits ARN.

L'ARN total était ensuite rétro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par action de la transcriptase inverse, utilisant le kit commercial Applied Biosystems (Warrington, Grande Bretagne), suivant les instructions du fabricant. Un µg d'ARN total était mis en présence de réverse transcriptase (Multiscribe, cDNA Reverse Transcriptase), d'amorces aléatoires (Random primers), de tampon (10X RT Buffer) et de désoxyribonucléotides (dNTP) pendant 10 minutes à 25°C, puis 2 heures à 37°C.

Les taux d'ADNc des gènes d'intérêt étaient estimés par PCR en temps réel sur 40 cycles (détecteur : SYBR-GREEN, Applied Biosystems) et étaient comparés à ceux d'un gène de ménage : la β-actine.

Les amorces utilisées pour la PCR en temps réel étaient choisies parmi les séquences publiées.

Les séquences des amorces utilisées sont détaillées ci-dessous (tableau 1).

Tableau 1: Séquences des amorces utilisées pour la qPCR :

Gènes humains	Séquence des amorces sens	Séquence des amorces anti-sens
PPAR γ 1	5'-AGGCCATTTTGTCAAACGAG-3'	5'-CCATTACGGAGAGATCCACG-3'
PPAR γ 2	5'-CCTATTGACCCAGAAAGCGA-3'	5'-TTACGGAGAGATCCACGGAG-3'
PLIN2	5'-CATGGGGGTGATGGCAGGCG-3'	5'-ACCAGCCAGTTGAGGGGCGT-3'
β-actine	5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'	5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATG-3'

MicroRNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems), suivant les instructions du fabricant. 50ng de microARN était mis en présence de reverse transcriptase, d'amorces spécifiques, de tampon et de dNTP pendant 30min à 16°C puis 30 min à 42°C, puis 5 min à 85°C à l'aide d'un thermocycler (TECHNE TC-512). Les taux d'ADNc des mir27a et b étaient estimés par PCR taqman temps réel (Roche) et étaient comparés à ceux d'un gène de ménage.

Transfection de pré-miR et anti-miR

Brièvement, un Pre-miR hsa-miR-27a ou l'anti-miR-27 étaient transfectés par electroporation (Microporateur MP100 [Neon™ system, Invitrogen]) selon les recommandations du fabricant. Un contrôle positif de transfection était réalisé en utilisant un Pre-miR hsa-miR1 non connu pour interagir avec PPAR γ . Après transfection les cellules étaient placées en incubateur standard pour une durée minimale de 12 h.

Statistiques

Les statistiques étaient réalisées à l'aide du logiciel JMP Pro v9.0.3(SAS Institute), utilisant un test de Wilcoxon-Mann-Whitney sur deux échantillons indépendants. Une probabilité inférieure ou égale à 0,05 était considérée comme significative.

RESULTATS

L'hypoxie diminue l'expression en ARNm et en protéine de PPAR γ sur les deux modèles cellulaire étudiés. Les cellules étaient soumises à l'hypoxie selon les conditions sus-décrites et l'analyse de l'expression de PPAR γ était réalisée à 4h, 8h, 24h, 48h et 72h. Les effets de l'hypoxie sur l'expression étaient observés à partir de 48 heures avec une diminution progressive, et significative de l'expression en ARNm de PPAR γ sur les deux modèles cellulaires de cellule épithéliale colique étudiée HT29 et caco-2. Au niveau protéique, le constat était similaire avec une répression progressive de l'expression de PPAR γ marquée à 48h. Il existait en parallèle une induction de l'expression de HIF-1 α témoignant de l'efficacité de l'hypoxie sur les cellules (Figure 1).

Afin d'évaluer si l'effet sur l'expression de PPAR γ n'était pas le fait d'une toxicité cellulaire induite par l'hypoxie, un test au MTT (sel de tétrazolium MTT [bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium]) a été effectué pour évaluer la quantité de cellule vivante en hypoxie. Il n'existait pas de différence en fonction de la culture des cellules épithéliales en condition hypoxique ou normoxique. Egalement après 48h d'hypoxie, il était noté une induction de l'expression de certains gènes cellulaires, en particulier du VEGF connu pour être induit en hypoxie.

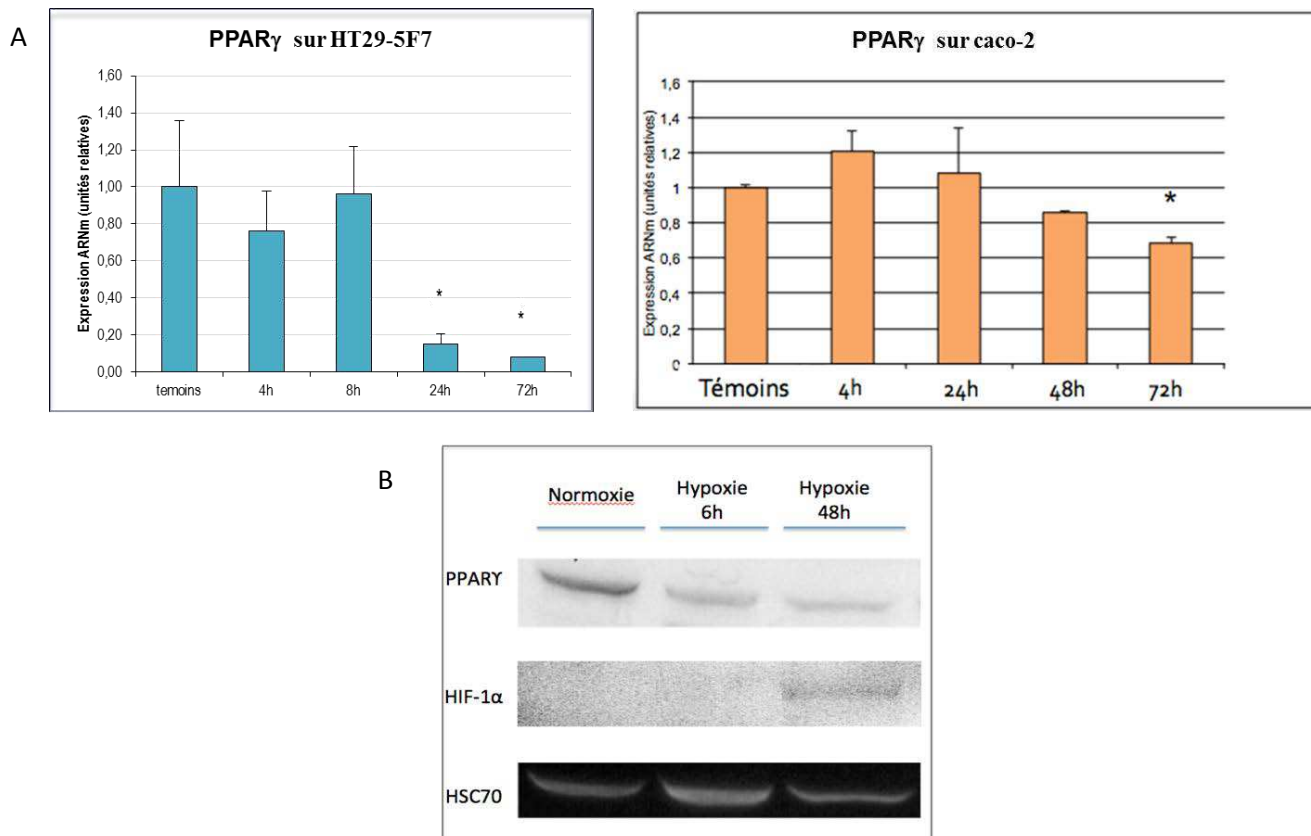


Figure 1 : cinétique de la répression de PPAR γ en hypoxie (1%O₂), sur HT29-5F7.

- (A)** L'ADNc était obtenu à partir de l'ARN total, extrait des cellules HT29-5F7 aux temps indiqués, et une PCR pour PPAR γ et la b-actine était réalisée. Les quantités d'ARNm de PPAR γ étaient normalisées selon le niveau de b-actine. Les quantités moyennes d'ARNm de PPAR γ en normoxie pour chaque temps étaient normalisées à 1. * $p < 0,05$
- (B)** Les lysats cellulaires obtenus à partir des cellules HT29-5F7 en normoxie et hypoxie, aux différents temps indiqués, étaient analysés par western blot, Résultats d'une expérience, représentative de 2 réalisées.

Effets des inducteurs chimiques de HIF-1 α sur l'expression de PPAR γ . En raison des effets de l'hypoxie sur l'expression de PPAR γ , les mécanismes sous-tendant cet effet ont été explorés. HIF-1 α étant un des facteurs majeurs de la réponse cellulaire en hypoxie en général et en raison de l'augmentation de son expression dans les cellules incubées en hypoxie, un lien entre la surexpression de HIF-1 α et la diminution de l'expression de PPAR γ a été recherché en induisant une surexpression de HIF-1 α au moyen d'inducteur chimique. Plusieurs doses de chlorure de cobalt (50 et 100 μ M), Diméthylaloxaloylglycine (DMOG) (1 et 2mM) et desferrioxamine ont été testées. L'induction chimique d'HIF-1 α était associée à un effet variable et non significatif sur l'expression de PPAR γ (Figure 2). L'analyse de l'expression protéique de PPAR γ ne retrouvait pas de différence significative entre les cellules non stimulées et celles stimulées par les inducteurs chimiques. En raison de la présence d'acides gras dans le sérum de veau fœtal utilisé pour les cultures cellulaires et de leur possible effet inducteurs de l'expression de PPAR γ par boucle d'autorégulation, les mêmes expérimentations ont été répétées sur des cultures cellulaires en l'absence de sérum de veau fœtal. Il n'existait pas de modification significative en présence ou non de sérum de veau fœtal. Ainsi l'ensemble de ces expérimentations n'évoquait pas une régulation HIF-dépendante de l'expression de PPAR γ .

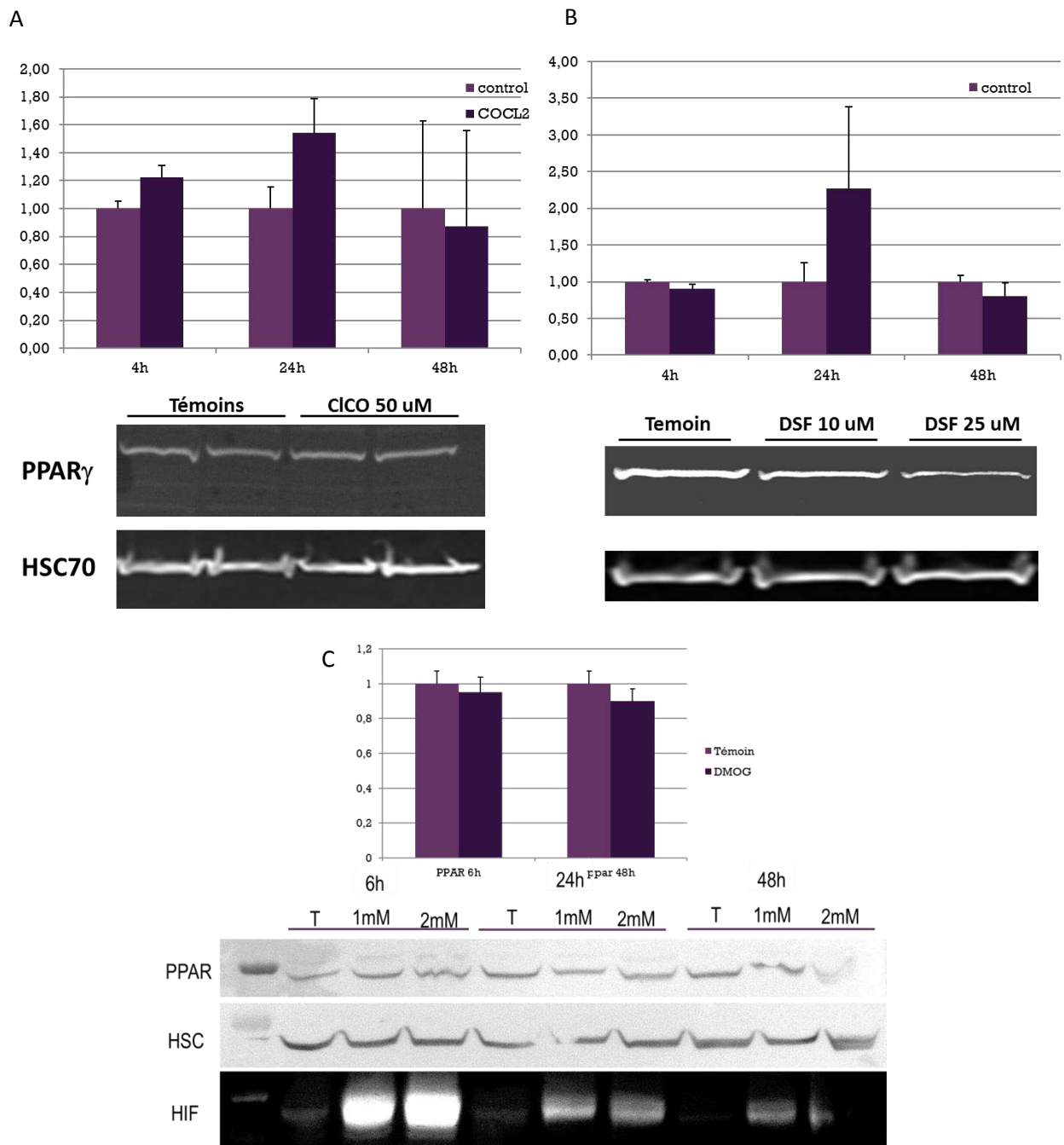


Figure 2, répression de l'ARNm de PPAR γ après stimulation par 2 inducteurs chimiques de HIF-1 α , à 48h. Les cellules HT29-5F7 étaient stimulées pendant 48h puis récoltées pour extraction des ARNm totaux et analyse de l'expression de PPAR γ par RTqPCR avec normalisation selon la b-actine. * $p < 0,05$. Résultats avec le CoCl₂ 50 μ M (B) desferroxamine 10 et 25 μ M et (C) Le DMOG à 1mM et 2mM

L'expression de miR-27a était augmentée en hypoxie dans les cellules HT29-5F7. En raison de l'absence d'effet de HIF-1 α sur l'expression de PPAR γ , la voie des microRNA a été

étudiée. L'analyse par PCR observait une induction marquée et significative de l'expression de miR27a dans HT29-5F7 après 48h d'hypoxie. Nous avons cherché à évaluer le rôle de HIF-1 α dans cette induction en étudiant l'impact des inducteurs chimiques de HIF-1 α sur l'expression de miR-27a (Figure 3). Il n'existait pas d'induction significative de l'expression de miR-27a après stimulation par le chlorure de cobalt, suggérant un mécanisme de régulation HIF-1 α indépendant de miR-27a dans les conditions d'hypoxie (Figure 3)

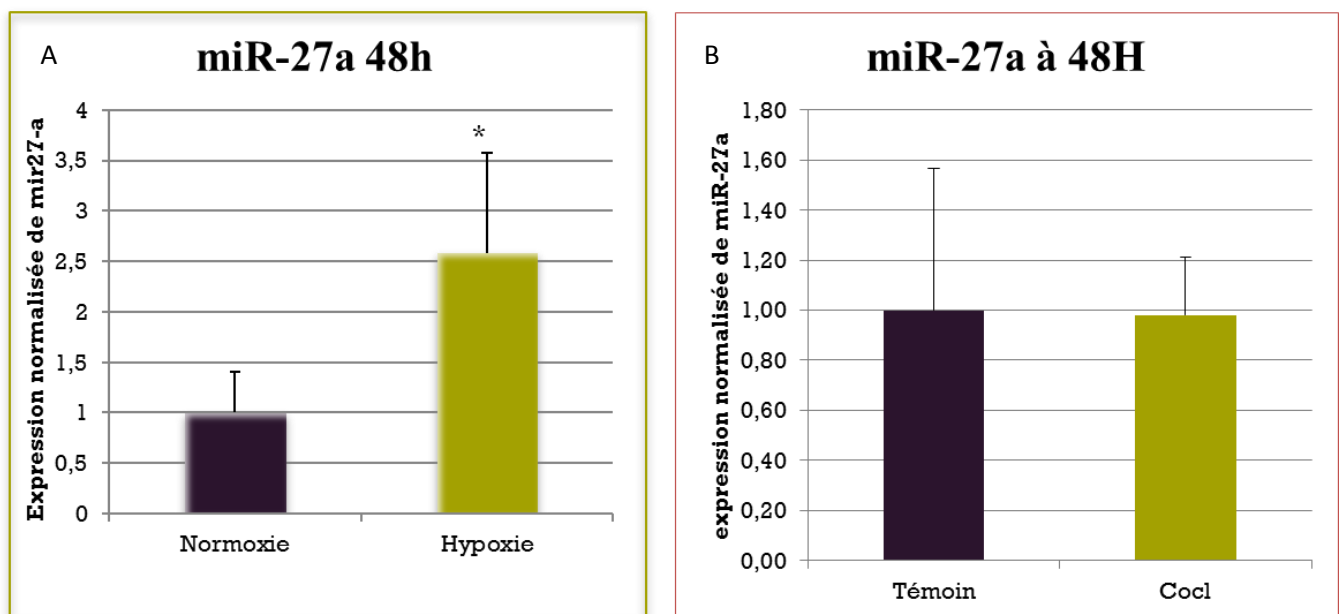


Figure 3 : Augmentation significative ($* < 0,05$) de l'expression de miR-27a dans les cellules HT29 induite par une culture en hypoxie à 1 % (A). L'utilisation de DMOG, inducteur chimique de HIF-1 α n'induit pas de majoration de l'expression de miR-27a suggérant un effet HIF-1 α indépendant (B).

L'expression de PPAR γ est dépendante de l'expression des microRNA. Afin d'évaluer l'impact de cette surexpression de miR-27a observé en hypoxie sur l'expression de PPAR γ les lignées cellulaires HT29 ont été transfectées par des Pre-miR-27a et cultivées en hypoxie. A 24h, il existait une diminution significative de l'expression de PPAR γ par rapport aux cellules non transfectées ou transfectées par un microRNA témoins. Inversement, la transfection de

microRNA inhibiteur de miR-27a avant mise en hypoxie résultait d'une absence de diminution de l'expression ARN de PPAR γ . L'ensemble de ces transfections souligne le lien étroit entre mir-27a et PPAR γ et le contrôle de l'expression de PPAR γ par le niveau d'expression de miR-27a. Ainsi une surpression de miR-27a, notamment en condition hypoxique, diminue l'expression de PPAR γ (Figure 4).

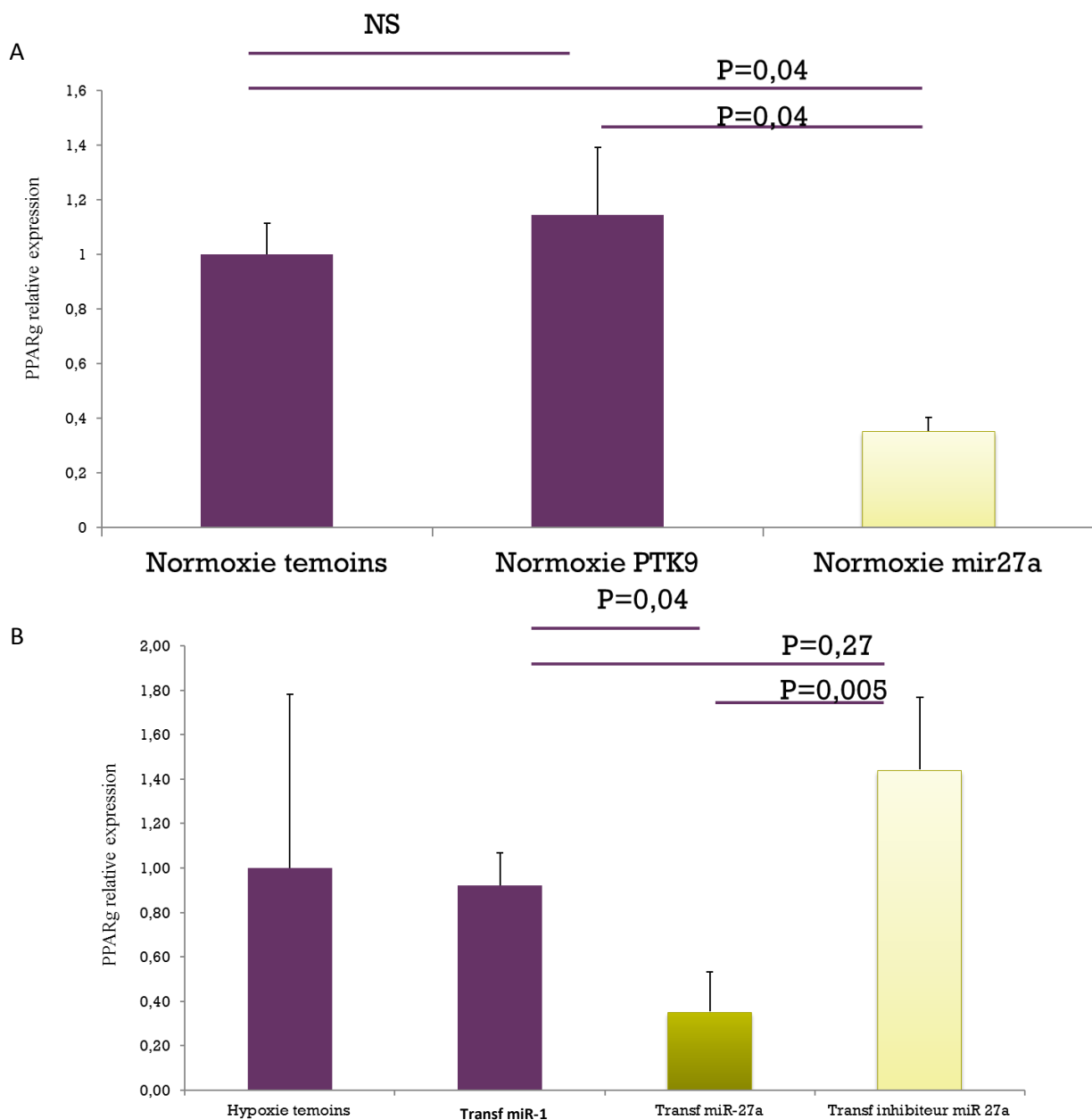


Figure 4 : Transfection des lignées cellulaire HT29 par des pré-miR-27a et d'un miR-témoins de la PTK9 et effet sur l'expression en ARN de PPAR γ (A) en condition normoxique. Réversion de la diminution de l'expression de PPAR γ en hypoxie à 1% après transfection d'inhibiteur de miR-27a (anti-miR-27a) (B).

Le sildenafil corrige non seulement la répression mais induit l'expression de PPAR γ après 48h d'hypoxie en modulant l'expression de miR-27a. Après stimulation des cellules HT29 par 2 doses de sildenafil à 10 et 40 mM, il existait une induction dose-dépendante de l'expression en ARNm de PPAR γ malgré l'hypoxie. Afin de rechercher un éventuel effet du sildenafil sur l'expression de mir-27a, nous avons comparé son expression en hypoxie seule et après stimulation par 40mM de sildenafil. Il était noté une persistance d'une induction de miR-27a en hypoxie en présence de sildenafil, mais significativement moins importante que celle obtenue après hypoxie seule. Ces expérimentations soulignent l'impact du sildenafil sur l'expression de PPAR γ en hypoxie possiblement liée en partie liée à la diminution de l'expression de mir27a (Figure 5).

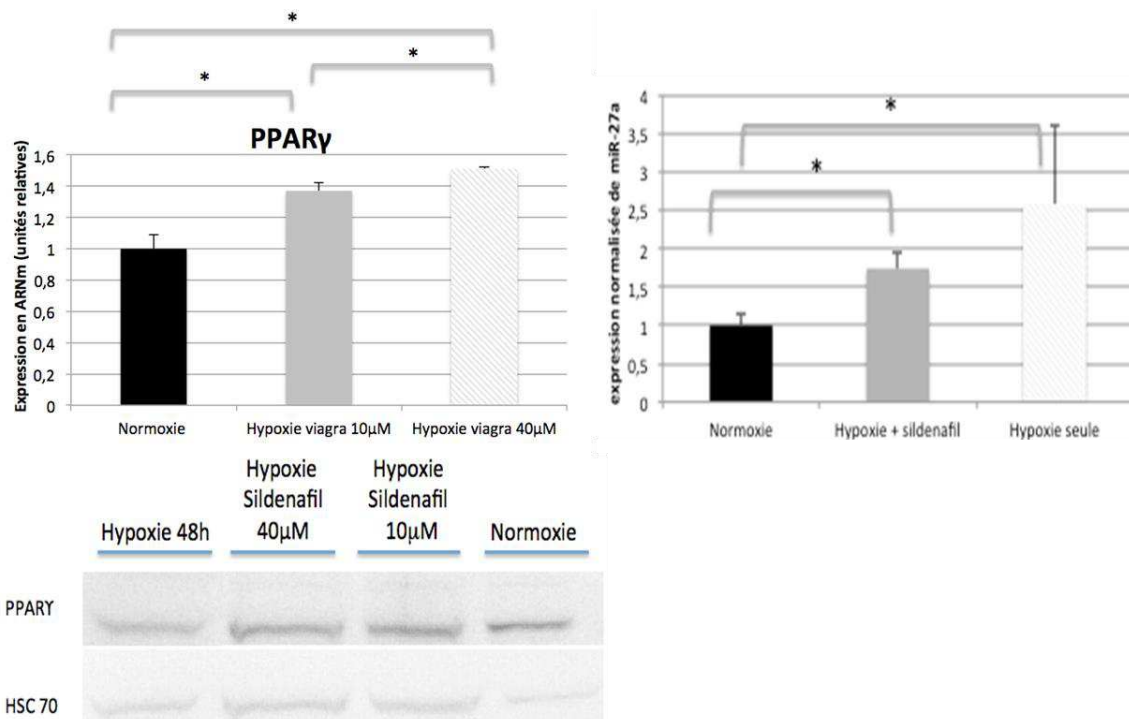


Figure 5 : Stimulation des lignées cellulaire HT29 par le sildénafil expression à 48h, en ARNm de PPAR γ en hypoxie à 1%. Les cellules HT29 étaient soumises à l'hypoxie pendant 48h dans les conditions sus-décrites après stimulation par 2 concentrations différentes de sildénafil, 10 et 40mM résultant en une induction significative de l'expression de PPAR γ (A). Effet du sildénafil sur l'expression de miR-27a en condition hypoxique (hypoxie à 1%) pendant 48h (B) marqué par une diminution de la surexpression relative de miR-27a

DISCUSSION

L'ensemble des données de ce travail montre pour la première fois l'existence d'une régulation négative de l'expression de PPAR γ en hypoxie dans un modèle de cellules épithéliales coliques. Ces données prennent toute leur importance lorsqu'elles sont confrontées aux résultats *ex-vivo* issus de l'extraction des cellules épithéliales coliques de patients atteints de RCH.(Van der Gooten et al. 2012) En effet, il n'existe actuellement pas de données dans la littérature expliquant de façon claire le déficit de PPAR γ chez les patients atteints de RCH. Ainsi, l'hypoxie liée à la dysfonction microvasculaire et l'inflammation participe à la perte d'expression de PPAR γ observée au cours de la RCH.

La répression de PPAR γ en hypoxie a été à ce jour démontrée dans un modèle de cellules tubulaires rénales et dans un modèle adipocytaire.(Li et al. 2007, Yun et al. 2002) Le niveau de répression était similaire à celui constaté dans notre travail sur cellules HT29. Dans un travail de 2001, Narravula et al n'avaient pas montré en analyse par microarrays d'abord puis en RT-PCR de répression de PPAR γ en hypoxie sur un modèle de cellules épithéliales intestinales (T84 cells) et orales (KB cells). Une répression de PPAR α avait par contre été mise en évidence mais l'expression en ARNm de PPAR γ était globalement stable après 6 et 18h d'hypoxie. Cette discordance avec notre travail peut d'abord s'expliquer par l'utilisation d'un modèle cellulaire différent, mais surtout par la durée de l'hypoxie. Les temps réalisés dans ce travail de 2001 étaient trop précoces et nos résultats sur HT29-5F7 comme sur caco-2 montrent une répression significative au-delà 24h de culture, plus marquée à 48 et 72h. Pour les temps précoces, on observait l'absence de variation voire une induction de PPAR γ . Ces résultats aux temps tardifs sont d'autant plus intéressants qu'ils reflètent mieux la situation d'hypoxie chronique observée au cours de la RCH que les temps précoces, et sont donc une base plus cohérente pour envisager la physiopathologie de cette maladie.

Le mécanisme sous-tendant la répression des PPARs a été étudié dans plusieurs études sur différents modèles cellulaires avec des résultats discordants. Ainsi, sur le modèle intestinal, la répression de PPAR α en hypoxie semblait HIF-1 α dépendante. (Narravula and Colgan 2001) En effet, il était observé en western-blot une régulation contraire de l'expression de HIF-1 α et de PPAR α qui lui était réprimé à 12h. Cette répression était reproduite par le CoCl₂ 100 μ M, puissant inducteur de HIF-1 α , réalisant une « hypoxie chimique ». Nous n'avons pu reproduire ces constatations sur une éventuelle répression de PPAR γ sur le modèle des cellules épithéliales coliques. Il existerait *in silico* deux sites potentiels de HRE dans la zone promotrice de PPAR γ mais qui n'ont pas été étudiés. L'implication et le rôle de HIF-1 α ne semblent pas être impliqués dans la modulation de l'expression de PPAR γ mais secondairement à l'induction en hypoxie de miR-27a. En raison du rôle prépondérant de HIF-1 α dans la réponse cellulaire à l'hypoxie, son absence d'effet retrouvé dans cette étude reste surprenante mais pas impossible. Il a été montré que la régulation en hypoxie de PPAR α mais pas PPAR γ dans un modèle intestinal faisait intervenir un mécanisme HIF-dépendant. (Narravula and Colgan 2001) Par ailleurs, la perte d'expression de PPAR γ 2 dans un modèle adipocytaire semblait également HIF-dépendante. (Yun et al. 2002) Enfin, l'inactivation de HIF-1 α dans le modèle rénal par vecteur d'expression d'une forme double négative de HIF-1 α ne modifiait pas l'expression de PPAR γ , suggérant une régulation HIF-indépendante concordant avec nos résultats. (Li et al. 2007)

A côté de ces facteurs de transcription, d'autres mécanismes régulateurs ont été plus récemment étudiés, parmi lesquels les microRNA tiennent une place importante. L'hypothèse de leur implication dans la régulation de l'expression de PPAR γ a ainsi été confortée par plusieurs études. Parmi les plus de 700 microRNA répertoriés, des analyses bio-informatiques ont permis de cibler certains d'entre eux, susceptibles d'interagir avec PPAR γ . Par ailleurs, Wu et al ont réalisé une étude par microarray d'échantillons de muqueuse colique de patients atteints de RCH et ont mis en évidence un profil d'expression différentielle de certains

microRNA par rapport aux sujets contrôles, parmi lesquels figurent miR-27a et b. Une des limites de ce travail est l'absence d'analyse d'échantillon de patient atteint de RCH pour évaluer l'expression de miR27 chez nos patients. Cependant, l'équipe de Louvain a étudié par puce l'expression muqueuse des microRNA chez les patients atteints de RCH à partir de biopsies endoscopiques. Dans cette étude, miR27a était le deuxième microRNA le plus induit au cours de la RCH, plus de 3,8 fois plus que les patients témoins. (Van der Goten et al. 2012) Une biocollection est en cours et les échantillons seront prochainement analysés pour confirmer cette donnée chez le patient atteint de RCH.

Considérant notre hypothèse d'une implication des microRNA dans la répression de PPAR γ , il est important de noter cette évolution parallèle et tardive de l'expression de PPAR γ en ARNm et en protéine lors des manipulations d'hypoxie. En effet, on sait que les microRNA exercent leur action répressive par blocage de la traduction protéique et par dégradation de l'ARNm. Par ailleurs, il a été observé l'existence d'une séquence cible pour miR-27a et b, au niveau de la région 3'UTR de PPAR γ , très conservée chez les mammifères. Dans l'adipocyte, PPAR γ a également été montré comme cible directe de miR-27a et b, dont la surexpression entravait l'adipogénèse et réprimait PPAR γ . Par ailleurs, en hypoxie, une surexpression de ces microRNA a été mise en évidence dans plusieurs modèles cellulaires tel que l'adipocyte (pour miR27a et b) (Lin et al. 2009) mais aussi 4 lignées cellulaires cancéreuses humaines (pour miR-27a). (Kulshreshtha et al. 2007) Sur la lignée HT29, à 48h, l'hypoxie induisait selon un ratio de 2,48 l'expression de mir27a, ce qui correspond de façon exacte aux résultats présentés dans notre travail. L'existence d'une régulation HIF-dépendante de ces microRNA a également été évoquée, au moins pour certains d'entre eux. En effet, dans cette étude, l'analyse *in silico* des promoteurs de 27 microRNA identifiés comme induits par l'hypoxie a montré un enrichissement très significatif en éléments HRE par rapport aux séquences de miR non régulés par l'hypoxie. Un mécanisme HIF-dépendant est donc possible pour la régulation des microRNA régulés par l'hypoxie. Toutefois, nos résultats, quoique préliminaires, n'ont

pas montré d'induction de l'expression de mir-27a après stimulation des cellules HT29-5F7 par le ClCo2, avec un ratio à 0,88 (p=ns). Quoiqu'il en soit ces résultats et nos résultats démontrent une relation étroite et surtout un contrôle de l'expression de PPAR γ par le miR-27a, une induction de l'expression de miR27a induisant une diminution de l'expression de PPAR γ .

Enfin, nos premiers résultats sur l'utilisation du sildénafil, qui demandent à être confirmés, sont encourageants puisqu'ils confirment l'induction de PPAR γ par cette molécule en normoxie, et plus intéressant contrecarre l'effet répresseur de l'hypoxie sur l'expression de PPAR γ . Son mode d'action nécessite d'être exploré plus avant. Dans leur travail, Zhang et al ont mis en évidence le rôle de cGMP-dépendant kinases (PKG) dans l'induction de PPAR γ .(Zhang et al. 2010) En effet, l'utilisation d'un analogue du cGMP induisait PPAR γ de la même façon que le sildénafil. Cette induction était dans les deux cas bloquée par l'utilisation concomitante d'un inhibiteur de PKG. Par ailleurs nos résultats suggèrent que l'effet de sildénafil sur l'expression de PPAR γ notamment en condition hypoxique semble en partie lié à une diminution de la surexpression de miR-27a. A l'échelle humaine il ne faut pas négliger qu'il s'agit d'un traitement vasodilatateur par relargage par la cellule endothéliale de NO. Cet effet macro pourrait potentialiser l'efficacité clinique en diminuant les troubles de la microvascularisation et l'ischémie relative observée au cours de la RCH en favorisant la perfusion muqueuse colique. Il faut noter que cette molécule dont le profil de tolérance est satisfaisant sans effet secondaire majeure lorsqu'elle est utilisée à faible dose en chronique a un profil pharmacocinétique d'intérêt en raison d'une biodisponibilité orale de l'ordre de 40 à 50 % permettant son action systémique mais également topique au niveau de la cellule épithéliale colique. En association au 5-ASA il pourrait constituer une solution thérapeutique dans le cadre de la RCH légère à modérée chez les mauvais répondeurs aux 5-ASA en monothérapie.

PARTIE 3 OPTIMISATION DE LA PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE ACTUELLE

Au-delà de l'approche expérimentale qui nécessite des études complémentaires et notamment une transposition à la clinique, une meilleure connaissance et une meilleure utilisation des traitements disponibles est la première étape pour améliorer dans l'immédiat l'état de santé de nos patients.

Une première option consiste à articuler nos stratégies thérapeutiques non plus en fonction d'objectifs cliniques mais en fonction de cibles objectives d'inflammation, garants ultimes d'une amélioration du pronostic, à court (chirurgie) et à long termes (adénocarcinome colique).

La seconde option vise à améliorer l'utilisation des thérapeutiques en cours. Cette dernière décennie a été marquée par une révolution thérapeutique, l'arrivée des anti-TNF α et notamment l'infliximab. D'autres anti-TNFs ont récemment obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour leur utilisation dans la RCH, l'adalimumab (2012) et le golimumab (2014) mais n'ont pas été ici étudiés en détail. Toute révolution amène un changement, changement qui s'opère en dépit de nombreuses zones d'ombre.

3.1.Traiter au-delà des symptômes : concept du « treat to target »

3.1.1. Origine du concept

Le concept de treat to target est un concept issu de pathologies chroniques comme le diabète, l'hypertension artérielle et dans le domaine des maladies auto-immunes la polyarthrite rhumatoïde. Au cours de la polyarthrite rhumatoïde, maladie chronique et destructrice de l'articulation, les paradigmes thérapeutiques ont beaucoup évolué avec la distinction de

traitements anti-inflammatoires et de traitements modifiant l'évolution de la maladie (*disease-modifying anti-rheumatic drugs* [DMARD]).(Bouguen et al. 2013) Ces DMARDs, incluant les immunosuppresseurs traditionnels et les biothérapies sont des traitements capables de diminuer les destructions cartilagineuses et osseuses tout comme les marqueurs systémiques d'inflammation. La reconnaissance de tels traitements a fait évoluer le concept de traitements des symptômes (en général bien contrôlés par les antalgiques ou anti-inflammatoires) vers le concept de traitement de l'inflammation pour éviter la survenue d'un handicap induit par la destruction osseuse secondaire à l'inflammation rémanente non contrôlée. Ce concept est de plus en plus appliqué pour guider les décisions thérapeutiques au cours de la maladie de Crohn étant donné la forte discordance entre les symptômes et l'inflammation muqueuse.(Bouguen et al. 2013)

En raison des analogies qu'il existe entre ces maladies auto-immunes chroniques, et les complications au long cours de la rectocolite hémorragique, ce concept de traiter au-delà des symptômes vers l'abrogation de l'inflammation pourrait être appliqué à la rectocolite hémorragique. Comme cela a été précisé en introduction, l'évolution de la RCH est marquée par certaines complications dont l'incidence au cours des décennies ne semble être que peu modifiée.

3.1.2. Cicatrisation muqueuse : la cible ultime ?

L'inflammation muqueuse endoscopique au cours de la rectocolite hémorragique est le marqueur le plus fiable et objectif pour évaluer l'inflammation chez les patients atteints de RCH. Par ailleurs, l'atteinte du rectum étant constante, l'évaluation par recto-sigmoïdoscopie est aisée et réalisable en ambulatoire. La définition de la cicatrisation muqueuse est variable mais globalement est considérée comme l'obtention d'une muqueuse normale ou avec des signes minimales d'inflammation (scores 0 et 1 du sous index endoscopique du score de Mayo).

L'intérêt d'une cicatrisation muqueuse a été démontré au cours de plusieurs études et semble modifier l'évolution de la maladie. Ainsi, sur une cohorte prospective en population, l'obtention d'une cicatrisation muqueuse à 1 an étaient associée à une diminution significative du risque de colectomie à 10 ans. (Froslic et al. 2007) D'autres études rétrospectives ou des sous-analyses d'essais randomisés contrôlés ont également observé cette diminution du risque de recours à la chirurgie, aux immunosuppresseurs, ou de nécessité d'hospitalisation des patients.(Ardizzone et al. 2011, Colombel J. F. et al. 2011)

La cicatrisation muqueuse semble ainsi un objectif séduisant pour modifier l'histoire naturelle de la RCH. Par ailleurs, il ne s'agit pas d'un objectif inatteignable car l'ensemble des traitements validés au cours de la RCH permettent l'obtention d'une cicatrisation muqueuse à des degrés plus ou moins importants.(Pineton de Chambrun et al. 2010) Le seul frein à l'utilisation d'une telle stratégie est qu'il n'existe actuellement aucune étude prouvant sa faisabilité et son efficacité au cours de la rectocolite hémorragique.



FEASIBILITY OF ENDOSCOPIC ASSESSMENT AND TREATING TO TARGET TO ACHIEVE MUCOSAL HEALING IN ULCERATIVE COLITIS

Journal:	<i>Inflammatory Bowel Diseases</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Research Articles - Clinical
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Bouquen, Guillaume; University of California San Diego, Division of Gastroenterology; CHU Pontchaillou and INSERM U991 Université de Rennes 1, Service des Maladies de l'Appareil Digestif Levesque, Barrett; University of California San Diego, Division of Gastroenterology Pola, Suresh; University of California San Diego, Division of Gastroenterology Evans, Elisabeth; University of California San Diego, Division of Gastroenterology Sandborn, William; University of California-San Diego, Gastroenterology
Keywords:	Healing < Clinical Areas, Outcomes Research/Measurements < Clinical Areas, Clinical Areas, Pathology of IBD < Clinical Areas, Ulcerative Colitis: General Clinical < Clinical Areas

SCHOLARONE[™]
Manuscripts

FEASIBILITY OF ENDOSCOPIC ASSESSMENT AND TREATING TO TARGET TO ACHIEVE MUCOSAL HEALING IN ULCERATIVE COLITIS

Guillaume Bouguen MD^{1,2}, Barrett G. Levesque MD, MS¹, Suresh Pola MD¹, Elisabeth Evans NP¹, William J. Sandborn MD¹

¹ Division of Gastroenterology, University of California San Diego, La Jolla, California, USA

² Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Rennes, Pontchaillou, Inserm U991 university of Rennes 1, Rennes, France

Correspondence to:

William J. Sandborn, M.D.

Division of Gastroenterology, University of California San Diego

9500 Gilman Drive, La Jolla, California 92093-0956

Telephone (858) 657-5284 / Fax (858) 657-5022

Email: wsandborn@ucsd.edu

Conflicts of Interest and Source of Funding

This work did not receive any financial support.

G.B., has received lecture fees from Abbott Laboratories, Ferring and MSD Pharma
BGL, consultant: Santarus Inc, Prometheus Laboratories, speakers bureau: Warner Chilcott, UCB Pharma, , Salix;

SP and EE declare no disclosure

WJS - Dr Sandborn reports having received consulting fees from ActoGeniX NV, AGI Therapeutics, Inc., Alba Therapeutics Corporation, Albireo, Alfa Wasserman, Amgen, AM-Pharma BV, Anaphore, Astellas Pharma, Athersys, Inc., Atlantic Healthcare Limited, Axcan Pharma (now Aptalis), BioBalance Corporation, Boehringer-Ingelheim Inc, Bristol Meyers Squibb, Celgene, Celek Pharmaceuticals, Cellerix SL, Cerimon Pharmaceuticals, ChemoCentryx, CoMentis, Cosmo Technologies, Coronado Biosciences, Cytokine Pharmasciences, Eagle Pharmaceuticals, Eisai Medical Research Inc., Elan Pharmaceuticals, EnGene, Inc., Eli Lilly, Enteromedics, Exagen Diagnostics, Inc., Ferring Pharmaceuticals, Flexion Therapeutics, Inc., Funxional Therapeutics Limited, Genzyme Corporation, Genentech (now Roche), Gilead Sciences, Given Imaging, Glaxo Smith Kline, Human Genome Sciences, Ironwood Pharmaceuticals (previously Microbia Inc.), Janssen (previously Centocor), KaloBios Pharmaceuticals, Inc., Lexicon Pharmaceuticals, Lycera Corporation,

Meda Pharmaceuticals (previously Alaven Pharmaceuticals), Merck Research Laboratories, MerckSerono, Millennium Pharmaceuticals (subsequently merged with Takeda), Nisshin Kyorin Pharmaceuticals Co., Ltd., Novo Nordisk A/S, NPS Pharmaceuticals, Optimer Pharmaceuticals, Orexigen Therapeutics, Inc., PDL Biopharma, Pfizer, Procter and Gamble, Prometheus Laboratories, ProtAb Limited, Purgenesis Technologies, Inc., Receptos, Relypsa, Inc., Salient Pharmaceuticals, Salix Pharmaceuticals, Inc., Santarus, Schering Plough Corporation (acquired by Merck), Shire Pharmaceuticals, Sigmoid Pharma Limited, Sirtris Pharmaceuticals, Inc. (a GSK company), S.L.A. Pharma (UK) Limited, Targacept, Teva Pharmaceuticals, Therakos, Tillotts Pharma AG (acquired by Zeria Pharmaceutical Co., Ltd), TxCell SA, UCB Pharma, Viamet Pharmaceuticals, Vascular Biogenics Limited (VBL), Warner Chilcott UK Limited, Wyeth (now Pfizer); has received lecture fees from Bristol Meyers Squibb, and Janssen (previously Centocor); and has received research support from Bristol Meyers Squibb, Genentech, Glaxo Smith Kline, Janssen (previously Centocor), Millennium Pharmaceuticals (now Takeda), Novartis, Pfizer, Procter and Gamble Pharmaceuticals, Shire Pharmaceuticals, and UCB Pharma.

ABSTRACT

Background and aims: Mucosal healing (MH) as a treatment target for ulcerative colitis (UC) is of growing interest because it is associated with improved clinical outcomes. However, the feasibility and probability of reaching MH in clinical practice is unknown. We therefore evaluated the feasibility of “treating to target” according to endoscopic findings to reach MH.

Methods: All endoscopic outcomes of patients with UC followed in a single inflammatory bowel disease unit from 2011 to 2012 were reviewed, as well as subsequent therapeutic management. Cumulative incidence of MH and histologic healing were estimated using a Kaplan-Meier method.

Results: A total of 60 patients underwent at least 2 consecutive endoscopic assessments, of whom 45 and 48 patients had endoscopic and histologic evidence of active disease, respectively. After a median follow up of 76 weeks, 27 of 45 (60%) patients with endoscopic disease activity at baseline achieved MH and 24 (50%) of 48 patients with histologic disease activity at baseline had histologic healing. The cumulative probabilities of MH were 26%, 52% and 70% at 26, 52 and 76 weeks respectively. The cumulative probabilities of HH at weeks 26, 52 and 76 from the time of initial procedure were 19%, 41% and 57%, respectively. Any adjustment in medical therapy in case of persistent endoscopic activity was associated with both MH and HH.

Conclusion: Repeated assessment of endoscopic disease activity with adjustment of medical therapy to the target of MH is feasible in clinical practice in patients with UC, and appears to be of benefit.

INTRODUCTION

Ulcerative colitis (UC) is a chronic relapsing inflammatory disease of the colonic mucosa that for more than half of patients results in chronic intermittent or continuous symptoms of increased stool frequency, fecal urgency and rectal bleeding.(Ordas et al. 2012b) Patients with unremitting disease or related complications such as colorectal cancer ultimately require colectomy, 10% within the first year of diagnosis, 8.7% to 24% at 10 years and up to 45% after 25 years from diagnosis, particularly in some sub-group of patients such as those with extensive disease and with young age at diagnosis.(Hendriksen et al. 1985, Hoie et al. 2007b, Jess et al. 2007, Langholz et al. 1994, Leijonmarck et al. 1990) This natural history of UC, as defined by population-based cohort studies, has not changed over time, despite the introduction of new medical therapies such as immunosuppressives and biologics.(Filippi et al. 2011, Jess et al. 2007, Langholz et al. 1994)

Based on this unfavorable natural history, new therapeutic goals and strategies which could potentially modify the course of the disease have emerged for the treatment of UC.(Bouguen et al. 2013, Sandborn 2008)Subsequently, the idea of mucosal healing (MH) as a treatment target began to receive increasing attention after studies demonstrated that it might improve long term clinical outcomes.(Bouguen et al. 2013, Sandborn 2008)For example, among 328 cases in the IBSEN population-based cohort of patients with newly diagnosed UC who had endoscopic follow-up, MH defined by normal or light erythema/granularity appearance 1 year after the diagnosis was associated fewer surgeries ($p=0.02$). (Froslic et al. 2007) In another study of a cohort of patients with newly diagnosed UC who starting corticosteroids for the first time, MH defined by normal mucosa or mild erythema appearance at 3 month predicted better long term outcomes defined by a combined endpoint of occurrence of hospitalization, need for immunosuppressive treatment or colectomy ($p=0,01$). (Ardizzone et al. 2011) In the ACT trials of infliximab as induction and maintenance therapy for UC, a decrease in the rates of UC-related surgery and a higher rate of corticosteroid free remission were observed among

patients who achieved MH at week 8 (defined by Mayo endoscopic subscore of 0 or 1) and the clinical outcomes were even better in patients who achieved an endoscopic subscore of 0 at week 8.(Colombel J. F. et al. 2011)Most drugs that are effective for the treatment of UC have been shown to induce MH, including 5-aminosalicylic acid (5-ASA), corticosteroids, thiopurine analogues such as azathioprine and 6-mercaptopurine, calcineurin inhibitors such as cyclosporine and tacrolimus, and TNF antagonists such as infliximab, adalimumab and golimumab.(Pineton de Chambrun et al. 2010) Beside MH, histologic healing (HH) have been reported to have an even stronger association with favorable clinical outcomes, lower rates of relapse, and a decrease of the risk of colorectal cancer.(Bessissow et al. 2012, Bitton et al. 2001, Peyrin-Biroulet et al. 2014)

While the idea of MH as a treatment goal or outcome measure is increasingly being considered in patients with UC, at present there is no study that demonstrates the feasibility and effectiveness of using a medical therapy algorithm to reach the target of MH in clinical practice. We therefore evaluated the feasibility of “treat to target” according to endoscopic disease activity to reach MH in clinical practice.

METHODS

Study population

All medical records of consecutive patients referred to the IBD center at the University of California San Diego (UCSD) between January 2011 and December 2012, were reviewed. The ICD-9 codes were used to identify all patients with a diagnosis of UC who were referred to UCSD. The diagnosis of UC was then confirmed based on radiological, endoscopic and/or histologic evidence. Only patients with UC who had at least 2 consecutive endoscopic procedures performed during the study period were included.

The following demographic and clinical characteristics were abstracted from the electronic medical records of the patients: sex, birth date, age at diagnosis, smoking status, UC disease

extension at diagnosis according to the Montreal classification,(Satsangi et al. 2006) previous history of hospitalization, previous and concurrent treatment for UC.

At the time of each endoscopic procedure, the medical records were reviewed for the type and findings of the procedure, histologic findings, medical therapies being used at the beginning of the study period, any adjustments of medical therapy after endoscopic procedures, and the presence of clinical symptoms at the time of each endoscopic procedure and within 3-6 months following each endoscopic procedure. Patients were defined as having clinical symptoms if they had symptoms of diarrhea and/or bloody stools. Adjustments of medical therapy following endoscopic procedures were defined by the introduction of mesalamine or corticosteroid, or by the introduction or switch of immunosuppressives or the introduction, optimization or switch within the class, or changes in both immunosuppressive and biologics. Endoscopic disease activity was identified by review of endoscopy reports and color photographs. Endoscopic disease activity was defined by the presence of friability, erosion, ulceration or bleeding in the rectum or the colon at the time of the endoscopic procedure and consequently healing of the mucosa was defined unremarkable findings including, absence of any type of friability (even mild) and with possible remaining slightly and patchy loss of vascular pattern or erythema from inactive disease equivalent to a Mayo endoscopic subscore of 0. We also analyzed separately the presence of disease activity in mucosal biopsies with histologic evaluation. Histologic healing (HH) was defined by the absence of inflammatory infiltrate but with possible remaining disturbance of the architecture of the mucosa.(Gupta et al. 2007) Of note, the second and subsequent endoscopic assessments were usually a priori planned by the treating physician to be performed within 6 months in order to assess the endoscopic response to therapy (i.e. scheduled endoscopic follow up to assess for MH).

This study was approved by the UCSD Institutional Review Board.

Statistical analysis

Quantitative variables were described as median and percentile (I.Q.R. for Inter Quartile Range: 25% and 75%). Categorical variables were presented as number and percent of the cohort. The non-parametric Wilcoxon signed-rank test for continuous variable and the non-parametric Pearson test for categorical variable were used to compare disease activity indexes on the whole population.

Two events previously defined were used for further analyses, (1) MH and (2) (HH). The events were assessed using survival analysis. Only patients with endoscopic disease activity at baseline were included for MH analysis and only patient with histological disease activity at baseline were included for histological analysis. The cumulative probabilities of MH, and HH were estimated using the Kaplan Meier method. For both, the time to MH or HH was considered to begin at the date of first endoscopic assessment and end at last known follow-up or at the date of the first procedure that observed MH/HH. To identify factors predictive of each event, we performed a univariate analysis using the log-rank test. We performed univariate analysis to identify the predictors of the outcomes described above (characteristics of patients at referral) and the factors associated with outcomes (factors related to management of patients after referral). We then performed a multivariate analysis to identify the independent predictors and factors associated with MH and HH: all variables with p values of <0.05 in the log-rank test were retained and integrated into a Cox proportional hazards regression model. The results are shown as HRs with 95% CIs. Statistical analyses were performed using JMP® Pro 10.0.0 software.

RESULTS

Characteristics of the population at referral

Out of 475 patients with UC seen at UCSD during the study period, 144 patients were referred to the IBD center leading to 113 endoscopic procedures performed at the time of referral. The study population was constituted of 60 patients had at least 2 consecutive endoscopic

procedures performed during the study period, of whom 45 and 48 patients had endoscopic and histologic evidence of active disease, respectively.

The baseline characteristics of these 60 patients are listed in Table 1. Of these patients, 28 (46.6%) were male. The median age at referral was 37 years (IQR75 25-56) and the median disease duration was 5 years (IQR75 0.7-10.5). The Montreal classification at the time of diagnosis was available for 56 patients. Forty-eight of the 56 (85%) patients had at least left sided colitis. Only 33 patients (55%) were naïve to both immunosuppressives and biologics at referral. Thiopurine analogues were the most common previous immunosuppressive, used in 20 patients (33.3%) compared to methotrexate used in 2 (3.3%) patients. Among 17 (28.3%) patients who were previously treated with TNF antagonists, 10 patients, 7 and 2 patients were treated with 1, 2 and 3 different TNF antagonists, respectively. Infliximab was the first TNF agents used for all except one patient. Medical therapies used at the time of referral are listed in Table 1.

Baseline endoscopy consisted of flexible sigmoidoscopy for 6 patients and of ileocoloscopy for 54 patients. A total of 45 patients had endoscopic disease activity as previously defined and histologic activity was observed on 48 patients.

Table 1: Baseline characteristics

VARIABLES	N = 60
Gender (M:F)	28:32
Smoking status (active/former/never) – n (%)	1 (1.7) / 11 (18.3) / 48 (80)
BMI –median (IQR 75)	22.6 (20.5-27.3)
Median disease duration – years (IQR75)	5 (0.7-10.5)
Familial history of IBD – n (%)	11 (18.6)
Median age at diagnosis – years (IQR75)	27 (19-45)
Montreal classification at UC Diagnosis – n (%)	
E1 – proctitis	8 (13.3)
E2 – left side colitis	17 (28.3)
E3 – extensive colitis	31 (51.6)
Extra-intestinal manifestation – n (%)	10 (16.7)
History of hospitalization – n (%)	64 (58.2)
Previous medical treatments – n (%)	
5-aminosalicylic acid	55 (91.7)
Steroid	39 (65)
Immunosuppressives (AZA/6MP or MTX)	20 (33.3)
TNF α antagonists	17 (28.3)
Treatment at the time of referral	
5-aminosalicylic acid	36 (60)
Steroid	20 (33.3)
Immunosuppressives (AZA/6MP or MTX)	11 (18.3)
TNF α antagonists	10 (16.6)
Median hemoglobin concentration – g/dL (IQR75)	12.8 (11.7-13.9)
Median white-cell count - /mm ³ (IQR75)	7.35 (5.5-8.8)
Median CRP – mg/L (IQR 75)	2.1 (1-13)
<u>Abbreviation</u> : UC, ulcerative colitis ; TNF, Tumor Necrosis Factor; AZA, azathioprine; 6MP, 6-mercaptopurine; MTX, methotrexate; BMI, Body Mass Index; IBD, Inflammatory Bowel Disease	

Endoscopic procedures and correlation with symptoms and histology

At the end of the follow-up period, a total of 159 endoscopic procedures were performed including 92 ileo-colonoscopies and 67 flexible sigmoidoscopies. According to inclusion criteria, all 60 patients had at least 2 consecutive endoscopic procedures, 26 (43%) patients underwent 3 consecutive endoscopic procedures, 8 (13%) patients underwent 4 consecutive endoscopic procedures and 5 procedures were performed for 2 patients. The overall median

time between two endoscopic procedures was 25 weeks (IQR75 16-42). The overall median time between two endoscopic procedures was 25 weeks (IQR75 16-42). Specifically, for those without mucosal healing, the median time between procedure 1 and 2, procedure 2 and 3 and procedure 3 and 4 were 19 weeks (IQR75 12-30), 17 weeks (IQR75 9-30) and 20 weeks (IQR75 10-45), respectively.

Overall, after a median follow-up of 76 weeks (IQR75 54-92), MH as previously defined by Mayo endoscopic subscore of 0 was described in 67 of the 159 endoscopic procedures and HH was found in pathology of 58 out of 155 procedures. At the time of the procedure, patients were symptomatic in 75 procedures. Patients were significantly more frequently symptomatic in case of endoscopic disease activity (n=71/92, 77.2%, 95% CI 67.7-84.6) as compared to those with MH (n=13/67, 19.4%, 95% CI 11.7-30.4, p<0.0001). The sensitivity and specificity of no symptom to detect MH was 80% and 77%, respectively. A total of 60 patients demonstrated bloody stools at the time of the procedure and 58 (96.6%) patients had endoscopic disease activity. Of note, 34 of the 92 patients with endoscopic disease activity did not have bloody stools. The negative predictive value, positive predictive value, sensibility and specificity of the absence of bloody stool to detect MH was 96%, 65%, 97% and 63% , respectively.

Histologic description was available for mucosal biopsies obtained at 155 procedures. Considering histologic activity, endoscopic disease activity was associated with histologic disease activity for 82 (93.2%) out of 88 patients and 15 (22.4%) of 67 patients with MH had histologic disease activity. The negative predictive value, positive predictive value, sensibility and specificity of MH to detect HH was 93%, 77%, 89% and 84%, respectively. Similar to mucosal healing, most of patients (n=53/55, 96,6%) with bloody stools had histological disease activity but only 56.1% (n=55/98) of patients without bloody stools had HH. Laboratory test (hemoglobin concentration, white blood count, CRP, ESR) were not associated with either endoscopic disease activity or histologic activity.

Outcomes and predictors of mucosal and histologic healing

After a median follow-up of 76 weeks (IQR 54-92), 27 (60%) of the 45 patients with endoscopic disease activity at baseline achieved MH. The proportion of patients with MH at week 26, 52 and 76 was 14 (31.1%), 21 (46.6%) and 24 (53.3%), respectively. The cumulative probabilities of MH with a Mayo endoscopic subscore of 0 at weeks 26, 52 and 76 from the time of initial endoscopic procedure were 26%, 52% and 70%, respectively (Figure 1A).

For predictors of endoscopic outcomes, all baseline factors were evaluated in univariate analysis using the Mantel-Cox log-rank test (Table 2). Disease duration less than 2 years, HR 5.5 (95% CI 2.15-14.4), familial history of IBD, HR 3.7 (95% CI 1.8-13.1) and TNF antagonist use at baseline HR 4.47 (95% CI 1.58-11.96) predicted MH by multivariate analysis (Table 2).

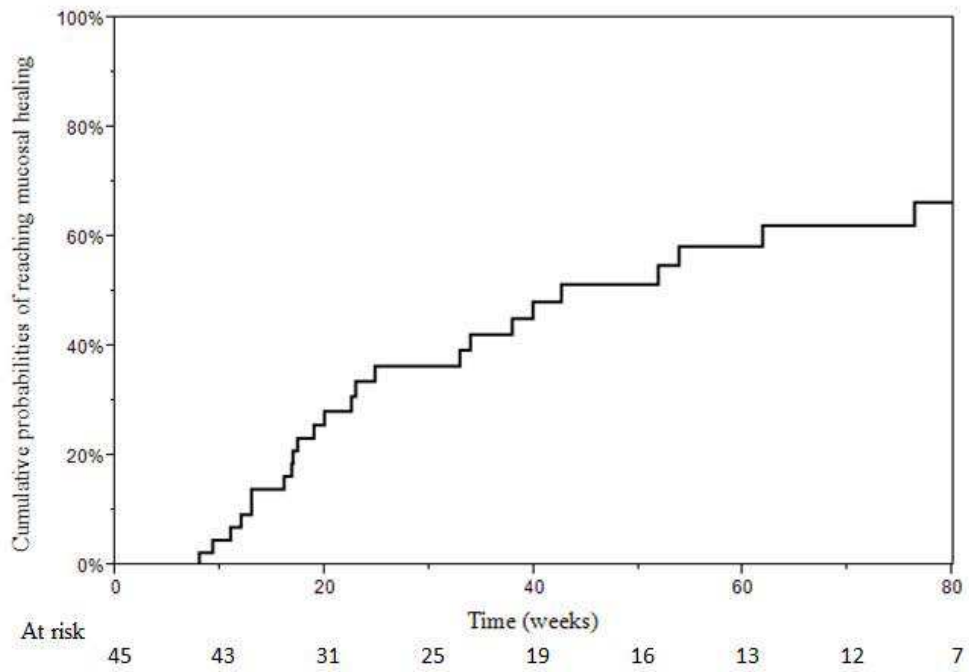
A total of 48 patients had baseline histologic activity. The proportion of patients with HH at week 26, 52 and at the end of the follow-up was 12 (25%), 17 (35.4%) and 24 (50%), respectively. The cumulative probabilities of HH at weeks 26, 52 and 76 from the time of initial endoscopic procedure were 19%, 41% and 57%, respectively (Figure 1B).

The same baseline factors were analyzed to identify predictors of HH (Table 2). Extensive disease at diagnosis and immunosuppressive predicted both histologic outcomes by univariate and multivariate analysis. Extensive disease at diagnosis predicted HH (HR=2.8 – 95%CI 1.17-7.24, p=0.0193) and immunosuppressive at baseline HR 0.15 (95% CI 0.008-0.72p=0.013) predicted a lower probability of achieving HH by multivariate analysis (Table 2).

Table 2: Predictors of mucosal healing and histologic healing by univariate analysis (log-rang test) and by multivariate (Cox model)

VARIABLES	MUCOSAL HEALING		HISTOLOGIC HEALING	
	Univariate analysis p-value	Multivariate analysis HR [IC95], p-value	Univariate analysis p-value	Multivariate analysis OR [IC95], p-value
Gender	0.94	-	0.74	-
Tobacco use	0.30	-	0.17	-
BMI < 24.9	0.44	-	0.32	-
Disease duration (<2 yrs)	0.0055	4.5 [1.8-11.5], 0.0013	0.07	-
Familial history of IBD	0.0087	5.4 [2-14.4], 0.0015	0.24	-
Montreal A at diagnosis	0.32	-	0.33	-
Montreal E3 at diagnosis	0.32	-	0.0097	2.7 [1.2-7.2], 0.193
EI manifestation	0.95	-	0.17	-
Prior hospitalization	0.38	-	0.16	-
Prior Immunosuppressive	0.25	-	0.16	-
Prior biologics	0.86	-	0.7	-
Treatment at baseline				
5-ASA	0.36	-	0.96	-
Oral steroid	0.65	-	0.35	-
Immunosuppressives	0.07	-	0.02	0.15 [0.008-0.7], 0.013
TNF α antagonists	0.02	4.9 [1.7-13.2], 0.0038	0.07	-
Baseline CRP < 5 mg/L	0.68	-	0.65	-
ESR < 30	0.98	-	0.66	-
Abbreviation : BMI, Body Mass Index; CRP, C-reactive protein; EI, extra-intestinal manifestation; ESR, Erythrocyte sedimentation rate; IS, immunosuppressive, TNF, Tumor Necrosis Factor; 5-ASA, 5-aminosalicylate acid				

1A



1B

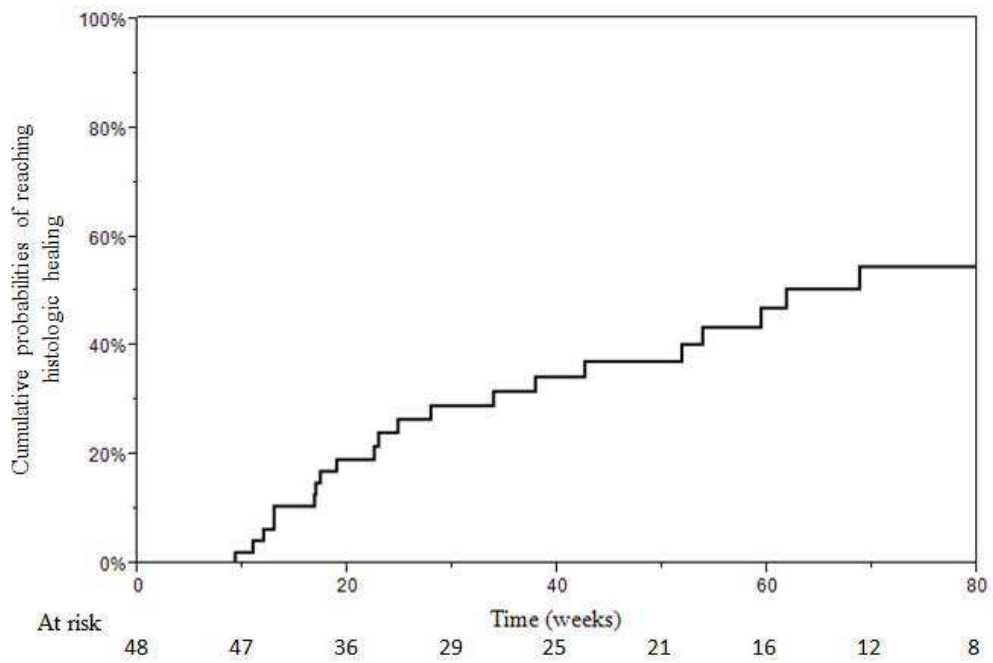


Figure 1: Cumulative probability of reaching mucosal healing (1A) and histologic healing (1B)

Medical therapy adjustments during study period

Among the 45 patients with endoscopic disease activity, a total of 51 adjustments in medical therapy were performed following the procedure regarding to endoscopic findings. Overall, during the study period, 5-ASA was introduced in 2 patients, steroids in 11 patients and immunosuppressive therapy was initiated after referral in 18 patients. TNF antagonists were introduced in 20 patients, optimized with dose escalation or interval shortening or switched within the class in 11 patients.

From an individual perspective, 21 (77.7%) of the 27 patients who achieved MH had one or more adjustments in medical therapy following endoscopic procedures until MH was achieved (i.e. they were treated to a target of MH) as compared to 3 (16.6%) of the 18 patients without MH at the end of the follow-up, $p < 0.0001$. Conversely, 15 of the 18 patients without MH at the end of the follow-up did not have adjustments in medical therapy despite the findings of endoscopic disease activity (i.e. they were not treated to a target of MH). The baseline characteristics of patients were similar between those treated to those not treated to the target of mucosal healing (see supplementary Table 1).

Supplementary table 1: Comparison of baseline characteristics of patients treated to the target of mucosal healing (n=24) to those not treated to the target of mucosal healing (n=21).

BASELINE CHARACTERISTICS	NOT TREATED TO THE TARGET OF MH	TREATED TO THE TARGET OF MH	p
Gender (Male) – n (%)	10 (48)	12 (50)	0.87
Never smoker – n (%)	16 (76)	20 (83)	0.41
BMI – n (%)	22.4 (20-25.1)	23 (20.6-27.3)	0.59
Disease duration (years) – median (IQR75)	4.1 (2.2-10.4)	2 (0.1-8.3)	0.24
Familial history of IBD – n (%)	1 (5)	8 (34)	0.01
Median age at diagnosis (years) – median (IQR75)	44 (21-55)	25 (18-40)	0.21
Montreal E3 at diagnosis – n (%)	10 (58)	13 (57)	0.55
EI manifestation – n (%)	5 (24)	3 (12)	0.32
Prior hospitalization – n (%)	6 (29)	10 (42)	0.36
Prior steroid use – n (%)	15 (71)	16 (66)	0.73
Prior Immunosuppressive use – n (%)	9 (42)	6 (25)	0.20
Prior TNF α antagonist use – n (%)	6 (28)	8 (33)	0.73
Treatment at baseline			
5-ASA – n (%)	14 (66)	10 (42)	0.09
Oral steroid – n (%)	8 (38)	11 (46)	0.6
Immunosuppressives – n (%)	6 (28)	3 (12)	0.18
TNF α antagonists – n (%)	2 (9)	8 (17)	0.17
CRP (mg/L) – median (IQR75)	3 (1-34.7)	3.15 (2-10.8)	0.77
ESR (mm) – median (IQR75)	25 (11-48)	21 (9.5-48)	0.57
Abbreviation : BMI, Body Mass Index; CRP, C-reactive protein; EI, extra-intestinal manifestation; ESR, Erythrocyte sedimentation rate; IS, immunosuppressive, TNF, Tumor Necrosis Factor; 5-ASA, 5-aminosalicylate acid			

Of the 51 adjustments in medical therapy, 8 (15.6%) were made in the absence of clinical symptoms and no adjustment in medical therapy was performed according to endoscopic findings in 22 (31%) out of 69 symptomatic patients at the time of the procedure.

A total of 3 patients out of the 45 patients with endoscopic disease activity at baseline underwent proctocolectomy during the follow-up period, including 1 patient who achieved MH because of relapsing disease. At last follow-up, 36 patients were treated with 5-ASA, 19 patients with biologics, 19 patients with immunosuppressives, including 16 patients receiving

combination therapy, and 8 patients with steroids including 2 patients treated with budesonide MMX®.

Factors associated with endoscopic outcomes

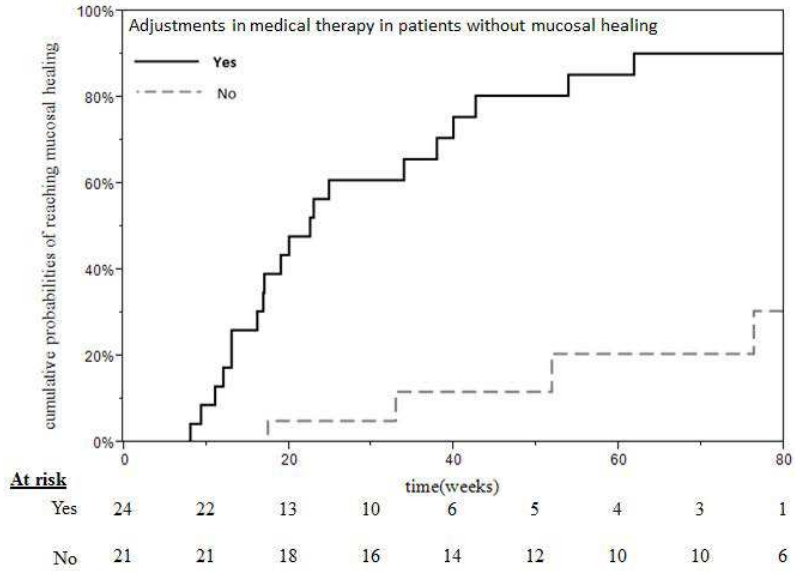
When factors associated with MH were assessed during the follow-up period, the type of treatments (5-ASA, steroids, biologics or immunosuppressive uses) was not individually associated with MH (Table 3). However, any adjustments in medical therapy following each endoscopic procedure in of the setting of persistent endoscopic lesions were associated with MH (HR=9.8 – 95% CI [3.6-34.5], $p<0.0001$ (Table 3 and Figure 2A).

With regards to HH, similar findings were observed. In multivariate analysis, any adjustment in medical therapy following each endoscopic procedure in the case of persistent histologic activity (HR=9.2– 95% CI [3.4-31.9], $p<0.0001$) was associated with endoscopic improvement (Table 3 and Figure 2B).

When predictors and factors associated with medical management linked to MH by univariate analysis were included in a multivariate analysis, adjustment of medical therapy was still associated with MH (HR=5.05 – 95% CI [1.67-19.04], $p=0.0031$). For HH, multivariate analysis demonstrated that adjustment of medical therapy (HR=8.8 – 95% CI 3.1-31.2, $p<0.0001$) was the only significant predictor (Table 4).

Figure 2: Kaplan-Meier analysis of reaching mucosal healing and histologic healing according to medical management during the follow-up period identified by multivariate analysis: (A) adjustments in medical therapy were made according to the finding of disease activity at subsequent endoscopic procedures until mucosal healing occurred. (B) Adjustments in medical therapy according to the finding of histologic activity following subsequent endoscopic procedures until histologic healing occurred.

2A



2B

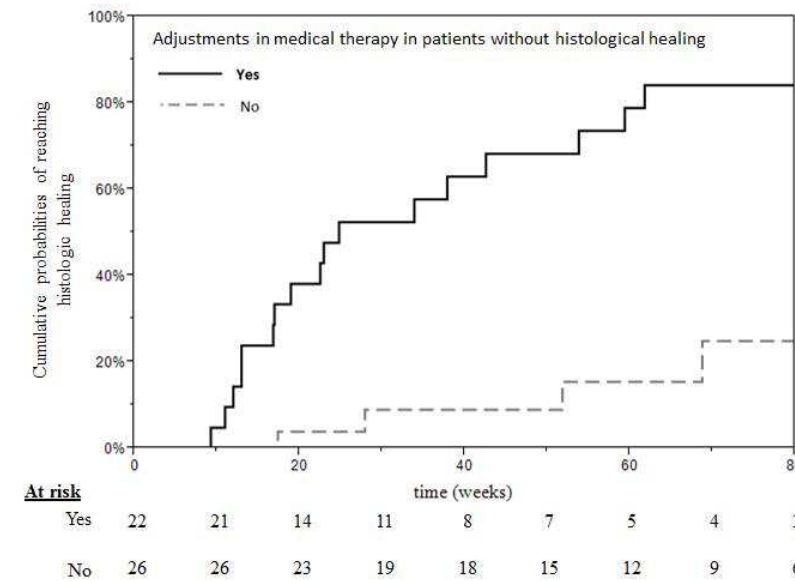


Table 3: Combined multivariate analysis of predictors and factors associated with mucosal healing and with histologic healing during (Cox model).

VARIABLES	MUCOSAL HEALING		HISTOLOGIC HEALING	
	Univariate analysis p-value	Multivariate analysis HR [IC95], p-value	Univariate analysis p-value	Multivariate analysis OR [IC95], p-value
Median time between assessment	0.64		0.34	
Any therapeutic change with steroid	<0.0001	9.8 [3.6-34.5], <0.0001	<0.0001	9.2 [3.4-31.9], <0.001
5ASA use after referral	0.20		0.08	
Steroid use after referral	0.14		0.42	
IS use after referral	0.37		0.43	
TNF antagonists use after referral	0.54		0.67	

Abbreviation : HR, Hazard Ratio; IS, immunosuppressive, TNF, Tumor Necrosis Factor; 5-ASA, 5-aminosalicylate acid

Table 4: Combination of factors associated with mucosal healing and histologic healing during the follow-up period after referral by univariate analysis (log-rang test) and by multivariate (Cox model).

VARIABLES	MUCOSAL HEALING			HISTOLOGIC HEALING		
	HR	IC95%	p-value	HR	IC95	p-value
Disease duration (<2 yrs)	2.65	1.02 – 7.05	0.04	-	-	-
Familial history of IBD	3.17	1.09 – 9.06	0.035	-	-	-
Montreal E3 at diagnosis	-	-	-	1.88	0.78 – 4.99	0.1642
Immunosuppressive at baseline	-	-	-	0.28	0.01 – 1.41	0.1407
TNF α antagonists at baseline	3.59	1.23 – 9.95	0.02	-	-	-
Any adjustment in medical therapy	5.05	1.67 – 19.04	0.0031	8.8	3.16 – 31.22	<0.0001

Abbreviation : IBD, Inflammatory Bowel Disease ; TNF, Tumor Necrosis Factor;

DISCUSSION

This is the first study that specifically investigates the feasibility of a treat to target approach in UC, where the target of medical therapy is endoscopic healing of the mucosa. In this retrospective cohort of patients with mild to severe UC, we found that a high rate of MH even when defined by a Mayo endoscopic subscore of 0 and HH can be achieved. The occurrence of MH during the study period was strongly associated with adjustment in medical therapy according to endoscopic findings.

MH is receiving increasing attention based on the inability of treatment strategy driven by symptoms to change the course of UC in one hand and in other hand an association between MH and a reduction in UC-related surgeries, hospitalizations, steroid use, and clinical relapse. Colombel, 2011 #92;Feagan, 2013 #120;Ferrante, 2008 #72;Froslic, 2007 #107;Laharie, 2013 #84} Importantly the risk of colectomy during UC was predicted by early MH but not by clinical remission in both prospective population-based cohort of patients with newly diagnosed UC and an Italian cohort of newly diagnosed UC treated with steroids, meaning that there is a discrepancy between clinical symptoms and objective findings of endoscopic inflammation that ultimately impact long-term outcomes. Although symptoms such as diarrhea or bloody stools were predictive of endoscopic disease activity in this study, in about 20 to 30 % of patients there were no clinical symptoms, despite the presence of endoscopic disease activity. This point highlights the lack of sensitivity of clinical symptoms to predict the presence of ongoing mucosal inflammation that could predispose the patient to hospitalization for severe relapse or surgery related to unremitting colonic inflammation.

That said, the feasibility and utility of achieving of MH in clinical practice continues to be questioned. In contrast to Crohn's disease, most approved treatments for UC have been demonstrated to induce MH. It is informative to compare rate of MH usually defined by a Mayo endoscopic subscore of 0 or 1 from the SUCCESS trial, which evaluated the efficacy of azathioprine monotherapy, infliximab monotherapy, and combination therapy, and rate of MH

with 5-ASA. The SUCCESS trial demonstrated that the combination therapy among 231 patients with moderate to severe UC refractory to steroid who were naïve to immunosuppressives seemed to be the most effective treatment achieving MH in 63 % of cases compared to 55% in the infliximab monotherapy group and 37% in the azathioprine monotherapy group at week 16.(Panaccione et al. 2014) In mild to moderate UC disease, a high rate of MH was also observed for half of patients treated with mesalamine.(Feagan et al. 2013, Romkens et al. 2012) It should be noted however, that in most of these clinical trials, that MH allowed the persistent presence of a Mayo endoscopic subscore of 1, which is a less stringent criteria than we applied in our study.

The use of TNF antagonist alone or in combination with immunosuppressive were not associated with higher rate of MH and only 42% of the population were treated with infliximab at the end of the follow-up. However the use of a treatment algorithm approach that was based on adapting therapy to the target of MH, meaning optimizing biologic therapy by increasing the dose, adjusting to target serum infliximab concentrations, switching biologics, and adding immunosuppressive agents as needed to reach MH, was ultimately successful in achieving a cumulative probability of reaching MH with no endoscopy disease activity of 70% at 76 weeks.

Adjustments in medical therapy in absence of MH could be argued to be a confounder with the study outcomes. However, it is worth noting that the median time between endoscopic procedures was 25 weeks and that the endoscopic procedures were usually planned a priori at the time of the previous endoscopic procedure for the purpose of assessing for MH and if indicated adjusting medical therapy, rather than being planned at the time of the subsequent endoscopic procedure in response to clinical symptoms. In some cases, adjustments in medical therapy were performed despite the absence of clinical symptoms. While it may seem logical and obvious that adjustment of medical therapy in patients with persistent endoscopic inflammation could result in subsequent MH, it never has been reported.

Some predictors of MH have been previously reported such as extensive colitis, educational state and female gender in newly diagnosed colitis.(Ardizzone et al. 2011, Froslic et al. 2007) A short disease duration that was shown in an early Crohn's disease to result in higher rate of reaching especially with TNF antagonist therapy, was extended to UC.(Colombel J. F. et al. 2014, D'Haens et al. 2008) In our study, which had a more heterogeneous patient population, a family history of IBD was also found to be associated with MH (which in turn could be associated with the educational status and a better knowledge of IBD leading to better adherence to treatment in turn rather than a disease severity).(Froslic et al. 2007, Ghosh et al. 2012, Nguyen et al. 2009) An important finding was that treatment with a TNF antagonist at baseline did not preclude MH.

Our preliminary study results should be considered with several limitations. The short follow-up period precluded the assessment of the sustained mucosal healing. The study was retrospective and the cohort of patients represents only a small subset of the patients referred to the UCSD IBD Center. The lack of a randomized control population and predefined therapeutic algorithm is another important limitation that precluded efficacy analyses of each treatment. Although a validated endoscopic scoring system was not used, all endoscopies were performed by experienced endoscopists. The definition of MH remains debated but is usually based on a Mayo endoscopic score of 0 or 1 in randomized controlled trial. In our study, since the definition friability is associated with high inter and intra observer variability, MH was defined by the absence of any friability even mild, equivalent to Mayo endoscopic sub-score of 0.(Travis S. P. et al. 2012) Taking this point into account, the rate of MH in this population is quite high and is likely the reason why the association with histologic activity was found with a high sensitivity and specificity of MH to predict HH.(Lemmens et al. 2013) Histologic assessment was also reported in this study because of some evidence that indicated better long-term outcomes might be achieved with HH, as compared to MH.(Peyrin-Biroulet et al. 2014) There is no universally accepted definition of HH, and a simple histologic index

based on neutrophil infiltrate was demonstrated to have low intra or inter-observer variability in addition to be associated when absent with a decrease risk of colorectal cancer during IBD.(Gupta et al. 2007) While further prospective studies are needed to determine the best scoring system and whether this emerging goal is superior to the target of MH, our retrospective data demonstrated that HH as well as MH appears to be an achievable target. The high rate of HH may be a consequence of the robust definition of MH. The rate of HH was higher when adjustment in medical therapy was performed in case of persistent histologic activity.

In conclusion, the adjustment of medical therapy on the basis of findings of endoscopic disease activity in order to reach the target of MH (treating to target) was feasible in clinical practice and resulted in high rates of MH. Additional well designed studies reports on the long-term UC outcomes of such approach are needed to confirm these preliminary results and to determine whether treating to a target of MH can change the long-term course of UC.

Acknowledgements: none

3.2.L'infliximab : un anti-TNF α

L'infliximab est un anticorps monoclonal de type IgG1 κ chimérique (fraction Fab murine, fraction Fc humaine) fixant le TNF α soluble et transmembranaire. Son action physiopathologique a surtout été étudiée chez les malades atteints de MC, où l'expérience de cette thérapeutique est plus ancienne (1994). Il agit à différents niveaux de la réponse inflammatoire, provoquant l'apoptose des cellules immunitaires, monocytes et lymphocytes, diminuant le recrutement des cellules inflammatoires, restaurant la barrière muqueuse intestinale, inhibant les réactions d'angiogénèse et la réponse fibroblastique à l'inflammation.(Rossetti et al. 2004)

Son administration s'effectue par voie intraveineuse à une dose adaptée au poids (5 mg/kg) lors d'une courte hospitalisation sous surveillance médicale. En pratique, son utilisation se fait selon deux phases successives, la phase dite d'induction constituée de 3 perfusions se succédant à 15 jours et 6 semaines d'intervalle (S0, S2, S6) suivie en générale d'une phase d'entretien où les perfusions sont réalisées tous les 8 semaines, adaptées en fonction de la réponse thérapeutique.

3.2.1. Efficacité de l'infliximab

Actuellement, plusieurs études contrôlées randomisées et méta-analyses ont été publiées. On peut distinguer deux formes de RCH étudiées, d'une part la colite chronique corticodépendante ou corticorésistante et d'autre part la colite aiguë grave nécessitant une hospitalisation avec un risque de chirurgie en urgence élevé.

3.2.1.1.Les colites chroniques corticodépendantes ou corticorésistantes modérées à sévères

Les premières études d'efficacité de l'infliximab au cours de la rectocolite hémorragique ont été effectuées sur de petites cohortes. Ainsi, à partir d'une série de 43 malades, présentant une colite corticodépendante ou corticorésistante à l'exclusion des colites fulminantes, une randomisation était réalisée en deux groupes, placebo et infliximab 10 mg/kg selon une stratégie de 2 perfusions à deux semaines d'intervalle. A 6 semaines, aucune différence statistique n'était observée entre les deux groupes où près d'un tiers des malades étaient répondeurs.(Probert et al. 2003) En 2004, 2 essais prospectifs sur de petites populations comparant l'infliximab à une corticothérapie concluaient à l'équivalence en terme de rémission clinique entre ces deux thérapeutiques.(Armuzzi et al. 2004, Ochsenkuhn et al. 2004)

C'est seulement en 2005 sous forme d'une seule publication que paraissent les résultats de deux larges études prospectives randomisées en double aveugle contre placebo, ACT-1 et ACT-2 (Active ulcerative Colitis Trial), établissant l'efficacité de l'infliximab dans la rectocolite hémorragique.(Rutgeerts et al. 2005) 364 malades dans chaque étude ont été inclus soit un total de 728 malades: l'ensemble de ces malades présentaient une corticodépendance, ou une corticorésistance et/ou étaient en échec des traitements immunosuppresseurs (azathioprine (AZA) et 6-mercaptopurine (6-MP)) et une atteinte colique gauche ou pancolite, les rectites isolées étant exclues. L'évaluation de la gravité de la maladie était basée sur le score clinico-endoscopique de Mayo et seuls les malades ayant un score supérieur à 6 étaient inclus. Le design des deux études était proche avec trois bras : perfusion de placebo, d'infliximab à 5mg/kg, ou d'infliximab à 10 mg/kg à 0, 2 et 6 semaines puis toutes les 8 semaines pendant 30 semaines dans ACT 2 et 46 semaines dans ACT 1. Le score de Mayo (critère principal de jugement) avec évaluation endoscopique était calculé aux semaines 0, 8, 30 pour les deux études et également à la semaine 54 pour ACT 1. Dans les deux séries, les résultats étaient similaires et significativement supérieurs au traitement par placebo ; il n'y avait pas de différence entre le groupe perfusé à 5 mg/kg et 10 mg/kg. La

réponse clinique (définie par une diminution du score de mayo de 3 points ou de 30% avec au minimum d'un point en moins dans le sous-score rectorragie) était obtenue pour 61,5-69,4 % des malades versus 29,3-37,2 % dans le groupe placebo. La rémission était obtenue chez 27,5-38,8 % des malades traités versus 5,7-14,9 % dans le groupe placebo. Le délai d'action était court puisque l'efficacité était obtenue dès la deuxième semaine. Dans ACT 1, à la semaine 54, la réponse se maintenait pour 38,8 % des malades et 19,8 % étaient toujours en rémission. Egalement, une cicatrisation muqueuse était constatée plus fréquemment dans le groupe infliximab pour 59-62 % des malades contre 30,9-33,9 % des malades du groupe placebo. Enfin, 51,1 à 61 % des malades recevaient à l'inclusion des corticoïdes à la dose moyenne de 20 mg ; à la semaine 30, la posologie quotidienne moyenne se situait entre 5,6 et 10 mg et près d'un patient sur 4 en rémission avait cessé toute corticothérapie. Des analyses post-hoc montraient une diminution de près de 50 % du risque de colectomie chez les malades traités par biothérapie (hazard ratio = 0.57) (Colombel J. F. et al. 2011)

Au total l'introduction de l'infliximab chez les malades porteurs d'une rectocolite hémorragique dépendante ou réfractaire aux corticoïdes ou en échec des immunosuppresseurs permet d'obtenir à 1 an une réponse clinique chez près de 2/3 des malades et une rémission clinique chez 1/3 des malades traités pour une colite gauche ou une pancolite.

Au-delà de l'efficacité clinique, un des éléments clés dans la prise en charge des patients est l'amélioration de leur qualité de vie et la possibilité de mener une vie en bonne santé (bien-être physique mais aussi mental et social) comme la définit l'Organisation Mondiale de la Santé. Au cours des essais ACT 1&2, les questionnaires de qualité de vie spécifique aux MICI (Inflammatory Bowel Disease Questionnaire [IBDQ]) ont été recueillis parmi chez les 728 malades à l'inclusion, à la semaine 8, à la semaine 30 et à la semaine 54 pour ACT 1. (Reinisch et al. 2007) L'IBDQ est un questionnaire d'évaluation spécifique de la qualité de vie des malades atteints de MICI structuré en quatre 4 thèmes : symptômes digestifs, état

général, statut social et statut psychologique. L'amélioration de la qualité de vie était supérieure dans les groupes traités par infliximab et d'autant plus importante que le patient était en rémission clinique. Une amélioration de 16 points à l'IBDQ était observée chez 68,7% et 32 points pour 54.7 % des malades, valeurs seuils considérées comme preuve d'une amélioration significative de la qualité de vie. Concernant le bien-être social, les malades répondeurs augmentaient de façon significative leur temps de travail et leur efficacité au travail.

3.2.1.2.La colite aiguë grave

La colite aigue grave ou colite fulminante pose un problème de définition. En effet, il n'existe pas de consensus établi sur la définition de cette urgence. Plusieurs scores ont été établis afin d'évaluer la gravité de la poussée tel que le score de Truelowe et Witts, l'index de Lichtiger, le Seo index ou encore le Fulminant Colitis Index (FCI). D'autres la définissent par une résistance à une corticothérapie intraveineuse de durée variable -3 à 7 jours-. Cependant un des principaux caractères est la manifestation aiguë de la colite la différenciant d'une colite chronique active s'acutisant. Elle est en règle associée à un syndrome de réponse inflammatoire systémique avec hyperthermie, tachycardie, anémie.

Deux études contrôlées randomisées testant l'infliximab ont été réalisées dans la colite aiguë grave. La première, en 2001 par Sands et collaborateurs, n'a pu être menée à terme du fait d'un défaut de recrutement.(Sands et al. 2001) Ainsi, seuls 11 malades présentant une colite aiguë depuis moins de 2 semaines, réfractaires à un traitement par corticoïde intraveineux ont été randomisés : 8 dans le groupe infliximab et 3 dans le groupe placebo. La moitié des malades ont répondu dans le groupe infliximab et aucun dans le groupe placebo. Cependant,

du fait du manque de puissance de cette étude, il n'a pu être mis en évidence de différence statistiquement significative entre ces deux groupes.

En 2005, une étude multicentrique suédoise, prospective, en double aveugle a été menée sur 45 malades atteints de colite aiguë grave.(Jarnerot et al. 2005) Les critères d'inclusion étaient une résistance au traitement par bétaméthasone intraveineux 3 jours consécutifs associée soit à un Fulminant Colitis Index supérieur à 8 au troisième jour, soit un index de Seo supérieur à 150 à J6, J7 ou J8. Le critère de jugement principal était la survenue d'une colectomie dans les 3 mois suivant la randomisation. Les malades traités par placebo ont significativement été plus sanctionnés d'un geste chirurgical puisque 67 % ont été opérés contre 29 % dans le groupe traité par infliximab.

Récemment, une étude de non infériorité prospective randomisée a comparé l'efficacité de l'infliximab au traitement alors de référence la ciclosporine. Il n'existait pas de différence entre les bras de traitement et des résultats en termes de colectomie similaire à ceux observés dans l'étude de Jarnerot.(Laharie et al. 2012)

3.2.1.3.Intérêt de la combothérapie

L'appellation combothérapie dénomme le fait d'associer l'anti-TNF à un immunosuppresseur traditionnel, en l'occurrence l'azathioprine, le seul utilisé au cours de la rectocolite hémorragique. Les enjeux d'une telle association thérapeutique est d'augmenter l'efficacité thérapeutique. Le principal intérêt démontré d'une combothérapie réside dans l'interaction médicamenteuse entre les deux classes thérapeutiques en particulier sur la pharmacocinétique des anti-TNF α .(Ordas et al. 2012a) De plus en plus d'études ont observé l'existence d'une relation étroite entre les concentrations sériques des anti-TNF α (pharmacocinétique) et l'efficacité du traitement (pharmacodynamique). Dans la majorité des essais réalisés (aussi

bien chez les patients atteints de MICI que chez ceux atteints de polyarthrite rhumatoïde), les taux de réponses cliniques sont positivement corrélés aux taux sériques d'anti-TNF α . A l'inverse, l'absence de détection ou des faibles concentrations sériques d'anti-TNF α sont associées à des résultats cliniques médiocres. Ainsi, il existe une relation étroite entre la concentration sérique de l'anti-TNF α et les résultats cliniques (réponse clinique, rémission clinique et cicatrisation muqueuse). Plusieurs équipes se sont intéressées aux facteurs impliqués dans l'augmentation de la clairance des anti-TNF α , c'est-à-dire les mécanismes participants à l'augmentation de leur élimination et par conséquent à la diminution de leur concentration sérique. Un des facteurs majeurs influençant la clairance est la présence d'anticorps anti-TNF α (AAT). Ces AAT fixent les anti-TNF α et sont responsables d'une accélération de l'élimination des traitements anti-TNF α et par conséquent d'une diminution de leur concentration sanguine et de leur efficacité (Figure 1). L'apparition des AAT est fortement corrélée à l'absence de traitement d'immunosuppresseur concomitant soulignant l'intérêt de cette association thérapeutique.(Ordas et al. 2012a)

Au cours de l'essai SUCCESS, des patients atteints de RCH réfractaire, naïfs d'anti-TNF α et majoritairement naïfs d'immunosuppresseurs (près de 10 % des patients avaient été exposés dans le passé à une thiopurine) ont été randomisés en 3 bras, azathioprine monothérapie, infliximab monothérapie ou combothérapie.(Panaccione et al. 2014) La proportion de malades ayant une RCH en rémission sans corticoïde à la semaine 16 était significativement plus importante chez les patients traités par combothérapie (40%) en comparaison aux deux autres groupes (22 % sous infliximab en monothérapie et 24 % sous azathioprine en monothérapie). Une cicatrisation muqueuse à la semaine 16, définie par un Mayo score endoscopique de 0 ou 1, était obtenue chez 63 % des patients dans le groupe combothérapie contre 55 % dans le groupe infliximab monothérapie ($p = 0,295$) et 37 % ($p < 0,0001$) dans le groupe azathioprine.(Panaccione et al. 2014)

3.2.2. Effets secondaires, sécurité d'emploi

D'une manière générale, l'utilisation d'immunosuppresseurs ou d'immunomodulateurs fait craindre deux grandes classes d'effets indésirables, l'infection sévère et les cancers.

Pour le cas spécifique de la rectocolite hémorragique, les essais ACT 1 et ACT 2 ou SUCCESS ne montraient pas de différence en terme d'incidence d'effets secondaires entre les groupes infliximab et placebo. Dans les deux essais ACT 1 et ACT 2, la proportion des effets secondaires jugés sévères était identique entre le groupe placebo et les groupes traités par infliximab. On remarque cependant qu'il a été rapporté un cas de tuberculose, un cas d'histoplasmosse mortelle, un cancer de la prostate, un adénocarcinome du rectum, un carcinome basocellulaire et deux atteintes neurologiques sévères parmi les malades traités par anti-TNF α .

Au cours des MICI (maladie de Crohn et RCH), il n'a pas été observé de différence significative d'infections entre le placebo et les anti-TNF α , résultat confirmé par une méta-analyse (49,1 % vs. 45,3 %; $p = 0,402$). (Lichtenstein et al. 2012b) Cependant, il existerait une augmentation du risque d'infection opportuniste sous traitement anti-TNF α (OR=2,05; IC 95% [1,10-3,85]). (Ford and Peyrin-Biroulet 2013) Plus récemment, le registre prospectif américain TREAT qui a évalué la sécurité de l'emploi à long terme de l'infliximab chez plus de 5000 patients atteints de MICI, observait une légère augmentation du risque d'infection sévère sous infliximab (HT=1,43 ; IC 95% [1,11, 1,84], $p=0.006$). (Lichtenstein et al. 2012a) Le risque n'était pas plus important en cas d'association à un immunosuppresseur. Il faut souligner que la mortalité et le risque d'infection sévère était principalement associés à la corticothérapie ainsi que la prise de narcotiques.

Concernant les cancers et les lymphomes, l'imputabilité des anti-TNF α et/ou des immunosuppresseurs dans la survenue de lymphomes est une crainte majeure. L'étude de la survenue de lymphome au cours d'un traitement par anti-TNF est difficile à évaluer en raison d'un bruit de fond induit par l'utilisation concomitante d'azathioprine dont le risque accru de

lymphome est clairement établi par la cohorte Française CESAME.(Beaugerie et al. 2009) Ainsi, un rapport récent de la Food & Drug Administration (FDA) confirme l'augmentation du risque de lymphome en cas de combothérapie en lien principalement avec la prise d'une thiopurine. Ce risque n'était pas retrouvé en case de monothérapie par anti-TNF. (Deepak et al. 2013) Concernant les cancers d'organes, deux méta-analyses des essais randomisés, une étude de population, une étude cas-témoins et une large cohorte rétrospective n'ont pas retrouvé de risque de cancer solide sous anti-TNF α à l'exception d'une augmentation minime du risque de mélanome.(Fidder et al. 2009, Lichtenstein et al. 2012b, Long et al. 2012)

3.3.Limite de l'utilisation l'infliximab au cours de la RCH

En dépit de l'efficacité retrouvée de l'infliximab au cours de ces formes sévères résistantes à l'utilisation d'une première ligne de corticoïdes, plusieurs interrogations concernant son efficacité limitent encore son utilisation.

La première concerne la forme rectale de la RCH. En effet, dans les essais randomisés, les patients atteints d'une rectite isolée étaient exclus. Pourtant, certaines formes rectales sont particulièrement invalidantes en raison du syndrome rectal induit (faux besoins, impériosité fécale ou encore épisodes d'incontinence imposant des passages pluriquotidiens). L'exclusion de ces formes n'est pas innocente car elles sont réputées être particulièrement résistantes aux différentes thérapeutiques entreprises. En conséquence, l'efficacité de l'infliximab au cours de la rectite reste à prouver.

La seconde limite repose sur la question posée de son efficacité au long cours essentielle dans ces maladies chroniques. Les données concernant le devenir à long terme des patients traités par IFX sont moins nombreuses et les résultats plus hétérogènes. Ainsi, le taux de rémission variait selon les études de 17 % à 90 % après un suivi de 10 à 24 mois.(Caviglia et al. 2007, Gies et al. 2010, Jakobovits et al. 2007, Lee et al. 2013) Les deux principaux points faibles de

ces essais restent la durée du suivi relativement courte, et le faible effectif des populations (de 9 à 134 patients). De même, le devenir des patients à l'arrêt de l'IFX a été très peu étudié. Dans une cohorte de 4 patients en rémission et ayant arrêté l'IFX, aucun des patients ne présentait de rechute au terme d'un suivi de 6.5 mois.(Caviglia et al. 2007) Une autre étude rapportait, parmi une cohorte de 28 patients ayant stoppé le traitement, un taux de rémission soutenue de 40 % au terme d'un suivi de 4,5 ans.(Steenholdt et al. 2012) Ainsi, au-delà de l'année de suivi des essais randomisés contrôlés, il n'existe que peu de données permettant d'adapter la prise en charge thérapeutique, à savoir la poursuite ou l'arrêt du traitement par IFX. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre seconde étude sur le devenir à long terme des patients atteints de RCH et traités par IFX afin de rechercher les facteurs prédictifs de rémission, de rechute, de chirurgie et de rémission soutenue, c'est-à-dire sans rechute.

Infliximab for refractory ulcerative proctitis

G. BOUGUEN*, X. ROBLIN†, A. BOURREILLE‡, L. FEIERS, J. FILIPPI¶, S. NANCEY**, J.-F. BRETAGNE*,
B. FLOURIÉ**, X. HÉBUTERNE¶, M.-A. BIGARDS, L. SIPROUDHIS* & L. PEYRIN-BIROULETS

*Inserm 991, Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Rennes, Pontchaillou, France; †Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France; ‡Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Nantes, Nantes, France; §Inserm U954 and Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Nancy, Vandœuvre-les-Nancy, France; ¶Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Nice, Nice, France; **Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Lyon, Lyon, France

Correspondence to:
Prof. L. Peyrin-Biroulet, Inserm U954, and Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Nancy, Allée du Morvan, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France.
E-mail: peyrin-biroulet@netcourrier.com

Publication data
Submitted 30 January 2010
First decision 25 February 2010
Resubmitted 4 March 2010
Accepted 5 March 2010
Epub Accepted Article 8 March 2010

SUMMARY

Background

Efficacy of infliximab in treating ulcerative proctitis remains unknown.

Aim

To evaluate the clinical, biological and endoscopic efficacy of infliximab therapy in refractory proctitis.

Methods

The charts of 420 patients treated with infliximab for ulcerative colitis were reviewed. Thirteen patients were treated with infliximab for refractory ulcerative proctitis in six referral centres between 2005 and 2009.

Results

Following infliximab therapy induction, 9/13 patients (69%) had a complete response (defined as absence of diarrhoea and blood), 2/13 (15%) had a partial response and 2/13 (15%) were primary nonresponders. The median follow-up was 17 months (range, 3–48). Among the 11 patients with clinical response after infliximab induction therapy, 9 (82%) patients maintained response at last follow-up. Disappearance of rectal disorders was observed in all nine patients who maintained clinical response at last follow-up. Following infliximab induction therapy, the mean CRP level fell from 12.8 mg/L to 4.7 mg/L. Endoscopic evaluation was performed before and after infliximab in seven patients, showing an improvement in mucosal lesions in four patients, persistent mild endoscopic activity in two patients and no improvement in one patient. One patient underwent proctocolectomy.

Conclusion

Infliximab therapy seems to be effective in inducing and maintaining a clinical response in refractory ulcerative proctitis.

Aliment Pharmacol Ther 31, 1178–1185

INFLIXIMAB FOR REFRACTORY ULCERATIVE PROCTITIS

Guillaume Bouguen¹, Xavier Roblin³, Arnaud Bourreille⁴, Laura Feier², Jérôme Filippi⁵, Stéphane Nancey⁶, Jean-François Bretagne¹, Bernard Flourié⁶, Xavier Hébuterne⁵, Marc-Andre Bigard², Laurent Siproudhis¹, Laurent Peyrin-Biroulet²

¹ Inserm 991, Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Rennes, Pontchaillou;

² Inserm, U954 and Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Nancy, Vandœuvre-les-Nancy;

³ Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Saint-Etienne;

⁴ Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Nantes;

⁵ Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Nice;

⁶ Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Lyon, France.

Correspondence to:

Prof. Laurent Peyrin-Biroulet, MD, PhD

Inserm U954, and Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Nancy, Allée du Morvan,

54511 Vandœuvre-lès-Nancy, FRANCE

Phone: + 33 3 83 15 36 31/ Fax: + 33 3 83 15 36 33

Email address: peyrin-biroulet@netcourrier.com

Short title: Infliximab for ulcerative proctitis

Key words: ulcerative proctitis, refractory ulcerative colitis, infliximab

Competing interest: G.B., XR, AB, JF, BF, LF, XH, SN, JFB, MAB, LS declare no conflict of interest. L.PB. has received consulting fees from Abbott Laboratories and UCB Pharma; lecture fees from Centocor for speaking at further medical education events; and grant support from UCB Pharma.

Sources of support: none

SUMMARY

Background: Efficacy of infliximab in treating ulcerative proctitis is unknown.

Aim: To evaluate clinical, biological and endoscopic efficacy of infliximab therapy in refractory proctitis.

Methods: The charts of 420 patients treated with infliximab for ulcerative colitis were reviewed. Thirteen patients were treated with infliximab for refractory ulcerative proctitis in six referral centers between 2005 and 2009.

Results: Following infliximab therapy induction, 9/13 patients (69%) had a complete response (defined as absence of diarrhea and blood), 2/13 (15%) had a partial response and 2/13 (15%) were primary non-responders. The median follow-up was 17 months (range, 3-48). Among the 11 patients with clinical response after infliximab induction therapy, 9 (82%) patients maintained response at last news. Disappearance of rectal disorders was observed in all 9 patients who maintained clinical response at last news. Following infliximab induction therapy, the mean CRP level fell from 12.8 mg/L to 4.7 mg/L. Endoscopic evaluation was performed before and after infliximab in 7 patients, showing an improvement in mucosal lesions in 4 patients, persistent mild endoscopic activity in 2 patients, and no improvement in one patient. One patient underwent proctocolectomy.

Conclusion: Infliximab therapy seems to be effective in inducing and maintaining clinical response in refractory ulcerative proctitis.

INTRODUCTION

In population-based studies, ulcerative colitis was confined to the rectum at the time of diagnosis in 22% to 59% of patients.(Bjornsson et al. 1998, Gower-Rousseau et al. 1994,

Henriksen et al. 2006, Moum et al. 1996, Pagenault et al. 1997, Solberg et al. 2009) The 2-yr, 5-yr and 10-yr cumulative rates of relapse after the first diagnosis were respectively of 42%, 57% and 84% for all patients with ulcerative proctitis (UP) at diagnosis.(Ayres et al. 1996, Meucci et al. 2000) UP may result in distressing symptoms, including stool frequency, tenesmus, urgency and bleeding.(Meucci et al. 2000, Regueiro et al. 2006b) Despite the significant benefits of rectally administered aminosalicylates and corticosteroids,(Regueiro et al. 2006b, Travis S.P.L. et al. 2008) some patients with UP and good observance fail to improve and require additional medical therapy.

The management of UP refractory to standard medications remains a challenge in clinical practice, as few data are evidence-based.(Regueiro et al. 2006b) Several medications have been tested to treat refractory UP. In randomized controlled trials, antibiotics, cyclosporine enemas and oral methotrexate were not significantly effective to induce and maintain long-term clinical response and remission.(Chapman et al. 1986, Oren et al. 1996, Regueiro et al. 2006b, Sandborn et al. 1994, Turunen U. et al. 1999, Turunen U. M. et al. 1998) Azathioprine and tacrolimus were more effective than 5-aminosalicylate/mycophenolate mofetil and placebo, respectively, to induce short-term clinical response in refractory ulcerative colitis, but were associated with a higher incidence of adverse events.(Ardizzone et al. 2006, Ogata et al. 2006, Orth et al. 2000) Intramuscular methotrexate(Paoluzi et al. 2002) and rectal tacrolimus ointment have been assessed in small open labeled studies, with encouraging results that need to be confirmed in large prospective studies.(Lawrance and Copeland 2008, Paoluzi et al. 2002, van Dieren et al. 2009) There is a lack of sufficient data or fair results for alternative and miscellaneous treatment including nicotine, heparin, short-chain fatty acid or probiotics.(Bibiloni et al. 2005, Bloom et al. 2004, Furrie et al. 2005, Thomas et al. 1996) (Bibiloni et al. 2005, Bloom et al. 2004, Furrie et al. 2005, Thomas et al. 1996) Although an invasive procedure, appendicectomy has recently shown promising results.(Bolin et al. 2009)

Overall, these results remain difficult to interpret due to small sample size and the lack of well-designed published studies supporting their efficacy for refractory UP.

Infliximab (Remicade; Centocor, Malvern, PA), a tumor necrosis factor antagonist, has changed the way of treating inflammatory bowel diseases refractory to standard medications. Two large placebo-controlled, randomized trials, namely ACT 1 and ACT 2, demonstrated that infliximab is effective to induce and maintain clinical response in ulcerative colitis.(Rutgeerts et al. 2005) However, patients with UP were excluded from both studies. In a retrospective study of 121 patients treated for ulcerative colitis with infliximab, only 3 patients had UP but were not specifically studied.(Ferrante et al. 2008) In a prospective pilot study evaluating the efficacy of local tacrolimus for UP, tacrolimus was prescribed for infliximab failure in 4 out of 8 patients. (Lawrance and Copeland 2008) Recently, topical administration of infliximab was found to be effective in one patient with chronic refractory proctitis.(Molnar et al. 2009)

Importantly, patients with UP showing an aggressive disease course, with frequently relapsing proctitis and refractory disease to conventional treatment, are more prone to show proximal extension at a later date, and are colectomized to a higher extent.(Meucci et al. 2000) Because some data suggest that early aggressive treatment of UP may prevent or delay proximal extension, there is an urgent need to better evaluate the efficacy of potent therapies such as infliximab in treating these patients.(Pica et al. 2004)

The aim of this study was therefore to evaluate the long-term outcome of refractory UP treated with infliximab therapy in a retrospective multicenter study.

METHODS

Study population

All hospital records of adult (age > 18 yr) patients treated with infliximab for ulcerative colitis at 6 tertiary referral centers in France (University Hospitals of Rennes, Nancy, Saint-Etienne,

Nantes, Lyon, and Nice) between January 2005 and September 2009 were reviewed. A centralized diagnostic index was first used to identify all patients with diagnosis of ulcerative colitis. The database of these patients with ulcerative colitis was then compared to the pharmacy records of all patients treated with infliximab at these six hospitals. All adult patients with documented proctitis refractory to standard medication at first infliximab infusion and an established diagnosis of ulcerative colitis based on clinical, radiological, endoscopic and/or histological evidence were included. Proctitis was defined according to the Montreal classification.(Satsangi et al. 2006)

Infliximab was administered initially at a dose of 5 mg/kg as a 2-h i.v. infusion. Following infliximab induction therapy, which consisted of 3 infusions at weeks 0, 2, and 6, the patients received various infliximab regimens, depending on the preferences of each treating physician. Maintenance treatment was individually tailored by treating physicians. Scheduled maintenance treatment was defined as if infliximab was intentionally planned every 8 weeks.(Ferrante et al. 2008, Schnitzler et al. 2009) All concomitant medications were recorded, and medication was included in the analysis only if total drug exposure was superior to 3 months after first infliximab infusion. All adverse events occurring during or after the first infliximab infusion and until last news were collected. Acute infusion reactions were defined as any adverse event that occurred during or within one hour after the infusion of infliximab.

All endoscopic and clinical reports mentioning the evolution of UP after first infliximab infusion were reviewed.

Short-term and long-term clinical responses were evaluated as previously described.(Colombel J. F. et al. 2003, Ferrante et al. 2008, Schnitzler et al. 2009) The “short-term response” was defined as the result of induction therapy with infliximab and “long-term response” was defined as clinical efficacy at the maximal follow-up. Both short- and long-term clinical responses were defined as complete in the absence of diarrhea and blood and if a

steroid-sparing effect was noted, and partial if there was marked clinical improvement but still persistent rectal blood loss.(Ferrante et al. 2007, Ferrante et al. 2008) To assess rectal disorders, we also recorded the presence of stool urgency, incontinence, tenesmus and rectal pain at first infliximab infusion and during the follow-up. Rectal disorders were considered as “present” if one of these items was reported, while rectal disorders were defined as “absent” if none was recorded.

To assess endoscopic activity of proctitis, three levels of activity were defined: (1) normal, (2) mild with erythema, friability erosion and lack of spontaneous bleeding, and (3) severe with ulceration and spontaneous bleeding. (Rutgeerts et al. 2005)

Statistical analysis

Owing to small sample size, statistical analysis was limited to descriptive statistics. Quantitative variables were described as mean \pm standard deviation (SD) and categorical variables were presented as counts and percent of the cohort.

RESULTS

Baseline characteristics of the patients

A total of 420 patients were treated with infliximab for ulcerative colitis at the six referral centers between January 2005 and September 2009. A total of 13 patients were treated with infliximab for refractory UP. The baseline characteristics at first infliximab infusion are indicated in Table 1. The mean age of our population was 47 years (SD=12.7; range, 27-66) and the mean duration of UP was 5.4 years (SD=6.9; range 0.2-22.2). Except for patient 2 who had a corticoid-dependent disease, all patients had active UP with diarrhea and/or bloody stools. All patients also had rectal disorders at time of first infliximab infusion.

Only one patient was an active smoker at baseline. One patient had extra-intestinal rheumatologic disease. One patient had prior intestinal surgery that was not related to

ulcerative colitis and consisted in a sigmoidectomy for diverticular disease performed 10 years before the diagnosis of ulcerative colitis.

Of the 13 patients, 11 (85 %) had been treated with immunosuppressants (thiopurine, methotrexate) before starting infliximab. Two patients had prior exposure to intravenous corticosteroid therapy, and two patients had received cyclosporine before infliximab initiation. All patients had received prior rectal 5-aminosalicylate and prior oral corticosteroid therapy.

Table 1: Baseline characteristics of 13 patients with refractory ulcerative proctitis.

Patient No.	Sex	Age (yr)	Disease duration (months)	Previous surgery	Previous treatment		Number of bowel movements/ 24 hours	Presence of bloody stools*	Rectal disorders	Endoscopic activity
					Enema, ointment, suppository	Systemic medications				
1	M	61	267	NO	ASA	ASA,CS, IS, Cyclo	6	Severe	Present	Severe
2	M	46	131	NO	ASA	ASA,CS, IS	4	None	Present	Normal
3	M	65	45	NO	ASA, CS	ASA,CS, IS	6	Mild	Present	Mild
4	M	31	24	NO	ASA	ASA,CS, IS	10	Severe	Present	Severe
5	M	55	195	NO	ASA, CS	ASA,CS, IS	15	Severe	Present	Severe
6	M	54	75	NO	ASA	ASA,CS, IS	15	Severe	Present	Severe
7	M	42	12	NO	ASA	ASA,CS	10	Mild	Present	Mild
8	M	28	12	NO	ASA, CS	ASA,CS, IS, Cyclo	3	Mild	Present	Mild
9	M	37	3	NO	ASA, CS	CS, IS	2	None	Present	Mild
10	M	26	44	NO	ASA, CS	ASA,CS	20	Mild	Present	Mild
11	M	54	7	Sigmoidectomy	ASA, CS	ASA, CS, IS	8	Severe	Present	Severe
12	F	55	4	NO	ASA, CS	ASA,CS, IS	8	Severe	Present	Severe
13	M	42	29	NO	ASA, CS	ASA,CS, IS	6	Severe	Present	Mild

M, Male; F, female; yr, years ; IFX, infliximab; ASA, aminosalicylate; IS, immunosuppressant (azathioprine, 6 mercaptopurine, methotrexate); CS, corticosteroid; Cyclo, cyclosporine
 *As judged by their physician.

Infliximab therapy and concomitant medications

Infliximab was prescribed for UP refractory to both rectal 5-aminosalicylate and oral corticosteroid therapy in all 13 patients, and UP was also refractory to immunosuppressants in 11 patients.

All patients received induction therapy with 3 infliximab infusions at weeks 0, 2 and 6. Four out of 13 patients (15%) received only infliximab induction therapy, while the 9 remaining patients (85%) had scheduled infliximab treatment. In these patients, the mean number of infliximab infusions after induction therapy was 7 (S.D. =8.6; range, 1-25).

Concomitant medications at infliximab therapy initiation are summarized in Table 2. A total of 8 patients were treated with concomitant immunosuppressants and 6 patients had concomitant corticosteroid therapy.

Short-term clinical and biological efficacy (Table 2)

Short-term efficacy could be assessed for all 13 patients. Two out of 13 patients (15%) were judged as primary non-responders. One primary non-responder had no concomitant treatment, while the other one was receiving concomitant oral corticosteroid at the time of infliximab initiation. A total of 11 out of 13 (85%) patients experienced clinical improvement after treatment with infliximab: complete clinical response was observed for 9 out of the 11 patients (82%) and a partial response for two subjects (18%). All subjects (n=8) with concomitant immunosuppressant had a clinical response, which was judged as complete in 6 out of the 8 patients. Rectal disorders were improved in 9 out of the 11 primary responders (82%).

Following infliximab induction therapy, the mean C-reactive protein (CRP) level fell from 12.8 mg (S.D. =15.1; range, 1-55) to 4.7 mg (S.D. =4.1; range 0.6-12; data available at baseline and after induction therapy in 10 of 13 patients).

Table 2: Short-term and long-term responses to infliximab in the 13 patients with refractory ulcerative proctitis.

Patient No.	Number of IFX infusions	Short-term response			Follow-up (months)	Maintenance treatment (IFX)	Long-term response		Endoscopy at last news	Treatment at last news
		Concomitant medications	Clinical response	Rectal disorders			Clinical response	Rectal disorders		
1	17	ASA, IS	Complete	Absent	28	YES	Complete	Absent	Mild	IFX
2	4	ASA, CS	Complete	Present	21	YES	Absent	-	-	Procto-colectomy
3	4	None	Complete	Absent	5	YES	Complete	Absent	-	IFX
4	18	CS, IS	Complete	Absent	28	YES	Complete	Absent	Complete mucosal healing	IFX
5	3	CS	Absent	Present	29	Primary non responder	Absent	Present	Mild	CS
6	6	CS, IS	Partial	Absent	12	YES	Complete	Absent	-	IFX
7	4	ASA	Complete	Absent	3	YES	Complete	Absent	-	IFX
8	4	IS	Complete	Present	9	YES	Absent	Present	Mild	Tacrolimus IS
9	28	CS, IS	Complete	Absent	48	YES	Complete	Absent	Mild	IFX, IS
10	3	None	Absent	Present	6	Primary non responder	Absent	Present	-	CS
11	3	ASA, IS	Partial	Absent	6	NO	Partial	Absent	-	IFX
12	3	CS, IS	Complete	Absent	18	NO	Partial	Absent	Severe	ADA*, CS, IS
13	9	ASA, IS	Complete	Absent	12	YES	Complete	Absent	Complete mucosal healing	IFX

IFX, infliximab; ASA, aminosalicilate; IS, immunosuppressant (azathioprine, 6 mercaptopurine, methotrexate); ADA, adalimumab
 *Switch from infliximab to adalimumab due to patient preference.

Long-term outcome: clinical, biological and endoscopic responses

Information regarding long-term follow-up was available for all patients (n=13). After a median follow-up of 17 months (SD 13 months; range 3-48), the evaluation of clinical activity at last news revealed a partial (n=2) or complete (n=7) clinical response in 9 of the 11 primary responders (82%). Of note, rectal disorders disappeared in all 9 patients.

The 4 remaining patients had symptomatic disease at last news, including the 2 patients who were considered as primary non-responders. Both of these patients (Patients 5 and 10) were being treated with oral corticosteroid at last news. Two patients (Patients 2 and 8) who were considered as primary responders lost response to infliximab over time and were secondary

non-responders: one patient treated with scheduled infliximab therapy without concomitant immunosuppressant had a disease extension to left-sided colitis after discontinuation of corticosteroid therapy and finally underwent proctocolectomy (Patient 2). The other one (Patient 8) had complete short-term clinical response with disappearance of diarrhea and blood in stools, but as patient 2 had a persistent rectal disorder after infliximab induction therapy. This patient had an early relapse after infliximab induction therapy and did not experience any clinical improvement despite infliximab optimization by dose escalation at the fourth infusion. Treatment was changed to oral tacrolimus and methotrexate without any response on clinical disease activity or rectal disorder.

Among the 8 patients who were primary responders and had concomitant immunosuppressant at baseline, 7 patients had maintained their clinical response without any rectal disorder at last news.

During follow-up, infliximab optimization was necessary in 3 patients. Two patients (patients 1 and 9) had a complete clinical response at last news, whereas the third one (Patient 8) had not experienced any improvement in clinical symptoms despite dose escalation and was considered a secondary non-responder.

At last news, the CRP level was available for 7 patients. When including all 7 subjects in the analysis, the mean CRP level was 14.4 mg/L (S.D. = 22.2; range 0.5-59). Excluding primary non-responders did not influence this result, with a mean CRP level of 14.1 mg/L (S.D. =25.2; range 0.5-59). When excluding both primary and secondary non-responders, the mean CRP level was only 2.9 mg/L (S.D. =2; range 0.5-5).

All patients had endoscopic evaluation at baseline. During follow-up, 7 patients also had endoscopic evaluation of the rectum after infliximab initiation. This showed an improvement in mucosal lesions in 4 patients (complete mucosal healing in 2 patients and mild endoscopic activity in 2 patients), stable endoscopic lesions with persistent mild endoscopic disease in two patients, and persistent severe rectal disease in one patient, as defined above.

Interestingly, endoscopic response was generally associated with clinical response: the two patients with complete mucosal healing at last news who had severe (patient 4) and mild (patient 13) lesions at infliximab initiation were in clinical response at last news, whereas patient 12 with severe mucosal lesions persisting after infliximab induction therapy was a secondary non-responder to infliximab therapy. The 4 remaining patients had mild endoscopic activity at last news: patients 1 and 9, who respectively had severe and mild endoscopic lesions at time of infliximab initiation, had a complete clinical response at last news. Hence, there was a discrepancy between endoscopic and clinical response in only two patients: patients 5 and 8, who respectively had severe or mild endoscopic lesions at baseline, were primary and secondary non-responders at last news despite mild endoscopic activity after infliximab therapy initiation.

Adverse events

Infliximab infusions were generally well tolerated. None of the 13 patients had any acute infusion reaction. Only two patients experienced adverse events. One developed psoriasiform lesions leading to infliximab discontinuation. The other adverse event included almost infections, with left-sided diverticulitis and bursitis of the knee. Both infections had a favorable outcome after administration of broad-spectrum antibiotics, so infliximab therapy could be continued. No opportunistic, tuberculosis infections, malignancies or lymphoma were observed throughout the follow-up period.

DISCUSSION

This study shows for the first time that infliximab treatment may be effective for both induction and maintenance of clinical response in refractory UP.

Two randomized trials, namely ACT 1 and ACT 2, demonstrated the efficacy of infliximab in ulcerative colitis, but UP were excluded from both studies, whereas the monocenter

retrospective study from Leuven did not specifically report the outcome of 3 patients with UP treated with infliximab.(Ferrante et al. 2008, Rutgeerts et al. 2005) (Ferrante et al. 2008)

Following infliximab induction therapy, 11 out of 13 (85%) patients experienced clinical improvement after treatment with infliximab, with 9 of the 11 (82%) also experiencing improvement in rectal disorders. Long-term outcome showed a complete clinical response for half of the patients with refractory UP. These results are in line with previous reports showing a clinical response in patients with pancolitis or left-sided colitis treated with infliximab at short term in about 63-69.4% of patients and at long term in 38.8-43% of patients. (Ferrante et al. 2008, Rutgeerts et al. 2005) Of note, 9 of the 11 primary responders maintained a complete response at maximal follow-up, as judged by disease activity and the absence of rectal disorders. This finding is also consistent with that obtained in a large monocenter retrospective study evaluating infliximab in left-sided and pancolitis, and showing that 68% of patients with initial response to infliximab had sustained clinical response during follow-up.(Ferrante et al. 2008) Because infliximab efficacy for UP was broadly similar to that reported for left-sided colitis and extensive colitis, our results suggest that UP may be included in large international clinical trials evaluating the efficacy of anti-TNF agents in ulcerative colitis.

Interestingly, clinical response was accompanied by a decrease in CRP levels and an improvement in endoscopic lesions of the rectum. The drop in CRP levels is a known factor associated with clinical response in ulcerative colitis.(Ferrante et al. 2008) Mucosal lesions were improved in 4 of the 7 patients with endoscopic assessment after infliximab initiation, thus confirming the efficacy of infliximab therapy in this indication.

Meucci et al. reported that 14% of patients with UP presented one or more features consistent with a refractory disease, indicating that, in some patients with UP, the disease course is not as mild as generally assumed.(Meucci et al. 2000, Solberg et al. 2009) This aggressive course was associated with an increased risk of proximal disease extension and finally colectomy. In

our series, only one patient relapsed after infliximab induction: he progressed to pancolitis and finally underwent proctocolectomy. Of note, the safety profile of infliximab was consistent with previous experience with this drug in UC.(Ferrante et al. 2008, Rutgeerts et al. 2005)Overall, these results indicate that infliximab may be effective in treating refractory UP. We were not able to look for predictors of response to infliximab due to small sample size. Despite this limitation, patients with concomitant immunosuppressant administration seemed to have higher rates of clinical response and a longer duration of response to infliximab. Another limitation is the lack of control arm. However, the rates of response to placebo in patients with severe and resistant ulcerative colitis in randomized control trials are low, ranging from 10 to 33% at short term and from 6.6 to 14% in the long term.(Ogata et al. 2006, Rutgeerts et al. 2005) In addition, only patients who had active disease despite treatment with conventional therapy, including local aminosalicylate and corticosteroid therapy, were included in the study.

Importantly, the median follow-up was 17 months. A long-term follow-up is required to assess the sustained efficacy of medical treatment in refractory UP, which is known to relapse frequently, and because refractory disease is more prone to having a complicated outcome.(Meucci et al. 2000, Stewenius et al. 1996, Turunen U. M. et al. 1998)Furthermore, this was a multicenter study. Infliximab therapy is rarely used to treat UP in clinical practice. By screening a total of 420 patients treated with anti-TNF therapy for ulcerative colitis at 6 referral centers in France, we were able to identify and analyze the data of 13 patients. Finally, because of the retrospective study design and the inherent bias in interpreting clinical response on medical records, we decided to assess clinical response not only by using the judgment of the treating physician but also by recording the presence or not of objective Mayo criteria such as diarrhea and blood in the stools.(Ferrante et al. 2007, Ferrante et al. 2008)In addition, the absence of rectal disorders was defined as the absence of all predefined items, namely stool urgency, incontinence, tenesmus and rectal pain.

Collectively, our findings indicate that infliximab may be effective and safe in inducing and maintaining a clinical response in patients with refractory UP. It is unlikely that a randomized controlled trial will ever be carried out to evaluate the efficacy of infliximab in refractory UP. However, because of the retrospective study design of our study and small sample size, infliximab efficacy in treating ulcerative proctitis needs to be confirmed in larger prospective studies. Pending these results, infliximab should be used only in patients with disease refractory to all available medications. The optimal drug regimen as well as the optimal duration of treatment remain to be determined.

LONG-TERM OUTCOMES OF ULCERATIVE COLITIS TREATED WITH INFLIXIMAB

Florence Le Roy^{1*}, Guillaume Bouguen^{1,2*}, Charlène Brochard^{1,3}, Véronique Desfourneaux⁴, Pierre-Nicolas D'Halluin¹, Maël Pagenault¹, Jean-François Bretagne¹, Laurent Siproudhis^{1,2}

¹ Service des Maladies de l'Appareil Digestif, CHU Pontchaillou, Université de Rennes 1, Rennes, France

² INSERM U991, Université de Rennes 1, Rennes, France

³ Services d'Explorations Fonctionnelles Digestives, CHU Pontchaillou, Université de Rennes 1, Rennes, France

⁴ Service de Chirurgie Viscérale, CHU Pontchaillou, Université de Rennes 1, Rennes, France

*Equal contribution

Correspondence to:

Guillaume Bouguen

Service des Maladies de l'Appareil Digestif

2 rue Henri le Guillou

35033 Rennes cedex, FRANCE

Telephone (0033)-2-99-28-43-17 / Fax (0033)-2-99-28-41-89

Email: guillaume.bouguen@free.fr

Conflicts of Interest and Source of Funding

This work did not receive any financial support.

G.B. received lecture fees from Abbvie, Ferring and MSD Pharma

LS received lecture fees and grants from MSD Pharma

J-FB received lecture fees from Abbvie

FLR, CB, PND, MP, VD declare that they have nothing to disclose

Keywords: Ulcerative colitis, Infliximab, long-term outcomes, surgery

ABSTRACT

Background

Data on the long-term efficacy of infliximab in ulcerative colitis are scarce. Sustained remissions beyond one year, recurrence and outcomes after infliximab withdrawal have to be highlighted.

Methods

Medical records of all patients with ulcerative colitis treated with infliximab in a referral center between 2001 and 2012 were reviewed through September 2013. Cumulative incidence of surgery, remission and recurrence with or without infliximab withdrawal were estimated using the Kaplan-Meier method. Independent predictors of all outcomes were identified using a Cox proportional hazards model.

Results: One hundred patients (63 males) were included. After a median follow-up of 55.1 months, cumulative probabilities of surgery were 27%, 33% and 36% at 1, 3 and 5 years, respectively. A CRP > 6 mg/L at week 6 was associated with an increased risk of subsequent colectomy. Among the 64 patients in clinical remission, 28 patients (44%) relapsed. The cumulative probabilities of sustained clinical remission were 19%, 31% and 38% at 1, 3 and 5 years, respectively. The absence of infliximab withdrawal was the only factor independently associated with sustained clinical remission. After infliximab withdrawal among patients in clinical remission, the cumulative probabilities of relapse at 1, 3 and 5 years were 24%, 61% and 81%, respectively. A young age < 21 years at diagnosis and platelets > 400000/mm³ at infliximab withdrawal were associated with an higher rate of relapse.

Conclusions: After an almost 5 year's follow-up, about one third of patients experienced sustained clinical remission and one third of patient underwent surgery. Most patients relapse after infliximab withdrawal.

Introduction

Ulcerative colitis (UC) is a chronic relapsing inflammatory condition of the colon that lead to disabling symptoms such as rectal bleeding, diarrhea, and abdominal pain that alter quality of life of patients.(Ordas et al. 2012b, Rubin et al. 2010) Moreover, patients with unremitting disease refractory to standard medication or related complications such as colorectal cancer ultimately require colectomy. Based on these dreaded long-term outcomes, new therapeutic agents such as infliximab (IFX) a tumor necrosis factor antagonist changed the way of treating UC refractory to standard medications and aimed to modify the disease course and the long-term requirements for surgery. Two large placebo-controlled randomized trials, namely ACT 1 and ACT 2, demonstrated that IFX is effective in inducing and maintaining clinical response in UC within the first year of follow-up.(Rutgeerts et al. 2005) In acute severe colitis, IFX have been shown to significantly reduce the colectomy rate at 3 months.(Jarnerot et al. 2005) These data on the short term were also observed in real life setting from retrospective cohort with a colectomy-free survival of 85% at 2 months, and 61% at 17 months.(Kohn et al. 2007, Mortensen et al. 2011) Despite this well described short-term efficacy, the ability of infliximab to modify the course of the disease on the long term such as decrease the requirement of surgery remains questionable.(Laharie et al. 2013) After 10 to 24 months follow-up, retrospective studies report heterogeneous remission rates between 17% and 90%.(Caviglia et al. 2007, Gies et al. 2010, Jakobovits et al. 2007, Lee et al. 2013) An explanation to this wide range of remission might include the duration of infliximab exposure.(Stange et al. 2008) Beyond the one year of clinical trial, IFX withdrawal in 28 patients resulted in sustained remission for 40% of patients after a median follow-up of 4.5 years.(Steenholdt et al. 2012)

Because of small sample size and the relatively short follow-up of these studies, results remain difficult to interpret. Thus, after almost ten years of use, long-term outcome of patients

treated with IFX remains unclear leading to a tough decision-making regarding the maintenance therapy with IFX. The aims of this study was to assess the long-term outcome of UC treated with infliximab therapy in a large cohort of patients focusing on surgical events, sustained clinical remission and outcome after infliximab withdrawal.

Materials and methods

Study Population

In this retrospective study, all medical records of adult patients (age >18 years) treated with IFX for UC in a French referral center (University Hospital of Rennes, France) between December 2001 and 2012 were reviewed through September 2013.

All adult patients with an established diagnosis of UC based on clinical, biological, radiologic, endoscopic, and/or histologic evidences at first IFX infusion were included. The following data were recorded: sex, birth date, age at diagnosis, weight, UC phenotype according to the Montreal classification at diagnosis and at first IFX infusion, and history of surgery.(Satsangi et al. 2006) Previous medications by mesalamine, corticoids, azathioprine, 6-mercaptopurine, methotrexate and ciclosporin were reported and concomitant medication to IFX was reviewed at each point of study follow-up.

Clinical (partial Mayo score), and biological data (hemoglobin, CRP, leukocytes, lymphocytes, platelets) were collected at the first IFX infusion, at short-term follow-up (6-10 weeks), at infliximab withdrawal and at last follow-up. Endoscopic assessments were recorded at first infusion and during follow-up, if available.

Regarding IFX treatment, the date of first and last infusions, the number of infusions and the need to optimize IFX were collected.

IFX was administered initially at a dose of 5 mg/kg as a 2-hour intravenous infusion in all patients included in this study; all patients were planned to receive 3 doses of IFX at weeks 0, 2, and 6 as induction therapy then followed by scheduled maintenance IFX every 8 months.

All adverse events were collected. Acute infusion reactions were defined as any adverse event that occurred during or within 1 h after the infusion of infliximab.

The partial Mayo score was prospectively assessed at each infliximab infusion. Clinical response was defined by a decrease of the partial mayo score of at least 2 points between 2 visits.(Lewis et al. 2008a) Clinical remission was defined by a partial Mayo score of 2 points or lower, with no individual subscore exceeding 1 point. Sustained remission was defined by the onset of steroid free clinical remission without relapse or colectomy until the last known follow-up. Mucosal healing was defined by a Mayo endoscopic score of 0 or 1 point. Acute severe colitis was defined by the failure of 5 days of intravenous corticosteroids.(Stange et al. 2008)

Statistical Analysis

Quantitative variables were described as median and percentile (interquartile range [IQR], 25% and 75%). Categorical variables were presented as counts and percent of the cohort. A survival analysis was used to analyze probability of remission, colectomy, relapse and sustained remission. The cumulative probabilities of survival without events were estimated by using the Kaplan–Meier method. The time to clinical remission and colectomy was considered to begin at the date of first IFX infusion and end at the date of clinical remission or colectomy. For relapse analysis, the time was considered to begin at the date of clinical remission and end at the date of relapse.

To identify factors predictive of each event, we performed a univariate analysis by using the log-rank test. When considering the continuous variables for dichotomous analysis, cutoff values were determined by using receiver operating characteristic (ROC) analysis to reduce the risk of bias related to arbitrarily defined cutoff and identify the optimal cutoff by using each outcome as a classification variable.

To identify independent predictors of each event, a multivariate analysis was used, and all significant variables with P values < 0.05 in the log-rank test were retained in the model and

integrated into a Cox proportional hazards regression model. The results are shown as hazard ratios (HRs) with 95% confidence intervals [CIs]. Statistical analyses were performed by using JMP Pro 10.0.2 software (SAS Institute Inc, Cary, NC).

Results

Characteristics of the Population at IFX Initiation

A total of 100 consecutive UC patients were included over the eleven-year period. The baseline characteristics at first IFX infusion are listed in Table 1. Eighty six patients received immunosuppressant therapy before IFX therapy initiation. Concomitant medications at first infliximab infusion are listed in Table 1. A combination therapy (IFX in association with thiopurine) was started for 14 patients, naïve to immunosuppressant.

Table 1. Baseline Characteristics

Variables – n or median (IQR25-75)	Patients (n=100)
Sex (M/F)	63/37
Median age at diagnosis, years	32 (21–45)
Median weight, kilograms	68 (58,5–76)
Median disease duration, years	3.8 (2–8)
Disease location at diagnosis	
Proctitis	27
Left colitis	31
Pancolitis	42
Prior treatment	
Mesalamine	87
Steroids	99
Azathioprine/6-mercaptopurine	81
Methotrexate	5
Cyclosporin	20
Disease location at first IFX infusion	
Proctitis	11
Left side colitis	33
Pancolitis	56
Concomitant medications at first IFX infusion	
Mesalamine	10
Steroids	62
Azathioprine/6-mercaptopurine	52
Methotrexate	2
Clinical context of IFX use	
Acute severe colitis	17
Steroids dependency	83
Biological at first IFX infusion	
Median Hemoglobin (g/dl)	11,8 (10-12.9)
Median Leukocytes (/mm ³)	9000 (6200 - 11900)
Median CRP rate (mg/L)	14.1 (6 - 50)
Median Platelets rate (/mm ³)	392000 (312000 - 505500)
Clinical score at first IFX	
Median Partial Mayo score	3 (2-3)

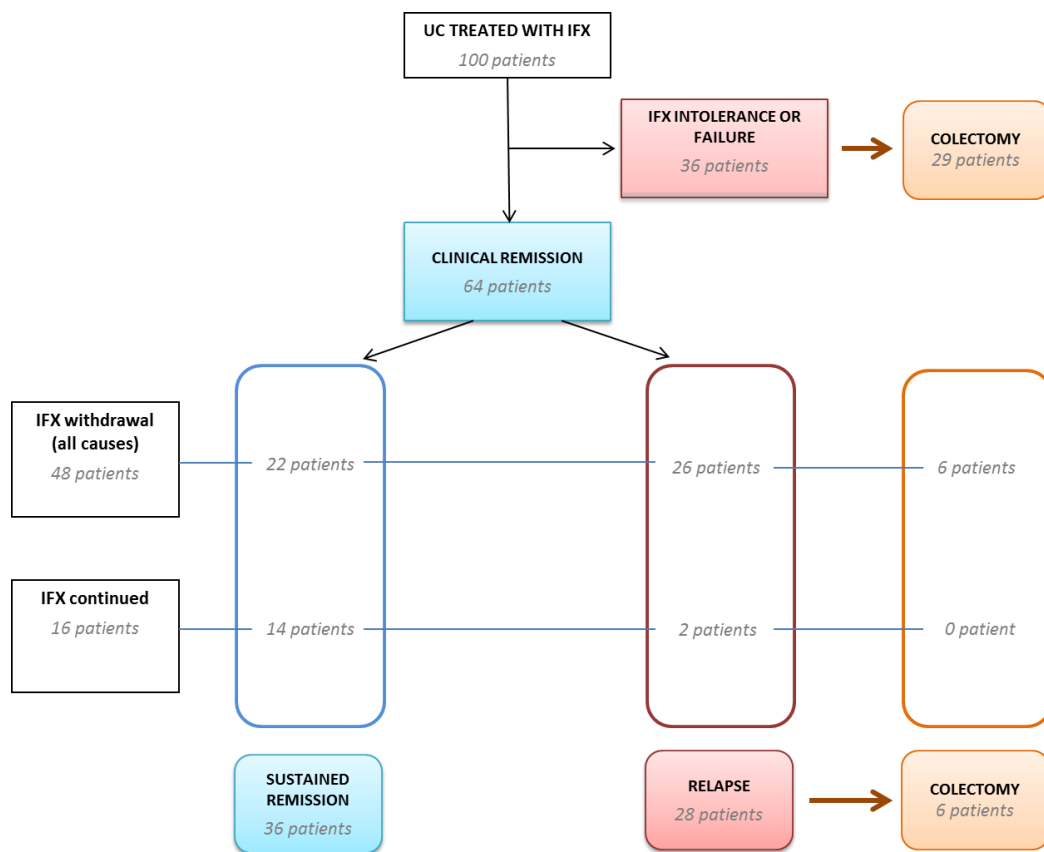
Abbreviation: IFX, infliximab; CRP, C Reactive Protein; M, Male; F, Female

IFX treatment

After a median duration follow-up of 55.1 months (IQR, 35.2-74.4) between the beginning of IFX and the last news, a total of 1174 IFX infusions were administered to the 100 patients, corresponding to a median number of IFX infusions per patient of 9.5 (IQR, 3–18).

Induction regimen with 3 IFX infusions at weeks 0, 2, and 6 was performed for 88 patients, followed for 63 patients with scheduled IFX treatment every 8 weeks. Twenty-five patients had only 3 induction infusions (IFX was used as a bridge to immunosuppressant for 6 of them), 5 patients had 2 infusions, and 7 patients had only 1 infusion. A total of 82 patients withdrew IFX (37 for clinical remission, 36 for primary or secondary treatment failure, and 9 for intolerance). A total of 52 patients had combination therapy at infliximab initiation. The median duration of the combination therapy was 13.5 months. During maintenance phase, 14 patients were optimized by increasing doses (11/14), and/or shortening interval between two infusions (4/14). Twenty-four patients underwent a second course of treatment, after a median of 15.3 months after IFX withdrawal (IQR, 8.9–25.9) (Figure 1). Anti-TNF treatment was still ongoing for 26 of the 100 patients at last news.

Figure 1: Flow chart



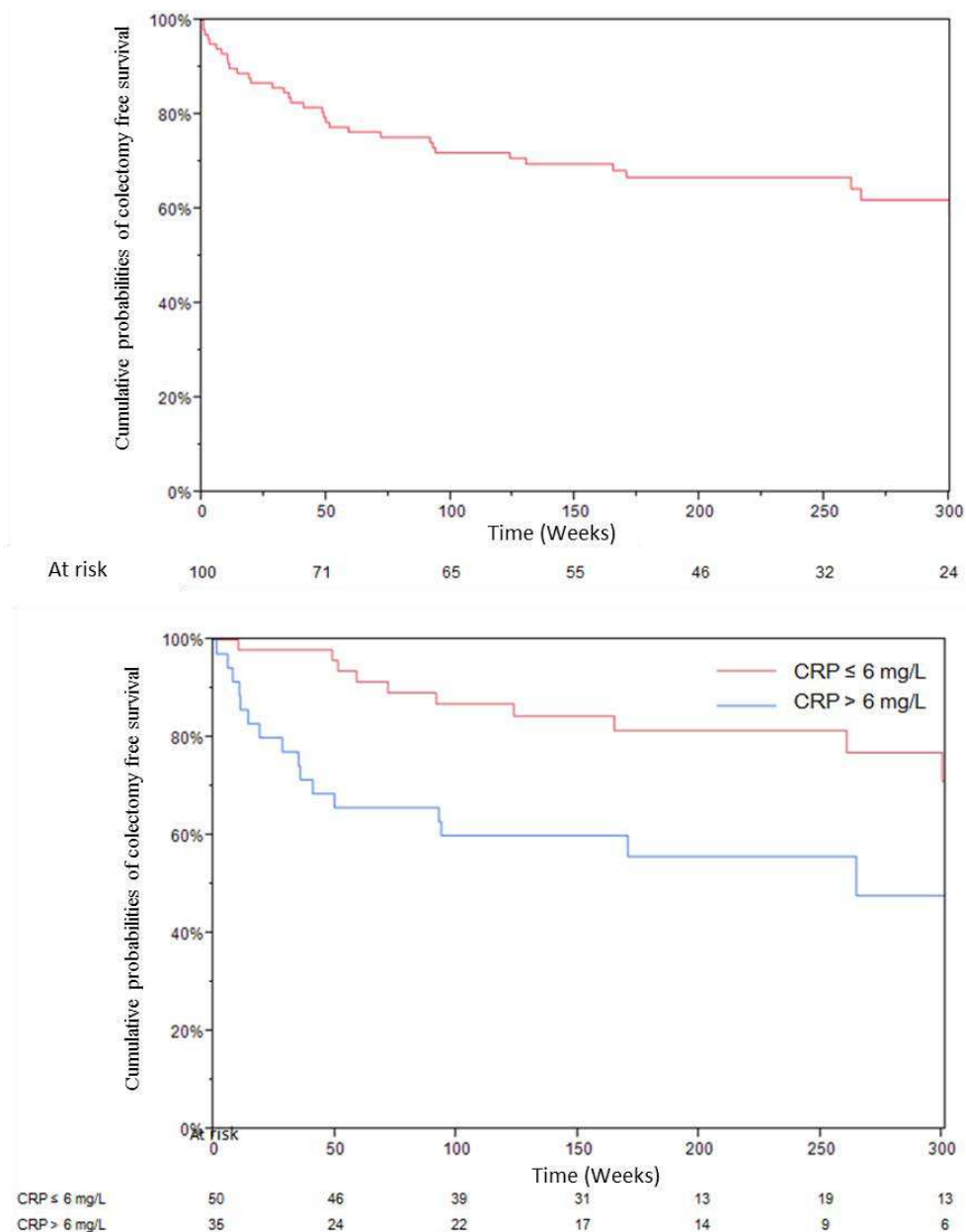
Proctocolectomies

Of the 100 patients, 35 patients underwent surgery at the end of follow-up after a median time of 9.4 months following IFX initiation. Cumulative probabilities of surgery were 27%, 33% and 36%, at 1, 3 and 5 years respectively (Figure 2A).

In ROC analyses, optimal cutoff values associated with surgery at IFX initiation and short term evaluation were a platelets rate > 400000/mm³, leukocytes > 10000/mm³, and CRP > 6 mg/L. All baseline factors were evaluated in the univariate analysis by using the log-rank test. Acute severe colitis, pancolitis (E3 score on Montreal classification), leukocytes > 10000/mm³ as defined by ROC analysis, platelets > 400000/mm³ and CRP > 6mg/L at inclusion and short term evaluation were associated with colectomy.

By using multivariate analysis, CRP > 6 mg/L at short term evaluation was the only independent factor associated with colectomy (HR=3.43, 95% CI, 1.17-10.9; p=.023) (Figure 2B).

Figure 2 : Cumulative probabilities of colectomy-free survival (A) and independent predictor of colectomy after starting infliximab treatment (CRP at week 6) (B)



Sustained Clinical remission

Sixty-four of the 100 patients reached a clinical remission after a median time of 20 weeks from infliximab initiation (IQR, 6.5-47). By using multivariate analysis, combination therapy

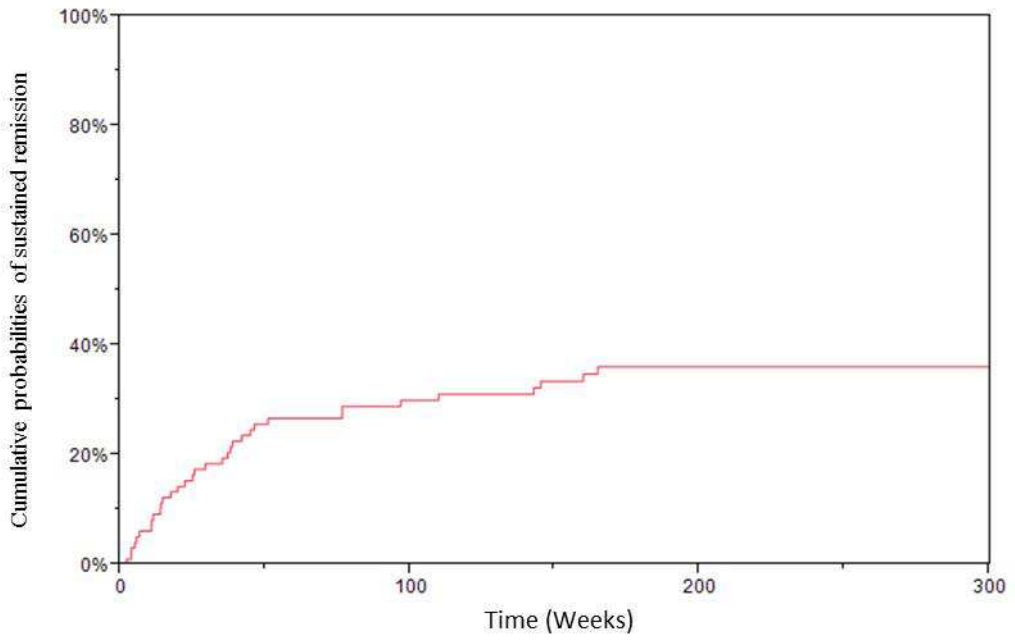
(HR=1.95, 95% CI, 1.10-3.60; p=.022) and clinical response at short term (HR=2.09, 95% CI, 1.17-3.82; p=.013) were associated with clinical remission.

Of the 64 patients in clinical remission, 28 (44%) patients relapsed during the follow-up. Overall, 56% (36/64) of patients had a sustained clinical remission after a median follow up of 36.5 months (IQR 15.9-53.1) between clinical remission and last news. Cumulative probabilities of sustained clinical remission at 1, 3 and 5 years were respectively 19%, 31% and 38% (figure 3A).

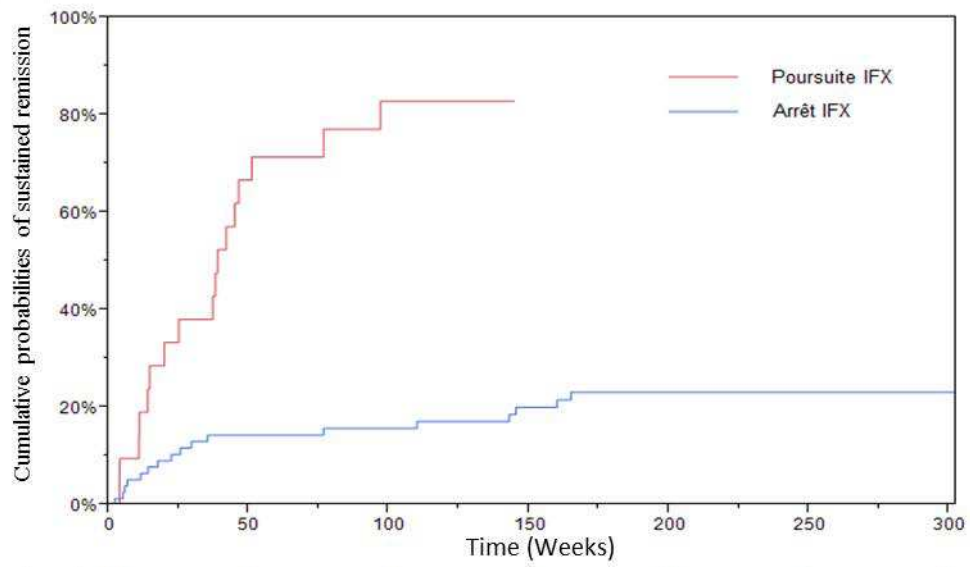
In univariate analysis, sustained clinical remission was associated with IFX treatment duration of at least 54 weeks (p<0.001), leukocytes count <10000/mm³, platelets count<400000/mm³ at first infusion (p=0.010 and p=0.0005, respectively)) and at short term assessment (p=0.003 and p=0,038, respectively), with pancolitis at first IFX infusion (p=0.0093) and weight more than 67 kg (p=0.036). Conversely, IFX withdrawal was associated with lower rate of sustained clinical remission. Mucosal healing during the follow-up period tended to be associated with sustained remission. This variable was not taken into account since the endoscopic assessment was variable and not time-controlled.

Using multivariate analysis, the absence of IFX withdrawal was the only independent factor associated with sustained clinical remission (HR=4.6, 95% IC, 1.66-13.85; p=0.0029).(Table 2). Of note the median duration of IFX treatment was 16 months (IQR75 7-31) among patients with sustained clinical remission. (Table 2 and Figure 3A)

Figure 3: Cumulative probabilities of sustained steroid-free clinical remission at maximal follow-up (A) and independent factor associated with sustained clinical remission (B)



At risk	100	72	65	56	46	32	24
---------	-----	----	----	----	----	----	----



IFX continued	23	8	4	1	0	0	0
IFX discontinued	77	65	62	56	46	31	24

Table 2. Factors associated with sustained clinical remission by univariate and multivariate analysis

Covariates	Univariate analysis	Multivariate analysis
	<i>P</i> value	HR [95% CI], <i>P</i> value
Male sex	0.9388	
Age at diagnosis	0.5184	
Weight > 67kg	0.036	1.65 [0.71-4.19], 0.247
Disease location at first IFX infusion		
Proctitis	0.9738	
Left colitis	0.064	
Pancolitis	0.0093	1.63 [0.72-3.86], 0.245
Concomitant medications at short term		
Mesalamine	0.3777	
Steroids	0.7284	
Azathioprine/6-mercaptopurine	0.7408	
Methotrexate	0.2205	
IFX treatment modalities		
More than 53 weeks	<0.0001	1.03 [0.37-2.83], 0.95
IFX withdrawal	<0.0001	0.22 [0.07-0.60], 0.0029
IFX indication		
Acute severe colitis	0.8073	
Partial Mayo score		
At first IFX infusion	0.726	
Biological data		
Leukocytes < 10000/mm ³ at first IFX infusion	0.0102	1.99 [0.86-5.01], 0.108
Hemoglobin at first IFX infusion	0.4534	
Platelets < 400000/mm ³ at first IFX infusion	0.0005	1.63 [0.64-4.51], 0.313
CRP at first IFX infusion	0.0909	
Leukocytes < 10000/mm ³ at short term	0.0034	1.57 [0.69-3.64], 0.282
Hemoglobin at short term	0.1459	
Platelets <400000/mm ³ at short term	0.038	0.91 [0.34-2.69], 0.847

Outcomes after IFX withdrawal in patients in clinical remission

IFX was discontinued for 38 of the 64 patients because of the steroid-free clinical remission.

After a median follow up of 54 months (IQR 25.4-64.5) following IFX withdrawal, 10% (4/38) of patients underwent colectomy, 63.2% (24/38) of patients relapsed, and 36.8% of patients (14/38) remained in clinical remission. Relapse occurred within 24 months (IQR=14.4-33.1). Among the 24 who relapsed, 19 patients were retreated with infliximab and 13 (68%) achieved a clinical remission.

After IFX withdrawal, relapse occurred in 24%, 61% and 81% patients at 1, 3 and 5 years respectively (Figure 4).

By using univariate and multivariate analysis, a young age < 21 years at diagnosis (HR=12, 95% IC, 2.77-58.24; p=0.001) and platelets rate > 400000/mm³ at IFX withdrawal (HR=6.68, 95% IC 1.55-30.82; p=0.011) were associated with relapse (Table 3)

Figure 4: Cumulative probabilities of relapse after infliximab discontinuation in patients in steroid free clinical remission.

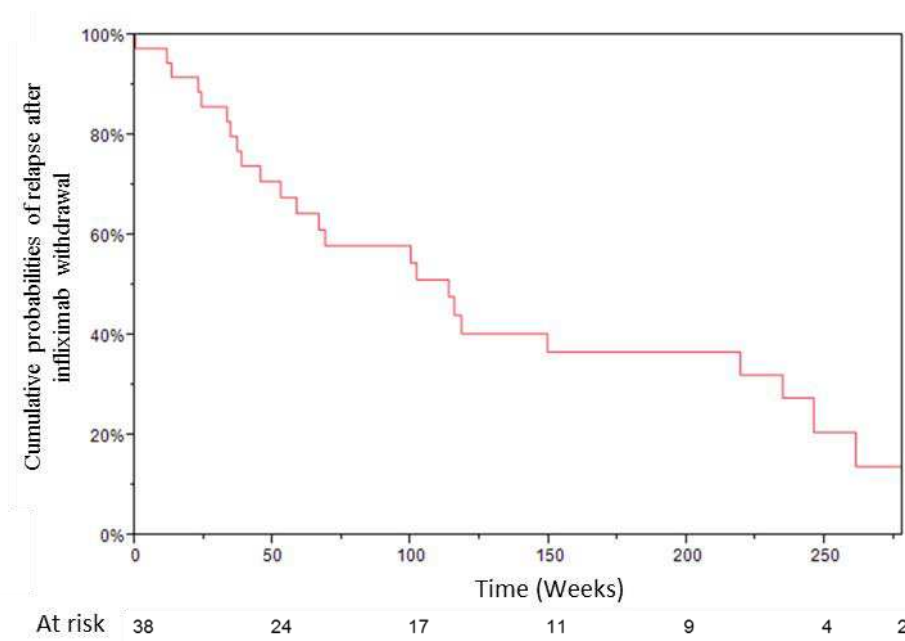


Table 3. Factor associated with relapse after IFX withdrawal by univariate and multivariate analysis

Covariates	Univariate analysis	Multivariate analysis
	<i>P</i> value	HR [95% CI], <i>P</i> value
Male sex	0.073	
Age at diagnosis < 21 years	0.0025	12.04 [2.77-58.24], 0.001
Disease location at first IFX infusion		
Proctitis	0.332	
Left side colitis	0.075	
Pancolitis	0.242	

Concomitant medications at IFX withdrawal		
Mesalamine	0.44	
Steroids	0.585	
Azathioprine/6-mercaptopurine	0.6159	
Methotrexate	0.5331	
IFX treatment modalities		
More than 53 weeks	0.3993	
IFX indication		
Acute severe colitis	0.3621	
Partial Mayo score		
At first IFX infusion	0.876	
Biological data at IFX withdrawal		
Leukocytes < 10000/mm ³	0.1721	
Hemoglobin	0.1312	
Platelets < 400000/mm ³	0.0411	6.68 [1.55-30.82], 0.011
CRP	0.1693	

Adverse events

Sixteen patients had adverse events which implied to stop IFX in 6. Seven patients (7%) had acute infusion reaction, 1 patient in combination therapy experienced neutropenia, 4 patients had a severe infection [tuberculosis (n=1), cytomegalovirus associated encephalitis (n=1), cytomegalovirus colitis (n=1) and lymphoproliferative syndrome (n=1)] and 4 patients developed a neoplasia (pulmonary adenocarcinoma, hepatocellular carcinoma, sigmoid adenocarcinoma and a papillary thyroid carcinoma). No cancer occurred during infliximab therapy and infliximab therapy was not a putative factor. A total of 5 deaths occurred during the follow-up: 3 deaths of cancer, 1 suicide and 1 death of septic shock 15 days after a rescue colectomy.

Discussion

This study confirms the efficacy of IFX in the short to middle term in moderate-to-severe UC, with 64% of clinical remission within the first year. These results are in line with the ACT 1 and 2 trials, where 69.4 and 64.5% patients respectively had a clinical response at 8

weeks.(Rutgeerts et al. 2005) Similarly, 67% of patients reached clinical remission in a retrospective cohort of 121 patients.(Ferrante et al. 2008) In the present study, despite this high rate of clinical remission, 35% of patients underwent colectomy, mostly within the year of IFX initiation related to primary non-response. A CRP > 6 mg/L at week 6 was the only independent factor associated with colectomy. Ferrante et al reported already the CRP level and particularly the drop of CRP after starting infliximab predictive of colectomy-free survival. However only half of the cohort had blood sample for CRP and it was not include in the final model.(Ferrante et al. 2008) The rate of surgery is somewhat higher in this cohort as compared to previous reports ranging from 6% to 53%. Several patients experienced a severe acute colitis which may explain this higher rate of colectomy within the first year as previously described.(Colombel J. F. et al. 2011, Jarnerot et al. 2005)

Concomitant use of immunosuppressant to IFX (52%) was associated with short term efficacy in the present study. These results are in line with the recent published SUCCESS trial that evaluated the efficacy of azathioprine monotherapy, infliximab monotherapy, and combination therapy in moderate-to-severe UC.(Panaccione et al. 2014) Patients with combination therapy had significantly higher rate of corticosteroid free remission and mucosal healing at 16 weeks. However, the efficacy of combination therapy did not benefit on the long-term outcome. This data remains under debate. Some studies observed a decrease risk of relapse when azathioprine was associated with infliximab.(Fidder et al. 2009, Sokol et al. 2010) Nevertheless, in a cohort of 45 patients, no difference was observed between infliximab monotherapy and combination therapy with azathioprine after a follow-up of 90 weeks.(Jarnerot et al. 2005)

The main strength of the study is the duration of the follow-up of 55.1 months in a large cohort of patients. Fifty-six percent of patients who reached remission sustained the clinical remission at the end of follow-up. In a retrospective trial of 121 patients with UC, 68% of the 81 patients responding to IFX had a sustained remission, after a follow-up of 33 months, and

in a smaller cohort of 10 patients, 9/10 had a sustained remission after 25 months.(Ferrante et al. 2008) One might argue that a larger proportion pursued IFX in these studies (about two thirds of patients as compared to one quarter in the present study) but both studies had a shorter follow-up. While the sustained remission was associated with absence of infliximab withdrawal, the relapse occurred after a median of 21 months.

Few data are available after IFX withdrawal. In small cohorts of 4 to 51 patients in remission, rate of relapse range from 0% to 59% after 6.5 months to 4.5 years of follow-up.(Caviglia et al. 2007, Steenholdt et al. 2012) By survival analysis, most of our patients relapsed at 5 years following infliximab discontinuation. This suggests to maintain infliximab to sustain clinical remission particularly in young patient with abnormal platelet count. Moreover, retreatment with infliximab was not systematically followed by clinical remission.

These results should be imbalance with side effects of the treatment. In this study, 5 deaths occurred at the end of follow-up related to cancer for 3 patients. Similar results were found in a large Belgian cohort of 734 patients treated with infliximab with a 13% rate of severe adverse events and with 2.82% rate of cancer.(Fidder et al. 2009)

In addition to the retrospective study design, some limitations should be mentioned. First, endoscopic data were not taken into account because of the large variability of endoscopic assessment during the follow up. Furthermore, the small sample size of patients followed after IFX withdrawal (38 patients) requires larger trials to confirm these results. However, the high rate of relapse after infliximab discontinuation discouraged such strategy.

In conclusion, one third of patients underwent colectomy, one third relapsed and only one third experienced a sustained clinical remission after a 5-year follow-up. Infliximab discontinuation led to a high rate of relapse and was inversely associated with sustained remission. Altogether these results suggest continuing on the long term infliximab maintenance therapy.

PARTIE 4: CONCLUSION

Un peu plus d'un siècle après les premières descriptions de la RCH, cette maladie reste invalidante, source d'angoisse dans le quotidien des patients et source de complications potentiellement graves. Ces problématiques renvoient directement aux difficultés de prise en charge thérapeutique. Le clinicien doit en permanence ajuster les traitements à sa disposition sans sous-traiter ni sur-traiter les patients pour que la balance bénéfices/risques soit optimale. Cette attitude n'est pas aisée en raison de nombreuses inconnues qui persistent du fait d'une connaissance encore imparfaite de la maladie et des traitements utilisés.

Le duo 5-ASA-PPAR γ reste un pilier de la prise en charge de la RCH pour plusieurs raisons. Les propriétés anti-inflammatoires de PPAR γ et de la diminution primitive de son expression au cours de la RCH en font un des facteurs impliqués dans la genèse de la maladie et une cible thérapeutique d'intérêt. De plus, le fait qu'il soit la cible pharmacologique de la mésalazine a renforcé son intérêt thérapeutique. L'avantage important de ce traitement est sa sécurité d'utilisation par opposition aux traitements immunosuppresseurs dont la longue liste de complications potentielles rebute régulièrement les patients. La compréhension des mécanismes impliqués dans la diminution de son expression nourrit l'espoir d'optimiser l'efficacité des 5-ASA. Il constitue par ailleurs une solution thérapeutique propre en raison de son activation potentielle par certains acides gras présents dans la lumière du tube digestif. En ce sens les expérimentations effectuées sur les souris PPRE-Luc objectivent concrètement le potentiel d'une telle séquence d'induction/activation de PPAR γ doublant l'activation in vivo de ce récepteur. Certes, la corticothérapie systémique n'est pas une solution d'avenir un traitement historique, mais très efficace de la RCH. Cependant, les modifications de la galénique pour en limiter son absorption digestive (forme non absorbable sans effet systémique) pourraient permettre une administration « topique » per os dans le cadre d'une galénique à libération tardive. L'autre voie de l'hypoxie est encore à l'état embryonnaire mais

semble une voie d'intérêt. De nombreuses études ont retrouvé une hypoxie au cours de la RCH et l'oxygénothérapie hyperbare est un traitement potentiellement efficace évoqué sur les données de petits essais prospectifs en ouvert. L'objectivation d'un effet direct de l'hypoxie sur l'expression de PPAR γ renforce son intérêt en termes de cible thérapeutique. Le lien potentiel observé avec un microRNA pourrait faire envisager une thérapie ciblant l'inhibition de la surexpression de ce miR-27a au cours de la RCH. Cependant l'effet du sildenafil, traitement bien toléré sans effet secondaire objectivé lors de son utilisation à faible dose, est une thérapie envisageable en ayant le double objectif d'induire l'expression de PPAR γ et de réduire l'hypoxie tissulaire muqueuse en améliorant la perfusion tissulaire.

Les anti-TNF permettent de réduire le recours à la chirurgie dans la MC et la RCH dans les essais cliniques randomisés contrôlés mais leur impact à long terme, au-delà d'un an, reste mal connu. Des études en population doivent être menées dans ce sens. Il reste important de définir de nouveaux objectifs thérapeutiques, afin de modifier leur histoire naturelle. Une utilisation des immunosuppresseurs à un stade précoce chez les patients ayant des facteurs prédictifs d'une évolution défavorable, l'utilisation d'une association azathioprine-anti-TNF quand cela est possible ou encore l'obtention d'une cicatrisation muqueuse permettent de réduire significativement le recours à la chirurgie dans les MICI. Dans la RCH, le concept de cicatrisation histologique peut représenter un nouvel objectif thérapeutique dans notre pratique clinique si les études en cours confirment son intérêt chez ces patients. En ce sens, une modification de nos stratégies de prise en charge thérapeutique est un tournant qu'il faut prendre aujourd'hui. Nous avons montré que l'obtention d'une cicatrisation muqueuse et même histologique à atteindre chez un grand nombre de patient. La succession de séquences modification/optimisation thérapeutique suivie d'un contrôle objectif de l'inflammation muqueuse semble être à ce jour la meilleure option pour limiter le handicap secondaire à la maladie. Deux obstacles limitent encore la diffusion d'une telle stratégie. S'il existe en effet de nombreux arguments montrant l'intérêt d'une cicatrisation muqueuse, la poursuite de cet

objectif thérapeutique n'a pas fait sa preuve dans le cadre d'essais prospectifs. La seconde incertitude concerne l'évaluation des risques d'une optimisation pour le contrôle de la cicatrisation muqueuse. Il a été par exemple observé au cours d'une autre pathologie chronique, le diabète insulino-dépendant, que le contrôle serré de la glycémie diminuait la survenue de complications micro-vasculaires mais augmentait la mortalité.(Ismail-Beigi et al. 2010) Concernant les anti-TNF et les deux études présentées ici, on peut constater que la réponse est précoce et que cette réponse initiale est directement associée à une réponse soutenue. Ces résultats vont dans le sens d'une réévaluation et éventuellement d'une optimisation/modification thérapeutique précoce pour diminuer la perte de réponse dans le temps.

Une fois ces objectifs atteints, il est nécessaire de les maintenir dans le temps. En dépit de biais inhérents au caractère rétrospectif de l'étude, le taux de rechute élevé à l'arrêt de l'infliximab souligne le caractère chronique et récidivant de la RCH et la nécessité d'un traitement prolongé. Cela soulève alors deux questions qui sont son coût et ses effets secondaires lors d'une utilisation de longue durée.

REFERENCES

- Adachi M, Kurotani R, Morimura K, et al. Peroxisome proliferator activated receptor gamma in colonic epithelial cells protects against experimental inflammatory bowel disease. *Gut* 2006;55:1104-13.
- Ardizzone S, Maconi G, Russo A, et al. Randomised controlled trial of azathioprine and 5-aminosalicylic acid for treatment of steroid dependent ulcerative colitis. *Gut* 2006;55:47-53.
- Ardizzone S, Cassinotti A, Duca P, et al. Mucosal healing predicts late outcomes after the first course of corticosteroids for newly diagnosed ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:483-9 e3.
- Armuzzi A, De Pascalis B, Lupascu A, et al. Infliximab in the treatment of steroid-dependent ulcerative colitis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004;8:231-3.
- Arora G, Singh G, Vadhavkar S, et al. Incidence and risk of intestinal and extra-intestinal complications in Medicaid patients with inflammatory bowel disease: a 5-year population-based study. *Dig Dis Sci* 2010;55:1689-95.
- Ayres RC, Gillen CD, Walmsley RS, et al. Progression of ulcerative proctosigmoiditis: incidence and factors influencing progression. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:555-8.
- Beaugerie L, Brousse N, Bouvier AM, et al. Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study. *Lancet* 2009;374:1617-25.
- Bessissow T, Lemmens B, Ferrante M, et al. Prognostic value of serologic and histologic markers on clinical relapse in ulcerative colitis patients with mucosal healing. *Am J Gastroenterol* 2012;107:1684-92.
- Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, et al. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1539-46.
- Bitton A, Peppercorn MA, Antonioli DA, et al. Clinical, biological, and histologic parameters as predictors of relapse in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2001;120:13-20.
- Bjornsson S, Johannsson JH, Oddsson E. Inflammatory bowel disease in Iceland, 1980-89. A retrospective nationwide epidemiologic study. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:71-7.

Bloom S, Kiilerich S, Lassen MR, et al. Low molecular weight heparin (tinzaparin) vs. placebo in the treatment of mild to moderately active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:871-8.

Bolin TD, Wong S, Crouch R, et al. Appendicectomy as a therapy for ulcerative proctitis. *Am J Gastroenterol* 2009;104:2476-82.

Bouguen G, Levesque BG, Feagan BG, et al. Treat to Target: A Proposed New Paradigm for the Management of Crohn's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013.

Bull AW, Steffensen KR, Leers J, et al. Activation of PPAR gamma in colon tumor cell lines by oxidized metabolites of linoleic acid, endogenous ligands for PPAR gamma. *Carcinogenesis* 2003;24:1717-22.

Card T, Hubbard R, Logan RF. Mortality in inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2003;125:1583-90.

Caviglia R, Ribolsi M, Rizzi M, et al. Maintenance of remission with infliximab in inflammatory bowel disease: efficacy and safety long-term follow-up. *World J Gastroenterol* 2007;13:5238-44.

Chapman RW, Selby WS, Jewell DP. Controlled trial of intravenous metronidazole as an adjunct to corticosteroids in severe ulcerative colitis. *Gut* 1986;27:1210-2.

Charpentier C, Salleron J, Savoye G, et al. Natural history of elderly-onset inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Gut* 2014;63:423-32.

Chouraki V, Savoye G, Dauchet L, et al. The changing pattern of Crohn's disease incidence in northern France: a continuing increase in the 10- to 19-year-old age bracket (1988-2007). *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:1133-42.

Cima I, Corazza N, Dick B, et al. Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation. *J Exp Med* 2004;200:1635-46.

Colombel J-F, Vernier-Massouille G, Gower-Rousseau C, et al. Epidémiologie et facteurs de risque des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Bull.Acad.Natle Méd* 2007;191:1105-23

Colombel JF, Ricart E, Loftus EV, Jr., et al. Management of Crohn's disease of the ileoanal pouch with infliximab. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2239-44.

Colombel JF, Rutgeerts PJ, Sandborn WJ, et al. Adalimumab induces deep remission in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12:414-22 e5.

Colombel JF, Rutgeerts P, Reinisch W, et al. Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011;141:1194-201.

Cosnes J, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery. *Gut* 2005;54:237-41.

Coste A, Dubuquoy L, Barnouin R, et al. LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13098-103.

D'Haens G, Baert F, van Assche G, et al. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet* 2008;371:660-7.

Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2011;365:1713-25.

Das I, Png CW, Oancea I, et al. Glucocorticoids alleviate intestinal ER stress by enhancing protein folding and degradation of misfolded proteins. *J Exp Med* 2013;210:1201-16.

De Bosscher K, Haegeman G. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 2009;23:281-91.

De Dombal FT. Ulcerative colitis: definition, historical background, aetiology, diagnosis, natural history and local complications. *Postgrad Med J* 1968;44:684-92.

Deepak P, Sifuentes H, Sherid M, et al. T-cell non-Hodgkin's lymphomas reported to the FDA AERS with tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) inhibitors: results of the REFURBISH study. *Am J Gastroenterol* 2013;108:99-105.

Delaney CP, Fazio VW, Remzi FH, et al. Prospective, age-related analysis of surgical results, functional outcome, and quality of life after ileal pouch-anal anastomosis. *Ann Surg* 2003;238:221-8.

Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, et al. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma

(PPAR γ) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 2001;193:827-38.

Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003;124:1265-76.

Edsbacker S, Andersson P, Lindberg C, et al. Liver metabolism of budesonide in rat, mouse, and man. Comparative aspects. *Drug Metab Dispos* 1987;15:403-11.

El-Jamal N, Dubuquoy L, Auwerx J, et al. In vivo imaging reveals selective PPAR activity in the skin of peroxisome proliferator-activated receptor responsive element-luciferase reporter mice. *Exp Dermatol* 2013;22:137-40.

Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem* 1997;272:18779-89.

Farmer RG, Easley KA, Rankin GB. Clinical patterns, natural history, and progression of ulcerative colitis. A long-term follow-up of 1116 patients. *Dig Dis Sci* 1993;38:1137-46.

Faubion WA, Jr., Loftus EV, Jr., Harmsen WS, et al. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* 2001;121:255-60.

Fazio VW, Ziv Y, Church JM, et al. Ileal pouch-anal anastomoses complications and function in 1005 patients. *Ann Surg* 1995;222:120-7.

Feagan BG, Macdonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;10:CD000543.

Feagan BG, Sandborn WJ, D'Haens G, et al. The role of centralized reading of endoscopy in a randomized controlled trial of mesalamine for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2013;145:149-57 e2.

Ferrante M, Vermeire S, Katsanos KH, et al. Predictors of early response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:123-8.

Ferrante M, Vermeire S, Fidder H, et al. Long-term outcome after infliximab for refractory ulcerative colitis. *Journal of Crohn's and Colitis* 2008;2:219-25.

Fidder H, Schnitzler F, Ferrante M, et al. Long-term safety of infliximab for the treatment of inflammatory bowel disease: a single-centre cohort study. *Gut* 2009;58:501-8.

Filippi J, Allen PB, Hebuterne X, et al. Does anti-TNF therapy reduce the requirement for surgery in ulcerative colitis? A systematic review. *Curr Drug Targets* 2011;12:1440-7.

Ford AC, Peyrin-Biroulet L. Opportunistic infections with anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in inflammatory bowel disease: meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Gastroenterol* 2013;108:1268-76.

Froslic KF, Jahnsen J, Moum BA, et al. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: results from a Norwegian population-based cohort. *Gastroenterology* 2007;133:412-22.

Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, et al. Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 2005;54:242-9.

Ghosh S, D'Haens G, Feagan BG, et al. What do changes in inflammatory bowel disease management mean for our patients? *J Crohns Colitis* 2012;6 Suppl 2:S243-9.

Giatromanolaki A, Sivridis E, Maltezos E, et al. Hypoxia inducible factor 1alpha and 2alpha overexpression in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 2003;56:209-13.

Gies N, Kroeker KI, Wong K, et al. Treatment of ulcerative colitis with adalimumab or infliximab: long-term follow-up of a single-centre cohort. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;32:522-8.

Glass CK, Saijo K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat Rev Immunol* 2010;10:365-76.

Gower-Rousseau C, Salomez JL, Dupas JL, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in northern France (1988-1990). *Gut* 1994;35:1433-8.

Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology* 2007;133:1099-105; quiz 340-1.

Hamilton MI, Dick R, Crawford L, et al. Is proximal demarcation of ulcerative colitis determined by the territory of the inferior mesenteric artery? *Lancet* 1995;345:688-90.

Hendriksen C, Kreiner S, Binder V. Long term prognosis in ulcerative colitis--based on results from a regional patient group from the county of Copenhagen. *Gut* 1985;26:158-63.

Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, et al. Ulcerative colitis and clinical course: results of a 5-year population-based follow-up study (the IBSEN study). *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:543-50.

Hoie O, Schouten LJ, Wolters FL, et al. Ulcerative colitis: no rise in mortality in a European-wide population based cohort 10 years after diagnosis. *Gut* 2007a;56:497-503.

Hoie O, Wolters FL, Riis L, et al. Low colectomy rates in ulcerative colitis in an unselected European cohort followed for 10 years. *Gastroenterology* 2007b;132:507-15.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.

Hulten L, Lindhagen J, Lundgren O, et al. Regional intestinal blood flow in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterology* 1977;72:388-96.

Hutchinson J. The Value of the Vermiform Appendix in the Treatment of Ulcerative and Membranous Colitis. *Br Med J* 1905;1:1039-40.

Ismail-Beigi F, Craven T, Banerji MA, et al. Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: an analysis of the ACCORD randomised trial. *Lancet* 2010;376:419-30.

Itoh T, Fairall L, Amin K, et al. Structural basis for the activation of PPARgamma by oxidized fatty acids. *Nat Struct Mol Biol* 2008;15:924-31.

Jakobovits SL, Jewell DP, Travis SP. Infliximab for the treatment of ulcerative colitis: outcomes in Oxford from 2000 to 2006. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:1055-60.

Jarnerot G, Hertervig E, Friis-Liby I, et al. Infliximab as rescue therapy in severe to moderately severe ulcerative colitis: a randomized, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 2005;128:1805-11.

Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012a;10:639-45.

Jess T, Frisch M, Simonsen J. Trends in overall and cause-specific mortality among patients with inflammatory bowel disease from 1982 to 2010. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;11:43-8.

Jess T, Simonsen J, Jorgensen KT, et al. Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years. *Gastroenterology* 2012b;143:375-81 e1; quiz e13-4.

Jess T, Riis L, Vind I, et al. Changes in clinical characteristics, course, and prognosis of inflammatory bowel disease during the last 5 decades: a population-based study from Copenhagen, Denmark. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:481-9.

Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998;391:82-6.

Jostins L, Ripke S, Weersma RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012;491:119-24.

Karhausen J, Haase VH, Colgan SP. Inflammatory hypoxia: role of hypoxia-inducible factor. *Cell Cycle* 2005;4:256-8.

Kaser A, Lee AH, Franke A, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 2008;134:743-56.

Kohn A, Daperno M, Armuzzi A, et al. Infliximab in severe ulcerative colitis: short-term results of different infusion regimens and long-term follow-up. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:747-56.

Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol* 2007;27:1859-67.

Laharie D, Filippi J, Roblin X, et al. Impact of mucosal healing on long-term outcomes in ulcerative colitis treated with infliximab: a multicenter experience. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;37:998-1004.

Laharie D, Bourreille A, Branche J, et al. Ciclosporin versus infliximab in patients with severe ulcerative colitis refractory to intravenous steroids: a parallel, open-label randomised controlled trial. *Lancet* 2012;380:1909-15.

Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, et al. Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* 1994;107:3-11.

Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, et al. Changes in extent of ulcerative colitis: a study on the course and prognostic factors. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:260-6.

Lawrance IC, Copeland TS. Rectal tacrolimus in the treatment of resistant ulcerative proctitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28:1214-20.

Lee KM, Jeon YT, Cho JY, et al. Efficacy, safety, and predictors of response to infliximab therapy for ulcerative colitis: a Korean multicenter retrospective study. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:1829-33.

Lefebvre M, Paulweber B, Fajas L, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J Endocrinol* 1999;162:331-40.

Leijonmarck CE, Persson PG, Hellers G. Factors affecting colectomy rate in ulcerative colitis: an epidemiologic study. *Gut* 1990;31:329-33.

Lemmens B, Arijs I, Van Assche G, et al. Correlation between the endoscopic and histologic score in assessing the activity of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:1194-201.

Lewis JD, Chuai S, Nessel L, et al. Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2008a;14:1660-6.

Lewis JD, Lichtenstein GR, Deren JJ, et al. Rosiglitazone for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2008b;134:688-95.

Li X, Kimura H, Hirota K, et al. Hypoxia reduces the expression and anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human proximal renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:1041-51.

Lichtenstein GR, Feagan BG, Cohen RD, et al. Serious infection and mortality in patients with Crohn's disease: more than 5 years of follow-up in the TREAT registry. *Am J Gastroenterol* 2012a;107:1409-22.

Lichtenstein GR, Rutgeerts P, Sandborn WJ, et al. A pooled analysis of infections, malignancy, and mortality in infliximab- and immunomodulator-treated adult patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2012b;107:1051-63.

Lin Q, Gao Z, Alarcon RM, et al. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *FEBS J* 2009;276:2348-58.

Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504-17.

Long MD, Martin CF, Pipkin CA, et al. Risk of melanoma and nonmelanoma skin cancer among patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2012;143:390-9 e1.

Meucci G, Vecchi M, Astegiano M, et al. The natural history of ulcerative proctitis: a multicenter, retrospective study. Gruppo di Studio per le Malattie Infiammatorie Intestinali (GSMII). *Am J Gastroenterol* 2000;95:469-73.

Molinie F, Gower-Rousseau C, Yzet T, et al. Opposite evolution in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut* 2004;53:843-8.

Molnar T, Farkas K, Nagy F, et al. Topically administered infliximab can work in ulcerative proctitis despite the ineffectiveness of intravenous induction therapy. *Am J Gastroenterol* 2009;104:1857-8.

Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012;142:46-54 e42; quiz e30.

Mortensen C, Caspersen S, Christensen NL, et al. Treatment of acute ulcerative colitis with infliximab, a retrospective study from three Danish hospitals. *J Crohns Colitis* 2011;5:28-33.

Moum B, Vatn MH, Ekbom A, et al. Incidence of ulcerative colitis and indeterminate colitis in four counties of southeastern Norway, 1990-93. A prospective population-based study. The Inflammatory Bowel South-Eastern Norway (IBSEN) Study Group of Gastroenterologists. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:362-6.

Mueller M, Cima I, Noti M, et al. The nuclear receptor LRH-1 critically regulates extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestine. *J Exp Med* 2006;203:2057-62.

Mulder CJ, Fockens P, Meijer JW, et al. Beclomethasone dipropionate (3 mg) versus 5-aminosalicylic acid (2 g) versus the combination of both (3 mg/2 g) as retention enemas in active ulcerative proctitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:549-53.

Narravula S, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor 1-mediated inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression during hypoxia. *J Immunol* 2001;166:7543-8.

Nguyen GC, LaVeist TA, Harris ML, et al. Patient trust-in-physician and race are predictors of adherence to medical management in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1233-9.

Norton C, Dibley LB, Bassett P. Faecal incontinence in inflammatory bowel disease: associations and effect on quality of life. *J Crohns Colitis* 2013;7:e302-11.

Noti M, Corazza N, Tuffin G, et al. Lipopolysaccharide induces intestinal glucocorticoid synthesis in a TNFalpha-dependent manner. *Faseb J* 2010;24:1340-6.

Ochsenkuhn T, Sackmann M, Goke B. Infliximab for acute, not steroid-refractory ulcerative colitis: a randomized pilot study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:1167-71.

Ogata H, Matsui T, Nakamura M, et al. A randomised dose finding study of oral tacrolimus (FK506) therapy in refractory ulcerative colitis. *Gut* 2006;55:1255-62.

Ordas I, Mould DR, Feagan BG, et al. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clin Pharmacol Ther* 2012a;91:635-46.

Ordas I, Eckmann L, Talamini M, et al. Ulcerative colitis. *Lancet* 2012b;380:1606-19.

Oren R, Arber N, Odes S, et al. Methotrexate in chronic active ulcerative colitis: a double-blind, randomized, Israeli multicenter trial. *Gastroenterology* 1996;110:1416-21.

Orth T, Peters M, Schlaak JF, et al. Mycophenolate mofetil versus azathioprine in patients with chronic active ulcerative colitis: a 12-month pilot study. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1201-7.

Pagenault M, Tron I, Alexandre JL, et al. [Incidence of inflammatory bowel diseases in Bretagne (1994-1995). ABERMAD. Association Bertonne d'Etude et de Recherche des Maladies de l'Appareil Digestif]. *Gastroenterol Clin Biol* 1997;21:483-90.

Panaccione R, Ghosh S, Middleton S, et al. Combination therapy with infliximab and azathioprine is superior to monotherapy with either agent in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2014;146:392-400 e3.

Paoluzi OA, Pica R, Marcheggiano A, et al. Azathioprine or methotrexate in the treatment of patients with steroid-dependent or steroid-resistant ulcerative colitis: results of an open-label study on efficacy and tolerability in inducing and maintaining remission. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1751-9.

Pedersen G, Brynskov J. Topical rosiglitazone treatment improves ulcerative colitis by restoring peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1595-603.

Peng N, Kim JW, Rainey WE, et al. The role of the orphan nuclear receptor, liver receptor homologue-1, in the regulation of human corpus luteum 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:6020-8.

Peyrin-Biroulet L, Bressenot A, Kampman W. Histologic remission: the ultimate therapeutic goal in ulcerative colitis? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12:929-34 e2.

Peyrin-Biroulet L, Khosrotehrani K, Carrat F, et al. Increased risk for nonmelanoma skin cancers in patients who receive thiopurines for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011;141:1621-28 e1-5.

Pica R, Paoluzi OA, Iacopini F, et al. Oral mesalazine (5-ASA) treatment may protect against proximal extension of mucosal inflammation in ulcerative proctitis. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:731-6.

Pineton de Chambrun G, Peyrin-Biroulet L, Lemann M, et al. Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:15-29.

Powell-Tuck J, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. The prognosis of idiopathic proctitis. *Scand J Gastroenterol* 1977;12:727-32.

Probert CS, Hearing SD, Schreiber S, et al. Infliximab in moderately severe glucocorticoid resistant ulcerative colitis: a randomised controlled trial. *Gut* 2003;52:998-1002.

Regueiro M, Loftus EV, Jr., Steinhardt AH, et al. Clinical guidelines for the medical management of left-sided ulcerative colitis and ulcerative proctitis: summary statement. *Inflamm Bowel Dis* 2006a;12:972-8.

Regueiro M, Loftus EV, Jr., Steinhardt AH, et al. Medical management of left-sided ulcerative colitis and ulcerative proctitis: critical evaluation of therapeutic trials. *Inflamm Bowel Dis* 2006b;12:979-94.

Reinisch W, Sandborn WJ, Bala M, et al. Response and remission are associated with improved quality of life, employment and disability status, hours worked, and productivity of patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1135-40.

Rieusset J, Andreelli F, Auboeuf D, et al. Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human adipocytes. *Diabetes* 1999;48:699-705.

Romkens TE, Kampschreur MT, Drenth JP, et al. High mucosal healing rates in 5-ASA-treated ulcerative colitis patients: results of a meta-analysis of clinical trials. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:2190-8.

Rossetti S, Actis GC, Fadda M, et al. The use of the anti-tumour necrosis factor monoclonal antibody--infliximab--to treat ulcerative colitis: implications and trends beyond the available data. *Dig Liver Dis* 2004;36:426-31.

Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, et al. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Exp Med* 2005;201:1205-15.

Rubin DT, Dubinsky MC, Panaccione R, et al. The impact of ulcerative colitis on patients' lives compared to other chronic diseases: a patient survey. *Dig Dis Sci* 2010;55:1044-52.

Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;353:2462-76.

Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, et al. Cancer surveillance in longstanding ulcerative colitis: endoscopic appearances help predict cancer risk. *Gut* 2004;53:1813-6.

Sandborn WJ. Current directions in IBD therapy: what goals are feasible with biological modifiers? *Gastroenterology* 2008;135:1442-7.

Sandborn WJ, Tremaine WJ, Schroeder KW, et al. A placebo-controlled trial of cyclosporin enemas for mildly to moderately active left-sided ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994;106:1429-35.

Sandborn WJ, Travis S, Moro L, et al. Once-daily budesonide MMX(R) extended-release tablets induce remission in patients with mild to moderate ulcerative colitis: results from the CORE I study. *Gastroenterology* 2012;143:1218-26 e1-2.

Sands BE, Tremaine WJ, Sandborn WJ, et al. Infliximab in the treatment of severe, steroid-refractory ulcerative colitis: a pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:83-8.

Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, et al. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55:749-53.

Schnitzler F, Fidder H, Ferrante M, et al. Long-term outcome of treatment with infliximab in 614 patients with Crohn's disease: results from a single-centre cohort. *Gut* 2009;58:492-500.

Schoonjans K, Martin G, Staels B, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:159-66.

Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-7.

Sidler D, Renzulli P, Schnoz C, et al. Colon cancer cells produce immunoregulatory glucocorticoids. *Oncogene* 2011;30:2411-9.

Siebert U, Wurm J, Gothe RM, et al. Predictors of temporary and permanent work disability in patients with inflammatory bowel disease: results of the swiss inflammatory bowel disease cohort study. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:847-55.

Sokol H, Seksik P, Carrat F, et al. Usefulness of co-treatment with immunomodulators in patients with inflammatory bowel disease treated with scheduled infliximab maintenance therapy. *Gut* 2010;59:1363-8.

Solberg IC, Lygren I, Jahnsen J, et al. Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study). *Scand J Gastroenterol* 2009;44:431-40.

Stahn C, Lowenberg M, Hommes DW, et al. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol* 2007;275:71-8.

Stange EF, Travis SP, Vermeire S, et al. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2008;2:1-23.

Steenholdt C, Molazahi A, Ainsworth MA, et al. Outcome after discontinuation of infliximab in patients with inflammatory bowel disease in clinical remission: an observational Danish single center study. *Scand J Gastroenterol* 2012;47:518-27.

Stein RB, Hanauer SB. Comparative tolerability of treatments for inflammatory bowel disease. *Drug Saf* 2000;23:429-48.

Stewenius J, Adnerhill I, Ekelund GR, et al. Risk of relapse in new cases of ulcerative colitis and indeterminate colitis. *Dis Colon Rectum* 1996;39:1019-25.

Su CG, Wen X, Bailey ST, et al. A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 1999;104:383-9.

Thomas GA, Rhodes J, Rangunath K, et al. Transdermal nicotine compared with oral prednisolone therapy for active ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:769-76.

Thompson PW, Bayliffe AI, Warren AP, et al. Interleukin-10 is upregulated by nanomolar rosiglitazone treatment of mature dendritic cells and human CD4+ T cells. *Cytokine* 2007;39:184-91.

Timmer A, McDonald JW, Tsoulis DJ, et al. Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;9:CD000478.

Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* 2008;77:289-312.

Toy LS, Yio XY, Lin A, et al. Defective expression of gp180, a novel CD8 ligand on intestinal epithelial cells, in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1997;100:2062-71.

Travis SP, Danese S, Kupcinskis L, et al. Once-daily budesonide MMX in active, mild-to-moderate ulcerative colitis: results from the randomised CORE II study. *Gut* 2014;63:433-41.

Travis SP, Schnell D, Krzeski P, et al. Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut* 2012;61:535-42.

Travis SPL, Stange EF, Lemann M, et al. European evidence-based Consensus on the management of ulcerative colitis: Current management. *Journal of Crohn's and Colitis* 2008;2:24-62.

Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. Colonic mucosal hemodynamics and tissue oxygenation in patients with ulcerative colitis: investigation by organ reflectance spectrophotometry. *J Gastroenterol* 1995;30:183-8.

Turunen U, Farkkila, Valtonen V. Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin. *Gastroenterology* 1999;117:282-3.

Turunen UM, Farkkila MA, Hakala K, et al. Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 1998;115:1072-8.

Van der Goten J, Arijs I, Van Lommel L, et al. Differential expression of microRNAs in inflamed colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 2012;6:S29.

van Dieren JM, van Bodegraven AA, Kuipers EJ, et al. Local application of tacrolimus in distal colitis: feasible and safe. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:193-8.

Vavricka SR, Brun L, Ballabeni P, et al. Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort. *Am J Gastroenterol* 2011;106:110-9.

Veloso FT, Carvalho J, Magro F. Immune-related systemic manifestations of inflammatory bowel disease. A prospective study of 792 patients. *J Clin Gastroenterol* 1996;23:29-34.

Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997;99:2416-22.

WILKS SS. The morbid appearance of the intestine of Miss Banks. *Medical Times and Gazette*,
1859;2:264.

Winther KV, Jess T, Langholz E, et al. Survival and cause-specific mortality in ulcerative colitis: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County. *Gastroenterology* 2003;125:1576-82.

Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, et al. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev Cell* 2002;2:331-41.

Zhang X, Ji J, Yan G, et al. Sildenafil promotes adipogenesis through a PKG pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396:1054-9.

Zieleniak A, Wojcik M, Wozniak LA. Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2008;56:331-45.

OPTIMISATION DE LA PRISE EN CHARGE DE LA RECTOCOLITE HÉMORRAGIQUE :

DE LA THÉORIE À LA PRATIQUE

La rectocolite hémorragique (RCH) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin responsable d'un handicap et d'une altération de la qualité de vie pouvant exposer les patients à des complications sévères en dépit des thérapeutiques actuelles.

L'objectif de cette thèse était d'analyser les voies possibles d'amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients à partir de données expérimentales et cliniques.

Au niveau expérimentale nous nous sommes intéressés au mécanisme impliqué dans la régulation de l'expression de PPAR γ , récepteur nucléaires aux propriétés anti-inflammatoires, primitivement diminuée au cours de la RCH et cible des 5-aminosalicylés. Il a été montré que son expression était d'une part sous le contrôle de la stéroïdogenèse intraépithéliale, elle-même sous contrôlée par LRH-1 et d'autre part que l'hypoxie épithéliale diminuait son expression via une sur-expression de miR-27a. Par ailleurs, les effets de l'hypoxie sur l'expression de PPAR γ étaient inversés en présence de sildénafil. Sur le versant clinique, l'analyse d'une nouvelle stratégie thérapeutique ciblant la cicatrisation muqueuse, c'est à dire l'abrogation de l'inflammation colique macroscopique était efficace et possible dans la pratique clinique. Cet objectif semble aujourd'hui fondamental pour diminué la morbi-mortalité induite par cette maladie. Enfin nous avons observé l'efficacité des anti-TNF dans le cas spécifique de la rectite réfractaire et l'importance de son utilisation prolongée pour éviter les rechutes de la maladie et l'obtention d'une rémission prolongée.

THERAPEUTIC OPTIMIZATION DURING ULCERATIVE COLITIS: FROM BENCH TO CLINIC

Ulcerative colitis (UC) is a chronic disabling and relapsing inflammatory disease of the colonic mucosa that for more than half of patients results in chronic intermittent or continuous symptoms of increased stool frequency, fecal urgency and rectal bleeding

The aim of the present work was to assess experimental ways and new therapeutic strategies with current treatments to improve long-term outcomes of UC.

We focused experimental work on the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), a key factor of gut homeostasis and a target of mesalamine. The mechanism of primary impaired expression of PPAR γ in colonic epithelial cells (CEC) during UC remains unknown. We demonstrated the control of PPAR γ expression by intracellular CEC production of cortisol and the lack of cortisol production during UC that may participate towards the decreased expression of PPAR γ . Furthermore hypoxia, a driver of mucosal inflammation during UC, markedly decreased PPAR γ expression through the over-expression of miR-27a that was reversible by the use of sildenafil. From a clinic point of view, we assessed the efficacy and feasibility of a treat to target strategy which implies treatment optimization to achieve mucosal healing a key factor of long-term outcomes. Finally we addressed the long-term outcomes of patients treated with infliximab including the case of refractory proctitis.

Mots-Clés: Rectocolite hémorragique, PPAR γ , hypoxie, corticoïde, infliximab, treat to target