



**HAL**  
open science

**Analyse des mécanismes moléculaires et cellulaires  
conduisant à une inflammation dans l'intestin et une  
progression tumorale induits par la perte de la  
sous-unité d'intégrine Alpha6 chez la souris**

Hussein Hamade

► **To cite this version:**

Hussein Hamade. Analyse des mécanismes moléculaires et cellulaires conduisant à une inflammation dans l'intestin et une progression tumorale induits par la perte de la sous-unité d'intégrine Alpha6 chez la souris. Hépatologie et Gastroentérologie. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ062 . tel-01249545

**HAL Id: tel-01249545**

**<https://theses.hal.science/tel-01249545>**

Submitted on 4 Jan 2016

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire**

**THÈSE** présentée par :

**Hussein HAMADE**

soutenue le : 17 avril 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Analyse des mécanismes moléculaires  
et cellulaires conduisant à une  
inflammation dans l'intestin et une  
progression tumorale induits par la  
perte de la sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$   
chez la souris**

**THÈSE dirigée par :**

*Directeur de thèse*

**Mr LABOUESSE Michel**

Directeur de Recherches, université de Strasbourg

*Co-Directeur de thèse*

**Mr GRADWOHL Gérard**

Directeur de Recherches, université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme ROMAGNOLO Béatrice**

Directeur de Recherches, Institut Cochin-U1016

**Mr APETOH Lionel**

Chargé de Recherches, Inserm-UMR866

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mr LEHMANN Maxime**

Professeur, université de Strasbourg

**Mr RYFFEL Bernhard**

Directeur de Recherches, CNRS-UMR7355

---



**Analyse des mécanismes moléculaires et cellulaires conduisant à une inflammation dans l'intestin et une progression tumorale induits par la perte de la sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$  chez la souris**

## REMERCIEMENTS

La Science est avant tout pour moi une passion qui se partage collectivement !

Je tiens à remercier le Dr. Olivier Pourquoié et le Dr. Brigitte Kieffer pour m'avoir accueilli au sein de l'IGBMC et de m'avoir offert les meilleures conditions de travail.

Un grand merci à Elisabeth qui m'a offert l'opportunité de travailler sur ce magnifique sujet et qui jusqu'au bout a tout fait pour que je puisse être entouré de personnes exceptionnelles. Je salue son courage, sa force et son énergie. Je regrette que son départ prématuré ne lui ait pas permis de voir l'aboutissement de ce travail dont elle a été l'initiatrice.

Je remercie Michel d'avoir repris la direction de ma thèse et de m'avoir accordé sa confiance. Michel est une personne avec qui il est extrêmement agréable de travailler et qui pousse la réflexion scientifique toujours plus loin. Merci pour tout.

Je tiens à remercier Gérard pour tous ses précieux conseils et toutes les très bonnes discussions scientifiques que nous avons eues ensemble.

Un grand merci également à Sophie Jarriault et Maxime Lehmann pour avoir accepté de juger ma soutenance à mi-parcours, et de m'avoir encouragé et soutenu dans les moments difficiles.

Je tiens à remercier les Docteurs Béatrice Romagnolo, Lionel Apetoh et Bernhard Ryffel de m'avoir fait l'honneur d'accepter de lire et de juger mon travail.

Je remercie nos collaborateurs de Lille, en particulier un grand merci à Mathias et Sylvain pour leur précieuse aide.

Je voudrais également remercier toutes les personnes de l'IGBMC qui ont participé de près ou de loin à ce projet. Claudine pour sa bonne humeur et ses conseils pour le FACS, Alex et William pour m'avoir transmis leur expérience en matière d'expérimentation animale, Doulaye pour son aide précieuse et ses conseils pour analyser les données de puces à ADN.

Je remercie bien évidemment tous les membres de l'équipe pour leur soutien et leur gentillesse. Tout d'abord un grand merci à Adèle pour sa gentillesse, son grand cœur, sa bonne humeur et pour m'avoir encadré durant toute ma thèse. Je n'oublierai pas le nombre d'heures que nous avons passé à disséquer des souris, tous les délires et les fous rires que nous avons eus. Je remercie Véronique de m'avoir aidé à gérer mes souris et d'avoir toujours été là avec sa bonne humeur. Je remercie également Stéphanie de m'avoir appris de nombreuses techniques et avec qui il est agréable de travailler. Je tiens à remercier Naël, le deuxième homme du labo, qui m'a transmis la passion des intégrines et de la biologie cellulaire.

Je remercie également Thomas Hussenet qui m'a encadré durant mon stage de Master et qui m'a transmis sa passion pour la cancérologie.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe de Michel, Gérard et Sophie pour leur bonne humeur et leur bel esprit.

Un très grand merci à mes amis de l'IGBMC : Kobita, Firas, Elias, Fernande, Nicolas, Ismail, Yara, Carole, Laura, Angeline, Ricardo.... Pour tous les fous rires et les sorties que nous avons fait ensemble.

Merci à tous mes amis en général, Abdel-Aziz, Ali, Bassel, Fouad, Hussein, Wael, Jacques, Matthias, Maassarani, Antoine, Loïc, Anaïs, Onsi, Kanso, Metz, Jamal, Maud, Jérémy, Julien...

Enfin, un énorme Merci à ma famille qui est tout ce qu'il y a de plus beau dans ma vie.

Je dédie ce mémoire de thèse à Elisabeth et à ma grand-mère, toutes deux décédées d'un cancer au cours de ma thèse.

**Ce projet a été initié par Mme Elisabeth GEORGES-LABOUESSE (Directeur de recherche, Université de Strasbourg) décédée au cours de ma thèse.**

## LISTE DES ABREVIATIONS

AKT	<i>Protéine kinase B</i>
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>
BP180	<i>Bullous pemphigoid antigen 180 (collagen XVII)</i>
BP230	<i>Bullous pemphigoid antigen 230</i>
CD151	<i>Cluster of Differentiation 151</i>
c-MET	<i>MNNG HOS Transforming gene</i>
cox2	<i>Cyclooxygénase 2</i>
CXCL5	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 5</i>
DLG	<i>Discs large</i>
DSS	<i>Dextran Sodium Sulfate</i>
EB1	<i>End-binding protein</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ErBb2	<i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FAP	<i>Familial adenomatous polyposis</i>
FCA	<i>Foyers de cryptes aberrantes</i>
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK3 $\beta$	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
IL	<i>Interleukine</i>
IL-18R	<i>Interleukin-18 receptor</i>
IL-1R	<i>Interleukin-1 receptor</i>
IL1RAcP	<i>IL-1 receptor accessory protein</i>
ILK	<i>Intergin-liked kinase</i>
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	<i>Interferon regulatory transcription factor</i>
IRS-1/2	<i>Insulin receptor substrate</i>
KRT17	<i>Keratin 17</i>
LEF	<i>Lymphoid enhancer-binding factor</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MAL	<i>Myelin And Lymphocyte protein</i>
MEK	<i>Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase</i>
MICI	<i>Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin</i>
mmp	<i>Matrix metalloproteinases</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
MUC	<i>Mucin</i>
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
NF-KB	<i>Nuclear factor kappa enhancer binding protein</i>
NLRP	<i>NOD-like receptor family pyrin domain</i>

NOD	<i>Nucleotide oligomerization domain</i>
P53	<i>Tumor protein p53</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PGE2	<i>Prostaglandin E2</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositide 3-kinases</i>
PLAU	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTP-BL	<i>Protein tyrosine phosphatase-BL</i>
PTP-PEST	<i>Protein tyrosine phosphatase-PEST</i>
RCH	<i>Rectocolite hémorragique</i>
Reg3 $\gamma$	<i>Regenerating islet-derived protein 3-gamma-like</i>
RT-qPCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SAA3	<i>Serum amyloid A 3</i>
SHC	<i>Src homology 2 domain containing</i>
SRC	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
sST2	<i>ST2 soluble</i>
ST2L	<i>Récepteur ST2</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAF6	<i>TNF Receptor-Associated Factor 6</i>
TRAM	<i>Translocating chain-associating membrane protein</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
Wnt	<i>wingless (Wg) et integration site (Int)</i>
AKT	<i>Protéine kinase B</i>
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>
BP180	<i>Bullous pemphigoid antigen 180 (collagen XVII)</i>
BP230	<i>Bullous pemphigoid antigen 230</i>
CD151	<i>Cluster of Differentiation 151</i>
c-MET	<i>MNNG HOS Transforming gene</i>
cox2	<i>Cyclooxygénase 2</i>
CXCL5	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 5</i>
DLG	<i>Discs large</i>
DSS	<i>Dextran Sodium Sulfate</i>
EB1	<i>End-binding protein</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ErBb2	<i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FAP	<i>Familial adenomatous polyposis</i>
FCA	<i>Foyers de cryptes aberrantes</i>



GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK3 $\beta$	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
IL	<i>Interleukine</i>
IL-18R	<i>Interleukin-18 receptor</i>
IL-1R	<i>Interleukin-1 receptor</i>
IL1RAcP	<i>IL-1 receptor accessory protein</i>
ILK	<i>Intergin-liked kinase</i>
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	<i>Interferon regulatory transcription factor</i>
IRS-1/2	<i>Insulin receptor substrate</i>
KRT17	<i>Keratin 17</i>
LEF	<i>Lymphoid enhancer-binding factor</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MAL	<i>Myelin And Lymphocyte protein</i>
MEK	<i>Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase</i>
MICI	<i>Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin</i>
mmp	<i>Matrix metalloproteinases</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
MUC	<i>Mucin</i>
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
NF-KB	<i>Nuclear factor kappa enhancer binding protein</i>
NLRP	<i>NOD-like receptor family pyrin domain</i>
NOD	<i>Nucleotide oligomerization domain</i>
P53	<i>Tumor protein p53</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PGE2	<i>Prostaglandin E2</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositide 3-kinases</i>
PLAU	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTP-BL	<i>Protein tyrosine phosphatase-BL</i>
PTP-PEST	<i>Protein tyrosine phosphatase-PEST</i>
RCH	<i>Rectocolite hémorragique</i>
Reg3 $\gamma$	<i>Regenerating islet-derived protein 3-gamma-like</i>
RT-qPCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SAA3	<i>Serum amyloid A 3</i>
SHC	<i>Src homology 2 domain containing</i>
SRC	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
sST2	<i>ST2 soluble</i>
ST2L	<i>Récepteur ST2</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>

TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAF6	<i>TNF Receptor-Associated Factor 6</i>
TRAM	<i>Translocating chain-associating membrane protein</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
Wnt	<i>wingless (Wg) et integration site (Int)</i>

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	3
LISTE DES ABREVIATIONS .....	5
TABLE DES MATIERES .....	9
RESUME .....	15
INTRODUCTION .....	156
AVANT-PROPOS.....	20
LES INTEGRINES.....	21
1-Généralités .....	21
2. Les intégrines dans les jonctions cellulaires.....	23
2.1 Les adhésions focales .....	24
2.2 Les hémidesmosomes .....	25
2.2.1 Les composants de la plaque externe .....	26
2.2.2 Les composants de la plaque interne.....	27
2.2.3 Les ligands de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ .....	28
3. Régulation des fonctions cellulaires par l'hémidesmosome.....	28
3.1 Rôle de l'hémidesmosome dans la survie cellulaire.....	29
3.2 Rôle de l'hémidesmosome dans la prolifération.....	29
3.3 Rôle de l'hémidesmosome dans la migration cellulaire.....	30
4. Répertoire des intégrines et laminines exprimées dans l'intestin.....	30
5. Pathologie ou phénotype associé à la perte de l'hémidesmosome .....	32
6. Dérégulation de l'hémidesmosome dans les cancers .....	33
LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN .....	34
1. Introduction sur l'histologie de l'intestin .....	34
2. Introduction générale sur l'inflammation .....	35
2.1 Barrière naturelle .....	36
2.1.1 Barrière physique .....	36
2.1.2 Barrière chimique .....	43
2.1.3 Barrière immunitaire .....	44
2.2 Immunité innée .....	44
2.3 Immunité adaptative .....	45

3. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) .....	46
3.1 Maladie de Crohn .....	47
3.2 La rectocolite hémorragique .....	47
4. Les voies de signalisation communément altérées dans les MICI .....	49
4.1 Les voies des récepteurs de type Toll (TLR).....	49
4.1.1 Signalisation des TLRs.....	49
4.1.2 Rôles dans la défense contre les infections .....	50
4.1.3 Rôles dans la réparation et la régénération du tissu.....	50
4.2 L'inflammasome et les protéines Nlrp .....	51
4.2.1 Signalisation de l'inflammasome.....	51
4.2.2 Rôles de l'inflammasome dans la défense contre les infections et l'interaction avec le microbiote .....	52
4.2.3 Rôles de l'inflammasome dans la réparation et la régénération de l'épithélium intestinal	53
4.3. Les voies de signalisation IL-33/ST2 .....	54
4.3.1 Rôle de la voie de signalisation IL-33/ST2 dans la réponse immunitaire et la régénération du tissu .....	55
Introduction générale sur la carcinogenèse.....	57
1. Le cancer colorectal.....	57
2. Les sous-types de cancers colorectaux .....	58
2.1 Anatomie pathologique.....	58
2.2 Localisation colorectale : Une ou plusieurs entités.....	59
3. De la cellule normale à la cellule cancéreuse.....	60
3.1 Origine monoclonale des cancers .....	60
3.2 Les traits des phénotypes tumoraux .....	61
3.3 Les tumeurs comme organes .....	62
4. Tumorigenèse colorectale .....	63
4.1 Voies communément dérégulées dans les cancers du colon .....	64
4.1.1 La voie Wnt/APC/ $\beta$ -caténine .....	64
4.1.2 Les voies du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor).....	67
4.1.3 La voie TGF- $\beta$ /SMAD.....	68
4.1.4 Le gène suppresseur de tumeur TP53.....	69
4.1.5 Voies de synthèse des prostaglandines.....	70
4.1.6 Les métalloprotéinases.....	71
LES OBJECTIFS.....	73
MATERIELS ET METHODES .....	75

1. Souris transgéniques .....	75
Régime alimentaire à base de nourriture gélifiée.....	75
Traitement au tamoxifène.....	75
2. Analyse de puces à ADN .....	76
Souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .....	76
Souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM .....	76
3. RT-qPCR .....	77
4. Extractions protéiques et analyses par Western blot .....	78
5. Transfection transitoire des cellules HCT116.....	79
6. Isolation des cellules CD4+ .....	79
7. Analyses statistiques .....	80
I-L'inactivation de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ spécifiquement dans l'épithélium intestinal conduit au développement spontané de cancers colorectaux associés à l'inflammation chez les souris (article soumis à JCI – journal of clinical investigation) .....	82
1. Contexte et justification de la recherche .....	82
2. Résumé des principaux résultats de l'article.....	83
2.1 Désorganisation des structures d'ancrage au pôle basal et perte de l'intégrité de la barrière épithéliale chez les souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .....	83
2.2 Altération et hypersécrétion de mucus.....	83
2.3 Ségrégation anormale de bactéries et dysbiose .....	84
2.4 Inflammation .....	84
2.5 Des traitements antibiotiques diminuent partiellement le phénotype, ceci est corrélé à la diminution de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ et d'IL-18 chez les souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .....	84
2.6 Rôle de l'immunité adaptative .....	85
3. Les principales conclusions de l'article.....	86
II- Analyse des mécanismes moléculaires impliqués dans carcinogenèse associée à l'inflammation dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .....	144
1. Analyse du transcriptome .....	144
Stratégie .....	144
Résultats .....	145
Conclusion : .....	146
2. Dérégulation de ST2 dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .....	147
3. Diminution du niveau d'expression de la protéine Nrlp6 chez les souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .....	147
4. La sécrétion d'IL-18 est dépendante de la protéine adaptatrice MyD88 chez les souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .....	148
5. Quelle est la contribution du stress mécanique dans le phénotype de la souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ ? .....	149

6. Caractérisation de la réponse adaptative. ....	149
III- Analyse de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .....	151
Stratégie .....	151
Résultats .....	151
Conclusion : .....	152
IV- Analyse des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement de l'inflammation dans le modèle de souris $\alpha 6\Delta IEC$ TAM .....	153
1. Phénotype des souris $\alpha 6\Delta IEC$ TAM deux semaines après traitement au tamoxifène .....	153
Stratégie .....	153
Résultats .....	154
1.1 Les souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM présentent un détachement épithélial, des altérations du tissu, une hyperprolifération et une inflammation, deux semaines après inactivation de l'intégrine $\alpha 6$ ..	154
Conclusion: .....	154
1.2 Caractérisation de l'inflammation deux semaines après inactivation de l'intégrine $\alpha 6$ chez les $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM .....	154
Conclusion: .....	155
1.3 Analyse du transcriptome dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM deux semaines après l'inactivation de l'intégrine $\alpha 6$ dans l'intestin.....	156
Stratégie .....	156
Résultats .....	156
Conclusion: .....	156
2. Caractérisation de la cinétique des évènements et de la contribution de l'infection par les bactéries dans le modèle de souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM .....	157
2.1 Dans les processus établis dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM, quelle est la contribution des bactéries ? .....	157
Stratégie .....	158
Résultats .....	159
Conclusion : .....	159
2-2 Dans les processus établis dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM, quelle est la cinétique d'apparition des mécanismes ? .....	160
Résultats .....	160
Conclusion : .....	161
DISCUSSION/PERSPECTIVES .....	163
1. Perte de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ .....	163
L'âge au moment duquel se produit l'inactivation de l'intégrine $\alpha 6$ est-il essentiel au développement du phénotype observé ? .....	163

Le phénotype observé est-il dû à la perte de l'intégrine $\alpha6\beta4$ et/ou de l'intégrine $\alpha6\beta1$ ?.....	163
Quels sont les impacts de la perte de l'intégrine $\alpha6\beta4$ sur les fonctions cellulaires des cellules épithéliales? .....	164
Quels sont les impacts de la perte de l'intégrine $\alpha6\beta4$ sur la matrice extracellulaire et le cytosquelette ? .....	164
Quels sont les impacts de la perte de l'intégrine $\alpha6\beta4$ sur les voies de signalisation? .....	165
2. Détachement et dommage épithélial .....	166
Quel est le rôle des frottements mécaniques sur le phénotype observé chez les souris $\alpha6^{\Delta IEC}$ ?	166
Quel est l'impact du détachement épithélial sur les voies de signalisations ? .....	166
3. Perte de l'intégrité de la barrière épithéliale chez les souris $\alpha6^{\Delta IEC}$ .....	167
Quel est le rôle du mucus dans le développement du phénotype dans les modèles $\alpha6^{\Delta IEC}$ et $\alpha6^{\Delta IEC}$ TAM ?.....	167
Dans les processus établis dans les modèles $\alpha6^{\Delta IEC}$ et $\alpha6^{\Delta IEC}$ TAM, quelle est la contribution de l'infection par les bactéries ? .....	168
Quelle est la cause de la dysbiose et quel est le rôle de cette dernière dans le développement de l'inflammation dans les modèles $\alpha6^{\Delta IEC}$ et $\alpha6^{\Delta IEC}$ TAM? .....	168
Quelle est la contribution de l'immunité innée et adaptative dans le développement de l'inflammation et de la transformation tumorale ? .....	169
Quels sont les mécanismes, les molécules et/ou les voies de signalisation potentiellement impliqués dans la formation de cancers dans le modèle $\alpha6^{\Delta IEC}$ ? .....	169
4. Mécanismes de dérégulation des principales voies de signalisation étudiés dans les modèles $\alpha6^{\Delta IEC}$ et $\alpha6^{\Delta IEC}$ TAM .....	170
Quel est le mécanisme à l'origine de la diminution de la protéine APC et quel est son rôle dans le développement du phénotype? .....	170
Quels sont les mécanismes d'activation de ST2 et quel est son rôle dans les modèles $\alpha6^{\Delta IEC}$ et $\alpha6^{\Delta IEC}$ TAM ?.....	171
Quels sont les mécanismes d'activation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ et d'IL-18 et quels sont leurs rôles dans les modèles $\alpha6^{\Delta IEC}$ et $\alpha6^{\Delta IEC}$ TAM ? .....	171
Quelles sont les cellules productrices des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-18 et sST2? .....	172
Quel est type de réponse adaptative est activé dans le modèle $\alpha6^{\Delta IEC}$ ? .....	172
Conclusion .....	173
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	175

# RESUME



## RESUME

### **Analyse des mécanismes moléculaires et cellulaires conduisant à une inflammation dans l'intestin et une progression tumorale induits par la perte de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ chez la souris**

Les récepteurs de la famille des intégrines sont les principaux médiateurs des interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire. L'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  fait partie d'une jonction d'ancrage, l'hémidesmosome, qui assure l'attachement des cellules épithéliales à la lame basale, notamment dans l'épithélium intestinal. Cet épithélium forme une barrière physique qui sépare le reste du corps des quelques 100.000 milliards de micro-organismes qui constituent le microbiote. Dans le but de déterminer le rôle de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$ , dans le maintien et l'homéostasie de l'épithélium intestinal, notre équipe a produit en utilisant le système Cre-LoxP, un modèle de souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  présentant une invalidation conditionnelle de l'intégrine  $\alpha 6$  spécifiquement dans l'épithélium intestinal. Chez ces souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  la sous-unité  $\alpha 6$  est absente dans les cellules épithéliales de toutes les régions intestinales. On observe, chez la totalité des souris mutantes une séquence d'inflammation chronique sévère/ adénocarcinome colorectal. Ce modèle de souris mutantes  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  développe donc sans manipulation additionnelle une inflammation chronique intestinale associée à la formation d'adénocarcinomes colorectaux.

Mon projet de thèse a consisté à définir les mécanismes cellulaires et moléculaires qui influencent la transformation des lésions inflammatoires en adénocarcinomes. Pour cela, plusieurs approches ont été utilisées, telles que la création d'une lignée de souris « Knock Out » conditionnel inducible par administration de tamoxifène ( $\alpha 6^{\Delta IEC/TAM}$ ), des analyses de transcriptome afin de rechercher des modifications de voies de signalisation impliquées dans la transformation tumorale, des analyses biochimiques et histologiques, notamment des immuno-marquages de cellules inflammatoires, le tri de cellules inflammatoires du compartiment colorectal, la mesure du niveau d'expression des gènes, le dosage de cytokines et le traitement des souris (antibiotiques, nourriture gélifiée). La caractérisation du modèle a permis de mettre en évidence plusieurs altérations après la perte de fonction de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  dans l'épithélium intestinal.

#### **Désorganisation des structures d'ancrage au pôle basal et Perte de l'intégrité de la barrière épithéliale chez les souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$**

Pour rechercher d'éventuelles altérations de la lame basale, j'ai réalisé des marquages et des mesures d'expression par RT-qPCR de ses composants dans la région colorectale. Cette analyse m'a permis de mettre en évidence une surexpression de plusieurs chaînes de laminine et d'intégrine chez les souris mutantes. L'absence de l'intégrine  $\alpha 6$ , n'affecte pas de manière importante les caractéristiques d'adhérence intercellulaire et de polarité épithéliale mais aboutit à une désorganisation des structures d'ancrage et du cytosquelette (délocalisation de la plectine et des kératines 8/18). De plus, une mesure de la perméabilité épithéliale in vivo, nous a permis de mettre

en évidence une augmentation significative de celle-ci dès l'âge de 6 semaines (~3 fois) chez les souris mutantes, indiquant une perte d'intégrité de la barrière épithéliale.

#### **Altération et hypersécrétion de mucus**

Dès les stades précoces (juste après sevrage), l'intestin mutant présente une hypersécrétion de mucus, reflétant une anomalie et un stress affectant le tissu. Des colorations histologiques à l'acide périodique de Schiff et au bleu alcian sur des coupes de côlon mutant inflammatoire ont révélé un déséquilibre dans la composition du mucus, avec une surproduction de mucines de type acide. Le niveau d'expression de Muc2 et Muc4 ne change pas de manière significative. Néanmoins, des altérations affectant la qualité du mucus, en particulier des anomalies de glycosylation et sulfatation des mucines, pourraient être à l'origine des défauts de perméabilité et de perte d'intégrité de la barrière épithéliale. Des analyses du niveau d'expression de Chst4 et Gal3st2, ont permis de mettre en évidence une altération de ces dernières chez les souris mutantes.

#### **Inflammation**

Les souris  $\alpha6\beta4$  présentent très tôt des signes d'inflammation qui se traduisent 10 semaines après la naissance par le développement d'un prolapsus rectal. Ceci est corrélé à une augmentation significative de la prolifération cellulaire (marquages BrdU et Ki67) et de la hauteur des glandes ainsi qu'à une infiltration de cellules immunitaires CD11b+ et de cellules CD4+. De plus, une caractérisation de différentes populations de cellules inflammatoires a été réalisée par FACS sur la rate et la lamina propria des souris. Cette analyse nous a permis d'identifier une augmentation des neutrophiles et macrophages chez les mutants comparés aux témoins. Ceci suggère un rôle clé de ces sous-populations inflammatoires dans le déclenchement de l'inflammation dans notre modèle.

#### **Des traitements antibiotiques diminuent partiellement les phénotypes, ceci est corrélé à la diminution de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ et d'IL-18 chez les souris $\alpha6^{\Delta IEC}$**

La détection des bactéries par FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) associée à un marquage de l'épithélium par la mucine Muc2, sur coupes de côlon distal, ont permis de mettre en évidence des zones de contact direct entre les bactéries et les cellules épithéliales chez les souris mutantes alors que chez les souris contrôles l'épithélium intestinal est bien protégé des bactéries par le mucus. L'altération de cette barrière peut favoriser un déséquilibre de la flore commensale pouvant entraîner une inflammation.

Afin de définir plus finement le rôle de la flore bactérienne dans le développement du phénotype dans notre modèle, nous avons effectué des traitements antibiotiques (ATB) sur des souris mutantes et témoins âgées de 6 semaines, afin d'éliminer les bactéries de la flore intestinale. Les souris  $\alpha6^{\Delta IEC}$  traitées aux ATB présentent une diminution de l'inflammation comparée aux souris  $\alpha6^{\Delta IEC}$  non traitées aux ATB. Ceci est corrélé à une diminution significative de la hauteur des glandes et de l'infiltration de cellules CD11b positives. De plus, le dosage des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18, a permis de mettre en évidence un retour au niveau basal de la sécrétion de IL-1 $\beta$  et une diminution partielle de la sécrétion d'IL-18 chez les souris  $\alpha6^{\Delta IEC}$  traitées aux ATB comparées aux souris non traitées. De manière intéressante, ces résultats évoquent que la sécrétion d'IL-18 n'est que partiellement dépendante des bactéries.

#### **Développement tumoral**

De façon frappante, les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  développent toutes des adénocarcinomes de différents grades allant de la tumeur in situ au carcinome hautement infiltrant dans un délai de 10-12 mois. Les lésions sont principalement localisées dans le rectum, plus rarement dans le côlon. Le développement de cancer colorectal résulte de l'accumulation de mutations affectant classiquement la voie Wnt/APC/ $\beta$ -caténine, K-ras et p53. Les analyses effectuées au sein de l'équipe n'ont pas permis d'identifier des mutations de K-ras, p53 et  $\beta$ -caténine. Des analyses par Western Blot que j'ai réalisées, ont permis de montrer une diminution de la protéine APC, cependant cette diminution ne résulte pas d'une activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (peu de translocation nucléaire de  $\beta$ -caténine dans les tumeurs, pas de différence de Phospho-GSK3 $\beta$  et de la forme active de  $\beta$ -caténine). Des analyses sur des lignées cellulaires ne m'ont pas permis de démontrer de lien direct entre l'inhibition de l'intégrine  $\alpha 6$  et la diminution de la protéine APC. Ceci suggère donc que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine n'est probablement pas à l'origine du développement des tumeurs dans notre modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .

### **Rôle de l'immunité adaptative**

Pour analyser plus précisément le rôle de l'immunité adaptative, nous avons croisé les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  avec les souris Rag1-/-, qui ont une absence de différenciation des lymphocytes T et B. A des stades inflammatoires, les souris doubles mutantes  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  Rag1-/- présentent les mêmes signes d'inflammation que les souris simples mutantes  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Ceci suggère que l'immunité adaptative joue peu de rôle dans l'établissement de l'inflammation chronique, et que celle-ci est dépendante de l'immunité innée. Cependant, par des analyses histologiques et anatomopathologiques à des stades tardifs (1 an), nous avons pu observer de manière saisissante que les souris doubles mutantes  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  Rag1-/- ne présentaient que des lésions de bas grade alors que les souris simples mutantes  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  présentaient des carcinomes de haut grade. Ces résultats, nous amènent à déduire que l'immunité innée serait probablement impliquée dans l'établissement de l'inflammation alors que l'immunité adaptative est impliquée dans le développement de tumeurs. L'analyse sur des cellules CD4+ isolées de la lamina propria du colon a permis de mettre en évidence une réponse de type Th1/Th17 chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .

### **Souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM**

L'ordre des événements qui conduisent à l'inflammation et au développement de cancer colorectaux ne sont pas clairement définis. Pour étudier plus finement la séquence et la cinétique des mécanismes moléculaires et cellulaires, j'ai développé un modèle de souris où l'inactivation du gène de la sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$  dans l'épithélium intestinal peut-être induite par administration de tamoxifène ( $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM). Cette lignée de souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM présente, deux semaines après l'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$ , les mêmes signes d'inflammation que les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Mon approche a consisté à dissocier les différents processus impliqués dans chacune des étapes-clés de la pathologie afin de définir et distinguer plus précisément la contribution respective de l'infection par les bactéries et du stress mécanique.

### **Dans les processus établis dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM, quelle est la contribution des bactéries ?**

Deux semaines après l'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$ , j'ai pu mettre en évidence une activation de l'immunité innée caractérisée par une infiltration de cellules CD11b+ et d'une hypersécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18. Cette réponse inflammatoire est diminuée après traitement avec des antibiotiques à large spectre, démontrant un rôle-clé des bactéries dans l'apparition du phénotype. Cependant, certains

gènes ne voient pas leur expression altérée, tels que St2 et Gal3st2, deux sulfotransferases, ce qui suggère que d'autres mécanismes indépendants des bactéries sont impliqués dans l'apparition du phénotype.

#### **Dans les processus établis dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}$ , quelle est la contribution du stress mécanique?**

La perte de l'hémidesmosome dans l'épithélium intestinal des souris mutantes conduit à une fragilisation de l'épithélium. De nombreuses zones présentent un détachement de l'épithélium qui peut être exacerbé par les frottements mécaniques, très importants dans le compartiment colorectal. De plus, cette fragilité du tissu, induit chez la souris une multitude de cycles de lésions et réparations qui peut être à l'origine de l'inflammation et à la formation de tumeurs colorectales. Les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  ont été soumises à un régime alimentaire exclusivement constitué de nourriture gélifiée afin de diminuer les stress mécaniques causés par le transit de la nourriture solide dans l'intestin. Ce traitement provoque une amélioration modérée de l'inflammation, se traduisant par une diminution de l'expression de St2 et une diminution partielle de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ .

#### **Conclusion**

La contribution et le rôle des différentes sous-populations cellulaires restent à élucider, telle que l'identification des cellules à l'origine de la sécrétion des cytokines et les voies de signalisation impliquées dans leur activation, notamment le rôle de la protéine adaptatrice MyD88. Il serait également intéressant de caractériser la nature exacte des changements de composition du mucus en recherchant les causes, telles que « l'ER stress » ou l'éventuel rôle du cytosquelette. Notre approche devrait permettre non seulement de mieux appréhender le rôle de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  sur la fonction de barrière intestinale, mais aussi de révolutionner notre compréhension de la contribution de la flore bactérienne et du stress mécanique dans la carcinogénèse colique associée à l'inflammation.

#### **Article soumis pour publication à la revue : "Journal of clinical investigation" JCI**

##### **Epithelial-specific alpha6 integrin deficiency spontaneously triggers colitis-associated colorectal cancer**

Adèle De Arcangelis\*, Fabien Alpy, Sylvain Normand, **Hussein Hamade**, Emilie Bruyère, Olivier Lefebvre, Agnès Méchine-Neuville, Stéphanie Siebert, Véronique Pfister, Romain Dassonneville, Christophe Audebert, David Hot, Sophie Rodius, Sylvie Robine, Michèle Kedinger, Isabelle Van Seuning, Michel Labouesse\*, Patricia Simon-Assmann, Mathias Chamillard and Elisabeth Georges-Labouesse

\* Authors for correspondence: [adele@igbmc.fr](mailto:adele@igbmc.fr), [lmichel@igbmc.fr](mailto:lmichel@igbmc.fr)

# **INTRODUCTION**

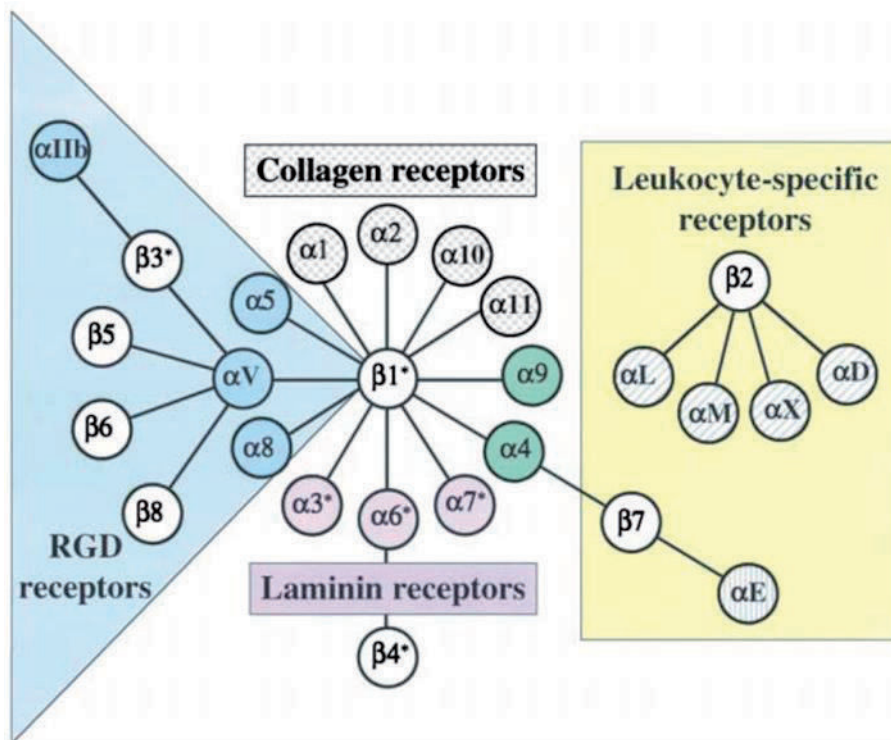
## AVANT-PROPOS

Notre équipe s'intéresse au rôle des interactions des cellules avec la matrice extracellulaire dont les principaux médiateurs sont les intégrines. Les analyses génétiques chez la souris nous ont permis de démontrer l'importance des intégrines  $\alpha6\beta1$  et  $\alpha6\beta4$  dans l'homéostasie de plusieurs tissus. Nous avons notamment mis en évidence le rôle de l'intégrine  $\alpha6\beta4$  dans le maintien de l'intégrité de la peau (Georges-Labouesse et al., 1996; Niculescu et al., 2011). Dans le but de comprendre la fonction de l'intégrine  $\alpha6$  dans le tractus digestif où elle est fortement exprimée, nous avons généré un modèle murin dans lequel l'inactivation de la sous-unité d'intégrine  $\alpha6$  ciblé à l'épithélium intestinal (souris  $\alpha6^{\Delta IEC}$ ) conduit au développement spontané d'inflammation et de cancer colorectal. Dans cette introduction, je m'attacherai à décrire les trois aspects essentiels à la compréhension du phénotype observé dans le modèle de souris  $\alpha6^{\Delta IEC}$  qui sont le rôle des intégrines dans les interactions cellules/matrice, les défauts à l'origine des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, et différents aspects de la carcinogenèse colorectale.

# LES INTEGRINES

## 1-Généralités

Les intégrines sont les principaux médiateurs de l'interaction entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires, constituées d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . Chez les mammifères, il existe 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  qui sont capables de s'assembler pour former 24 hétérodimères d'intégrine (Hynes, 2002) (Fig. 1).

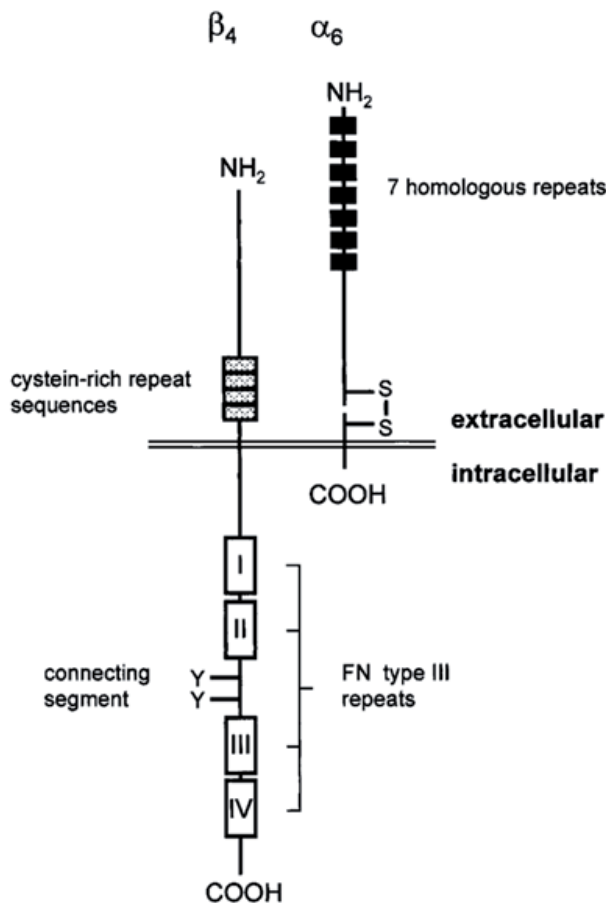


**Figure 1 :** Les différents hétérodimères d'intégrine. Extrait de (Hynes, 2002)

Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques permettant l'adhésion cellulaire, elles appartiennent à une famille de protéines transmembranaires constituées de 24 différents hétérodimères.

Les intégrines comportent un domaine extracellulaire, qui permet l'interaction avec le ligand, la spécificité de la liaison dépend des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  qui se sont associées. Elles possèdent notamment un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire, qui est

en règle générale assez court à l'exception de la sous-unité  $\beta_4$  qui a une longue queue cytoplasmique (Nievers et al., 1999) (Fig. 2). Cette partie cytoplasmique permet l'interaction avec les constituants du cytosquelette, en particulier les filaments d'actine et les kératines, faisant ainsi le lien entre la matrice et le cytosquelette. Cependant, par son domaine cytoplasmique, l'intégrine peut recruter de nombreuses protéines formant ainsi une plateforme de signalisation par laquelle transitent plusieurs voies de signalisation.



**Figure 2 : Représentation schématique de l'intégrine  $\alpha_6\beta_4$ . Adaptée de (Nievers et al., 1999)**

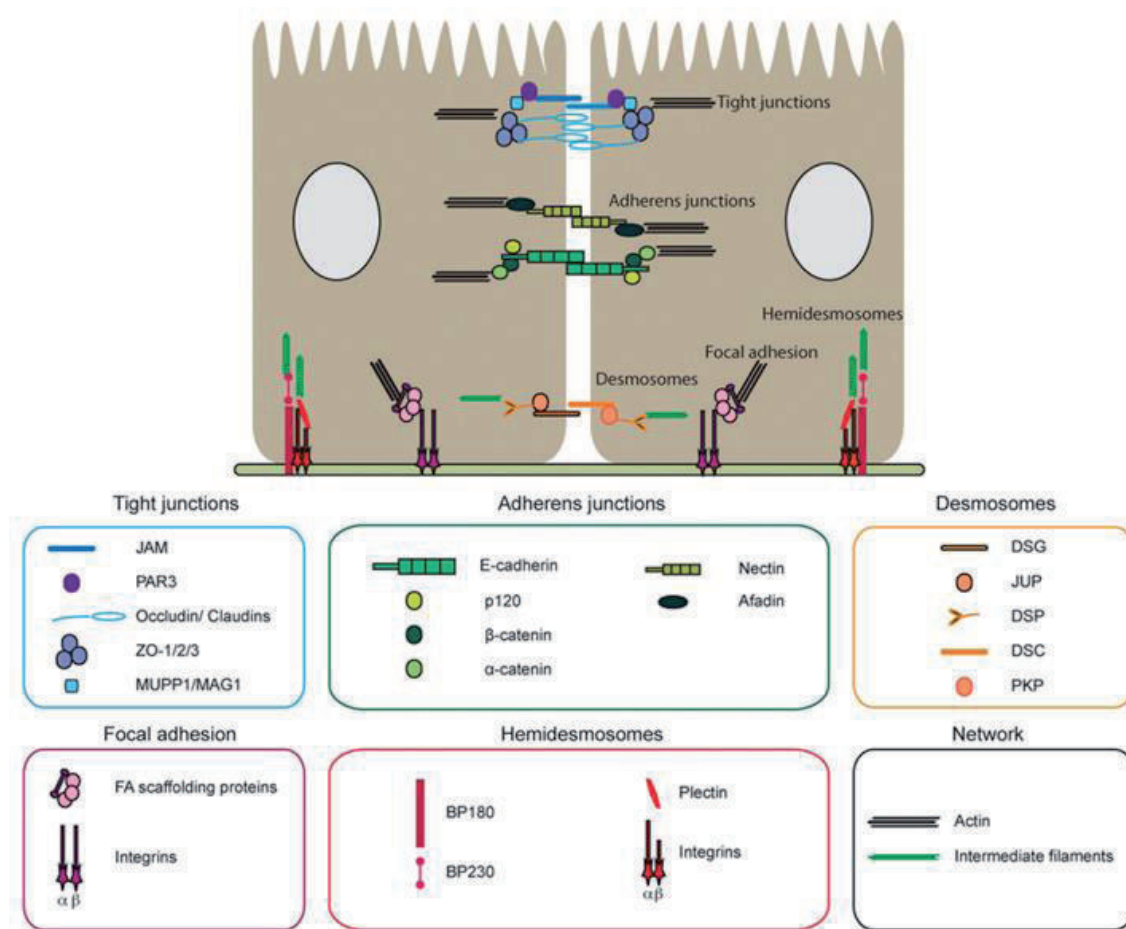
La sous-unité  $\alpha$  possède un long domaine extracellulaire et un court domaine cytoplasmique. La partie extracellulaire contient le domaine N-terminal qui est constitué de sept séquences répétées. Au niveau des trois dernières séquences répétées se situent des sites de fixation pour cations divalents ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ). Ces cations divalents sont essentiels à l'association des hétérodimères et à la liaison au substrat. La chaîne  $\alpha_6$  est constituée d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde reliées entre elles par un pont disulfure présent dans le domaine extracellulaire.

La sous-unité  $\beta_4$  a quant à elle un court domaine extracellulaire et un long domaine cytoplasmique. Le domaine extracellulaire de la chaîne  $\beta_4$  contient plusieurs séquences répétées riches en cystéines reliées entre elles par des ponts disulfures. La partie intracellulaire ne contient pas de domaine catalytique mais deux paires de motifs fibronectine de type III, séparés par un segment connecteur.



## 2. Les intégrines dans les jonctions cellulaires.

Les intégrines assurent non seulement l'interaction entre les cellules et leur microenvironnement, mais peuvent affecter plusieurs voies de signalisation par leur domaine cytoplasmique. Pour assurer cette interaction avec ces différentes molécules, les intégrines se rassemblent sous forme de complexes multiprotéiques. Elles forment ainsi principalement deux jonctions cellulaires : les adhésions focales et les hémidesmosomes (Epifano and Perez-Moreno, 2012)(fig. 3). Je ferai une description plus détaillée de l'hémidesmosome.

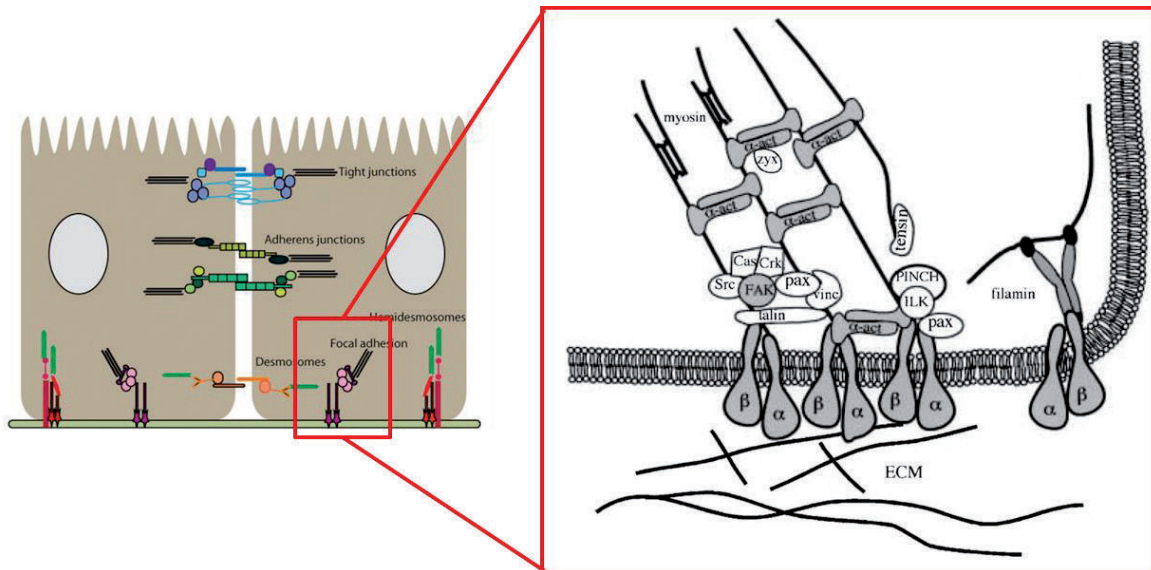


**Figure 3: Représentation schématique des complexes d'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. Extrait de (Epifano and Perez-Moreno, 2012)**

Les jonctions d'adhésion cellule-cellule sont essentiellement assurées par trois structures : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. Au niveau du pôle basal, les interactions cellule-matrice extracellulaire sont assurées majoritairement par les intégrines qui forment deux types de structure : les adhésions focales et les hémidesmosomes.

## 2.1 Les adhésions focales

Les adhésions focales sont des jonctions d'adhérence qui assurent principalement l'interaction entre les micro-filaments d'actine et la matrice extracellulaire. Ce sont des complexes multiprotéiques, qui peuvent comporter plus d'une cinquantaine de protéines, formant une plaque qui n'est pas visible en microscope électronique, dans laquelle s'insèrent les micro-filaments d'actine (voir Figure 4 ; adaptée de (van der Flier and Sonnenberg, 2001) et (Epifano and Perez-Moreno, 2012)). Les adhésions focales sont des structures allongées qui peuvent se former de manière ponctuelle lors de la migration cellulaire. Ce sont des structures très dynamiques, sensibles aux tensions mécaniques exercées au sein de la cellule ou à l'extérieur (Zhang et al., 2011). Elles sont également sensibles au changement de la matrice extracellulaire, pouvant modifier leur organisation et influencer, par leurs interactions avec de nombreuses voies de signalisation, le comportement de la cellule. Les principales intégrines présentes dans cette plaque sont les intégrines  $\alpha5\beta1$  et  $\alpha v\beta3$ . Leurs partenaires cytoplasmiques peuvent avoir un rôle de maintien de la structure et de liaison aux micro-filaments d'actine ou sont impliqués dans la transduction des signaux. En effet, des protéines telles que la vinculine, la taline, la filamine ou la tensine sont essentielles au maintien de la cohésion entre les intégrines et les micro\_filaments d'actine. A titre d'exemple, l'inactivation de la taline et de l' $\alpha$ -actinine dans les cellules en culture empêche la formation des plaques focales et inhibe ainsi l'assemblage des filaments d'actine (Pavalko and Burridge, 1991; Priddle et al., 1998). Parmi les protéines impliquées dans la transduction du signal figurent plusieurs kinases telles que, FAK, Src, ILK, PI3K, des phosphatases comme PTEN, PTP-PEST et des protéines adaptatrices telles que Paxilline, Grb2, Shc et Crk (Guo and Giancotti, 2004). Grâce à ces interactions, les adhésions focales en plus de jouer un rôle de structure et d'adhérence, sont impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que la prolifération, la migration, la survie et l'invasion cellulaire (Bouvard et al., 2013; Brizzi et al., 2012; Harburger and Calderwood, 2009; Hynes, 2002; Petit and Thiery, 2000).



**Figure 4: Représentation schématique des adhésions focales. Adaptée de (van der Flier and Sonnenberg, 2001) et (Epifano and Perez-Moreno, 2012)**

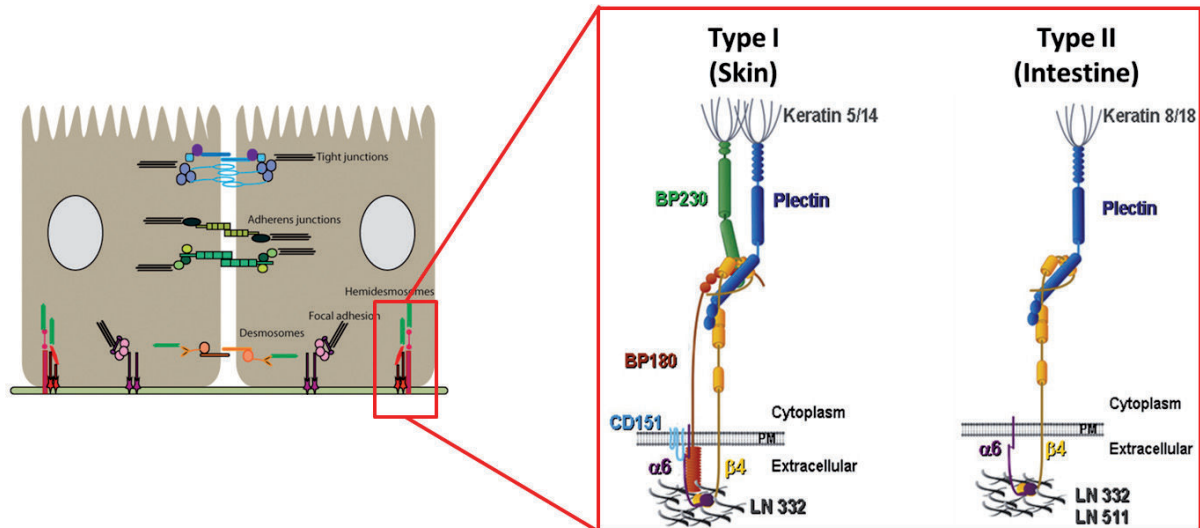
Les adhésions focales sont des jonctions d'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire. Elles sont formées de plusieurs intégrines qui par leur domaine extracellulaire interagissent avec le microenvironnement et par leur domaine intracellulaire se lient à leurs partenaires et aux filaments d'actine. Les adhésions focales forment une plateforme qui module plusieurs voies de signalisation.

## 2.2 Les hémidesmosomes

L'hémidesmosome est une jonction d'ancrage qui permet l'interaction entre la matrice extracellulaire, en particulier les laminines, et le cytosquelette, plus précisément les cytokératines. Les hémidesmosomes classiques dits de type I sont visibles au microscope électronique où ils apparaissent sous forme de structures denses, composées d'une plaque interne et d'une plaque externe, localisées au pôle basal de la plupart des cellules épithéliales (Figure 5 adaptée de (Epifano and Perez-Moreno, 2012) et (Margadant et al., 2008)). On distingue deux types d'hémidesmosome :

- L'hémidesmosome de type I, dit mature, présent essentiellement dans les épithéliums stratifiés comme la peau, constitué de l'intégrine  $\alpha 6 \beta 4$ , la plectine, BP180, BP230 et CD151.
- L'hémidesmosome de type II, dit immature, présent globalement dans les épithéliums simples comme dans l'intestin, constitué de l'intégrine  $\alpha 6 \beta 4$  et de la plectine.

Dans les phases de cicatrisation de la peau, la formation des hémidesmosomes de type II précède celle des hémidesmosomes de type I, d'où la notion d'hémidesmosome mature et immature.



**Figure 5 :** Représentation schématique des différents types d'hémidesmosomes. Adaptée de (Margadant et al., 2008) et (Epifano and Perez-Moreno, 2012)

Les hémidesmosomes sont localisés au pôle basal des cellules épithéliales. Il existe deux types d'hémidesmosome, le type I exprimée dans les épithéliums pseudo-stratifiés et stratifiés comme la peau, et le type II exprimé dans les épithéliums simples tels que l'intestin.

### 2.2.1 Les composants de la plaque externe

La plaque externe est constituée de l'intégrine  $\alpha6\beta4$ , CD151 et BP180. L'intégrine  $\alpha6\beta4$  est l'unique intégrine impliquée dans cette jonction, contrairement aux adhésions focales dans lesquelles peuvent intervenir plusieurs intégrines. Dans l'intestin par exemple, la sous-unité  $\alpha6$  interagit préférentiellement avec la sous-unité  $\beta4$  mais peut également interagir avec la sous-unité  $\beta1$ . A l'inverse, la sous-unité  $\beta4$  interagit uniquement avec la sous-unité  $\alpha6$ . La sous-unité  $\beta4$  possède la particularité, contrairement aux autres sous-unités  $\beta$ , d'avoir un domaine cytoplasmique relativement long, lui permettant d'interagir avec un grand nombre de protéines. Son domaine extracellulaire, plus court, est plutôt impliqué dans l'interaction avec le ligand et joue un rôle structural. La chaîne  $\alpha6$  quant à elle, possède un domaine cytoplasmique très court et un domaine extracellulaire relativement long. Les deux chaînes d'intégrine sont indispensables à la formation de l'hémidesmosome car l'inactivation d'une

de ces chaînes conduit à la perte de cette jonction d'ancrage (Georges-Labouesse et al., 1996; van der Neut et al., 1996).

BP180 (ou BPAG2) est une protéine transmembranaire présente dans les hémidesmosomes de type I. Elle est capable d'interagir par son domaine intracellulaire avec la protéine BP230, la plectine et la sous-unité  $\beta 4$  (Koster et al., 2003).

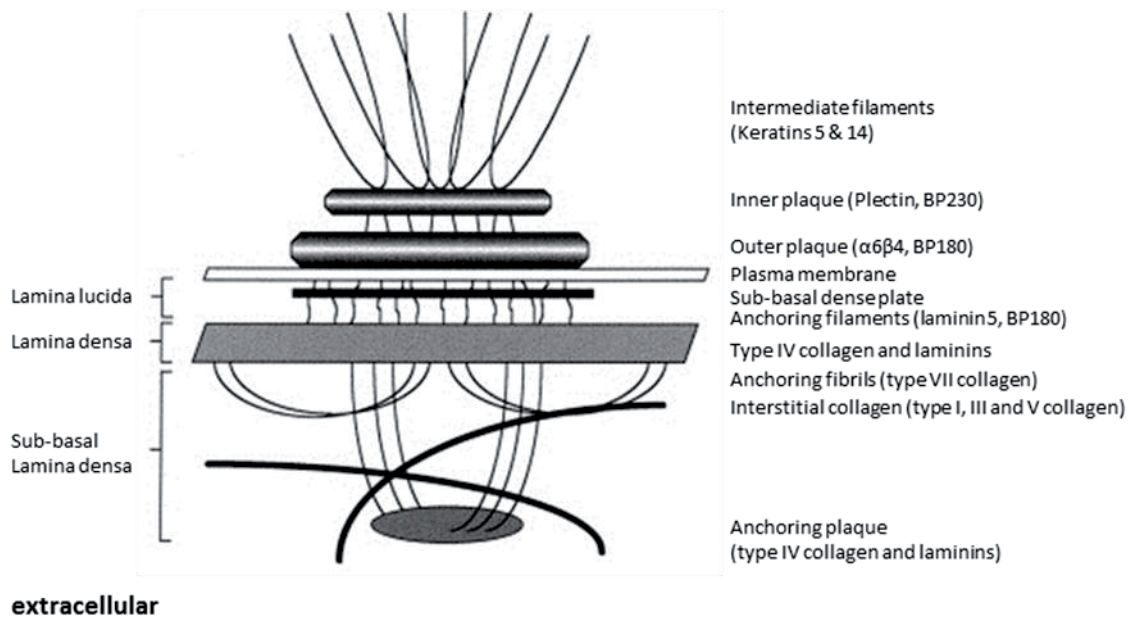
CD151 est une protéine transmembranaire appartenant à la famille des tétraspanns présente dans l'hémidesmosome de type I. Elle possède quatre domaines hydrophobes transmembranaires, deux petits domaines extracellulaires et cytoplasmiques. Au sein de l'hémidesmosome elle interagit essentiellement avec la sous-unité  $\alpha 6$ .

### **2.2.2 Les composants de la plaque interne**

La plaque interne est constituée de la plectine et de la protéine BP230 (ou BPAG1), elle permet de relier les filaments intermédiaires à la plaque externe. La plectine qui est un constituant majeur de l'hémidesmosome, est une protéine volumineuse de 500 kDa appartenant à la famille des plakines. Les plakines représentent un ensemble de protéines qui connectent le cytosquelette à la membrane cytoplasmique ; elles sont capables d'interagir avec les filaments intermédiaires, les filaments d'actine et les microtubules (Wiche, 1998). La plectine peut également être localisée dans les adhésions focales (Seifert et al., 1992; Wiche et al., 1984). Dans l'hémidesmosome, la plectine en se fixant à la sous-unité  $\beta 4$  permet la stabilisation de la structure et l'ancrage des filaments de kératines.

BP230 est une protéine appartenant aussi à la famille des plakines. Par son domaine amino-terminal, elle interagit avec la chaîne  $\beta 4$ , et par son domaine carboxy-terminal, elle se lie aux filaments intermédiaires.

## Intracellular



## extracellular

**Figure 6:** Représentation schématique de l'hémidesmosome et de la lame basale. Extrait de (Nievers et al., 1999)

L'interaction entre les filaments intermédiaires et l'hémidesmosome est assurée par la plaque interne. Au niveau extracellulaire, l'interaction avec la lame basale est assurée par les filaments d'ancrage qui sont constitués par la laminine 332 et BP180. Ces filaments d'ancrage partent de la plaque sous-basale et traversent la lamina lucida pour se lier aux fibrilles d'ancrage dans la lamina densa. La lame basale est essentiellement constituée de laminines et de collagènes.

### 2.2.3 Les ligands de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$

L'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  est un récepteur de laminines, son principal ligand étant la laminine 332 (ou laminine 5) (Fig. 6). Les laminines sont des glycoprotéines hétérotrimériques constituées de chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Chez les mammifères, il existe 5 chaînes  $\alpha$ , 3 chaînes  $\beta$  et 3 chaînes  $\gamma$  qui peuvent s'associer pour former 15 trimères différents (Durbeej, 2010; Hamill et al., 2009). Les laminines sont nommées suivant les chaînes qui les constituent, par exemple la laminine 332 est constituée des chaînes  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  et  $\gamma 2$ . Cependant, elle est souvent citée d'après l'ancienne nomenclature sous le nom de laminine 5.

## 3. Régulation des fonctions cellulaires par l'hémidesmosome

L'hémidesmosome est une structure d'adhérence qui permet l'ancrage des cellules épithéliales à la lame basale sous-jacente. En plus d'assurer la solidité mécanique du tissu,

l'hémidesmosome peut réguler certaines fonctions biologiques, notamment par sa capacité à interagir avec la matrice extracellulaire et avec plusieurs voies de signalisation. En effet, les intégrines, même si elles ne possèdent pas d'activité catalytique intrinsèque, font partie des rares récepteurs à émettre des signaux de manière bidirectionnelle. Nous parlons de signal « inside-out » lorsque le signal émis de l'intérieur de la cellule module l'affinité de l'intégrine pour son ligand, et de signal « outside-in » lorsque le stimulus provient de la liaison de l'intégrine à son ligand afin de moduler des processus intracellulaires (Bouvard et al., 2013; Harburger and Calderwood, 2009; Hynes, 2002). Je vais passer en revue certaines des fonctions biologiques pouvant impliquer l'hémidesmosome.

### 3.1 Rôle de l'hémidesmosome dans la survie cellulaire

Dans les tissus épithéliaux l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire est essentiel à leur maintien en vie. En effet, un défaut dans ces jonctions d'ancrage peut conduire à l'activation de l'anoïkose, une forme spécifique d'apoptose due à la perte de l'interaction entre la cellule et la matrice extracellulaire (Frisch and Francis, 1994). La plupart des intégrines qui se regroupent pour former les adhésions focales, ont, au niveau de leur sous-unité  $\beta$ , qui est souvent  $\beta 1$ , un domaine de fixation de la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase). FAK est une kinase qui peut jouer un rôle de protéine adaptatrice recrutant au niveau des intégrines de nombreuses protéines impliquées dans des cascades de signalisation. Les voies de signalisation PI3K/Akt et Ras/MEK/ERK sont les principales voies par lesquelles les intégrines maintiennent la survie cellulaire (Gilcrease, 2007) (Reginato et al., 2003). Le signal est essentiellement transmis à travers la protéine FAK. L'intégrine  $\alpha 6 \beta 4$  ne se lie pas directement aux protéines FAK et PI3K, mais peut cependant activer la voie de signalisation PI3K/Akt par un mécanisme impliquant les protéines IRS-1 et IRS-2, et interagir avec la voie du récepteur à l'EGF (Shaw, 2001).

### 3.2 Rôle de l'hémidesmosome dans la prolifération

La liaison des intégrines à leur ligand est essentielle à l'activation de la croissance cellulaire. Les coopérations existant entre certaines intégrines et les récepteurs à l'EGF, ErbB2 et c-MET

permettent aux intégrines de moduler la prolifération (Gilcrease, 2007). L'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  peut se lier, grâce à sa sous-unité  $\beta 4$ , à la protéine Shc, qui une fois phosphorylée va se lier au complexe Grb2-SOS qui va activer la voie Ras-Erk (Mariotti et al., 2001). D'autres modifications post-transcriptionnelles de la chaîne  $\beta 4$  peuvent conduire à l'activation de la protéine Src qui à son tour va favoriser l'activation de la voie Ras-Erk (Gagnoux-Palacios et al., 2003). L'activation de la voie des MAPKs stimule en règle générale la prolifération.

### 3.3 Rôle de l'hémidesmosome dans la migration cellulaire

Le processus de migration peut être subdivisé en quatre étapes : l'extension des lamellipodes dans le sens de la migration, la formation de nouveaux points d'ancrage, la contraction du corps cellulaire et le détachement d'une partie de la cellule à l'arrière du front de migration. Cette suite d'évènements fait intervenir à la fois le remodelage de la matrice extracellulaire, des intégrines et du cytosquelette. Par exemple, il a été montré dans des lignées cellulaires que la migration stimulée par le facteur EGF induit une relocalisation de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  au niveau du front de migration, et ceci par un mécanisme qui implique la protéine kinase C- $\alpha$  (Rabinovitz et al., 1999) (Fig. 7).

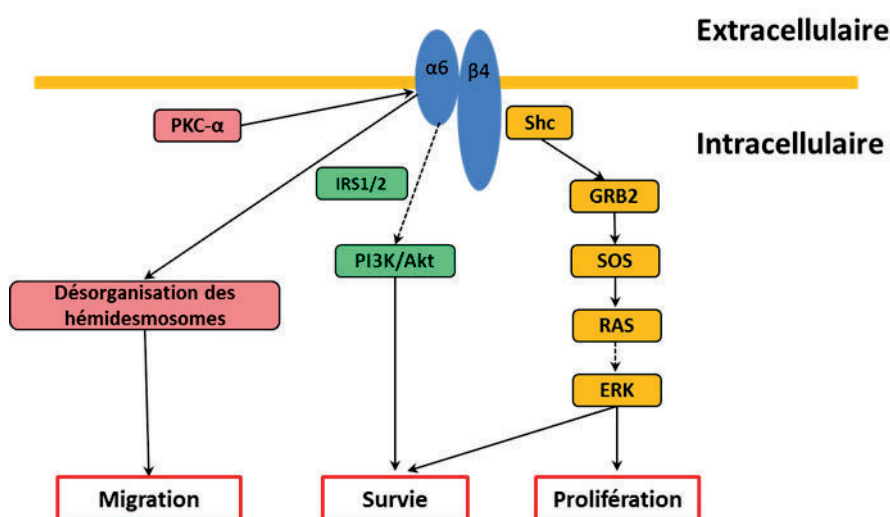


Figure 7: Exemples de voies de signalisation régulées par l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$

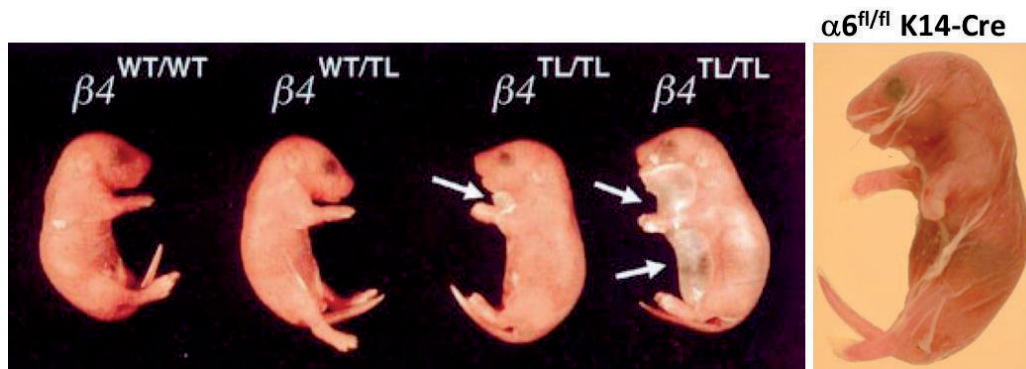
## 4. Répertoire des intégrines et laminines exprimées dans l'intestin.



L'épithélium intestinal forme une barrière physique qui protège le corps de quelques 10 milliards de micro-organismes constituant la flore intestinale. Cette flore intestinale, dite commensale, survit en parfaite harmonie avec l'organisme et interagit avec l'épithélium intestinal. L'intestin, constitué d'un épithélium simple, est un très bon modèle d'étude de l'interaction entre les intégrines, la matrice extracellulaire et le microenvironnement. En effet, la muqueuse intestinale est organisée en compartiments bien définis dans lesquels les fonctions cellulaires telles que prolifération et différenciation ainsi que les interactions cellules/matrice qui les régissent sont clairement séparées. L'épithélium intestinal peut être grossièrement divisé en deux parties : les cryptes qui contiennent les cellules souches et les cellules progénitrices, et les villosités qui comportent les cellules différenciées. Les cellules des cryptes assurent le renouvellement de l'épithélium intestinal et les cellules différenciées des villosités assurent les fonctions d'absorption et de sécrétion de l'intestin. Dans chacun de ces compartiments, les cellules expriment un répertoire d'intégrines spécifique, défini par la nature des ligands présents dans la matrice extracellulaire. Les différents couples intégrines/ligand mis en jeu sont à l'origine de réponses cellulaires différentes. La membrane basale sur laquelle adhèrent les cellules épithéliales est composée essentiellement de collagène de type IV, de laminines et de protéoglycanes (Fig. 6). Le patron d'expression des intégrines et des laminines n'est pas le même dans l'ensemble de l'épithélium; par exemple, les intégrines  $\alpha 2\beta 1$  et  $\alpha 7\beta 1$  sont préférentiellement exprimées dans les cellules en prolifération de la crypte et dans les cellules nouvellement différenciées (Beaulieu, 1992; Beaulieu et al., 1993). Dans l'intestin adulte, certaines laminines peuvent être classées en tant que marqueurs de la membrane basale des cellules de la crypte telles que les laminines 111 et 211 ou en tant que marqueurs des cellules des villosités telles que les laminines 332 et 511 (Simon-Assmann et al., 2010; Teller et al., 2007). Cette organisation et cette distribution sont essentielles à l'homéostasie et au bon fonctionnement de l'intestin. Des défauts d'expression de certains composants de la lame basale peuvent conduire à de graves pathologies (Kruegel and Miosge, 2010), ce qui démontre le rôle majeur que jouent les interactions de la cellule avec la matrice extracellulaire.

## 5. Pathologie ou phénotype associé à la perte de l'hémidesmosome

Comme on a pu le voir, l'hémidesmosome est une jonction d'ancrage qui permet l'interaction entre les kératines et la matrice extracellulaire, en particulier les laminines. L'hémidesmosome est une structure stable qui permet de maintenir attachées physiquement les cellules épithéliales à la lame basale et leur confère ainsi une résistance au stress mécanique. Cette structure multiprotéique est essentielle au maintien de l'intégrité tissulaire. Dans les modèles murins, l'inactivation des gènes codant pour les sous-unités d'intégrine  $\alpha 6$  et  $\beta 4$ , ou pour la plectine entraîne une létalité périnatale (Andrä et al., 1997; van der Neut et al., 1996)(Georges-Labouesse et al., 1996)(Murgia et al., 1998) (Fig. 8). Ces souris présentent un détachement de la peau et plusieurs défauts dans les autres tissus. Dans la peau, les deux types d'hémidesmosome I et II sont présents et exprimés au pôle basal des cellules de la couche basale de l'épiderme où ils forment un complexe d'ancrage entre le derme et l'épiderme. Chez l'homme, une dizaine de mutations dans des gènes codant pour les membres ou partenaires de l'hémidesmosome ont été caractérisées et sont responsables d'une maladie rare qui est l'épidermolyse bulleuse (Nievers et al., 1999; Sawamura et al., 2010). Cette maladie génétique est associée à une forte fragilité de la peau qui devient plus sensible aux frottements mécaniques. Les personnes atteintes de cette maladie présentent des détachements localisés de l'épiderme dus à cette fragilité et aux tensions mécaniques pouvant être subies. Chez la souris, l'inactivation ciblée de la sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$  dans la couche basale des cellules de l'épiderme conduit à des détachements localisés de la peau mais également à une inflammation chronique associée à une hyperprolifération des kératinocytes (Niculescu et al., 2011)(Georges-Labouesse et al., 1996). La perte chez la souris de la kératine 8, une des kératines associées à l'hémidesmosome dans l'épithélium intestinal, entraîne le développement d'une colite ou une hyperplasie des cellules de l'épithélium intestinal en fonction du fond génétique des souris mutantes (Habtezion et al., 2005).



**Figure 8: Perte de l'intégrine  $\alpha6\beta4$  et épidermolyse bulleuse. Adaptée de (Murgia et al., 1998)**

La perte de l'intégrine  $\alpha6\beta4$  chez les souris conduit à un phénotype semblable à l'épidermolyse bulleuse. Détachement sévère de l'épiderme chez les souris déficientes pour la sous-unité  $\beta4$  (A) et la sous-unité  $\alpha6$  (B)

## 6. Dérégulation de l'hémidesmosome dans les cancers

Les intégrines affectent de nombreuses voies de signalisation à différents stades de la progression tumorale. Le rôle de l'intégrine  $\alpha6\beta4$  dans la carcinogenèse reste controversé. L'intégrine  $\alpha6\beta4$  est en effet surexprimée dans certains cancers où elle jouerait un rôle pro-tumoral, alors qu'elle est sous-exprimée dans d'autres cancers où elle aurait une fonction anti-tumorale (Raymond et al., 2007). Cette dualité pourrait s'expliquer par l'aptitude de l'intégrine  $\alpha6\beta4$  à affecter différentes voies de signalisation. En effet, l'inactivation de l'intégrine  $\beta4$  dans des cellules initiatrices de tumeurs, déficientes en Smad4 et P53, augmente leur capacité à proliférer, suggérant que l'intégrine  $\alpha6\beta4$  joue un rôle anti-tumoral. Cependant, lorsque ces cellules sont transformées par la protéine Ras, l'intégrine  $\alpha6\beta4$  stimule la croissance tumorale (Raymond et al., 2007). Dans le cancer du sein, l'intégrine  $\beta4$  amplifie la voie Erb2 et favorise la croissance tumorale (Guo et al., 2006). Cette complexité est d'autant plus grande que certaines études effectuées dans des modèles d'invertébrés, en particulier chez *C.elegans*, ont pu montrer que l'équivalent de l'hémidesmosome se comporte comme un récepteur mécanotransducteur, traduisant les tensions mécaniques en signaux moléculaires (Zhang et al., 2011).

# LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN

## 1. Introduction sur l'histologie de l'intestin

L'intestin fait partie intégrante de l'appareil digestif, il assure l'absorption des nutriments et de l'eau dans le sang. Il s'étend de l'estomac à l'anus et peut être subdivisé en deux parties : l'intestin grêle, comportant le duodénum, le jéjunum et l'iléon, et le gros intestin constitué du cæcum, du côlon, du rectum et du canal anal (Burkitt, 1993). L'intestin comporte quatre couches fonctionnellement distinctes :

a) **La muqueuse** qui histologiquement peut être subdivisée en trois parties :

- **l'épithélium simple tubulaire** qui est une fine couche de cellules épithéliales tapissant l'ensemble de l'intestin. Il assure par son pôle apical le contact avec la lumière intestinale et par son pôle basal repose sur la lame basale qui le sépare du tissu conjonctif de soutien appelé lamina propria.

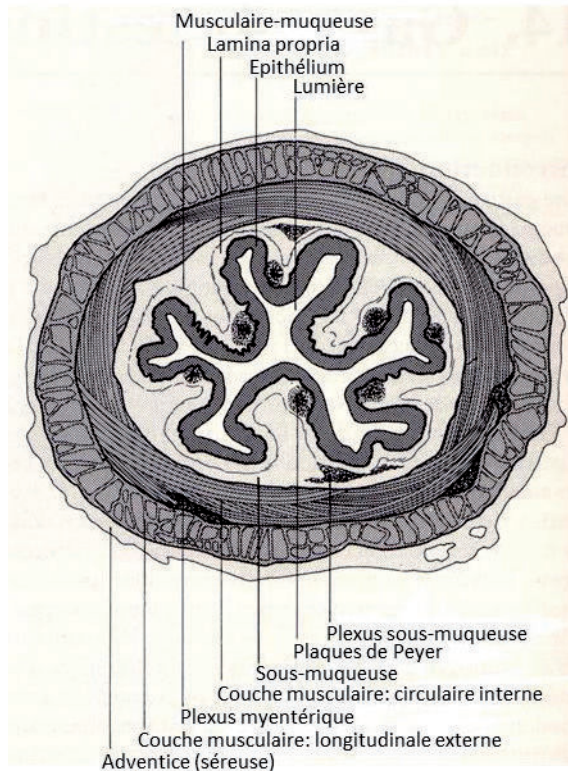
- **la lamina propria** dans l'intestin assure plusieurs fonctions notamment mécanique en soutenant l'épithélium, défensive (c'est dans cette couche que résident de nombreuses sous-populations inflammatoires et fibroblastiques), et finalement nutritive en assurant la transition des nutriments de l'épithélium vers le sang.

- **la muscularis mucosae** est une strate musculaire qui assure les mouvements locaux et le repliement de l'épithélium intestinal.

b) **La sous-muqueuse** constituée du tissu conjonctif comporte les principaux vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les plexus nerveux.

c) **La couche musculaire** composée de deux strates de tissus musculaires lisses : circulaire interne et longitudinale externe. Cette couche musculaire assure la contraction péristaltique de l'intestin.

d) **L'adventice**, qui tapisse la tunique externe de l'intestin, est constituée par un tissu conjonctif lâche qui rend l'intestin solidaire des organes voisins. (Fig. 9)

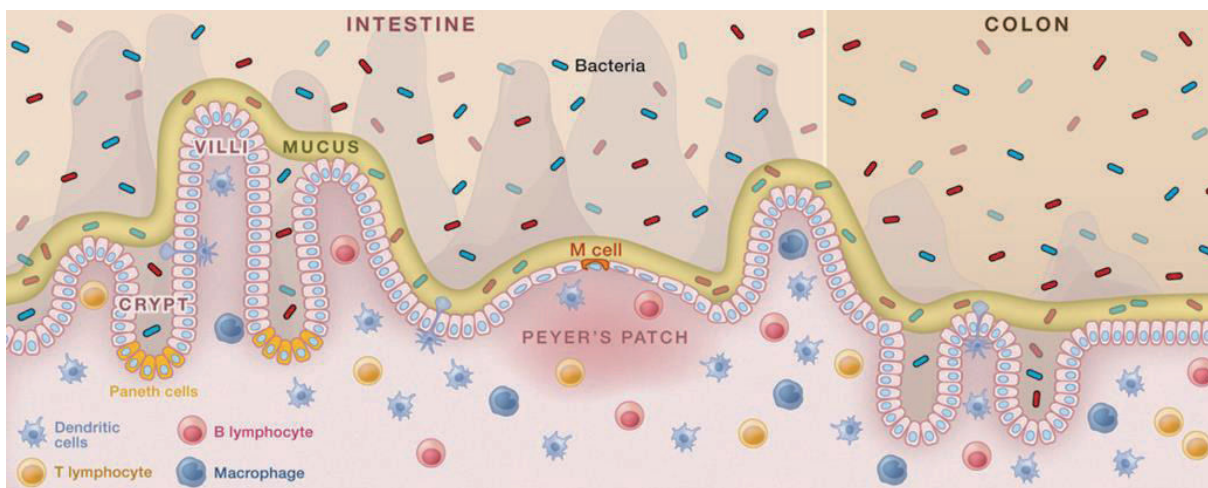


**Figure 9:** Structure de la paroi du tractus gastro-intestinal. Extrait de (Burkitt, 1993)

## 2. Introduction générale sur l'inflammation

L'épithélium intestinal protège le reste du corps de quelques 10 milliards de micro-organismes qui vivent normalement en parfaite symbiose dans l'intestin. Cette protection ou barrière naturelle est assurée à trois niveaux : physique, en traçant une frontière imperméable aux micro-organismes, chimique en sécrétant des molécules protectrices telles que les mucines ou peptides antibactériens et finalement immunitaire en assurant l'activation de la réponse immunitaire (Zouiten-Mekki et al., 2013). Une fois cette barrière rompue l'organisme active le système immunitaire inné puis adaptatif afin d'éliminer toute infection. L'épithélium de l'intestin est majoritairement composé de quatre types cellulaires

différenciés : les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules de Paneth et les cellules endocrines. Les entérocytes sont les plus abondants dans l'épithélium, ce sont des cellules cylindriques et polarisées qui possèdent une structure en bordure en brosse à leur pôle apical. Ils assurent la principale fonction de l'intestin qui est l'absorption d'électrolytes, des nutriments et de l'eau. Les cellules caliciformes renferment des granules intracellulaires qui contiennent essentiellement des glycoprotéines, les mucines, composants majoritaires du mucus. Le mucus permet de lubrifier et de protéger l'épithélium contre les agressions mécaniques, chimiques ou infectieuses. Les cellules de Paneth sont situées au fond des cryptes uniquement dans l'intestin grêle, elles approvisionnent l'épithélium en substances anti-microbiennes telles que les défensines. Les cellules endocrines libèrent quant à elles des hormones qui peuvent intervenir dans la motricité (Zouiten-Mekki et al., 2013)(Garrett et al., 2010) (Fig. 10).



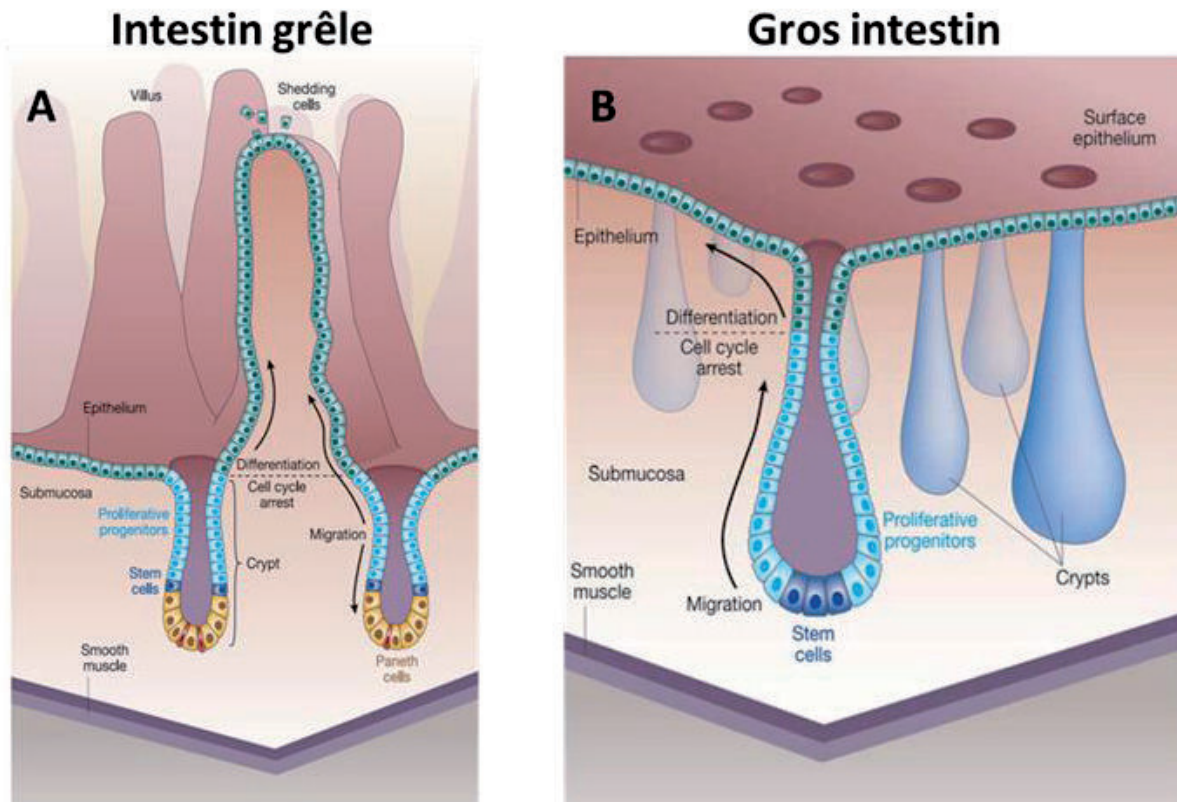
**Figure 10: Vue d'ensemble de l'épithélium intestinal. Extrait de (Garrett et al., 2010)**

L'épithélium intestinal forme avec le mucus une barrière physique qui protège l'organisme des micro-organismes présents dans la lumière intestinale. La lamina propria contient différentes populations inflammatoires qui assurent une barrière immunitaire qui protège l'hôte. Certaines de ces sous-populations comme les cellules dendritiques et les lymphocytes T peuvent être intra-épithéliales. Au niveau structural, l'intestin grêle possède des villosités relativement longues par rapport au gros intestin. De plus, certaines populations cellulaires telles que les cellules M ou les cellules de Paneth sont présentes dans l'intestin grêle et n'existent pas dans le gros intestin.

## 2.1 Barrière naturelle

### 2.1.1 Barrière physique

Cette barrière est assurée par les cellules épithéliales qui en se liant les unes aux autres grâce à des jonctions intercellulaires, forment une monocouche de cellules parfaitement compacte et imperméable. De plus, au niveau basal, les cellules sont ancrées à la lame basale grâce aux adhésions focales et aux hémidesmosomes qui assurent la solidité de la barrière et son interaction avec la lamina propria sous-jacente. L'épithélium intestinal est très dynamique et se renouvelle continuellement. Les cellules souches présentes dans les cryptes des glandes se divisent de manière asymétrique pour donner naissance aux cellules progénitrices. Ces cellules progénitrices se multiplient et se différencient progressivement en migrant vers la lumière intestinale, à l'exception des cellules de Paneth qui restent confinées à la base des cryptes. Une fois que les cellules épithéliales atteignent le sommet de la villosité, elles sont éliminées par apoptose et éjectées dans la lumière (Reya and Clevers, 2005)(Fig. 11). Cette capacité de renouvellement confère à l'organisme une protection contre les agressions chimiques ou physiques. En effet, lors d'une ulcération ou d'une érosion du tissu, l'épithélium intestinal a une remarquable capacité à se régénérer en stimulant la migration et la croissance des cellules épithéliales (Laukoetter et al., 2008). Cette propriété est essentielle à l'homéostasie intestinale. Des études récentes réalisées chez la souris ont montré que la diminution de la vitesse de régénération augmente la susceptibilité à développer une inflammation chronique (Normand et al., 2011)(Lopetuso et al., 2012). Lors d'une blessure, l'épithélium intestinal recouvre rapidement la brèche afin d'éviter toute translocation de micro-organismes ; plus le temps de recouvrement est grand, plus l'exposition aux micro-organismes est grande. Cette étanchéité de l'épithélium est également primordiale pour le maintien de l'homéostasie de l'intestin, elle est assurée par des complexes de jonctions intercellulaires qui contrôlent les diffusions à travers cette barrière physique.



**Figure 11:** Structure anatomique des glandes de l'intestin grêle et du gros intestin. Extrait de (Reya and Clevers, 2005)

(A) l'intestin grêle contient des cellules souches positionnées juste au-dessus des cellules de Paneth, présentes au fond des cryptes. La partie supérieure des cryptes contient les cellules progénitrices qui prolifèrent et migrent progressivement vers les villosités et vers le fond des cryptes pour se différencier.

(B) Dans le gros intestin les cellules sont au fond des cryptes et donnent naissance aux cellules progénitrices qui occupent les 2/3 des glandes. Les cellules migrent vers le haut et se différencient progressivement. Les cellules différenciées occupent le 1/3 supérieur des glandes ainsi que la surface luminale de l'épithélium.

### 2.1.1.1 Les jonctions intercellulaires

Les jonctions intercellulaires adoptent une organisation bien précise et sont composées par les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes (Laukoetter et al., 2006) (Fig. 12).

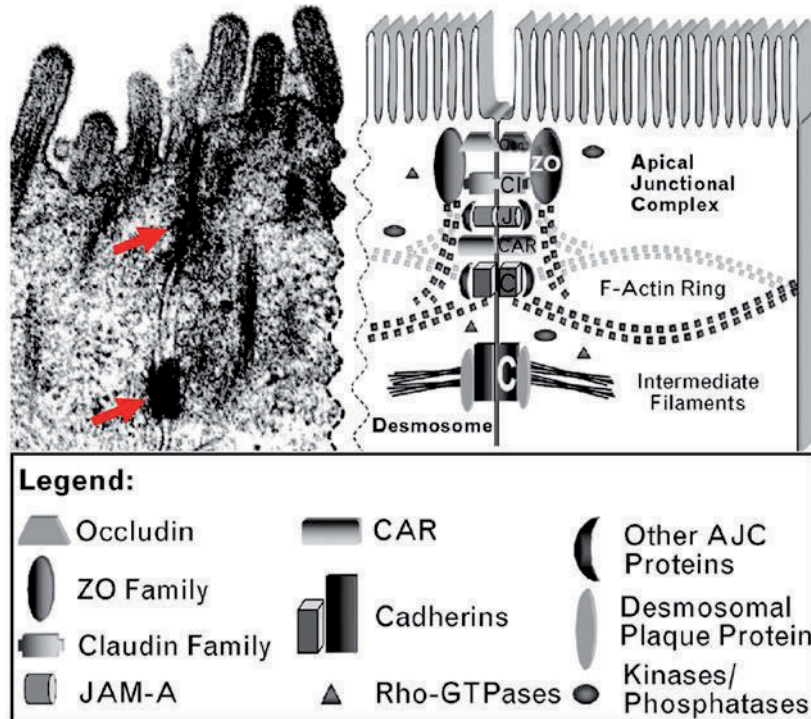
- **Les jonctions serrées** sont des complexes multiprotéiques localisés à l'extrémité apicale des contacts intercellulaires, elles jouent un rôle dans la polarité cellulaire et dans la régulation de la perméabilité. Les jonctions serrées sont également appelées *zonula occludens* car elles forment un anneau entourant le pourtour de la cellule et permettent une occlusion complète de l'espace intercellulaire (Zouiten-Mekki et al., 2013). Leur fonction



principale dans l'intestin est de réguler le transport de l'eau et des électrolytes, et de restreindre la diffusion de lipides et protéines à travers la membrane plasmique entre les pôles apical et baso-latéral (Laukoetter et al., 2008). Des altérations de la structure des jonctions serrées et de la perméabilité sont observées dans les MICI. Certains pathogènes et bactéries modulent ces jonctions serrées afin d'influencer la perméabilité (Clayburgh et al., 2004)(Berkes et al., 2003; Fasano and Nataro, 2004; Fasano et al., 1991). La dérégulation des jonctions serrées est également observée dans les cellules cancéreuses et est impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Oku et al., 2006; Usami et al., 2006; Wang et al., 2005).

- **les jonctions adhérentes** qui se trouvent juste en dessous des jonctions serrées, forment une ceinture continue de contacts intercellulaires. Elles maintiennent l'adhésion des cellules entre elles et jouent un rôle de signalisation via les protéines qui leur sont associées en particulier la protéine E-cadherine, la  $\beta$ -caténine et l' $\alpha$ -caténine, et se lient au cytosquelette, plus particulièrement aux filaments d'actine (Laukoetter et al., 2008; Zouiten-Mekki et al., 2013).

- **les desmosomes** sont des jonctions d'adhésion cellule-cellule, ils sont localisés en dessous des jonctions adhérentes et se lient par leur domaine intracellulaire aux cytokératines. Ils jouent un rôle essentiellement mécanique en aidant l'épithélium à résister aux forces de cisaillements.



**Figure 12: Organisation des jonctions intercellulaires. Extrait de (Laukoetter et al., 2008)**

(A) Image de microscopie électronique à transmission où l'on distingue des structures denses aux électrons qui correspondent aux jonctions intercellulaires (flèches rouges)

(B) Représentation schématique des différents complexes des jonctions cellule-cellule.

### 2.1.1.2 Les jonctions d'ancrage du pôle basal

Les jonctions d'ancrage du pôle basal, impliquant majoritairement les intégrines, jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie et le maintien de la structure de l'épithélium. Comme on a pu le voir dans le chapitre 1, les intégrines renforcent la barrière physique en maintenant liées les cellules à leur lame basale et en modulant le cytosquelette.

### 2.1.1.3 Le mucus

Le mucus tapisse l'ensemble de la face luminale de l'épithélium intestinal et constitue la première ligne de défense contre les micro-organismes. Les mucines sont de larges protéines fortement glycosylées et sont les principaux composants du mucus. Dans le compartiment colorectal, il existe deux couches de mucus: la couche interne dense et insoluble dans l'eau, adhérant à la muqueuse, et une couche externe moins dense, visqueuse hydrosoluble qui recouvre la couche interne. Chaque mucine contient au moins un domaine qui lui attribue des propriétés spécifiques, certaines mucines pouvant être transmembranaires et d'autres

sécrétées, ces dernières entrant dans la composition du gel formant le mucus. Les cellules épithéliales expriment à leur pôle apical les mucines transmembranaires qui sont probablement responsables de la formation du glycocalyx qui assure la fixation de la couche interne de mucus (Johansson et al., 2013). Les cellules de Goblet ou caliciformes vont assurer la production du gel de mucus, contenu dans des granules de sécrétion. Dans l'intestin, ces granules sont majoritairement constitués par la mucine 2 ou MUC2 (Tableau 1). Ces granules, une fois sécrétés, vont venir se fixer au glycocalyx pour former la couche interne de mucus dense et imperméable aux bactéries.

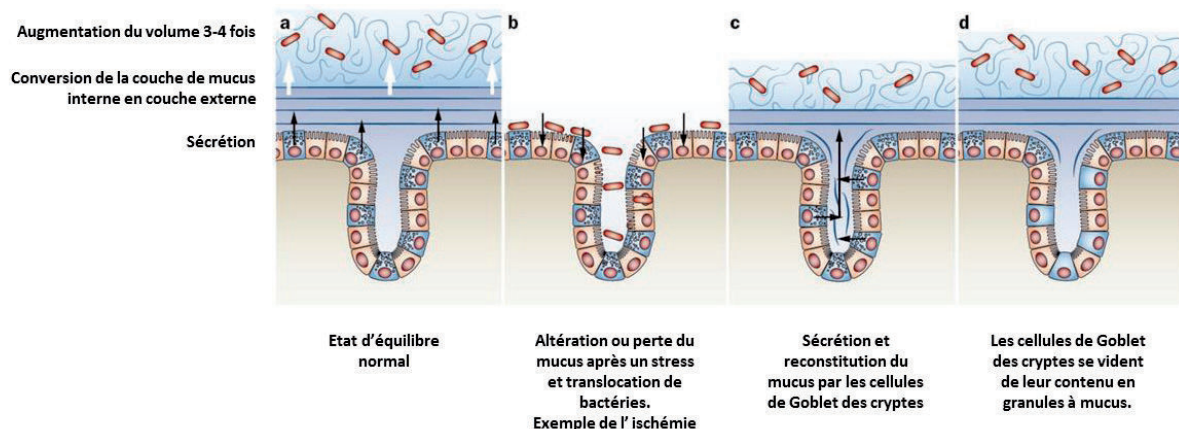
La face supérieure de cette couche interne va progressivement se convertir pour former la couche externe du mucus. Cependant, même si la composition des couches interne et externe paraît identique leurs propriétés sont différentes, la couche externe est moins dense, perd son ancrage aux cellules épithéliales et contient des sites spécifiques de fixation des bactéries au niveau des chaînes glycaniques (Zouiten-Mekki et al., 2013). Les mécanismes exacts de conversion de la couche interne en couche externe restent très peu connus, néanmoins ils apparaissent comme étant dépendants de l'organisme et non des bactéries car cette couche externe existe chez les souris axéniques (Johansson et al., 2008). Par ailleurs, la prise de volume et la diminution de la densité sont probablement dues à des protéases qui viennent fragmenter les mucines (Johansson et al., 2008, 2013). La couche externe du mucus constitue un habitat pour de nombreuses bactéries commensales ; de cette manière, elle joue un rôle dans la protection de la muqueuse intestinale vis-à-vis des micro-organismes pathogènes. En effet, l'épithélium favorise la formation d'un mucus adéquate à la fixation et à la croissance de bactéries commensales, saturant ainsi les sites de fixation et empêchant la fixation d'autres germes potentiellement pathogènes (Zouiten-Mekki et al., 2013). Certaines bactéries et parasites pathogènes sécrètent des protéases qui clivent les mucines et dissolvent ainsi le mucus. De plus, l'inactivation du gène codant pour la mucine 2 dans l'épithélium intestinal chez la souris conduit au développement d'une inflammation chronique de l'intestin qui peut mener dans certains cas au développement de cancers (Van der Sluis et al., 2006)(Velcich et al., 2002). Le renouvellement et le maintien de la couche interne sont assurés par les cellules de Goblet présentes dans la partie luminale de l'épithélium. Lorsque le tissu subit un stress ou une lésion, les cellules de Goblet des cryptes

vont vider leur contenu en mucus afin de renouveler la couche interne (Fig. 13) (Johansson et al., 2013).

Mucus	Section of gastrointestinal tract			
	Mouth	Stomach	Small intestine	Large intestine
Mucus layers	None	Outer, unattached layer Inner, attached layer	Single, unattached layer	Outer, unattached layer Inner, attached layer
Gel-forming mucins:				
Surface/crypt	NF	MUC5AC	MUC2	MUC2 (MUC5B)
Gland	MUC5B	MUC6	MUC6	NF
Paneth cells	NA	NA	MUC2	NA
Transmembrane mucins:				
Epithelial cells	MUC1, MUC16	MUC1	MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC17	MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC17
Secreted mucins	MUC7	NF	NF	NF

Abbreviations: NA, not applicable; NF, not found.

**Tableau 1.** Patron d'expression et sécrétion des mucines dans le tractus gastro-intestinal. Extrait de (Johansson et al., 2013)



**Figure 13.** Mécanismes de régulation et sécrétion du mucus après induction d'un stress. Exemple de l'ischémie. Extrait de (Johansson et al., 2013)

(a) A l'état d'équilibre normal, la couche interne de mucus est produite par les cellules de Goblet de la surface luminale de l'épithélium. La couche interne se convertit en couche externe continuellement.

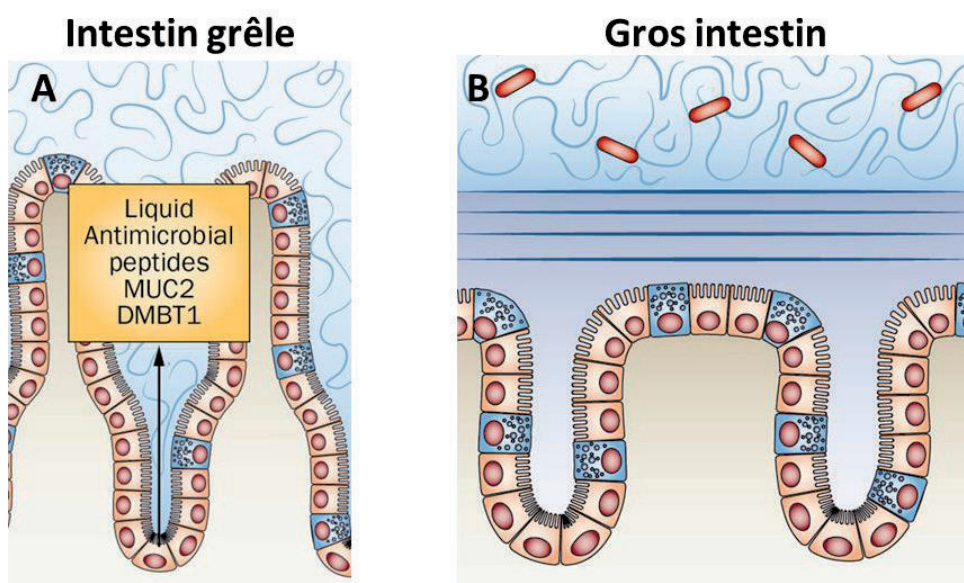
(b) Après induction d'un stress sur le tissu, en l'occurrence l'induction d'une ischémie, on a une perte ou une altération du mucus. Cette altération conduit à la translocation des bactéries.

(c) Une fois les conditions de stress retirées, en l'occurrence en perfusant, les cellules de Goblet des cryptes sécrètent leur contenu en mucus afin de reconstituer la couche interne puis la couche externe de mucus.

(d) Plusieurs heures après, les cellules de Goblet des cryptes se retrouvent sans granules de mucus et le tissu est plus vulnérable aux lésions.

### 2.1.2 Barrière chimique

En plus d'une barrière physique, l'épithélium intestinal va libérer toute une batterie de molécules qui vont réguler les différentes populations microbiennes et protéger l'organisme contre les infections. Le mucus contient plusieurs molécules telles que des immunoglobulines A (sécrétées par les plasmocytes intra-épithéliaux), du lysozyme, des défensines et des peptides anti-microbiens, il contribue ainsi à la protection anti-microbienne non spécifique (Zouiten-Mekki et al., 2013). La sécrétion de ces molécules anti-microbiennes est essentiellement assurée par les cellules de Paneth présentes dans l'iléon, elle contribue au maintien de l'homéostasie intestinale (Fig. 14). En effet, certaines études suggèrent que le dysfonctionnement des cellules de Paneth dans l'iléon peut conduire à une inflammation chronique du côlon (Adolph et al., 2013; Alenghat et al., 2013; Welz et al., 2011). La synthèse de ces molécules est soit constitutive, soit induite par certains produits bactériens comme le LPS (lipopolysaccharide) ou certaines cytokines telles que IL-1 $\beta$  ou TNF (Zouiten-Mekki et al., 2013).



**Figure 14:** Organisations différentes de la barrière chimique et du mucus dans l'intestin grêle et le gros intestin. Adaptée de (Johansson et al., 2013)

**(A)** L'intestin grêle possède une couche de mucus qui n'est pas ancrée aux cellules épithéliales. Cependant, grâce à la présence des cellules de Paneth dans ses cryptes, l'intestin grêle a une barrière chimique très active. Les cellules de Paneth sécrètent de nombreuses molécules et peptides anti-microbiens.

**(B)** Le gros intestin ne possède pas une activité anti-microbienne intense mais son mucus est constitué de deux couches dont l'une est ancrée aux cellules épithéliales. La composition du mucus et les molécules qu'il comporte sont essentielles au maintien d'un équilibre entre la flore commensale et les micro-organismes pathogènes.

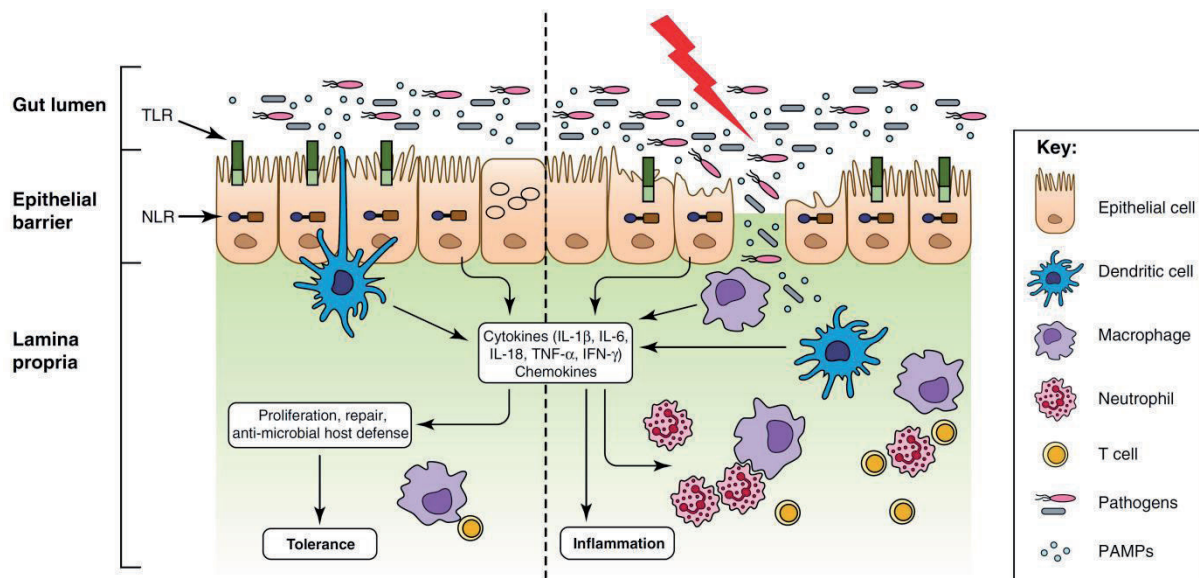
### 2.1.3 Barrière immunitaire

La capacité de l'épithélium intestinal à coexister et à reconnaître les micro-organismes de la flore commensale par rapport aux pathogènes, repose sur une régulation complexe de son immunité. Les interactions et les échanges entre la flore intestinale et l'organisme sont primordiaux pour le maintien de l'homéostasie (Garrett et al., 2010; Harrington, 2011). Les cellules épithéliales possèdent des moyens de communication avec la flore intestinale notamment à travers les récepteurs PRR (pattern recognition receptor) qui sont représentés par les TLR (Toll-like receptor) et les NOD (nucleotide binding oligomerization) (Zouiten-Mekki et al., 2013)(Harrison and Maloy, 2011). Ces récepteurs peuvent initier la réponse immunitaire innée et adaptative, en réponse à une infection, en activant la voie pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B. Ces voies de signalisation peuvent conduire à la production de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et stimulent la production de l'immunoglobuline A par les cellules B (Cario, 2010). Il existe d'autres systèmes de régulation de l'immunité, plus particulièrement dans l'iléon, où l'on retrouve des plaques de Peyer. Les plaques de Peyer sont des agrégats de follicules lymphoïdes composés en grande partie de lymphocytes B et de lymphocytes T. Il existe, au niveau de l'épithélium qui recouvre les plaques de Peyer, des cellules épithéliales particulières, appelées cellules M (microfold cells). Les cellules M possèdent une activité d'endocytose qui leur permet de capturer des antigènes de la lumière intestinale et de les présenter ensuite aux cellules dendritiques qui les présentent aux lymphocytes B (Neutra et al., 2001). Enfin, certaines cellules dendritiques de l'intestin ont la capacité de projeter des dendrites entre les cellules épithéliales de l'intestin afin de prélever directement des antigènes dans la lumière intestinale (Lelouard et al., 2012; Rescigno et al., 2001).

## 2.2 Immunité innée

Le système immunitaire inné correspond à la réponse de défense immédiate de l'organisme contre une infection ou une lésion. Il comprend de nombreuses cellules immunitaires parmi lesquelles les cellules NK (Natural killer), les granulocytes, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Certaines de ces cellules résident de manière permanente dans la lamina propria. La réponse inflammatoire innée est activée après lésion ou infection du

tissu. En effet, les cellules épithéliales et immunitaires expriment des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires. Ces récepteurs peuvent reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes, libérés par exemple par les micro-organismes détruits, ou des motifs moléculaires associés aux débris cellulaires, libérés lorsque la cellule éclate après lésion du tissu. L'activation de ces récepteurs va induire la sécrétion de molécules et cytokines pro-inflammatoires qui vont stimuler à leur tour le recrutement de cellules inflammatoires au niveau du site d'infection (Zaki et al., 2011)(Fig. 15).



**Figure 15: Equilibre entre tolérance et activation de l'immunité innée. Adaptée de (Zaki et al., 2011)**

**(A)** Dans un état d'équilibre normal, les cellules inflammatoires maintiennent une réponse tolérante par rapport à la flore commensale, de manière à favoriser leur croissance.

**(B)** Lorsque le tissu est lésé, la translocation des micro-organismes à travers la barrière épithéliale active les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires. Ces récepteurs vont stimuler la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et l'activation de l'immunité innée.

### 2.3 Immunité adaptative

L'immunité adaptative est activée après reconnaissance, par l'immunité innée, d'agents infectieux. Le système adaptatif est spécifique de l'antigène mais met plus de temps à se mettre en place que l'immunité innée. La réponse immunitaire adaptative amplifie l'inflammation et garde une mémoire de l'antigène afin de prévenir toute nouvelle infection. Les lymphocytes sont les cellules de l'immunité adaptative. On distingue principalement deux groupes de lymphocytes, les lymphocytes B et les lymphocytes T. Les lymphocytes B sont impliqués dans la production d'anticorps, qui peuvent circuler dans le sang et la

lymphe. Les lymphocytes T regroupent plusieurs sous-populations cellulaires parmi lesquelles les lymphocytes T cytotoxiques et les lymphocytes T auxiliaires. Les lymphocytes T cytotoxiques sont directement impliqués dans l'élimination des pathogènes en stimulant la mort par apoptose des cellules infectées par des virus ou les cellules cancéreuses. Les lymphocytes T auxiliaires, quant à eux, ne sont pas impliqués dans l'élimination des pathogènes mais orchestrent la réponse immunitaire, essentiellement en sécrétant des cytokines localement afin d'activer d'autres cellules immunitaires. Nous distinguons trois grands sous-types de réponses des lymphocytes auxiliaires ou T-helper (Th) :

- la réponse Th1 caractérisée par la sécrétion d'interféron  $\gamma$  généralement anti-tumorale, elle est impliquée dans les défenses antibactériennes et virales ;

- la réponse Th2 caractérisée par la sécrétion d'interleukine 4 généralement pro-tumorale, elle est impliquée dans les défenses antiparasitaires ;

- la réponse Th17 caractérisée par la sécrétion d'interleukine 17 dont le rôle dans la progression tumorale est controversé. Elle est impliquée dans la défense antibactérienne et le recrutement de neutrophiles.

D'autres sous-populations existent comme les lymphocytes T régulateurs ou les lymphocytes Th22 qui sont également impliqués dans la réponse inflammatoire. Le sous-type de réponse immunitaire adaptative peut favoriser la progression ou l'élimination des cellules cancéreuses.

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

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont représentées par la maladie de Crohn (MC) et la recto-colite hémorragique (RCH). Ces deux pathologies chroniques évoluent par poussées et leur présentation clinique et morphologique est différente. Leur diagnostic est basé sur des examens cliniques, biologiques, radiologiques, endoscopiques et histologiques (Geboes et al., 2008). Cependant, dans certains cas de figure, on utilise le terme de « colite indéterminée » lorsque les examens réalisés ne permettent pas de trancher entre les deux maladies. La prévalence moyenne actuelle des MICI dans les pays occidentaux est estimée à un sujet sur 1000 (Baumgart et al., 2011; Cosnes et al., 2002). Le



développement de MICI semble être lié à des facteurs génétiques et environnementaux ainsi qu'à une altération de la flore intestinale qui stimule l'inflammation (Gasparetto and Guariso, 2013). Les personnes atteintes de MICI ont un risque doublé de développer un cancer et les traitements actuels ne permettent pas la guérison. La compréhension des mécanismes provoquant les MICI et la caractérisation des pathogènes responsables de ces pathologies sont des enjeux d'ordre public et pourraient permettre de prévenir le développement de cancers colorectaux.

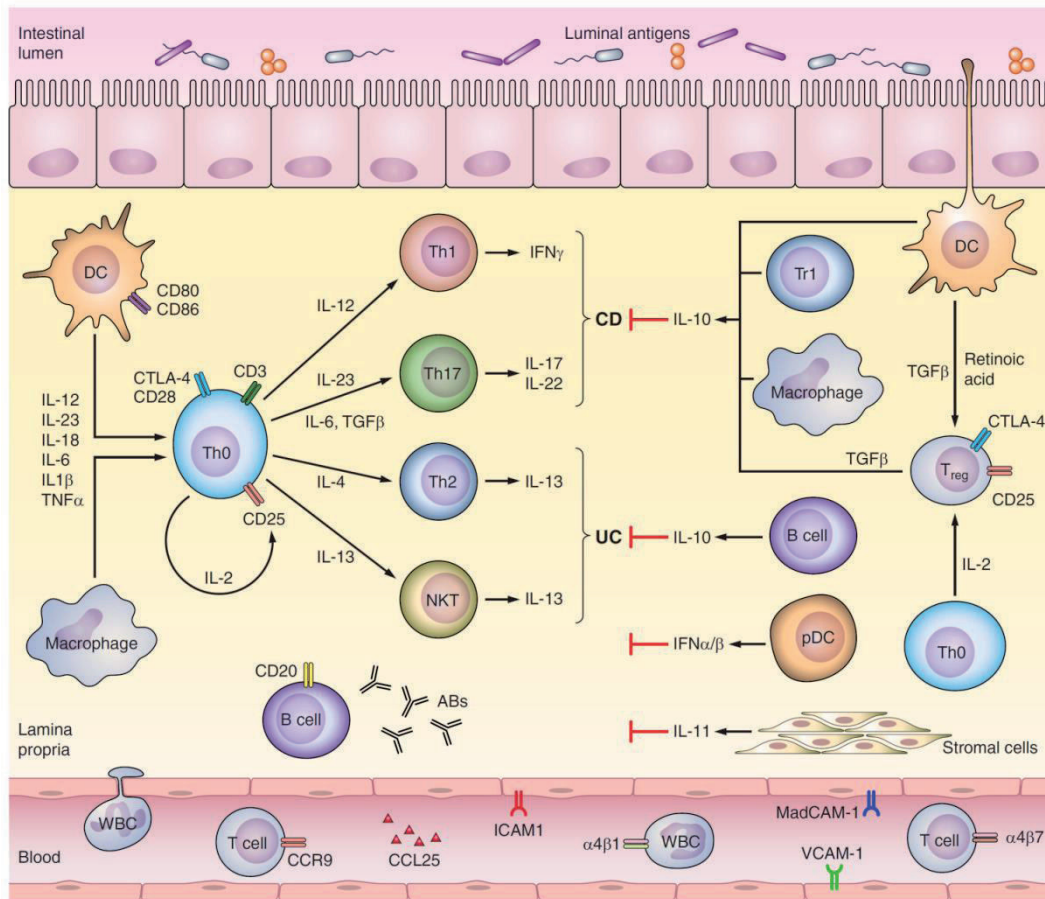
### **3.1 Maladie de Crohn**

La maladie de Crohn touche le plus souvent les jeunes adultes et évolue par poussées inflammatoires. L'intensité et la fréquence diffèrent suivant les personnes et elle est souvent associée à une malnutrition et à une perte de poids. Les lésions peuvent atteindre tout le tube digestif et certaines personnes présentent des manifestations extra-intestinales. Les lésions se présentent sous forme d'ulcérations souvent profondes associées à une inflammation transmurale qui touche les différentes couches de la paroi digestive. Les atteintes sont en général discontinues, des segments normaux pouvant séparer des segments atteints. L'inflammation de l'ensemble de la paroi peut conduire à la formation de fistules caractéristiques de la maladie de Crohn. Les personnes atteintes de la maladie de Crohn ont 3 fois plus de risque de développer des cancers colorectaux (Friedman, 2006).

### **3.2 La rectocolite hémorragique**

La rectocolite hémorragique est une maladie inflammatoire qui affecte la partie distale de l'intestin, en particulier le colon et le rectum. Elle se manifeste par des phases aiguës interrompues par des périodes de rémission. Contrairement à la maladie de Crohn, les lésions de la RCH n'affectent que les couches superficielles de la paroi, la muqueuse et la sous-muqueuse, et sont réparties de manière continue. Dans ses formes les plus sévères, elle peut atteindre l'ensemble du compartiment colorectal et est associée à un amaigrissement et des diarrhées sanglantes. Dans le cas de la RCH, l'inflammation chronique conduit à un raccourcissement du compartiment colorectal et affecte souvent le rectum. Les

personnes atteintes de RCH ont deux fois plus de risque de développer des cancers colorectaux (Abraham and Cho, 2009; Ullman and Itzkowitz, 2011). Les principales voies de l'inflammation mises en jeu dans les MICI sont illustrées dans la figure 16 (Valatas et al., 2013).



**Figure 16: Principales voies de l'inflammation et cytokines mises en jeu dans les MICI. Extrait de (Valatas et al., 2013)**

La maladie de Crohn (CD) est caractérisée par une réponse inflammatoire de type Th1/Th17 dans laquelle interviennent des cytokines telles que l'IL-17, l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$ . La rectocolite hémorragique (UC) est liée, quant à elle, à une réponse Th2 atypique et à une réponse des cellules T Natural killer (NKT) caractérisée par la sécrétion d'IL-13. De nombreuses cytokines telles que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 interviennent en amont pour orienter la réponse inflammatoire.

## **4. Les voies de signalisation communément altérées dans les MICI**

### **4.1 Les voies des récepteurs de type Toll (TLR)**

Les récepteurs de type Toll (Toll-like receptors, TLR) appartiennent à la famille des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires connus pour leur rôle dans la défense contre les infections. Ces récepteurs ont un rôle majeur dans l'homéostasie intestinale notamment grâce à leur implication dans les réponses inflammatoires et la réparation du tissu. Les TLR sont connus pour leur capacité à reconnaître les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, pathogen-associated molecular patterns) tels que les lipopolysaccharides (LPS). En plus de pouvoir reconnaître les PAMPs, certains TLR, comme par exemple TLR2 et TLR4, peuvent être activés par des ligands endogènes et des produits de la matrice extracellulaire (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2009).

#### **4.1.1 Signalisation des TLRs**

Les TLR sont localisés dans différents compartiments subcellulaires et leur localisation est souvent associée à la nature des ligands auxquels ils se lient. En effet, les TLR dont les ligands sont essentiellement lipidiques et protéiques sont exprimés à la membrane cytoplasmique tels que TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6, alors que les TLR qui détectent les acides nucléiques viraux comme TLR3, TLR7 et TLR9 sont présents dans les compartiments endolysosomaux (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2009). Les TLR peuvent se lier aux protéines adaptatrices telles que MyD88, TRIF, TRAM et MAL et leur stimulation conduit à l'activation de plusieurs voies telles que NF- $\kappa$ B, MAPKs et IRF (Lee and Kim, 2007). Dans l'intestin, les TLR sont exprimés dans la plupart des types cellulaires incluant les cellules épithéliales et les cellules inflammatoires. Les TLR interviennent également dans l'inflammasome, leur stimulation conduit à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B qui à son tour va induire l'expression des gènes codant les formes immatures des cytokines pro-IL-18 et pro-IL-1 $\beta$ . Les mécanismes d'activation des TLR et le signal qu'ils transduisent peuvent fortement dépendre du type cellulaire dans lequel ils sont exprimés (Fig. 17).

#### 4.1.2 Rôles dans la défense contre les infections

Les TLR interviennent à plusieurs niveaux dans la défense contre les infections notamment en stimulant la prolifération, la production de peptides antimicrobiens et l'activation de l'immunité innée et adaptative. Par exemple, les TLR prennent part à la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de plusieurs facteurs antimicrobiens tels que les défensines, la phospholipase A2, le lysozyme et les protéines Reg (Brandl et al., 2007; Ganz, 2003; Mukherjee et al., 2008). Ils jouent également un rôle majeur dans l'immunité innée où leur activation conduit au recrutement de leucocytes aux sites d'infection. Les TLR participent aussi à la maintenance et à la différenciation des lymphocytes T et B en stimulant la production des cytokines IL-12, IL-23 et IL-27 qui sont impliquées dans les réponses T-helper Th1 et Th17 (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2009; Reiner et al., 2007).

#### 4.1.3 Rôles dans la réparation et la régénération du tissu

En plus de leurs rôles défensifs contre les bactéries, les TLR affectent plusieurs aspects de l'homéostasie intestinale comme la régénération et la réparation du tissu. Les TLR qui apparaissent comme essentiels dans la réparation et la régénération sont TLR4 et TLR2. En effet, les souris déficientes en TLR2, TLR4 ou MyD88 sont plus susceptibles de développer une inflammation induite par le DSS que les souris sauvages (agent chimique couramment utilisé pour induire des inflammations dans l'intestin chez la souris) (Abreu et al., 2005; Araki et al., 2005; Rakoff-Nahoum et al., 2004). De plus, il a été observé chez les souris déficientes en TLR4 ou MyD88, une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose dans les lésions induites par le DSS comparées aux souris sauvages (Abreu et al., 2005; Brown et al., 2007; Rakoff-Nahoum et al., 2004). Il est à noter que dans des conditions normales, sans lésions, le taux de prolifération chez les souris TLR4<sup>-/-</sup> ou MyD88<sup>-/-</sup> est le même que chez les souris sauvages (Abreu, 2010; Fukata et al., 2005). De nombreuses études ont pu mettre en évidence le rôle de TLR4 dans le processus de réparation et de régénération du tissu. Certaines d'entre elles suggèrent que le récepteur TLR4 stimule l'expression de la cyclooxygénase 2 au niveau des lésions, qui active à son tour la production de PGE2 et l'expression de l'amphiréguline (un ligand de l'EFGR). L'entérocolite nécrosante

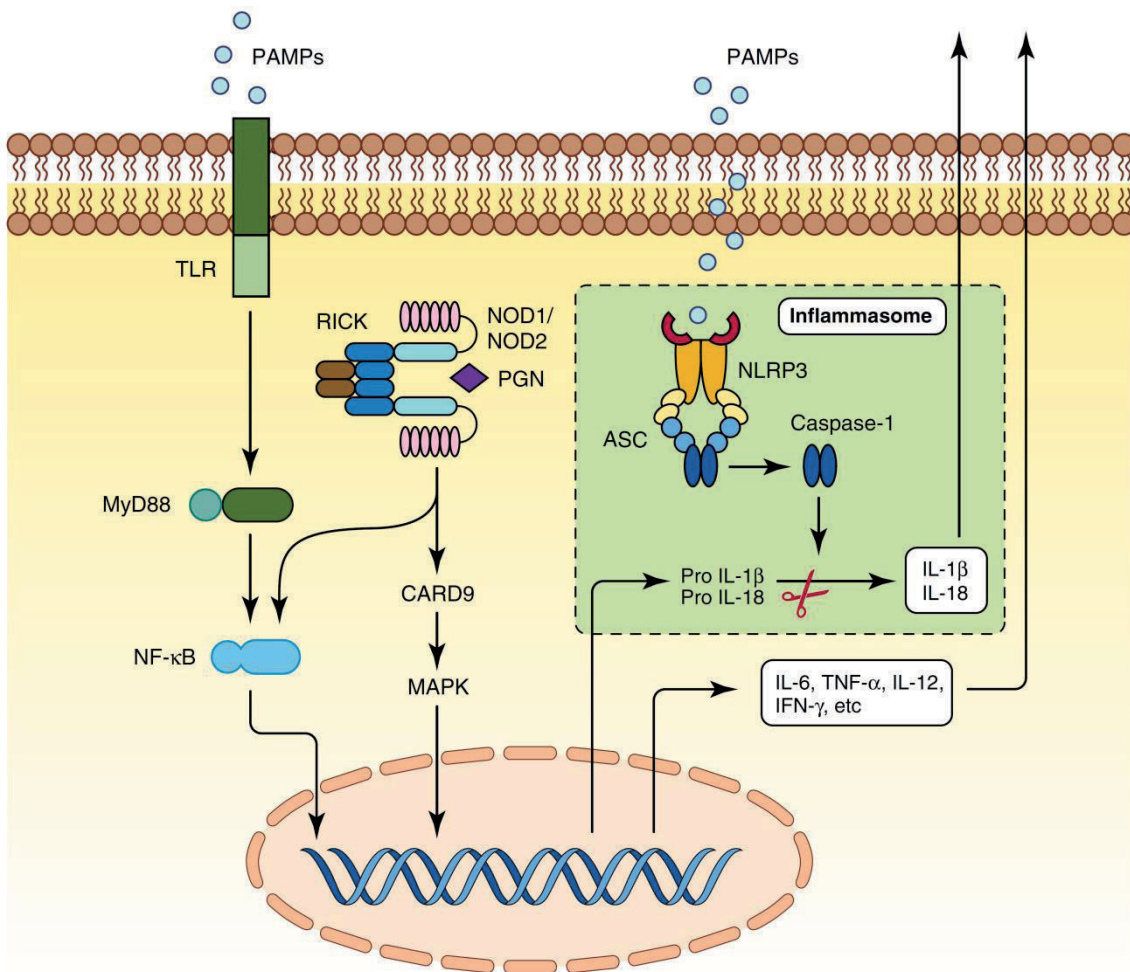
est une maladie caractérisée par des ulcérations et des nécroses qui affectent l'iléon et le côlon chez l'enfant. Des études sur le rôle des TLR chez les souris et l'humain ont démontré que l'entérocolite nécrosante était associée à une surexpression de TLR4 dans la muqueuse intestinale (Jilling et al., 2006; Leaphart et al., 2007). De plus, l'expression d'une forme non-fonctionnelle de TLR4 chez les souris les protège contre le développement de l'entérocolite nécrosante (Abreu, 2010; Lotz et al., 2006)

## 4.2 L'inflammasome et les protéines Nlrp

L'inflammasome est un complexe multiprotéique cytoplasmique impliqué dans la défense contre les micro-organismes et la réparation du tissu après lésion. L'inflammasome est constitué globalement de protéines de la famille des Nlrp (NOD-like receptor family, pyrin domain containing) parmi lesquelles Nlrp1, Nlrp3, Nlrp4 et Nlrp6, de la protéine ASC et de la caspase-1. Ce complexe oligomérique se forme suite à la reconnaissance de divers signaux inflammatoires tels que des cristaux d'acide urique, du LPS ou des composantes virales et bactériennes. L'inflammasome peut être activé dans divers types cellulaires comme les cellules épithéliales, inflammatoires ou même myofibroblastiques, son rôle pouvant grandement dépendre du contexte cellulaire.

### 4.2.1 Signalisation de l'inflammasome

L'inflammasome fait partie d'un complexe de signalisation qui est responsable de la maturation et de la sécrétion des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18. En effet, un premier signal est provoqué par la liaison des TLR à leur ligand, ce signal active la voie NF- $\kappa$ B qui va stimuler l'expression des formes immatures pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18. Au niveau cytoplasmique, un second signal va induire la formation du complexe de l'inflammasome qui active la caspase-1 ; la caspase-1 va à son tour cliver les protéines immatures pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 en formes matures IL-1 $\beta$  et IL-18. Les cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 une fois clivées pourront être sécrétées par les cellules (Fig. 15) (Zaki et al., 2011). Ces deux cytokines sont pro-inflammatoires et sont impliquées dans le recrutement de cellules inflammatoires et dans la prolifération épithéliale.



**Figure 17: La voie de l'inflammasome. Adaptée de (Zaki et al., 2011)**

L'inflammasome régule à deux niveaux la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18. Au niveau transcriptionnel, contrôlée par les voies des récepteurs de type toll (TLR) et post-transcriptionnel, sous le contrôle des voies de l'inflammasome (via l'activation de la caspase-1)

#### 4.2.2 Rôles de l'inflammasome dans la défense contre les infections et l'interaction avec le microbiote

Comme on a pu le voir auparavant, l'homéostasie de l'épithélium intestinal repose sur la capacité de l'organisme à distinguer les bactéries commensales des bactéries pathogènes et sur la régulation de sa barrière physique, chimique et immunitaire qui empêche toute translocation de micro-organismes. L'inflammasome fait partie de l'immunité innée, il se comporte comme un « senseur » qui détecte tout corps étranger pouvant être chimique ou biologique et stimule la réponse inflammatoire suite à la lésion du tissu ou à l'infiltration de corps étrangers. Diverses composantes bactériennes et virales peuvent être reconnues par ce complexe multiprotéique, ce qui le met au premier plan dans les défenses contre les

micro-organismes. Cependant, le rôle de l'inflammasome dans les MICI reste controversé car d'une part il apparait essentiel au maintien de la barrière épithéliale et d'autre part sa suractivation peut conduire à une infiltration de nombreuses cellules inflammatoires et à une inflammation chronique. Des études sur des modèles murins ont pu montrer que les souris déficientes en IL-18, IL-18R, IL-1 $\beta$ , IL-1R, ASC, Caspase-1, MyD88, Nlrp3 et Nlrp6 étaient plus susceptibles de développer une inflammation après traitement au DSS que les souris sauvages (Elinav et al., 2011)(Zaki et al., 2010)(Araki et al., 2005)(Takagi et al., 2003)(Lebeis et al., 2009). Ces études suggèrent fortement que ces différentes protéines et plus globalement l'inflammasome jouent un rôle protecteur contre le développement des MICI. Néanmoins, d'autres approches, utilisant des inhibiteurs ou des protéines recombinantes, ont démontré un rôle accélérateur d'IL-18, IL-18R et caspase-1 dans le développement d'inflammations chroniques induites par le DSS (Bauer et al., 2007; Siegmund et al., 2001; Sivakumar et al., 2002). Ces controverses sont dues à la complexité de l'homéostasie intestinale dans laquelle interviennent différents types cellulaires capables pour la plupart d'activer l'inflammasome, mais aussi la composition bactérienne de la flore intestinale. En effet, des études récentes ont pu démontrer que le transfert du microbiote de la flore intestinale de souris Nlrp6 $^{-/-}$ , ASC $^{-/-}$  ou IL-18 $^{-/-}$  à des souris sauvages les rendait plus susceptibles à développer des inflammations chroniques induites par le DSS (Elinav et al., 2011). Ces études mettent en avant le rôle primordial que peut jouer le microbiote dans la susceptibilité à développer des MICI.

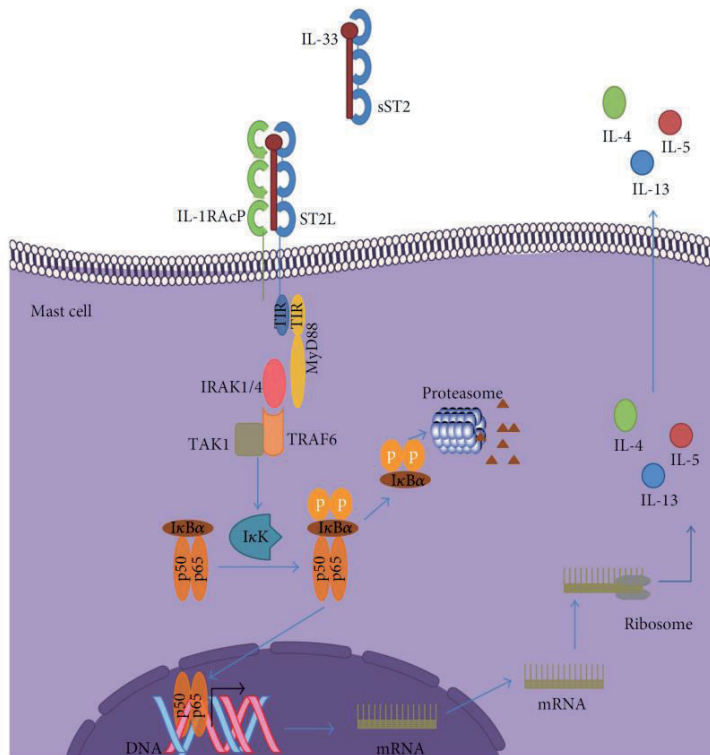
#### **4.2.3 Rôles de l'inflammasome dans la réparation et la régénération de l'épithélium intestinal**

Parallèlement à son rôle dans l'activation de la réponse immunitaire, l'inflammasome apparait comme essentiel à la régénération et à la réparation du tissu après lésion. En effet, la protéine Nlrp3 favorise la stimulation de la prolifération des cellules souches après lésion du tissu (Radtke and Clevers, 2005). Les cellules épithéliales des souris déficientes en caspase-1 ou Nlrp3 prolifèrent moins rapidement lors des phases aiguës des colites que chez les souris sauvages (Zaki et al., 2010b). De plus, chez les souris déficientes en Nlrp6 les propriétés de régénération, prolifération et migration des cellules épithéliales sont dérégulées après lésion du tissu (Elinav et al., 2011; Normand et al., 2011).

### 4.3. Les voies de signalisation IL-33/ST2

L'interleukine 33 est un membre de la famille des cytokines IL-1 qui comporte également les interleukines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-18. IL-33 est le principal ligand du récepteur membranaire ST2, également appelé IL1RL1. ST2 appartient à la famille des récepteurs IL-1 ; il est exprimé dans plusieurs types cellulaires tels que les macrophages, les lymphocytes Th2 ou les cellules épithéliales (García-Miguel et al., 2013). Il existe quatre isoformes de la protéine ST2 résultant d'un épissage alternatif de son gène : ST2L, sST2, STLV et STV (Bergers et al., 1994). Les isoformes majoritaires sont ST2L et sST2, l'isoforme ST2L correspond au récepteur membranaire alors que l'isoforme sST2 est la forme sécrétée de la protéine et joue un rôle d'inhibiteur de la voie. En effet, la protéine sST2 en se liant à IL-33 séquestre celle-ci et bloque ainsi sa liaison au récepteur ST2L (Hayakawa et al., 2007; Oshikawa et al., 2002). Des études récentes mettent en avant l'implication de cet axe dans le développement de maladies inflammatoires chroniques. Les patients atteints de rectocolite hémorragique ont une concentration élevée de ST2 dans le sérum et une augmentation du niveau d'IL-33 dans la muqueuse intestinale (Beltrán et al., 2010). Le niveau de concentration de ST2 dans le sérum est corrélé à la sévérité de la pathologie (Díaz-Jiménez et al., 2011). Cependant, le rôle et les mécanismes d'activation de cette voie dans les MICI sont controversés et pas clairement définis.





**Figure 18: La voie IL33/ST2. Adaptée de (García-Miguel et al., 2013)**

La liaison d'IL-33 à la protéine ST2 induit sa dimérisation avec le récepteur IL1RAcP (IL-1 Receptor Accessory Protein). Le domaine intracellulaire TIR du récepteur ST2 une fois phosphorylé va recruter les protéines MyD88, TRAF6 et IRAK1-4. Le recrutement de ces protéines va stimuler la voie NF-κB et la voie des MAPK.

#### 4.3.1 Rôle de la voie de signalisation IL-33/ST2 dans la réponse immunitaire et la régénération du tissu

Contrairement aux cytokines IL-β et IL-18, l'interleukine IL-33 ne comporte pas de site de clivage pour la caspase-1 et les mécanismes de sa sécrétion ne sont pas encore clairement définis. Cependant, la forme biologiquement active d'IL-33 (pro-IL-33) est libérée par les cellules nécrosées et apparaît comme jouant un rôle d'alarmine (Haraldsen et al., 2009; Milovanovic et al., 2012). En absence de dommage ou d'infection, IL-33 est localisée dans le noyau des cellules (Carriere et al., 2007). L'axe IL-33/ST2 participe à la réponse inflammatoire en stimulant la sécrétion de cytokines favorables à la réponse Th2 (Schmitz et al., 2005) (Fig. 18). En plus de son rôle dans la réponse immunitaire adaptative, plusieurs études mettent en avant son implication dans les MICI (Beltrán et al., 2010; Kobori et al., 2010; Pastorelli et al., 2010; Sedhom et al., 2013; Seidelin et al., 2010; Sponheim et al., 2010). Les souris déficientes en ST2 ou IL-33 sont moins susceptibles de développer des colites dans les modèles d'induction de l'inflammation par le DSS (Oboki et al., 2010;

Sedhom et al., 2013). Le traitement des souris avec des anticorps bloquants dirigés contre ST2 diminue l'inflammation induite par le DSS (Sedhom et al., 2013). Dans le même sens, l'administration d'IL-33 chez les souris aggrave l'inflammation induite par le DSS (Groß et al., 2012). Cependant, le rôle de l'axe IL-33/ST2 est controversé car certaines études démontrent que le traitement avec IL-33 dans la phase chronique de l'inflammation induite par le DSS diminue la sévérité de la colite, suggérant un rôle protecteur d'IL-33 (Groß et al., 2012).

## Introduction générale sur la carcinogénèse

Le Cancer est une maladie qui se caractérise par une prolifération anormale des cellules, liée à un échappement aux mécanismes de régulation qui assurent le développement harmonieux de l'organisme. C'est une maladie multifactorielle qui implique à la fois des facteurs biologiques, comportementaux, et environnementaux. Le Cancer est l'une des premières causes de mortalité dans le monde et sa fréquence est en continuelle augmentation (Jemal et al., 2011).

### 1. Le cancer colorectal

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les hommes et le deuxième chez les femmes avec une estimation en 2008 d'environ 1,2 millions de nouveaux cas et 608700 morts dans le monde (Ferlay et al., 2010). Le cancer colorectal est plus fréquent dans les pays développés que ceux en voie de développement. Les principaux facteurs de risques comportementaux sont le tabagisme, l'inactivité physique, le surpoids et l'obésité, la consommation de viande rouge et transformée, et la consommation excessive d'alcool (Jemal et al., 2011). Les facteurs biologiques sont également critiques tels que l'âge, le dépistage du cancer colorectal est conseillé après 50 ans. Des facteurs héréditaires entrent également en compte et représentent 5 à 10% des cancers colorectaux :

- la polypose recto-colique familiale qui se manifeste par la formation d'une multitude de polypes dans l'intestin, se caractérise au niveau génétique par une mutation du gène codant pour la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli). La protéine APC est un suppresseur de tumeur impliqué dans la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. Les mutations affectant les membres de cette voie de signalisation sont considérées comme initiateurs de la carcinogénèse dans la majorité des cancers colorectaux (Fearon and Vogelstein, 1990)(Fearon, 2011)(Logan and Nusse, 2004).

- Le syndrome de Lynch (ou cancer colorectal héréditaire sans polypose) se caractérise par des mutations des gènes MMR (Mismatch repair ou réparation des mésappariements), ces gènes sont impliqués dans la réparation des erreurs de réplication de l'ADN. Les personnes atteintes par ce syndrome développent plus souvent des cancers colorectaux avant l'âge de 50 ans. Ce syndrome représente environ 3% de l'ensemble des cancers colorectaux (Lynch et al., 2009).

En plus des facteurs héréditaires, certaines pathologies peuvent favoriser le développement de cancers colorectaux. En effet, les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), notamment

la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, sont des facteurs de risque, les personnes atteintes de MICI ont deux fois plus de risque de développer des cancers colorectaux (Friedman, 2006)(Abraham and Cho, 2009; Ullman and Itzkowitz, 2011).

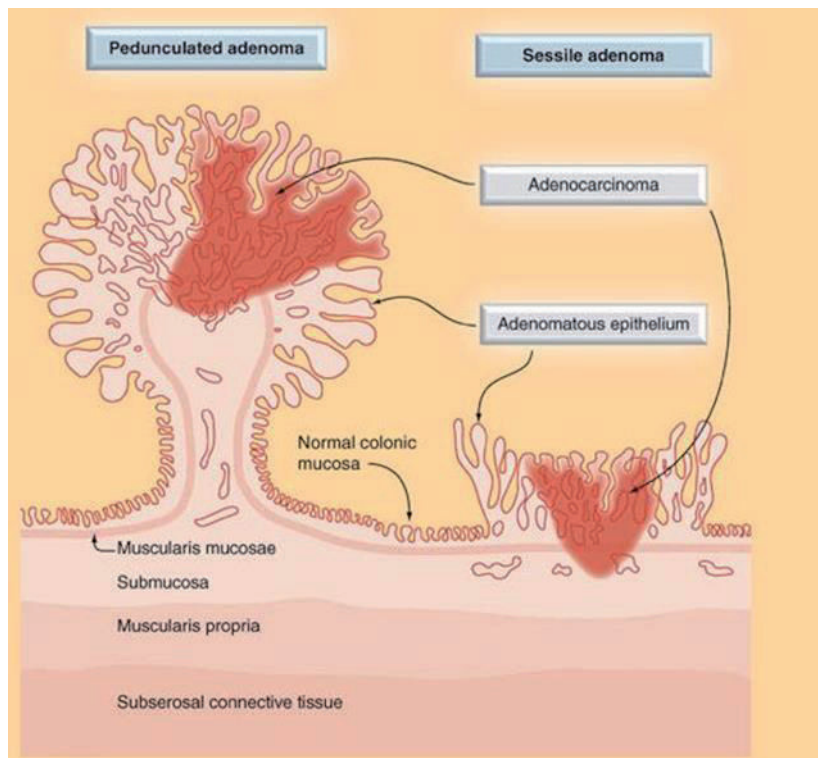
## 2. Les sous-types de cancers colorectaux

### 2.1 Anatomie pathologique

Au niveau anatomique, les cancers colorectaux se caractérisent généralement au départ par la formation de polypes. Le polype correspond à une excroissance tissulaire qui est projetée dans la lumière intestinale. Au niveau, histologique les polypes peuvent avoir une origine épithéliale ou non épithéliale. Je vais uniquement me focaliser sur la description des polypes épithéliaux adénomateux. 90% des adénomes se présentent sous forme de polypes. On distingue deux types de polypes adénomateux:

- les polypes pédiculés lorsque la base d'implantation est inférieure à la taille du polype ;
- les polypes sessiles lorsque la base d'implantation est supérieure à la taille du polype.

Lorsque l'adénome ne forme pas de polype on parle d'adénome plan. La figure 19 qui est adaptée de l'article de Søreide et collaborateurs (Søreide et al., 2009) illustre la différence entre les polypes pédiculés et sessiles. L'évaluation des critères de pronostique est différente suivant le type d'adénomes.



**Figure 19: Les différentes formes de polypes. Adaptée de (Søreide et al., 2009)**

A gauche, un polype pédiculé et à droite un polype sessile. Les adénocarcinomes se développent au sein des polypes et peuvent infiltrer la sous-muqueuse. La différence structurale entre les deux polypes explique en partie leur différence d'agressivité. Les polypes pédiculés sont plus visibles et plus faciles à retirer chirurgicalement.

## 2.2 Localisation colorectale : Une ou plusieurs entités

Les cancers du côlon et du rectum sont souvent associés sous le terme de cancer colorectal essentiellement du fait de leur forte ressemblance. Cependant, plusieurs études mettent en avant le fait qu'il y ait une nette différence au niveau moléculaire et au niveau du pronostic suivant la localisation de la tumeur (Li and Lai, 2009; Minoo et al., 2010). Globalement le compartiment colorectal est subdivisé en trois entités : le côlon proximal, le côlon distal et le rectum. Les trois compartiments diffèrent à plusieurs niveaux, que ce soit au niveau de leur origine embryologique, au niveau anatomique ou physiologique. Les principales différences sont listées dans le tableau 2 (Adapté de la revue suivante : (Li and Lai, 2009)). A titre d'exemple, au niveau physiologique, le côlon proximal et distal jouent un rôle dans l'absorption des électrolytes et de l'eau alors que le rectum permet le stockage des fèces. Au niveau histologique, la proportion de cellules caliciformes et la sécrétion de mucus est plus abondante dans le côlon proximal et le rectum que dans le colon distal, ceci pouvant être un système de défense de la muqueuse pour se protéger des frottements mécaniques et stimuli chimiques plus abondants au niveau proximal (Li and Lai, 2009)(Arai and Kino, 1989)

Feature	Proximal colon	Distal colon	Rectum
<b>Physiology</b>			
Embryological origin	Midgut	Hindgut	Hindgut
Artery supply	Branches of superior mesenteric artery	Tributaries from the inferior mesenteric artery	Tributaries from the inferior mesenteric artery
Innervation	Vague nerve	S2, S3, S4	S2, S3, S4
Histology	Dense mucous apical vesicles	Highest proportion of goblet cells	Richer in endocrine cells
Major physical function	Nutrient and water absorption	Nutrient and water absorption	Fecal storage
Other physical features	Short-chain fatty acids and ethanol fermentation	Protein fermentation; neutral mucopolysaccharide predominance	Acidic mucin predominance
<b>Carcinogenesis</b>			
Molecular mechanism	MSI	CIN	MSS; CIN; more contribution of TP53, APC/ $\beta$ -catenin pathway; more COX2 overexpression; less <i>K-ras</i> mutation
Hereditary disease predominant	HNPCC	FAP	
<b>Risk factors</b>			
Dietary fiber	Greatest protective effect	Protective effect	Less or null protective effect
Meat consumption	Roasted meat	Processed meat	Red meat
Calcium and vitamin D	Less protective effect	More protective effect	More protective effect
Physical activity	Protective effect	Protective effect	No protective effect

CIN: chromosomal instability; MSI: microsatellite instability; MSS: microsatellite stability; HNPCC: hereditary nonpolyposis colorectal cancer; FAP: familial adenomatous polyposis; TP53: tumor protein P53; APC: adenomatous polyposis coli; COX2: cyclooxygenase-2

**Tableau 2:** Les principales différences entre les trois sous-types de cancers colorectaux (Li and Lai, 2009).

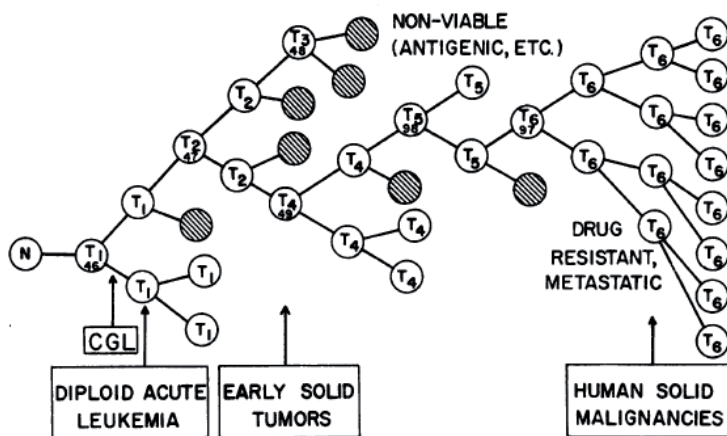
### 3. De la cellule normale à la cellule cancéreuse

Les théories et les paradigmes autour de l'origine des cancers et de la carcinogénèse n'ont cessé de changer et d'évoluer au cours l'histoire. Les premières preuves de cancer ont été observées sur des momies datant de l'Égypte Antique. Le Cancer, en tant que maladie, a été pour la première fois décrit par Hippocrate qui comparait les propagations de la tumeur aux pinces de crabe (Cancer en grecque). Les hypothèses et les questions sur l'initiation et la progression tumorale restent diverses et variées. La tumeur est-elle d'origine monoclonale ou polyclonale ? L'initiation tumorale débute-t-elle dans une cellule ou dans plusieurs cellules simultanément ? Peut-on assimiler la tumeur à un organe dans lequel les différentes sous-populations cellulaires se partagent les tâches ? La réponse à ces questions dépend en partie du type de cancer et du stade d'évolution. Je vais présenter certaines des hypothèses les plus récentes.

#### 3.1 Origine monoclonale des cancers

En 1976, Peter C. Nowell décrit la progression tumorale comme une évolution clonale, très proche de l'évolution darwinienne (Nowell, 1976). En effet, l'initiation tumorale débute par des altérations génétiques et chromosomiques qui conduisent à la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse. Cette cellule pré-cancéreuse prolifère de manière continue et prend un avantage sélectif

par rapport à la cellule voisine. Cet avantage permet d'obtenir une population a priori monoclonale, dans laquelle émerge, sous l'impulsion de stress tels que le manque de nutriment ou d'oxygène, de nouvelles mutations. Ces mutations peuvent à leur tour si elles apportent un avantage à la cellule conduire à la formation d'une nouvelle sous-population clonale qui prend le dessus sur les autres cellules. Au fur et à mesure, et part des vagues successives de mutations, les cellules cancéreuses deviennent de plus en plus résistantes et agressives (Nowell, 1976) (Fig. 20). L'évolution et l'agressivité des cellules cancéreuses dépendent fortement du microenvironnement de la tumeur.



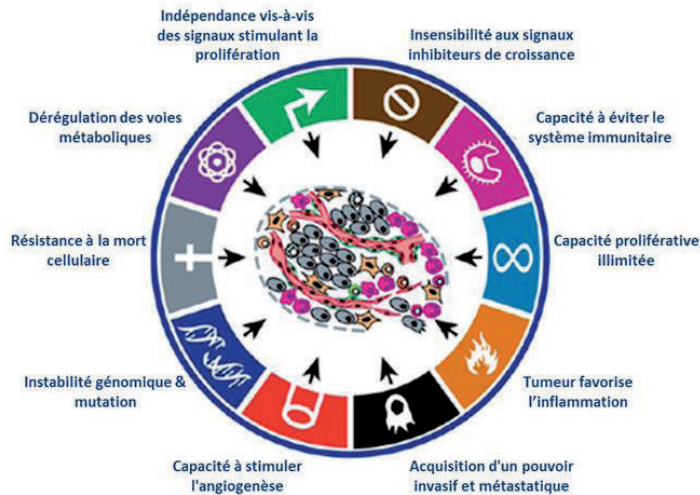
**Figure 20: Modèle d'évolution clonale des cellules néoplasiques (Nowell, 1976).**

Figure extraite de la revue de Peter C. Nowell en 1976, dans laquelle il décrit l'évolution tumorale comme une succession de vagues de sélections clonales, les populations clonales prédominantes étant celles qui apportent un avantage sélectif par rapport aux autres. De cette manière, les cellules néoplasiques s'adaptent et se développent plus rapidement dans un environnement en constante évolution.

### 3.2 Les traits des phénotypes tumoraux

En 2000 puis en 2011, Hanahan et Weinberg décrivent ce que l'on appelle les traits des phénotypes tumoraux ou « hallmarks of cancer » (Hanahan and Weinberg, 2000)(Hanahan and Weinberg, 2011). En effet, même si les mutations nous paraissent être aléatoires, leur sélection et leur maintien dans les populations-filles dépendent des voies de signalisation et des processus biologiques qu'elles affectent. La théorie de Hanahan et Weinberg sur la transformation et la progression tumorales est également un analogue de l'évolution darwinienne, la transformation tumorale étant le résultat d'une succession de mutations qui apportent à la cellule de nouvelles fonctions biologiques lui donnant un avantage de croissance par rapport aux cellules adjacentes. En 2000, ils attribuent 6 traits des phénotypes tumoraux communément présents dans l'ensemble des cancers, auxquels viennent se rajouter 4 nouveaux en 2011. Cela nous montre à quel point les paradigmes autour de la

tumorigenèse sont en continuelle évolution. Les différents traits des phénotypes tumoraux sont illustrés dans la figure 21.



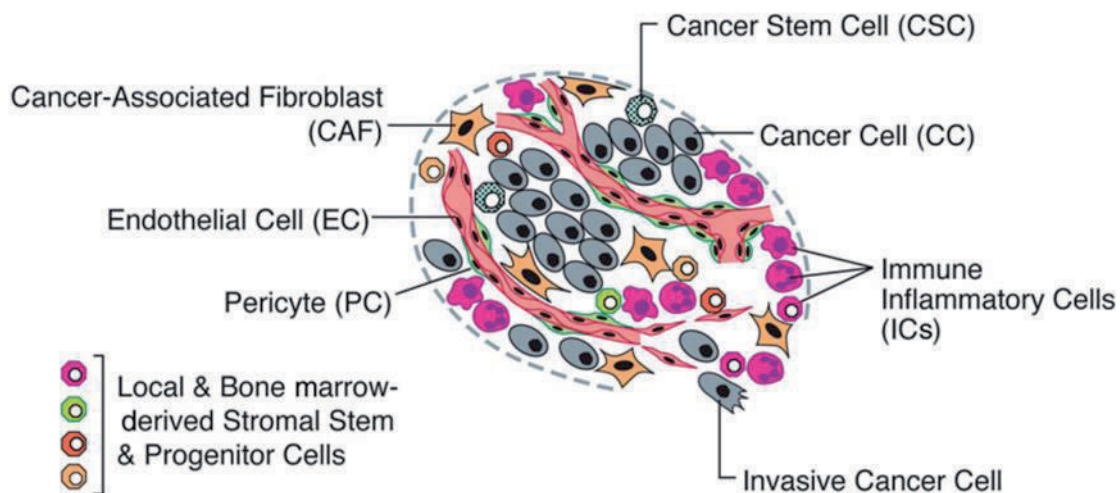
**Figure 21: Les traits des phénotypes tumoraux. Adapté de (Hanahan and Weinberg, 2011)**

La tumeur se forme suite à des mutations successives qui altèrent plusieurs fonctions biologiques. Certaines des nouvelles fonctions acquises sont communes à de nombreux cancers et sont regroupées sous le nom de traits des phénotypes tumoraux. Suivant le contexte cellulaire ces processus biologiques seront contrôlés par des voies de signalisation différentes.

### 3.3 Les tumeurs comme organes

Le cancer ne peut pas être considéré comme une entité homogène qui n'interagit pas avec son microenvironnement. En effet, outre les cellules cancéreuses, la tumeur est constituée d'une multitude de types cellulaires tels que les cellules fibroblastiques, inflammatoires, vasculaires et nerveuses (Fig. 22). Les cellules cancéreuses peuvent communiquer avec ces différentes populations, allant jusqu'à les stimuler ou favoriser leur maturation afin qu'elles leur apportent un avantage sélectif par rapport aux cellules voisines (Pietras and Östman, 2010)(Hanahan and Weinberg, 2011). Certains paradigmes décrivent la tumeur comme un organe qui non seulement contient une multitude de cellules qui favorisent sa croissance mais est capable de stimuler d'autres organes ou cellules à distance.





**Figure 22: Le microenvironnement tumoral. Adaptée de (Hanahan and Weinberg, 2011)**

La tumeur est constituée de nombreux types cellulaires. La cellule cancéreuse profite de la présence de ces différents types cellulaires. Elle peut par exemple stimuler la sécrétion de métalloprotéinases par les cellules environnantes afin de dégrader la matrice extracellulaire et migrer vers d'autres organes.

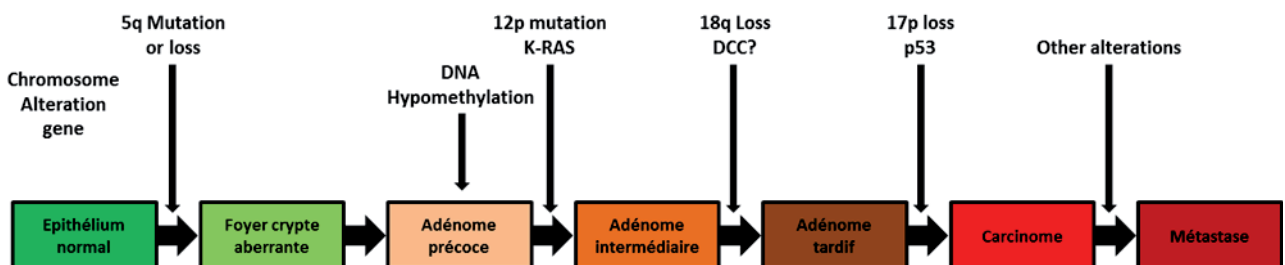
#### 4. Tumorigenèse colorectale

Le développement tumoral est un processus séquentiel qui fait intervenir de nombreuses étapes. Les cellules normales subissent une succession de modifications génétiques et épigénétiques les transformant progressivement en cellules cancéreuses. Dans l'intestin, les cellules cancéreuses se développent dans les cryptes où les cellules prolifèrent plus rapidement que les cellules différenciées. Sur le plan morphologique, ceci se traduit par la formation de foyers de cryptes aberrantes (FCA) (Pretlow et al., 1991). Les foyers de cryptes aberrantes peuvent être à des stades hyperplasiques, lorsque les cellules sont en hyperprolifération, ou à des stades dysplasiques, lorsque les glandes sont caractérisées par des anomalies cellulaires et architecturales. Cette prolifération anormale des cellules au sein des glandes conduit à la formation de polypes. A ce stade, les polypes forment des adénomes qui sont considérés comme bénins. Les adénomes sont des lésions néoplasiques qui peuvent évoluer en adénocarcinomes. L'accumulation dans les adénomes d'une succession de mutations peut les conduire à se transformer en adénocarcinomes. Dans un premier temps les adénomes se développent en superficie des polypes puis pénètrent progressivement dans l'épithélium et la muqueuse, mais sans franchir la lame basale. A ce stade, on parle d'adénocarcinome « in situ ». Ensuite d'autres mutations peuvent apparaître et conduire à la rupture de la lame basale, on parle alors de carcinome invasif. Le carcinome invasif peut ensuite progressivement s'étendre en profondeur pour atteindre les autres couches de la paroi intestinale.

Finalement, l'acquisition successive de mutations génétiques permet aux cellules cancéreuses d'atteindre d'autres organes et d'y former des foyers métastatiques.

#### 4.1 Voies communément dérégulées dans les cancers du colon

En 1990, Fearon et Vogelstein décrivent pour la première fois un modèle de progression des cancers colorectaux dans lequel ils proposent que l'évolution de l'épithélium normal en adénocarcinome suit globalement une séquence précise de mutations affectant à la fois des oncogènes ainsi que des gènes suppresseurs de tumeur (Fig. 23)(Fearon and Vogelstein, 1990). Ce modèle a été établi en étudiant les fréquences d'altérations de ces différents gènes dans les épithéliums normaux, les adénomes et les adénocarcinomes. Actuellement nous savons que ces gènes jouent des rôles clés dans des voies de signalisation communément dérégulées dans les cancers colorectaux.



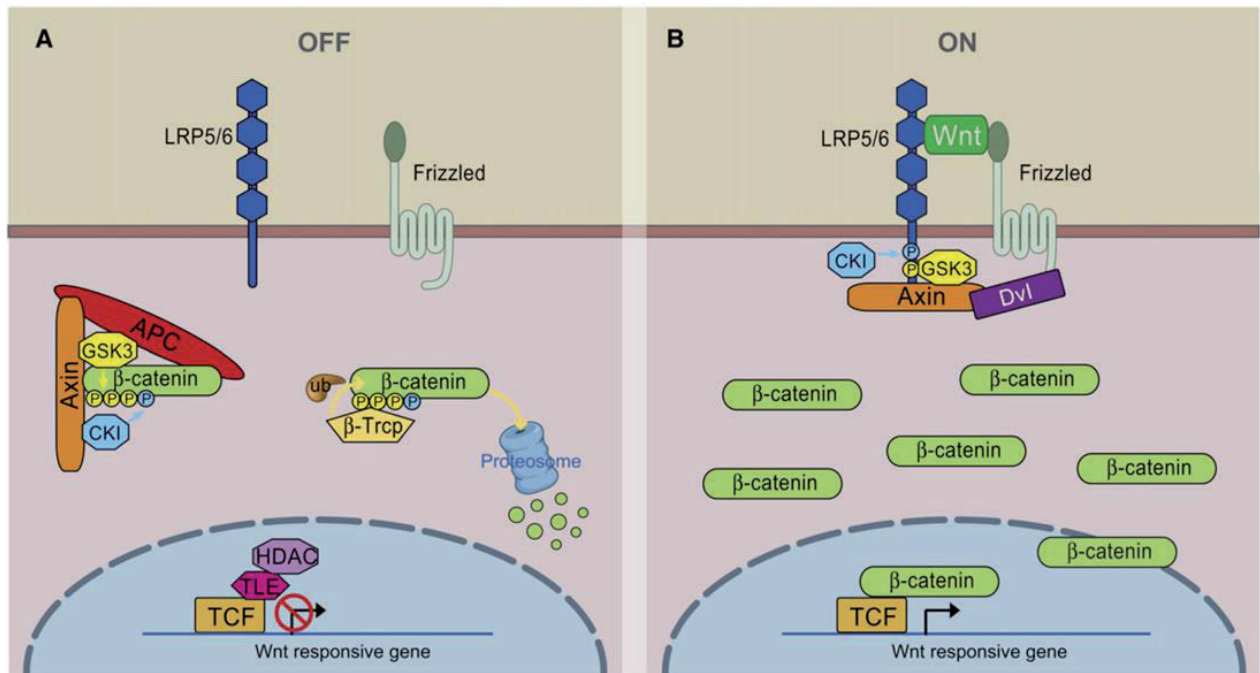
**Figure 23: Modèle génétique de développement des cancers colorectaux. Adaptée de (Fearon and Vogelstein, 1990)**

La tumorigénèse colorectale est probablement initiée par une perte de la région 5q de l'ADN ou des mutations au niveau du gène codant pour la protéine APC. Ces altérations conduisent à la prolifération des cellules de la crypte et à la formation de foyers de cryptes aberrantes. Une fois le stade d'adénome atteint, des modifications épigénétiques et des mutations du gène codant pour la protéine K-RAS provoquent probablement une augmentation de la taille de l'adénome. S'en suivent des pertes chromosomiques des régions 18q et 17p, qui contiennent respectivement des gènes codant pour des membres de la voie TGF- $\beta$  et de la protéine P53. Ceci amène l'adénome à se transformer en adénocarcinome. Finalement, d'autres altérations génétiques peuvent apparaître au sein de l'adénocarcinome, notamment au niveau des gènes codant pour des métalloprotéinases, et permettre au carcinome d'envahir le tissu et de migrer vers d'autres organes qui seront colonisés par des métastases.

##### 4.1.1 La voie Wnt/APC/ $\beta$ -caténine

Les protéines Wnt sont une famille de glycoprotéines dont les voies de signalisation sont impliquées dans de nombreux mécanismes fondamentaux tels que la prolifération, la polarité cellulaire, le développement embryonnaire et l'homéostasie tissulaire (Logan and Nusse, 2004)(MacDonald et al., 2009). Des mutations de plusieurs membres de ces voies, en particulier de la voie Wnt/APC/ $\beta$ -caténine (la voie canonique), sont directement impliquées dans de nombreuses maladies, en

particulier les malformations congénitales et les cancers. Le principal rôle de la voie Wnt est d'activer la dégradation de la protéine  $\beta$ -caténine (Fig. 24).



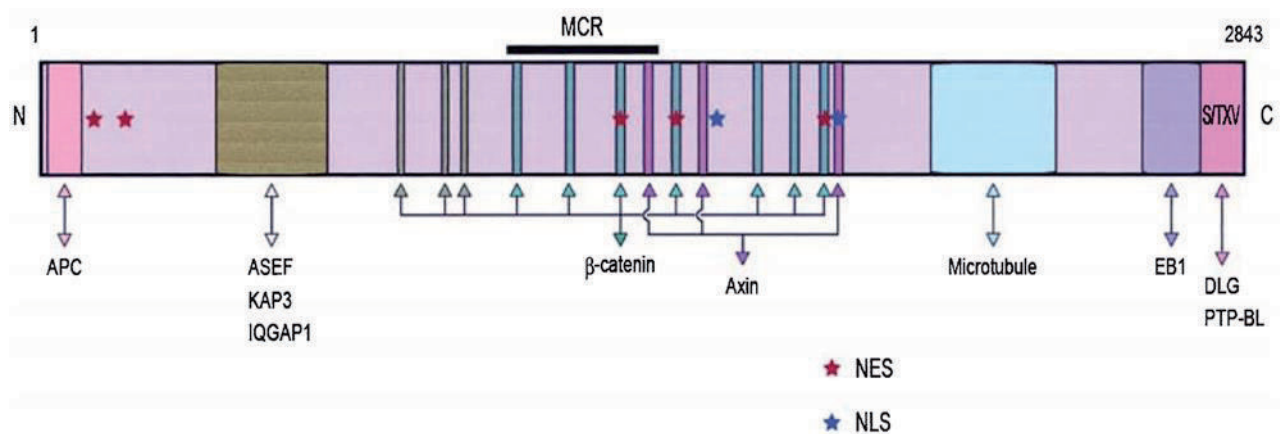
**Figure 24: Modèle de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. Adaptée de (MacDonald et al., 2009)**

(A) En absence de ligands Wnt, la  $\beta$ -caténine est capturée par un complexe de dégradation, composé des protéines APC (Adenomatous Polyposis Coli), axine, caséine kinase 1 (CK1) et la Glycogène Synthétase Kinase 3 (GSK3- $\beta$ ). La GSK3 $\beta$  phosphoryle des résidus sérine et thréonine localisés à l'extrémité N-terminale de la  $\beta$ -caténine conduisant ainsi à sa dégradation par le protéasome. (B) En présence de ligands Wnt extracellulaires, ils se fixent à leur récepteur et co-récepteur (Frizzled et LRP), pour activer une cascade de signalisation intracellulaire menant à la stabilisation et à l'accumulation cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine. La  $\beta$ -caténine est transférée dans le noyau où elle se lie à un partenaire nucléaire (facteur de transcription TCF/LEF). Cette association déplace des co-répresseurs et permet de recruter des co-activateurs stimulant ainsi la transcription de gènes cibles. Parmi ces gènes cibles, on trouve à titre d'exemple les gènes CCND1 et c-myc codant respectivement pour les protéines Cycline D1 et C-myc.

La protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli) est une protéine multifonctionnelle de grande taille, environ 312 kDa ; elle est essentiellement impliquée dans la voie Wnt/ $\beta$ -caténine mais peut également interagir par son domaine C-terminal avec de nombreuses protéines du cytosquelette telles que les microtubules (Hanson and Miller, 2005)(Barth et al., 2008)(Munemitsu et al., 1994)(Fig. 6). Le gène de la protéine APC lorsqu'il est muté dans les cellules germinales conduit à une maladie génétique connue sous le nom de polypose recto-colique familiale ou FAP (Familial Adenomatous Polyposis). Les personnes atteintes de cette maladie génétique développent de nombreux polypes adénomateux, qui avec le temps peuvent évoluer en adénocarcinomes, s'ils ne sont pas résectionnés. Les mutations du gène APC dans les cellules somatiques sont en règle générale initiatrices de la carcinogenèse colique (Fearon, 2011; Fearon and Vogelstein, 1990; Logan and Nusse, 2004). En effet,

ce dernier est muté dans 80% des cancers colorectaux. Globalement, le gène de la protéine APC est divisé en 3 parties, N-terminale, intermédiaire et C-terminale (Fig. 25).

Des études d'analyse des zones de distribution des mutations somatiques ont pu mettre en évidence une région de regroupement des mutations (MCR) localisées essentiellement au niveau de la zone de liaison avec la protéine  $\beta$ -caténine (Fig. 25). Certaines hypothèses suggèrent que la partie N-terminale pourrait être favorable à la progression tumorale alors que la partie C-terminale est plutôt anti-tumorale.



**Figure 25: Structure de la protéine APC. Adaptée de (Senda et al., 2007)**

**La partie N-terminale** est composée du domaine d'oligomérisation de la protéine APC et de la «région armadillo». Cette région armadillo contient des sites de liaison aux protéines ASEF (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor), KAP3 (kinesin superfamily-associated protein 3) et IQGAP1. Ces protéines sont essentiellement impliquées dans la morphologie cellulaire, la mobilité et la migration à travers les filaments d'actine et les microtubules. Ce domaine est globalement conservé dans les différentes protéines tronquées d'APC.

**La partie centrale** comporte les sites de liaison à la  $\beta$ -caténine et à l'axine. Elle est principalement impliquée dans la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et contient la région de regroupement des mutations somatiques (MCR) démontrant son importance dans la progression tumorale.

**La partie C-terminale** contient les domaines de liaison aux microtubules et aux protéines EB1, DLG et PTP-BL. Cette partie intervient dans l'interaction avec les microtubules, la formation du fuseau mitotique et le cycle cellulaire.

La protéine APC contient plusieurs sites de transport et localisation nucléaire NES (Nuclear Export Signal) et NLS (Nuclear Localization Signal).

Plusieurs modèles de cancers colorectaux ont été développés, les plus fréquents étant les modèles de souris APC, qui contiennent des mutations de la protéine APC. En règle générale, les mutations présentes dans les modèles APC donnent lieu à l'expression d'une forme tronquée de la protéine APC. En fonction de la localisation de ces mutations, différentes protéines tronquées sont générées qui vont être à l'origine de phénotypes différents chez la souris, démontrant encore une fois la

complexité du rôle que joue la protéine APC dans la progression tumorale (McCart et al., 2008).

L'ensemble des modèles APC est résumé dans le tableau 3.

GEM	Mutation	Polyp burden <sup>a</sup>	Histology/pathology	Comments
<i>Apc</i> <sup>Mm/+</sup>	Truncating mutation at codon 850 (ENU induced).	~30 → 100	Polypoid, papillary and sessile adenomas. Cystic crypts, no colonic ACF.	Canonical FAP model
<i>Apc</i> <sup>A716/+</sup>	Neomycin inserted into exon 15; protein truncated at codon 716.	~300	Polypoid, papillary and sessile adenomas. No colonic ACF	Normal villous epithelium covering each polyp
<i>Apc</i> <sup>1638N/+</sup>	Neomycin inserted in antisense orientation into exon 15; protein truncated at codon 1638.	< 10	Polypoid and hyperplastic polyps. Moderate to highly differentiated adenocarcinoma with infiltration into mucosa and submucosa. Gastric lesions and a single liver metastasis. Desmoids, cutaneous cysts and spontaneous colonic ACFs.	Truncated protein predicted, no expression detected
<i>Apc</i> <sup>1638T/+</sup>	Hygromycin inserted in sense orientation into exon 15; protein truncated at codon 1638.	–	No increases in predisposition towards intestinal tumorigenesis. Smaller size, absence of preputial glands, nipple-associated cysts	Expression of 182 kDa protein detected.
<i>Apc</i> <sup>1309/+</sup>	Frameshift at codon 1309.	~35	Polyps throughout duodenum to colon.	More colonic polyps than <i>Apc</i> <sup>Mm/+</sup>
<i>Apc</i> <sup>A14</sup>	Frameshift at codon 580.	~65	Increase in colonic polyps, ACF and rectal prolapse. Tubular adenomas and invasive carcinomas in animals > 12 months.	More severe than <i>Apc</i> <sup>Mm/+</sup>
<i>Apc</i> <sup>580D</sup>	Frameshift at codon 580 following adenoviral derived cre exposure.	~6	Adenomas developed predominantly near anus.	Approach using adenovirus derived cre may account for localization of tumors
<i>Apc</i> <sup>A580</sup>	Keratin 14 promoted excision of exon 14, resulting in a frameshift at codon 580 and truncation at codon 605	~120	Intestinal phenotype similar to <i>Apc</i> <sup>A14</sup> with additional phenotypic manifestations in the skin, thymus and tooth.	Similar extra-colonic features to FAP patients (tooth defects)
<i>Apc</i> <sup>A474/+</sup>	Neomycin inserted into exon 9, with duplication of exons 7, 8, 9 and 10. Frameshift at codon 474.	~30-00	Sessile polyps with a central depression. Mammary adenocarcinoma (18% between 3-5 months). Hyperproliferation of intestinal glands.	Influence of duplicated exons on expression?
<i>Apc</i> <sup>neoR</sup> <i>Apc</i> <sup>neoF</sup>	Neomycin inserted into intron 13, in reverse or forward orientation.	< 1 at 15 months		Hypomorphic alleles that reduce Apc by 80% and 90%, respectively.

<sup>a</sup>Per mouse.

**Tableau 3. Résumé des modèles murins de la protéine APC. Extrait de (McCart et al., 2008)**

D'autres mutations des membres de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine sont également présents dans de nombreux cancers telles que des mutations des sites de phosphorylation de la protéine  $\beta$ -caténine qui conduisent à l'expression d'une protéine  $\beta$ -caténine constitutivement active, ou des mutations de la protéine adaptatrice axine qui permet la cohésion du complexe de destruction.

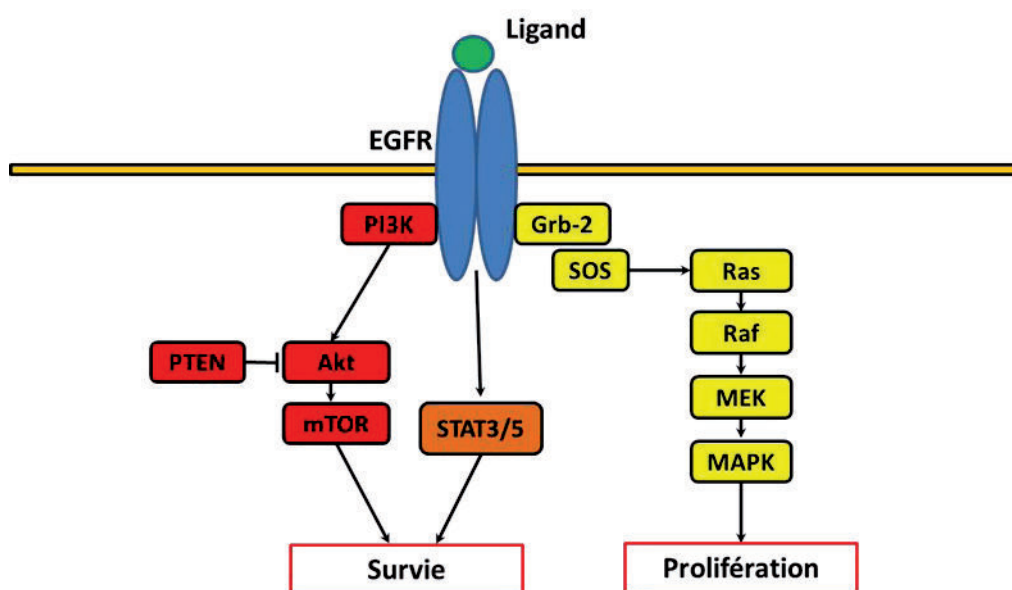
#### 4.1.2 Les voies du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor)

L'un des traits du phénotype tumoral est l'indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération. Le récepteur à l'EGF (EGFR ou ErbB1) est une protéine monomérique transmembranaire, membre de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase, ErbB. Après

liaison à ses ligands, tels que EGF, TGF- $\alpha$ , épîréguline et amphiréguline, le récepteur à l'EGF induit l'activation d'une cascade de voies de signalisation impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la prolifération, l'apoptose, la différenciation et la survie (Jorissen et al., 2003). Globalement, ces récepteurs activent les voies de signalisation Ras/ERK/MEK, STAT et PI3K/AKT (Fig. 26).

Les protéines Ras, des GTPases appartenant à la famille des protéines G monomériques, sont impliquées dans de nombreux cancers. Des mutations somatiques de la protéine K-Ras sont présentes dans environ 40 % des cancers colorectaux et sont considérées dans le modèle de Vogelstein comme l'une des premières étapes de la progression tumorale (Fearon, 2011). Cette protéine joue un rôle clé dans la transduction du signal du récepteur à l'EGF et l'activation des voies MAPKs.

La protéine PTEN, une phosphatase impliquée dans la voie du récepteur à l'EGF, en particulier la voie PI3K/AKT, est mutée dans environ 10% des cancers colorectaux (Fearon, 2011). Ces mutations somatiques conduisent en règle générale à l'inactivation de la protéine, favorisant la transduction du signal après activation des récepteurs à l'EGF.

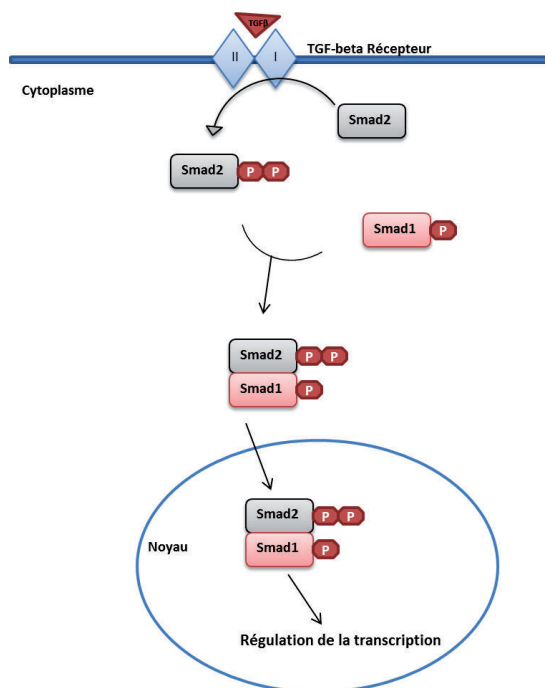


**Figure 26:** La voie de signalisation du récepteur à l'EGF.

La liaison du ligand à son récepteur induit des cascades de phosphorylations qui régulent de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération et la survie.

#### 4.1.3 La voie TGF- $\beta$ /SMAD

Les voies de signalisation TGF- $\beta$ /SMAD comprennent une famille de plus de 30 facteurs de croissance chez l'humain (Massagué, 2008). Elles régulent plusieurs fonctions biologiques et sont altérées dans de nombreux cancers. Le rôle de la voie TGF- $\beta$ /SMAD dans la progression tumorale est controversé et est dépendant du contexte cellulaire. Dans le cancer colorectal, cette voie est associée à une fonction suppresseur de tumeur, son inactivation favorisant la transformation tumorale. Cependant, son implication dans des processus tels que la migration et la transition épithélio-mésenchymateuse, peut favoriser l'invasion tumorale (Massagué, 2008, 2012)(Fig. 27). Des mutations inactivant le récepteur TGF $\beta$ II sont présentes dans environ 10–15% des cancers colorectaux (Fearon, 2011). Dans le schéma de Vogelstein, la voie TGF- $\beta$  est altérée et présente dans la phase de promotion des tumeurs (Fearon, 2011; Fearon and Vogelstein, 1990). Plusieurs modèles de souris ont démontré l'importance de cette voie dans la progression tumorale. Certaines mutations affectant d'autres membres de la voie TGF- $\beta$  tels que la protéine Smad4 peuvent favoriser également la formation tumorale.



**Figure 27: La voie TGF- $\beta$ .**

La liaison du ligand au récepteur TGF- $\beta$ , va induire la phosphorylation des protéines Smad qui vont migrer vers le noyau pour moduler l'expression de gènes.

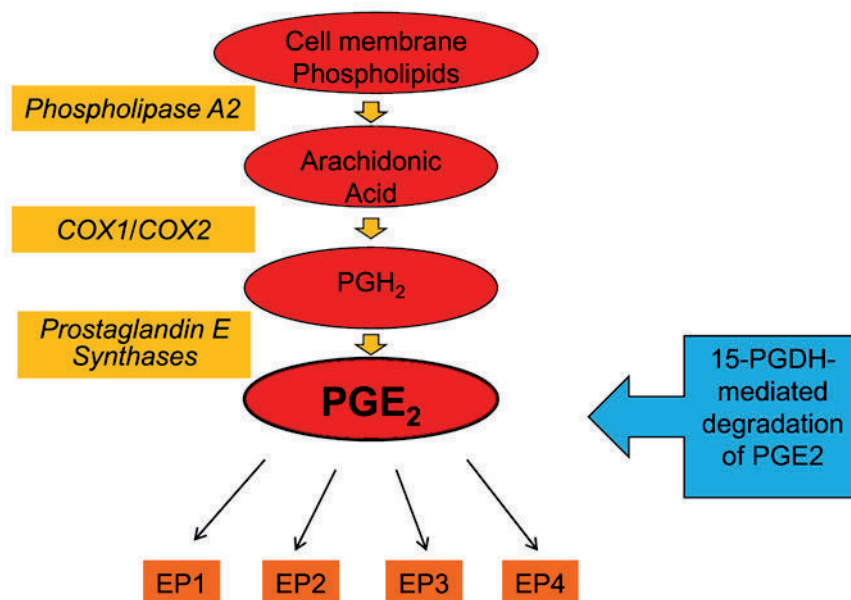
#### 4.1.4 Le gène suppresseur de tumeur TP53

La perte d'hétérozygotie (LOH) d'une cellule est un mécanisme clé de l'inactivation d'un allèle dans les cancers. Elle correspond à la perte du matériel génétique d'un allèle venant de l'un des parents.

Près de 70% des cancers colorectaux présentent une perte d'hétérozygotie du locus 17p qui contient le gène codant pour la protéine P53 (Fearon and Vogelstein, 1990)(Vogelstein et al., 1988). La protéine P53 est un facteur de transcription inactivé dans la majorité des cancers qui participe au maintien de l'intégrité de la cellule. En effet, lorsque la protéine P53 est active, elle induit l'expression de gènes qui conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire ou l'activation de la mort cellulaire programmée par apoptose. L'inactivation de P53 est souvent associée à la transition de l'adénome en adénocarcinome (Fearon, 2011) notamment parce qu'elle favorise la survie cellulaire et la résistance à la mort cellulaire.

#### 4.1.5 Voies de synthèse des prostaglandines

Les enzymes Cox (cyclooxygénases) interviennent dans les réactions qui permettent de produire des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (Fig. 28). Les protéines Cox sont des molécules pro-inflammatoires, leur action est généralement inhibée grâce aux anti-inflammatoires non-stéroïdiens. Dans les cancers colorectaux, la protéine Cox2, l'un des isoformes de Cox, favorise la croissance tumorale. En effet, dans certains modèles murins, le traitement des souris avec des inhibiteurs spécifiques de Cox2 diminue la fréquence de formation des tumeurs.



**Figure 28: Voie de synthèse des prostaglandines.**

L'acide arachidonique est synthétisé à partir des phospholipides de la membrane cellulaire grâce à l'action de la Phospholipase A2. Les cyclo-oxygénases (COX-1 et COX-2) vont ensuite transformer l'acide arachidonique en prostaglandine H2 qui va être à son tour transformée en prostaglandine E2 par l'action des prostaglandines-synthases. La prostaglandine E2 va ensuite stimuler ses quatre récepteurs. La 15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase peut quant à elle dégrader la prostaglandine E2.



#### 4.1.6 Les métalloprotéinases

Les métalloprotéinases (MMPs) sont des enzymes responsables de la dégradation des composants de la matrice extracellulaire. Les MMPs sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, comme la différenciation, la régénération et les remodelages tissulaires. Dans le développement cancéreux, les métalloprotéinases sont impliquées dans les stades tardifs, où elles jouent notamment un rôle clé dans la formation des métastases. En effet, leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire permet aux cellules cancéreuses de s'ouvrir un chemin afin de se déplacer de leur site d'origine vers d'autres organes. La surexpression de ces enzymes est souvent associée à un phénotype agressif du cancer.

## **LES OBJECTIFS**

## LES OBJECTIFS

Au cours de cette introduction, nous avons pu voir que les intégrines sont les principaux médiateurs des interactions entre les cellules et leur microenvironnement, en particulier la matrice extracellulaire. Elles sont également capables d'interagir avec d'autres récepteurs et d'affecter certaines fonctions biologiques. Ces mêmes fonctions biologiques peuvent être dérégulées dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et la carcinogenèse colorectale. Nous avons notamment pu voir que les MICI et les cancers colorectaux étaient des pathologies multifactorielles et séquentielles, impliquant de nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires.

Notre équipe s'intéresse plus particulièrement à l'intégrine  $\alpha6\beta4$ , qui comme on a pu le voir est un composant majeur de l'hémidesmosome. Des études antérieures au sein du laboratoire ont permis de mettre en évidence le rôle de cette intégrine  $\alpha6\beta4$  dans le maintien de l'homéostasie et de l'intégrité de la peau. Plus récemment notre équipe s'est intéressé aux rôles de cette intégrine dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal et a développé un nouveau modèle de souris mutantes  $\alpha6^{\Delta IEC}$  qui développent sans manipulation additionnelle une inflammation chronique intestinale associée à la formation d'adénocarcinomes colorectaux. Ce modèle  $\alpha6^{\Delta IEC}$  correspond à une inactivation ciblée à l'épithélium intestinal de la sous-unité d'intégrine  $\alpha6$ .

Mon projet de thèse a consisté à définir les mécanismes cellulaires et moléculaires qui influencent la transformation des lésions inflammatoires en adénocarcinomes. Pour ce faire, j'ai, dans un premier temps, caractérisé les mécanismes impliqués dans le développement de l'inflammation dans le modèle  $\alpha6^{\Delta IEC}$ , puis j'ai essayé de définir les mécanismes impliqués dans l'inflammation et qui conduisent à la transformation tumorale. Finalement, j'ai tenté d'identifier les événements primaires responsables du déclenchement des mécanismes à l'origine du phénotype en utilisant un modèle inductible  $\alpha6^{\Delta IEC-TAM}$ .

## **MATERIELS ET METHODES**

## MATERIELS ET METHODES

Les « matériels et méthodes » décrits ci-dessous se rapportent aux expériences qui n'ont pas été décrites dans l'article soumis « **Epithelial-specific  $\alpha 6$  integrin deficiency spontaneously triggers colitis-associated** ».

### 1. Souris transgéniques

Toutes les expériences sur les souris ont été réalisées en accord avec les réglementations nationales françaises et les recommandations du comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale (CREMEAS). Les souris villine-CreERT2 proviennent du laboratoire du Dr. S. Robine (el Marjou et al., 2004).

#### **Régime alimentaire à base de nourriture gélifiée**

Le but de cette expérience est de caractériser le rôle des frottements mécaniques produits par la nourriture solide sur le phénotype inflammatoire observé chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Chez ces souris, l'inactivation ciblée de l'intégrine  $\alpha 6$  à l'épithélium intestinal conduit au détachement des cellules épithéliales et à une inflammation. Afin de tester le rôle, sur ces processus, des particules solides contenues dans les croquettes de l'alimentation classique, nous avons soumis les souris à un régime alimentaire exclusivement constitué de nourriture gélifiée, GelDiet CLASSIC (SAFE), visant à éviter une érosion de la muqueuse intestinale. Les souris ont été sacrifiées à l'âge de 9 semaines et comparées à des cohortes ayant reçu une alimentation normale.

#### **Traitement au tamoxifène**

La lignée de souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM a été développée en croisant les souris portant les allèles conditionnels floxés du gène de la sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$  (De Arcangelis et al., en soumission) avec des souris exprimant le gène Cre-ERT2 sous le contrôle du promoteur de la villine (el Marjou et al., 2004). Dans ce modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM, l'inactivation du gène codant pour la sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$  peut être induite par l'administration de tamoxifène. Dans un

premier temps, le traitement a été administré par gavage à des animaux adultes âgés de 8 semaines à raison d'une dose de 10 mg de tamoxifène dans un volume de 300 µl, 3 fois par jour (1 gavage toutes les 4 heures), 1 jour sur 2, pendant 5 jours. Cette dose s'étant révélée toxique pour certains animaux, l'administration de tamoxifène a été réduite à 2 gavages par jour à 8h d'intervalle, selon le même protocole. Ce traitement est suffisant pour induire une délétion homogène et complète du gène ITGA6 15 jours après l'administration de la première dose. La solution stock de tamoxifène a été préparée par dissolution dans du sérum physiologique puis homogénéisée par sonication pour favoriser l'absorption intestinale (concentration finale = 33,33 mg/ml). Les souris ont été sacrifiées deux semaines ou 6 jours après le premier traitement au tamoxifène (Numéro d'autorisation, n° ADA/2012/09/28).

## 2. Analyse de puces à ADN

### **Souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$**

Les échantillons correspondant à des zones tumorales ou inflammatoires préalablement repérées par un anatomopathologiste ont été obtenus par macrodissection sur cryo-coupes de prolapsus rectaux de souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  âgées de 53-80 semaines. Cinq échantillons d'adénocarcinomes et 4 échantillons de la muqueuse adjacente inflammatoire ont été prélevés. Les échantillons témoins ont été prélevés par grattage de l'épithélium du rectum de quatre souris témoins. L'ARN a été extrait avec le kit « RNeasy® Micro Kit » (Qiagen) selon les instructions du fabricant. La quantification et le contrôle de la qualité de l'ARN ont été évalués sur « Agilent 2100 Bioanalyzer ». L'analyse du transcriptome a été réalisée en utilisant les sondes Affymetrix « GeneChip Mouse Gene 1.0ST Array ».

### **Souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ -TAM**

Ces analyses de puces à ADN ont été réalisées sur des échantillons de rectum provenant de 3 souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ -TAM et de 4 souris témoins traitées au tamoxifène, et de 4 souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ -TAM traitées avec du sérum physiologique. L'ARN a été extrait avec le kit « RNeasy® Midi Kit » (Qiagen) selon les instructions du fabricant. La quantification et le contrôle de la qualité de

l'ARN ont été évalués sur « Agilent 2100 Bioanalyzer ». L'analyse du transcriptome a été réalisée en utilisant les sondes Affymetrix « GeneChip Mouse Gene 1.0ST Array ».

### 3. RT-qPCR

L'ARN total a été extrait des échantillons à l'aide du kit RNeasy kit (Qiagen). L'ADNc a été préparé à partir de 1 µg d'ARN total en utilisant le kit Superscript<sup>TM</sup>II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. La réaction PCR a été réalisée à l'aide de « Universal ProbeLibrary System » (Roche Applied Science). Le niveau d'expression des ARNm ont été normalisés par rapport au niveau d'expression de l'ARNm de l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase (HPRT). Ci-dessous un tableau récapitulatif des amorces utilisées.

Gènes	Amorces sens (de 5' vers 3')	Amorces antisens (de 5' vers 3')	Taille des produits PCR (paire de base)
ANK3	cgaatgtcaacctgagcaataa	ccacattcactcggctcttctt	75
APC	ggagtggcagaaagcaacac	ccacacgtgtagctggactc	61
Bmp8	ctgtatgaactccaccaaccac	tggggatgatatctggcttc	71
CCND1	gagattgtgccatcatgc	ctcctcttcgcacttctgct	78
Chst4	ggggagcagctatcacga	cccttcttcaacagcatcat	75
COX2	gatgctctccgagctgtg	ggattaggaacagcaaggattt	75
FOXO3	gctaagcaggcctcatctca	ttccgtcagttgagggtct	92
Gal3St2	tccatcctgagaggcacac	aagtccatgcaggaaacc	95
HPRT	tcctcctcagaccgctttt	cctggtcatcatcgctaadc	90
IL-13	cctctgacccttaaggagcttat	cgttgcacaggggagtct	70
IL-17a	caggagagcttcatctgtgt	gctgagctttgaggatgat	94
IL-18	caaaccttccaaatcacttct	tccttgaagtgacgcaaga	78
IL-1β	agttgacggaccccaaaag	agctggatgctctcatcagg	75
IL-33	ggatgaacatgagtcacatca	cgtcaccccttgaagctc	86
IL-4	catcggcattttgaacgag	cgagctcactctctgtggtg	104
INF-γ	atctggaggaactggcaaaa	ttcaagacttcaaagagtctgaggta	89
ITGA3	agggggagaccagagttcc	gccattggagcaggtcaa	85
ITGB1	tggcaacaatgaagctatcg	atgtcgggaccagtaggaca	53

LAMA1	ccgacaacctcctcttacc	tctccactgcgagaaagtca	60
MMP10	gagtctggctcatgcctacc	caggaataagttggccctga	106
MMP12	ttgtggataaacactactggaggt	aaatcagcttgggtaagca	72
MMP8	aacggaagacatacttctcataa	gggtccatggatcttctttg	71
c-Myc	cctagtgtcatgaggaga	tcttctcatcttctgtcttc	72
Nlrp6	cccgaatgtcatctgagtg	ctctggaggaggccaac	123
PLAU	ggagcagctcatcttgac	cccgtgctggtacgtatctt	90
sST2	cctcacggctctgagcttat	ctgaggtagggtccagaagaga	78
ST2L	agcctgttacctgggcaag	cacctgtcttctgctattctgg	70

#### 4. Extractions protéiques et analyses par Western blot

Les segments intestinaux (colon, rectum, prolapsus rectal) ont été rincés avec du PBS, congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à traitement. Les échantillons de tissu ont été broyés en poudre fine dans de l'azote liquide à l'aide d'un pilon et d'un mortier. Les échantillons ont ensuite été lysés dans du tampon RIPA (150 mM NaCl ; 10mM Tris -HCl , pH 7,4 ; 0,1% de SDS ; 0,01 % de Triton X100 , 1% de désoxycholate de sodium ; 5 mM EDTA, pH 8 ; PMSF 1 mM ; leupeptine 2µg/mL ; 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> , 20 mM de NaF ; 1X Protease Inhibitor Cocktail (Roche)), 30 min à 4°C. Les extraits de protéines totales ont été récupérés après centrifugation à 13 000 rpm, pendant 10 min à 4°C. Pour les extraits de protéines à partir des lignées cellulaires, les cellules ont été lavées avec du PBS et lysées dans du tampon RIPA, comme décrit ci-dessus. Les concentrations en protéines ont été déterminées à l'aide du réactif de dosage BCA (Thermo Fisher Scientific) et des quantités équivalentes de protéines (20 ou 40 µg) ont été déposées et séparées sur un gel en gradient SDS-PAGE 5-8 %. Les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose. Pour évaluer les niveaux de la protéine APC , les membranes ont été saturées dans un tampon PBS contenant 0,1 % de Tween 20 et 0,5% de lait écrémé en poudre, puis incubées avec des anticorps primaires, anti-APC (C-20, Santa Cruz Biotechnology ; Ab1, Calbiochem), anti-lamine A (ab26300) et anti-E-cadhérine (ab53033) (provenant tous deux de Abcam), 2 h à température ambiante. Pour déterminer les quantités de NLRP6 et de Phospho-GSK3β, les membranes ont été saturées dans un tampon TBS (Tris 50 mM , NaCl 150 mM, pH 7,6 ) contenant 0,1 % de Tween 20 et 5% de lait écrémé en poudre, puis incubées en présence des anticorps primaires anti-NLRP6 (E-20, Santa Cruz Biotechnology), anti-Phospho-GSK3β (Ser9) (#9336, Cell Signaling) et anti-β-tubuline (TUB-2A2, UMR7104, Strasbourg, France) 2 h à température ambiante. Après incubation avec les anticorps secondaires adéquats



couplés à la peroxydase HRP (horseradish peroxydase) (Jackson Laboratories ImmunoResearch), les protéines ont été révélées par chimioluminescence à l'aide du réactif Immobilon™ Ouest (Millipore).

## **5. Transfection transitoire des cellules HCT116**

Des tests de mises au point et d'optimisation ont été initialement effectués afin de déterminer les meilleures conditions de transfection transitoire pour la lignée HCT116. 300 000 cellules ont étéensemencées par puits (plaque 6 puits) dans un milieu sans antibiotiques (DMEM 1g/L glucose ; 7,5% de sérum de veau foetal) et cultivées pendant 24h à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont ensuite été transfectées en utilisant l'agent de transfection « Lipofectamine® RNAiMAX » (Invitrogen) selon les instructions du fabricant à l'aide des ARN interférents (siRNA) suivants : le siRNA contrôle (On Target plus siControl Non Targeting siRNA ; Thermo Fisher Scientific) a été utilisé à 30 pmol et le siRNA dirigé contre l'ARNm de la sous-unité d'intégrine α6 (On Target plus Smart Pool Human ITGA6, Thermo Fisher Scientific) a été utilisé respectivement à 30 pmol, 50 pmol et 100 pmol. Après 72 heures, les protéines ont été extraites à l'aide du tampon RIPA comme décrit précédemment.

## **6. Isolation des cellules CD4+**

Les cellules immunitaires de la lamina propria du compartiment colorectal ont été isolées en utilisant le protocole décrit dans l'article soumis (De Arcangelis et al, soumis). A partir de ces cellules, les lymphocytes CD4+ ont été purifiés en utilisant des billes paramagnétiques couplées à un anticorps anti-CD4, « CD4+ T cell isolation Kit II, mouse » séparées sur colonne « MS Columns » selon les instructions du fabricant (MACS Miltenyi Biotec). L'ARNm a ensuite été extrait en utilisant le kit « NucleoSpin® RNA XS » selon les recommandations du fabricant (Macherey-Nagel). L'ADNc a été préparé à partir de 1 µg d'ARN total en utilisant le kit Superscript™II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen) selon les instructions du fabricant.

## 7. Analyses statistiques

Les données des puces ADN Affymetrix ont été traitées par la plateforme de séquençage de l'IGBMC. La significativité des variations du niveau d'expression des gènes analysés entre les différents groupes expérimentaux a été déterminée à l'aide d'un test de Student.

A l'exception des données Affymetrix, les autres analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney sous le logiciel Graph Pad Prism 6.0. Les résultats ont été représentés sous forme de nuages de points, les barres d'erreur correspondant à des écart-types.

Nous avons utilisé le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA) pour établir des liens entre les gènes sélectionnés dans les analyses de puce à ADN. Ce logiciel permet d'analyser à partir d'une liste de gènes et en utilisant une base de données de la littérature, le lien entre différents gènes que nous sélectionnons, les processus biologiques activés (cancer, maladies inflammatoires...) et les régulateurs en amont de ces gènes sélectionnés. Finalement, le programme attribue à chaque analyse un score et une probabilité  $p$  qui permet de déterminer la solidité et validité de l'analyse.

## **RESULTATS**

## I-L'inactivation de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ spécifiquement dans l'épithélium intestinal conduit au développement spontané de cancers colorectaux associés à l'inflammation chez les souris (article soumis à JCI – journal of clinical investigation)

### 1. Contexte et justification de la recherche

L'homéostasie intestinale repose sur un équilibre entre les bactéries présentes dans la lumière, la barrière épithéliale et la réponse immunitaire. L'altération de l'une de ces composantes peut conduire à de graves pathologies. La barrière épithéliale élabore de nombreuses lignes de défenses : physiques, chimiques et immunitaires. Les interactions entre le pôle basal de l'épithélium et la matrice extracellulaire apparaissent comme essentiel à l'homéostasie intestinale, cependant peu de modèles murins s'intéressant à ces interactions ont été développés. Notre équipe s'intéresse à l'un des composants majeurs du pôle basal, l'hémidesmosome, et plus particulièrement à la sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$ . Les récepteurs de la famille des intégrines étant en effet les principaux médiateurs des interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire. Des études antérieures de l'équipe ont pu mettre en évidence l'importance de l'intégrine  $\alpha 6$  dans le maintien de l'homéostasie de la peau et son rôle dans le développement de pathologies telle que l'épidermolyse bulleuse (Georges-Labouesse et al., 1996)(Niculescu et al., 2011). Afin de caractériser le rôle de la sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$  dans l'homéostasie intestinale, notre laboratoire a établi récemment un nouveau modèle de souris mutante  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  qui correspond à une inactivation ciblée de l'intégrine  $\alpha 6$  dans l'épithélium intestinal. Ces souris mutantes  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  développent (sans manipulation additionnelle) une inflammation chronique intestinale associée à la formation d'adénocarcinomes colorectaux.

## **2. Résumé des principaux résultats de l'article**

Plusieurs mécanismes interviennent simultanément au cours de la progression du phénotype dans le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Dans cette étude nous avons décrit les principaux mécanismes cellulaires et moléculaires qui après la perte de l'une des composantes du pôle basal conduisent progressivement au développement d'inflammation chronique et de cancers colorectaux.

### **2.1 Désorganisation des structures d'ancrage au pôle basal et perte de l'intégrité de la barrière épithéliale chez les souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$**

L'absence de l'intégrine  $\alpha 6$  aboutit à une désorganisation des structures d'ancrage et du cytosquelette (délocalisation de la pléctine et des kératines 8/18). De plus la perte de cette structure d'ancrage qu'est l'hémidesmosome conduit à la fragilisation de l'épithélium intestinale qui se traduit par un détachement excessif de cellules épithéliales et une augmentation de la perméabilité chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Cependant, la perte de l'intégrine  $\alpha 6$  n'affecte pas de manière importante les caractéristiques d'adhérence intercellulaire et de polarité épithéliale.

### **2.2 Altération et hypersécrétion de mucus**

Dès les stades précoces (juste après sevrage), l'intestin mutant présente une hypersécrétion de mucus, reflétant une anomalie et un stress affectant le tissu. Des colorations histologiques à l'acide périodique de Schiff et au bleu alcian sur des coupes de côlon mutant inflammatoire ont révélé un déséquilibre dans la composition du mucus, avec une surproduction de mucines de type acide. Le niveau d'expression de Muc2 et Muc4 ne change pas de manière significative. Néanmoins, des altérations affectant la qualité du mucus, en particulier des anomalies de glycosylation et sulfatation des mucines, pourraient être à l'origine des défauts de perméabilité et de perte d'intégrité de la barrière épithéliale. Des analyses du niveau d'expression de Chst4 et Gal3st2, deux enzymes impliquées dans la

maturation du mucus, ont permis de mettre en évidence une altération de ces dernières chez les souris mutantes.

### 2.3 Ségrégation anormale de bactéries et dysbiose

La détection des bactéries par FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) associée à un marquage de l'épithélium par la mucine Muc2 ont permis de mettre en évidence des zones de contact direct entre les bactéries et les cellules épithéliales chez les souris mutantes alors que chez les souris contrôles l'épithélium intestinal est bien protégé des bactéries par le mucus. A partir d'analyses de pyroséquencage on a pu démontrer un déséquilibre de la flore commensale à 9 semaines avec une diminution des *campylobacterales*.

### 2.4 Inflammation

Les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  présentent très tôt des signes d'inflammation qui se traduisent 10 semaines après la naissance par le développement d'un prolapsus rectal. Ceci est corrélé à une augmentation significative de la prolifération cellulaire (marquages BrdU et Ki67) et de la hauteur des glandes ainsi qu'à une infiltration de cellules immunitaires CD11b+ et de cellules CD4+. L'analyse des différentes populations de cellules inflammatoires par FACS sur la rate et la lamina propria des souris ont permis d'identifier une augmentation des neutrophiles et macrophages chez les mutants comparés aux témoins. De plus, le dosage de plusieurs cytokines pro-inflammatoires ont permis de démontrer l'augmentation de la sécrétion des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 dans le colon chez les souris mutantes.

### 2.5 Des traitements antibiotiques diminuent partiellement le phénotype, ceci est corrélé à la diminution de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ et d'IL-18 chez les souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$

Afin de définir plus finement le rôle de la flore bactérienne dans le développement du phénotype dans notre modèle, nous avons effectué des traitements antibiotiques (ATB) sur

des souris mutantes et témoins âgées de 6 semaines, afin d'éliminer les bactéries de la flore intestinale. Les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  traitées aux ATB présentent une diminution de l'inflammation comparées aux souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  non traitées aux ATB. Ceci est corrélé à une diminution significative de la hauteur des glandes et de l'infiltration de cellules CD11b positives. De plus, le dosage des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18, a permis de mettre en évidence un retour au niveau basal de la sécrétion de IL-1 $\beta$  et une diminution partielle de la sécrétion d'IL-18 chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  traitées aux ATB comparées aux souris non traitées. De manière intéressante, ces résultats évoquent que la sécrétion d'IL-18 n'est que partiellement dépendante des bactéries.

## 2.6 Rôle de l'immunité adaptative

Les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  développent toutes des adénocarcinomes de différents grades allant de la tumeur in situ au carcinome hautement infiltrant dans un délai de 10-12 mois. Les lésions sont principalement localisées dans le rectum, plus rarement dans le côlon. Pour analyser plus précisément le rôle de l'immunité adaptative, nous avons croisé les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  avec les souris *Rag1*<sup>-/-</sup>, qui ont une absence de différenciation des lymphocytes T et B. A des stades inflammatoires, les souris doubles mutantes  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  *Rag1*<sup>-/-</sup> présentent les mêmes signes d'inflammation que les souris simples mutantes  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Ceci suggère que l'immunité adaptative joue peu de rôle dans l'établissement de l'inflammation chronique, et que celle-ci est dépendante de l'immunité innée. Cependant, par des analyses histologiques et anatomopathologiques à des stades tardifs (1 an), nous avons pu observer de manière saisissante que les souris doubles mutantes  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  *Rag1*<sup>-/-</sup> ne présentaient que des lésions de bas grade alors que les souris simples mutantes  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  présentaient des carcinomes. Ces résultats suggèrent que l'immunité innée est probablement impliquée dans l'établissement de l'inflammation alors que l'immunité adaptative est impliquée dans le développement de tumeurs.

### 3. Les principales conclusions de l'article

-La sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$  est essentielle au maintien de l'homéostasie intestinale, son inactivation conduit au développement spontané d'inflammation chronique et de cancers colorectaux.

-L'absence de l'intégrine  $\alpha 6$  conduit à la perte de la barrière épithéliale, une augmentation de perméabilité, une altération du mucus et une dysbiose.

-L'inflammation est caractérisé par une hyperprolifération, une infiltration de cellules CD11+ et une hypersécrétion des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18

-L'inflammation est indépendante de l'immunité adaptative et partiellement dépendante des bactéries.

-Les traitements antibiotiques diminuent clairement la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et l'infiltration de cellules CD11b+ mais ne diminuent que partiellement la sécrétion d'IL-18

-D'autres mécanismes sont impliquées dans la sécrétion d'IL-18

-Le développement de cancers colorectaux chez  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  est fortement dépendant du système immunitaire adaptatif.

Le phénotype observé chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  est multifactoriel et implique de nombreux mécanismes. Des analyses complémentaires liées directement ou indirectement à cet article seront détaillé respectivement dans les chapitres 2 et 3 des résultats.



# ARTICLE

## **Epithelial-specific $\alpha 6$ integrin deficiency spontaneously triggers colitis-associated colorectal cancer**

Adèle De Arcangelis <sup>1-4\*</sup>, Fabien Alpy <sup>5,§</sup>, Sylvain Normand <sup>6-9</sup>, Hussein Hamade <sup>1-4</sup>, Emilie Bruyère <sup>10</sup>, Olivier Lefebvre <sup>4,5,11,12</sup>, Agnès Méchine-Neuville <sup>5,13,§</sup>, Stéphanie Siebert <sup>1-4</sup>, Véronique Pfister <sup>1-4</sup>, Romain Dassonneville <sup>6,14,15</sup>, Christophe Audebert <sup>14,15</sup>, David Hot <sup>6-9,14</sup>, Sophie Rodius <sup>1-4,#</sup>, Sylvie Robine <sup>16,17</sup>, Michèle Kedinger <sup>5</sup>, Isabelle Van Seuningen <sup>9,10</sup>, Michel Labouesse <sup>1-4\*</sup>, Patricia Simon-Assmann <sup>4,5,11,12</sup>, Mathias Chamaillard <sup>6-9</sup> and Elisabeth Georges-Labouesse <sup>1-4,18</sup>

<sup>1</sup> IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Department of Development and Stem Cells, Université de Strasbourg, Illkirch, F-67404, France

<sup>2</sup> INSERM, U964, Illkirch, F-67404, France

<sup>3</sup> CNRS, Unité Mixte de Recherche 7104, Illkirch, F-67404, France

<sup>4</sup> Université de Strasbourg, Strasbourg, F-67000, France

<sup>5</sup> INSERM, U1109, MNT3 team, Strasbourg, F-67200, France

<sup>6</sup> INSERM, U1019, F-59019 Lille, France

<sup>7</sup> Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, F-59019, France

<sup>8</sup> CNRS, Unité Mixte de Recherche 8204, Lille, F-59021, France

<sup>9</sup> Université Lille Nord de France, Lille, F-59000, France

<sup>10</sup> INSERM, Unité Mixte de Recherche 837, Jean-Pierre Aubert Research Center Team 5 « Mucins, epithelial differentiation and carcinogenesis », Lille, F-59045, France

<sup>11</sup> LabEx Medalis, Université de Strasbourg, Strasbourg, F-67000, France

<sup>12</sup> Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, F-67000, France

<sup>13</sup> CHRU Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Service d'anatomo-pathologie, Strasbourg, F-67200, France

<sup>14</sup> PEGASE-Biosciences, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette, Lille, F-59019, France

<sup>15</sup> GENES DIFFUSION, 3595, route de Tournai, Douai, F-59501, France

<sup>16</sup> Institut Curie, Paris, F-75005, France

<sup>17</sup> CNRS, Unité Mixte de Recherche 144, Paris, F-75005, France

<sup>18</sup> This work is a warm tribute to Elisabeth who initiated this study and supervised it until passing away in July 2012

§ Present address: IGBMC, Department of Functional Genomics and Cancer, Illkirch, F-67400, France

# Present address: *CRP-Santé*, NORLUX Neuro-Oncology Laboratory, L-1150, Luxembourg

\$ Present address: Département de Pathologie, Institut Bergonie, Bordeaux, F-33076, France

\* Authors for correspondence: [adele@igbmc.fr](mailto:adele@igbmc.fr), [lmichel@igbmc.fr](mailto:lmichel@igbmc.fr)

The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Keywords:** integrin, laminin, ulcerative colitis, colorectal cancer, innate immunity, *Rag1*

## Abstract

The maintenance of intestinal homeostasis relies on an efficient epithelial barrier function. It involves self-renewal of the epithelium and complex microbiota-immune system interactions. Damage in this barrier can lead to the development of inflammatory bowel diseases and possibly go up to induce cancer. Here we show that proper attachment of the epithelium to the basement membrane (BM) via hemidesmosomes is crucial to maintain intestinal mucosal integrity and homeostasis, by preventing inflammation and tumorigenesis. Genetic ablation of  $\alpha 6$  integrin from intestinal epithelial cells (IECs) ( $\alpha 6^{\Delta IEC}$ ) was sufficient to spontaneously trigger fully penetrant Ulcerative Colitis (UC)-like lesions and colorectal cancer. Loss of  $\alpha 6$  integrin resulted in epithelial barrier damage associated with enhanced permeability and impairment of the mucus layers promoting attachment of commensals to the epithelium. Mechanistically, impaired barrier function triggered inflammation due to bacterial dysbiosis and did not involve adaptive immunity. Inflammation characterized by epithelial hyperplasia, strongly increased IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion, and CD11b<sup>+</sup> myeloid cell infiltration, was significantly improved by broad-spectrum antibiotic treatment. By contrast, a *rag1* mutation compromising the adaptive immune response did not reduce inflammation in  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice. Unexpectedly, the spontaneous development of adenocarcinomas required B and T lymphocytes. This model demonstrates the essential role of cell / BM interactions in intestinal homeostasis. It represents an invaluable tool to study the mechanisms involved in the development of colitis-associated colorectal cancer and the search for new therapeutic targets.

## Introduction

Intestinal homeostasis depends on a fine symbiosis between the intestinal immune system and the trillions of commensal bacteria, commonly referred to as the microbiota. The polarized intestinal epithelium, with its mucus layer on its apical side and the basement membrane on its basal side, plays a critical and complex role in this homeostasis (1, 2). In particular, the epithelium forms a physical barrier to the luminal environment and promotes a robust antimicrobial response when enteropathogens breach this barrier. Whereas numerous studies have examined the protective role played by the mucus layer on intestinal homeostasis and the development of intestinal bowel diseases (3-10), the potential role of the epithelial-basement membrane interactions in intestinal homeostasis and disease has been largely overlooked (11).

Inflammatory Bowel Diseases (IBD) are characterized by chronic inflammation and gastrointestinal tissue damage (2, 12-14). The two major IBD forms, Crohn's Disease (CD) and Ulcerative colitis (UC), differ in part by the damaged area: CD affects the entire intestine and predominantly the ileum, whereas UC affects the colorectal area; CD can develop transmural inflammation, whereas UC is more restricted to the mucosa (14). IBD patients have twice the risk of developing a colorectal cancer (CRC) than the average population (12, 13). Importantly, tumour lesions of genetic origin were found to cause systemic microbial invasion following deterioration of the mucosal barrier in mice (15).

Mouse IBD models have outlined the importance of preserving the mucus layer and epithelial junctional integrity for maintaining intestinal homeostasis; they have also outlined the importance of the endoplasmic stress response in the epithelium, and of

both the innate and adaptive immune systems (16). Mechanistically, numerous cytokines have been shown to influence disease progression (16, 17), along with the inflammasome, which contributes to repair the wounded epithelium and maintain tissue homeostasis (5, 18-21). Developing curative treatments for IBD patients requires identifying the pathways that mediate inflammation.

A systematic functional analysis of the integrins mediating intestinal epithelial cell (IEC) interactions with the basement membrane has not yet been carried out. Among the major mediators of these interactions is the  $\alpha 6$  integrin that binds distinct laminin isoforms. Alpha6 integrin subunit forms two heterodimers,  $\alpha 6\beta 1$  and  $\alpha 6\beta 4$ . Of these two receptors,  $\alpha 6\beta 4$  is the main receptor present in IECs where it forms specific junctions, the hemidesmosomes, that interconnect the basement membrane laminin-332 to the keratin intermediate filaments, by interacting with plectin (22). Alpha6 integrin also recognizes other laminin isoforms that contain  $\beta 1$  and  $\gamma 1$  chains in particular the laminin-511, and can promote the migration of carcinoma cells (23, 24). Analysis of genetic diseases in humans, such as epidermolysis bullosa, where the central components of hemidesmosomes, integrin  $\alpha 6\beta 4$  or laminin-332, are mutated or missing have clearly established that  $\alpha 6\beta 4$  integrin is essential for the maintenance of skin integrity and homeostasis (22, 25). In addition, other studies showed that some patients suffering from epidermolysis bullosa or from the auto-immune bullous pemphigoid, a skin disorder also linked to hemidesmosome-defects (22), can develop intestinal erosions that are reminiscent of UC (26-28). In mice, genetic ablation of  $\alpha 6\beta 4$  integrin also results in a phenotype resembling human epidermolysis bullosa (29, 30), while targeted deletion of  $\alpha 6$  integrin in basal keratinocytes induces a phenotype of skin inflammation resembling psoriasis (31), a skin defect frequently observed in IBD patients (32). Furthermore, independent Genome-Wide-Association Studies revealed

that mutations in the laminin  $\beta$ 1 chain (*LAMB1*) and in the laminin  $\gamma$ 1 chain (*LAMC1*) genes, which encode components of the basement membrane, predispose to UC (27, 33) and colorectal cancer (17). These data hint at a potential implication of  $\alpha$ 6-integrin in intestinal epithelial homeostasis.

To investigate this possibility, we generated a new mouse model carrying a targeted deletion of the integrin  $\alpha$ 6 gene (*Itga6*) in intestinal epithelial cells, which we named the  $\alpha$ 6 <sup>$\Delta$ IEC</sup> line. Strikingly, with time all mutant animals developed mild to severe inflammation in the colorectal area, which spontaneously degenerated into adenocarcinomas. Here we describe this unique model of UC/colitis-associated colorectal cancer, which demonstrates for the first time the central role of the epithelial cell/basement membrane connection at the interface between the gut microbiota and the immune system. Mechanistically, we further define the cellular signature of the innate and acquired immune response triggered by epithelial cell detachment, and we probe the consequences on the spatio-temporal segregation of commensals from the epithelial surface. In addition, we provide evidence of a sequential contribution of the innate and adaptive immunity during disease progression, which is improved by broad-spectrum antibiotics.

## Results

### Genetic ablation of *Itga6* in intestinal epithelial cells impacts on intestinal barrier function

Deletion of *Itga6* in IECs upon expression of a *Villin-Cre* transgene effectively removed the  $\alpha6$  integrin chain from intestinal epithelial cells (Figure 1A, B, and D; Supplemental Figure 1 and Supplemental Figure 2A), as well as its heterodimerizing partner within hemidesmosomes, integrin  $\beta4$ , which was also absent throughout the intestinal epithelium at all stages examined (Figure 1C; Supplemental Figure 2B). The remaining signal in Figure 1B and D corresponds to the staining of integrin  $\alpha6$  in the blood vessels, confirming the specificity of the deletion in the epithelium. By contrast, expression of integrin  $\beta1$ , which can heterodimerize with  $\alpha6$  and other  $\alpha$  chains, did not vary in the epithelium (Supplemental Figure 2C). Thus, we assume that most defects observed in these mice originated from a loss of the  $\alpha6\beta4$  integrin in the epithelium.

A well-established function of  $\alpha6\beta4$  integrin is to nucleate hemidesmosome assembly and maintain epithelial integrity in the skin (29-31). We examined whether they fulfill a similar role in the intestine. *Itga6* depletion induced hemidesmosome assembly defects and epithelial fragility once animals started to feed after birth. As illustrated in Figure 1E-F, staining for the core hemidesmosome components, plectin and keratin 8/18, revealed abnormalities. Plectin interacts with the  $\beta4$  integrin cytoplasmic domain, and forms basal patches in close apposition with the basement membrane (marked by collagen IV staining in Figure 1E), but also marks the apical membrane. In  $\alpha6^{\Delta IEC}$  mice, plectin staining was strongly reduced basally but not apically starting in late embryos (Figure 1E, Supplemental Figure 2D). Moreover, the K8/K18 keratin intermediate filament dimers, which normally are concentrated in the plectin



patches basally, were diffusely distributed throughout the cytoplasm (Figure 1F). As a result, epithelial cells appeared less columnar and more cuboidal in shape than in WT controls (Figure 1F). Co-staining with collagen IV revealed that the epithelial layer tends to detach from its basement membrane and the subjacent lamina propria (Figure 1E-F). Although immunolabeling of the laminin  $\gamma 2$  chain, the specific hemidesmosomal ligand of  $\alpha 6\beta 4$  integrin, showed no obvious difference between WT controls and mutants (Figure 1G), overexpression was observed at the transcriptional level in  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  young mice (Supplemental Figure 3A). Despite these strong defects, the intestinal epithelium retained characteristic differentiated features, such as villin, a structural component of microvilli, and the tight junction marker cingulin (Supplemental Figure 4). Hence, like in the skin where it nucleates type I hemidesmosomes (containing BP180 and BP230),  $\alpha 6\beta 4$  integrin is essential to the assembly of type II hemidesmosomes (lacking BP180 and BP230) present in the intestine (34).

To functionally assess epithelial integrity in mutant mice, we first, analyzed intestinal histological haematoxylin/eosin-stained sections from animals perfused with paraformaldehyde prior to dissection to avoid artefacts due to mechanical stress. We observed areas of epithelial detachment throughout the mutant intestine even in the colon where usually cell shedding is rarely found, from early stages of development as before weaning (Figure 2A, Supplemental Figure 5). To investigate whether these morphological changes were associated with loss of epithelial barrier function, we fed 6-week old mice with FITC-dextran by gavage and measured FITC levels in the blood. We observed a significant increase in intestinal permeability in  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice (Figure 2B). Surprisingly, despite the morphological and permeability defects, the absorption function was maintained in the  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mutant intestine, since the animals did not lose

weight (Supplemental Figure 6), as has been observed in many other cases of mucosal barrier defects (21, 35). Thus,  $\alpha 6$  integrin loss in IECs impairs hemidesmosome formation, epithelial morphology and barrier function.

The mucus layer plays a protective role in intestinal homeostasis with commensals (2, 6). Notably, mice carrying missense mutations of the secreted mucin Muc2 display an UC-like phenotype, and *Muc2*<sup>-/-</sup> mice experienced enhanced bacterial translocation (36), abnormal epithelial-bacterial signaling (37), are more susceptible to develop colitis (9) and develop colorectal carcinomas (10). Young  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice (6 weeks) showed an apparent imbalance in neutral versus acidic secreted mucins, as revealed by Periodic Acid Schiff/Alcian Blue (PAS/AB) staining (Figure 3A). However, the proportion of goblet cells within glands remained unchanged (ratio PAS/AB+ cells over total number of cells was  $59.0 \pm 4.6$  % for controls and  $59.7 \pm 2.7$  % for  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice, N=3). Both PAS/AB staining and Muc2 immunostaining showed abundant mucus discharge in the lumen of the mutant colon (Figure 3A and B). The Muc4 mucin was also found in the lumen. Interestingly, RT-qPCR analysis revealed significant and opposite changes for transcripts encoding two sulfotransferases, involved in sulfation of mucin O-glycan side chains in the secretory pathway, Chst4/carbohydrate (chondroitin 6/keratan) sulfotransferase 4 and Gal3st2 (galactose-3-O-sulfotransferase 2) (Supplemental Figure 3B and C). By contrast, no major change in transcript levels for Muc2 and Muc4 was observed (data not shown), suggesting that some properties of the mucus layer might be altered consequently to changes in the sugar moiety of secreted intestinal mucins.

**Enhanced colonization of the colon epithelial surface by bacterial commensals in  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice.**

Alterations of epithelium integrity may favor physical interaction of bacteria with the epithelium, which may subsequently alter the composition of the intestinal microbiota and confer disease risk (7). To test this hypothesis, we examined the spatial segregation of the microbiota from the epithelium of  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice using Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) to detect bacterial 16S ribosomal RNA, together with antibodies against the Muc2 positive layer to delineate the mucin layer and the epithelial border in the distal colon. Compared to control intestines where bacteria are clearly separated from the Muc2-secreting IECs (double-headed arrows in Figure 3C), bacterial colonization of the colonic epithelial surface was enhanced in mutant animals, as judged by the presence of bacterial 16S RNA in direct contact with epithelial cells (Figure 3C). Furthermore, a culture-independent analysis of the mucosal-associated microbiota at the rectum/anus was performed by multiplex pyrosequencing of V3-V4 region amplicons of bacterial 16S rRNA genes. Multivariate principal component analysis (PCA) highlighted significant changes of the bacterial composition at the rectal mucosa of 9-week old mutant mice when compared to that in control animals (Figure 3D). In contrast, no significant changes was observed between control and mutant animals before weaning (Figure 3D), suggesting that disease onset may precede changes on the composition and structure of the microbial communities. More importantly, we observed a significant decreased abundance of commensals related to the *Campylobacterales* ( $p < 0.02$ ) that belongs to the *Epsilon Proteobacteria* (Figure 3E). Hence, loss of *Itga6* can rapidly alter epithelial integrity, which in turn might impair segregation and composition of the microbiota to influence disease risk. The  $\alpha 6\beta 4$  integrin is therefore essential to maintain epithelial barrier function and bacterial symbiosis in the gut.

## **Intestinal inflammation in $\alpha 6^{\Delta IEC}$ mice is independent of the adaptive immune response**

IBD are characterized by progressive inflammation subsequent to mucosal barrier defects; we therefore investigate whether  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice also develop intestinal inflammation.

At a global level,  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice experienced abnormally loose and viscous stools indicative of mucus discharge, which was already apparent even before weaning (Figure 4A; data not shown). At 6 to 8 weeks, all  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice showed signs of inflammation characterized by a rectal prolapse or by the irritation and bleeding of the recto-anal mucosa, which was never observed in control littermates (Figure 4A). At the histological level, the intestinal wall appeared thickened throughout the colorectal region (Figure 4B, Supplemental Figure 5B and B'). Staining of intestinal sections from young adults for BrdU incorporation as a proliferation marker revealed approximately two-fold more positive cells in the colon and the rectum, but not in the jejunum of  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice compared to WT controls (Figure 4C-D). In addition, mutant glands in the colon were on average twice more elongated (Figure 4E). Tissue enlargement, epithelial hyperplasia, development of rectal prolapse and recto-anal inflammation were observed very rapidly after weaning suggesting that  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice develop chronic inflammation, specifically in the distal large intestine area where the bacterial load is the highest.

Studies of mouse models have strongly suggested that intestinal inflammation results from an abnormal exposure of the innate immune system to commensal microbiota, followed by dysregulation of the adaptive immune system (16). We thus examined whether inflammation in  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  intestines follows this general framework. We first defined the immunological profile of  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice by flow cytometry sorting (FACS) of

immune cells isolated from the colonic lamina propria (called lamina propria mononuclear cells or LPMC). We observed a 3-5-fold increase in CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes and of several myeloid cells, including neutrophils, dendritic cells (DC) and monocytes in  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice (Figure 5). Notably, there was a >40-fold increased recruitment of Ly-6G<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> neutrophils within the intestinal mucosa of mutant mice when compared to that in controls (Figure 5B). By contrast, the number of CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes and of inflammatory monocytes did not vary (Figure 5). These results show a massive influx of mainly myeloid cells, but also CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes into the mutant large intestine. Histological analysis confirmed the presence of extensive immune cell infiltrates in the mutant colon/rectum/prolapse area (Supplemental Figure 7A). Consistent with FACS analyses, immunohistochemical analysis revealed the presence of numerous CD11b-reactive cells infiltrated within the colonic mucosa of mutant mice (Figure 6A-A'). However, while CD4<sup>+</sup> T cells were detectable by immunostaining, it was not possible to distinguish significant differences between WT and mutant mice (Figure 6B-B').

As inflammation can trigger increased CD11b<sup>+</sup> myeloid cell levels in the spleen to promote repair (38, 39), we examined the spleen immune profile of  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  animals. To do so, we performed FACS analysis on spleens of wild-type and mutant animals (Figure 7A and B; Supplemental Figure 8). Interestingly, whereas no difference was observed in the number of T or B-lymphocytes (Figure 7A; Supplemental Figure 8A) the mutant spleens showed a highly significant 3- to 4-fold increase in CD11b<sup>+</sup> myeloid-populations, including macrophages and neutrophils (Figure 7B). Similar results were obtained with different age-group mice; furthermore, there was no difference between animals raised in conventional or Specific Pathogen Free (SPF) conditions (Figure 7A and B; Supplemental Figure 8B). Thus,  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mutant mice show inflammatory lesions

characterized by the local influx in the distal large intestine of CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes and different subsets of myeloid cells, associated with a significant accumulation of CD11b<sup>+</sup> cells in the mutant spleen.

To test the relative role of T lymphocytes and myeloid cells to the intestinal phenotype of the  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice, we crossed  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice with *rag1*<sup>-/-</sup> mice, which lack mature B and T lymphocytes (40). Remarkably, *rag1*<sup>-/-</sup>  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  double mutant mice still developed colitis with high levels of myeloid cells infiltrated in the spleen (Figure 7C) as well as within the colonic mucosa of mutant mice (Figure 6C-C'), suggesting that inflammation onset is indeed independent of lymphocytes. Histopathological analyses confirmed that the intestinal phenotype of *rag1*<sup>-/-</sup>  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  double mutant animals was as severe as that of single  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mutant mice reared in SPF conditions, with the presence of large immune infiltrates throughout the colorectal mucosa (Supplemental Figure 7B).

To define the pathways mediating inflammation, we examined the levels of the well-characterized pro-inflammatory cytokines, namely IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-18, and TNF $\alpha$ . Specifically, we determined cytokine levels of small resected colon specimens from young adults by ELISA after 24-hour culture. We found that IL-1 $\beta$  and IL-18 levels were 20 times higher in 9-week old mutant compared to control mice (Figure 8), and that levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 in individual samples were significantly correlated (Supplemental Figure 9A). Notably, the levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 were similar in control and mutant  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice before weaning (2-3 weeks), suggesting a role for the microbiota in increased cytokine levels in the adult mutant animals (Figure 8). By contrast, we failed to detect changes in TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-17 (Supplemental Figure 9B). To test whether inflammation was initiated in response to dysbiosis, we treated animals for 3 weeks with a cocktail of broad-spectrum antibiotics (starting at 6 weeks of age) prior to

collecting intestinal explants. Overall, the antibiotic treatment improved the phenotype by reducing the number of CD11b<sup>+</sup> cells infiltrated into the mutant colonic mucosa (Figure 6A'), while it has no major effect on CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 6B'). In addition, antibiotics strongly reduced the levels of IL-1 $\beta$  to those observed in untreated control animals, and halved those observed for IL-18 (Figure 8), suggesting a role for bacterial dysbiosis in the inflammatory response.

Taken together, these data indicate that mutants develop chronic inflammation, which is restricted to the colorectal area as observed in UC patients. Its initiation is mainly associated with cells of myeloid origin and is independent of adaptive immunity. However, the *in situ* presence of an increased number of CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes in mutant intestines may suggest a role for T lymphocytes in maintenance or amplification of the inflammatory response.

### **Spontaneous and adaptive immunity-dependent formation of adenocarcinomas in all $\alpha 6^{\Delta IEC}$ mutant mice**

Animal models of Ulcerative Colitis can develop adenocarcinomas, albeit at a low prevalence unless treated with Dextran Sodium Sulphate and Azoxymethane (16, 41). By contrast, we observed that all  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice developed colorectal adenocarcinomas by one year of age, and without any further treatment. Noteworthy, adenocarcinomas were mostly located in the rectal prolapse (Figure 9A). Histopathological analyses revealed different degrees of mucosal infiltration (Figure 9B). We observed numerous Ki-67 positive cells, a marker of cell proliferation, in invading glands at the surface of the rectal prolapse (Figure 9D). Among 11 young mutant mice (10-31 week old), six displayed

low-grade dysplasias, and two mice aged 10 and 15 weeks had adenocarcinomas (one being infiltrating) (data not shown). Among 14 older mutant mice (48-80 week old), all had adenocarcinomas (Figure 9E). Among the four most infiltrating tumours, three were mucinous adenocarcinomas, with the presence of over 50% mucus-secreting tumoral cells. Mucus accumulation, positive for PAS/AB, Muc2 and Muc4 staining, was observed in the lumen of the mutant glands, in large mucus lakes as well as in the muscle layers for the most infiltrating mucinous adenocarcinomas (Supplemental Figure 10). Tumours were mostly present in the rectum, and rarely in the small intestine, since only 2 out of 8 animals examined by histological analysis had small intestinal tumours. Noteworthy, even if  $\alpha6\beta4$  integrin is normally present along the entire intestine, inflammation and tumorigenesis were mostly distal in  $\alpha6^{\Delta IEC}$  mice, as commonly found in UC patients. Lastly, histopathological analysis of  $\alpha6^{\Delta IEC}$  mutants showed a frequent invasion of cancer cells within the stromal compartment (Figure 9B), as often observed in human colorectal cancers observed in UC patients (42). We conclude that the absence of  $\alpha6\beta4$  integrin in IECs spontaneously results into colitis-associated carcinogenesis.

As reported above, the adaptive immune system does not play an obvious role in the onset of inflammation, since  $rag1^{-/-} \alpha6^{\Delta IEC}$  double mutants had the same apparent degree of inflammation as single  $\alpha6^{\Delta IEC}$  mutants (Supplemental Figure 7B). To define whether or not the adaptive immune system might also be dispensable for progression to adenocarcinoma, we compared single  $\alpha6^{\Delta IEC}$  and  $rag1^{-/-} \alpha6^{\Delta IEC}$  double mutants raised in SPF conditions. Out of 8  $\alpha6^{\Delta IEC}$  animals aged 45-76 weeks, 3/8 had developed an adenocarcinoma, 1/8 displayed a severe dysplasia, whereas the remaining 4/8 had inflammation (Figure 9E). By contrast, none of the  $rag1^{-/-} \alpha6^{\Delta IEC}$  double mutants (6/6) developed an adenocarcinoma; rather they showed very discrete low grade dysplasia



lesions (4/6) and inflammation (6/6) (Figure 9C, E), suggesting a critical role for the adaptive immune response in disease progression.

Alterations in the expression and distribution of different laminins are often observed in cancer (reviewed in ref. (11)). Overexpression of the  $\gamma 2$  chain of laminin-332, the major integrin  $\alpha 6\beta 4$  ligand in hemidesmosomes, is associated with poor prognosis due to its pro-invasive properties. We therefore looked at the expression of the laminin  $\gamma 2$  chain in rectal tissues from animals aged one year and over. As illustrated in Figure 10, the laminin  $\gamma 2$  signal formed a decreasing gradient from the surface epithelium to the base of the glands in the wild-type rectum, whereas large deposits were present all along the glands in mutant rectal prolapse. Increased expression was also detected at the transcriptional level in mutant large intestine when compared to that in controls (Supplemental Figure 3A).

Altogether, we conclude that the worsening of the disease is associated with alterations in the microenvironment. Mechanistically, the inflammation observed in  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice primarily involves myeloid cells rather than lymphocytes, whereas tumour progression requires the adaptive immune system.

## Discussion

We report for the first time the key physiological function of the  $\alpha 6$  integrin-mediated signaling in intestinal epithelial cells in preventing colitis and colitis-associated carcinogenesis in mice. All  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  animals had early signs of inflammation starting soon after weaning, and spontaneously developed adenocarcinoma within one year without any additional chemical treatment. Our data suggest that the sequence of events leading to inflammation and tumorigenesis entail loss of hemidesmosomes, epithelial detachment from the extracellular matrix, a defective intestinal barrier function, dysbiosis, the exposure of immune cells to bacterial and potentially other luminal components, chronic inflammation mediated by innate myeloid cells, and lymphocyte-dependent malignant transformation (Figure 11). The cytokines involved in the inflammatory response include IL-1 $\beta$  and IL-18. Their increased secretion together with dysbiosis have been linked to disease risk (43), suggesting a detrimental response to the microbiota in the absence of  $\alpha 6\beta 4$  integrin.

We suggest that the inflammation is triggered by defective  $\alpha 6\beta 4$  integrin function at the hemidesmosome. Indeed,  $\beta 4$  integrin, rather than  $\beta 1$  integrin, was absent at the basal side of the epithelium. This is consistent also with the fact that  $\beta 1$  integrin depletion in the intestine leads to more severe phenotypes (44). We further suggest that the absence of hemidesmosomes is the key initiating event triggering all defects from the initial epithelial cell detachment to enhanced epithelial cell proliferation, and dysbiosis. However, it is worth noting that the  $\alpha 6$  subunit may play a role regardless of its association with  $\beta 4$  as the specific loss of  $\alpha 6$  integrin in the skin causes a more severe and penetrant phenotype than that associated with the loss of  $\beta 4$  integrin.

The localization and nature of the lesions observed in the  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  model recapitulate global, cytological, cellular and/or immune hallmarks common to UC rather than CD. In particular, like mouse models deficient for LRRK2, Nlrp6, p120-catenin or core-1-O-glycans (3, 18, 19, 21, 45, 46), the inflammatory response involved neutrophils and macrophages rather than lymphocytes. Moreover, we found that the balance of *Gal3st2* versus *Chst4* transcripts was abnormal like in some adenocarcinomas, which can be linked to the observation that mucins often display reduced sulfation in intestinal adenocarcinoma mice models (47-49). Lastly, genetic variations in the genes encoding laminin- $\beta 1$  and - $\gamma 1$  chains, which are  $\alpha 6$  integrin ligands, predispose to UC (27, 33) and colorectal cancer (17). It is also worth pointing out that some rare cases of intractable diarrhea have been reported in patients carrying mutations in  $\alpha 6\beta 4$  integrin without skin disease manifestation (50, 51). Nonetheless, there are also some differences when compared with previously reported animal models of UC. For instance,  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice did not lose weight (3, 19, 21, 45, 46), and they overall secreted more mucins, rather than less, as observed in other UC-derived tumours (4). More importantly, the most striking difference is the fully penetrant and spontaneous development of adenocarcinomas. Such differences could mainly be due to the nature of the target protein, an extracellular matrix receptor, which had never been tested in mice so far. Unexpectedly, the inflammation observed after the loss of keratin-8 intermediate filaments, which are attached to intestinal type II hemidesmosomes (see Figure 1), induced UC-like phenotypes that involved T lymphocytes (52, 53) and thus substantially differed from those observed in *Itga6* deficient mice. A possible origin for these differences could be that plectin and  $\beta 4$  integrin were uniquely affected in *Itga6* deficient mice, whereas loss of keratin-8 should also impact on desmosomes.

Mechanistically, we identified that disease onset was sensitive to antibiotic treatment, and requires innate (but not adaptive) immunity in response to bacterial dysbiosis with IL-1 $\beta$  and IL-18 as the likely primary cytokines mediating inflammation. The mechanisms leading to enhanced IL-1 $\beta$ / IL-18 secretion are not known at this point, however. One can speculate that, due to the defective epithelial barrier, either bacterial antigens or other antigens activate a Toll-like receptor to be defined and the inflammasome via the MyD88 signaling pathway. Alternatively, compensatory activation of the inflammasome via a Nod-like receptor protein (NLRP) could result from injury and/or changes in purinergic receptor signaling (54, 55). The dissection of the cellular and molecular mechanism leading to enhanced IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion, of the cells responsible for increased secretion and of the cells responding to those cytokines will be a key challenge in future studies.

Based on the tumorigenesis observed in  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice,  $\alpha 6\beta 4$  integrin classify as a tumour suppressor. This conclusion, however, seems at odds with other results establishing that  $\alpha 6\beta 4$  integrin behaves as an oncogene when it cooperates with ErbB2 in the formation of mammary tumours (56). A potential difference is that the mammary gland has a different hormonal and cellular environment. Furthermore, in the skin  $\alpha 6\beta 4$  integrin can both suppress or promote tumour growth depending on whether or not cells express Ras (V12), the oncogenic form of the small GTPase (57).

In future studies, it will be important to further assess whether it is the microbiota imbalance, changes in the homeostasis of the immune system or some other factors that play a more important role in tumour formation. It has been recently shown that changes in bacterial composition are associated with tumor progression in colorectal cancer (58). Likewise, the dysbiosis observed in the  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  model, might

evolve over time and be at the onset of tumor development. Besides host-microbiota, mechanical stress might also influence the process, since adenocarcinomas appeared mostly in the rectal region, which is the most intensely subject to mechanical stress. Interestingly, hemidesmosomes have recently been found to act as a mechanotransduction platform (59).

In conclusion, we have generated a unique single-gene mouse knockout model spontaneously leading to intestinal inflammation and tumorigenesis. We have established that expression of the  $\alpha 6$  integrin receptor in intestinal epithelial cells plays a pivotal role to maintain the intestinal barrier at the interface between the gut microbiota and the immune system. This mouse line should therefore be very useful to identify more efficient drugs in preventing and/or curing such unpredictable and invalidating disease.

## Methods

**Construction of the targeting vector and production of mice.** A lambda phage containing 20 kb corresponding to the 3' region of the murine *Itga6* gene was isolated by screening a 129Sv genomic library with a probe spanning the 3' end of an *Itga6* cDNA (exons A and B). Subclones of this region were used to construct a targeting vector with three loxP sites and a neomycin-resistance cassette driven by the phospho-glycerate-kinase (PGK) promoter (Figure 1A; Supplemental Figure 1A). Embryonic stem (ES) cells derived from the 129Sv mouse strain were electroporated with the targeting vector. Out of 279 clones screened for homologous recombination, seven had correctly recombined. We electroporated two of them with a Cre recombinase expression plasmid (pCMV-Cre), recovered two independent clones having excised the neomycin cassette but retained the  $\alpha 6$  sequence, and one clone transmitting to the germ-line after injection into mouse blastocysts of the C57/Bl6J strain (Supplemental Figure 1A). Mice carrying the *Itga6* floxed allele were bred to homozygosity and displayed normal viability and fertility. They were crossed with *Villin-Cre* transgenic mice (60) in two steps, first generating  $\alpha 6^{fl/+}$ ; *Villin-Cre* mice, which were then crossed with  $\alpha 6^{fl/fl}$  animals. Control mice had a  $\alpha 6^{fl/+}$ ; -or  $\alpha 6^{fl/fl}$  genotype. Details for conditions to genotype the floxed and deleted alleles are available upon request. All animal experimentations were performed in accordance with French national regulations and guidelines of the regional committee for animal experimentation (Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale, CREMEAS).

**Depletion of the gut microbiota by antibiotic treatment.** A combination of 4 antibiotics (streptomycin, 2g/L, Sigma-Aldrich; gentamicin, 200 mg/L, Transgram Oral, CEVA; enrofloxacin, 100 mg/L, Baytril, Bayer; bacitracin, 1g/L, Bacivet, Alpharma) was

administered in the drinking water to 6-week old WT and  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice, for 3 weeks before sacrifice. All experimental procedures were performed in accordance with French national regulations and guidelines of the regional committee for animal experimentation (Comité Régional d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale, CREMEAS).

**Histological Analysis.** Intestinal samples were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS) and processed for paraffin embedding. For conventional histology, 5  $\mu$ m paraffin sections were stained with Harris haematoxylin and eosin (H&E). For mucus analysis, 5  $\mu$ m paraffin sections were stained with periodic acid-Schiff (PAS) and haematoxylin or Alcian blue (AB) (pH 2.5) using standard histology techniques. For BrdU detection assays, BrdU was injected intraperitoneally to mice at 50 mg/kg body weight, 3h or 12h prior sacrifice.

**Immunofluorescence, immunohistochemistry and Fluorescent In Situ Hybridization (FISH).** For immunofluorescence staining, intestinal pieces from different regions were embedded in Tissue-Tek (Sakura, Labonord, France) and frozen on dry ice. 10  $\mu$ m cryosections were incubated for 2 h at room temperature or overnight at 4°C with primary antibodies. Tissues were washed in PBS and incubated for 1 h with secondary antibodies; nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Slides were mounted in Aqua Poly/Mount (PolySciences, Warrington, PA). Observations were made as described before (31). For immunohistochemistry (IHC), 5  $\mu$ m sections were deparaffinized and processed for antigen retrieval using citrate buffer. For BrdU staining, sections were incubated in 2N HCl for 1 hour, washed with PBS, and then incubated for 2 h at room temperature or overnight at 4°C with primary antibody. Detection was performed with biotinylated secondary antibody (Jackson

ImmunoResearch Laboratories), then avidin biotinylated peroxydase complex for 1 h and revealed with DAB (Vectastain Elite ABC kit and DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Sections were counterstained with haematoxylin. Mucins were analysed by manual IHC (61) or automatic IHC with an immunostainer (ES, Ventana Medical System, France) (62).

Primary antibodies used were: anti-integrin  $\alpha$ 6 (GoH3); anti-integrin  $\beta$ 4 (346-11A); anti-CD4 (GK1.5); anti-CD8a (53-6.7); biotin conjugated anti-CD11b (M1/70)(all from BD Pharmingen™); anti-integrin  $\beta$ 1 (MAB1997, Chemicon International); anti-keratin 8/18 (Spring Bioscience); anti-plectin (GP21, PROGEN Biotechnik GmbH); anti-laminin  $\gamma$ 2 chain (LE-4-6, gift from T. Sasaki, Portland, Oregon, USA); anti-collagen IV (U1109, Strasbourg, France); anti-villin (ID3C3, UMR144, Paris, France); anti-Ki67 (NCL-Ki67p, Novocastra); anti-MAP115/cingulin (U1109, Strasbourg, France); anti-BrdU (Roche Diagnostics Corporation); anti-Muc2 (H-300, Santa Cruz Biotechnology); anti-Muc4 (HA-1 (63)). The secondary antibodies used were: Alexa Fluor® 488- or 594-conjugated anti-rabbit, anti-rat or anti-mouse IgG (Molecular Probes), and Cy3-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

For FISH analysis, colon and rectum pieces were fixed in Methanol-Carnoy's fixative and processed as described (64). Sections (5  $\mu$ m) were hybridized to the universal bacterial probe Cy3 -conjugated EUB338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') at 10 nM. After hybridization, a co-immunostaining using the anti-Muc2 antibody (H-300, Santa Cruz Biotechnology) was performed as described (64). Nuclei were counter-stained with DAPI.



**Pyrosequencing analysis.** Mucosal samples were collected from the rectum/anus and stored frozen before DNA extraction by using the Qiaamp DNA kit (Qiagen). Pyrosequencing of extracted DNA was performed and a minimum of 4,000 high-quality reads were generated from each biological replicates. 16S rRNA gene sequences with at least 97% similarity were clustered into species level OTUs using average neighbor algorithm. Phylogenetic affiliation of each OTU was governed by using SILVA taxonomy and template file. Only OTUs which were represented by at least 3 individuals with a relative abundance equal or higher to 1.0% were included for the cluster analysis. Principal component analysis (PCA) was performed to visualize interactions between the composition and structure of the mucosal-associated microbiota and the host genotype. The statistical language R was used for data visualization and for performing abundance based PCA on the bacterial genera observed with pyrosequencing data. The non-parametric Mann-Whitney test implemented in Prism4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) was used to compare the 2 groups of individuals. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was defined at a level of  $P < 0.05$ .

**Images analysis.** Images were captured using a SP2 confocal laser scanning microscope, a DM-RXA2 fluorescence microscope, or a DM-RB fluorescence microscope all from Leica. Digital slide scanner NanoZoomer (2.0-HT C9600-13) and the NDP.view software (Hamamatsu) were used for immune cell counting and gland size measurement.

**FITC-dextran assay.** In vivo intestinal permeability was determined as described previously (65). FITC-dextran of average molecular weight 3,000-5,000 (FD4; Sigma-Aldrich) was used. Three independent experiments were performed in duplicate using 6-week old wild-type (n=14) and  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  (n=12) mice.

**Flow cytometry.** Mononuclear immune cells from the lamina propria (LPMC) were isolated as described (66) and were subsequently analysed by fluorescence activated cell sorting (FACS). Immune cell populations from spleen were also analysed by FACS.  $5.10^5$  LPMC and  $5.10^6$  splenocytes were stained for each antibody combination. Splenocytes were first block in Mouse BD Fc Block™ (anti-CD16/CD32, BD Pharmingen™). Antibodies used for spleen analysis: biotin-conjugated anti-CD86 (B7-2) (GL1); eFluor® 450-conjugated anti-IgD (11-26c); Alexa Fluor® 700-conjugated anti-CD8a (53-6.7); biotin-conjugated anti-CD115 (c-fms) (AFS98); eFluor® 650NC-conjugated Streptavidin; eFluor® 450-conjugated anti-Ly-6G (Gr-1) (RB6-8C5), (all from eBiosciences); R-Phycoerythrin-conjugated streptavidin and Cy™5-conjugated AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgM,  $\mu$  Chain Specific (both from Jackson ImmunoResearch Laboratories); PerCP-Cy™5.5-conjugated anti-CD19 (1D3); PerCP/Cy5.5 anti-CD11b (Mac-1) (both from BioLegend). Antibodies used for LPMC analysis: PE-CF594-conjugated anti-CD3 (145-2C11); PE-conjugated anti-CD4 (RM4-5); FITC-conjugated anti-CD8a (53-6.7); biotin-conjugated anti-TCR $\gamma\delta$  (GL3); APC-conjugated anti-TCR $\beta$  (H57-597); FITC-conjugated anti-CD59 (Ly-6C) (AL-21); APC-conjugated anti-CD11b (Mac-1) (145-2C11); (all from BD Pharmingen™); Alexa Fluor® 405-conjugated Streptavidin (Invitrogen); PE-Cy™7-conjugated anti-Ly-6G (1A8); BV 605 NC-conjugated anti-CD11c (HL3); PE-conjugated anti-CD64 (X54-5/7.1) (all from BioLegend); PE-Cy™5-conjugated anti-MHC class II (M5/114.15.2) (eBiosciences). Flow cytometry analyses were performed on a BD LSR II (BD Biosciences) using FACS DIVA with automatic compensation. The number of positive cells was evaluated based on the total number of cells present in the tissue lysate.

**Cytokine Measurements.** Small colon resection specimens were cultured at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 24h in RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™, HEPES (Invitrogen, life Technologies) in presence of antibiotics. Medium was then recovered, and centrifuged at 5000g at 4°C to eliminate cellular debris. Cytokines were measured in the resulting supernatant by ELISA using DuoSet® ELISA Development Kits (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. All values were normalized to the dry weight of the biopsy specimens.

**RT-qPCR.** For RT-qPCR, total RNA was extracted with Trizol® reagent (Invitrogen) and the RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. cDNAs were prepared from 1 µg of total RNA, using oligodT and the SuperScript™ II RT-PCR system (Invitrogen). PCR reactions were performed with SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ reaction mixture (SIGMA) and Universal ProbeLibrary System (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions. Experimental values of gene expression levels were normalized by hypoxanthine phosphoribosyl-transferase (HPRT) mRNA levels. Primers sequences are available upon request.

**Statistical analysis.** All data were analyzed using the Graphpad Prism 6.0 software and are displayed as scattered dot plots; error bars correspond to standard deviation.

Significance among samples (mutants versus controls) was determined using the two tailed non-parametric test of Mann-Whitney offered in Prism. For the assessment of the gland height, of the percentage of BrdU+ cells relative to the total cells per gland, and of infiltrating CD11b+ and CD4+ cells, we scored positive cells within at least 8 non-adjacent colon sections, averaged those counts and then used the averages originating from distinct animals for statistical comparisons. A *P* value ≤0.05 was considered as significant.

## **Acknowledgements**

We thank Dominique Ferrandon, Daniel Louvard, Tanya Mayadas, Jean-Marc Reichhart, Bernardo Reina and Lydia Sorokin for critical reading of the manuscript. We thank P. Laquerriere for helpful suggestions, A. Klein and C. Arnold for technical assistance, C. Ebel for help with FACS analysis, J.P. Ghnassia for anatomopathological analysis, and the IGBMC-Histology platform for technical support and for making available their Hamamatsu slide reader. We are grateful to A. Van Es and the IGBMC animal facility staff for help and advice in animal experimentation, to D. Metzger, P. Chambon, M. Li, S. Chan and T. Sasaki for gift of reagents, and to S. Bour for help in Figure preparation. This work was supported by funds from CNRS, Inserm and Université de Strasbourg, by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer and Ligue Régionale contre le Cancer (E. G-L), the Fondation pour la Recherche Médicale (“Equipe FRM 2009” to MC), the Institut National du Cancer (Appel à projets “Formes précoces du cancer colorectal” to EG-L and PS-A, and to EG-L and MC), and Agence Nationale pour la Recherche (EG-L and ML). SN is a recipient of a Post-doctoral Fellowship from the Ligue contre le Cancer.

## References

1. McGuckin, M.A., Eri, R., Simms, L.A., Florin, T.H., and Radford-Smith, G. 2009. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 15:100-113.
2. Salim, S.Y., and Soderholm, J.D. 2010. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 17:362-381.
3. Fu, J., Wei, B., Wen, T., Johansson, M.E., Liu, X., Bradford, E., Thomsson, K.A., McGee, S., Mansour, L., Tong, M., et al. 2011. Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest* 121:1657-1666.
4. Heazlewood, C.K., Cook, M.C., Eri, R., Price, G.R., Tauro, S.B., Taupin, D., Thornton, D.J., Png, C.W., Crockford, T.L., Cornall, R.J., et al. 2008. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med* 5:e54.
5. Johansson, M.E., Gustafsson, J.K., Sjoberg, K.E., Petersson, J., Holm, L., Sjovall, H., and Hansson, G.C. 2010. Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PLoS One* 5:e12238.
6. Sheng, Y.H., Hasnain, S.Z., Florin, T.H., and McGuckin, M.A. 2012. Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 27:28-38.
7. Vaishnava, S., Yamamoto, M., Severson, K.M., Ruhn, K.A., Yu, X., Koren, O., Ley, R., Wakeland, E.K., and Hooper, L.V. 2011. The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 334:255-258.
8. van der Sluis, M., Bouma, J., Vincent, A., Velcich, A., Carraway, K.L., Buller, H.A., Einerhand, A.W., van Goudoever, J.B., Van Seuning, I., and Renes, I.B. 2008. Combined defects in epithelial and immunoregulatory factors exacerbate the pathogenesis of inflammation: mucin 2-interleukin 10-deficient mice. *Lab Invest* 88:634-642.
9. Van der Sluis, M., De Koning, B.A., De Bruijn, A.C., Velcich, A., Meijerink, J.P., Van Goudoever, J.B., Buller, H.A., Dekker, J., Van Seuning, I., Renes, I.B., et al. 2006. Muc2-

- deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131:117-129.
10. Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K., and Augenlicht, L. 2002. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 295:1726-1729.
  11. Spenle, C., Hussenet, T., Lacroute, J., Lefebvre, O., Kedinger, M., Orend, G., and Simon-Assmann, P. 2012. Dysregulation of laminins in intestinal inflammation. *Pathol Biol (Paris)* 60:41-47.
  12. Abraham, C., and Cho, J.H. 2009. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 361:2066-2078.
  13. Ullman, T.A., and Itzkowitz, S.H. 2011. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 140:1807-1816.
  14. Xavier, R.J., and Podolsky, D.K. 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448:427-434.
  15. Grivennikov, S.I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C.A., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G.Y., Osterreicher, C.H., Hung, K.E., et al. 2012. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* 491:254-258.
  16. Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R.S. 2010. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 28:573-621.
  17. Peters, U., Jiao, S., Schumacher, F.R., Hutter, C.M., Aragaki, A.K., Baron, J.A., Berndt, S.I., Bezieau, S., Brenner, H., Butterbach, K., et al. 2013. Identification of Genetic Susceptibility Loci for Colorectal Tumors in a Genome-Wide Meta-analysis. *Gastroenterology* 144:799-807 e724.
  18. Chen, G.Y., Liu, M., Wang, F., Bertin, J., and Nunez, G. 2011. A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *J Immunol* 186:7187-7194.

19. Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., et al. 2011. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 145:745-757.
20. Franchi, L., Kamada, N., Nakamura, Y., Burberry, A., Kuffa, P., Suzuki, S., Shaw, M.H., Kim, Y.G., and Nunez, G. 2012. NLRC4-driven production of IL-1beta discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. *Nat Immunol* 13:449-456.
21. Normand, S., Delanoye-Crespin, A., Bressenot, A., Huot, L., Grandjean, T., Peyrin-Biroulet, L., Lemoine, Y., Hot, D., and Chamaillard, M. 2011. Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9601-9606.
22. Nievers, M.G., Schaapveld, R.Q., and Sonnenberg, A. 1999. Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol* 18:5-17.
23. Nishiuchi, R., Takagi, J., Hayashi, M., Ido, H., Yagi, Y., Sanzen, N., Tsuji, T., Yamada, M., and Sekiguchi, K. 2006. Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant alpha3beta1, alpha6beta1, alpha7beta1 and alpha6beta4 integrins. *Matrix Biol* 25:189-197.
24. Rabinovitz, I., and Mercurio, A.M. 1997. The integrin alpha6beta4 functions in carcinoma cell migration on laminin-1 by mediating the formation and stabilization of actin-containing motility structures. *J Cell Biol* 139:1873-1884.
25. Sawamura, D., Nakano, H., and Matsuzaki, Y. 2010. Overview of epidermolysis bullosa. *J Dermatol* 37:214-219.
26. Barth, J.H., Kelly, S.E., Wojnarowska, F., Savin, J.A., Whittaker, S., Cream, J.J., and White, J.E. 1988. Pemphigoid and ulcerative colitis. *J Am Acad Dermatol* 19:303-308.
27. Thompson, A.I., and Lees, C.W. 2011. Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 17:831-848.

28. Fine, J.D., and Mellerio, J.E. 2009. Extracutaneous manifestations and complications of inherited epidermolysis bullosa: part I. Epithelial associated tissues. *J Am Acad Dermatol* 61:367-384; quiz 385-366.
29. Georges-Labouesse, E., Messaddeq, N., Yehia, G., Cadalbert, L., Dierich, A., and Le Meur, M. 1996. Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat Genet* 13:370-373.
30. van der Neut, R., Krimpenfort, P., Calafat, J., Niessen, C.M., and Sonnenberg, A. 1996. Epithelial detachment due to absence of hemidesmosomes in integrin beta 4 null mice. *Nat Genet* 13:366-369.
31. Niculescu, C., Ganguli-Indra, G., Pfister, V., Dupe, V., Messaddeq, N., De Arcangelis, A., and Georges-Labouesse, E. 2011. Conditional ablation of integrin alpha-6 in mouse epidermis leads to skin fragility and inflammation. *Eur J Cell Biol* 90:270-277.
32. Gisondi, P., Del Giglio, M., Cozzi, A., and Girolomoni, G. 2010. Psoriasis, the liver, and the gastrointestinal tract. *Dermatol Ther* 23:155-159.
33. Barrett, J.C., Lee, J.C., Lees, C.W., Prescott, N.J., Anderson, C.A., Phillips, A., Wesley, E., Parnell, K., Zhang, H., Drummond, H., et al. 2009. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet* 41:1330-1334.
34. Orian-Rousseau, V., Aberdam, D., Fontao, L., Chevalier, L., Meneguzzi, G., Keding, M., and Simon-Assmann, P. 1996. Developmental expression of laminin-5 and HD1 in the intestine: epithelial to mesenchymal shift for the laminin gamma-2 chain subunit deposition. *Dev Dyn* 206:12-23.
35. Zaki, M.H., Boyd, K.L., Vogel, P., Kastan, M.B., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.D. 2010. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* 32:379-391.
36. Johansson, M.E., Gustafsson, J.K., Holmen-Larsson, J., Jabbar, K.S., Xia, L., Xu, H., Ghishan, F.K., Carvalho, F.A., Gewirtz, A.T., Sjoval, H., et al. 2013. Bacteria penetrate the normally

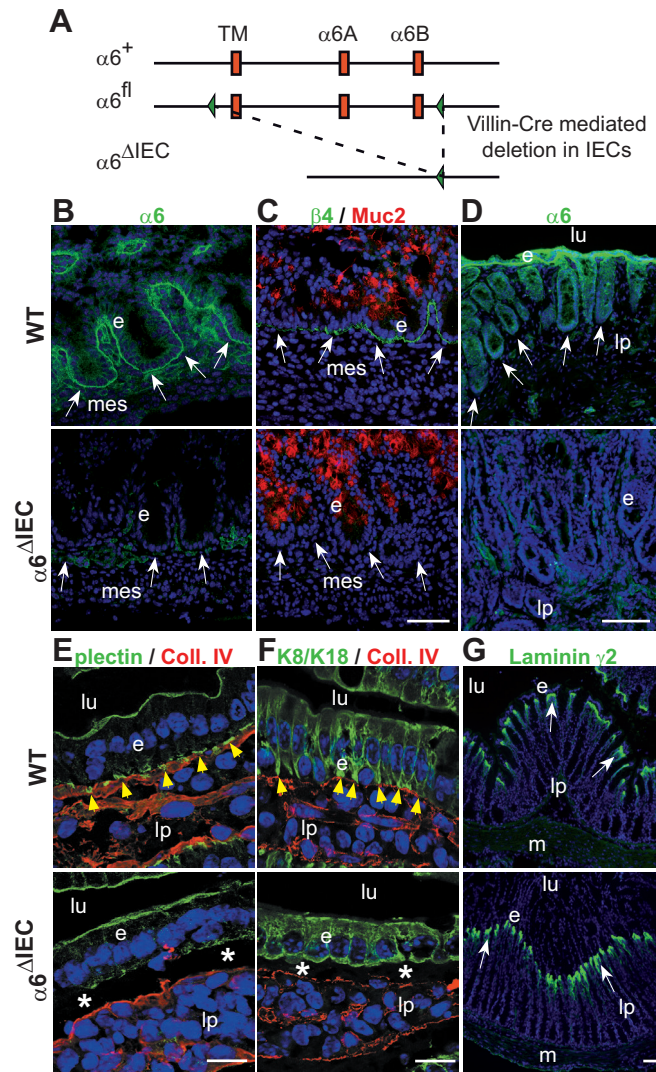


- impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*.
37. Burger-van Paassen, N., Loonen, L.M., Witte-Bouma, J., Korteland-van Male, A.M., de Bruijn, A.C., van der Sluis, M., Lu, P., Van Goudoever, J.B., Wells, J.M., Dekker, J., et al. 2012. Mucin Muc2 deficiency and weaning influences the expression of the innate defense genes Reg3beta, Reg3gamma and angiogenin-4. *PLoS One* 7:e38798.
  38. Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Eitzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., et al. 2009. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325:612-616.
  39. Zhang, R., Ito, S., Nishio, N., Cheng, Z., Suzuki, H., and Isobe, K.I. 2011. Dextran sulphate sodium increases splenic Gr1(+)CD11b(+) cells which accelerate recovery from colitis following intravenous transplantation. *Clin Exp Immunol* 164:417-427.
  40. Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68:869-877.
  41. Kanneganti, M., Mino-Kenudson, M., and Mizoguchi, E. 2011. Animal models of colitis-associated carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2011:342637.
  42. Watanabe, T., Konishi, T., Kishimoto, J., Kotake, K., Muto, T., and Sugihara, K. 2011. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer shows a poorer survival than sporadic colorectal cancer: a nationwide Japanese study. *Inflamm Bowel Dis* 17:802-808.
  43. Hamilton, M.J., Snapper, S.B., and Blumberg, R.S. 2012. Update on biologic pathways in inflammatory bowel disease and their therapeutic relevance. *J Gastroenterol* 47:1-8.
  44. Jones, R.G., Li, X., Gray, P.D., Kuang, J., Clayton, F., Samowitz, W.S., Madison, B.B., Gumucio, D.L., and Kuwada, S.K. 2006. Conditional deletion of beta1 integrins in the intestinal epithelium causes a loss of Hedgehog expression, intestinal hyperplasia, and early postnatal lethality. *J Cell Biol* 175:505-514.

45. Liu, Z., Lee, J., Krummey, S., Lu, W., Cai, H., and Lenardo, M.J. 2011. The kinase LRRK2 is a regulator of the transcription factor NFAT that modulates the severity of inflammatory bowel disease. *Nat Immunol* 12:1063-1070.
46. Smalley-Freed, W.G., Efimov, A., Burnett, P.E., Short, S.P., Davis, M.A., Gumucio, D.L., Washington, M.K., Coffey, R.J., and Reynolds, A.B. 2010. p120-catenin is essential for maintenance of barrier function and intestinal homeostasis in mice. *J Clin Invest* 120:1824-1835.
47. Seko, A., Nagata, K., Yonezawa, S., and Yamashita, K. 2002. Ectopic expression of a GlcNAc 6-O-sulfotransferase, GlcNAc6ST-2, in colonic mucinous adenocarcinoma. *Glycobiology* 12:379-388.
48. Seko, A., Nagata, K., Yonezawa, S., and Yamashita, K. 2002. Down-regulation of Gal 3-O-sulfotransferase-2 (Gal3ST-2) expression in human colonic non-mucinous adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res* 93:507-515.
49. Kawashima, H. 2012. Roles of the gel-forming MUC2 mucin and its O-glycosylation in the protection against colitis and colorectal cancer. *Biol Pharm Bull* 35:1637-1641.
50. Salvestrini, C., McGrath, J.A., Ozoemena, L., Husain, K., Buhamrah, E., Sabery, N., Leichtner, A., Rufo, P.A., Perez-Atayde, A., Orteu, C.H., et al. 2008. Desquamative enteropathy and pyloric atresia without skin disease caused by a novel intracellular beta4 integrin mutation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 47:585-591.
51. Lachaux, A., Bouvier, R., Loras-Duclaux, I., Chappuis, J.P., Meneguzzi, G., and Ortonne, J.P. 1999. Isolated deficient alpha6beta4 integrin expression in the gut associated with intractable diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 29:395-401.
52. Habtezion, A., Toivola, D.M., Butcher, E.C., and Omary, M.B. 2005. Keratin-8-deficient mice develop chronic spontaneous Th2 colitis amenable to antibiotic treatment. *J Cell Sci* 118:1971-1980.

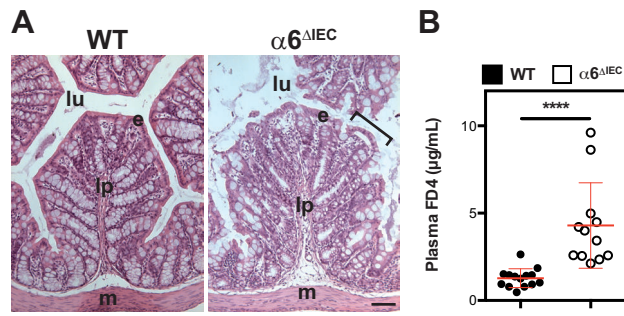
53. Toivola, D.M., Krishnan, S., Binder, H.J., Singh, S.K., and Omary, M.B. 2004. Keratins modulate colonocyte electrolyte transport via protein mistargeting. *J Cell Biol* 164:911-921.
54. Chen, G.Y., and Nunez, G. 2011. Inflammasomes in intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 141:1986-1999.
55. Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., and Flavell, R. 2012. Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481:278-286.
56. Guo, W., Pylayeva, Y., Pepe, A., Yoshioka, T., Muller, W.J., Inghirami, G., and Giancotti, F.G. 2006. Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell* 126:489-502.
57. Raymond, K., Kreft, M., Song, J.Y., Janssen, H., and Sonnenberg, A. 2007. Dual Role of alpha6beta4 integrin in epidermal tumor growth: tumor-suppressive versus tumor-promoting function. *Mol Biol Cell* 18:4210-4221.
58. Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J.R., and Dutilh, B.E. 2012. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol* 10:575-582.
59. Zhang, H., Landmann, F., Zahreddine, H., Rodriguez, D., Koch, M., and Labouesse, M. 2011. A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis. *Nature* 471:99-103.
60. el Marjou, F., Janssen, K.P., Chang, B.H., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., and Robine, S. 2004. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* 39:186-193.
61. van der Sluis, M., Melis, M.H., Jonckheere, N., Ducourouble, M.P., Buller, H.A., Renes, I., Einerhand, A.W., and Van Seuning, I. 2004. The murine Muc2 mucin gene is transcriptionally regulated by the zinc-finger GATA-4 transcription factor in intestinal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 325:952-960.
62. Mariette, C., Perrais, M., Leteurtre, E., Jonckheere, N., Hemon, B., Pigny, P., Batra, S., Aubert, J.P., Triboulet, J.P., and Van Seuning, I. 2004. Transcriptional regulation of

- human mucin MUC4 by bile acids in oesophageal cancer cells is promoter-dependent and involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathway. *Biochem J* 377:701-708.
63. Jonckheere, N., Vincent, A., Perrais, M., Ducourouble, M.P., Male, A.K., Aubert, J.P., Pigny, P., Carraway, K.L., Freund, J.N., Renes, I.B., et al. 2007. The human mucin MUC4 is transcriptionally regulated by caudal-related homeobox, hepatocyte nuclear factors, forkhead box A, and GATA endodermal transcription factors in epithelial cancer cells. *J Biol Chem* 282:22638-22650.
64. Johansson, M.E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15064-15069.
65. Aube, A.C., Cabarrocas, J., Bauer, J., Philippe, D., Aubert, P., Doulay, F., Liblau, R., Galmiche, J.P., and Neunlist, M. 2006. Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 55:630-637.
66. Weigmann, B., Tubbe, I., Seidel, D., Nicolaev, A., Becker, C., and Neurath, M.F. 2007. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nat Protoc* 2:2307-2311.



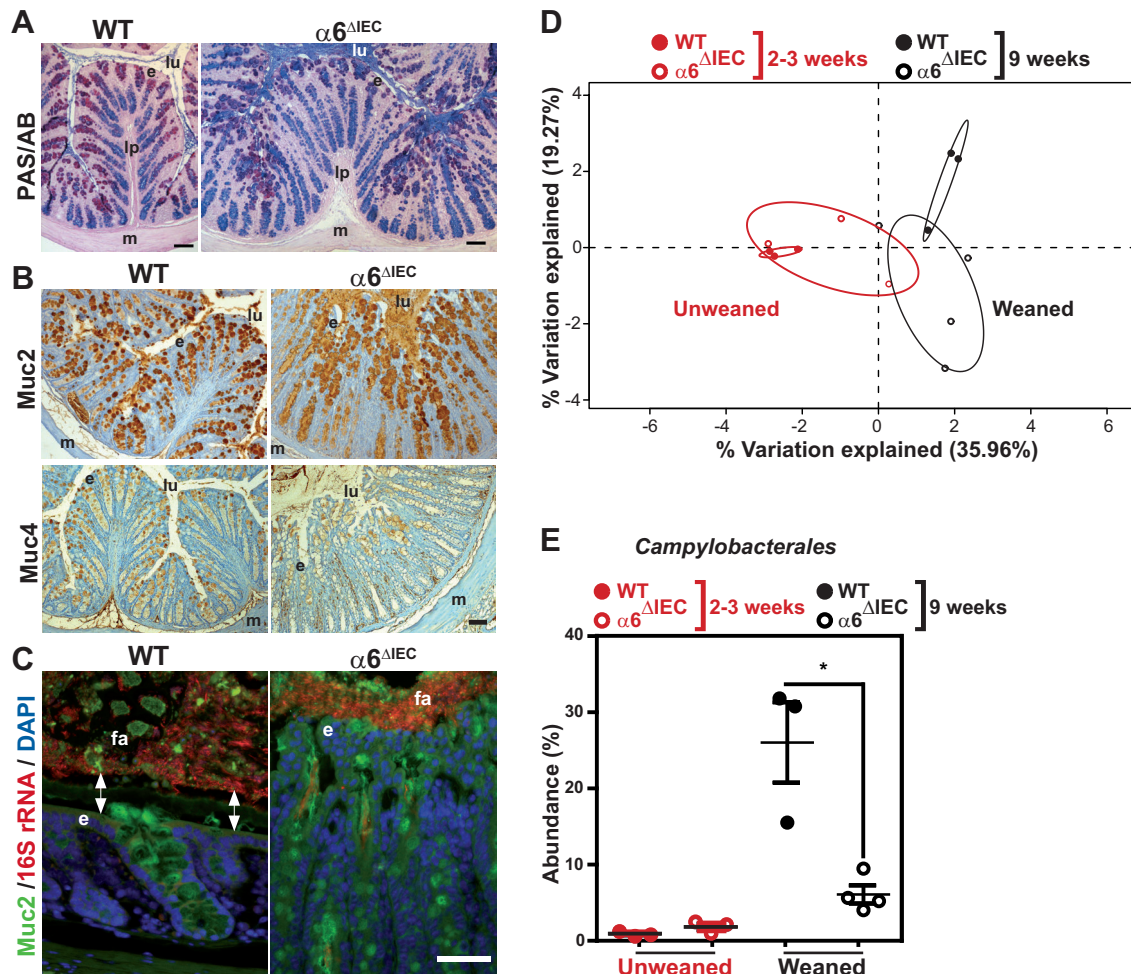
**Figure 1: Efficient deletion of *Itga6* in  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice results in compromised hemidesmosomes and epithelial fragility**

(A) Strategy to generate an intestinal epithelium-specific *Itga6* knockout. The insertion at the *Itga6* 3' end (top; TM/ $\alpha 6A$ / $\alpha 6B$ , transmembrane/cytoplasmic A/B exons) of two loxP cassettes (green triangles, middle) results after a cross with the intestinal *Villin-Cre* line in a truncated *Itga6* copy, denoted  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . (B-G) Immunodetection of hemidesmosome markers in the colon of E16.5 embryos (B, C) and in different intestinal segments of 9-16 week old mice (D-G); (D) rectum; (E, F) jejunum; (G) colon; DAPI marks nuclei (blue). (B, D)  $\alpha 6$ - and (C)  $\beta 4$ -integrin chains (green) with the mucin *Muc2* (red) marking goblet cells. (E) Plectin and (F) K8/K18 intermediate filaments (green), with Collagen IV (red). (G) Laminin- $\gamma 2$  chain (green). White arrows, epithelium/lamina propria interface; yellow arrowheads, hemidesmosome patches; stars, areas of epithelial detachment in mutants. Scale bars, 50  $\mu m$ . In this and subsequent figures: e, epithelium; lp, lamina propria; lu, lumen; m, muscle layer; mes, mesenchyme.



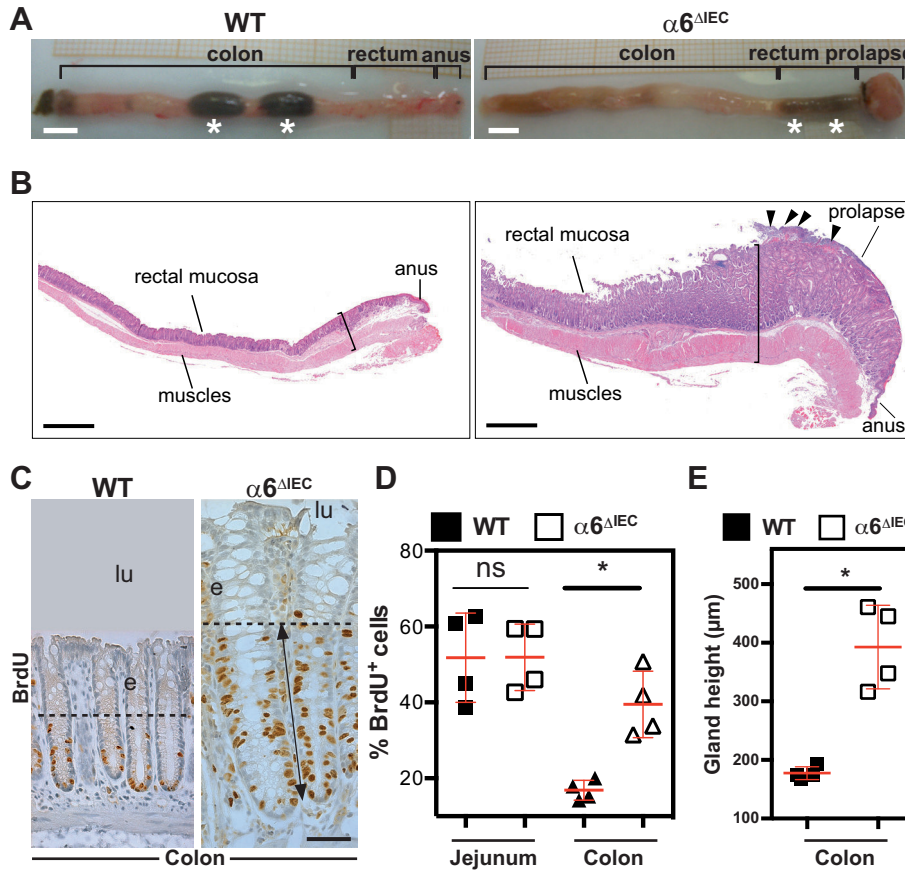
**Figure 2: Compromised epithelial integrity in  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice**

(A) Histological analysis of the colon from 3 week-old pups; note the erosion of the outer surface in mutant glands (bracket). Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . (B) Scattered dot plots showing the plasma concentration of FITC-dextran (FD4) as a measure of intestinal permeability in animals fed with FD4; error bars, standard deviation. \*\*\*\*,  $p < 10^{-4}$ .



**Figure 3: Defective mucin layer and altered microbiome composition in  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice**

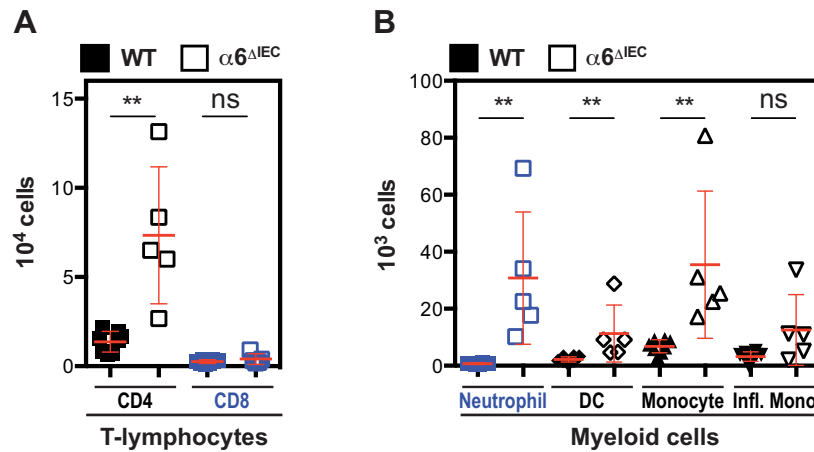
(A) PAS/AB stained sections of colons from 6-week old animals. Mixed neutral (dark pink) and acidic mucin (blue) secreting cells and abundant mucinous material filling the lumen are detected in mutants. Scale bar, 100  $\mu$ m. (B) Immunodetection of Muc2 and Muc4 (brown) in colons from 10-week old mice. Muc2 immunostaining marks the lumen and the dilated crypts in mutants. Muc4+ signal is diffuse and reduced in mutant goblet cells. Scale bar, 100  $\mu$ m. (C) Combined Muc2 immunostaining (green) and FISH (red) for bacteria using the 16S rRNA gene probe EUB-338/Cy3 on colons from young adults. Mutant colons lack the spatial segregation between bacteria and epithelial cells (double arrow in WT). e, epithelium; fa, faeces. Scale bar, 50  $\mu$ m. (D) Principal Component Analysis (PCA) generated on nonabundance-based euclidean distance matrices showing a complete overlap in unweaned animals and almost complete separation in weaned animals. (E) Assessment of *Campylobacteriales* abundance (%). Values represent means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ .



**Figure 4: All  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice develop colitis**

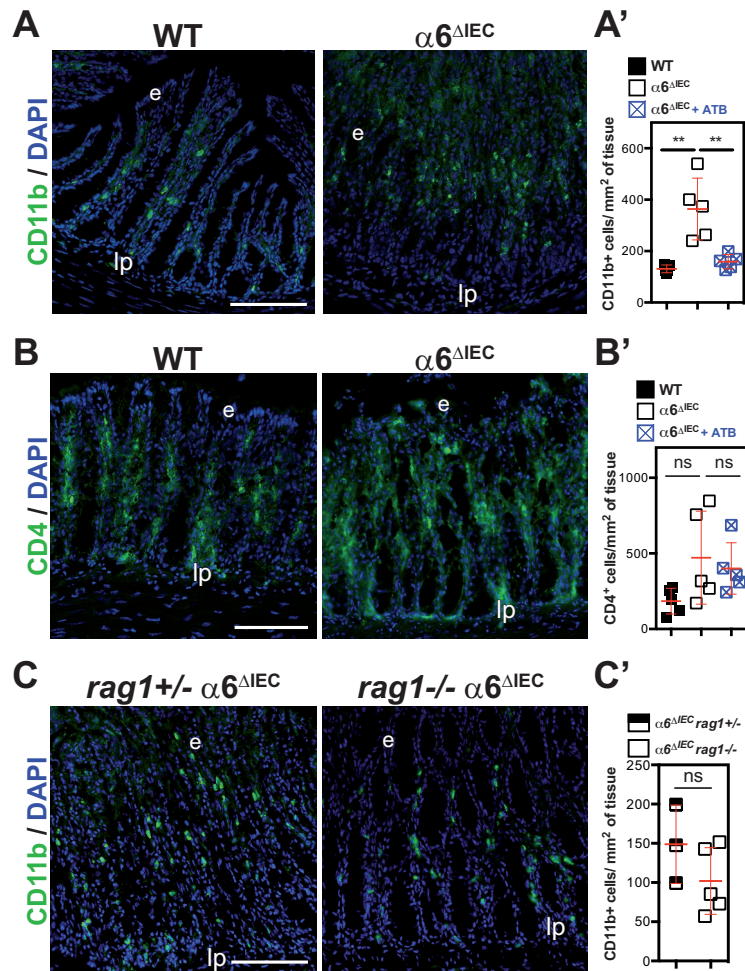
**(A)** Morphology of the colorectal region in 15-week old WT and  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice. Mutant animals invariably displayed rectal prolapse or recto-anal swelling, colon swelling, and loose stools. Asterisks, stools. Scale bars, 500  $\mu\text{m}$ . **(B)** Longitudinal haematoxylin/eosin-stained sections of the recto-anal region from animals aged 15 weeks. Mutants display hyperplastic mucosa and thickened muscle layers (compare brackets in WT and mutant); arrowheads, ulcerated surface. Scale bars, 500  $\mu\text{m}$ . **(C-E)** BrdU labeling and gland height measurement in 15-19 week old WT and  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice. **(C)** Immunohistochemical BrdU detection (brown nuclei) on colon sections; the proliferative compartment is expanded (dashed lines and double arrows) in the mutant colon. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . **(D)** Scattered dot plot quantification of BrdU-positive cells in the jejunum and colon. Each point corresponds to the mean value for the ratio BrdU+/total cell number/gland for at least 10 glands per animal; n=4 mice/group. ns, not significant; \*  $p \leq 0.05$ . **(E)** Scattered dot plot quantification of gland height. Each point corresponds to the mean value for the size of at least 25 glands per animal; n=4 mice/group. ns, not significant; \*:  $p \leq 0.05$ .





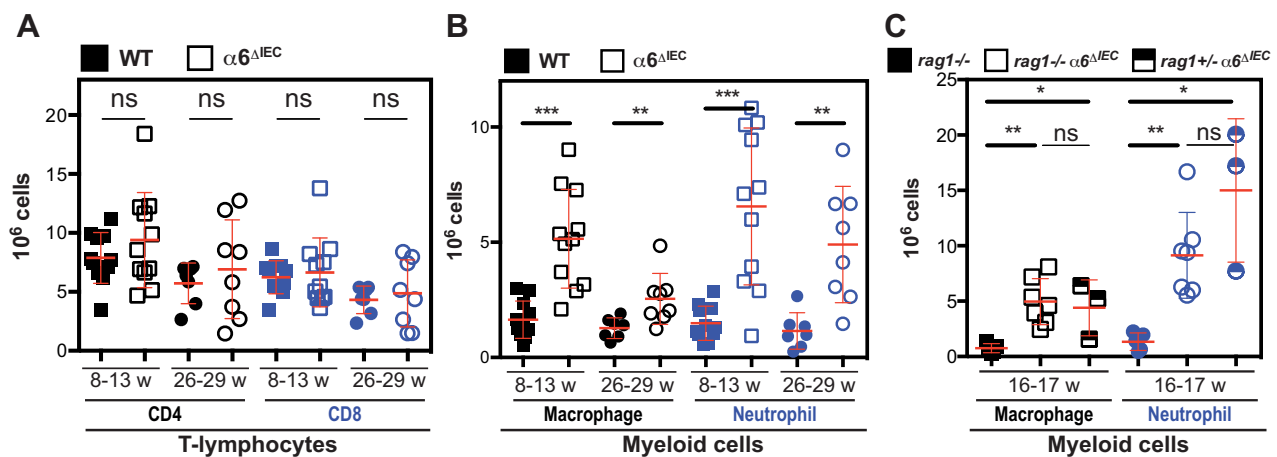
**Figure 5:  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice display an influx of myeloid cells in the colonic lamina propria**

(A, B) Flow cytometry analysis and quantification of immune cell sub-populations present in colonic lamina propria extracts. Results are displayed as scattered dot plots (error bars, standard deviation). Animals were raised in conventional conditions. In each panel, dots represent the number of positive cells present in total cell extract for each animal. ns, not significant; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . Colonic lamina propria mononuclear cells originate from WT ( $n=7$ ) and  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  ( $n=5$ ) animals aged 9-15 weeks. (A) CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes; (B) cells of myeloid origin. Myeloid cell sub-populations are defined as: Neutrophils, Ly-6G<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>; Dendritic cells (DC), Ly-6G<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> MHC class II<sup>intermediate</sup>-; Monocytes, Ly-6G<sup>-</sup> Ly-6C<sup>+</sup> MHC class II<sup>-</sup>; Pro-inflammatory monocytes (Infl. Mono), Ly-6G<sup>-</sup> Ly-6C<sup>+</sup> CD11c<sup>low</sup> MHC class II<sup>+</sup> CD64<sup>+</sup>.



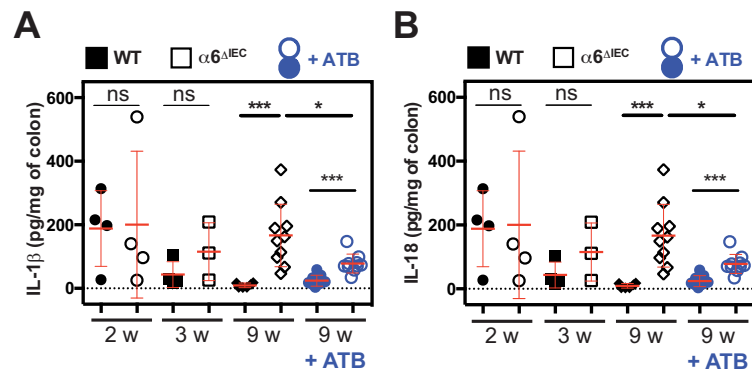
**Figure 6:  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  inflamed-colons exhibit local influx of CD11b<sup>+</sup> myeloid cells**

(A-C) Representative immunofluorescence images showing the distribution of CD11b<sup>+</sup> (A, C) or CD4<sup>+</sup> (B) cells in the colon of 9-week old WT and  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice (A, B), and in the colon of combined *rag1*<sup>+/-</sup>  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  and *rag1*<sup>-/-</sup>  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  animals (C). Scale bars, 100  $\mu$ m. (A'-C') Quantification of the number of infiltrating cells, displayed as scattered dot plots. Note that combined *rag1*  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mutants must be raised in SPF conditions, which could explain the reduced level of immune cells compared to what is observed in the conventional conditions illustrated in panel A'. ns, not significant; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; in all scattered dot plots, error bars represent the standard deviation.



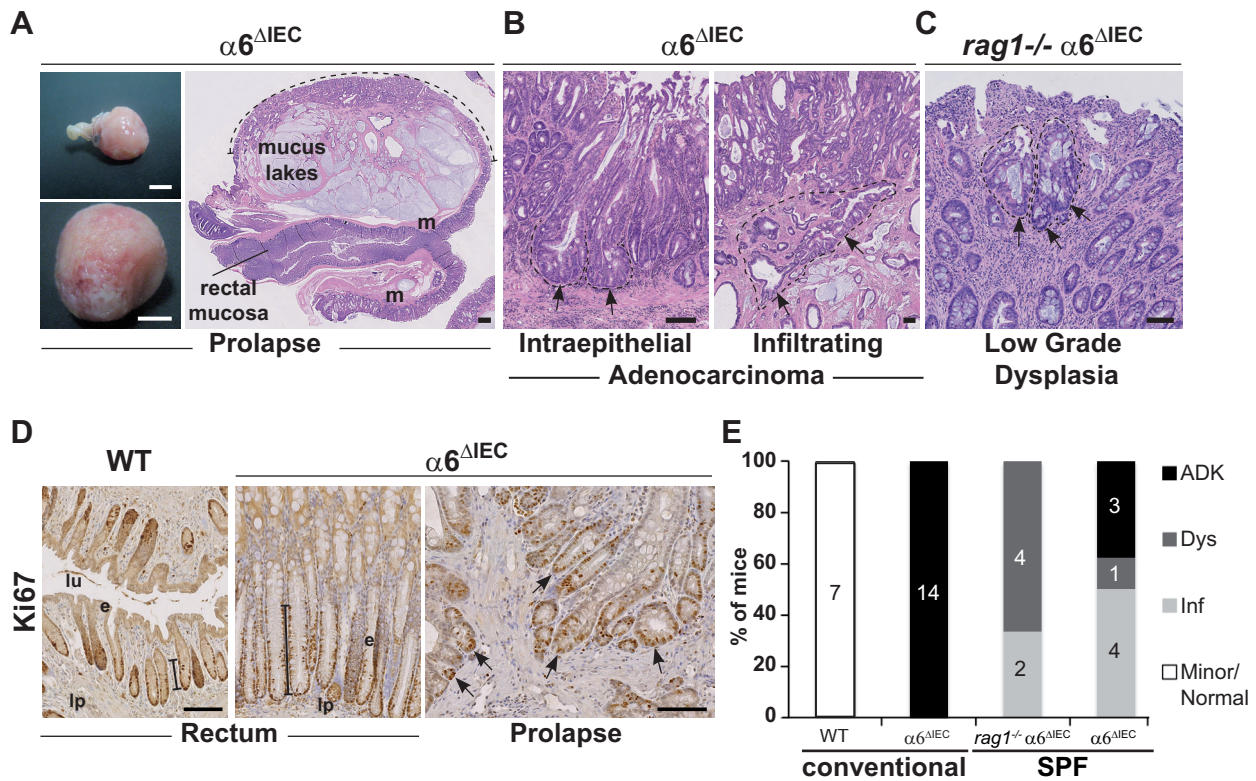
**Figure 7:  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  and combined  $rag1^{-/-} \alpha 6^{\Delta IEC}$  mice display a significant increase of CD11b<sup>+</sup> myeloid cells in the spleen**

**(A-C)** Flow cytometry analysis and quantification of immune cell sub-populations present in total spleen lysates. Results are displayed as scattered dot plots (error bars, standard deviation). Animals were raised in **(A, B)** conventional or **(C)** Specific Pathogen Free (SPF) conditions. In each panel, dots represent the number of positive cells present in the total cell extract for each animal. ns, not significant; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . **(A)** CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes; **(B)** myeloid cells from conventional-housed mice aged 8-13 weeks (n=11 animals/group) or 26-29 weeks (n=7 for WT and n=8 for mutants). **(C)** Myeloid cell analysis in spleen lysates from combined  $rag1 \alpha 6^{\Delta IEC}$  mutant animals aged 16-17 weeks.  $rag1^{-/-}$ , n=5;  $rag1^{-/-} \alpha 6^{\Delta IEC}$ , n=7;  $rag1^{+/-} \alpha 6^{\Delta IEC}$ , n=3. Splenic myeloid cells are defined in **(B)** and **(C)** as: Macrophages, CD11b<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup>; Neutrophils, CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup>.



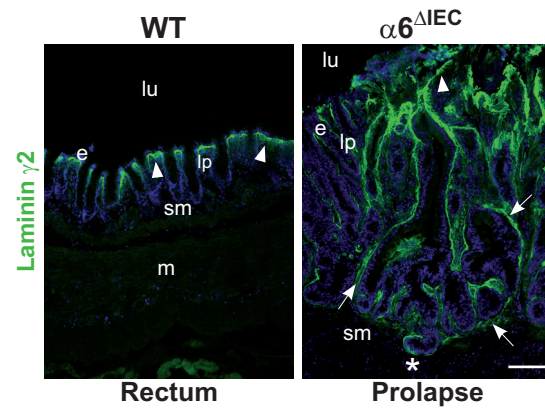
**Figure 8:  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice have elevated IL-1 $\beta$  and IL-18 levels which are antibiotic-responsive**

(A-B) Scattered dot plot quantification of IL-1 $\beta$  (A) and IL-18 (B) levels secreted in the culture medium of colon explants cultured for 24 hours. Six-week old animals received normal drinking water (No ATB) or water containing antibiotics (+ ATB) for 3 weeks prior to dissection. ns, not significant; \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001; in all scattered dot plots, error bars represent the standard deviation.



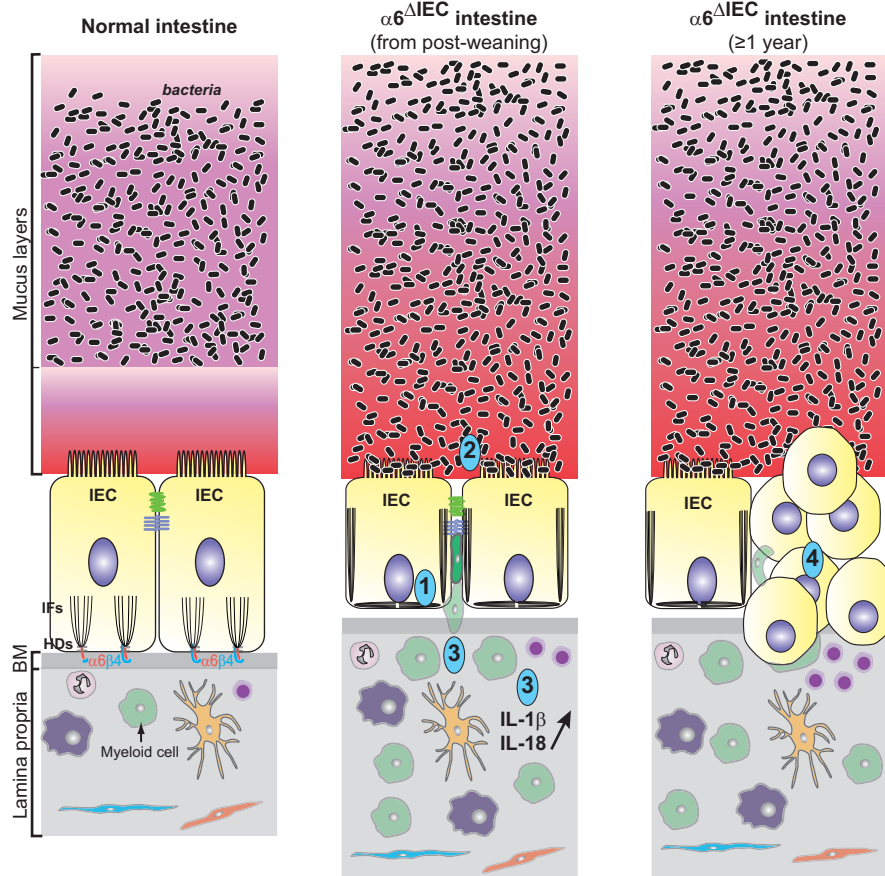
**Figure 9: All  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice spontaneously develop colitis-associated adenocarcinomas**

(A) Wide-field view (left) and histological section (right) of a large prolapse with an infiltrating mucinous adenocarcinoma invading the sub-mucosa and muscle layers in an one-year old mutant mouse. The dotted line indicates the region comprising tumor lesions. Scale bars: 500  $\mu$ m. (B) Views of prolapse-associated tumors in one-year old adults: (left) intraepithelial adenocarcinoma with abnormal glandular architecture; (right) highly infiltrating adenocarcinoma with atypical branched glands penetrating deeply into the sub-mucosa and muscularis propria (dotted line, arrows). Scale bars: 100  $\mu$ m. (C) Section through the recto-anal region of a combined  $rag1^{-/-} \alpha 6^{\Delta IEC}$  mutant showing a low grade dysplasia (dotted line, arrows). Scale bar: 100  $\mu$ m. (D) Ki67 immunostaining (brown nuclei) on rectal sections from one-year old mice. Ki67+ cells are located at the base of the crypts (bar), and in the invading glands of the prolapse associated-adenocarcinoma (arrows). Scale bars: 100  $\mu$ m. (E) Schematic representation showing the total number and the percentage of one-year old animals and the type of lesions they displayed. WT versus simple  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mutants raised in conventional conditions and double  $rag1^{-/-} \alpha 6^{\Delta IEC}$  versus simple  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mutants raised in SPF conditions are illustrated. ADK, adenocarcinoma; Dys, dysplasia; Inf, inflammation.



**Figure 10: Increased laminin expression in the adenocarcinomas from  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice**

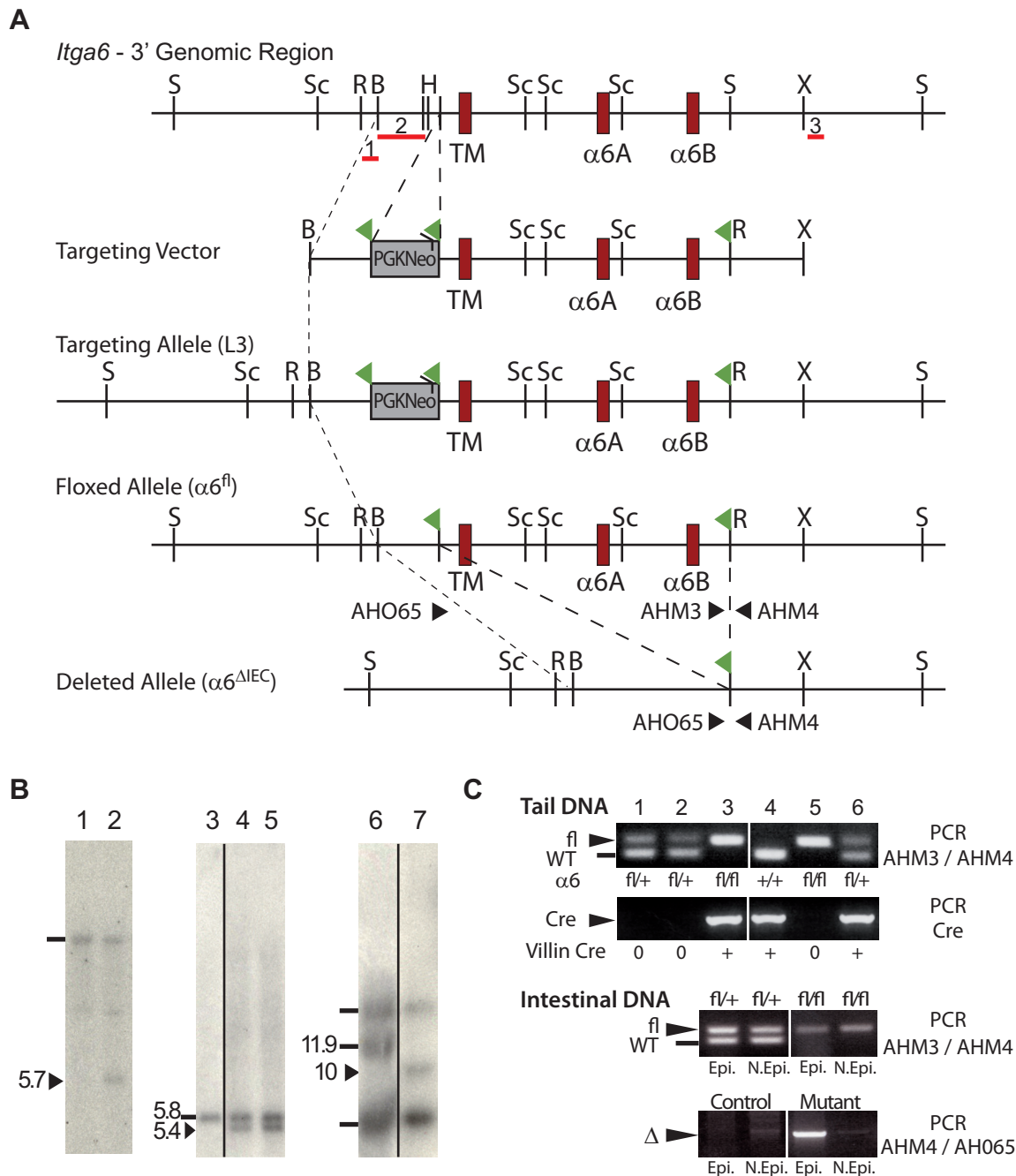
Immunodetection of laminin  $\gamma 2$  chain (green) in WT rectum and  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  prolapse of one-year old mice. DAPI in blue marks nuclei. Arrowheads, basement membrane underlying the surface epithelium. Arrows, deposits of laminin  $\gamma 2$  in the mutant lamina propria. Star, invasive gland infiltrated into the submucosa (sm). Scale bar: 100  $\mu$ m.



- Cascade of events leading to colorectal inflammation and carcinogenesis**
- 1 Loss of hemidesmosomes (HDs); epithelial integrity compromised
  - 2 Mucin barrier integrity compromised; microbiota composition altered
  - 3 Inflammation characterized by myeloid cell infiltration, mostly lymphocyte-independent
  - 4 Adenocarcinoma formation, lymphocyte-dependent

**Figure 11: Model of the sequence of events leading to colorectal inflammation and carcinogenesis**

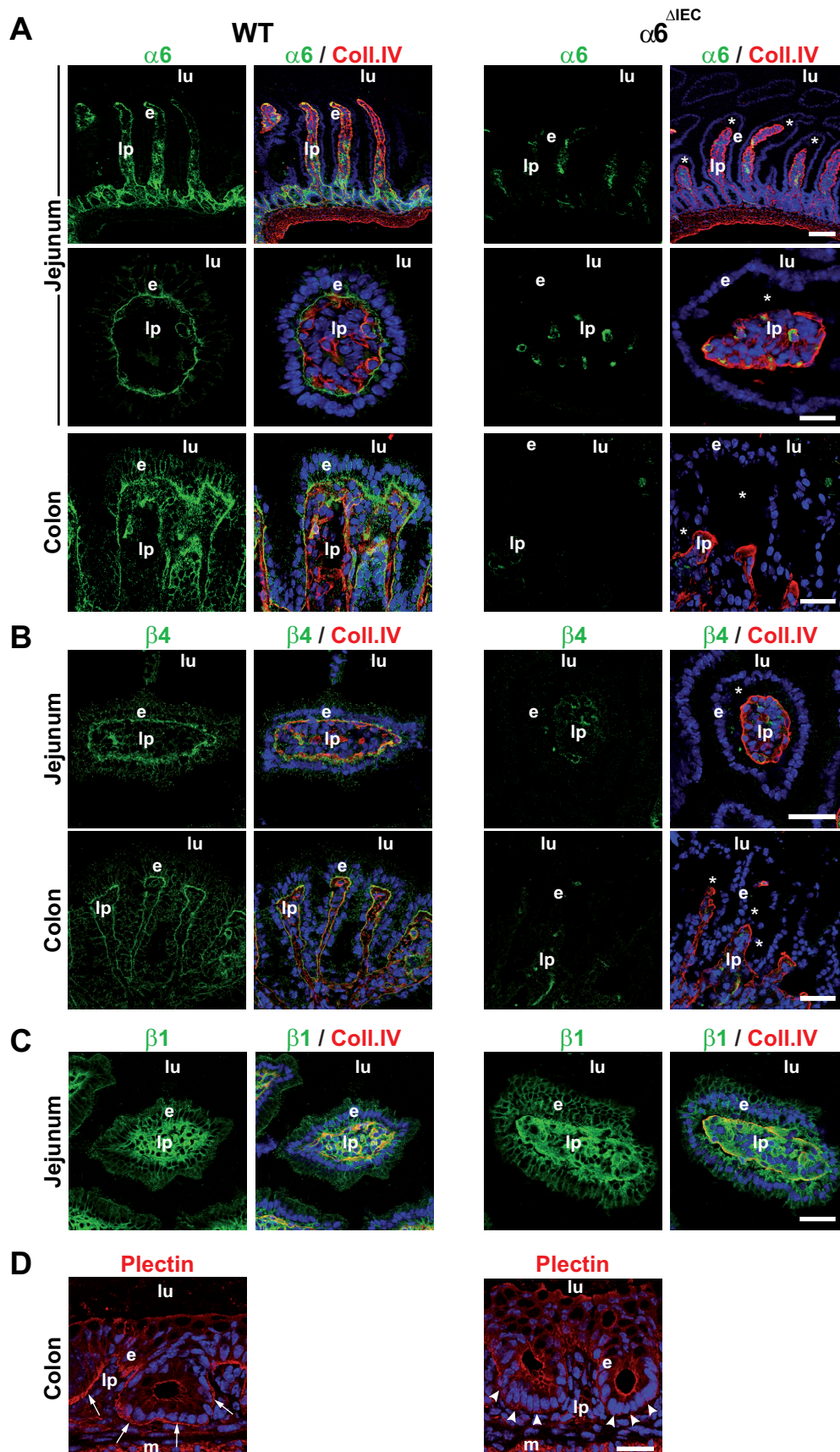
Schematic drawing illustrating two intestinal epithelial cells (IEC) of the large intestine attached through  $\alpha 6\beta 4$ -integrin to the basement membrane (BM) via the hemidesmosomes (HDs). In  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice, we suggest that the following sequence of events occurs. First, loss of the integrin impairs epithelial integrity causing epithelial detachment from the BM; in particular, epithelial cells become less columnar, their intermediate filament (IF) network dissociates and the epithelium as a whole becomes permeable to FITC-Dextran, and probably to commensals or other luminal moieties. Second, presumably as a secondary consequence, the composition and integrity of the mucin layer, as well as the microbiota composition, become altered. Third, altered epithelial barrier function triggers an inflammatory response, induced in part by bacteria since antibiotic treatment strongly reduces inflammation. Inflammation relies on engagement of the innate immune system, mostly independently of Rag1-mediated immunity. It is characterized by enhanced secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18, and infiltration of CD11b<sup>+</sup> myeloid cells in the colonic mucosa. Lastly, progressive colitis was found responsible for spontaneous adenocarcinoma formation in all animals. Transformation into invasive tumours involved the adaptive immune system.



**Supplemental Figure 1: Construction and validation of the intestine-specific *Itga6*-deficient mice**

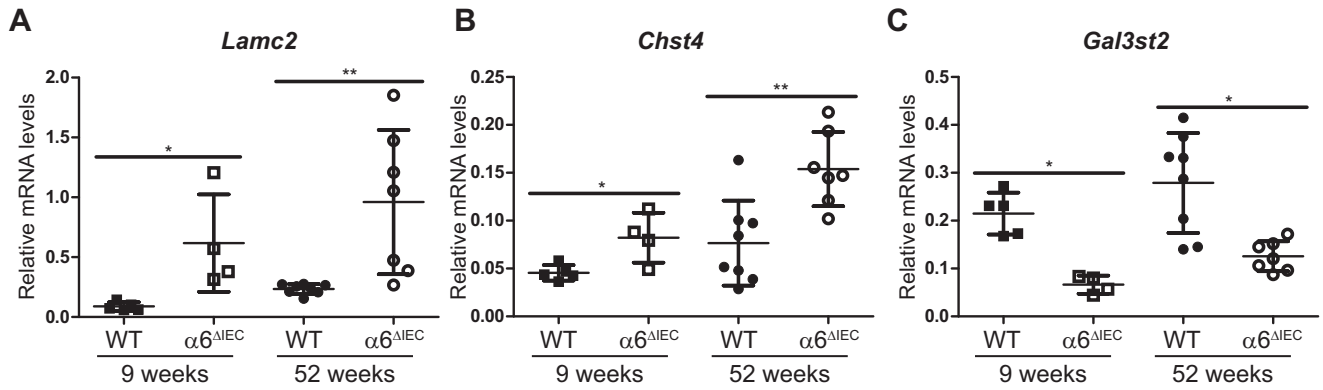
**(A)** Top: 3'-genomic region of the murine *Itga6* gene showing the exons encoding the transmembrane domain (TM) and the alternative cytoplasmic domains  $\alpha 6A$  and  $\alpha 6B$  (red boxes). Probes 1-3 were used to screen ES cells through Southern blotting. The targeting vector was a BamHI-XhoI fragment with 8.6 kb of *Itga6* sequence, which included a PGKNeo cassette (grey box) flanked by 2 loxP sequences, and a 3rd loxP with an engineered EcoRI site (green flags). The targeted allele obtained in ES cells contains 3 loxP sequences (L3). The floxed allele is produced after transfection with a *Cre* expression vector. The recombined allele after complete excision of the region between the loxP sequences lacks the transmembrane and cytoplasmic A-B exons (deleted allele). AHO65, AHM3 and AHM4 primers were used for genotyping (sequences available upon request). B, BamHI; H, HindIII; R, EcoRI; S, Sall; Sc, SacI; X, XhoI. **(B)** Southern blot analysis of targeted ES cell clones. Lanes 1, 2: EcoRI digestion of parental (1) and targeted (2) DNA. An expected additional fragment of 5.7 kb (arrowhead, L3 allele) is observed after hybridization with probe 3. Lanes 3-5: SacI digestion to verify the correct insertion of the 5' end. Arrowhead marks the additional expected 5.4 kb SacI fragment obtained in 2 targeted clones (lanes 4, 5, L3 allele) after hybridization with probe 1 outside the construct. Lanes 6, 7: after *Cre* expression in ES cells, one clone contains the floxed allele in lane 7. Arrowhead marks the novel 10 kb EcoRI band of this floxed allele. **(C)** PCR analysis. Upper panel: results of mice genotyping performed with AHM3/AHM4 primers to visualize the floxed allele and with *Cre*-specific primers to visualize the *Cre* transgene. Lanes 2 and 3 correspond to the mice used to verify the specificity of the *Itga6* deletion in the mutant intestinal epithelium, showed in the lower panels. Intestinal DNA was extracted from mechanically dissociated colonic epithelium (Epi.) and non-epithelial tissue (N. Epi.) and then analyzed by PCR with AHM3/AHM4 primers and with AHO65/AHM4 primers to visualize the deleted allele ( $\Delta$ ). A strong band is detected only in the mutant epithelium.





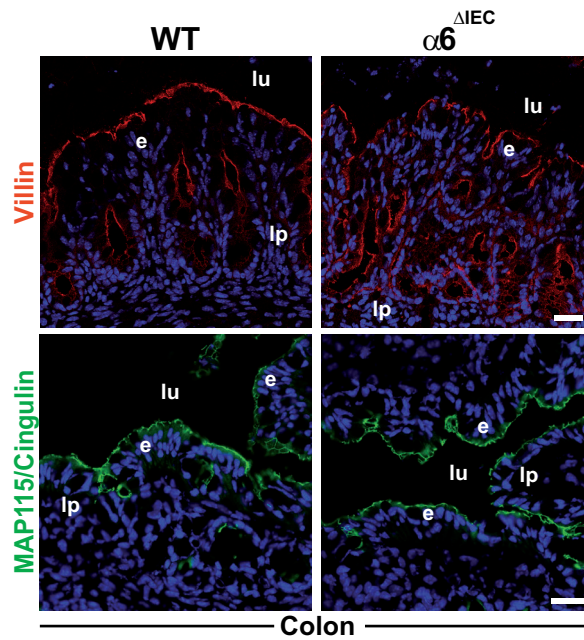
**Supplemental Figure 2: Intestinal epithelial cells of  $\alpha 6^{\Delta \text{IEC}}$  mice do not express  $\alpha 6\beta 4$ -integrin chains but still express  $\beta 1$ -integrin**

(A-C) Immunodetection of  $\alpha 6$ - (A),  $\beta 4$ - (B) and  $\beta 1$ -integrin (C) chains (green) with collagen IV (Coll.IV) (red) marking the basement membrane, in jejunum and colon of young control and  $\alpha 6^{\Delta \text{IEC}}$  mice. Nuclei are stained with DAPI (blue). Low and high magnifications (upper and lower panels respectively) are shown for jejunum in (A). Sections illustrated for the jejunum correspond to transverse sections through a villus (lower panel in (A)).  $\alpha 6$ - and  $\beta 4$ -integrin expression is lost in  $\alpha 6^{\Delta \text{IEC}}$  small and large intestine (A, B). Asterisks indicate areas of epithelial detachment. (D) Immunodetection of plectin, marking the hemidesmosome inner plaque in newborn mice; arrows point at hemidesmosomes in the epithelial basement membrane; note their strong reduction in mutants (arrowheads). e, epithelium; lp, lamina propria; lu, lumen; m, muscle layer. Scale bars: upper panels (A), 100  $\mu\text{m}$ ; other panels, 50  $\mu\text{m}$ .

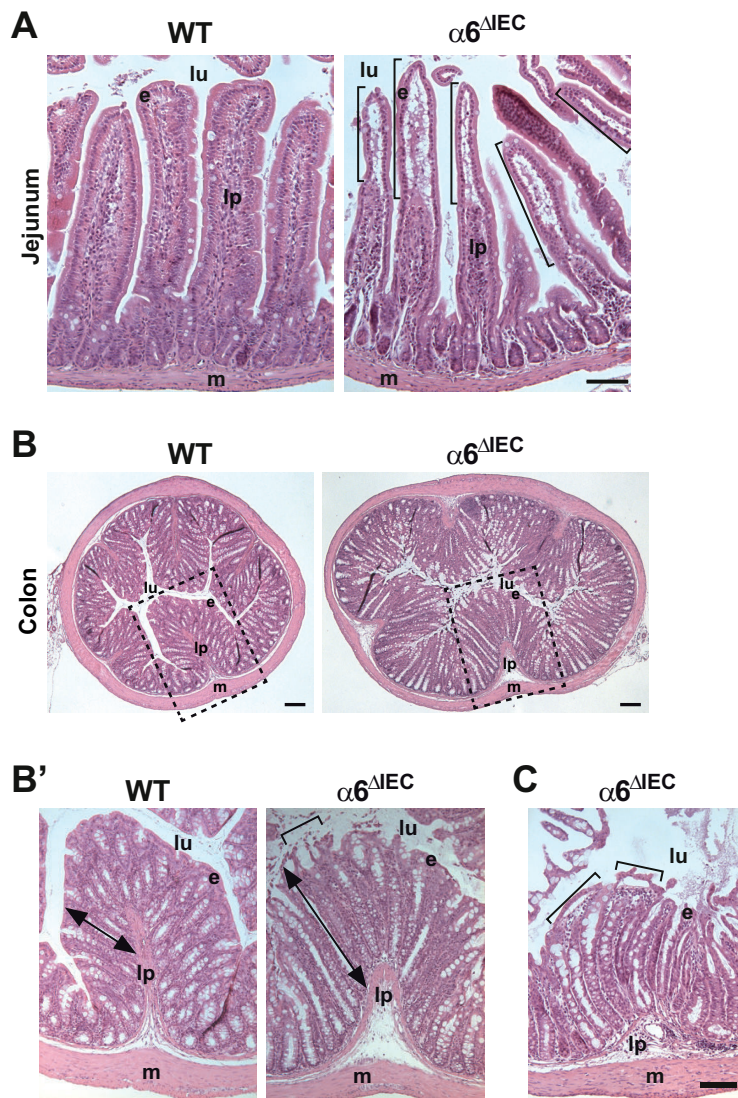


**Supplemental Figure 3:  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice display altered expression of the laminin  $\gamma 2$  (*Lamc2*), and of the sulfotransferases *Chst4* and *Gal3st2* mRNAs during disease progression**

(A-C) RT-qPCR analysis of *Lamc2* (A), *Chst4* (B) and *Gal3st2* (C) mRNA expression in the recto-anal mucosa of controls and  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice at 9 or 52 weeks of age. Results are displayed as scattered dot plots (error bars, standard deviation). Dots represent the relative mRNA expression normalized by *Hprt* mRNA levels. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

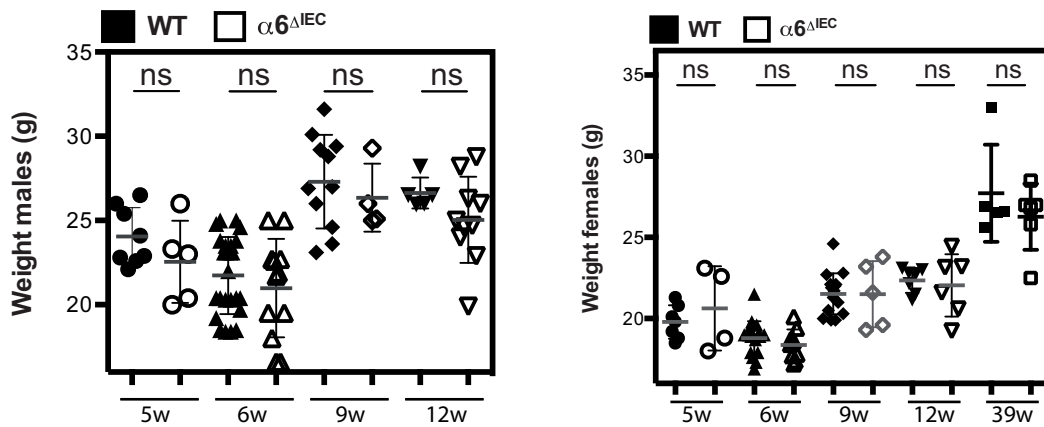


**Supplemental Figure 4: The *Itga6*-deficient intestinal epithelial cells retained their polarity in  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice**  
 Immunofluorescence analysis of colons from suckling control and  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice showing comparable apical staining for villin, an intestinal brush border marker (red), and MAP115/Cingulin (green), a tight junction marker, in WT and mutant sections; cell polarity was retained in  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  epithelium. Nuclei are stained with DAPI (blue). e, epithelium; lp, lamina propria; lu, lumen. Scale bars, 50  $\mu$ m.



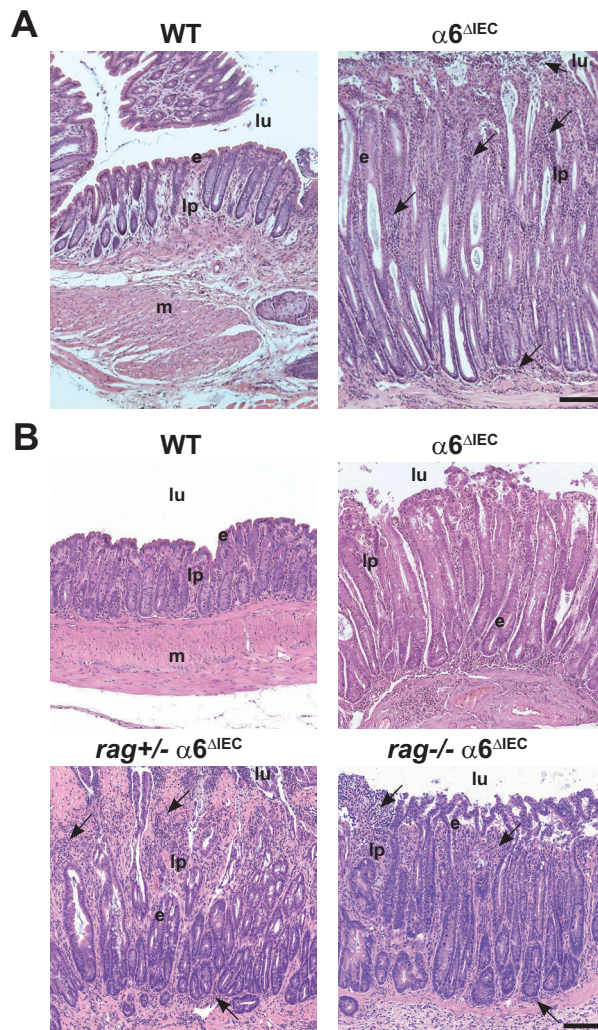
**Supplemental Figure 5: Intestinal erosion in young  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice**

(A-C) Histological sections of jejunum (A) and colons (B, B', C) from WT and  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  animals (A, B, B', 10-week old mice; C, 3-week old mice). (B') Enlargement of the areas boxed in (B). The mutant colon has longer crypts as compared to the WT (double arrows in panel B'). (C) Enlargement of the colon from a 3-week old  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  animal. Note the areas of epithelial detachment observed at the mutant surface epithelium (brackets in A, B', C). e, epithelium; lp, lamina propria; lu, lumen; m, muscle layer. Scale bars: 100  $\mu$ m (B); 200  $\mu$ m (others).



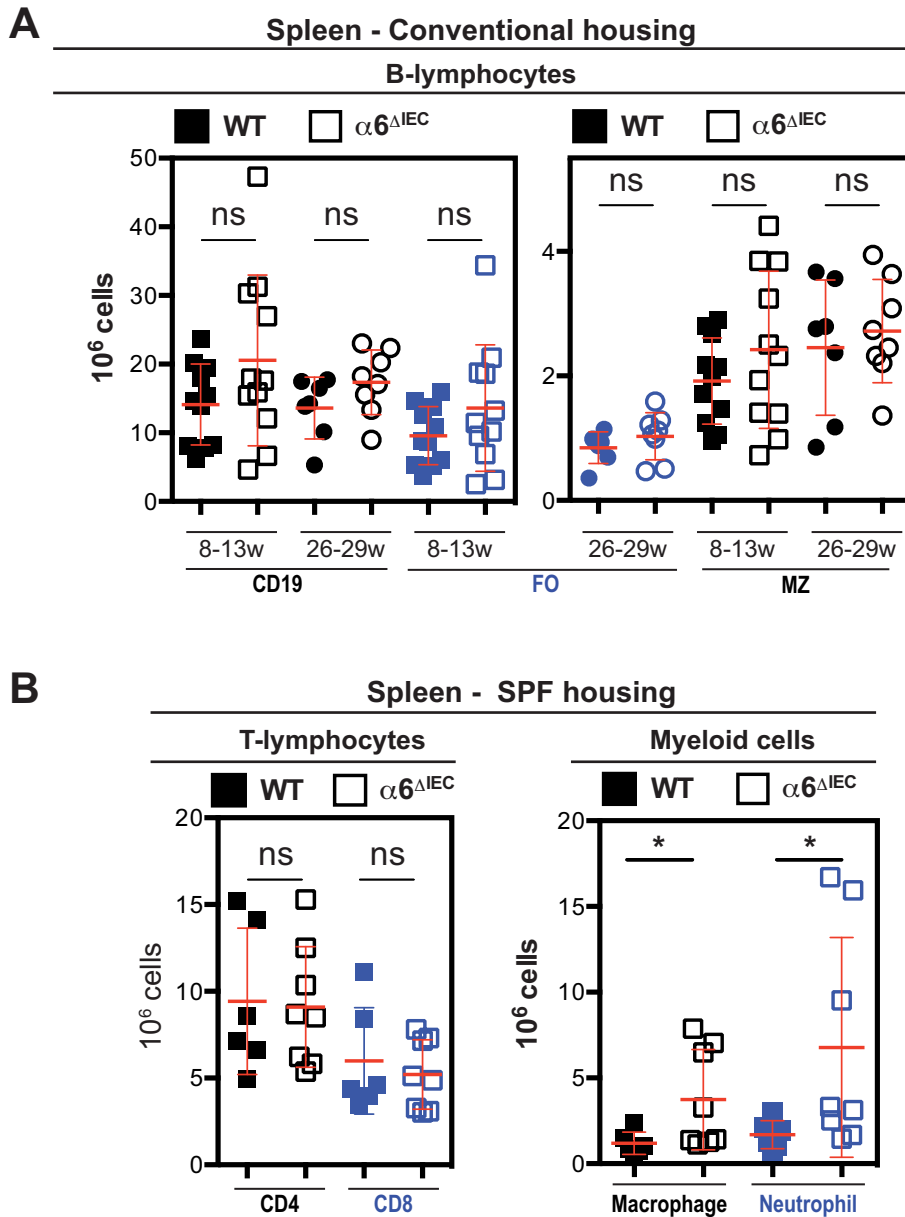
**Supplemental Figure 6:  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice display normal growth development.**

Body weight measurement of WT and  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  males and females taken from several experiments at different ages. ns, not significant.



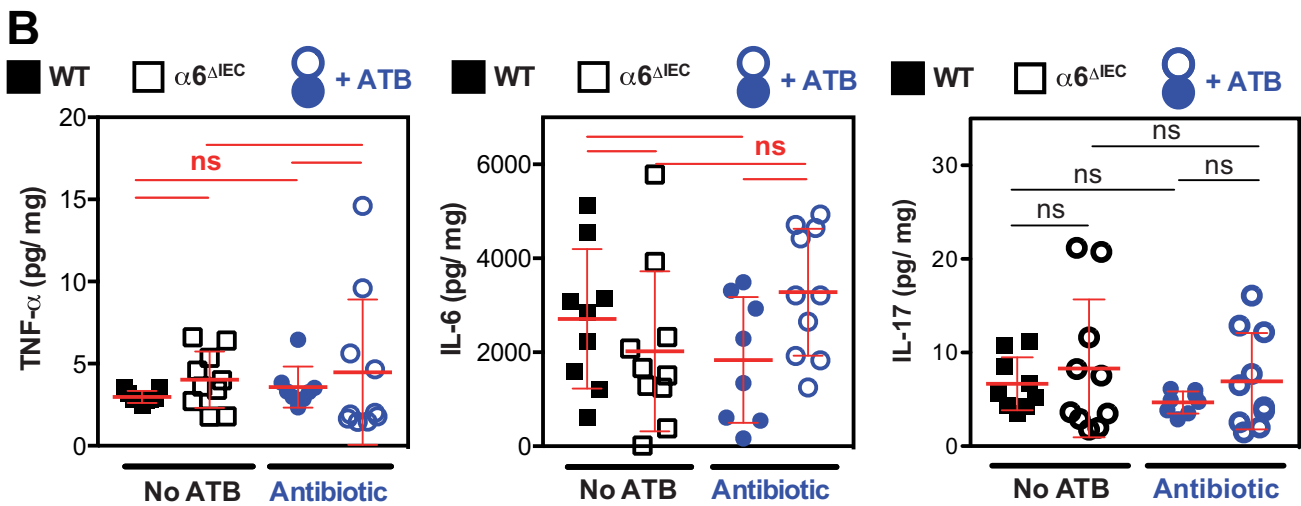
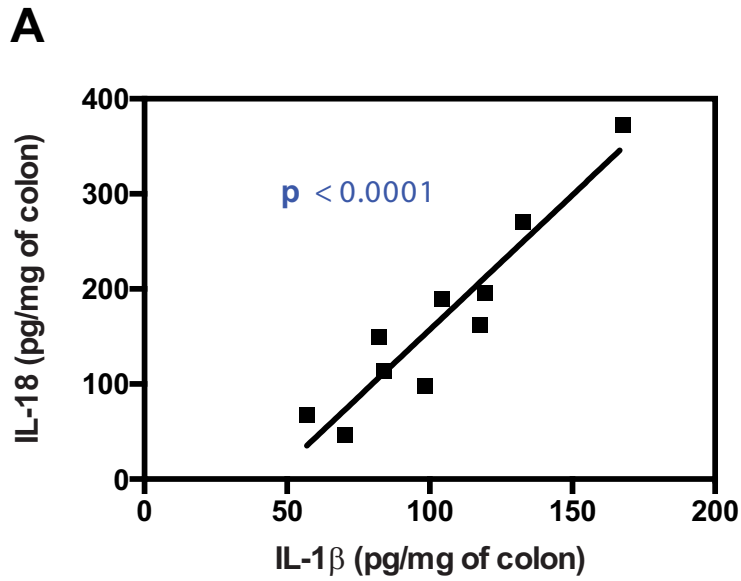
**Supplemental Figure 7: Infiltration of immune cells in  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice and  $rag1^{-/-} \alpha 6^{\Delta IEC}$  mice**

(A-B) Haematoxylin/eosin-stained longitudinal sections of (A) control rectum and  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  prolapse (20-week old mice), or (B) colons of control,  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  and  $rag1^{-/-} \alpha 6^{\Delta IEC}$  (16-week old mice). (A) Large immune infiltrates are visible in the mutant mucosa (arrows) at the ulcerated surface and in the sub-mucosa. (B) Compared to the control colon, the crypts of  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  or  $rag1^{+/-} \alpha 6^{\Delta IEC}$  mutants, and  $rag1^{-/-} \alpha 6^{\Delta IEC}$  double mutants are equally elongated, disorganized and infiltrated. e, epithelium; lp, lamina propria; lu, lumen. Scale bars: 100  $\mu m$ .



**Supplemental Figure 8:  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  spleens displayed normal rates of B- and T-lymphocytes and increased number of CD11b+ myeloid cells**

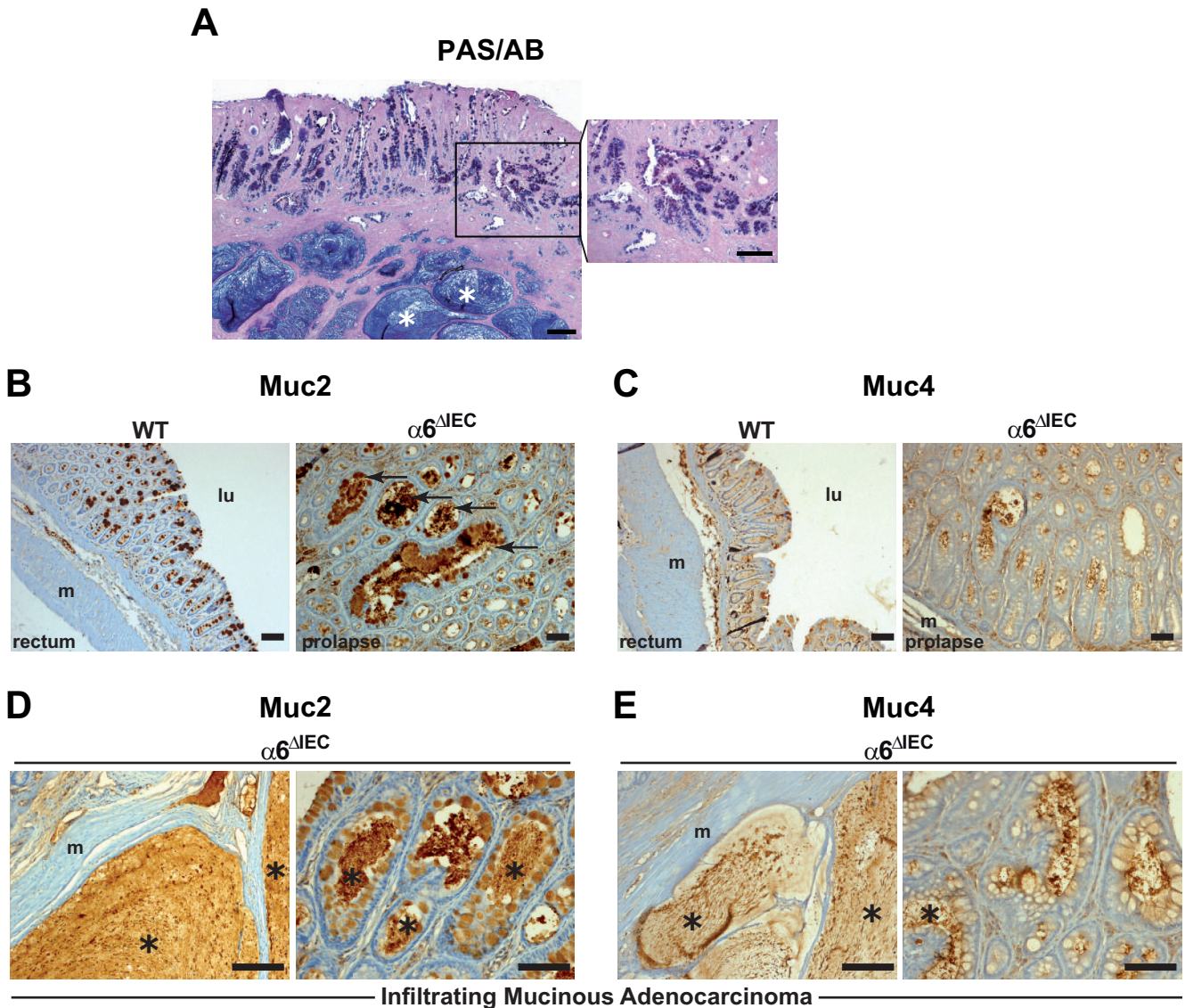
(A-B) Flow cytometry analysis of B-lymphocytes (A) and of T-lymphocytes and myeloid cells (B) from spleen derived cells of control and  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice. Animals were raised in conventional (A) or SPF (B) conditions. Results are displayed as scattered dot plots (error bars, standard deviation). (A) There were no changes among CD19+, follicular (FO) or marginal zone (MZ) subsets of B-lymphocytes; the graphs for the FO population are split in two due to a change in scale. (B) There were no changes among CD4+ or CD8+ T lymphocytes (left), whereas CD11b+ CD115+ (scored as macrophages), and CD11b+ Gr1+ (scored as neutrophils) were significantly higher in SPF-housed  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  animals. \*:  $p \leq 0.05$ .



**Supplemental Figure 9: IL-1 $\beta$  and IL-18, but not TNF- $\alpha$ , IL-6 or IL-17, increase in  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  colons**

(A) Correlation analysis of IL-1 $\beta$  and IL-18 levels from colonic explants in untreated mutant animals ( $p < 0.0001$ , Spearman's test) (see Figure 8). (B) Quantification of the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-17 secreted in the culture medium of colon explants cultured for 24 hours. Results for 9-week old untreated and antibiotic-treated animals are illustrated. Note that the levels of these pro-inflammatory cytokines were similar in control and mutant culture medium. Filled symbols, wild-type explants; open symbols, mutant explants; ATB, antibiotics.





**Infiltrating Mucinous Adenocarcinoma**

**Supplemental Figure 10:  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mice develop adenocarcinomas with mucinous features**

**(A)** Mutant prolapse section stained with PAS/AB showing an infiltrating mucinous adenocarcinoma displaying large acidic mucus lakes (asterisks); enlargement of the boxed area (right) shows infiltrating neoplastic glands. Scale bars: 200  $\mu$ m (left); 100  $\mu$ m (right). **(B-E)** Immunostainings of control and  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  recto-anal region from one-year-old animals showing Muc2 **(B, D)** and Muc4 **(C, E)** mucins. **(B)** Strong Muc2 staining (brown) was detected in the goblet cells of control animals, mainly in the upper part of glands, as well as in the dilated glands of the mutant prolapse (arrows). **(C)** Compared to the control recto-anal region where Muc4 signal was restricted to the upper third of the crypts, in mutant crypts Muc4 was detected in the lumen and at the apical membrane of goblet cells. Scale bars, 100  $\mu$ m. **(D, E)** Infiltrating mucinous adenocarcinoma in the rectal prolapse of an  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mutant. Left panels: Muc2+ and Muc4+ mucus lakes (asterisks) infiltrated in the muscle layer (m). Right panels: Muc2+ and Muc4+ material in the lumen (asterisks) and in the cells lining the mucus-filled cysts. Note again that Muc4 appears to mark the membrane of goblet cells. Scale bar, 100  $\mu$ m. e, epithelium; lu, lumen; m, muscle layer.

© 2000-2014 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.					
Upstream Regulator	Fold Change	Molecule Type	Predicted Activation State	Activation	p-value of overlap
TNF		cytokine	Activated	3,968	7,88E-17
IL1B	8,326	cytokine	Activated	3,454	2,81E-14
TNFSF12		cytokine	Activated	2,899	3,84E-10
KRT17		other	Activated	2,828	3,06E-08
ERK1/2		group	Activated	2,772	8,35E-07
IKBKB		kinase	Activated	2,700	4,31E-10
TLR3		transmembrane receptor	Activated	2,660	1,76E-09
MYD88		other	Activated	2,640	2,35E-12
TLR9		transmembrane receptor	Activated	2,622	2,73E-11
PTPRJ		phosphatase	Activated	2,449	1,17E-04
OSM		cytokine	Activated	2,448	5,11E-11
RUNX2		transcription regulator	Activated	2,425	1,58E-07
SPP1	4,812	cytokine	Activated	2,425	2,70E-05
MAP3K1		kinase	Activated	2,412	1,75E-07
PLAU		peptidase	Activated	2,408	2,91E-12
EGR1		transcription regulator	Activated	2,367	2,47E-06
TNFRSF1A		transmembrane receptor	Activated	2,208	5,65E-06
P38 MAPK		group	Activated	2,135	7,23E-08
MAP3K8		kinase	Activated	2,095	3,64E-04
CSF1		cytokine	Activated	2,000	5,93E-05

**Tableau 1: liste des 20 protéines régulatrices de gènes ayant les scores d'activation les plus élevés d'après Ingenuity Pathway Analysis (IPA)**

La liste des gènes analysés a été établie en sélectionnant les gènes dont le rapport des niveaux d'expression (zones tumorales)/(zones inflammatoires) est supérieur à 2 ou inférieur à 0,5 et une valeur  $p < 0,01$ . Le tableau indique de gauche à droite, le symbole du gène codant la protéine régulatrice, le facteur de modification s'il est significatif, le type de molécule, l'état d'activation, le score d'activation et la valeur  $p$  de l'analyse attribués par le programme IPA.

ID	Molecules in Network	Score	Focus Mole	Top Diseases and Functions
1	↑ADAMTS12, Alpha catenin, ↑BDKRB1, ↑COL1A1, Collagen type I, Collagen(s), ↑CXCL6, hemoglobin, ↑HP, IL1, ↑IL11, IL-1R, ↑IL1A, ↑IL1B, ↑IL1RL1, ↓LUM, ↓MEP1A, ↑MMP8, ↑MMP9, ↑MMP13, ↑PHLDA1, ↑PPBP, ↑Reg3g, ↑S100A9, ↓SAA1, ↑Saa3, ↓SCNN1G, ↑SEMA7A, ↓SLC26A3, ↓SLC9A3, ↑SPP1, ↑TIMP1, ↓TNXB, ↑TREM1, ↑WNT5A	41	29	Inflammatory Response, Cellular Movement, Hematological System Development and Function
2	↓ACTA2, ↓ADCY5, Akt, Ap1, ↓ATP2B4, ↓CNN1, ↑CYR61, ↓DMD, ↑EPA2, ↓FBXO32, Fc gamma receptor, ↓FLNC, FSH, ↓HSPB6, Immunoglobulin, ↓KCNMA1, ↑LOX, ↓MAPK10, Mek, ↓mir-143, ↓mir-145, ↓MYH11, ↓MYOCD, ↓NOS1, P38 MAPK, ↓PLCB4, ↓PLN, ↓PRKCB, ↓PRKG1, ↑RET, ↑SERPINE1, ↓SGCD, ↓SYNM, Tgf beta, ↓VIP	36	27	Cardiovascular System Development and Function, Organ Morphology, Skeletal and Muscular System Development and Function
3	Alp, ↑ANXA1, ↓AQP8, ↓AR, ↑Bglap (includes others)*, ↑Bmyc, ↓CA4, ↑CCND1, ↓CD180, ↓CLDN1, ↑CXCL3, ↓DES, ↓DSG3, ERK1/2, ↓GAL, ↓GPC3, ↑INHBA, Jnk, ↑KRT14, Lh, Mapk, ↑MUC1, ↑NPPC, ↓NPY, ↓OGN, ↑PLAUR, Proinsulin, ↑PTGS2, Ras, ↑SRD5A1, STAT5a/b, ↓SULF2, ↑TNFRSF11B, ↓TRG, ↑Wfdc18	36	27	Organ Morphology, Reproductive System Development and Function, Nutritional Disease
4	↑ALB, ↑ARG1, ↓Ccl8, ↓CD28, ↓CD36, ↓CHRNA3, ↓CLEC10A, ↑Clu, ↓CMPK2, ↑CXCL14, ↑CXCR2, ↑HBEGF, ↓IDO1, ↑Ifi202b, ↓IFIT1B, IFN alpha/beta, Ifnar, IgG, IL12 (complex), IL12 (family), Interferon alpha, ↓IRF7, JINK1/2, ↑MMP10, N-cor, NFkB (complex), Nr1h, ↓Oasl2, ↓PDK4, ↑SELP, ↓SLC2A4, ↓Sp100, ↓TGFB3, Tlr, ↑TNFRSF12A	30	24	Immunological Disease, Lipid Metabolism, Molecular Transport
5	↑ABC4, AHR, ↑ANGPTL7, ↑ARG2, CALB1, CELA1, ↑CES1, ↓CLDN1, ↑CLDN4, ↑COL12A1, ↑COL1A1, COL6A1, CYP1A2, ↓FAM129A, FLT1, ↓FMO2, ↓FXVD1, GATA3, GLIS2, IL22, ↑LTBP2, MT1E, MT1H, NFE2L2, ↓NXPE2, PRKCA, ↓Rdh1 (includes others), ↓SAA1, ↓SLC16A5, SPARC, ↑TEAD4, TGFBR2, ↑TNC, TSC2, Vegf	18	17	Organismal Injury and Abnormalities, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation

**Tableau 2: Liste des 5 réseaux moléculaires ayant les scores les plus élevés**

La liste des gènes analysés a été établie en sélectionnant les gènes dont le rapport des niveaux d'expression (zones tumorales)/(zones inflammatoires) est supérieur à 2 ou inférieur à 0,5 et une valeur  $p < 0,01$ . Les gènes indiqués en gras sont ceux dont l'expression varie au sein du réseau, une flèche rouge indiquant une surexpression, une flèche verte indiquant une sous-expression. Le réseau 1 (le plus activé) est détaillé dans la Figure 1.

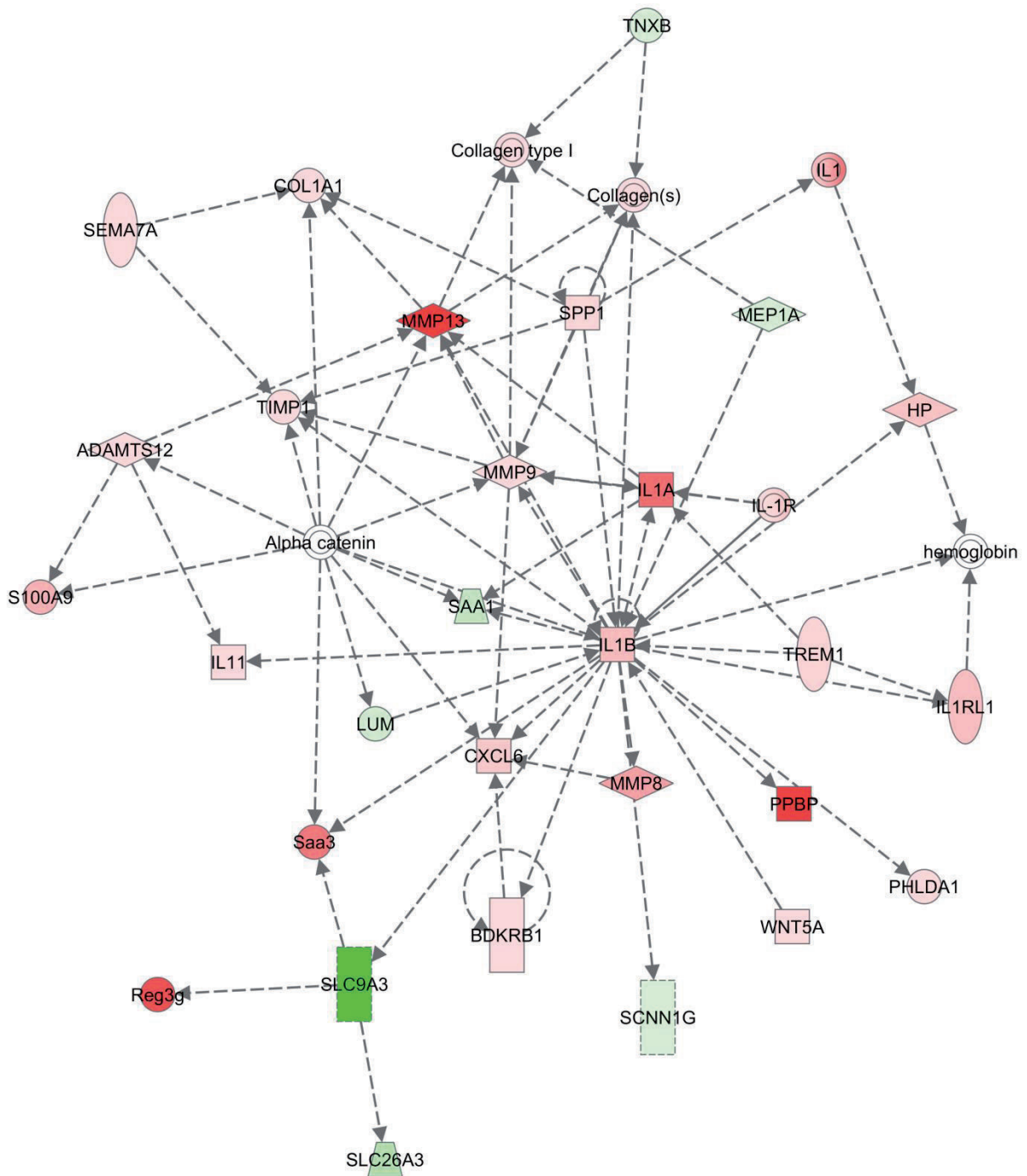
## II- Analyse des mécanismes moléculaires impliqués dans carcinogénèse associée à l'inflammation dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}$

Plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires sont impliqués simultanément dans le phénotype observé chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Nous avons en plus des résultats présentés dans l'article soumis, analysé d'autres voies de signalisation et d'autres mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans l'initiation de l'inflammation et la progression tumorale. En effet, le phénotype observé chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  est une succession d'évènements reproductibles qui conduit au développement de cancers colorectaux chez 100% des souris mutantes. Cette observation suggère fortement que l'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$  conduit non seulement à la perte de l'homéostasie mais oriente le phénotype vers une progression pro-tumorale. Je me suis donc attaché à définir les mécanismes et les voies de signalisation impliqués dans la carcinogénèse chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .

### 1. Analyse du transcriptome

#### **Stratégie**

La transformation cellulaire résulte de l'accumulation dans la cellule de mutations génétiques conduisant par exemple à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur ou à l'activation d'oncogènes. De manière générale, ce processus fait intervenir de nombreuses voies cellulaires apportant à la cellule un avantage sélectif. Notre stratégie a consisté à définir trois stades chez des souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  âgées de 53-80 semaines : le stade normal (issu de la muqueuse de souris témoins), le stade inflammatoire (tissu inflammatoire des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ ) et le stade tumoral (tumeur des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ ). Dans le but de définir une signature moléculaire dans ces trois contextes différents, le tissu provenant des zones inflammatoires et des zones tumorales des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  a été prélevé par macro-dissection, à l'aide d'un scalpel, à partir de coupes congelées comprenant le compartiment recto-anal ; la muqueuse rectale normale des souris témoins a quant à elle été récupérée en raclant



© 2000-2014 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

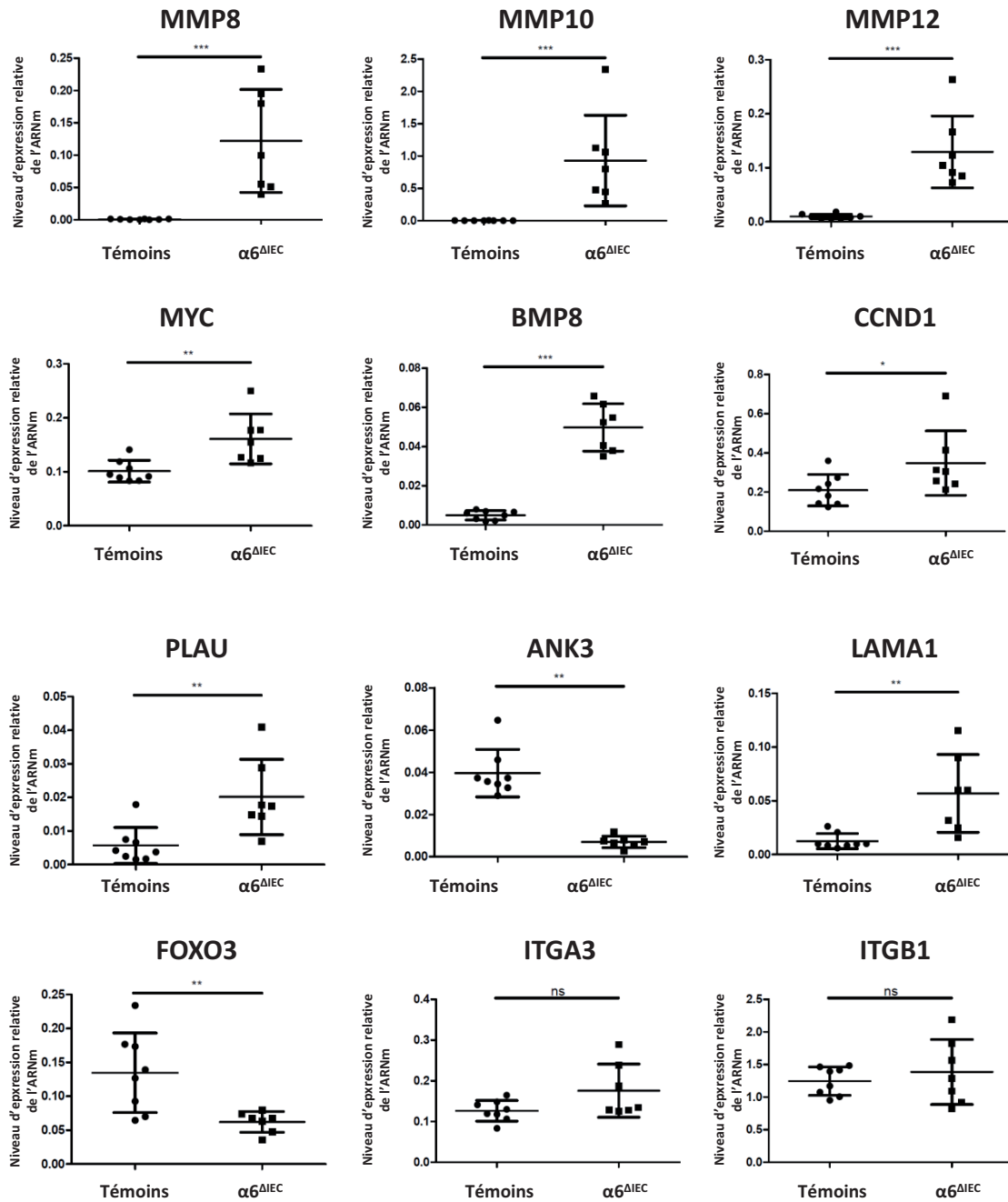
**Figure 1: Réseau moléculaire enrichi dans les zones tumorales dans le modèle  $\alpha^{AIEC}$**

Illustration du réseau moléculaire ayant le score attribué par IPA le plus élevé. Les gènes surexprimés sont indiqués en rouge et les gènes sous-exprimés sont indiqués en vert. L'intensité de la couleur correspond au niveau d'expression. Les flèches pleines montrent les interactions directes et les flèches en pointillés les interactions indirectes.

l'épithélium de surface à l'aide d'une lame de verre. A partir des échantillons collectés, nous avons initié une comparaison du transcriptome par puces à ADN (Affymetrix) du tissu tumoral par rapport au tissu inflammatoire (tissu adjacent) et à l'épithélium normal. L'analyse des données Affymetrix a été réalisée grâce à un programme de traitement de données de puces à ADN appelé « Ingenuity Pathway Analysis ». Ce programme permet d'analyser à partir d'une liste de gènes et en utilisant une base de données de la littérature, le lien entre différents gènes que nous sélectionnons, les processus biologiques activés (cancer, maladies inflammatoires...) et les régulateurs en amont de ces gènes sélectionnés. Finalement, le programme attribue à chaque analyse un score et une probabilité  $p$  qui permet de déterminer la solidité et validité de l'analyse.

## Résultats

Nous avons essentiellement focalisé notre analyse sur la signature moléculaire des zones tumorales comparées aux zones inflammatoires. Cette analyse permet de caractériser les réseaux moléculaires enrichis dans les zones tumorales. Les données ont été filtrées en comparant les zones tumorales (A) aux zones inflammatoires (R) et en sélectionnant les gènes dont le niveau d'expression a un ratio A/R supérieur à 2 ou inférieur à 0.5 et une valeur  $p < 0,01$ . Cette analyse a permis d'identifier plusieurs protéines impliquées dans la régulation des gènes. Le tableau 1 illustre les 20 régulateurs dont les scores, attribués par « Ingenuity Pathway Analysis », sont les plus élevés. Nous retrouvons plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation comme les cytokines pro-inflammatoires TNF et IL-1 $\beta$ , des protéines engagées dans la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes ou dégâts cellulaires, MyD88, TLR3 et TLR9, des kinases impliquées dans la prolifération, P38 MAPK et ERK1/2, ou des protéines liées au cytosquelette et à la matrice extracellulaire comme KRT17 (kératine 17) et PLAU (Activateur du Plasminogène de type urokinase). De plus, l'analyse des liens directs ou indirects entre les différents gènes a permis de mettre en évidence plusieurs réseaux moléculaires dont les plus activés sont illustrés dans le tableau 2. Une vue plus détaillée du réseau moléculaire le plus activé est présentée dans la figure 1. Parmi les membres de ce réseau on peut citer plusieurs gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire comme les MMP13, MMP9 et MMP8. D'autres protéines sont



**Figure 2: Validation par RT-qPCR des altérations d'expression de gènes impliqués dans le remodelage de la matrice et dans la carcinogénèse colorectale sélectionnés à partir des analyses Affymetrix**

Niveau d'expression de différents gènes sélectionnés après analyse Affymetrix évalué par RT-qPCR à partir de rectum de souris témoins et α6<sup>ΔIEC</sup> âgées de 52 semaines. Les valeurs représentent l'expression relative de l'ARNm normalisée par rapport à l'expression de l'ARNm du gène de référence HPRT. ns, non significatif; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001.

impliquées dans l'inflammation telles qu'IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL1r1 (ST2), S100A9, CXCL6 (CXCL5), IL-1R, saa3 et Reg3 $\gamma$ .

En plus des analyses des données par « Ingenuity Pathway Analysis», nous avons sélectionné et validé par RT-qPCR à partir d'échantillons de rectum provenant de souris âgées d'un an, certains gènes impliqués dans le remodelage de la matrice et dans la carcinogénèse colorectale (Fig. 2). Parmi ceux-ci, plusieurs gènes codant pour des MMP sont fortement surexprimés et probablement impliqués dans l'invasion tumorale. Des gènes plus directement impliqués dans la transformation tumorale sont également surexprimés comme C-Myc, un facteur de transcription associé à plusieurs cancers, la cycline D1 (CCND1) qui joue un rôle essentiel dans le cycle cellulaire, Bmp8 qui est impliqué dans la voie TGF- $\beta$  et FOXO3 (Forkhead box O3), un facteur de transcription associé aux cancers colorectaux. .

En outre, l'analyse des données de puces à ADN a permis d'identifier une forte activation de la voie de synthèse de la prostaglandine E2 (Fig. 3). Cette voie est impliquée dans la tumorigénèse colorectale notamment dans les stades tardifs de la transformation. L'inhibition de COX2 diminue le temps d'apparition des tumeurs chez les souris *APC<sup>Min</sup>* (Brown and DuBois, 2005). Nous avons pu confirmer, par RT-qPCR, l'augmentation de l'expression de COX2 (ptgs2), un élément-clé de cette voie (Fig. 3).

## Conclusion :

-L'analyse du transcriptome a permis d'identifier plusieurs réseaux moléculaires activés dans les tumeurs et de nombreux gènes régulateurs.

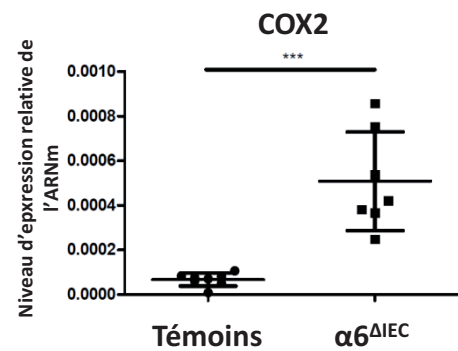
-Parmi les régulateurs, plusieurs protéines impliquées dans l'inflammation sont présentes telles que TNF, IL-1 $\beta$ , MyD88, TLR3 et TLR9.

-Le réseau le plus activé contient de nombreuses protéines impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire et l'inflammation telles que CXCR2, CXCL5, ST2 et IL-1 $\beta$ .

-La voie de synthèse de la prostaglandine E2 est probablement activée dans le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .

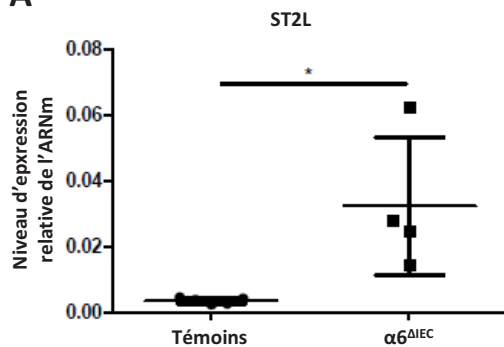
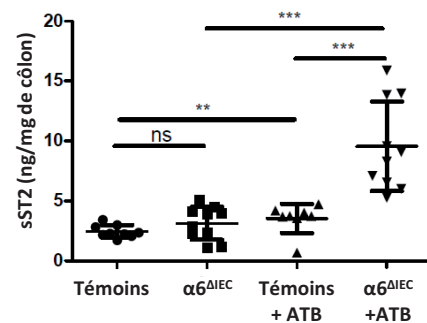
**A**

Gènes	Ratio (A/R)	Ratio (R/T)
Phospholipase A2	1,17	13,1
Cyclo-oxygénase 2	4,29	17,52
Prostaglandine E synthase	1,85	4,88
15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase	-1,78	-3,38

**B**

**Figure 3: Activation de la voie de synthèse des prostaglandines dans le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$**

(A) Tableau récapitulatif illustrant les variations d'expression des membres de la voie de synthèse des prostaglandines entre les zones tumorales et les zones inflammatoires (A/R), et entre les zones inflammatoires et la muqueuse rectale normale de souris témoins (R/T). (B) Niveau d'expression de COX2 dans le rectum de souris témoins (n=8) et  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  (n=7) âgées de 52 semaines.\*\*\*, p<0,001.

**A****B**

**Figure 4: Altération de l'expression du récepteur ST2 et de la sécrétion de la cytokine sST2 dans le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$**

(A) Niveau d'expression de ST2L dans le rectum évalué par RT-qPCR sur 5 souris témoins et 4 souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  âgées de 9 semaines. Les valeurs représentent l'expression relative de l'ARNm normalisée par rapport à l'expression du gène de référence HPRT. \*, p<0,05. (B) Dosage par ELISA de la protéine sécrétée sST2 dans le milieu de culture issu d'explants de côlon cultivés pendant 24h. Le traitement aux antibiotiques (ATB) a été ou non administré à des animaux âgés de 6 semaines, pendant une durée de 3 semaines avant sacrifice. ns, non significatif; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001.



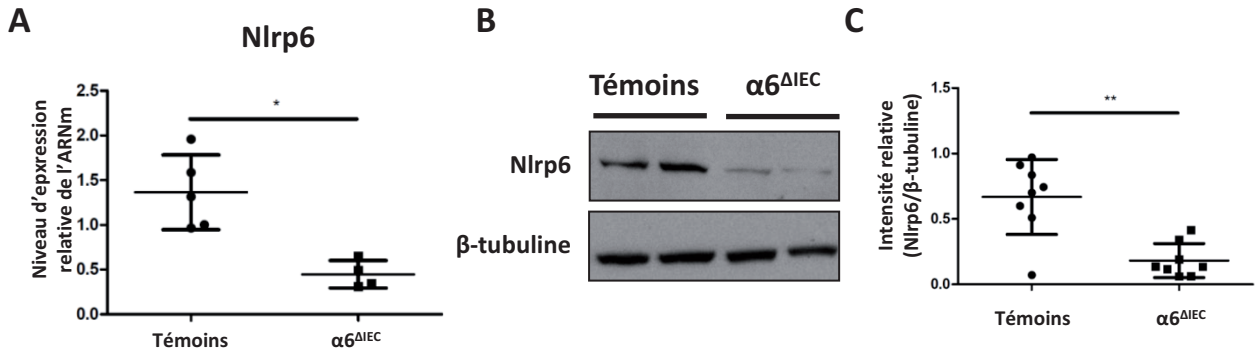
## 2. Dérégulation de ST2 dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}$

Les données de puces à ADN ont permis de mettre en évidence l'implication et l'enrichissement de nombreuses cytokines et protéines de l'inflammation dans les zones tumorales parmi lesquelles plusieurs cytokines et récepteurs de la famille IL-1. Le récepteur dont le niveau d'expression de l'ARNm est le plus augmenté est ST2. La voie de signalisation IL-33/ST2 est impliquée dans le développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Les souris déficientes en IL-33 ou ST2 sont en effet moins susceptibles de développer une inflammation après traitement au DSS (Oboki et al., 2010; Sedhom et al., 2013). Il existe deux formes majoritaires de la protéine ST2, la forme membranaire ST2L et la forme sécrétée ou soluble sST2. Les deux protéines ont un rôle inverse, la protéine sST2 joue en effet un rôle d'antagoniste lorsqu'elle est sécrétée et va venir se lier au ligand IL-33 afin d'empêcher sa liaison au récepteur ST2L.

La protéine ST2 est affectée par la perte de l'intégrine  $\alpha 6$  et est probablement impliquée dans le phénotype observé chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . L'implication de cette protéine sera plus détaillée dans la partie 4 des résultats. Nous avons observé chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  comparées aux souris témoins, une augmentation du niveau d'expression de l'ARNm codant pour la forme membranaire de la protéine ST2 (ST2L) (Fig. 4A). Le dosage par ELISA de la protéine soluble ST2 (sST2) sécrétée dans le milieu de culture issu d'explants de côlon est en revanche équivalent chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et les souris témoins. De manière étonnante, après traitement aux antibiotiques, le niveau de sécrétion de la protéine sST2 est augmenté chez les souris témoins et les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ , en étant 2 fois plus élevé chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  (Fig. 4B). Ce résultat démontre que les bactéries interviennent dans la voie de signalisation du récepteur ST2 en influençant la sécrétion de la protéine sST2. Cette sécrétion est exacerbée chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .

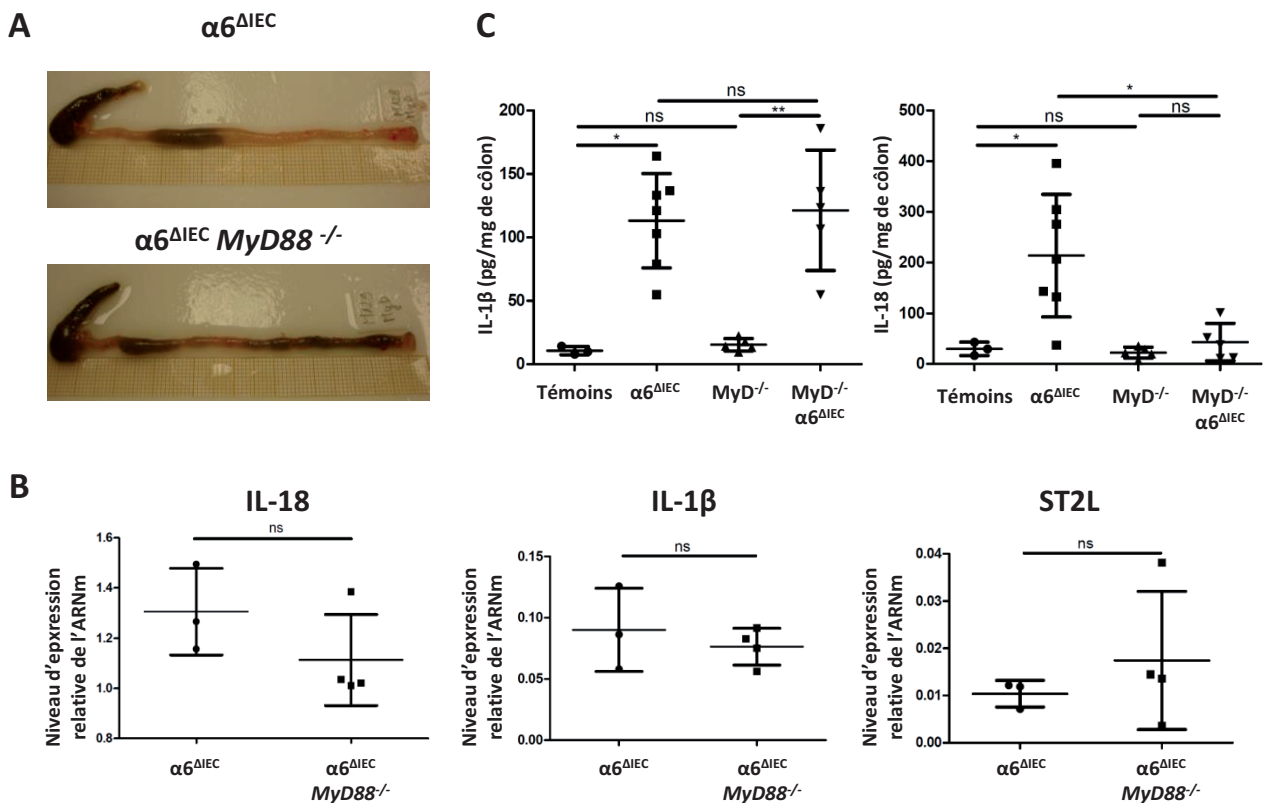
## 3. Diminution du niveau d'expression de la protéine Nrlp6 chez les souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$

La sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 apparaît comme cruciale dans le développement de l'inflammation chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Cette sécrétion est essentiellement contrôlée par



**Figure 5: Diminution de l'expression de Nlrp6 dans le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$**

(A) Niveau d'expression de Nlrp6 dans le rectum évalué par RT-qPCR sur 5 souris témoins et 4 souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  âgées de 9 semaines. Les valeurs représentent l'expression relative de l'ARNm normalisée par rapport à l'expression du gène de référence HPRT. \*,  $p < 0,05$ . (B-C) Analyse par Western blot (B) et quantification (C) de l'expression de la protéine Nlrp6 dans des échantillons de rectum issus d'animaux âgés de 6 à 13 semaines. (B) Deux exemples représentatifs de chacun des groupes (Témoins et  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ ) sont illustrés. (C) Quantité relative de Nlrp6 évaluée par ImageJ (Intensité de la bande Nlrp6 / intensité de la bande  $\beta$ -tubuline) ( $n=8$  par groupe). \*\*,  $p < 0,01$ .



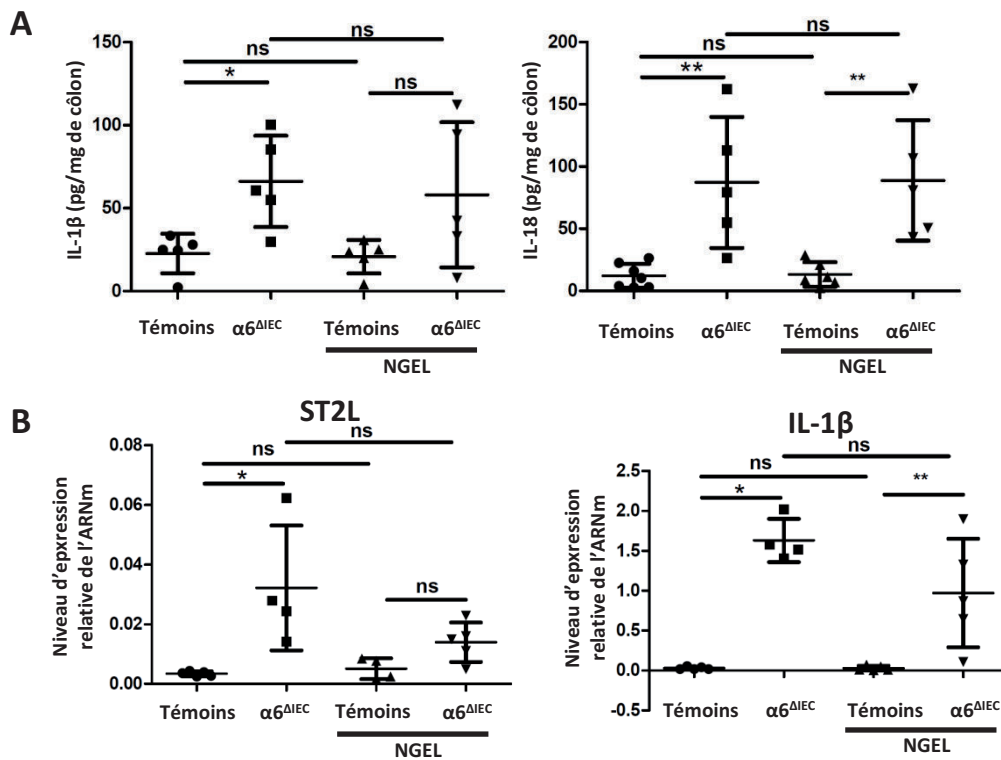
**Figure 6: La sécrétion d'IL-18 dans le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  est dépendante de la voie MyD88**

(A) Aspect macroscopique du gros intestin des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et  $\alpha 6^{\Delta IEC} MyD88^{-/-}$ . (B) Niveau d'expression, évalué par RT-qPCR, d'IL-18, d'IL-1 $\beta$  de ST2L dans le côlon distal de souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  ( $n=3$ ) et  $\alpha 6^{\Delta IEC} MyD88^{-/-}$  ( $n=4$ ) âgées de 11 et 14 semaines. Les valeurs représentent l'expression relative de l'ARNm normalisée par rapport à l'expression du gène de référence HPRT. ns, non significatif. (C) Dosage par ELISA des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 sécrétées dans le milieu de culture issu d'explants de côlon cultivés pendant 24h. Les animaux suivants âgés de 9-10 semaines ont été comparés: Témoins ( $n=3$ ), simple-mutants  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  ( $n=7$ ), simple-mutants  $MyD88^{-/-}$  ( $n=5$ ) et double-mutants  $\alpha 6^{\Delta IEC} MyD88^{-/-}$  ( $n=5$ ). ns, non significatif; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

l'inflammasome et les TLR. A partir des analyses du transcriptome, on a pu remarquer que parmi les protéines de l'inflammasome, le gène codant pour Nlrp6 est celui qui est le plus dérégulé chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . La protéine Nlrp6, l'un des membres de l'inflammasome, a récemment été impliquée dans la dysbiose et les processus responsables de la sécrétion du mucus (Elinav et al., 2011; Wlodarska et al., 2014). Les souris déficientes en Nlrp6 sont également plus susceptibles de développer une inflammation induite par le DSS (Normand et al., 2011). L'analyse par RT-qPCR du niveau d'expression de l'ARNm codant pour la protéine Nlrp6 a permis de mettre en évidence une diminution de ce dernier chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  comparées aux souris témoins (Fig. 5A). Cette diminution a également été confirmée au niveau protéique par Western Blot (Fig. 5B-C).

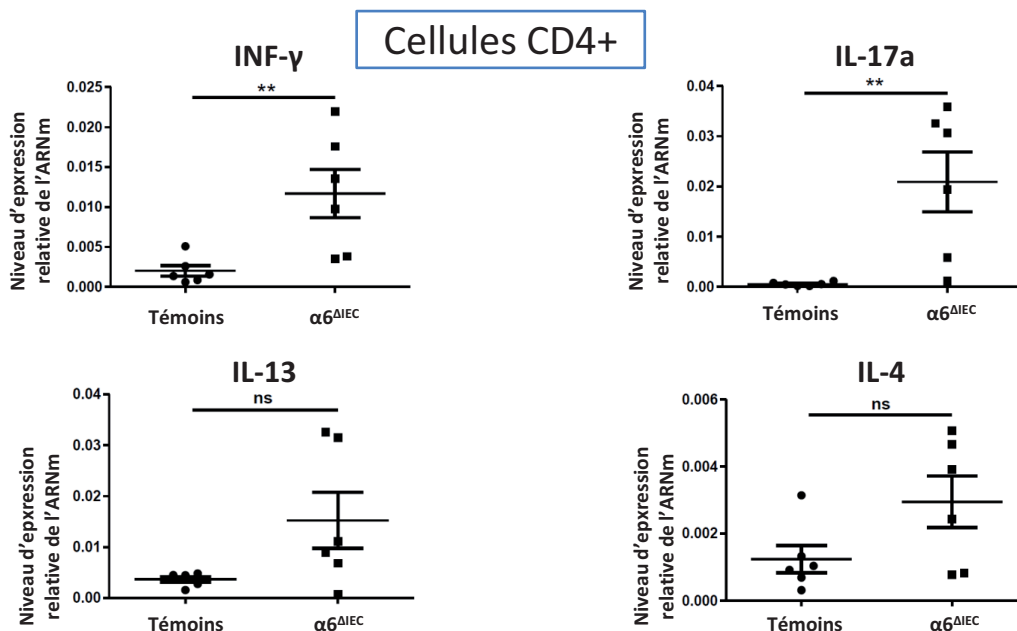
#### 4. La sécrétion d'IL-18 est dépendante de la protéine adaptatrice MyD88 chez les souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$

La protéine adaptatrice MyD88 est impliquée dans la transduction du signal dans la quasi-totalité des voies des TLR, elle est de ce fait un acteur majeur du système immunitaire inné. De plus, la protéine a été identifiée dans nos analyses « IPA » comme l'un des régulateurs de gènes les plus activés (tableau 1). Les TLR sont impliqués dans la sécrétion des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 ; ils interviennent, essentiellement à travers la voie NF-kB, dans l'induction de l'expression des ARNm codant pour les formes immatures (pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18) de ces deux cytokines. Afin de déterminer le rôle de la protéine MyD88 dans la sécrétion de ces deux cytokines et sa contribution dans l'apparition des phénotypes, nous avons croisé les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  avec les souris déficientes en MyD88 (souris *MyD88*<sup>-/-</sup>). Les souris double-mutantes  $\alpha 6^{\Delta IEC}MyD88^{-/-}$  comparées aux souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  ne présentent globalement pas de claire différence au niveau du phénotype macroscopique (Fig. 6A). Le niveau d'expression d'IL-1 $\beta$ , d'IL-18 et de ST2 est équivalent entre les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}MyD88^{-/-}$  et les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  (Fig. 6B), ce qui suggère que la protéine MyD88 n'est pas impliquée dans l'induction de l'expression de ces gènes. Cependant, le dosage des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 dans des milieux de culture d'explant de côlon a permis de mettre en évidence une diminution du niveau de sécrétion d'IL-18 chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}MyD88^{-/-}$  comparées aux souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Par contre, le niveau de sécrétion d'IL-1 $\beta$  reste élevé chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}MyD88^{-/-}$  comparées aux souris



**Figure 7: Evaluation de l'effet du stress mécanique sur la réponse inflammatoire dans le modèle  $\alpha 6^{AIEC}$**

(A) Dosage par ELISA des cytokines sST2 et IL-1 $\beta$  sécrétées dans le milieu de culture issu d'explants de cölon de souris âgées de 9 semaines alimentées ou non avec de la nourriture gélifiée (NGEL). (B) Niveau d'expression de ST2L et d'IL-1 $\beta$ , évalué par RT-qPCR, dans le rectum de souris âgées de 9 semaines alimentées ou non avec de la nourriture gélifiée (NGEL). Les valeurs représentent l'expression relative de l'ARNm normalisée par rapport à l'expression du gène de référence HPRT. ns, non significatif; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .



**Figure 8: Caractérisation de la réponse Th1/Th17 dans les lymphocytes T CD4+ chez les souris  $\alpha 6^{AIEC}$**

Niveau d'expression, évalué par RT-qPCR, de l'INF- $\gamma$ , IL-17a, IL-13 et IL-4, dans des cellules CD4+ isolées de la lamina propria du compartiment colorectal de souris témoins ( $n=6$ ) et  $\alpha 6^{AIEC}$  ( $n=6$ ) âgées de 9 semaines. Les valeurs représentent l'expression relative de l'ARNm normalisée par rapport à l'expression du gène de référence HPRT. ns, non significatif; \*\*,  $p < 0,01$ .

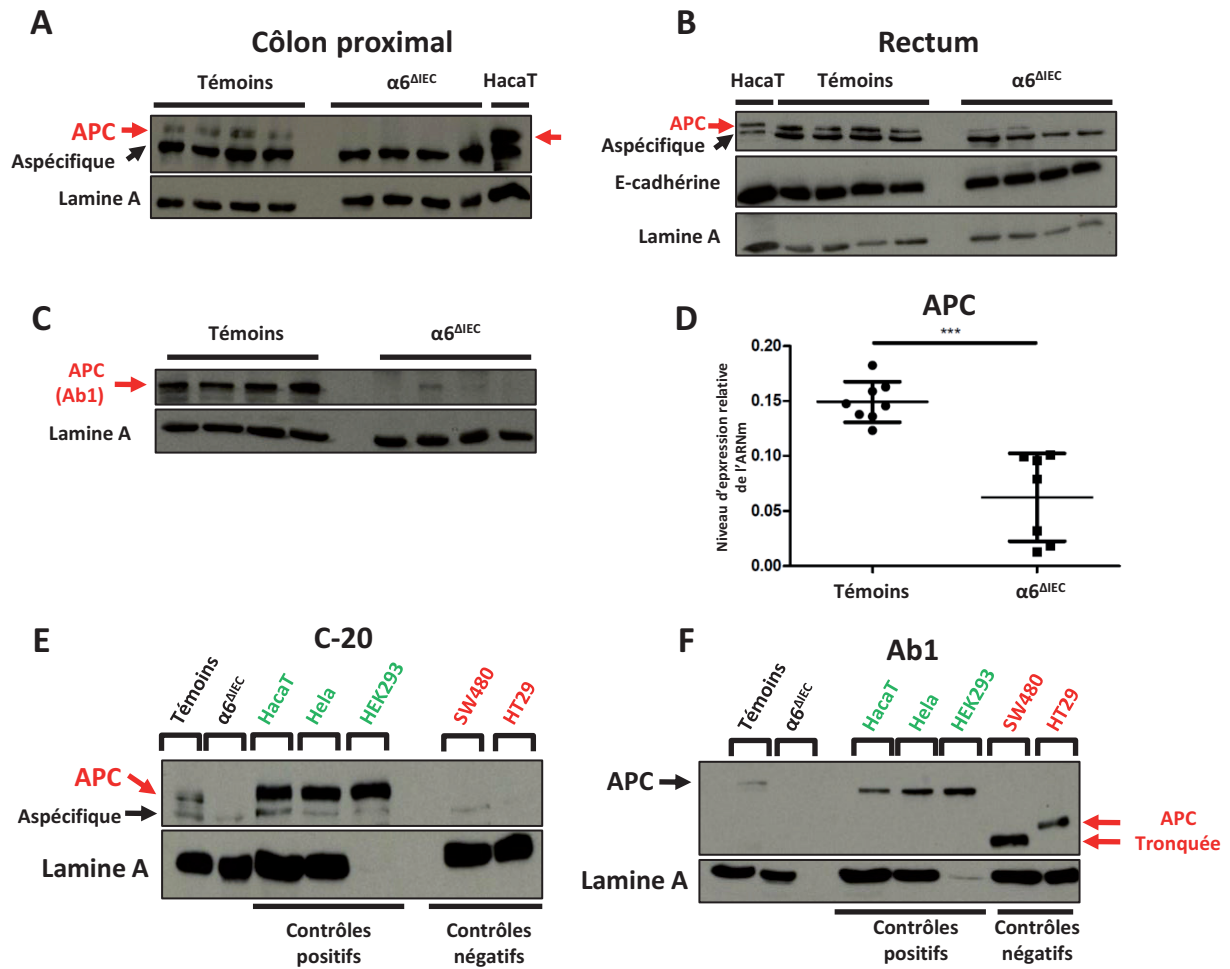
témoins (souris *MyD88*<sup>-/-</sup>) et est équivalent à celui des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  (Fig. 6C). Cette analyse démontre que la sécrétion des cytokines IL-18 et IL-1 $\beta$  est régie par deux mécanismes distincts, la sécrétion d'IL-18 est totalement dépendante de la protéine MyD88 alors que celle d'IL-1 $\beta$  est indépendante de MyD88 et dépendante des bactéries. De plus, l'expression de l'ARNm de ST2 n'est pas affectée par l'inactivation de MyD88, ce qui suggère que d'autres mécanismes sont potentiellement responsables de cette augmentation tels que le stress mécanique.

## 5. Quelle est la contribution du stress mécanique dans le phénotype de la souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ ?

La perte de l'hémidesmosome dans l'épithélium intestinal des souris mutantes conduit à une fragilisation de l'épithélium. De nombreuses zones présentent un détachement de l'épithélium qui peut être exacerbé par les frottements mécaniques, très importants dans le compartiment colorectal. De plus, cette fragilité du tissu, induit chez la souris une multitude de cycles de lésions et réparations qui peut être à l'origine de l'inflammation et à la formation de tumeurs colorectales. Les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  ont été soumises à un régime alimentaire exclusivement constitué de nourriture gélifiée afin de diminuer les stress mécaniques causés par le transit de la nourriture solide dans l'intestin. Ce traitement provoque une amélioration modérée du phénotype macroscopique qui est associée à une diminution partielle mais non significative de l'expression de l'ARNm de ST2 et de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Fig. 7A-B). Cependant, le niveau d'expression d'IL-1 $\beta$  et de sécrétion d'IL-18 ne sont pas modifiés (Fig. 4A-B)

## 6. Caractérisation de la réponse adaptative.

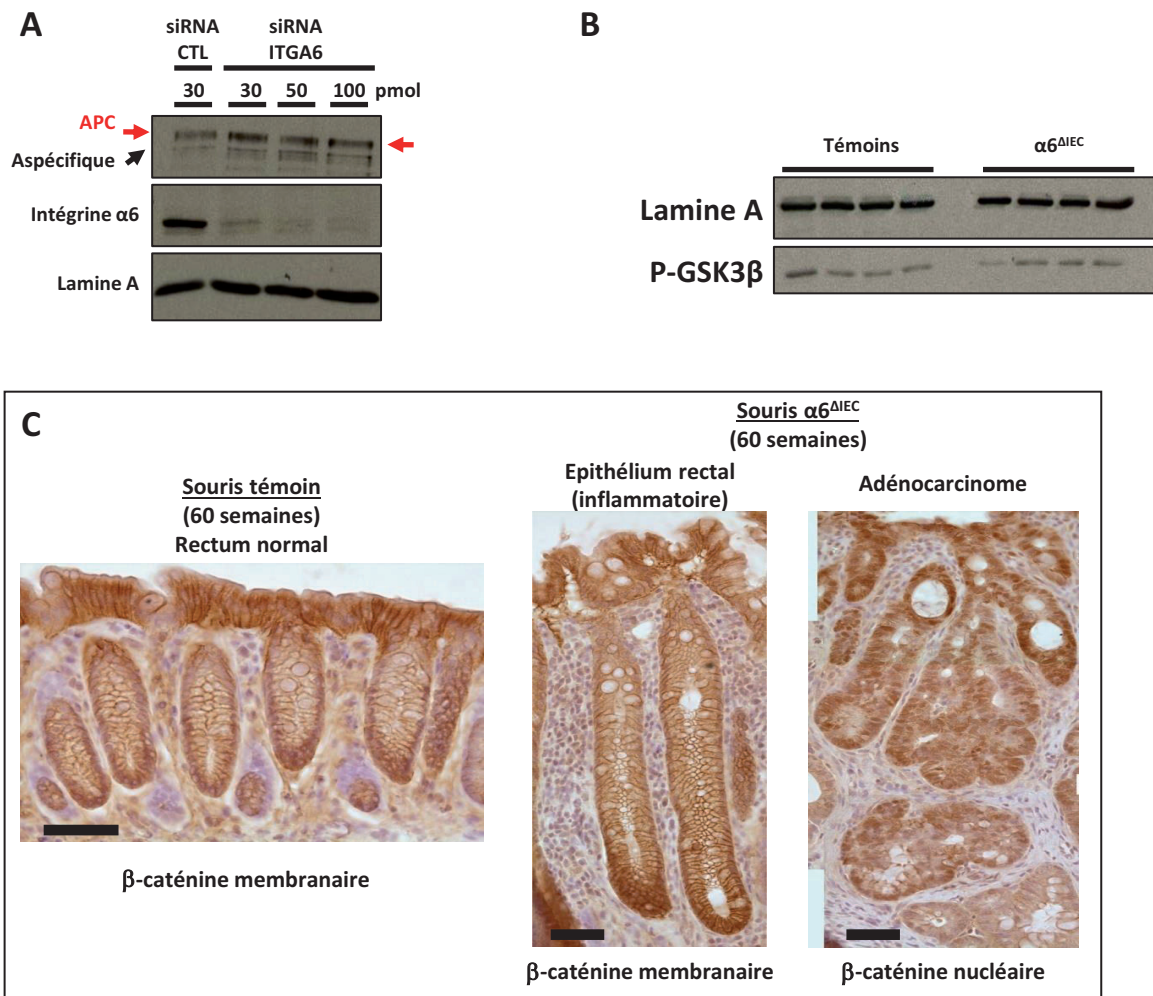
Nous avons pu récemment montrer que la progression tumorale dans le modèle de souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  requiert la participation de l'immunité adaptative. L'analyse sur des cellules CD4+ isolées de la lamina propria du côlon a permis de mettre en évidence une augmentation statistiquement significative de l'expression de l'interféron- $\gamma$  et de l'interleukine 17a par RT-qPCR chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  comparées aux souris témoins (Fig. 8). L'interféron- $\gamma$  et



**Figure 9: Diminution de l'expression de la protéine APC chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$**

(A-C) Analyse par Western blot de l'expression de la protéine APC dans des échantillons de côlon proximal (A et C) et de rectum (B) issus d'animaux âgés de 6 à 13 semaines. La protéine APC a été détectée avec l'anticorps C-20 (A et B) ou l'anticorps Ab1 (C). (D) Niveau d'expression de l'ARNm d'APC, évalué par RT-qPCR, d'APC dans le rectum de souris témoins (n=8) et  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  (n=7) âgées de 52 semaines. (E-F) Validation des bandes correspondant à la protéine APC détectées par les anticorps C-20 (E) et Ab1 (F) à partir de lignées cellulaires connues pour exprimer ou non la protéine APC. Pour l'ensemble des Western blot, la lamine A a été utilisée comme protéine de référence. \*\*\*, p<0,001.

l'interleukine 17a correspondent respectivement à une réponse de type Th1 et Th17. Le niveau d'expression des interleukines 4 et 13, caractéristiques de la réponse Th2, n'est pas affecté.



**Figure 10: Analyse de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine en l'absence de l'intégrine  $\alpha 6$**

(A) Analyse par Western blot de l'expression de la protéine APC dans la lignée cellulaire HCT116 après transfection avec des ARN interférents (siRNA) contrôles (CTL) ou dirigés contre l'intégrine  $\alpha 6$  (ITGA6). (B) Analyse par Western blot de l'expression de la Phospho-GSK3 $\beta$  (ser9) dans des échantillons de côlon proximal de souris âgées de 6-13 semaines. (C) Immunodétection de la  $\beta$ -caténine (marquage brun) sur des coupes histologiques de rectum d'une souris témoin (à gauche) et d'une souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  (à droite) montrant une zone inflammatoire et une zone tumorale. Barres, 50  $\mu$ m.



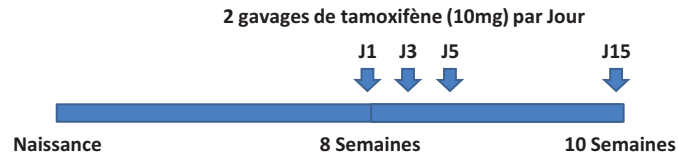
### III- Analyse de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}$

#### Stratégie

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine est décrite comme l'une des premières voies impliquées dans la carcinogénèse colorectale. 80% des cancers colorectaux présentent des mutations de la protéine suppresseur de tumeur APC (Fearon, 2011). La protéine APC fait partie d'un complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine constitué notamment de l'axine, de GSK3 $\beta$  et de la CK (caséine kinase). L'inactivation d'APC conduit à l'accumulation dans le cytoplasme de la  $\beta$ -caténine qui va se délocaliser dans le noyau cellulaire. Les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  développent préférentiellement des cancers au niveau distal du compartiment colorectal. Notre stratégie a consisté à analyser le niveau d'expression de la protéine APC par Western blot à différents âges et à différents niveaux du compartiment colorectal (côlon proximal, côlon distal et rectum). Plusieurs analyses biochimiques et histologiques ont ensuite été réalisées sur différents membres de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine afin de déterminer si cette voie est activée et conduit à la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine dans le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .

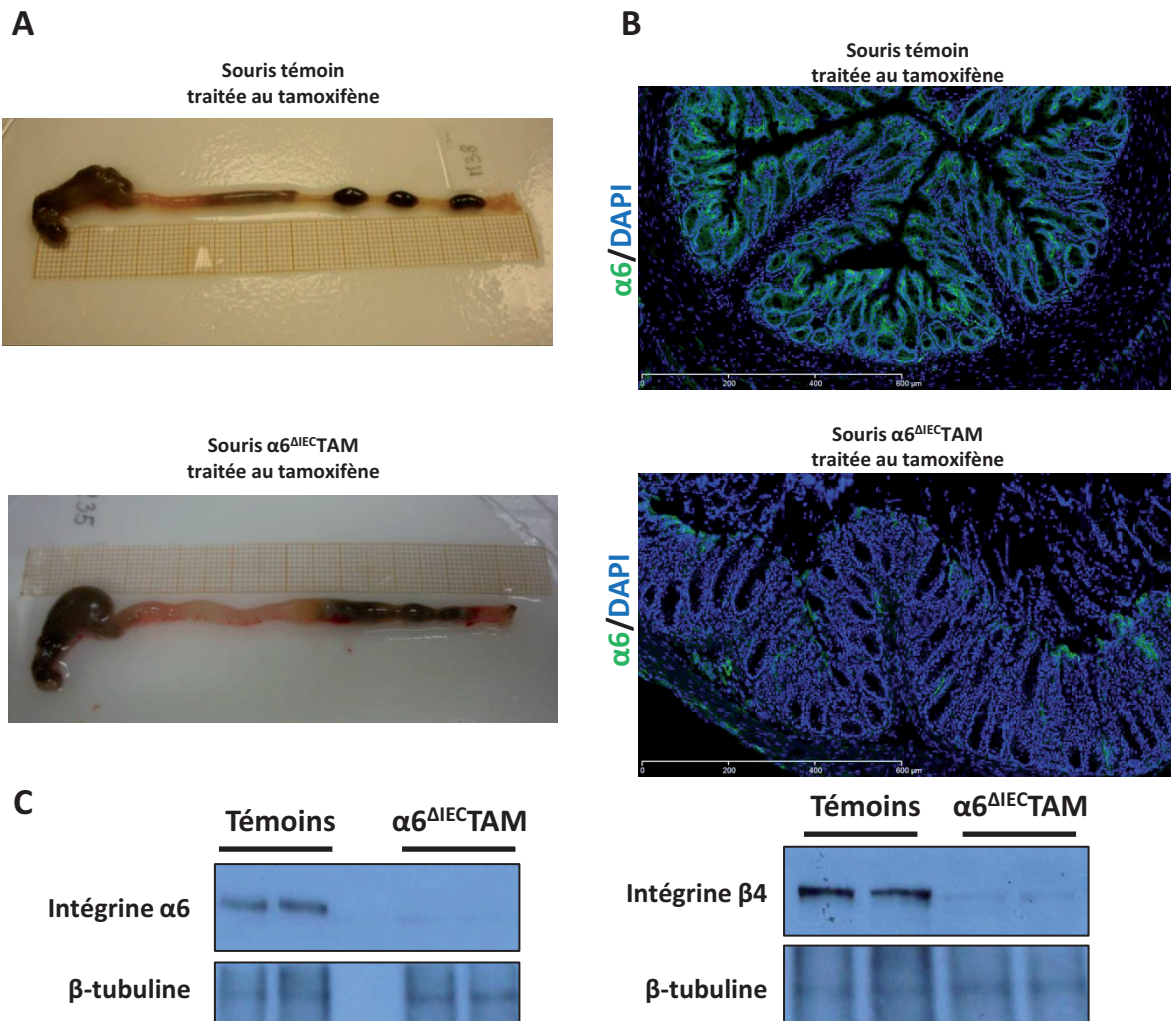
#### Résultats

L'analyse par Western blot a permis de mettre en évidence une diminution du niveau d'expression de la protéine APC chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  comparées aux souris témoins. Cette diminution est observée à des stades précoces (6 semaines) et au niveau de l'ensemble du compartiment colorectal (Fig. 9A-B). Au cours de cette analyse, j'ai été confronté à d'importantes difficultés techniques, l'anticorps utilisé pour détecter la protéine APC (correspondant à la partie C-terminale) révélant plusieurs bandes dont certaines aspécifiques. Afin de confirmer la spécificité de la bande correspondant à APC, j'ai utilisé plusieurs lignées cellulaires connues pour exprimer ou non la protéine APC comme contrôle positif et négatif (Fig. 9E). J'ai également utilisé un autre anticorps qui reconnaît le domaine N-terminal de la protéine APC, qui m'a permis de confirmer la diminution de la protéine APC dans le compartiment colorectal des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  (Fig. 9C-F). Cette diminution est également observée au niveau transcriptionnel, le niveau d'expression de l'ARNm codant pour la



**Figure 11: Protocole du traitement au tamoxifène**

Le tamoxifène a été administré par gavage aux souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  âgées de 8 semaines à raison d'une dose de 10mg de tamoxifène, 2 fois par jour à 8h d'intervalle, et ce, 1 jour sur 2, pendant 5 jours. Les animaux ont été sacrifiés 15 jours après la première administration de tamoxifène.



**Figure 12: Phénotype des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  15 jours après traitement au tamoxifène**

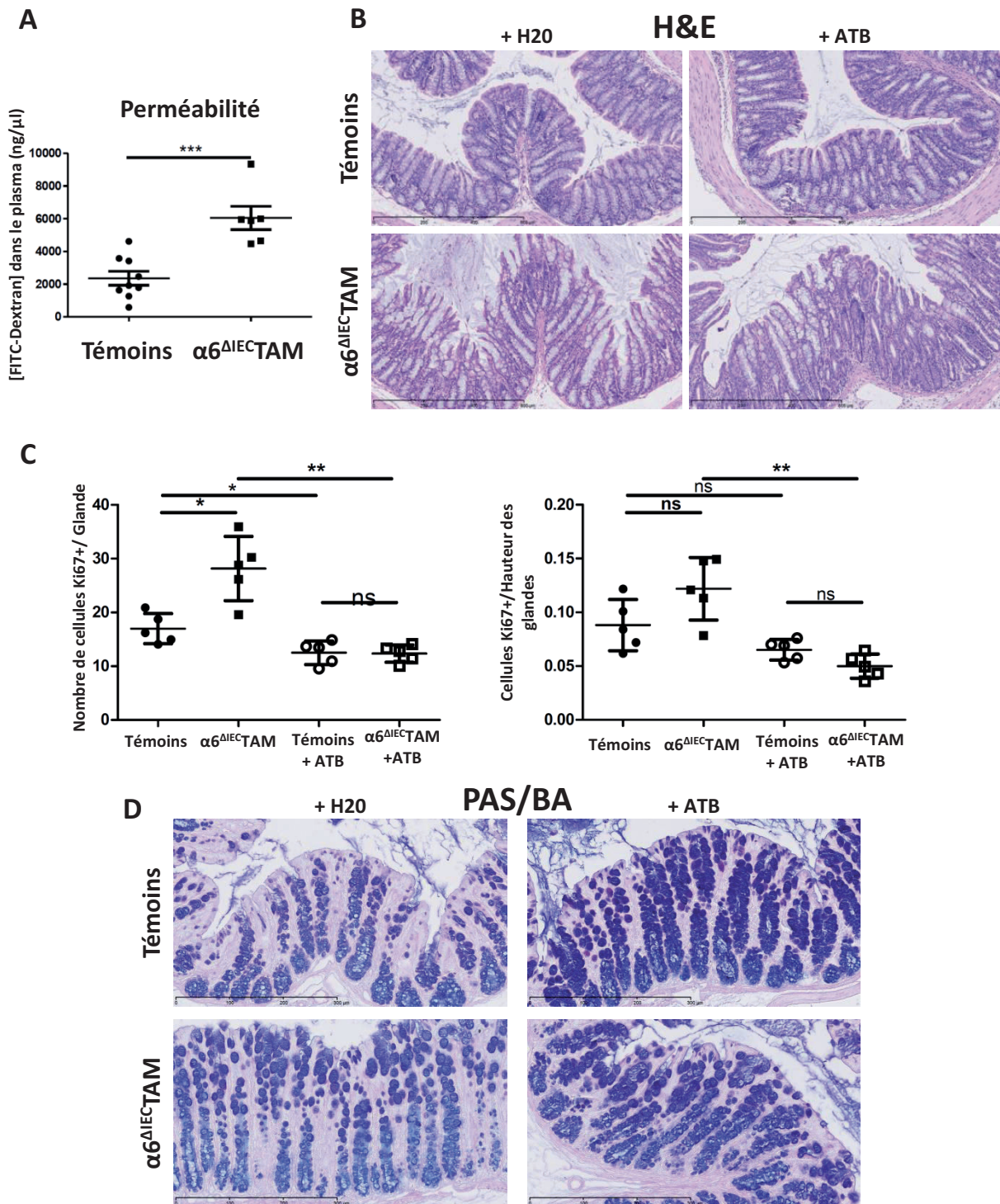
(A) Aspect macroscopique du gros intestin des souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$ , 15 jours après le premier traitement au tamoxifène. (B) Immunomarquage fluorescent de la sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$  (en vert) sur des coupes congelées de côlon de souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$ ; les noyaux ont été marqués au DAPI (en bleu). (C) Analyse par Western blot de l'expression des sous-unités d'intégrine  $\alpha 6$  et  $\beta 4$  dans des échantillons de rectum issus de souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  15 jours après le premier traitement au tamoxifène. Deux exemples représentatifs de chacun des groupes (Témoins et  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ ) sont illustrés .

protéine APC étant diminué chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  (Fig. 9D). Dans le but de déterminer si cette diminution était directement liée à l'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$ , j'ai ensuite utilisé un modèle cellulaire, la lignée HCT116, qui exprime à la fois la forme totale de la protéine APC et l'intégrine  $\alpha 6$ . Les cellules HCT116 ont été transfectées à l'aide d'un cocktail de d'ARN interférents (siRNA) dirigé contre l'intégrine  $\alpha 6$ . Soixante-douze heures après l'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$  nous n'avons pas observé de différence d'expression de la protéine APC (Fig. 10A) entre cellules déficientes en intégrine  $\alpha 6$  et cellules témoins. La diminution de la protéine APC n'est donc pas liée directement à l'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$ .

Je me suis ensuite attaché à déterminer si la diminution de la protéine APC conduisait à l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. J'ai analysé par Western blot le niveau de phosphorylation de la protéine GSK3 $\beta$  (Ser 9) (Fig. 10B). Aucune différence significative n'a été observée pour ces protéines chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  comparées aux souris témoins (Fig. 10C). De plus, des marquages immunohistochimiques de la  $\beta$ -caténine ont révélé une translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine uniquement dans de rares zones tumorales chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . L'ensemble de ces résultats suggère que malgré la diminution de la protéine APC, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine n'est probablement pas activée chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .

## Conclusion :

- Le niveau d'expression de la protéine APC est diminué chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  bien que cette diminution ne semble pas activer la voie Wnt/ $\beta$ -caténine.
- Le modèle cellulaire HCT116 a permis de montrer qu'il n'y a pas de lien direct entre l'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$  et la diminution de la protéine APC.



**Figure 13: Phénotype des souris  $\alpha 6^{\Delta I E C T A M}$  avant et après traitement antibiotique**

(A-D) Analyse du phénotype des souris  $\alpha 6^{\Delta I E C T A M}$  comparées aux souris témoins 15 jours après traitement au tamoxifène. (A) Perméabilité intestinale évaluée par mesure de l'intensité de la fluorescence retrouvée dans le plasma sanguin 5h après gavage des souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta I E C T A M}$  avec du FITC-dextran. (B-D) Analyse des souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta I E C T A M}$  ayant reçu ou non un traitement antibiotique (ATB). (B) Colorations hématoxyline/éosine (H/E) de coupes histologiques de côlon distal de souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta I E C T A M}$  (+/- ATB). Barre, 600 μm. (C) Quantification du nombre moyen de cellules Ki67+ présent par glande (à gauche) ou rapporté à la moyenne de la hauteur des glandes (à droite) par animal. Chaque valeur correspond à la moyenne des comptages réalisés à partir de 27 glandes. (D) Colorations PAS/bleu alcian (PAS/BA) de coupes histologiques de côlon distal de souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta I E C T A M}$  (+/- ATB). Barre, 300 μm.

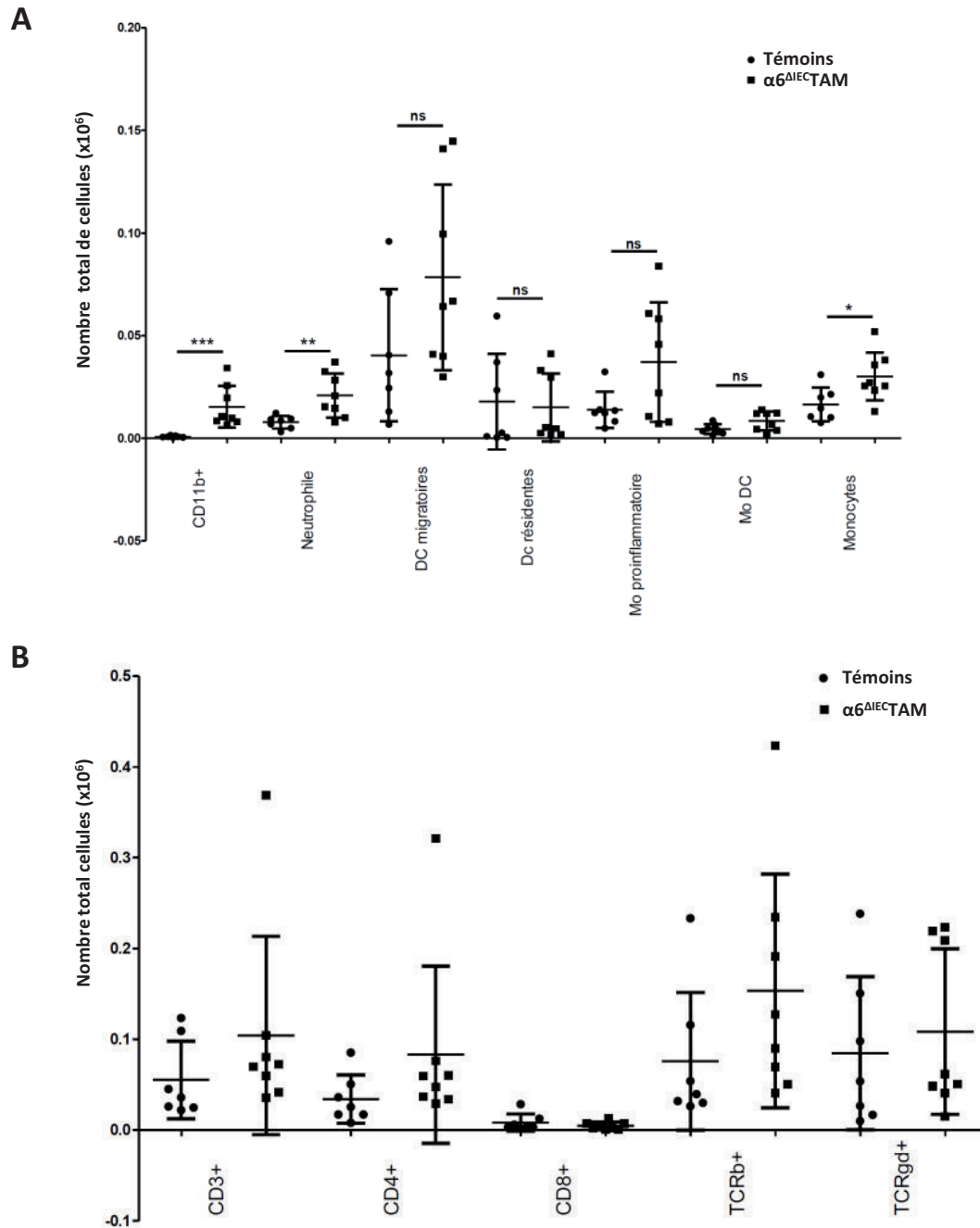
## IV- Analyse des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement de l'inflammation dans le modèle de souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM

La souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  développe de manière spontanée des cancers colorectaux associés à une inflammation chronique dans l'intestin. Nous avons pu caractériser différents mécanismes impliqués dans le développement de l'inflammation et dans la formation de cancer. Cependant, l'ordre des événements n'est pas clairement défini. J'ai donc pour étudier plus finement la séquence et la cinétique des mécanismes moléculaires et cellulaires, développé un modèle de souris,  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM, où l'inactivation du gène de la sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$  dans l'épithélium intestinal peut être induite par administration de tamoxifène.

### 1. Phénotype des souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM deux semaines après traitement au tamoxifène

#### **Stratégie**

La lignée de souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM a été développée en croisant les souris portant les allèles conditionnels floxés du gène de la sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$  ((De Arcangelis et ; soumis) avec des souris exprimant le gène Cre-ERT2 sous le contrôle du promoteur de la villine (el Marjou et al., 2004). Ce croisement permet d'obtenir des souris chez lesquelles l'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$  dans l'épithélium intestinal peut être induite par administration de tamoxifène. Dans le protocole que j'ai utilisé (illustré dans la figure 11), le tamoxifène a été administré à des souris témoins et mutantes âgées de 8 semaines. Les analyses ont ensuite été réalisées 2 semaines après traitement, soit à l'âge de 10 semaines.



**Figure 14: Profil des sous-populations de cellules inflammatoires présentes dans la lamina propria du côlon des souris  $\alpha 6^{\Delta I E C T A M}$ .**

**(A-B)** Analyse et quantification par cytométrie en flux (FACS) des différentes sous-populations de cellules inflammatoires présentes dans la lamina propria du côlon de souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta I E C T A M}$  (15 jours après traitement au tamoxifène). Chaque point représente le nombre total de cellules positives présentes dans le compartiment colorectal de chaque animal. ns, non significatif; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . Les cellules isolées de la lamina propria sont issues du clon de 7 souris témoins et de 8 souris  $\alpha 6^{\Delta I E C T A M}$ . **(A)** Sous-populations de cellules myéloïdes définies comme : Neutrophiles, Ly-6G+ CD11b+ CD11c+; Cellules dendritiques (DC) migratoires, Ly6G-/CD11c+/MHC classe II élevé; DC résidentes, Ly6G-/CD11c+/MHC classe II intermédiaire; Monocytes pro-inflammatoires (Mo-proinflammatoires), Ly-6G-/Ly-6C+/CD11c bas/MHC class II+/CD64+; Monocytes d'origine dendritique, Ly-6G-/CD11c+/bas CD64+/Ly6C-/MHC classe II +; Monocytes, Ly-6G-/Ly-6C+/MHC class II-. **(B)** Sous-populations lymphocytaires définies comme : Lymphocytes T CD4+, CD3+/CD4+; Lymphocytes T CD8+, CD3+/CD8+; Lymphocytes T, TCRβ+; Lymphocytes T, TCRγδ+.

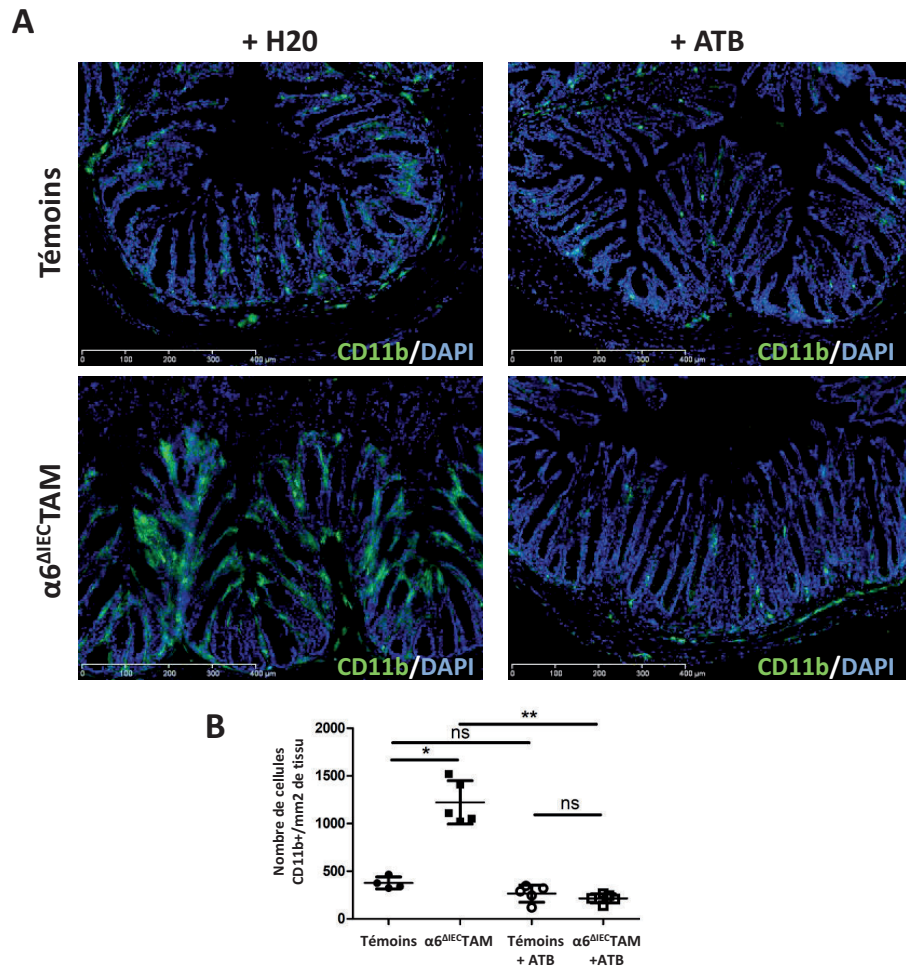
## Résultats

### 1.1 Les souris $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$ présentent un détachement épithélial, des altérations du tissu, une hyperprolifération et une inflammation, deux semaines après inactivation de l'intégrine $\alpha 6$

La lignée de souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  présente, deux semaines après l'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$ , les mêmes défauts et signes d'inflammation que les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . En effet, les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  traitées au tamoxifène montrent plusieurs signes d'altération du compartiment colorectal notamment une hypersécrétion de mucus et un épaissement du compartiment colorectal (Fig. 12A). Des marquages immunofluorescents sur coupes congelées ont permis de vérifier la perte homogène de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  dans l'ensemble du compartiment colorectal (Fig. 12B). Nous avons également confirmé cette perte par Western blot (Fig. 12C). Les souris mutantes présentent une augmentation significative d'environ 2,5 fois de la perméabilité intestinale (absorption du FITC-Dextran) comparées aux souris témoins (Fig. 13A). Au niveau histologique, des colorations à l'hématoxyline/éosine de coupes de côlon ont permis de mettre en évidence plusieurs zones de détachement épithélial (Fig. 13B). Ces analyses histologiques ont également révélé une hyperprolifération de l'épithélium intestinal caractérisée par une augmentation de taille des glandes et du nombre de cellules positives pour le marqueur de prolifération Ki67 (Fig. 13C). Bien que chez la souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  les fèces présentent une quantité importante de mucus, des colorations de coupes de côlon à l'acide périodique de Schiff (PAS) et au bleu alcian (AB) n'ont pas permis de mettre en évidence une claire augmentation de la sécrétion de mucus chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$ . Cependant, les défauts affectant le mucus ne sont pas à exclure et devront être recherchés avec des techniques plus appropriées (Fig. 3D).

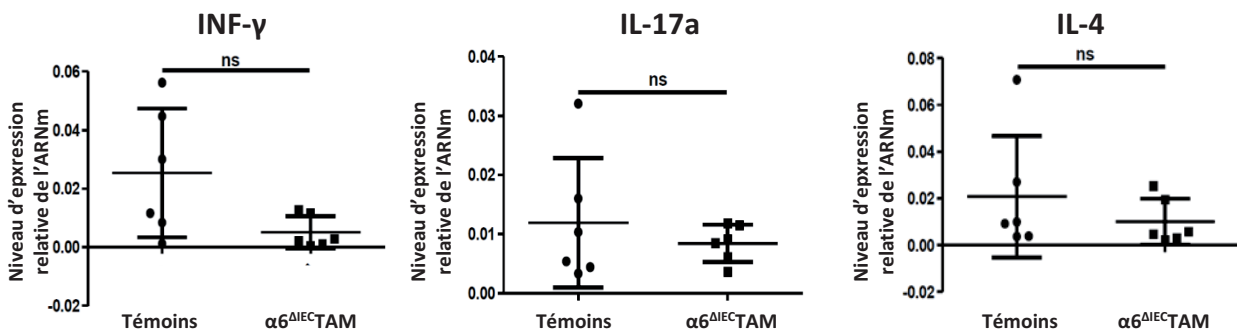
### Conclusion:

Les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  présentent deux semaines après traitement au tamoxifène, un détachement épithélial, une hyperprolifération des cellules épithéliales, une infiltration de cellules inflammatoires dans la lamina propria et une inflammation caractérisée par un épaissement du compartiment colorectal.



**Figure 15: Infiltration de cellules CD11b+ chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$**

(A) Immunomarquage fluorescent du récepteur CD11b (en vert) sur des coupes congelées de côlon de souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  15 jours après traitement au tamoxifène ayant reçu ou non un traitement antibiotique (ATB); les noyaux ont été marqués au DAPI (en bleu) et (B) quantification du nombre de cellules CD11b+ infiltrées dans la muqueuse colique par  $mm^2$ .



**Figure 16: Caractérisation de la réponse Th1/Th17 dans les lymphocytes T CD4+ de la lamina propria du côlon des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$**

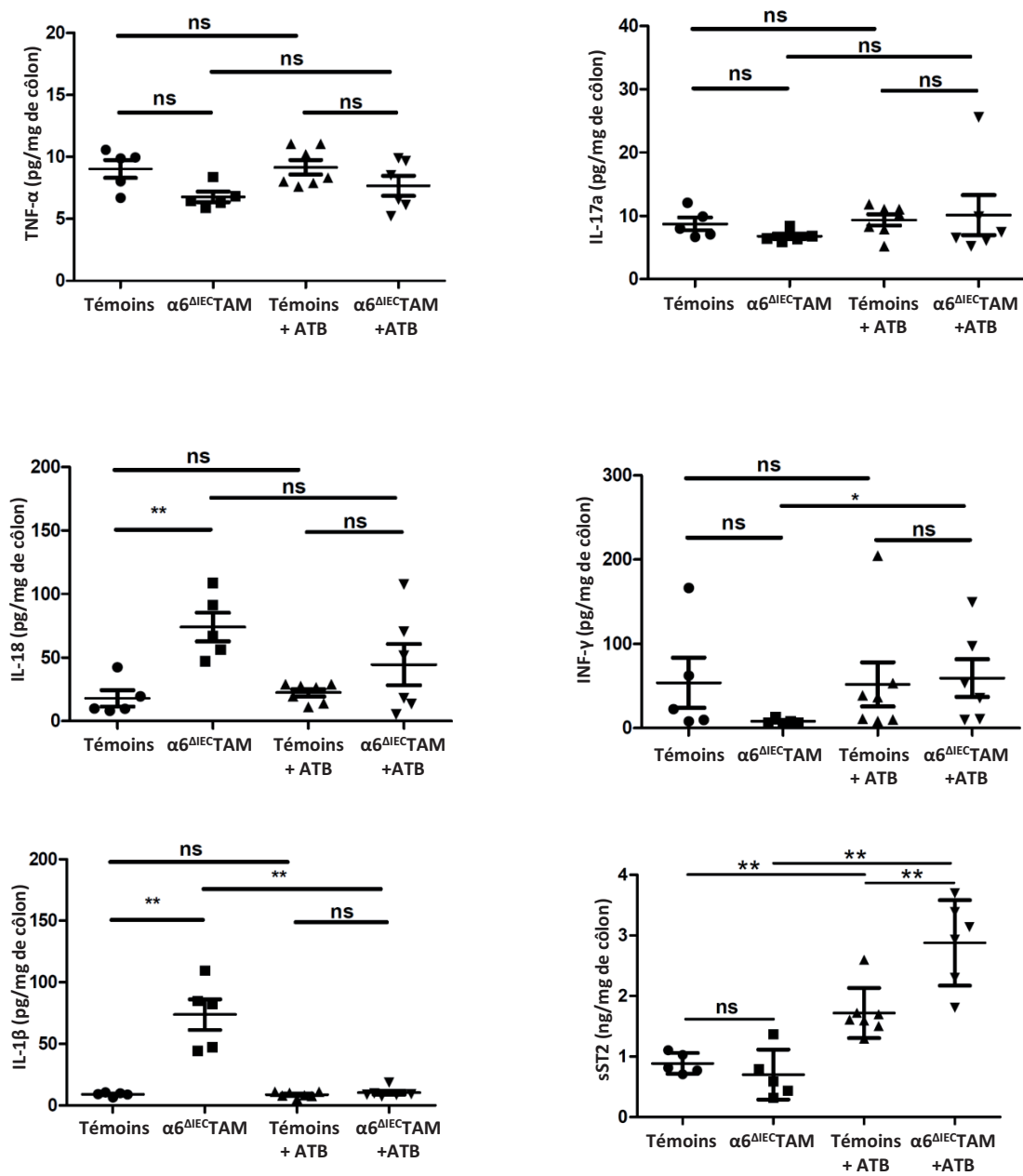
Niveau d'expression, évalué par RT-qPCR, de l'INF- $\gamma$ , IL-17a et IL-4, dans des cellules CD4+ isolées de la lamina propria du compartiment colorectal de souris témoins (n=6) et  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  (n=6) 15 jours après traitement au tamoxifène. Les valeurs représentent l'expression relative de l'ARNm normalisée par rapport à l'expression du gène de référence HPRT. ns, non significatif.



## 1.2 Caractérisation de l'inflammation deux semaines après inactivation de l'intégrine $\alpha 6$ chez les $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$

Comme pour le modèle de souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  l'inflammation du compartiment colorectal chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  se caractérise par une infiltration de sous-populations de cellules de l'immunité innée en particulier les cellules CD11b+. L'analyse par cytométrie en flux (FACS) des différentes sous-populations de cellules inflammatoires présentes dans la lamina propria a permis de mettre en évidence une augmentation des neutrophiles et des macrophages chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  (Fig. 14A). Cette analyse a été confirmée par marquage immunofluorescent qui montre une augmentation significative des cellules CD11b+ infiltrées dans la muqueuse colique des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  (Fig. 15A-B). Cependant, il n'y a pas de différence entre les souris mutantes et témoins pour les sous-populations lymphocytaires, en particulier pour les lymphocytes CD4 positifs (Fig. 14B). De manière intéressante, ce résultat est corrélé aux données obtenues précédemment avec les souris double-mutantes  $\alpha 6^{\Delta IEC}Rag1^{-/-}$  qui suggéraient que l'immunité adaptative n'est pas impliquée dans l'inflammation précoce. De plus, le niveau d'expression de l'interféron- $\gamma$ , de l'interleukine 17a et de l'interleukine 4 dans les cellules CD4+ isolées de la lamina propria du compartiment colorectal n'est pas différent entre les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  et les souris témoins (Fig. 16). Ceci montre que l'immunité adaptative n'est pas activée deux semaines après invalidation de l'intégrine  $\alpha 6$ .

En plus de l'identification des différentes sous-populations inflammatoires impliquées dans l'inflammation, nous avons dosé par ELISA le niveau de sécrétion des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-18, sST2, IL-17a, INF- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ , à partir de milieux de culture provenant d'explants de côlon cultivés pendant 24h ex-vivo (Fig. 7). Les niveaux de sécrétion des cytokines IL-17a, INF- $\gamma$ , sST2 et TNF- $\alpha$  ne sont pas modifiés entre les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  et les souris témoins. Par contre, le niveau de sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 est augmenté chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  comparées aux souris témoins. Ces résultats confirment que l'inflammation observée deux semaines après traitement au tamoxifène chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  est équivalente à l'inflammation observée dans le modèle de souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .



**Figure 17: Augmentation de la sécrétion des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 dans le modèle  $\alpha 6^{\Delta IECTAM}$**

Dosage par ELISA des cytokines TNF $\alpha$ , IL-17a, IL-18, INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  et sST2 sécrétées dans le milieu de culture issu d'explants de côlon cultivés pendant 24h. Le traitement aux antibiotiques (ATB) a été ou non administré à des souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta IECTAM}$  âgées de 7 semaines, pendant une durée de 3 semaines avant sacrifice. Le traitement au tamoxifène a été administré une semaine après le début du traitement aux antibiotiques. ns, non significatif; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001.

## Conclusion:

Deux semaines après traitement au tamoxifène, l'inflammation se caractérise chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM par une infiltration de cellules CD11b positives et une augmentation de neutrophiles et macrophages dans la lamina propria du compartiment colorectal. L'inflammation paraît en grande partie indépendante de l'immunité adaptative dans ce modèle. De plus, l'inflammation est caractérisée comme pour le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  par une hypersécrétion des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18.

### 1.3 Analyse du transcriptome dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM deux semaines après l'inactivation de l'intégrine $\alpha 6$ dans l'intestin

#### Stratégie

Afin de définir la signature moléculaire de l'intégrine  $\alpha 6$  *in vivo*, nous avons effectué des analyses de transcriptome par puces à ADN (Affymetrix) chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM, deux semaines après traitement au tamoxifène. Ces analyses ont été réalisées sur des échantillons de rectum provenant de 3 souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM et de 4 souris témoins traitées au tamoxifène, et de 4 souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM traitées avec du sérum physiologique. L'analyse des données Affymetrix a été réalisée avec le programme « Ingenuity Pathway Analysis ». La recherche d'une signature moléculaire a été principalement effectuée après comparaison des données obtenues pour les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM traitées au tamoxifène et celles de souris témoins également traitées au tamoxifène.

#### Résultats

Les données ont été filtrées en sélectionnant les gènes dont le niveau d'expression a un ratio (souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM)/(souris témoins) supérieur à 2 ou inférieur à 0.5 et une valeur  $p < 0,01$ . Cette analyse a permis d'identifier plusieurs protéines impliquées dans la régulation des gènes. Le tableau 3 illustre les 20 « régulateurs » dont les scores, attribués par « Ingenuity Pathway Analysis », sont les plus élevés. Nous retrouvons plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation comme TNF, IL-1 $\beta$ , KRT 17, MyD88, TLR9, INF $\gamma$  et NOS. De plus, l'analyse des

© 2000-2014 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Upstream	Fold Change	Molecule Type	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of
MYD88		other	Activated	2,661	2,89E-04
CSF2		cytokine	Activated	2,626	8,48E-04
KRT17		other	Activated	2,236	1,06E-05
TNF		cytokine	Activated	2,157	5,12E-04
TRPV4		ion channel		1,960	5,97E-05
RELA		transcription regulator		1,941	7,91E-03
TNFSF12		cytokine		1,913	2,09E-06
IL1B	5,266	cytokine		1,849	9,76E-06
NFE2L2		transcription regulator		1,623	3,96E-03
NOS2		enzyme		1,342	1,79E-02
IFNG		cytokine		1,159	6,03E-05
AR		ligand-dependent nuclear receptor		1,000	4,39E-04
STAT3		transcription regulator		0,974	3,87E-03
IKBKB		kinase		0,914	1,18E-03
TLR3		transmembrane receptor		0,891	1,97E-03
TLR9		transmembrane receptor		0,765	1,26E-03
CHUK		kinase		0,591	2,85E-02
ESR1		ligand-dependent nuclear receptor		0,577	1,01E-03
SMAD3		transcription regulator		0,447	2,28E-04
CD44		enzyme		0,447	5,60E-03

**Tableau 3: liste des 20 protéines régulatrices de gènes ayant les scores d'activation les plus élevés d'après Ingenuity Pathway Analysis (IPA)**

La liste des gènes analysés a été établie en sélectionnant les gènes dont le rapport des niveaux d'expression dans le rectum (souris  $\alpha 6^{\Delta ECTAM}$ )/(témoins) est supérieur à 2 ou inférieur à 0,5 et une valeur  $p < 0,01$ . Le tableau indique de gauche à droite, le symbole du gène codant la protéine régulatrice, le facteur de modification s'il est significatif, le type de molécule, l'état d'activation, le score d'activation et la valeur p de l'analyse attribués par le programme IPA.

ID	Molecules in Network	Score	Focus Mole	Top Diseases and Functions
1	↓ABC1, ↑ALB, Alpha catenin, ↑ANXA1, ↑AREG/AREGB, ↓C1QTNF3, ↑CXCL6, ↑CXCR2, ↑DBF4, ↓EDN1, Histone h3, Histone h4, Ifnar, Ige, ↓IL15, IL12 (complex), ↑IL1B, ↑IL1RL1, ↑KRT7, ↑LCN2, ↑MAD2L1, ↑MARCKSL1, ↓MEP1A, ↓MMP3, ↑MMP7, ↑MMP10, NFkB (complex), ↑NOV, ↑RIPK3, ↑Saa3, ↑SEMA7A, ↑SERPINA3, ↑SLPI, ↑TF, ↑TIMP1	47	28	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking
2	↑AKR1C3, Akt, ↓ANGPTL7, BAG4, ↓CA2, CD3, ↓CD72, ↓DIO1, ↑E2F2, ↑EPHA2, ERK1/2, ↓FBXO32, ↓FXRD4, ↑HELLS, ↓HEXB, ↑HGF, Igm, Immunoglobulin, Jnk, ↓KLB, ↑LRP8, ↑Nrg1, P38 MAPK, ↓PCK1, ↓PPARGC1A*, Proinsulin, RNA polymerase II, ↓RRM2, ↓S100G, ↑SFN*, ↓SLC20A1, ↓SLC34A2, TRPV5, ↓VDR, Vegf	35	23	Lipid Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry
3	A2M, ↓ABC1, AHR, ↑ANXA1, ↑ASNS, ATP1A1, BTG2, CAV1, CCR4, CEBPB, CLIC4, CTSC, E2F8, ↓FMO2, ↓GPNMB, Hmga1, IFNG, ↑IGFBP5, IL5, ↑IL1RL1, ↓INMT, ↑KIAA0101, ↑LAMC2, ↓LDX1, Lyz1/Lyz2, MGAT5, NPM1, ↓PDK2, ↑PSAT1, SAA1, ↑Saa3, ↓SLC1A1, TP53, TREM1, VCAN	19	15	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Movement, Hematological System Development and Function
4	↓ABC1, BIRC3, BTNL2, ↑CAPG, CFTR, ↑CKS1B, ↑CLDN10, CSF2, ↓Cyp2d26, E2F8, EDNRB, ERAP1, ↓HLA-B*, ↑HPGD5, IFNG, IKBKB, IL2, IL11, IL-1R, IL10RA, ↑IL1RL1, ↑KIF23, ↑LRG1, MAP3K3, ↑MYL7, P2RX7, PKD1, ↑Saa3, SCNN1B, ↓SLC26A3, SLC2A5, SLC9A3, ↑TNFRSF8, TRAF2, ↑TRIM15	19	15	Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking, Inflammatory Response
5	ACACA, ACADVL, ↓ADTRP, ALDH1A1, ↓AQP8, ↑ASNS, ↓Ces2a, CLDN6, CPT1A, ↓CYP27A1, CYP2B6, CYP7B1, CYP8B1, EHHADH, FGF21, GSTP1, HLF, ↓HSD3B1, ↑KIF4A, LOR, miR-217-5p (and other miRNAs w/seed ACUGCAU), MT1E, ↑NT5C1A, ↑PGAP1*, POR, PPARA, ↑PRCL, ↑RETSAT, SGPP1, ↑SLC7A11, Sloc1a4, ↑Sprr2b, TAF4, TEF, ↓TGM3	17	14	Energy Production, Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry

**Tableau 4: Liste des 5 réseaux moléculaires ayant les scores les plus élevés.**

La liste des gènes analysés a été établie en sélectionnant les gènes dont le rapport des niveaux d'expression dans le rectum (souris  $\alpha 6^{\Delta ECTAM}$ )/(témoins) est supérieur à 2 ou inférieur à 0,5 et une valeur  $p < 0,01$ . Les gènes indiqués en gras sont ceux dont l'expression varie au sein du réseau, une flèche rouge indiquant une surexpression, une flèche verte indiquant une sous-expression. Le réseau 1 (le plus activé) est détaillé dans la Figure 1.

liens directs ou indirects entre les différents gènes a permis de mettre en évidence plusieurs réseaux moléculaires dont les plus activés sont illustrés dans le tableau 4. Une vue plus détaillée du réseau moléculaire le plus activé est présentée dans la figure 18. Parmi les membres de ce réseau, plusieurs gènes sont impliqués dans les MICI comme IL1RL1 (ST2), RIPK3, IL-1 $\beta$ , CXCR2, CXCL6 (CXCL5), et l'amphiréguline. De manière intéressante, plusieurs de ces gènes ont déjà été identifiés dans le réseau défini dans les zones tumorales à des stades tardifs (plus d'un an) dans le modèle constitutif  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  (Fig. 1). Ceci suggère que le réseau moléculaire, activé deux semaines après invalidation de l'intégrine  $\alpha 6$ , apporte probablement un avantage aux cellules cancéreuses puisqu'il reste enrichi dans les zones tumorales. Parmi les gènes présents dans les deux réseaux nous pouvons citer IL1RL1 (ST2), IL-1 $\beta$ , CXCR2 et CXCL6 (CXCL5).

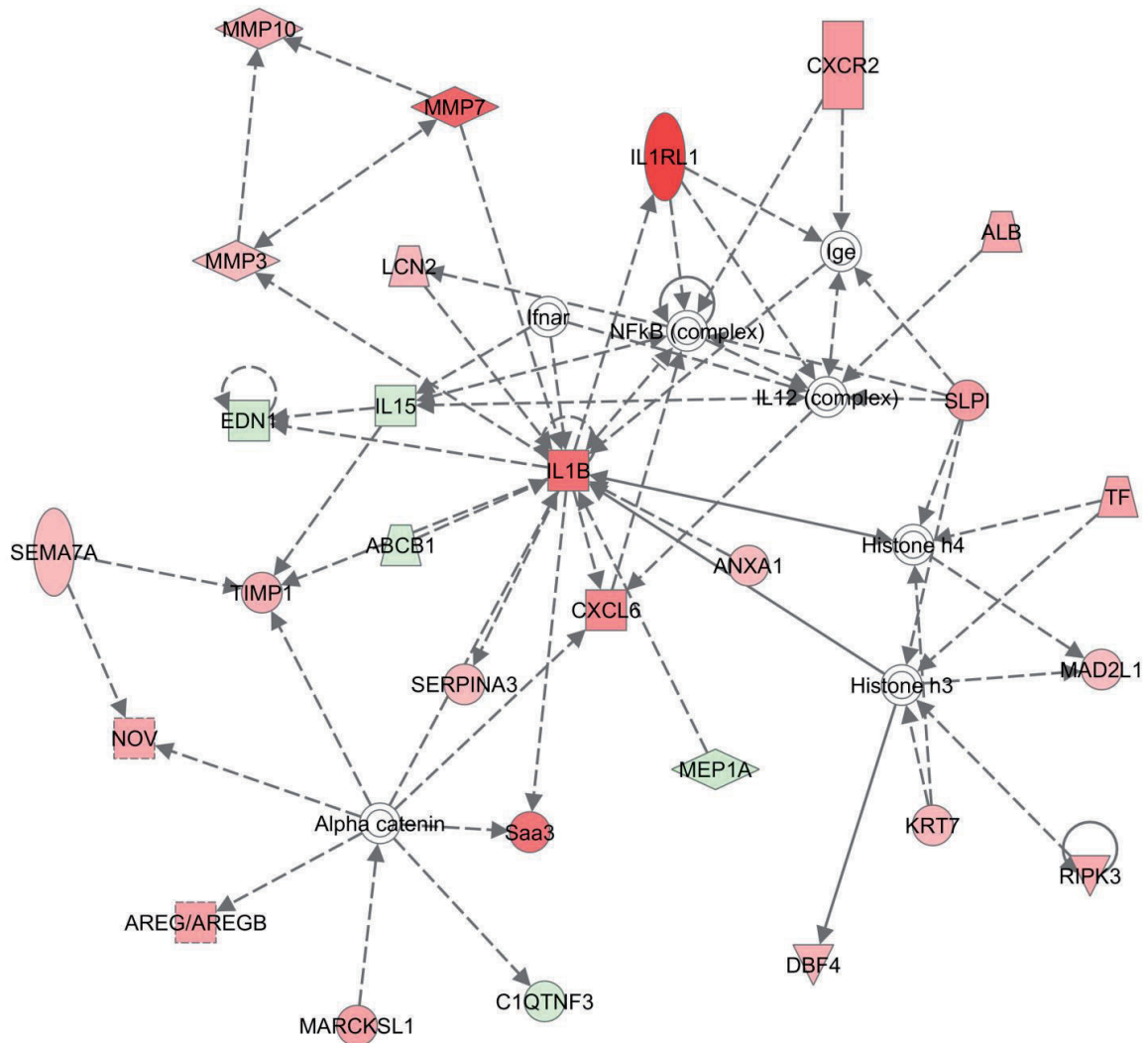
En plus des analyses des données par « Ingenuity Analysis Pathway », nous avons sélectionné et validé par RT-qPCR certains des gènes précédemment caractérisés chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et impliqués dans différents mécanismes moléculaires et cellulaires (Fig. 19). Parmi les TLR et les protéines Nlrp, seuls les TLR2, TLR4 et Nlrp9b voient leur expression altérée. Par ailleurs, le niveau d'expression d'aucun gène codant pour les mucines n'est affecté.

### **Conclusion:**

L'analyse du transcriptome a permis de mettre en évidence un réseau moléculaire activé deux semaines après traitement au tamoxifène. Plusieurs gènes connus pour leur implication dans l'inflammation et dont l'intérêt avait été précédemment souligné dans le modèle de souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  ont été sélectionnés afin de caractériser plus finement leur rôle dans l'apparition du phénotype.

## **2. Caractérisation de la cinétique des événements et de la contribution de l'infection par les bactéries dans le modèle de souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM**

Plusieurs altérations ont été identifiées et caractérisées dans le modèle constitutif  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et inductible  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM après délétion de l'intégrine  $\alpha 6$  dans l'épithélium intestinal. Afin de



© 2000-2014 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

**Figure 18: Réseau moléculaire activé chez les souris  $\alpha 6^{\Delta E C}$ TAM deux semaines après traitement au tamoxifène**

Illustration du réseau moléculaire ayant le score attribué par IPA le plus élevé. Les gènes surexprimés sont indiqués en rouge et les gènes sous-exprimés sont indiqués en vert. L'intensité de la couleur correspond au niveau d'expression. Les flèches pleines montrent les interactions directes et les flèches en pointillés les interactions indirectes.

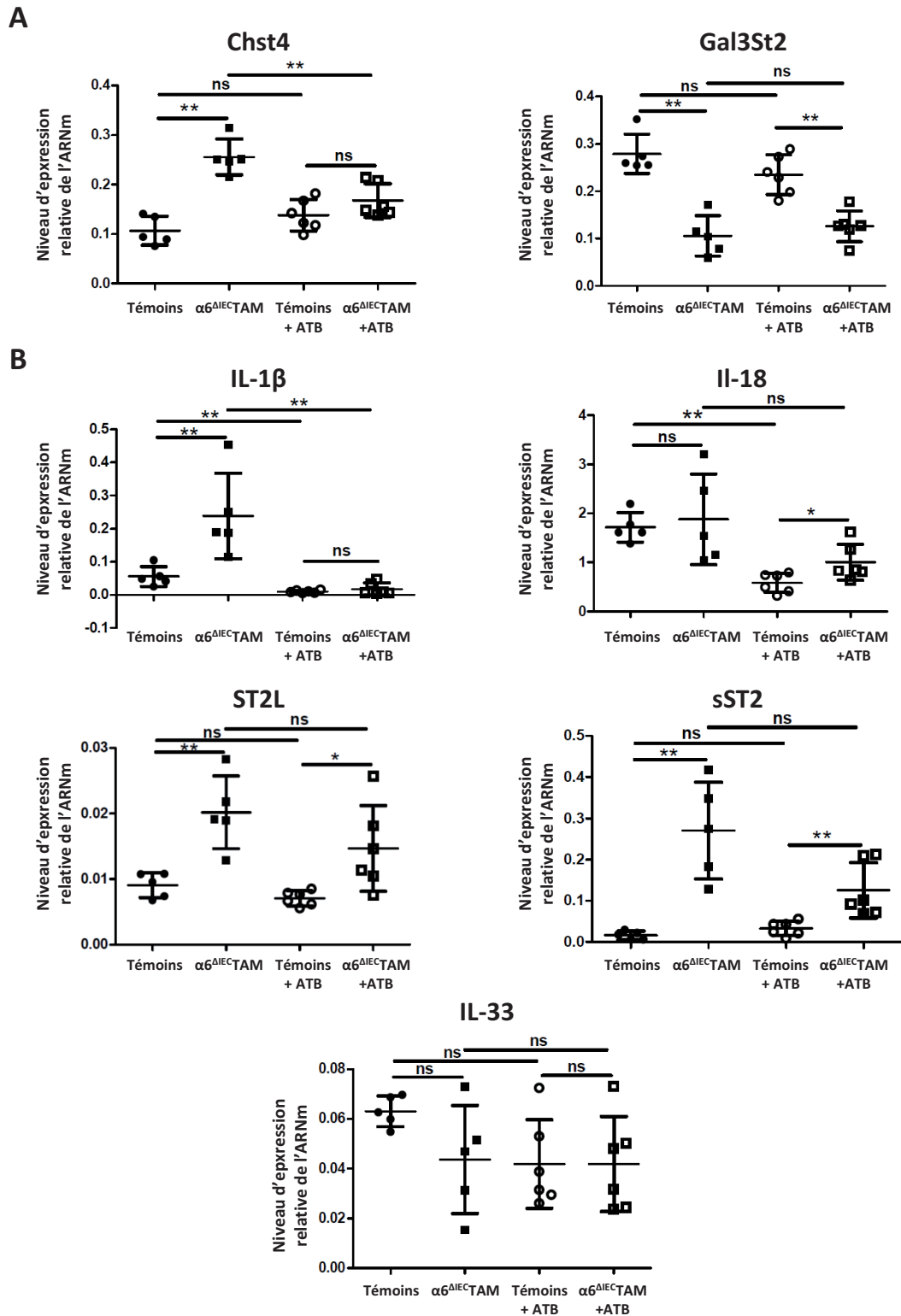
décrire l'ordre des événements et de déterminer les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu, j'ai défini, à partir des résultats précédemment obtenus dans les modèles constitutif et inductible, plusieurs critères qui ont ensuite été évalués de manière systématique. Les critères choisis sont les suivants : taux de prolifération ; quantification du nombre de cellules inflammatoires CD11b+ infiltrées dans le compartiment colorectal; analyse histologique du tissu (érosion/ulcération de la muqueuse, taille des glandes); taux de sécrétion des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-18, ST2, IL-17a, INF- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ; altérations du mucus et finalement niveau d'expression des gènes suivants : IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, sST2, ST2L, Chst4 et Gal3St2.

Mon approche a consisté à dissocier les différents processus impliqués dans chacune des étapes-clés de la pathologie afin de définir et de distinguer plus précisément la contribution respective de l'infection par les bactéries et des dommages provoqués par la fragilisation du tissu.

## **2.1 Dans les processus établis dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM, quelle est la contribution des bactéries ?**

### **Stratégie**

La flore bactérienne joue un rôle essentiel dans l'apparition du phénotype dans le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  dans lequel un traitement avec des antibiotiques réduit significativement l'inflammation. Afin de caractériser plus précisément la contribution de l'infection par les bactéries dans l'évolution du phénotype, j'ai traité les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM adultes (âgées de 7 semaines) avec une combinaison de 4 antibiotiques visant à détruire la flore intestinale. Le traitement a été administré dans l'eau de boisson pour une durée de 3 semaines et a démarré une semaine avant l'administration du tamoxifène. Les souris ont été sacrifiées et analysées au terme du traitement soit deux semaines après l'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$ , puis les critères mentionnés précédemment ont été évalués.



**Figure 19: Effet du traitement aux antibiotiques sur l'expression de l'ARNm de différentes cytokines et enzymes impliquées dans la maturation des mucines dans le modèle  $\alpha 6^{\text{AIECTAM}}$**

(A-B) Niveau d'expression des ARNm de molécules impliquées dans la maturation des mucines (A) de différentes cytokines pro-inflammatoires (B) évalué par RT-qPCR à partir de rectum de souris témoins et  $\alpha 6^{\text{AIECTAM}}$  traitées ou non aux antibiotiques. Les valeurs représentent l'expression relative de l'ARNm normalisée par rapport à l'expression de l'ARNm du gène de référence HPRT. ns, non significatif; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

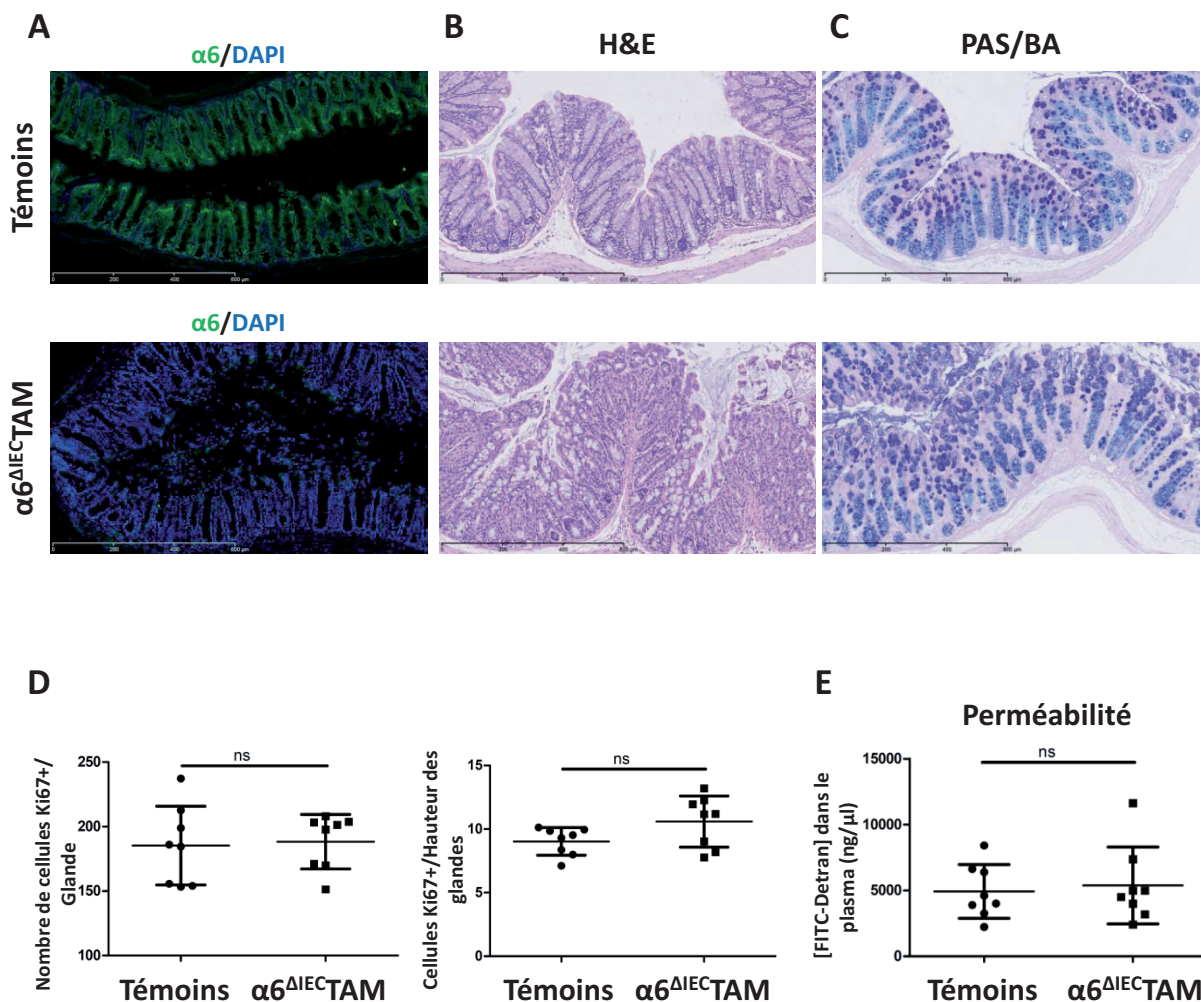


## Résultats

Les bactéries jouent un rôle clé dans le développement du phénotype inflammatoire chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM. En effet, au niveau histologique le traitement antibiotique (ATB) diminue de manière significative la prolifération épithéliale (Fig. 13C) chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM. L'inflammation est également diminuée chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM traitées aux ATB comparées aux souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM non traitées ce qui se traduit par une diminution de l'infiltration de cellules CD11b+ (Fig. 15 A-B). Au niveau des cytokines, la sécrétion d'IL-1 $\beta$  est diminuée à la fois chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM et les souris témoins traitées aux ATB comparées respectivement aux souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM et témoins non traitées. La sécrétion d'IL-18 n'est que partiellement diminuée chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM après traitement ATB (Fig. 17). Les cytokines TNF- $\alpha$  et Il-17a ne sont pas affectées avant ou après traitement aux ATB alors que la sécrétion d'IFN- $\gamma$  augmente chez les mutants après traitement. La sécrétion de ST2 augmente après traitement ATB à la fois chez les souris témoins et chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM, la sécrétion étant significativement plus élevée chez les souris mutantes (Fig. 17). Au niveau transcriptionnel, le traitement ATB diminue l'expression d'IL-1 $\beta$  à la fois chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM et chez souris témoins. Il diminue également l'expression de Chst4 chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM comparées aux souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM non traitées (Fig. 19). Finalement, le niveau d'expression d'IL-33, ST2L, sST2 et Gal3St2 n'est pas affecté par le traitement ATB chez les souris mutantes et témoins. Nous pouvons observer sur les coupes colorées à l'hématoxyline et à l'éosine une amélioration globale de l'aspect du tissu chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM traitées aux ATB, néanmoins plusieurs zones de détachement de l'épithélium persistent (Fig. 13B).

## Conclusion :

Les bactéries sont fortement impliquées dans les phénotypes observés chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM deux semaines après inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$ , sans pour autant être responsables de l'ensemble des mécanismes. En effet, les bactéries activent la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et de sST2, le recrutement des cellules CD11b+, la prolifération épithéliale et la surexpression d'IL-1 $\beta$  et de Chst4. Néanmoins, plusieurs mécanismes sont indépendants ou partiellement dépendants des bactéries tels que la sécrétion d'IL-18, la surexpression de sST2 et de ST2L, la sous-expression de Gal3st2 et le détachement épithélial. L'ensemble de



**Figure 20: Phénotype des souris  $\alpha 6^{\Delta I E C T A M}$  6 jours après administration du premier traitement au tamoxifène.**

(A-D) Analyse du phénotype des souris  $\alpha 6^{\Delta I E C T A M}$  comparées aux souris témoins 6 jours après traitement au tamoxifène. (A) Immunomarquage fluorescent de la sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$  (en vert) sur des coupes congelées de côlon de souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta I E C T A M}$ ; les noyaux ont été marqués au DAPI (en bleu). (B) Colorations hématoxyline/éosine (H/E) de coupes histologiques de côlon distal de souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta I E C T A M}$ . Barre, 600  $\mu$ m. (C) Colorations PAS/bleu alcian (PAS/BA) de coupes histologiques de côlon distal de souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta I E C T A M}$ . Barre, 300  $\mu$ m. (D) Quantification du nombre moyen de cellules Ki67+ présent par glande (à gauche) ou rapporté à la moyenne de la hauteur des glandes (à droite) par animal. Chaque valeur correspond à la moyenne des comptages réalisés à partir de 27 glandes. (E) Perméabilité intestinale évaluée par mesure de l'intensité de la fluorescence retrouvée dans le plasma sanguin 5h après gavage des souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta I E C T A M}$  avec du FITC-dextran

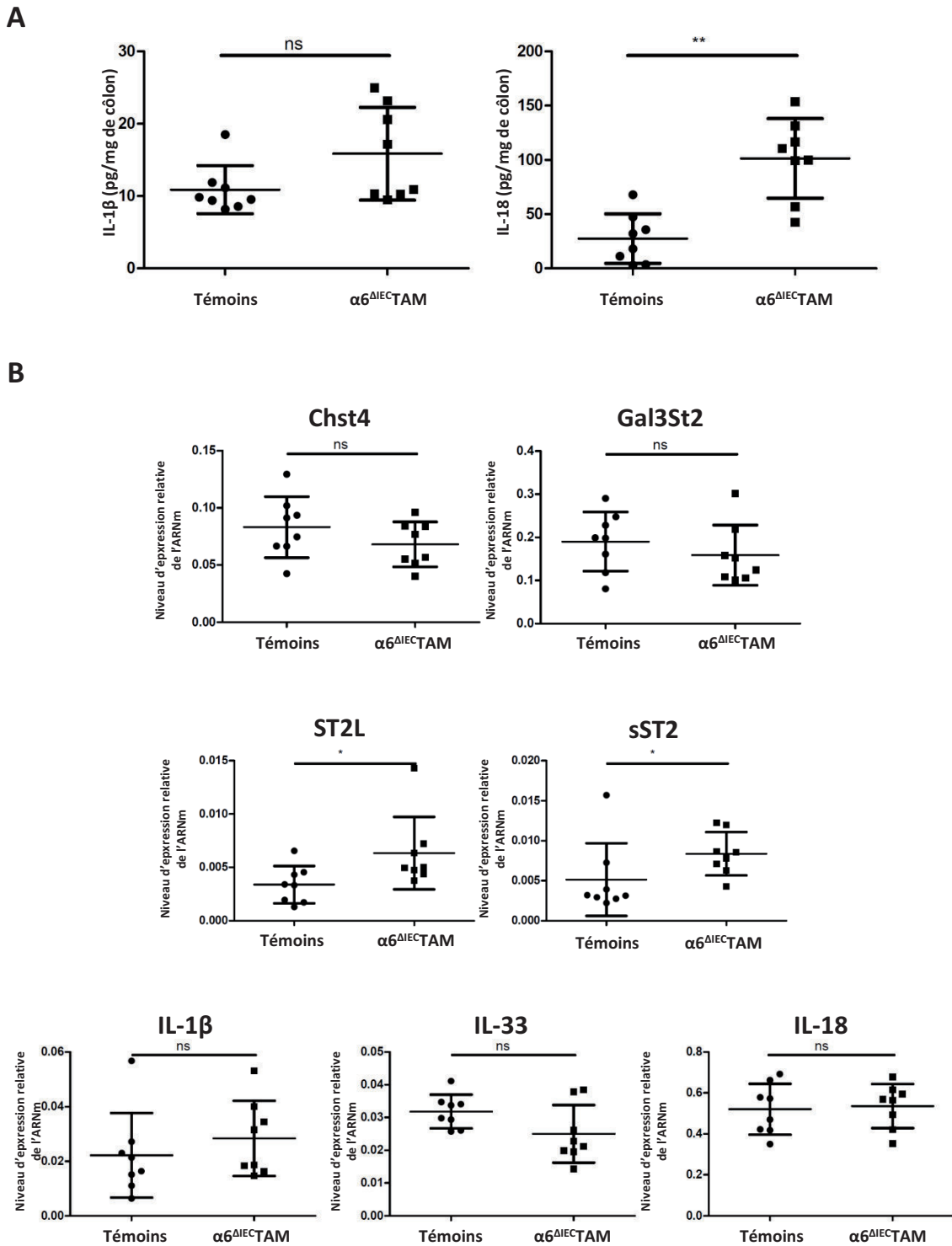
ces résultats suggèrent que plusieurs mécanismes sont impliqués dans le phénotype, les uns dépendants des bactéries et les autres impliquant probablement les dommages dus à la fragilité du tissu ou plus directement liés à la perte de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$ .

## 2-2 Dans les processus établis dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$ , quelle est la cinétique d'apparition des mécanismes ?

Les résultats précédents suggèrent que le phénotype observé deux semaines après l'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$  chez le souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  implique des mécanismes dépendants ou indépendants des bactéries. Nous avons ensuite cherché à déterminer si les mécanismes impliquant les bactéries apparaissent avant ou après les mécanismes indépendants des bactéries. Afin de répondre à cette question et de caractériser l'ordre des événements, nous avons analysé le phénotype des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  immédiatement après avoir induit l'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$ , soit 6 jours après le début du traitement au tamoxifène.

### Résultats

Six jours après traitement au tamoxifène, nous n'avons pas observé de claire différence d'épaisseur du compartiment colorectal entre les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  et les souris témoins. Nous avons réalisé des immunomarquages fluorescents de l'intégrine  $\alpha 6$  afin de déterminer l'efficacité d'un traitement à court terme sur l'inactivation de la sous-unité  $\alpha 6$  (Fig. 20A). Ces analyses ont révélé qu'au moins 2/8 souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  présentent une inactivation mosaïque de la sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$  dans l'épithélium intestinal, bien que celle-ci soit absente dans la majorité des cellules. Au niveau histologique, des colorations à l'hématoxyline/éosine de coupes de côlon ont permis de mettre en évidence plusieurs zones de détachement épithélial (Fig. 20B). Cependant des colorations de coupes de côlon à l'acide périodique de Schiff (PAS) et au bleu alcian (AB) n'ont pas permis de mettre en évidence une claire augmentation de la sécrétion de mucus chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  (Fig. 20C). De plus, il n'y a pas de différence de prolifération entre les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  et le souris témoins (Fig. 20D). La perméabilité intestinale est quasiment identique entre les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  et



**Figure 21: Augmentation de la sécrétion d'IL-18 et surexpression de sST2 et ST2L dans le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  6 jours après la première administration de tamoxifène**

**(A)** Dosage par ELISA des cytokines IL-18 et IL-1 $\beta$  sécrétées dans le milieu de culture issu d'explants de colon de souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$  6 jours après le premier traitement au tamoxifène. **(B)** Niveau d'expression évalué, par RT-qPCR, dans le rectum de souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$ , 6 jours après le premier traitement au tamoxifène. Les valeurs représentent l'expression relative de l'ARNm normalisée par rapport à l'expression de l'ARNm du gène de référence HPRT. ns, non significatif; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

témoins (Fig. 20E). Par contre, le dosage des cytokines a permis de mettre en évidence une augmentation de la sécrétion de la cytokine IL-18 chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM comparées aux souris témoins (Fig. 21A). Le niveau de sécrétion d'IL-1 $\beta$  est équivalent entre les souris mutantes et les souris témoins. Au niveau transcriptionnel, les niveaux d'expression de sST2, IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, Chst4 et Gal3st2 ne sont pas différents entre les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM et les souris témoins, alors que le niveau d'expression de ST2L est augmenté d'environ 3 fois (Fig. 21B).

### **Conclusion :**

Les résultats obtenus dans le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM, 6 jours après traitement au tamoxifène, suggèrent fortement que les mécanismes cellulaires et moléculaires indépendants (ou partiellement dépendants) des bactéries apparaissent avant ceux dépendants des bactéries.

## **DISCUSSIONS/PERSPECTIVES**

## DISCUSSION/PERSPECTIVES

L'homéostasie intestinale repose sur un équilibre entre la flore intestinale, la barrière épithéliale et le système immunitaire. Notre étude a permis de mettre en évidence le rôle majeur de l'intégrine  $\alpha 6$  dans le maintien de cette homéostasie. L'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$  chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et  $\alpha 6^{\Delta IEC} TAM$  conduit à la perte de l'homéostasie intestinale et au déclenchement d'une séquence d'évènements qui conduit au développement d'une inflammation chronique et de cancers colorectaux. Je vais, dans un premier temps, décrire mes hypothèses sur les différentes phases qui, suite à l'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$ , conduisent à la perte de l'homéostasie et au développement de l'inflammation. Dans un second temps, je décrirai mes hypothèses quant aux rôles des voies de signalisation que nous avons analysées et des perspectives de travail.

### 1. Perte de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$

#### **L'âge au moment duquel se produit l'inactivation de l'intégrine $\alpha 6$ est-il essentiel au développement du phénotype observé ?**

Le premier évènement correspond à la perte de la sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$  spécifiquement dans l'épithélium intestinal. Le stade d'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$  n'apparaît pas être déterminant pour le développement du phénotype car les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et  $\alpha 6^{\Delta IEC} TAM$  développent toutes deux un phénotype inflammatoire similaire. Des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC} TAM$  âgées d'un an dans lesquelles l'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$  a été déclenchée à 8 semaines sont en cours d'analyse et permettront de déterminer si les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC} TAM$  développent également des tumeurs.

#### **Le phénotype observé est-il dû à la perte de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et/ou de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ ?**

La sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$  peut se lier aux sous-unités  $\beta 1$  ou  $\beta 4$  pour former respectivement les intégrines  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$ . Dans l'intestin, la sous-unité  $\alpha 6$  se lie

préférentiellement à la sous-unité  $\beta 4$ , nous nous sommes focalisés dans notre étude sur le rôle de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$ . Cependant, il n'est pas à exclure totalement que la perte de l'intégrine  $\alpha 6\beta 1$  puisse avoir un effet, même si au niveau transcriptionnel nous n'avons pas observé une altération de l'expression de l'ARNm de la sous-unité  $\beta 1$  chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  (Voir Résultats - Fig. 2). De plus, la sous-unité  $\beta 1$  qui peut se lier à plusieurs sous-unités  $\alpha$ , n'apparaît pas être désorganisée dans les cellules épithéliales des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  (De Arcangelis et al, soumis).

### **Quels sont les impacts de la perte de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ sur les fonctions cellulaires des cellules épithéliales?**

L'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$  conduit à la perte de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  et des hémidesmosomes (De Arcangelis et al, soumis). Comme on a pu le voir dans l'introduction, l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation et permet l'interaction entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire. L'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  peut affecter l'ancrage, la migration et la prolifération des cellules épithéliales, trois fonctions cellulaires essentielles à la réparation du tissu après lésion. Un projet initié récemment dans l'équipe en collaboration avec l'équipe de M. Chamillard (Institut Pasteur, Lille) va permettre de déterminer à l'aide d'un mini-endoscope le temps de réparation d'une blessure réalisée dans l'épithélium intestinal chez les souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . En effet, la réparation étant un élément clé de l'homéostasie intestinale, ce projet permettra de caractériser le rôle de l'intégrine  $\alpha 6$  dans ce processus.

### **Quels sont les impacts de la perte de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ sur la matrice extracellulaire et le cytosquelette ?**

Les intégrines sont des récepteurs qui permettent l'interaction entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire. L'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  est un récepteur de laminines, son inactivation peut probablement conduire au remodelage de la matrice extracellulaire. En effet, parmi les gènes altérés chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et  $\alpha 6^{\Delta IEC} TAM$ , nous avons de nombreuses protéines impliquées dans le remodelage de la matrice comme les MMP ou des composants de la matrice tels que les chaînes de laminines (De Arcangelis et al, soumis ; et voir Résultats Fig. 2). Ces modifications peuvent affecter le comportement des cellules.



## Quels sont les impacts de la perte de l'intégrine $\alpha6\beta4$ sur les voies de signalisation?

L'intégrine  $\alpha6\beta4$  peut moduler certaines voies de signalisation en interagissant avec d'autres récepteurs (Bertotti et al., 2005; Mariotti et al., 2001)(Bertotti et al., 2006). L'absence de l'intégrine peut avoir des répercussions sur certaines voies de signalisation, cependant l'étude de ces voies *in vivo* s'avère compliquée. En effet, l'une des difficultés à laquelle nous avons été confrontés, provient du fait que l'on travaille sur le tissu et que des variations modérées dans l'épithélium peuvent ne pas être évidentes sur des lysats de tissu entier. Pour contourner ce problème, nous avons cherché à établir un modèle simplifié *in vitro* à partir des cellules épithéliales intestinales témoins et  $\alpha6^{\Delta IEC}$ . Dans ce but, les souris ont été croisées avec la lignée Immortomouse afin d'obtenir des cellules immortalisées qui peuvent être maintenues et propagées en culture tout en gardant leurs propriétés de cellules primaires. Cette approche avait été utilisée avec succès dans l'équipe pour isoler des kératinocytes déficients en intégrine  $\alpha6$  à partir d'épiderme de souris  $\alpha6^{-/-}$  (Rodius et al., 2007). Cette expérience a permis d'obtenir 4 clones de cellules intestinales à partir des souris  $\alpha6^{\Delta IEC}$  mais nous n'avons pas pu pour l'instant obtenir de clone pour les souris témoins.

Dans le but de définir l'évènement primaire à l'origine du phénotype, nous avons analysé les principaux défauts potentiellement en cause à savoir, le détachement et les dommages affectant l'épithélium et la perte d'intégrité de la barrière épithéliale en cherchant à déterminer la contribution respective des altérations liées aux couches de mucus et de celles liées aux bactéries. Le rôle de l'immunité innée et adaptative a également été étudié ainsi que celui de différentes voies de signalisation. Dans les paragraphes qui suivent j'aborderai ces différents points et présenterai mes principales hypothèses.

## 2. Détachement et dommage épithélial

### Quel est le rôle des frottements mécaniques sur le phénotype observé chez les souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$ ?

L'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  est un constituant majeur de l'hémidesmosome, son inactivation peut conduire à la fragilisation et au détachement de l'épithélium. Ce détachement est accéléré après sevrage chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  c'est-à-dire au moment où les animaux commencent à manger de la nourriture solide. Le compartiment colorectal est un lieu où les frottements mécaniques sont continus et intenses. Ceci pourrait expliquer en grande partie la différence de cinétique dans le développement de l'inflammation dans les modèles  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM. En effet, l'inflammation est clairement présente deux semaines après inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$  chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM alors qu'elle n'apparaît qu'après sevrage (~4-5 semaines après la naissance) chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Nous avons essayé de limiter les frottements mécaniques provoqués par le transit de la nourriture solide en soumettant les souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  à un régime alimentaire exclusivement composé de nourriture gélifiée. Cette expérience n'a pas permis de révéler de différence significative sur le plan cellulaire ou moléculaire entre souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  nourries avec de la nourriture classique ou gélifiée. Cependant, dans cette approche, seule l'érosion de la surface de l'épithélium a été limitée mais elle ne correspond qu'à une partie du stress mécanique qui tire également son origine des contractions musculaires. Celles-ci sont extrêmement importantes au niveau rectal. Il serait donc intéressant de limiter les contractions musculaires pour évaluer plus finement le rôle du stress mécanique dans l'établissement du phénotype.

### Quel est l'impact du détachement épithélial sur les voies de signalisations ?

Le détachement épithélial provoque de nombreux cycles de blessure et réparation. Les mécanismes impliqués dans la réparation du tissu peuvent, s'ils sont activés de manière continue, conduire au développement d'inflammation chronique. Dans le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM, le détachement est visible 6 jours après le premier traitement au tamoxifène. En plus de ce détachement, nous avons également observé une surexpression de l'ARNm de ST2L et sST2 et une augmentation de la sécrétion d'IL-18. Le récepteur ST2L est

probablement impliqué dans la réparation des lésions dans notre modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  alors que la sécrétion d'IL-18, qui est dépendante de la protéine MyD88, est potentiellement stimulée par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires.

### **3. Perte de l'intégrité de la barrière épithéliale chez les souris $\alpha 6^{\Delta IEC}$**

L'absence de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  conduit à la perte de l'intégrité de la barrière épithéliale qui est caractérisée par une augmentation de la perméabilité et une ségrégation anormale des bactéries. Cette barrière épithéliale constitue une ligne de défense majeure contre l'infection par des micro-organismes. Le mucus est un composant majeur de cette barrière épithéliale, il n'est pas encore clair dans les modèles  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et  $\alpha 6^{\Delta IEC-TAM}$  si les altérations de mucus interviennent avant ou après la ségrégation anormale des bactéries et la dysbiose.

#### **Quel est le rôle du mucus dans le développement du phénotype dans les modèles $\alpha 6^{\Delta IEC}$ et $\alpha 6^{\Delta IEC-TAM}$ ?**

Dans l'intestin, le mucus est un composant essentiel de la barrière épithéliale et permet de protéger et de lubrifier l'épithélium intestinal. Les souris déficientes en MUC2 développent un phénotype similaire à notre modèle (Johansson et al., 2008; Velcich et al., 2002). Dans notre modèle nous observons une hypersécrétion du mucus que l'on retrouve dans les fèces chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Nous avons pu mettre en évidence chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et  $\alpha 6^{\Delta IEC-TAM}$  une altération de l'expression de l'ARNm de deux sulfotransférases, Chst4 et Gal3st2, impliquées dans la maturation des mucines. L'expression de l'une semble être dépendante des bactéries, Chst4, alors que celle de l'autre, Gal3st2, semble être indépendante des bactéries (voir Résultats - Fig. 19). Il est probable que le mucus soit altéré d'une part par la perte de l'intégrine  $\alpha 6$  et d'autre part par les bactéries. L'étude du mucus demande des expertises qui ne sont pas acquises dans notre laboratoire. Cependant, des études plus approfondies sur la formation des granules de mucus, leur composition et leur sécrétion seraient intéressantes dans les modèles de souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et  $\alpha 6^{\Delta IEC-TAM}$ .

## Dans les processus établis dans les modèles $\alpha 6^{\Delta IEC}$ et $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$ , quelle est la contribution de l'infection par les bactéries ?

Dans les modèles  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et  $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$ , les bactéries jouent un rôle clé dans le développement de l'inflammation. Nous avons pu démontrer que le traitement aux antibiotiques réduisaient fortement la prolifération épithéliale, l'infiltration de cellules CD11b+ dans la muqueuse intestinale et la sécrétion des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18. Les bactéries semblent intervenir également dans la sécrétion de la cytokine sST2 (voir Résultats - Fig. 4B et 17). D'autres expériences seraient nécessaires afin de confirmer cette observation. Parmi les gènes identifiés dans nos réseaux moléculaires, certains sont potentiellement activés par les bactéries comme Reg3 $\gamma$  probablement induit en réponse à la ségrégation des bactéries (Vaishnava et al., 2011) ou Cxcr2 et Cxcl5 qui sont deux chimiokines impliquées dans le recrutement de cellules inflammatoires et impliquées dans les MICI (Bento et al., 2008)(Jamieson et al., 2012).

## Quelle est la cause de la dysbiose et quel est le rôle de cette dernière dans le développement de l'inflammation dans les modèles $\alpha 6^{\Delta IEC}$ et $\alpha 6^{\Delta IEC}TAM$ ?

Des analyses de pyroséquencage ont permis de démontrer un déséquilibre de la flore commensale à 9 semaines avec une diminution des *Campylobacterales* chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  (De Arcangelis et al, soumis). Ce déséquilibre de la flore commensale peut être provoqué par la perte de la perméabilité, le changement de composition du mucus et les changements de l'acidité dans la lumière intestinale. En plus de ces processus, certaines protéines comme Nlrp6 peuvent affecter à la fois la sécrétion du mucus et la flore intestinale (Elinav et al., 2011; Wlodarska et al., 2014). Dans notre modèle, on a pu observer une diminution de la protéine Nlrp6 chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  comparées aux souris témoins. La diminution de Nlrp6 pourrait contribuer à ralentir la réparation et pourrait être impliquée dans la dysbiose observée dans notre modèle. Cependant, elle ne semble pas contribuer à l'augmentation d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18. Un projet initié dans notre équipe en collaboration avec l'équipe de M. Chamillard (Institut Pasteur, Lille) consiste à réintroduire dans des souris axéniques certaines souches bactériennes de la flore intestinale des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ , afin de déterminer si ces dernières sont responsables ou favorisent le développement de l'inflammation.

## Quelle est la contribution de l'immunité innée et adaptative dans le développement de l'inflammation et de la transformation tumorale ?

L'inflammation est caractérisée par une infiltration de plusieurs sous-populations inflammatoires de l'immunité innée notamment les cellules CD11b+ chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et  $\alpha 6^{\Delta IEC} TAM$ . L'immunité innée semble donc impliquer dans les premiers stades d'inflammation et semble être liée à la ségrégation anormale des bactéries. En effet, Les traitements antibiotiques diminuent clairement l'infiltration des cellules CD11b+ dans la muqueuse. L'immunité adaptative ne semble pas, quant à elle, être impliquée dans les étapes précoces de l'inflammation. Les souris doubles mutantes  $\alpha 6^{\Delta IEC} Rag1^{-/-}$  présentent les mêmes signes d'inflammation que les souris simples mutantes  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . De plus, les lymphocytes T CD4+ ne semblent pas être activés 15 jours après traitement au tamoxifène chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC} TAM$  (voir Résultats - Fig. 16). Cependant, les données observées chez les souris doubles mutantes  $\alpha 6^{\Delta IEC} Rag1^{-/-}$  à des stades tumoraux suggèrent fortement que l'immunité adaptative est impliquée dans la transformation tumorale. Il est primordial de mieux caractériser les mécanismes responsables de l'activation et de polarisation de l'immunité adaptative, ainsi que les mécanismes activés par l'immunité adaptative qui conduisent à la formation de tumeurs.

## Quels sont les mécanismes, les molécules et/ou les voies de signalisation potentiellement impliqués dans la formation de cancers dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}$ ?

La carcinogénèse est un processus séquentiel qui implique de nombreuses voies de signalisation. Les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  développent des adénocarcinomes essentiellement à partir de lésions planes infiltrantes. De plus, l'initiation et l'évolution des cancers chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  se déroulent dans un environnement inflammatoire. L'inflammation et plus particulièrement l'immunité adaptative sont clairement impliquées dans la formation des tumeurs chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . L'autre particularité des cancers chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  est qu'ils se développent préférentiellement dans le côlon distal et le rectum, là où les frottements mécaniques sont les plus intenses et continus. Parmi les cytokines potentiellement affectées par les dégâts produits par le détachement épithélial, nous avons identifié ST2 et IL-18. De manière

intéressante, ST2 semble être activée très rapidement après l'inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$  et est maintenue activée dans les zones tumorales (voir Résultats - Fig. 1 et 18). Le rôle de la protéine ST2 dans le développement de cancers colorectaux reste cependant à élucider. D'autres voies de signalisation comme la voie de synthèse des prostaglandines peuvent favoriser le développement de tumeurs. Les MMP également semblent être impliquées dans la progression et probablement dans l'infiltration des cellules cancéreuses. En effet, les MMP sont fortement surexprimées dans les zones tumorales (voir Résultats - Fig. 2). Plusieurs ligands des récepteurs à l'EGF tels que l'amphiréguline et l'épiréguline sont également surexprimés chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et peuvent être impliqués dans le processus d'hyperprolifération.

#### 4. Mécanismes de dérégulation des principales voies de signalisation étudiés dans les modèles $\alpha 6^{\Delta IEC}$ et $\alpha 6^{\Delta IEC} TAM$

##### **Quel est le mécanisme à l'origine de la diminution de la protéine APC et quel est son rôle dans le développement du phénotype?**

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine est l'une des voies majeures impliquées dans le développement de cancers colorectaux. Cependant, elle est moins fréquemment impliquée dans les cancers associés à l'inflammation (à l'exception du modèle  $Apc^{\Delta 14/+}$  (Colnot et al., 2004)). Dans le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ , nous avons pu mettre en évidence une diminution de la protéine APC dans l'ensemble du compartiment colorectal. Cette diminution ne semble pas se traduire par une activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. De plus, les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  ne développent pas de polypes pédiculés caractéristiques de la perte de la protéine APC. Une hypothèse pouvant expliquer ces différences serait que la protéine APC qui interagit avec les microtubules soit délocalisée dans les cellules et soit plus difficile à extraire chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Une autre hypothèse serait que la protéine APC soit tronquée chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . La recherche de formes tronquées en utilisant l'anticorps Ab1 ne nous a pas permis de conclure car de nombreuses bandes aspécifiques sont détectées en Western blot à partir des extraits protéiques issus des souris témoins et  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Plusieurs revues ont fait l'objet d'études

précises sur les difficultés d'avoir de bons anticorps pour étudier la protéine APC (Brocardo et al., 2005; Davies et al., 2007).

### **Quels sont les mécanismes d'activation de ST2 et quel est son rôle dans les modèles $\alpha 6^{\Delta IEC}$ et $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM ?**

On a pu démontrer que l'augmentation de l'expression de l'ARNm de ST2L et sST2 survenait très rapidement après inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$ . De plus, ST2 semble à la fois fortement activée dans le réseau des analyses IPA des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM deux semaines après inactivation de l'intégrine  $\alpha 6$  et dans les zones tumorales des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  âgées de plus d'un an. Cette analyse suggère que la protéine ST2 favorise le développement de cancers. Au niveau transcriptionnel, l'expression de l'ARNm de ST2L et sST2 semble être activée par les dommages et le détachement qui affectent l'épithélium intestinal. Le récepteur ST2L est potentiellement impliqué dans la réparation et dans l'activation de l'inflammation. La forme sécrétée sST2, même si son expression est augmentée, ne semble pas être sécrétée chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM. Les mécanismes de sécrétion de sST2, qui est un antagoniste du récepteur ST2L, ne sont pas clairement caractérisés dans l'épithélium intestinal mais nos résultats mettent en évidence l'implication des bactéries dans ces mécanismes. En effet, le traitement aux antibiotiques augmente la sécrétion de la cytokine sST2 chez les souris témoins, les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  et  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM. De plus, cette augmentation est clairement plus élevée chez les souris mutantes que chez les souris témoins ; il est donc possible que la forme sST2 soit accumulée dans les cellules des souris mutantes et que sa sécrétion réponde à un mécanisme qui implique les bactéries de la lumière intestinale. Afin de mieux caractériser le rôle du récepteur ST2 dans l'inflammation et la progression tumorale, l'une des possibilités serait de traiter les souris avec des anticorps bloquant l'interaction entre le récepteur ST2 et son ligand ou de croiser les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  avec les souris déficientes en ST2.

### **Quels sont les mécanismes d'activation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ et d'IL-18 et quels sont leurs rôles dans les modèles $\alpha 6^{\Delta IEC}$ et $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM ?**

La sécrétion des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 est principalement contrôlée à deux niveaux, au niveau transcriptionnel (expression des formes immatures pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18) et au niveau post-transcriptionnel (activation de la caspase-1 par l'inflammasome et clivage

/maturation des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18). La sécrétion de la cytokine IL-1 $\beta$  semble être activée au niveau transcriptionnel par un mécanisme dépendant des bactéries mais indépendant de la protéine MyD88. De plus, la sécrétion d'IL-1 $\beta$  est corrélée à l'augmentation de la prolifération épithéliale et de l'infiltration de cellules CD11b+ dans la muqueuse intestinale des souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ -TAM. Ceci suggère qu'IL-1 $\beta$  est impliquée dans l'activation de l'inflammation et/ou sécrétée par les cellules inflammatoires.

La sécrétion de la cytokine IL-18 est dépendante de la protéine MyD88 chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  mais ne semble pas être régulée au niveau transcriptionnel puisqu'il n'y a pas de différence significative dans l'expression de l'ARNm d'IL-18 entre les souris témoins et les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Les mécanismes d'activation de la sécrétion d'IL-18 impliquent probablement à la fois les bactéries, les dommages et le détachement affectant l'épithélium. IL-18 jouerait potentiellement un rôle double et serait impliquée dans la réparation et l'activation de l'inflammation.

### Quelles sont les cellules productrices des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-18 et sST2?

L'analyse moléculaire réalisée sur le tissu total ne permet pas de distinguer si la sécrétion des cytokines est due à l'augmentation de la proportion de sous-populations cellulaires exprimant le gène de la cytokine en question ou si elle est induite par l'activation d'une voie de signalisation particulière. Il est essentiel de définir quelles sont les cellules qui sécrètent les cytokines IL-1 $\beta$ , IL-18 et sST2. Des analyses sur des sous-populations cellulaires isolées de l'intestin sont envisagées afin de déterminer quels sous-types cellulaires sécrètent ces cytokines. Des immunomarquages sur coupe de côlon pourraient également permettre, avec les anticorps adéquats, de déterminer quels types cellulaires expriment ces différentes cytokines.

### Quel est le type de réponse adaptative activé dans le modèle $\alpha 6^{\Delta IEC}$ ?

Nous avons pu démontrer chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ , en isolant les lymphocytes T CD4+ de la lamina propria, que ces derniers surexprimaient les gènes codant pour l'INF- $\gamma$  et l'IL-17a, deux cytokines impliquées respectivement dans la réponse de type Th1 et Th17. Cependant ce résultat reste à confirmer au niveau protéique. De plus, d'autres types de réponse tels



que la réponse Th22 ou d'autres sous-populations lymphocytaires telles que les lymphocytes NK devraient être caractérisés dans le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Dans notre étude, nous avons isolé les lymphocytes CD4+ présents dans la lamina propria de l'ensemble du compartiment colorectal ; il serait intéressant de déterminer s'il existe une réponse adaptative différentielle entre la partie distale et proximale du compartiment colorectal pouvant expliquer la formation de cancer préférentiellement au niveau distal.

## Conclusion

L'homéostasie intestinale repose sur de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires complexes impliquant à la fois les micro-organismes de la lumière intestinale, la barrière épithéliale et le système immunitaire. La sous-unité d'intégrine  $\alpha 6$  semble être un acteur majeur de l'homéostasie intestinale et notre étude a permis de mettre en évidence les conséquences graves qu'induit la perte de l'intégrine  $\alpha 6$  dans les cellules épithéliales de l'intestin. Les mécanismes impliqués dans les différents stades de développement de l'inflammation et des cancers dans le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  sont encore à caractériser et à valider. Le modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  représente un modèle unique de carcinogenèse colorectale spontanée développée sur inflammation, très proche de la progression tumorale observée chez certains patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Notre étude a permis de démontrer que les interactions de la cellule avec la matrice extracellulaire sont essentielles au maintien de l'homéostasie intestinale et que leur altération pouvait conduire au développement d'inflammation et de cancer. De plus, nous suggérons que le stress mécanique peut être à l'origine du phénotype observé chez les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ . Finalement, nos approches devraient permettre non seulement de mieux appréhender le rôle de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  sur la fonction de la barrière intestinale, mais aussi de révolutionner notre compréhension de la contribution de la flore bactérienne et du stress mécanique dans la carcinogenèse colique associée à l'inflammation.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham, C., and Cho, J.H. (2009). Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* *361*, 2066–2078.
- Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 131–144.
- Abreu, M.T., Fukata, M., and Arditi, M. (2005). TLR signaling in the gut in health and disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 4453–4460.
- Adolph, T.E., Tomczak, M.F., Niederreiter, L., Ko, H.-J., Böck, J., Martinez-Naves, E., Glickman, J.N., Tschurtschenthaler, M., Hartwig, J., Hosomi, S., et al. (2013). Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* *503*, 272–276.
- Alenghat, T., Osborne, L.C., Saenz, S.A., Kobuley, D., Ziegler, C.G.K., Mullican, S.E., Choi, I., Grunberg, S., Sinha, R., Wynosky-Dolfi, M., et al. (2013). Histone deacetylase 3 coordinates commensal-bacteria-dependent intestinal homeostasis. *Nature* *504*, 153–157.
- Andrä, K., Lassmann, H., Bittner, R., Shorny, S., Fässler, R., Propst, F., and Wiche, G. (1997). Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes Dev.* *11*, 3143–3156.
- Arai, T., and Kino, I. (1989). Morphometrical and cell kinetic studies of normal human colorectal mucosa. Comparison between the proximal and the distal large intestine. *Acta Pathol. Jpn.* *39*, 725–730.
- Araki, A., Kanai, T., Ishikura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Iiyama, R., Totsuka, T., Takeda, K., Akira, S., and Watanabe, M. (2005). MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J. Gastroenterol.* *40*, 16–23.
- Barth, A.I.M., Caro-Gonzalez, H.Y., and Nelson, W.J. (2008). Role of adenomatous polyposis coli (APC) and microtubules in directional cell migration and neuronal polarization. *Semin. Cell Dev. Biol.* *19*, 245–251.
- Bauer, C., Loher, F., Dauer, M., Mayer, C., Lehr, H.A., Schönharting, M., Hallwachs, R., Endres, S., and Eigler, A. (2007). The ICE inhibitor pralnacasan prevents DSS-induced colitis in C57BL/6 mice and suppresses IP-10 mRNA but not TNF-alpha mRNA expression. *Dig. Dis. Sci.* *52*, 1642–1652.
- Baumgart, D.C., Bernstein, C.N., Abbas, Z., Colombel, J.F., Day, A.S., D’Haens, G., Dotan, I., Goh, K.L., Hibi, T., Kozarek, R.A., et al. (2011). IBD Around the world: comparing the epidemiology, diagnosis, and treatment: proceedings of the World Digestive Health Day 2010--Inflammatory Bowel Disease Task Force meeting. *Inflamm. Bowel Dis.* *17*, 639–644.
- Beaulieu, J.F. (1992). Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine. *J. Cell Sci.* *102 ( Pt 3)*, 427–436.

- Beaulieu, J.F., Jutras, S., Durand, J., Vachon, P.H., and Perreault, N. (1993). Relationship between tenascin and alpha-smooth muscle actin expression in the developing human small intestinal mucosa. *Anat. Embryol. (Berl.)* *188*, 149–158.
- Beltrán, C.J., Núñez, L.E., Díaz-Jiménez, D., Farfan, N., Candia, E., Heine, C., López, F., González, M.J., Quera, R., and Hermoso, M.A. (2010). Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *16*, 1097–1107.
- Bento, A.F., Leite, D.F.P., Claudino, R.F., Hara, D.B., Leal, P.C., and Calixto, J.B. (2008). The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. *J. Leukoc. Biol.* *84*, 1213–1221.
- Bergers, G., Reikerstorfer, A., Braselmann, S., Graninger, P., and Busslinger, M. (1994). Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene *Fit-1* generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J.* *13*, 1176–1188.
- Berkes, J., Viswanathan, V.K., Savkovic, S.D., and Hecht, G. (2003). Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* *52*, 439–451.
- Bertotti, A., Comoglio, P.M., and Trusolino, L. (2005). Beta4 integrin is a transforming molecule that unleashes Met tyrosine kinase tumorigenesis. *Cancer Res.* *65*, 10674–10679.
- Bertotti, A., Comoglio, P.M., and Trusolino, L. (2006). Beta4 integrin activates a Shp2-Src signaling pathway that sustains HGF-induced anchorage-independent growth. *J. Cell Biol.* *175*, 993–1003.
- Bouvard, D., Pouwels, J., De Franceschi, N., and Ivaska, J. (2013). Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 430–442.
- Brandl, K., Plitas, G., Schnabl, B., DeMatteo, R.P., and Pamer, E.G. (2007). MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J. Exp. Med.* *204*, 1891–1900.
- Brizzi, M.F., Tarone, G., and Defilippi, P. (2012). Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr. Opin. Cell Biol.* *24*, 645–651.
- Brocardo, M., Näthke, I.S., and Henderson, B.R. (2005). Redefining the subcellular location and transport of APC: new insights using a panel of antibodies. *EMBO Rep.* *6*, 184–190.
- Brown, J.R., and DuBois, R.N. (2005). COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *23*, 2840–2855.
- Brown, S.L., Riehl, T.E., Walker, M.R., Geske, M.J., Doherty, J.M., Stenson, W.F., and Stappenbeck, T.S. (2007). Myd88-dependent positioning of Ptgs2-expressing stromal cells maintains colonic epithelial proliferation during injury. *J. Clin. Invest.* *117*, 258–269.
- Burkitt, H.G. (1993). *Wheater's functional histology: a text and colour atlas* (Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone).

- Cario, E. (2010). Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm. Bowel Dis.* *16*, 1583–1597.
- Carriere, V., Roussel, L., Ortega, N., Lacorre, D.-A., Americh, L., Aguilar, L., Bouche, G., and Girard, J.-P. (2007). IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 282–287.
- Clayburgh, D.R., Shen, L., and Turner, J.R. (2004). A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *84*, 282–291.
- Colnot, S., Niwa-Kawakita, M., Hamard, G., Godard, C., Le Plenier, S., Houbron, C., Romagnolo, B., Berrebi, D., Giovannini, M., and Perret, C. (2004). Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *84*, 1619–1630.
- Cosnes, J., Cattan, S., Blain, A., Beaugerie, L., Carbonnel, F., Parc, R., and Gendre, J.-P. (2002). Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *8*, 244–250.
- Davies, M.L., Roberts, G.T., Stuart, N., and Wakeman, J.A. (2007). Analysis of a panel of antibodies to APC reveals consistent activity towards an unidentified protein. *Br. J. Cancer* *97*, 384–390.
- Díaz-Jiménez, D., Núñez, L.E., Beltrán, C.J., Candia, E., Suazo, C., Alvarez-Lobos, M., González, M.-J., Hermoso, M.A., and Quera, R. (2011). Soluble ST2: a new and promising activity marker in ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol. WJG* *17*, 2181–2190.
- Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell Tissue Res.* *339*, 259–268.
- Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., et al. (2011). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* *145*, 745–757.
- Epifano, C., and Perez-Moreno, M. (2012). Crossroads of integrins and cadherins in epithelia and stroma remodeling. *Cell Adhes. Migr.* *6*, 261–273.
- Fasano, A., and Nataro, J.P. (2004). Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *56*, 795–807.
- Fasano, A., Baudry, B., Pumphin, D.W., Wasserman, S.S., Tall, B.D., Ketley, J.M., and Kaper, J.B. (1991). *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 5242–5246.
- Fearon, E.R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol.* *6*, 479–507.
- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* *61*, 759–767.
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *127*, 2893–2917.

- Van der Flier, A., and Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* *305*, 285–298.
- Friedman, S. (2006). Cancer in Crohn's disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* *35*, 621–639.
- Frisch, S.M., and Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* *124*, 619–626.
- Fukata, M., Michelsen, K.S., Eri, R., Thomas, L.S., Hu, B., Lukasek, K., Nast, C.C., Lechago, J., Xu, R., Naiki, Y., et al. (2005). Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *288*, G1055–1065.
- Gagnoux-Palacios, L., Dans, M., van't Hof, W., Mariotti, A., Pepe, A., Meneguzzi, G., Resh, M.D., and Giancotti, F.G. (2003). Compartmentalization of integrin alpha6beta4 signaling in lipid rafts. *J. Cell Biol.* *162*, 1189–1196.
- Ganz, T. (2003). The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integr. Comp. Biol.* *43*, 300–304.
- García-Miguel, M., González, M.J., Quera, R., and Hermoso, M.A. (2013). Innate immunity modulation by the IL-33/ST2 system in intestinal mucosa. *BioMed Res. Int.* *2013*, 142492.
- Garrett, W.S., Gordon, J.I., and Glimcher, L.H. (2010). Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* *140*, 859–870.
- Gasparetto, M., and Guariso, G. (2013). Highlights in IBD Epidemiology and Its Natural History in the Paediatric Age. *Gastroenterol. Res. Pract.* *2013*.
- Geboes, K., Colombel, J.-F., Greenstein, A., Jewell, D.P., Sandborn, W.J., Vatn, M.H., Warren, B., Riddell, R.H., and Pathology Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel Diseases (2008). Indeterminate colitis: a review of the concept--what's in a name? *Inflamm. Bowel Dis.* *14*, 850–857.
- Georges-Labouesse, E., Messaddeq, N., Yehia, G., Cadalbert, L., Dierich, A., and Le Meur, M. (1996). Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat. Genet.* *13*, 370–373.
- Gilcrease, M.Z. (2007). Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett.* *247*, 1–25.
- Groß, P., Doser, K., Falk, W., Obermeier, F., and Hofmann, C. (2012). IL-33 attenuates development and perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.* *18*, 1900–1909.
- Guo, W., and Giancotti, F.G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 816–826.
- Guo, W., Pylayeva, Y., Pepe, A., Yoshioka, T., Muller, W.J., Inghirami, G., and Giancotti, F.G. (2006). Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell* *126*, 489–502.

- Habtezion, A., Toivola, D.M., Butcher, E.C., and Omary, M.B. (2005). Keratin-8-deficient mice develop chronic spontaneous Th2 colitis amenable to antibiotic treatment. *J. Cell Sci.* *118*, 1971–1980.
- Hamill, K.J., Kligys, K., Hopkinson, S.B., and Jones, J.C.R. (2009). Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. *J. Cell Sci.* *122*, 4409–4417.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hanson, C.A., and Miller, J.R. (2005). Non-traditional roles for the Adenomatous Polyposis Coli (APC) tumor suppressor protein. *Gene* *361*, 1–12.
- Haraldsen, G., Balogh, J., Pollheimer, J., Sponheim, J., and Küchler, A.M. (2009). Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? *Trends Immunol.* *30*, 227–233.
- Harburger, D.S., and Calderwood, D.A. (2009). Integrin signalling at a glance. *J. Cell Sci.* *122*, 159–163.
- Harrington, K.J. (2011). Biology of cancer. *Medicine (Baltimore)* *39*, 689–692.
- Harrison, O.J., and Maloy, K.J. (2011). Innate immune activation in intestinal homeostasis. *J. Innate Immun.* *3*, 585–593.
- Hayakawa, H., Hayakawa, M., Kume, A., and Tominaga, S. (2007). Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J. Biol. Chem.* *282*, 26369–26380.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673–687.
- Jamieson, T., Clarke, M., Steele, C.W., Samuel, M.S., Neumann, J., Jung, A., Huels, D., Olson, M.F., Das, S., Nibbs, R.J.B., et al. (2012). Inhibition of CXCR2 profoundly suppresses inflammation-driven and spontaneous tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* *122*, 3127–3144.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* *61*, 69–90.
- Jilling, T., Simon, D., Lu, J., Meng, F.J., Li, D., Schy, R., Thomson, R.B., Soliman, A., Arditì, M., and Caplan, M.S. (2006). The roles of bacteria and TLR4 in rat and murine models of necrotizing enterocolitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 3273–3282.
- Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 15064–15069.
- Johansson, M.E.V., Sjövall, H., and Hansson, G.C. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 352–361.
- Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P.J., Ward, C.W., and Burgess, A.W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res.* *284*, 31–53.

- Kobori, A., Yagi, Y., Imaeda, H., Ban, H., Bamba, S., Tsujikawa, T., Saito, Y., Fujiyama, Y., and Andoh, A. (2010). Interleukin-33 expression is specifically enhanced in inflamed mucosa of ulcerative colitis. *J. Gastroenterol.* *45*, 999–1007.
- Koster, J., Geerts, D., Favre, B., Borradori, L., and Sonnenberg, A. (2003). Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin alpha6beta4 important for hemidesmosome assembly. *J. Cell Sci.* *116*, 387–399.
- Kruegel, J., and Miosge, N. (2010). Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *67*, 2879–2895.
- Laukoetter, M.G., Bruewer, M., and Nusrat, A. (2006). Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Curr. Opin. Gastroenterol.* *22*, 85–89.
- Laukoetter, M.G., Nava, P., and Nusrat, A. (2008). Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol. WJG* *14*, 401–407.
- Leaphart, C.L., Cavallo, J., Gribar, S.C., Cetin, S., Li, J., Branca, M.F., Dubowski, T.D., Sodhi, C.P., and Hackam, D.J. (2007). A critical role for TLR4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 4808–4820.
- Lebeis, S.L., Powell, K.R., Merlin, D., Sherman, M.A., and Kalman, D. (2009). Interleukin-1 receptor signaling protects mice from lethal intestinal damage caused by the attaching and effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect. Immun.* *77*, 604–614.
- Lee, M.S., and Kim, Y.-J. (2007). Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 447–480.
- Lelouard, H., Fallet, M., de Bovis, B., Méresse, S., and Gorvel, J.-P. (2012). Peyer's patch dendritic cells sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores. *Gastroenterology* *142*, 592–601.e3.
- Li, F., and Lai, M. (2009). Colorectal cancer, one entity or three. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* *10*, 219–229.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 781–810.
- Lopetuso, L.R., Scaldaferrri, F., and Pizarro, T.T. (2012). Emerging role of the interleukin (IL)-33/ST2 axis in gut mucosal wound healing and fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* *5*, 18.
- Lotz, M., Gütle, D., Walther, S., Ménard, S., Bogdan, C., and Hornef, M.W. (2006). Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* *203*, 973–984.
- Lynch, H.T., Lynch, P.M., Lanspa, S.J., Snyder, C.L., Lynch, J.F., and Boland, C.R. (2009). Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin. Genet.* *76*, 1–18.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* *17*, 9–26.



- Margadant, C., Frijns, E., Wilhelmsen, K., and Sonnenberg, A. (2008). Regulation of hemidesmosome disassembly by growth factor receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 589–596.
- Mariotti, A., Kedeshian, P.A., Dans, M., Curatola, A.M., Gagnoux-Palacios, L., and Giancotti, F.G. (2001). EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of integrin alpha6beta4 at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. *J. Cell Biol.* *155*, 447–458.
- El Marjou, F., Janssen, K.-P., Chang, B.H.-J., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., and Robine, S. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genes. N. Y. N* *2000* *39*, 186–193.
- Massagué, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* *134*, 215–230.
- Massagué, J. (2012). TGF-β signaling in development and disease. *FEBS Lett.* *586*, 1833.
- McCart, A.E., Vickaryous, N.K., and Silver, A. (2008). Apc mice: models, modifiers and mutants. *Pathol. Res. Pract.* *204*, 479–490.
- Milovanovic, M., Volarevic, V., Radosavljevic, G., Jovanovic, I., Pejnovic, N., Arsenijevic, N., and Lukic, M.L. (2012). IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol. Res.* *52*, 89–99.
- Minoo, P., Zlobec, I., Peterson, M., Terracciano, L., and Lugli, A. (2010). Characterization of rectal, proximal and distal colon cancers based on clinicopathological, molecular and protein profiles. *Int. J. Oncol.* *37*, 707–718.
- Mukherjee, S., Vaishnav, S., and Hooper, L.V. (2008). Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *65*, 3019–3027.
- Munemitsu, S., Souza, B., Müller, O., Albert, I., Rubinfeld, B., and Polakis, P. (1994). The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Cancer Res.* *54*, 3676–3681.
- Van der Neut, R., Krimpenfort, P., Calafat, J., Niessen, C.M., and Sonnenberg, A. (1996). Epithelial detachment due to absence of hemidesmosomes in integrin beta 4 null mice. *Nat. Genet.* *13*, 366–369.
- Neutra, M.R., Mantis, N.J., and Kraehenbuhl, J.P. (2001). Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* *2*, 1004–1009.
- Niculescu, C., Ganguli-Indra, G., Pfister, V., Dupé, V., Messaddeq, N., De Arcangelis, A., and Georges-Labouesse, E. (2011). Conditional ablation of integrin alpha-6 in mouse epidermis leads to skin fragility and inflammation. *Eur. J. Cell Biol.* *90*, 270–277.
- Nievers, M.G., Schaapveld, R.Q., and Sonnenberg, A. (1999). Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* *18*, 5–17.
- Normand, S., Delanoye-Crespin, A., Bressenot, A., Huot, L., Grandjean, T., Peyrin-Biroulet, L., Lemoine, Y., Hot, D., and Chamaillard, M. (2011a). Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 9601–9606.

- Normand, S., Delanoye-Crespin, A., Bressenot, A., Huot, L., Grandjean, T., Peyrin-Biroulet, L., Lemoine, Y., Hot, D., and Chamaillard, M. (2011b). Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 9601–9606.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* *194*, 23–28.
- Oboki, K., Ohno, T., Kajiwara, N., Arae, K., Morita, H., Ishii, A., Nambu, A., Abe, T., Kiyonari, H., Matsumoto, K., et al. (2010). IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 18581–18586.
- Oku, N., Sasabe, E., Ueta, E., Yamamoto, T., and Osaki, T. (2006). Tight junction protein claudin-1 enhances the invasive activity of oral squamous cell carcinoma cells by promoting cleavage of laminin-5 gamma2 chain via matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane-type MMP-1. *Cancer Res.* *66*, 5251–5257.
- Oshikawa, K., Yanagisawa, K., Tominaga, S. ichi, and Sugiyama, Y. (2002). ST2 protein induced by inflammatory stimuli can modulate acute lung inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *299*, 18–24.
- Pastorelli, L., Garg, R.R., Hoang, S.B., Spina, L., Mattioli, B., Scarpa, M., Fiocchi, C., Vecchi, M., and Pizarro, T.T. (2010). Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 8017–8022.
- Pavalko, F.M., and Burridge, K. (1991). Disruption of the actin cytoskeleton after microinjection of proteolytic fragments of alpha-actinin. *J. Cell Biol.* *114*, 481–491.
- Petit, V., and Thiery, J.P. (2000). Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *92*, 477–494.
- Pietras, K., and Östman, A. (2010). Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *Exp. Cell Res.* *316*, 1324–1331.
- Pretlow, T.P., Barrow, B.J., Ashton, W.S., O’Riordan, M.A., Pretlow, T.G., Jurcisek, J.A., and Stellato, T.A. (1991). Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res.* *51*, 1564–1567.
- Priddle, H., Hemmings, L., Monkley, S., Woods, A., Patel, B., Sutton, D., Dunn, G.A., Zicha, D., and Critchley, D.R. (1998). Disruption of the talin gene compromises focal adhesion assembly in undifferentiated but not differentiated embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* *142*, 1121–1133.
- Rabinovitz, I., Toker, A., and Mercurio, A.M. (1999). Protein kinase C-dependent mobilization of the alpha6beta4 integrin from hemidesmosomes and its association with actin-rich cell protrusions drive the chemotactic migration of carcinoma cells. *J. Cell Biol.* *146*, 1147–1160.
- Radtke, F., and Clevers, H. (2005). Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* *307*, 1904–1909.
- Rakoff-Nahoum, S., and Medzhitov, R. (2009). Toll-like receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 57–63.

- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* *118*, 229–241.
- Raymond, K., Kreft, M., Song, J.-Y., Janssen, H., and Sonnenberg, A. (2007). Dual Role of alpha6beta4 integrin in epidermal tumor growth: tumor-suppressive versus tumor-promoting function. *Mol. Biol. Cell* *18*, 4210–4221.
- Reginato, M.J., Mills, K.R., Paulus, J.K., Lynch, D.K., Sgroi, D.C., Debnath, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. (2003). Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat. Cell Biol.* *5*, 733–740.
- Reiner, S.L., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2007). Division of labor with a workforce of one: challenges in specifying effector and memory T cell fate. *Science* *317*, 622–625.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* *2*, 361–367.
- Reya, T., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* *434*, 843–850.
- Sawamura, D., Nakano, H., and Matsuzaki, Y. (2010). Overview of epidermolysis bullosa. *J. Dermatol.* *37*, 214–219.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., et al. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* *23*, 479–490.
- Sedhom, M.A.K., Pichery, M., Murdoch, J.R., Foligné, B., Ortega, N., Normand, S., Mertz, K., Sanmugalingam, D., Brault, L., Grandjean, T., et al. (2013). Neutralisation of the interleukin-33/ST2 pathway ameliorates experimental colitis through enhancement of mucosal healing in mice. *Gut* *62*, 1714–1723.
- Seidelin, J.B., Bjerrum, J.T., Coskun, M., Widjaya, B., Vainer, B., and Nielsen, O.H. (2010). IL-33 is upregulated in colonocytes of ulcerative colitis. *Immunol. Lett.* *128*, 80–85.
- Seifert, G.J., Lawson, D., and Wiche, G. (1992). Immunolocalization of the intermediate filament-associated protein plectin at focal contacts and actin stress fibers. *Eur. J. Cell Biol.* *59*, 138–147.
- Shaw, L.M. (2001). Identification of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 as signaling intermediates in the alpha6beta4 integrin-dependent activation of phosphoinositide 3-OH kinase and promotion of invasion. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 5082–5093.
- Siegmund, B., Fantuzzi, G., Rieder, F., Gamboni-Robertson, F., Lehr, H.A., Hartmann, G., Dinarello, C.A., Endres, S., and Eigler, A. (2001). Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *281*, R1264–1273.

- Simon-Assmann, P., Spence, C., Lefebvre, O., and Kedinger, M. (2010). The role of the basement membrane as a modulator of intestinal epithelial-mesenchymal interactions. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *96*, 175–206.
- Sivakumar, P.V., Westrich, G.M., Kanaly, S., Garka, K., Born, T.L., Derry, J.M.J., and Viney, J.L. (2002). Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage. *Gut* *50*, 812–820.
- Van der Sluis, M., De Koning, B.A.E., De Bruijn, A.C.J.M., Velcich, A., Meijerink, J.P.P., Van Goudoever, J.B., Büller, H.A., Dekker, J., Van Seuning, I., Renes, I.B., et al. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* *131*, 117–129.
- Søreide, K., Nedrebø, B.S., Reite, A., Thorsen, K., and Kørner, H. (2009). Endoscopy, morphology, morphometry and molecular markers: predicting cancer risk in colorectal adenoma. *Expert Rev. Mol. Diagn.* *9*, 125–137.
- Sponheim, J., Pollheimer, J., Olsen, T., Balogh, J., Hammarström, C., Loos, T., Kasprzycka, M., Sørensen, D.R., Nilsen, H.R., Küchler, A.M., et al. (2010). Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts. *Am. J. Pathol.* *177*, 2804–2815.
- Takagi, H., Kanai, T., Okazawa, A., Kishi, Y., Sato, T., Takaishi, H., Inoue, N., Ogata, H., Iwao, Y., Hoshino, K., et al. (2003). Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the development of dextran sodium sulphate colitis in mice. *Scand. J. Gastroenterol.* *38*, 837–844.
- Teller, I.C., Auclair, J., Herring, E., Gauthier, R., Ménard, D., and Beaulieu, J.-F. (2007). Laminins in the developing and adult human small intestine: relation with the functional absorptive unit. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *236*, 1980–1990.
- Ullman, T.A., and Itzkowitz, S.H. (2011). Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* *140*, 1807–1816.
- Usami, Y., Chiba, H., Nakayama, F., Ueda, J., Matsuda, Y., Sawada, N., Komori, T., Ito, A., and Yokozaki, H. (2006). Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hum. Pathol.* *37*, 569–577.
- Vaishnav, S., Yamamoto, M., Severson, K.M., Ruhn, K.A., Yu, X., Koren, O., Ley, R., Wakeland, E.K., and Hooper, L.V. (2011). The antibacterial lectin RegIIIγ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* *334*, 255–258.
- Valatas, V., Vakas, M., and Kolios, G. (2013). The value of experimental models of colitis in predicting efficacy of biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *305*, G763–785.
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K., and Augenlicht, L. (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* *295*, 1726–1729.

- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* *319*, 525–532.
- Wang, Z., Mandell, K.J., Parkos, C.A., Mrsny, R.J., and Nusrat, A. (2005). The second loop of occludin is required for suppression of Raf1-induced tumor growth. *Oncogene* *24*, 4412–4420.
- Welz, P.-S., Wullaert, A., Vlantis, K., Kondylis, V., Fernández-Majada, V., Ermolaeva, M., Kirsch, P., Sterner-Kock, A., van Loo, G., and Pasparakis, M. (2011). FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation. *Nature* *477*, 330–334.
- Wiche, G. (1998). Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J. Cell Sci.* *111 ( Pt 17)*, 2477–2486.
- Wiche, G., Krepler, R., Artlieb, U., Pytela, R., and Aberer, W. (1984). Identification of plectin in different human cell types and immunolocalization at epithelial basal cell surface membranes. *Exp. Cell Res.* *155*, 43–49.
- Wlodarska, M., Thaïss, C.A., Nowarski, R., Henao-Mejia, J., Zhang, J.-P., Brown, E.M., Frankel, G., Levy, M., Katz, M.N., Philbrick, W.M., et al. (2014). NLRP6 Inflammasome Orchestrates the Colonic Host-Microbial Interface by Regulating Goblet Cell Mucus Secretion. *Cell* *156*, 1045–1059.
- Zaki, M.H., Boyd, K.L., Vogel, P., Kastan, M.B., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2010a). The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* *32*, 379–391.
- Zaki, M.H., Vogel, P., Body-Malapel, M., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2010b). IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 4912–4920.
- Zaki, M.H., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2011). The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis. *Trends Immunol.* *32*, 171–179.
- Zhang, H., Landmann, F., Zahreddine, H., Rodriguez, D., Koch, M., and Labouesse, M. (2011). A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis. *Nature* *471*, 99–103.
- Zouiten-Mekki, L., Serghini, M., Fekih, M., Kallel, L., Matri, S., Ben Mustapha, N., Boubaker, J., and Filali, A. (2013). [Epithelial cell in intestinal homeostasis and inflammatory bowel diseases]. *Médecine Sci. MS* *29*, 1145–1150.



# Analyse des mécanismes moléculaires et cellulaires conduisant à une inflammation dans l'intestin et une progression tumorale induits par la perte de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ chez la souris

## Résumé

Le laboratoire a établi un modèle de souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  qui développe une inflammation chronique intestinale associée à la formation d'adénocarcinomes colorectaux. Ce modèle correspond à une délétion ciblée à l'épithélium intestinal de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$ . Mon projet de thèse a consisté à définir les mécanismes qui influencent la transformation de lésions inflammatoires en adénocarcinomes.

La caractérisation du modèle  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  a permis de mettre en évidence plusieurs altérations: détachement de l'épithélium, régénération du tissu, prolifération, augmentation de la perméabilité intestinale, hypersécrétion du mucus, ségrégation anormale des bactéries, inflammation chronique et formation de tumeurs.

Pour étudier la séquence et la cinétique des mécanismes, j'ai développé un modèle de souris inducible ( $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM). Cette lignée présente, deux semaines après l'invalidation de l'intégrine  $\alpha 6$ , les mêmes signes d'inflammation que les souris  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ .

Mon approche a consisté à dissocier les processus impliqués dans chacune des étapes-clés de la pathologie afin de définir la contribution respective de l'infection par les bactéries et du stress mécanique.

Mots-clés : intégrine ; cancer ; inflammation

## Abstract

We generated a new mouse model,  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ , in which the genetic ablation of  $\alpha 6$  integrin from intestinal epithelial cells triggered the development of spontaneous colitis and colorectal cancer. My main goal was to define the mechanisms by which inflamed lesions degenerate into infiltrating adenocarcinomas. Loss of  $\alpha 6$  integrin in this model resulted in epithelial barrier damage, enhanced permeability, altered mucus layers, abnormal bacterial segregation, chronic inflammation and tumor development.

In order to define the sequence of events and the mechanisms involved at each stage of the disease, from inflamed to tumor lesions, I developed an inducible mouse model,  $\alpha 6^{\Delta IEC}$ TAM, in which  $\alpha 6$  integrin ablation was induced by tamoxifen treatment. This line recapitulates all aspects of inflammation observed in the  $\alpha 6^{\Delta IEC}$  model, as early as two weeks after tamoxifen treatment. In particular, I tried to define the respective contribution of infection by bacteria and mechanical stress during disease progression.

Key words: integrin; cancer; inflammation