



HAL
open science

Expression des récepteurs Toll-Like dans la muqueuse intestinale et évaluation de l'immunoréactivité antimicrobienne chez les chiens atteints de Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

Juan Hernandez

► To cite this version:

Juan Hernandez. Expression des récepteurs Toll-Like dans la muqueuse intestinale et évaluation de l'immunoréactivité antimicrobienne chez les chiens atteints de Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin. Biologie animale. Oniris, 2020. Français. ⟨NNT:⟩. ⟨tel-04259196⟩

HAL Id: tel-04259196

<https://hal.science/tel-04259196v1>

Submitted on 25 Oct 2023

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.



HAL Authorization

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ÉCOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie, Biologie Systémique Médicale

Par

Juan HERNANDEZ RODRIGUEZ

Expression des récepteurs Toll-Like dans la muqueuse intestinale et évaluation de l'immunoréactivité antimicrobienne chez les chiens atteints de Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 04 Mai 2020

Unité de recherche : Immuno-Endocrinologie Cellulaire et Moléculaire (IECM, USC 1383/Oniris)

Rapporteurs avant soutenance :

Armelle DIQUELOU Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Moez RHIMI Chargé de Recherche, HDR, INRAe Jouy-en Josas

Composition du Jury :

Président : Non déterminé à ce jour

Examineurs : Armelle DIQUELOU Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Moez RHIMI Chargé de Recherche, HDR, INRAe Jouy-en Josas
Luc CHABANNE Professeur, VetAgro Sup – Campus Vétérinaire de Lyon
Nathalie RUVOEN Professeur, Oniris, Nantes

Dir. de thèse : Blandine LIEUBEAU Chargée de Recherche, HDR, Oniris-INRAe, Nantes
Co-encadrant : Jérôme ABADIE Maître de Conférences, Oniris, Nantes

Invité(s)

Jean-Luc CADORE Professeur, VetAgro Sup – Campus Vétérinaire de Lyon
Jean-Pierre SEGAIN Directeur de Recherche, INRAe, Nantes

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements à tous les membres du jury :

Madame **Blandine Lieubeau** qui a dirigé ce travail. Recevez mes remerciements pour la confiance que vous m'avez accordée et pour la rigueur de votre encadrement.

Monsieur **Jérôme Abadie** qui a co-dirigé ce travail. Sincères remerciements pour votre bienveillance réconfortante et pour votre enthousiasme contagieux. Je suis particulièrement reconnaissant de la qualité de nos échanges, tant dans le cadre de ce travail que dans l'activité clinique quotidienne.

Madame la professeur **Armelle Diquelou** et Monsieur **Moez Rhimi** qui me font l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs. Recevez mes sincères remerciements.

Madame la professeur **Nathalie Ruvoen** et monsieur le professeur **Luc Chabanne** qui ont accepté d'examiner ce travail en tant que membre du jury. Recevez mes sincères remerciements pour cet engagement.

Monsieur le professeur **Jean-Luc Cadoré** qui a suivi ce travail en tant que membre du comité de suivi de thèse. Au-delà de votre bienveillance sans limite et des précieux conseils apportés au cours de ces quatre années, je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance pour votre présence constante dans les toutes les étapes de ma vie professionnelle.

Monsieur **Jean-Pierre Segain** qui a également suivi ce travail en tant que membre du comité de suivi de thèse. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance pour votre engagement et pour les précieux conseils techniques que vous m'avez prodigués.

Je tiens également à remercier toutes celles et ceux qui ont contribué à ce travail :

Monsieur le professeur **Jean-Marie Bach** qui, dès la première heure, a cru en une thématique en lien avec mes activités cliniques dominantes et qui a accepté d'intégrer l'inflammation du tube digestif du chien au sein de son unité. Également, je tiens à vous remercier très sincèrement pour la qualité de votre écoute et la richesse de nos échanges.

Toute l'équipe de l'**Unité IECM** et en particulier **Karine Haurogné**, **Marie Allard** et **Julie Hervé** qui ont passé de nombreuses heures à réaliser les dosages de cytokines, de chemokines et d'immunoglobulines.

Toute l'équipe du **Service d'anatomie pathologique** et en particulier **Florian Chocteau** et **Elodie Rouillé** pour leurs lectures attentives des lames histologiques et leur disponibilité toujours très agréable. Egalement, mes sincères remerciements à **Florence Lezin** et **Anabelle Ravet** pour les longues procédures de préparation des lames et pour le travail de mise au point du protocole d'immunohistochimie des TLRs.

Toute l'équipe du **CHV Frégis** où cette aventure est née et où les procédures de recrutement ont débuté. Mes sincères remerciements à **Rodolpho Léal**, **Marina Dominguez**, **Mélanie Pastor** et **Maud Girod** pour leur aide précieuse au recrutement des cas. Mes remerciements également aux associés **Jean-Philippe Corlouer**, **Laurent Cauzinille**, **Cyrill Poncet**, **Eymeric Gomes** et **Guillaume Ragetly** qui ont volontiers accepté, entre autres, l'installation d'un congélateur -80°C dans les locaux du CHV.

Toute l'équipe du **Service de Médecine Interne d'Oniris** pour son soutien indéfectible. **Odile Sénécat** et **Amandine Drut**, vous êtes devenues mes rayons de soleil. J'adresse également un message de reconnaissance à **Dominique Fanuel-Barret** qui a été mon premier contact avec Oniris et qui a œuvré sans relâche pour que ce projet aboutisse. Merci de m'avoir aidé à croire en cette reconversion professionnelle et d'être toujours présente pour un conseil, un soutien ou tout simplement un geste d'amitié. Votre présence m'est précieuse.

La compagnie **Hill's**, en la personne de **Michel Meunier**, qui a cru en ce projet et qui a apporté un soutien financier et humain sans qui ce travail n'aurait pu exister.

Enfin, je remercie tous les **animaux** et leurs **propriétaires** qui ont accepté de participer à ce travail.

Dédicaces

Antoine et Marie, mes deux amours. Vous n'en finissez pas de me surprendre avec vos interrogations pétillantes sur la vie. Cette thèse aura été pour vous le signe du travail et de la persévérance. Terminés les « tu es encore sur ta thèse ? mais ça fait combien de temps que tu la fais ... ? ». Je vous aime.

Hélène, mon amour. Je ne finis pas de te surprendre avec mes challenges à la c.. . What's next ? Je t'aime.

Ma mère pour qui cette thèse marque une période particulière de notre existence commune.

Danielle qui a su m'assimiler et qui m'a, une fois de plus, apporté une aide précieuse à la rédaction de ce manuscrit.

Chica et Geisha, mes meilleurs souvenirs

Sommaire

Sommaire	5
Table des illustrations	9
Table des annexes	12
Liste des abréviations	13
Avant-propos	17
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE I : IMMUNITE INTESTINALE	19
1 Anatomie digestive et régionalisation immunitaire	21
1.1 Structure et physiologie générale du tube digestif	21
1.2 Fonctions de l'épithélium digestif	24
1.2.1 Caractéristiques générales	24
1.2.2 Les complexes de jonctions	25
1.3 Le tissu lymphoïde associé à l'intestin	26
1.3.1 Généralités	26
1.3.2 Les follicules lymphoïdes de l'intestin et les plaques de Peyer	29
2 Les acteurs cellulaires de l'immunité intestinale	34
2.1 Les macrophages intestinaux	34
2.2 Les cellules dendritiques intestinales	34
2.3 Les lymphocytes T intestinaux	35
2.3.1 Les lymphocytes T conventionnels	37
2.3.2 Les lymphocytes T non-conventionnels	40
2.4 Les cellules lymphoïdes innées	40
2.5 Les cellules caliciformes	42
2.6 Les cellules entéroendocrines	43
2.7 Activité immunitaire directe des cellules épithéliales	47
2.8 Les cellules M	48
2.9 Les cellules de Paneth	49
2.10 Les cellules chimiosensibles intestinales	50
3 Quelques acteurs moléculaires de l'immunité intestinale	52
3.1 Le mucus	52
3.2 Les molécules anti-microbiennes	53
3.3 Les immunoglobulines A	55
3.3.1 Structure des IgA	56
3.3.2 Commutation de classe des immunoglobulines et hypermutation des lymphocytes	56
3.3.3 Sécrétion trans-épithéliale des Immunoglobulines A	58
3.3.4 Rôles des IgA	59
3.4 Les Récepteurs à Reconnaissance de Forme	60
3.4.1 Les récepteurs de type RIG-I-Like	61
3.4.2 Les récepteurs lectine de type C	61
3.4.3 Les récepteurs NOD-Like	61
3.4.4 Les Toll-Like Receptors	65

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE II : MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES	
INTESTINALES	75
1 Classification des entéropathies chroniques du chien	77
2 Aspects cliniques	79
2.1 Symptômes	79
2.2 Index d'activité clinique de la maladie	80
3 Démarche diagnostique générale des MICI du chien	85
4 Aspects endoscopiques	91
5 Aspects histologiques	94
6 Prise en charge thérapeutique des MICI	100
6.1 Traitements immunosuppresseurs	100
6.2 Probiotiques, prébiotiques et symbiotiques	102
7 Pathogénie des MICI	103
7.1 Facteurs génétiques	105
7.2 Facteurs immunitaires	107
7.3 Facteur microbiotique	110
QUESTIONNEMENT SCIENTIFIQUE	115
ETUDE EXPERIMENTALE	119
1 Etude épidémiologique de la population de chiens atteints d'entéropathie inflammatoire	123
1.1 Matériels et méthodes	123
1.1.1 Cohorte	123
1.1.2 Evaluation clinique	124
1.1.3 Analyse histologique intestinale	124
1.1.4 Analyses statistiques	125
1.2 Résultats	125
1.2.1 Population	125
1.2.2 Expression clinique	129
1.2.3 Analyse histologique	130
1.3 Discussion	132
1.3.1 Cohorte	132
1.3.2 Signes cliniques et score clinique	132
1.3.3 Race	133
1.3.4 Choix de la cohorte pour l'analyse de l'expression des TLRs	133
2 Etude de l'expression des récepteurs Toll-Like 2, 4, 5 et 9 dans la muqueuse intestinale et de la réaction immunitaire humorale dirigée contre des motifs bactériens chez le chien atteint de Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin	134
2.1 Introduction à la publication	134

2.2	Publication	135
2.3	Communication à des congrès	166
2.3.1	Poster Journées de l'Ecole Doctorale Biologie-Santé 2018	166
2.3.2	Poster congrès <i>European College of Veterinary Internal Medicine</i> 2019	166
2.3.3	Poster congrès <i>European College of Veterinary Pathology</i> 2019	166
DISCUSSION		167
1	Principaux résultats et implications majeures	169
1.1	Inflammation intestinale dans les MICI sans pertes de protéines	169
1.1.1	Histologie conventionnelle	169
1.1.2	Phénotypage par immunohistochimie des cellules inflammatoires	170
1.1.3	Et si l'inflammation cellulaire n'était pas déterminante ... ?	171
1.1.4	Vers une refonte de la nosographie des entéropathies chroniques du chien	171
1.2	Expression des TLRs	172
1.3	Expression des IgA dans la paroi intestinale des chiens atteints de MICI	174
1.4	Séro-réactivité anti-fagelline et anti-LPS des chiens atteints de MICI	175
2	Limites de l'étude	177
2.1	La cohorte	177
2.2	Les témoins	177
2.3	Validation des anticorps anti-TLRs	178
2.4	Dosages des cytokines et chimiokines	180
2.5	Analyse du microbiote	182
3	Conclusions et perspectives	183
BIBLIOGRAPHIE		185
ANNEXES		207

Table des illustrations

Figures

Figure 1: Anatomie générale du tube digestif du chien.	21
Figure 2 : Représentation schématique histologique d'une coupe transversale de l'intestin.	22
Figure 3 : Représentation schématique de la muqueuse intestinale grêle et colique avec les principaux constituants cellulaires impliqués dans l'immunité et les moyens de défense.	23
Figure 4 : Organisation des jonctions intercellulaires de l'épithélium intestinal.	25
Figure 5 : Représentation du système immunitaire de la muqueuse.	27
Figure 6 : Représentation schématique du fonctionnement général de la réponse immunitaire.	28
Figure 7 : Morphologie de l'épithélium associé aux follicules (FAE) en microscopie électronique.	30
Figure 8 : Représentation schématique d'une plaque de Peyer.	30
Figure 9 : Mécanismes de défense immunitaire contre les bactéries commensales du tube digestif.	32
Figure 10 : Développement et maturation des lymphocytes T intestinaux.	37
Figure 11 : Différenciation des lymphocytes effecteurs T helper.	39
Figure 12 : Présentation des populations de lymphocytes T auxiliaires (Th) et des cellules lymphoïdes innées (ILC).	41
Figure 13 : Ultrastructure d'une cellule caliciforme en microscopie électronique à transmission.	43
Figure 14 : Ultrastructure d'une cellule entéroendocrine en microscopie électronique.	44
Figure 15 : Rôle des cellules entéroendocrines (CEE) sur la barrière épithéliale et sur les cellules immunitaires.	46
Figure 16 : Représentation de la morphologie des cellules M.	49
Figure 17 : Fréquence des cellules tuft lors d'infection par <i>Trichomonas muris</i> .	51
Figure 18 : Le mucus dans l'intestin grêle et dans le côlon.	53
Figure 19 : Régulation de l'expression des molécules antimicrobiennes par le microbiote.	55
Figure 20 : Transcytose des IgA sécrétoires dans la lumière intestinale.	59
Figure 21 : Fonctions des récepteurs NOD-like (NLRs) ayant un rôle de PRR.	63
Figure 22 : Induction de l'autophagie par les récepteurs NOD-like.	64
Figure 23 : Les 2 principales voies de signalisation des TLRs.	69
Figure 24 : Modélisation macromoléculaire de Toll-Like Receptor 4 (TLR4) et du Myddosome.	71

Figure 25 : Modalités de calcul du score CIBDAI. _____	82
Figure 26 : Proposition de schéma de prise en charge nutritionnelle lors d'entéropathie chronique chez le chien. _____	87
Figure 27 : Démarche diagnostique lors de troubles digestifs chroniques chez le chien. _	90
Figure 28 : Planche d'images endoscopiques duodénales et coliques chez le chien. _____	92
Figure 29 : Images microscopiques de biopsies intestinales de chiens normaux et de chiens atteints de MICI: _____	96
Figure 30 : Analyse histologique et par hybridation in situ en fluorescence (FISH) du côlon d'un boxer atteint de colite granulomateuse avant et après traitement avec l'enrofloxacin. _____	98
Figure 31 : Facteurs contribuant à l'apparition et à l'entretien des MICI. _____	103
Figure 32 : Analyse par hybridation fluorescence in situ d'une biopsie colique de souris normale et d'une souris déficiente en IL-10 présentant une colite induite (DSS) montrant une pénétration des bactéries dans la couche profonde de mucus au contact de l'épithélium. _____	107
Figure 33 : Répartition des cas d'entéropathie recrutés selon leur classification. _____	126
Figure 34 : Répartition des scores médians d'activité clinique (CCECAI) selon le type d'entéropathie. _____	126
Figure 35 : Répartition des races représentées dans la cohorte selon le type d'entéropathie. _____	128
Figure 36 : Répartition des signes cliniques selon le type d'entéropathie. _____	130
Figure 37 : Quantification du nombre de cellules CD3+ dans la lamina propria duodénale des chiens atteints de différentes entéropathies chroniques et des témoins dans la publication de German et al. _____	170

Tableaux

Tableau 1 : Les deux grands groupes de lymphocytes T intestinaux. _____	36
Tableau 2 : Principales cellules entéroendocrines et leurs rôles. _____	45
Tableau 3 : Principaux récepteurs de type NOD-Like (NLRs) et leur fonction PRR. _____	62
Tableau 4 : Principaux récepteurs Toll-Like (TLRs) identifiés et leurs ligands chez l'humain. _____	67
Tableau 5 : Classification actuelle des entéropathies chroniques canines. _____	79
Tableau 6 : Comparaison des index cliniques utilisés chez l'humain et chez le chien atteints de MICI. _____	81
Tableau 7 : Détail des 9 paramètres utilisés pour le calcul du score CCECAI. _____	83
Tableau 8 : Causes de troubles digestifs chroniques chez le chien et moyens d'exploration. _____	85
Tableau 9 : Paramètres évalués par le <i>Simplified Histopathologic Scoring System for Gastrointestinal Inflammation</i> . _____	94

Tableau 10 : Classification, données démographiques et CCECAI des chiens recrutés dans l'étude globale. _____	125
Tableau 11 : Caractéristiques cliniques des chiens recrutés selon le type d'entéropathie. _____	129
Tableau 12 : Résumé des observations histologiques selon le type d'entéropathie (Comptes rendus LHA). _____	131
Tableau 13 : Sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative des sérologies pANCA et ASCA dans le diagnostic de la MC et de la RCH. _____	175
Tableau 14 : Résumé de l'expression des TLR2, 4, 5 et 9 selon la localisation. _____	173
Tableau 15 : Principaux fournisseurs et type d'anticorps utilisés dans les publications sur le marquage des TLRs chez le chien. _____	179
Tableau 16 : Comparaison des sensibilités de détection des cytokines/chimiokines entre les techniques Milliplex®, Meso Scale Delivery® et Elisa standard. _____	181

Encadrés

Encadré 1 : Organisation macromoléculaire des Toll-Like Receptors et des voies de signalisation. _____	71
Encadré 2 : La colite granulomateuse des boxers et des bouledogues français, des similitudes avec la Maladie de Crohn. _____	99
Encadré 3 : Modèles d'étude des Maladies Inflammatoires de l'Intestin chez l'animal de laboratoire _____	105

Table des annexes

Annexe 1 : Validation éthique du protocole d'étude clinique. _____	208
Annexe 2 : Formulaire de consentement éclairé signé par les propriétaires des chiens. _	209

Liste des abréviations

AID	Activate-Induced Desaminase	CX3CR	chemokine (C-X3-C motif) receptor
AIM	Absent-in-melanoma	CYLD	CYLD lysine 63 deubiquitinase
Alb	Albumine	DAMP	Damage-associated molecular patterns
ALR	AIM-Like receptor	DD	Death domain
APC	Antigen presenting cell	DEAF	Deformed epidermal autoregulatory factor
APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand	DLCK1	doublecortin like kinase 1
ARE	Antibiotic responsive enteropathy	FAE	Follicle associated epithelium
ARN	Acide ribonucléique	FRE	Food responsive enteropathy
ATF3	Activating transcription factor 3	GALT	Gut associated lymphoid tissue
ATG	Autophagy-related protein	GATA3	Trans-acting T-cell-specific transcription factor 3
ATG16L1	ATG 16 like 1	HD	Human defensin
CARD	Caspase activation and recruitment domain	ICAM	Inter Cellular adhesion molecule
CCECAI	Canine Chronic Enteropathy Clinical Activity Index	IEC	Intestinal epithelial cell
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand	IEL	Intraepithelial lymphocyte
CCR	Chemokine (C-C motif) receptor	IFN	Interféron
CD	Cellule dendritique	IgA	Immunoglobuline A
CD4	Cluster of differenciation	IKK	IκB kinase
CDEIS	Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity	IL	Interleukine
CEE	Cellule entéroendocrine	ILC	Intestinal lymphoid cell
CEI	Cellule épithéliale intestinale	iNOS	Oxyde synthase nitroinductible
CIBDAI	Canine Inflammatory Bowel Disease Activity Index	IRE	Immunomodulatory responsive enteropathy
CLEC4C	C-type lectin domain family 4 member C	IRF3	Interferon regulatory factor 3
CLR	C type lectine receptor	IRGM	Immunity-related GTPase family M protein
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité	JNK	c-Jun N-terminal kinases
COX	Cyclooxygénase	LAP	Latency-associated peptide
CPA	Cellule présentatrice d'antigène	LL- 37/hCAP18	LL-37/human Cationic Antimicrobial Protein 18
CX3CL	chemokine (C-X3-C motif) ligand	LP	<i>Lamina propria</i>

MAdCAM	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1	RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted or Chemokine (C-C motif) ligand 5
MAL	MyD88 adaptor-like	CCL5	Regenerating islet-derived protein 3-alpha
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue	RCH	Recto-colite hémorragique
MAPK	MAP kinase	REG3α	Resistin-like protein
MAPKKK	MAP kinase kinase kinase	RELM	Retinoic acid inducible gene
MC	maladie de Crohn	RIG	RIG-I-Like receptor
MDP	Muramyldipeptide	RLR	Retinoid-related Orphan Receptor gamma t
MICI	Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin	RORγt	Reactive Oxygen Species
MICL	Inhibitory C-type lectin receptor in myeloid cells	ROS	Sphingosine-1-phosphate
MINCLE	Macrophage inducible Ca ²⁺ -dependent lectin receptor	S1P	Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease
MIP1α / CCL3	macrophage inflammatory protein 1-alpha	SES-CD	Protein Associated with TLR4
MIP3 / CCL20	Macrophage Inflammatory Protein-3	PRAT4	Pattern recognition receptor
MUC	Mucin	PRR	Proteines totales
MyD88	Myeloid differentiation protein 88	PT	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted or Chemokine (C-C motif) ligand 5
MΦ	Macrophage	RANTES	IgA sécrétoire
NCR	Natural cytotoxicity receptor	CCL5	Signal regulatory protein 1 α
NDFIP1	Nedd4 Family Interacting Protein 1	SIgA	
NEMO	NF- κ B Essential Modulator	SIRP1α	Secondary lymphoid-tissue chemokine
NF-κB	nuclear factor-kappa B	SLC/CCL21	Single nucleotide polymorphism
NK	Natural killer	SNP	Signal transducer and activator of transcription
NLR	NOD-Like receptor	STAT	T-box expressed in T cell
NOD	Nucleotide-binding and oligomerization domain	T-bet	TRAF Family Member-associated NF- κ B Activator
PAM	Peptide antimicrobien	TANK	T cell receptor
PAMP	Pathogen associated molecular patterns	TCR	Trefoil factor 3
PAS	Acide Periodic Schiff	TFF3	Lymphocyte T follicular helper
PDLIM2	PDZ And LIM Domain 2	Tfh	Transforming growth factor
pIgR	Polymeric Ig receptor	TGF	Lymphocyte T helper
PRAT4	Protein Associated with TLR4	Th	Toll/interleukin-1 receptor
PRR	Pattern recognition receptor	TIR	Trypsinogen-Like Immunoreactivity
PT	Proteines totales	TLI	Toll-Like receptor
		TLR	Tumor necrosis factor
		TNF	TNF Alpha Induced Protein 3
		TNFAIP3	

TRAF	TNF receptor associated factor
TRAL	TRIF-related adaptor molecule
Treg	Lymphocyte T régulateur
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TSLP	Thymic stromal lymphopietin
UCEIS	Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity
UNC93B1	Unc-93 homolog B1
USP4	Ubiquitin-specific protease 4
WSAVA	World Small Animal Veterinary Association
ZO	Zonula Occludens

Avant-propos

Les Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales (MICI) de l'homme regroupent la Maladie de Crohn (MC) et la recto-colite hémorragique (RCH). Ces maladies connaissent une augmentation importante de leur incidence et de leur prévalence dans les pays en voie de développement depuis les années 1990 (1). En France, Chouraki et *al.* rapportent une augmentation de l'incidence de la MC de 29% entre 1990 et 2007 dans la région Nord. Chez les 10 à 19 ans, l'incidence a augmenté de 71% pendant cette même période (2). L'origine exacte des MICI demeure inconnue mais de nombreux facteurs étiologiques sont identifiés : génétiques, microbiens, immunitaires, environnementaux ...

La MC et la RCH sont caractérisées par une réaction inflammatoire exubérante à l'origine de lésions digestives importantes et de signes cliniques invalidants. La prise en charge diagnostique et thérapeutique des MICI reste complexe avec un risque élevé de rechutes, des complications fréquentes et la nécessité d'un traitement au long cours (3). Dans ce contexte, l'élargissement de nos connaissances est nécessaire pour le développement de mesures préventives et/ou thérapeutiques efficaces.

Chez le chien, les MICI sont également une dominante en pathologie spontanée. Elles présentent certaines similitudes avec celles de l'homme et peuvent donc constituer des modèles en pathologie comparée.

Une des voies actuelles de recherche se focalise sur les interactions entre le système immunitaire et le microbiote intestinal. C'est dans cet axe que s'inscrit ce travail de thèse. La première partie fait un état des lieux de nos connaissances sur l'équilibre immunitaire au sein de la muqueuse intestinale. La seconde partie vise à analyser l'expression des récepteurs *Toll-Like* impliqués dans la reconnaissance de motifs bactériens chez le chien atteint de MICI et à évaluer la réponse humorale associée. La troisième partie est une discussion sur les résultats obtenus et ouvre des perspectives pour la poursuite de cette voie de recherche.

Etude bibliographique

I

IMMUNITE INTESTINALE

1 Anatomie digestive et régionalisation immunitaire

1.1 Structure et physiologie générale du tube digestif

L'appareil digestif des omnivores comme l'humain et le chien, comporte le tube digestif proprement dit et les organes digestifs accessoires. La longueur moyenne du tube digestif est de 4,5 m chez l'humain et varie de 1,5 à 4,5 m chez le chien selon le gabarit de l'animal. Il est constitué de la bouche, du pharynx, de l'oesophage, de l'estomac, de l'intestin grêle (successivement duodénum, jéjunum et iléon), du gros intestin (successivement caecum, côlon ascendant, côlon transverse, côlon descendant, et rectum) et de l'anus. Les organes digestifs accessoires sont les glandes salivaires, le pancréas, le foie et la vésicule biliaire (Figure 1). Comme le tube digestif est ininterrompu de la bouche à l'anus, sa lumière est en continuité avec l'environnement extérieur (4).

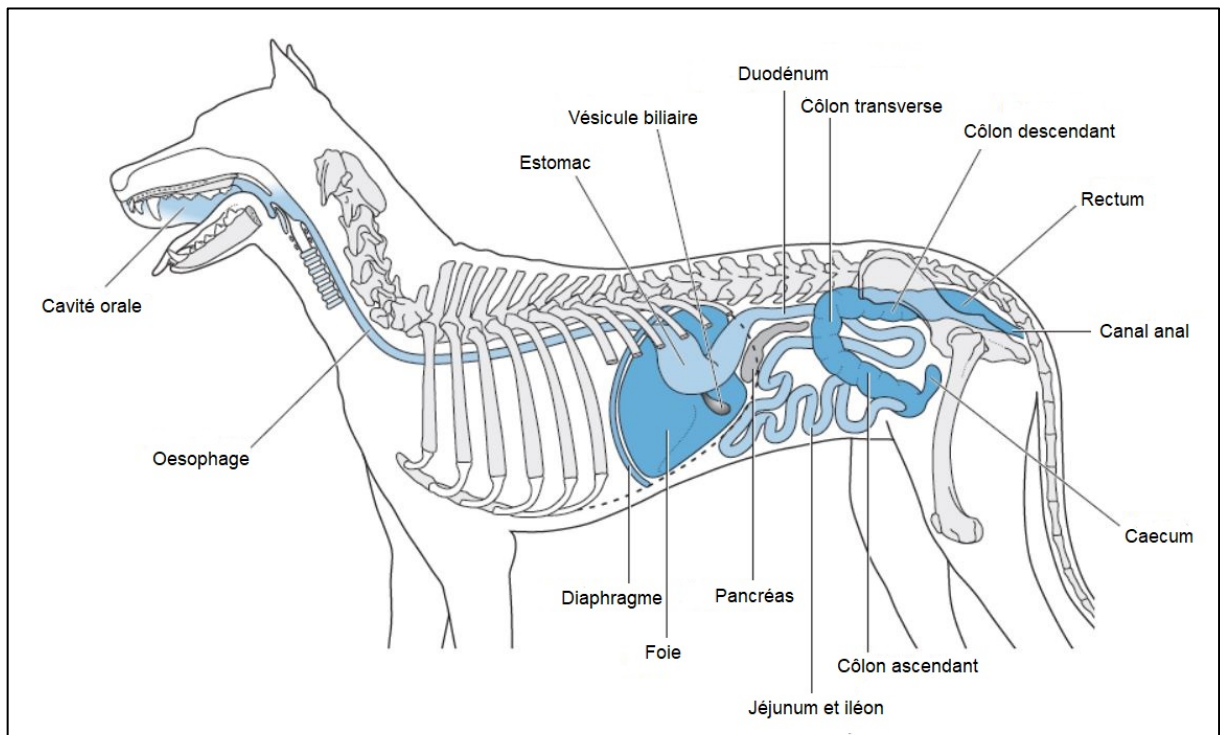


Figure 1: Anatomie générale du tube digestif du chien.

(Aspinall et Cappello, 2015 (4))

La paroi du tube digestif comporte quatre couches qui sont, de la lumière intestinale vers les couches plus profondes, la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (5). Au niveau de l'intestin, les caractéristiques de ces tuniques sont :

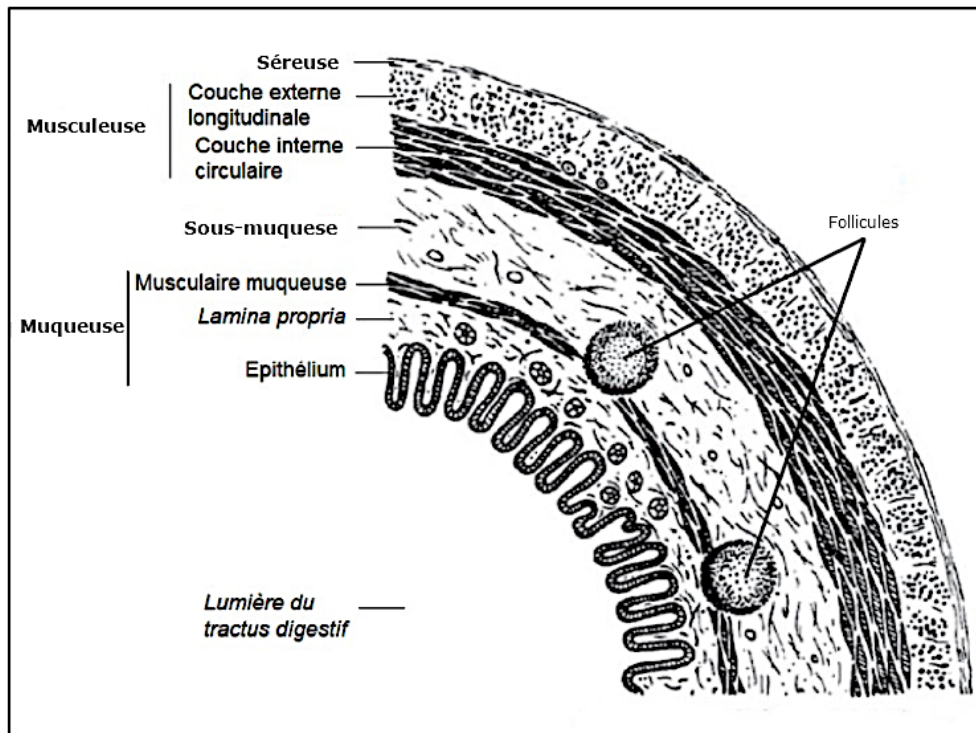


Figure 2 : Représentation schématique histologique d'une coupe transversale de l'intestin.

(Modifié d'après Eurelle et Frappier, 2006 (6)).

- La muqueuse est constituée d'une couche de cellules épithéliales cylindriques appelées entérocytes, d'un tissu conjonctif appelé *lamina propria* (ou chorion), des glandes de Lieberkhun et de la musculaire muqueuse.

Outre les entérocytes, plusieurs types cellulaires dont le rôle immunitaire est détaillé plus loin, sont observés : les cellules caliciformes, les lymphocytes T intra-épithéliaux, les cellules entéroendocrines, les cellules de Paneth, les cellules M et les cellules chimiosensibles (7). Dans le côlon, les cellules de Paneth sont absentes.

La *lamina propria* est le tissu conjonctif lâche situé sous l'épithélium. Elle possède un réseau vasculaire extrêmement dense ainsi que des cellules immunitaires fortement impliquées dans la reconnaissance des antigènes : lymphocytes, plasmocytes, macrophages et cellules dendritiques.

Dans l'intestin grêle, la base des villosités constitue les cryptes intestinales aussi appelées glandes de Lieberkühn. Elles sont constituées de cellules caliciformes, de cellules de Paneth, de cellules lymphoïdes et de cellules-souches qui permettent le renouvellement de l'épithélium. Dans le côlon, les villosités sont absentes mais on retrouve les cryptes constituées de cellules caliciformes, de cellules entéroendocrines, de cellules chimiosensibles et de cellules souches.

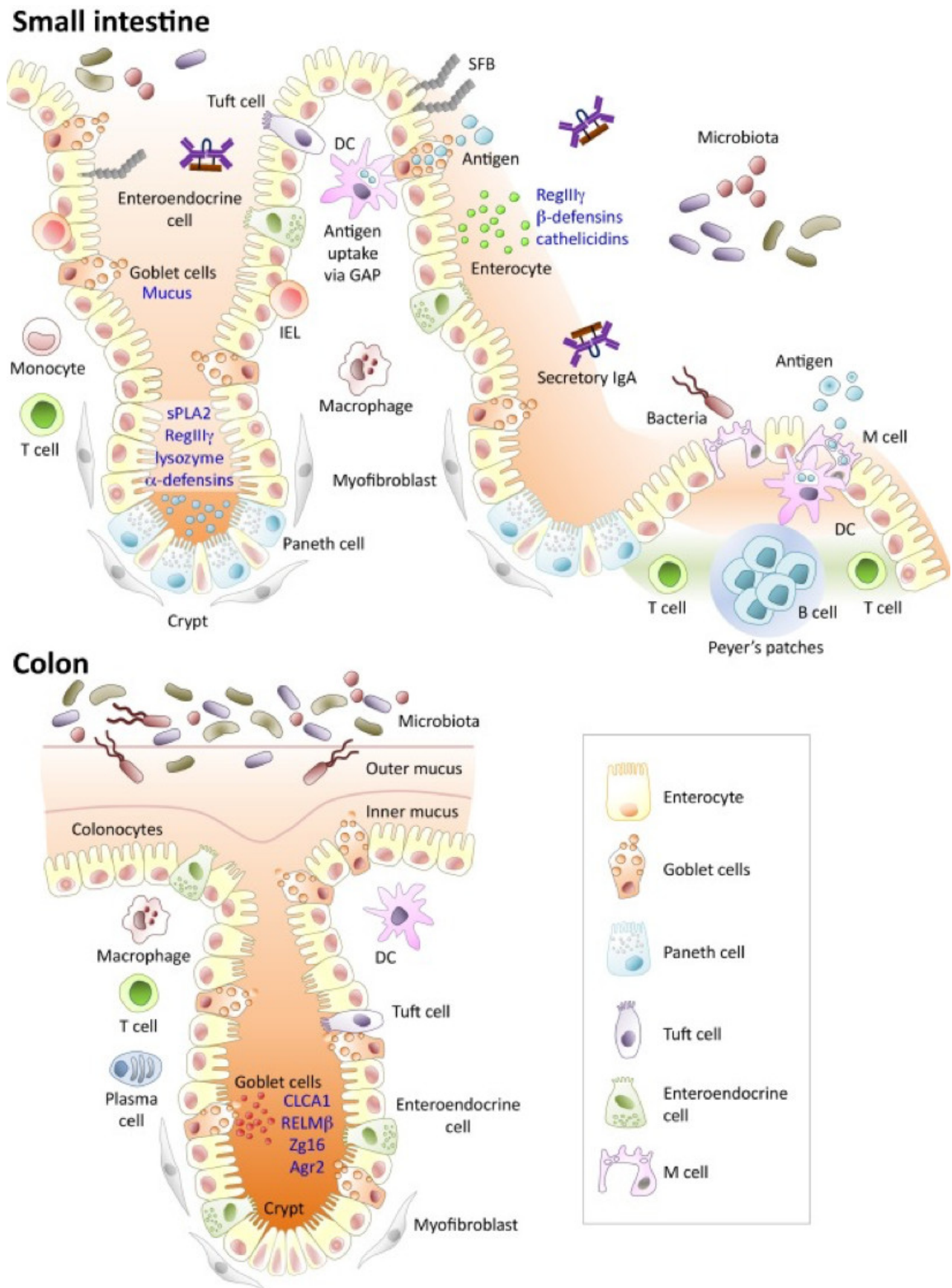


Figure 3 : Représentation schématique de la muqueuse intestinale grêle et colique avec les principaux constituants cellulaires impliqués dans l'immunité et les moyens de défense.

AMPs : antimicrobial peptides ; IESC : intraepithelial stem cell ; IEC : intestinal epithelial cell ; TFF3 : Trefoil factor 3 (Allaire et al., 2018 (8)).

- La sous-muqueuse est le prolongement de la *lamina propria* avec des plis circulaires, une riche vascularisation, un important plexus nerveux et des follicules lymphoïdes.
- La musculuse présente deux couches de fibres musculaires : une couche interne circulaire et une couche externe longitudinale.
- La séreuse est constituée d'un tissu conjonctif lâche et d'un mésothélium.

1.2 Fonctions de l'épithélium digestif

1.2.1 Caractéristiques générales

L'épithélium digestif forme le revêtement interne de l'ensemble du tube digestif et est au contact direct de la lumière digestive. Il occupe donc une position clé à l'interface entre le milieu extérieur et le milieu intérieur.

Une première fonction de l'épithélium digestif est de former une barrière protectrice entre le milieu extérieur très riche en agents microbiens et en antigènes alimentaires, et le milieu intérieur (9). Cette barrière est à la fois physique, chimique et immunitaire :

- Physique, grâce à la cohésion des cellules épithéliales et au mucus ;
- Chimique, grâce au pH du contenu, à la présence de détergents comme les sels biliaires, d'enzymes protéolytiques comme la trypsine, d'enzymes dégradant les parois comme les lysozymes et de molécules antibactériennes comme les défensines ;
- Immunitaire, grâce aux IgA sécrétoires et à la participation des cellules épithéliales à l'immunité innée et à leurs interactions avec le système lymphoïde annexé au tube digestif.

Le rôle des cellules épithéliales et de leur cohésion, celui du mucus, des IgA et des molécules anti-microbiennes est détaillé dans les sections suivantes.

L'épithélium digestif est également impliqué de manière directe dans le processus de digestion. Il facilite la progression du bol alimentaire, notamment par la sécrétion de mucus. Il participe à la dégradation des aliments en sécrétant dans la lumière digestive de nombreuses enzymes. Il joue un rôle essentiel dans l'absorption des nutriments, qu'il capte dans la lumière digestive puis transporte jusqu'au milieu intérieur. Enfin, il participe à la phase d'élimination des déchets en contrôlant les flux hydro-électrolytiques entre le milieu intérieur et la lumière digestive.

L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche de cellules dont la cohésion est assurée par plusieurs types de jonctions intercellulaires : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes (10) (cf. **Figure 4**).

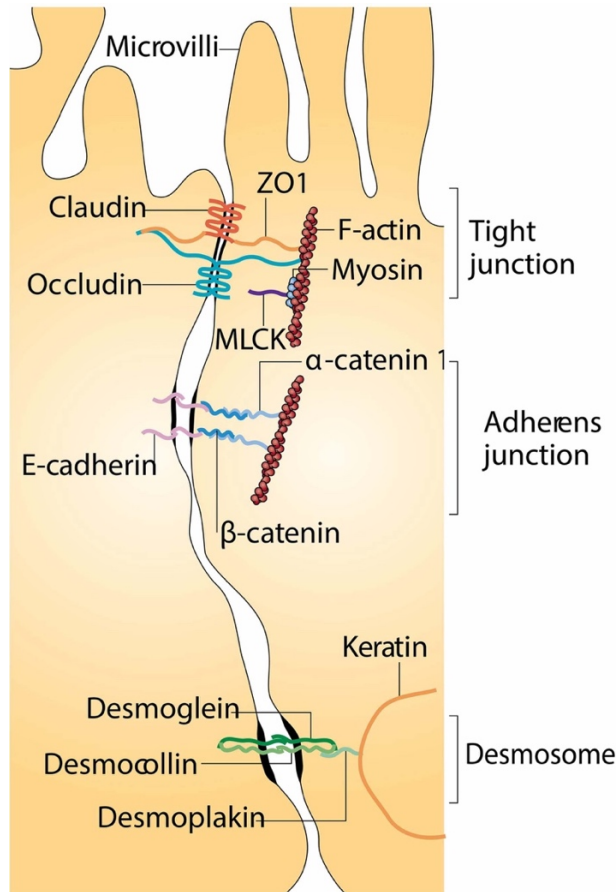


Figure 4 : Organisation des jonctions intercellulaires de l'épithélium intestinal.

La cohésion des cellules est assurée par plusieurs types de jonctions intercellulaires, telles que les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. Pour les jonctions serrées (Tight junction), la claudine et l'occludine interagissent avec les protéines Zonula Occludens (ZO)1 et ZO2 et l'actine du cytosquelette. Pour les jonctions adhérentes (Adherens junction), le segment intracellulaire de la E-cadhérine se lie, à la β ou à la γ -caténine. L' α -caténine s'associe ensuite à la β (ou γ)-caténine et fait le lien avec le réseau d'actine. Les desmosomes sont formés d'interactions entre la desmogléine, la desmocolline, la desmoplakine, la plakoglobine et les filaments de kératines du cytosquelette (Modifié d'après Turner, 2009 (11)).

1.2.2 Les complexes de jonctions

Les jonctions serrées se situent au pôle apical des cellules épithéliales et sont composées d'un complexe multiprotéique incluant des protéines transmembranaires de la famille des claudines. La claudine et l'occludine interagissent avec les protéines Zonula Occludens (ZO)1 et ZO2 et l'actine du cytosquelette (11).

L'occludine est une protéine membranaire avec un long domaine C-terminal qui interagit avec les protéines ZO. Ces dernières assurent le lien avec l'actine du cytosquelette (12). L'importance du rôle de l'occludine a été montrée dans différents modèles de souris délétées

pour le gène codant pour l'occludine où une importante augmentation de la perméabilité para-cellulaire aux macromolécules est observée (13).

Les claudines sont un groupe de protéines membranaires dont la portion extra-cellulaire établit des interactions homophiliques ou hétérophiliques avec les cellules adjacentes. Cette interaction crée une barrière ou des pores sélectifs. Leur rôle de barrière et de perméabilité sélective paracellulaire a également été montré dans des modèles de souris délétées pour les gènes codant pour les claudines (14).

Les jonctions adhérentes exercent plusieurs fonctions comme la stabilisation de l'adhésion entre cellules, la régulation du cytosquelette d'actine, la polarisation et la différenciation cellulaire, la régulation de la signalisation intracellulaire et de la transcription. Les jonctions adhérentes font intervenir des glycoprotéines transmembranaires de la superfamille des cadhérines comme la E-cadhérine pour les cellules épithéliales et des glycoprotéines de la famille des caténines comme la β -caténine, la p120-caténine et l' α -caténine (15). Le segment intracellulaire de la E-cadhérine se lie, au niveau du réticulum endoplasmique, à la β ou à la γ -caténine. L' α -caténine s'associe ensuite à la β (ou γ)-caténine et fait le lien avec le réseau d'actine (16).

Enfin, les desmosomes sont formés d'interactions entre la desmogléine, la desmocolline, la desmoplakine, la plakoglobine et les filaments de kératines du cytosquelette. Ce complexe fonctionnel permet le passage de protéines et de LPS bactérien mais ne permet pas le passage de bactéries entières (17).

1.3 Le tissu lymphoïde associé à l'intestin

1.3.1 Généralités

1.3.1.1 Les compartiments immunitaires

Le système immunitaire intestinal peut être schématiquement divisé en deux compartiments. Un premier compartiment dit « inducteur », où les réponses immunes intestinales sont initiées après stimulation antigénique, et un second compartiment dit « effecteur », où les cellules activées par l'antigène s'établissent après recirculation via le cycle hémolympatique. Les plaques de Peyer, les follicules lymphoïdes isolés et les nœuds (ou ganglions) lymphatiques mésentériques sont les principaux sites inducteurs ; l'épithélium intestinal et la *lamina propria* sous-jacente représentent les sites effecteurs (18).

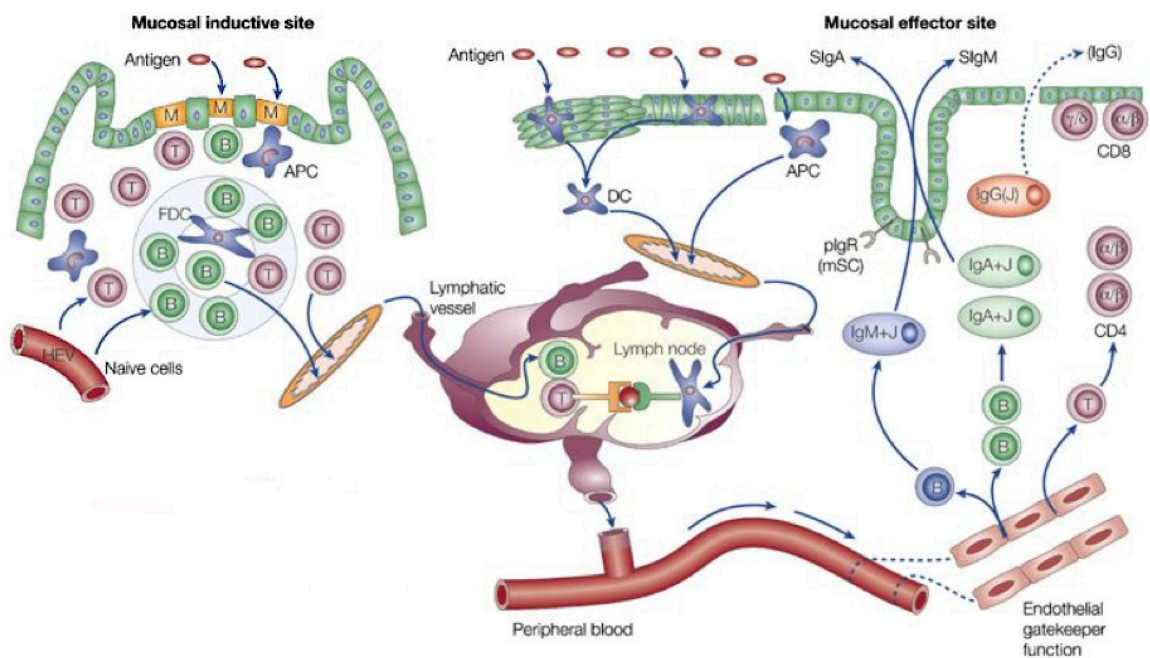


Figure 5 : Représentation du système immunitaire de la muqueuse.

Les sites inducteurs sont représentés à gauche par les plaques de Peyer, les follicules lymphoïdes et les nœuds lymphatiques. Les antigènes sont transportés activement vers les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes B) dans les nœuds lymphatiques. Après activation en lymphocytes T ou B à mémoire ou effecteurs, ils migrent dans la circulation générale jusqu'à extravasation aux sites effecteurs de la muqueuse grâce aux molécules d'adhésion vasculaire et aux chimiokines d'adressage. La lamina propria intestinale contient des lymphocytes T et quelques lymphocytes B, de nombreux plasmablastes et plasmocytes sécrétant des IgA et, dans une moindre mesure, des plasmocytes IgM⁺ et IgG⁺. Après passage épithélial, les IgA et IgM sécrétoires (SIgA et SIgM) sont représentées dans la lumière. Une faible quantité d'IgM atteint la lumière par voie paracellulaire. La distribution des lymphocytes intra-épithéliaux figure sur la représentation. APCs : cellule présentatrice d'antigènes ; DCs, cellule dendritique ; MALT : tissu lymphoïde associé aux muqueuses ; mSC : composé sécrétoire membranaire ; pIgR, polymeric Ig receptor ; SIgA, secretory IgA ; SIgM, secretory IgM (Modifié d'après Brandtzaeg et al., 2008 (18))

1.3.1.2 Fonctionnement général

La réponse immunitaire peut schématiquement être scindée en 2 types :

- La réponse immunitaire innée dont le rôle est d'assurer la défense contre un large spectre d'agents pathogènes. La réponse n'est pas spécifique et est assurée par les macrophages, les granulocytes neutrophiles et les cellules Natural Killer (NK).
- La réponse immunitaire adaptative dont le rôle est d'assurer la mémoire immunitaire d'un antigène déjà rencontré. La réponse est spécifique de l'antigène et est assurée par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les lymphocytes.

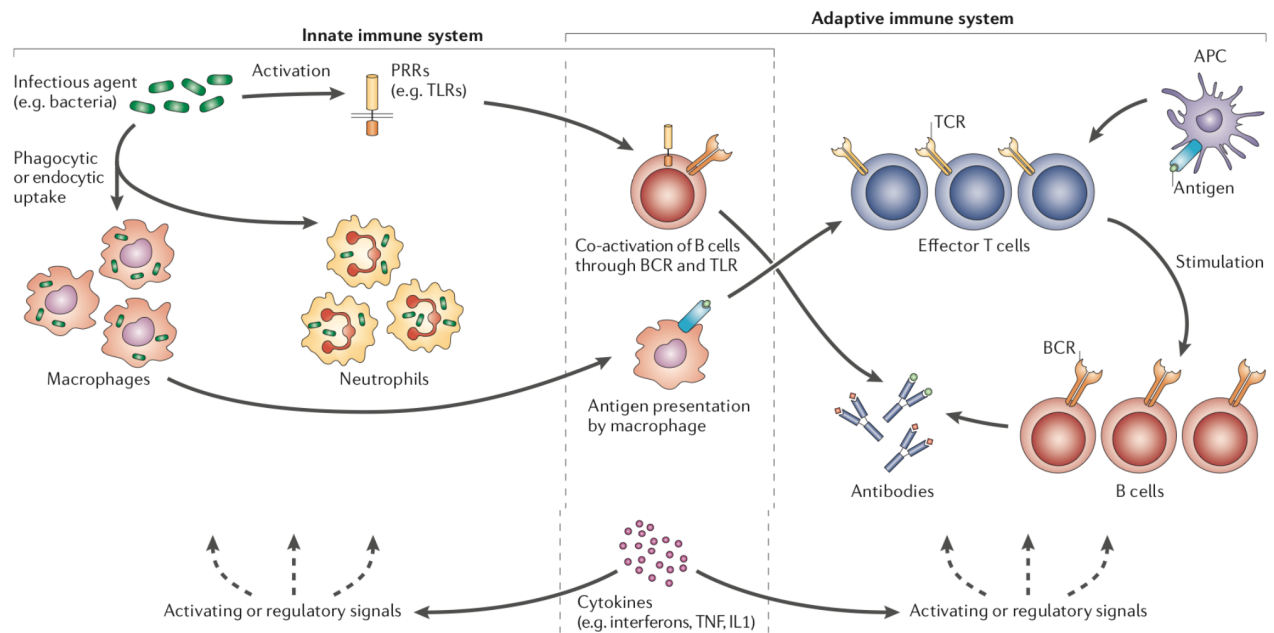


Figure 6 : Représentation schématique du fonctionnement général de la réponse immunitaire.

(Modifié d'après Gregersen et Behrens, 2006 (19)).

Les macrophages de la *lamina propria* assurent la phagocytose et l'élimination des bactéries commensales réussissant à franchir l'épithélium lorsqu'une perte de son intégrité survient (20).

En situation physiologique, le système immunitaire adaptatif permet l'établissement et le maintien de la tolérance vis-à-vis de la flore commensale, grâce notamment aux lymphocytes T régulateurs (T_{reg}). Parmi ces derniers, on distingue les :

- T_{reg} $CD4^+$ $FOXP3^+$ de la *lamina propria* de l'intestin grêle et du côlon,
- T_{reg} 1 ($Tr-1$) $CD4^+$ $FOXP3^-$ $IL-10^+$ localisés en position intra-épithéliale et dans la *lamina propria* de l'intestin grêle (21).

Les T_{reg} jouent un rôle majeur dans l'homéostasie intestinale, en produisant notamment des cytokines régulatrices telles que le TGF- β (Transforming growth factor beta) et l'IL-10. Le rôle joué par les T_{reg} et les cytokines qu'ils sécrètent est appuyé par les modèles animaux invalidés pour le gène codant pour l'IL-10 ou pour le TGF- β , qui développent une inflammation intestinale modérée lors du maintien en axénie. En revanche, l'inflammation est exacerbée lors de l'ensemencement du tube digestif par un microbiote normal (22). Ces observations expérimentales soulignent le rôle capital des T_{reg} et de l'IL-10 dans le contrôle de la réponse immunitaire vis-à-vis du microbiote intestinal. Certains produits bactériens issus de bactéries commensales, comme le polysaccharide A de *Bacteroides fragilis*, sont capables d'induire ces populations de T_{reg} (23).

Les cellules dendritiques (CDs) intestinales ont un rôle majeur dans la coordination de la réponse immunitaire adaptative et dans l'équilibre entre les différentes populations lymphocytaires. Les CDs, professionnelles dans la présentation d'antigènes, sont capables d'induire des réponses immunitaires adaptatives par présentation des antigènes aux lymphocytes T. Leur rôle est détaillé dans le paragraphe 2.2.

1.3.2 Les follicules lymphoïdes de l'intestin et les plaques de Peyer

L'intestin contient de très nombreux follicules lymphoïdes situés entre la muqueuse et la sous-muqueuse, parfois agrégés pour former les plaques de Peyer. Ces dernières sont principalement retrouvées dans l'intestin grêle (24). Elles constituent des organes lymphoïdes secondaires associés au tube digestif (Gut Associated Lymphoid Tissue ou GALT), sous-système du Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT). Elles sont impliquées dans l'échantillonnage d'antigènes présents dans la lumière intestinale et dans leur présentation au système immunitaire sous-jacent (25).

Les plaques de Peyer sont constituées d'un nombre variable de follicules B contenant un centre germinatif où s'activent et prolifèrent les lymphocytes B. Ceux-ci sont séparés par des zones inter-folliculaires impliquées dans l'activation des lymphocytes T. Les plaques de Peyer font directement saillie dans la lumière intestinale. L'épithélium associé aux follicules (FAE- Follicule associated epithelium) présente des caractéristiques particulières qui favorisent l'entrée des antigènes. Il est dépourvu de cellule caliciforme et présente des cellules M dispersées entre les entérocytes. Les villosités des cellules M sont de taille réduite et nettement moins nombreuses (cf. **Figure 8**).

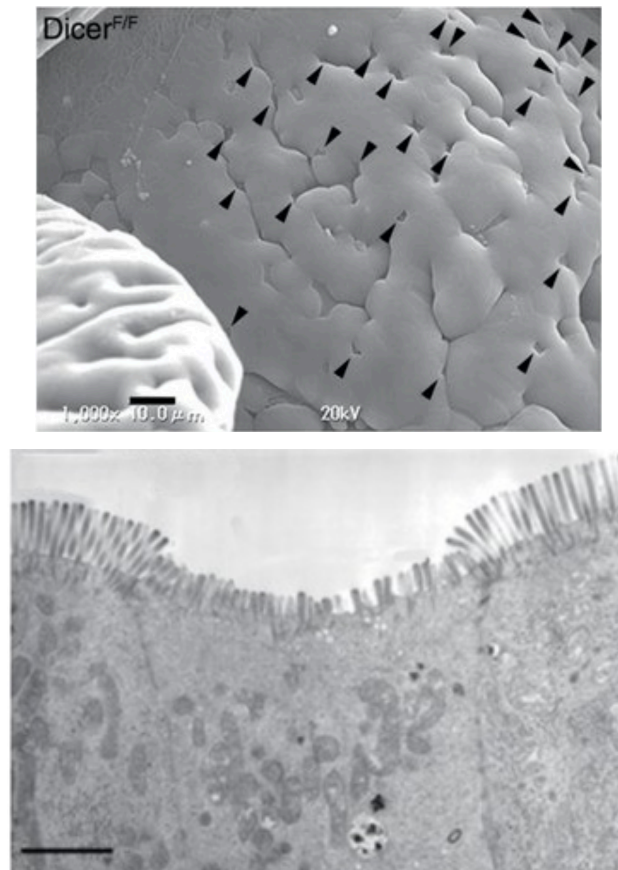


Figure 7 : Morphologie de l'épithelium associé aux follicules (FAE) en microscopie électronique.

(Gauche) Surface du FAE par microscopie électronique à balayage montrant la surface des entérocytes et de petites dépressions marquées par les pointes de flèche et qui correspondent aux cellules M. Echelle barre = 10 μm . (Droite) Photographie par microscopie électronique à transmission d'une cellule M (au centre) bordée par 2 entérocytes. La différence de taille et de densité des microvillosités est visible. Echelle barre=1,8 μm (Nakato et al., 2016 (26)).

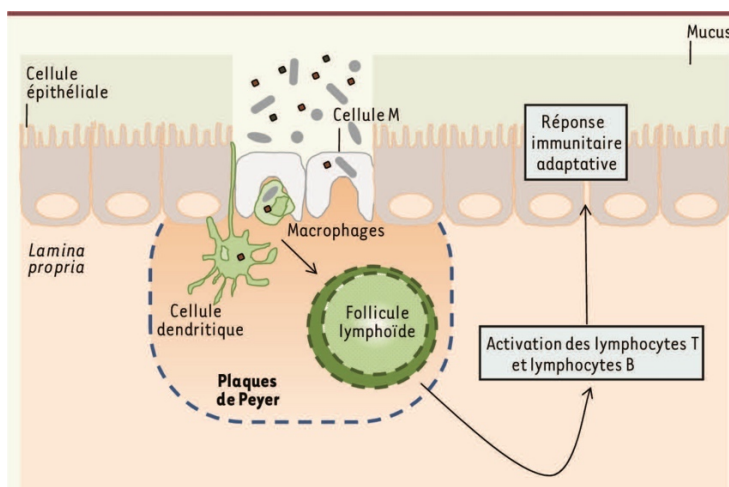


Figure 8 : Représentation schématique d'une plaque de Peyer.

L'échantillonnage antigénique réalisé par les cellules M permet, via les cellules présentatrices d'antigènes, la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative mettant en jeu les lymphocytes T et B (Chassaing et Darfeuille-Michaud, 2011).

L'entrée élective de nombreux antigènes intraluminaux, solubles ou particuliers, à travers l'épithélium des plaques de Peyer se fait par les cellules M (cellule « microfold ») (27). Ces cellules présentent de fortes capacités de transcytose. Les CD associées aux plaques de Peyer sont elles aussi capables de réaliser un échantillonnage antigénique par l'émission de protrusions passant à travers les cellules M (28). Les antigènes ayant pénétré au niveau des cellules M sont captés par les cellules présentatrices d'antigènes et initient une réponse immunitaire adaptative dans la muqueuse intestinale.

Les antigènes luminaux endocytés par les cellules M sont rapidement pris en charge par les CD de type CD103⁺ présentes dans la zone subépithéliale du dôme et qui expriment à leur surface les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et les molécules de co-stimulation CD80 et CD86. Leur activation se traduit par une forte augmentation de l'efficacité de présentation de l'antigène et par le remplacement du récepteur CCR6 par le récepteur CCR7. Ce dernier est un récepteur aux chimiokines MIP3b et SLC permettant la migration vers la zone T inter-folliculaire des plaques de Peyer. Les CD activent alors les lymphocytes T et B (29). Il a été suggéré par Schulz et *al.* que les antigènes captés hors des structures lymphoïdes par les CD CX3CR1⁺ seraient également transférés aux CD CD103⁺ présentes dans la *lamina propria* qui pourraient alors migrer directement vers les zones T des nœuds lymphatiques mésentériques (30).

Les lymphocytes B de la muqueuse intestinale se différencient préférentiellement vers la synthèse d'IgA. Le rôle du TGF- β et de l'IL-10 dans la commutation de classe des lymphocytes B vers les lymphocytes sécréteurs d'IgA a été démontré *in vitro* et *in vivo* chez la souris (cf. 3.3) (31). Le TGF- β est synthétisé par de nombreuses cellules dans l'intestin : épithélium, macrophages et CD, et certaines sous-populations de lymphocytes T. Les lymphocytes T et B IgA⁺ quittent les plaques de Peyer par le réseau lymphatique sous-séreux et gagnent les nœuds lymphatiques mésentériques (21). Ces formations lymphoïdes favorisent l'amplification des réponses initiées dans les plaques de Peyer et la différenciation des lymphocytes sensibilisés. Après un bref séjour dans ces nœuds lymphatiques, les lymphocytes rejoignent la circulation générale via le canal thoracique. Les lymphocytes récemment sensibilisés dans les tissus lymphoïdes intestinaux retournent préférentiellement dans la muqueuse intestinale grâce à l'expression d'intégrines qui se fixent à leur ligand constitutivement exprimé par la muqueuse intestinale (32,33). Ce cycle hémolymphatique

permet ainsi de redistribuer une réponse anticorps initiée dans le duodénum à l'ensemble de l'intestin. La **Figure 9** représente sous la forme d'un schéma l'ensemble du processus.

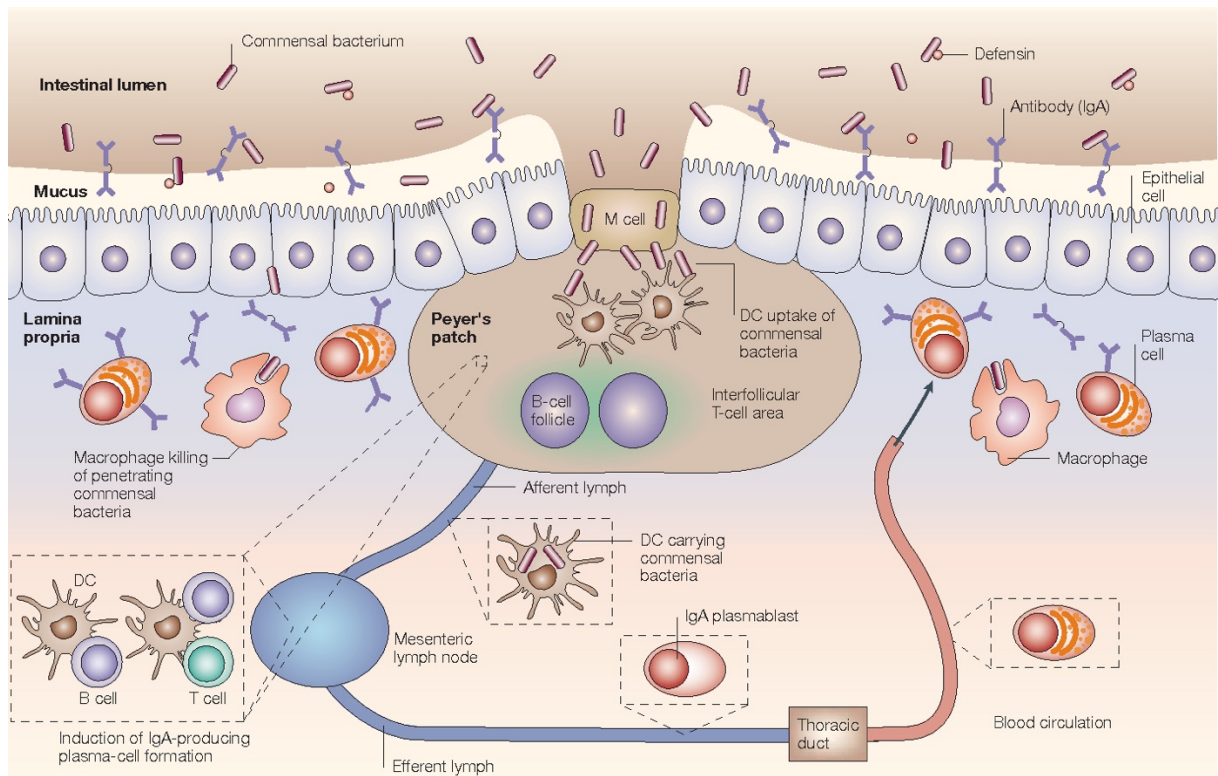


Figure 9 : Mécanismes de défense immunitaire contre les bactéries commensales du tube digestif.

Les bactéries qui traversent la barrière épithéliale sont rapidement éliminées par les macrophages présents dans la lamina propria. Les bactéries commensales peuvent aussi pénétrer par les cellules M des plaques de Peyer et être captées par les cellules dendritiques (CDs). Les CDs agissent comme cellules présentatrices d'antigènes et peuvent alors interagir avec les lymphocytes T et B et induire la formation de plasmocytes sécrétant les IgA ou migrer vers le nœud lymphatique mésentérique. Ce dernier agit comme une barrière que les CDs chargées de bactéries ne peuvent franchir. Après activation, les blastes B se différencient en plasmocytes. Ils peuvent quitter le nœud lymphatique via les canaux lymphatiques efférents, atteindre la circulation systémique par le canal thoracique et retourner vers la muqueuse intestinale où ils produisent les IgA. Ces IgA dimériques sont par la suite sécrétées dans la lumière intestinale (Macpherson et Harris, 2004 (29)).

Les mécanismes moléculaires qui assurent la sortie des lymphocytes activés des structures lymphoïdes vers le réseau lymphatique ne sont pas complètement élucidés et semblent impliquer la sphingosine-1-phosphate (S1P) dont le récepteur est exprimé à la surface des lymphocytes (34). Les mécanismes d'adressage vers le compartiment intestinal font intervenir l'expression sur les lymphocytes B et T de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et de la molécule

d'adressage CCR9 (35). Les CD⁺ CD103⁺, grâce à leur capacité à produire l'acide rétinoïque à partir du rétinol, induisent l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et de CCR9 sur les lymphocytes activés (36). L'interaction de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ avec MAdCAM-1 exprimé par l'endothélium des veinules post-capillaires de la *lamina propria* intestinale, participe à l'entrée des lymphocytes activés du sang vers le tissu. Par ailleurs, la sécrétion constitutive de CCL25 par l'épithélium intestinal, favorise le recrutement des lymphocytes dans le chorion intestinal par l'interaction CCL25-CCR9 (37).

Les lymphocytes intraépithéliaux répondent à un schéma d'activation différent des lymphocytes T conventionnels (cf. 2.3.2).

Ainsi, le système lymphoïde associé à l'intestin est étroitement lié à l'épithélium intestinal par de multiples interactions, tant dans le compartiment inductif que dans le compartiment effecteur de la réponse immunitaire intestinale. Ce système lymphoïde exerce une fonction de protection contre les pathogènes et une fonction de régulation de la réponse immunitaire sous l'effet des multiples antigènes luminaux.

2 Les acteurs cellulaires de l'immunité intestinale

2.1 Les macrophages intestinaux

Le nombre de macrophages (MΦ) aux différents étages de l'intestin semble être étroitement lié à la charge microbienne. Ils sont plus nombreux dans le côlon et moins abondants dans l'intestin proximal. Il a été démontré dans de nombreuses études que, contrairement aux MΦ d'autres tissus, les MΦ de la muqueuse intestinale ne répondent pas aux ligands des TLRs et ne sécrètent donc pas les cytokines ou les chimiokines pro-inflammatoires habituelles (38). Ils ne régulent pas non plus les molécules co-stimulatrices ni ne génèrent la production d'espèces oxygénées radicalaires (ROS) ou de monoxyde d'azote (NO) (38). Cependant, ils synthétisent de manière constitutive l'IL-10 aux propriétés anti-inflammatoires (39). En outre, les MΦ intestinaux expriment le récepteur CD36 qui est impliqué dans la phagocytose des cellules apoptotiques (38). Ils présentent également une forte activité bactéricide sans initiation d'inflammation manifeste, permettant aux MΦ locaux d'agir comme pare-feu contre toute bactérie commensale. Ils expriment des récepteurs à reconnaissance de forme (PRR- Pattern recognition Receptor) membranaires et cytosoliques qui sont cruciaux pour leur activité antibactérienne (40). En outre, les MΦ intestinaux régulent activement l'intégrité épithéliale comme démontrée chez la souris où la déplétion en macrophages augmente la gravité des lésions dans un modèle de colite (41). La sécrétion constitutive de l'IL-10 par les MΦ est un élément déterminant de l'homéostasie immunitaire intestinale comme en témoigne l'apparition de colite spontanée chez la souris déficiente en IL-10 (22) (cf. **Encadré 3**).

2.2 Les cellules dendritiques intestinales

Les cellules dendritiques (CD) sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Elles peuvent initier la réponse immunitaire primaire en activant les lymphocytes T naïfs et réguler les réponses immunitaires proinflammatoires ou tolérogènes (42). Les CDs sont impliquées dans la polarisation des lymphocytes T en lymphocytes T helper 1 (Th1), lymphocytes T helper 2 (Th2) ou lymphocytes Treg selon le profil cytokinique sécrété en réponse à l'exposition à un ligand. Dans des conditions physiologiques, les CDs ont un rôle régulateur en limitant la réponse immunitaire contre les antigènes alimentaires et microbiens (42). Elles sécrètent divers signaux comme l'IL-10, le TGF-β et l'acide rétinoïque. En présence d'acide rétinoïque, les CDs intestinales favorisent la différenciation des lymphocytes Treg naïfs en

lymphocytes Treg inductibles (iTreg) qui sécrètent des cytokines telles que le TGF- β et l'IL-35 aux propriétés inhibitrices de la réponse lymphocytaire (43).

Plusieurs sous-populations de CD ont été décrites dans la *lamina propria* :

- Les CD CX3CR1⁺ émettent des protrusions transépithéliales et réalisent un échantillonnage d'antigènes de la lumière intestinale (44). Ce mécanisme nécessite l'interaction de CX3CR1 avec son ligand CX3CL1/fractalkine, situé sur les cellules épithéliales. Les CD forment des jonctions serrées avec les entérocytes adjacents ce qui permet de conserver l'intégrité de l'épithélium intestinal (45).
- Les CD CD103⁺ ont quant à elles la capacité de migrer aux nœuds lymphatiques mésentériques et d'induire des réponses régulatrices (46) (cf. 0)
- Par ailleurs, les CD CCR6⁺ sont chargées en lysozyme et sont associées au dôme des plaques de Peyer. Elles effectuent également un échantillonnage des éléments de la flore commensale (28).

2.3 Les lymphocytes T intestinaux

Avec les M Φ , les lymphocytes T sont l'un des leucocytes les plus abondants dans la muqueuse et sont des acteurs importants de l'immunité intestinale. Selon leurs voies de développement et de maturation, les lymphocytes T intestinaux peuvent être divisés en deux groupes (cf. **Tableau 1**).

- Le groupe "conventionnel" (ou type a) exprime le TCR $\alpha\beta$ avec les corécepteurs CD4 ou CD8 $\alpha\beta$. Ce groupe est retrouvé dans le compartiment intraépithélial et dans la *lamina propria*.
- Le groupe "non conventionnel" (ou type b) exprime soit le TCR $\alpha\beta$ ou le TCR $\gamma\delta$ et typiquement l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$. Ce groupe est essentiellement retrouvé dans le compartiment intraépithélial.

Tableau 1 : Les deux grands groupes de lymphocytes T intestinaux.
(D'après Ma et al., 2019).

	Conventionnel (type a)	Non conventionnel (type b)
Marqueur	TCR $\alpha\beta^+$, CD4 $^+$ ou CD8 $\alpha\beta^+$	CD8 $\alpha\alpha^+$, TCR $\alpha\beta^+$ ou TCR $\gamma\delta^+$
Localisation intestinale	Intraépithéliale et <i>lamina propria</i>	Essentiellement intraépithéliale
Fonctions	Défense anti-infectieuse (lymphocytes T cytotoxiques, Th1, Th2 et Th17), effets proinflammatoires (Th17), tolérance (Tregs)	Régulation immunitaire, défense anti-infectieuse, tolérance, détection des auto-antigènes
Développement et maturation	Développement dans le thymus, circulation systémique et migration vers les GALTs, activation par antigène et adressage vers l'intestin	Sélectionnés dans le thymus et dirigés directement vers l'intestin

Le développement et la maturation des lymphocytes T intestinaux ont été récemment revus par Ma *et al.* (Figure 10).

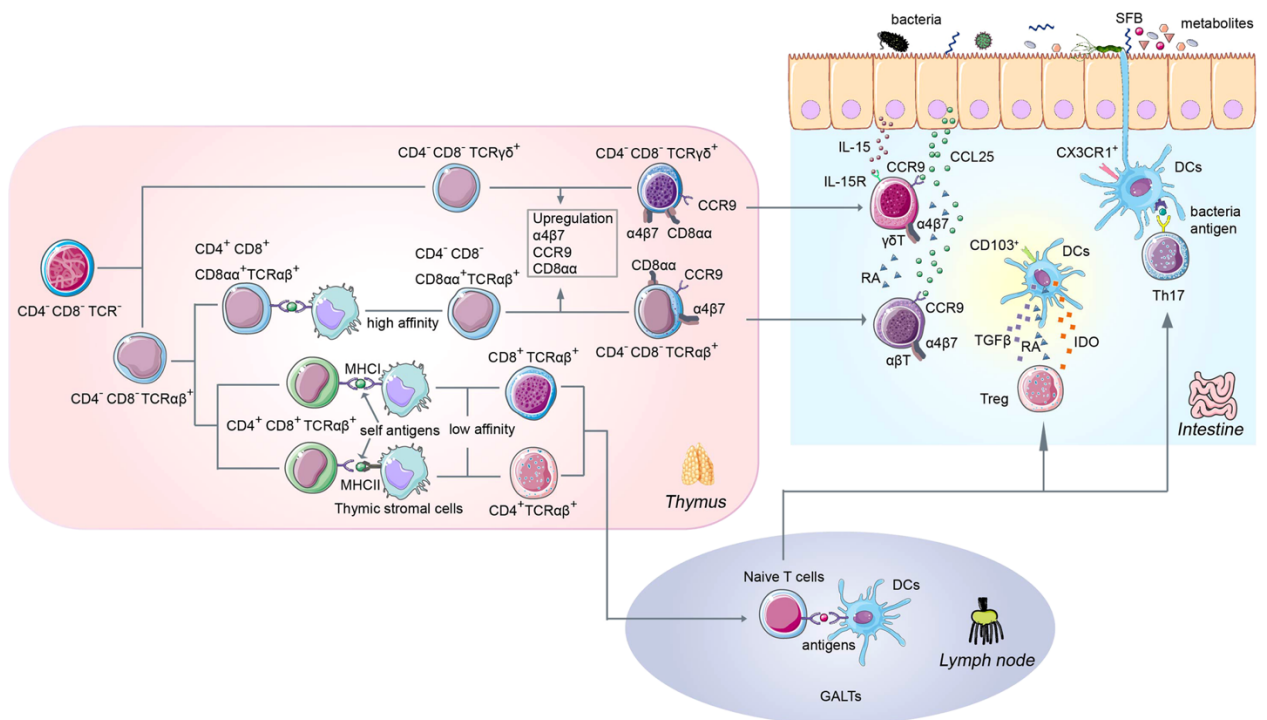


Figure 10 : Développement et maturation des lymphocytes T intestinaux.

Les lymphocytes T conventionnels sont dérivés des progéniteurs thymiques doubles négatifs $CD4^- CD8^-$ et acquièrent une simple positivité $CD4^+$ (MHC I) ou $CD8^+$ (MHC II). Ces cellules migrent alors vers les organes du GALT où ils rencontrent des antigènes et acquièrent un phénotype effecteur et une orientation migratoire vers l'intestin. En parallèle, les progéniteurs thymiques triples négatifs ($CD4^-$, $CD8^-$ et TCR^-) se différencient en précurseurs doubles négatifs ($CD4^-$ et $CD8^-$) et $TCR\gamma\delta^+$ ou $TCR\alpha\beta^+$. Les précurseurs $TCR\alpha\beta^+$ acquièrent leur phénotype effecteur avec les auto-antigènes présentés par les cellules stromales thymiques. L'expression des molécules d'adressage comme l'intégrine $\alpha4\beta7$, le $CCR9$, et le $CD8\alpha\alpha$ guide les lymphocytes $TCR\gamma\delta^+$ ou $TCR\alpha\beta^+$ vers l'intestin. Les lymphocytes T sont attirés par la chimiokine $CCL25$ exprimée par les cellules épithéliales intestinales. Dans l'intestin, l'abondance des antigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigènes finalise la spécialisation fonctionnelle des lymphocytes T. Des facteurs sécrétés par les cellules intestinales comme l' $IL-15$ et l'acide rétinoïque favorisent le maintien des lymphocytes T dans le compartiment intestinal (Ma *et al.*, 2019 (47)).

2.3.1 Les lymphocytes T conventionnels

Les lymphocytes T de la *lamina propria* sont dérivés de cellules T conventionnelles (type a) et subissent leur maturation dans le thymus et leur activation dans les organes lymphoïdes secondaires.

Chez l'homme comme chez la souris, la spécialisation fonctionnelle des populations effectrices T CD4⁺ conduit à leur différenciation en lignées T dites helper (Th) (pour auxiliaire) présentant des profils distincts de sécrétion de cytokines. La différenciation de chacune des lignées Th est définie et contrôlée par un unique facteur de transcription qui régule la production des cytokines (cf. *Figure 11*) (48).

- Les cellules Th1 produisent principalement de l'IFN γ . Grâce à leurs caractéristiques fonctionnelles, les cellules Th1 activent les fonctions bactéricides des M Φ et peuvent détruire les cellules infectées. Elles sont efficaces dans le contrôle des pathogènes intracellulaires.
- Les cellules Th2 produisent essentiellement de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 et favorisent la commutation isotypique et la production d'IgG, IgE et IgA qui sont importantes dans le contrôle de certains pathogènes extracellulaires et des helminthes.
- Les cellules Th17 produisent l'IL-17F, l'IL-17A, l'IL21, l'IL22 et l'IL26. Les IL-17F et A sont des cytokines proinflammatoires qui, selon la cellule cible, induisent l'expression de cytokines inflammatoires (IL-6, TNF- α , IL-1 β) et de chimiokines (IL8, CXCL1, CXCL10).
- Les cellules Treg sécrètent les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β .
- Les cellules T folliculaires régulatrices (Tfh) sont situées dans les zones B des organes lymphoïdes secondaires en interactions étroites avec les cellules B. Dans les plaques de Peyer, les cellules Tfh régissent la prolifération des cellules B et la production d'IgA *via* la sécrétion de l'IL-21 et l'expression du ligand de CD40 (49).

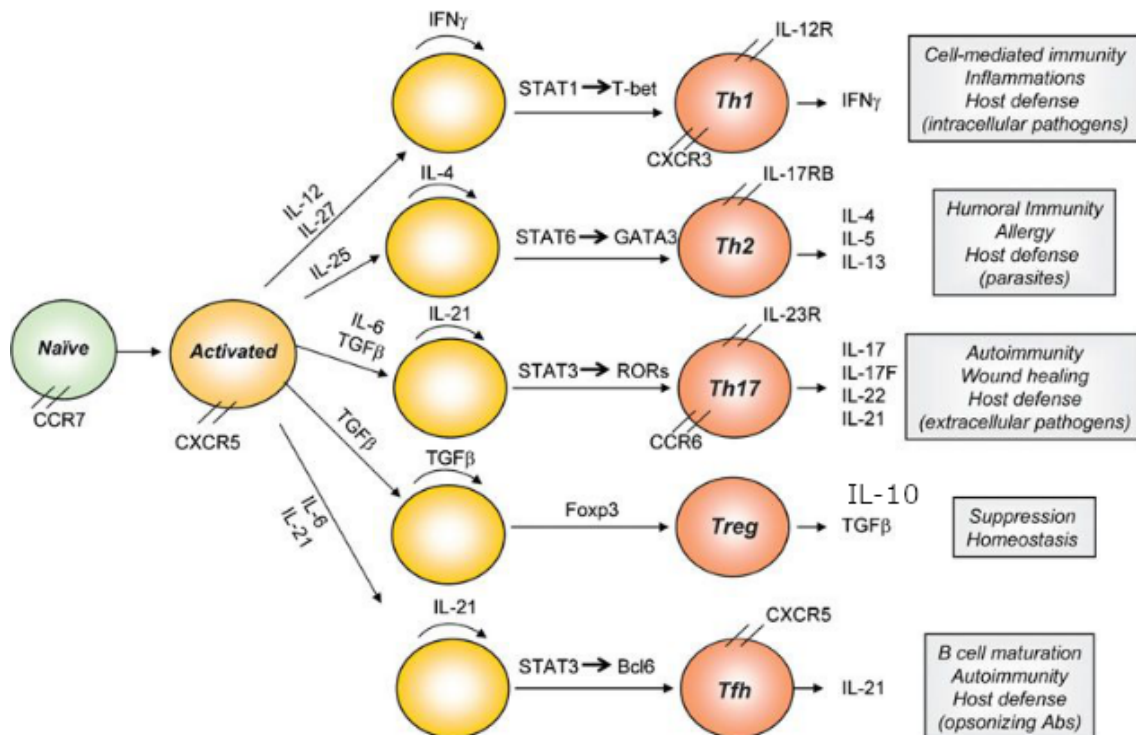


Figure 11 : Différenciation des lymphocytes effecteurs T helper.

Après rencontre avec un antigène présenté par une cellule présentatrice d'antigène, les lymphocytes T CD4⁺ se différencient en cellules effectrices (T helper 1, T helper 2, T helper 17, T régulateur et T folliculaire régulateur) caractérisées par leur production cytokinique, leur expression de facteur de transcription et de récepteur aux cytokines et leur fonction immunitaire (Nurieva et Chung, 2010 (50)).

L'orientation préférentielle vers les profils Th1 ou Th17 reflète la mise en place dans le compartiment intestinal d'une « inflammation physiologique ». Ces réponses sont régulées par les populations de lymphocytes Treg capables d'inhiber l'activation des cellules Th1 et Th17, notamment via la sécrétion de l'IL-10 et du TGF- β (51). Par ailleurs l'orientation des lymphocytes T CD4⁺ vers un profil particulier de sécrétion est dépendant des cytokines présentes dans le milieu environnant. Ces cytokines sont alors capables d'activer ou d'inhiber les facteurs de transcription conditionnant ainsi l'orientation Th de la cellule.

La mise en place de cette « inflammation physiologique » est dépendante du microbiote intestinal car il apparaît que la colonisation microbienne de souris axéniques immunocompétentes par un microbiote murin conventionnel est capable de rétablir les différents profils Th1, Th17 et Treg (52). Il ressort également que la colonisation microbienne intestinale influence le recrutement et l'activation des différentes populations de CD⁺ et de macrophages. Ces cellules de l'immunité innée activées par les signaux

microbiens *via* les PRRs (cf. 3.4), sont capables d'exprimer les molécules de co-stimulation CD80/CD86 mais également de sécréter des cytokines contribuant à orienter les réponses des lymphocytes T CD4⁺ (53).

2.3.2 Les lymphocytes T non-conventionnels

La majorité des lymphocytes intraépithéliaux (IEL-IntraEpithelial Lymphocyte) de l'intestin sont des lymphocytes T activés porteurs soit de TCR $\alpha\beta$ soit de TCR $\gamma\delta$, ces derniers pouvant représenter jusqu'aux deux-tiers des IEL retrouvés dans ce compartiment. Une forte proportion des IEL expriment CD8 sous forme d'un homodimère CD8 $\alpha\alpha$ et contiennent dans leur cytoplasme des granules à activité cytotoxique (47).

De façon remarquable, les souris axéniques présentent une réduction des populations d'IEL TCR $\alpha\beta$ ⁺ et TCR $\gamma\delta$ ⁺ par rapport aux souris conventionnelles, suggérant un rôle de la colonisation microbienne intestinale sur l'établissement de ces populations lymphocytaires dans l'épithélium. Cette hypothèse est confortée par le fait que la colonisation de souris axéniques adultes avec un microbiote conventionnel induit l'expansion d'IEL TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD8 $\alpha\alpha$ ⁺, jusqu'à des niveaux équivalents à ceux retrouvés chez les souris conventionnelles (54). Les mécanismes à l'origine de l'établissement de ces populations d'IEL dans l'intestin en réponse à la colonisation bactérienne ne sont pas encore établis.

2.4 Les cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (ILC-Intestinal Lymphoid Cell) ont été identifiées assez récemment. Elles se distinguent des lymphocytes B et T par l'absence de récepteur de l'antigène. Il existe de fortes similarités entre les ILC et les lymphocytes T conventionnels activés en raison des facteurs de transcription exprimés et des cytokines produites. Une nomenclature similaire à celle des lymphocytes T auxiliaires est utilisée pour les ILC (55).

- Les ILC de type 1 (ILC1) comme les Th1, expriment le facteur de transcription T-bet (*T-box expressed in T cells*) et sécrètent de l'IFN- γ ; les cellules NK font partie des ILC1.
- Les ILC de type 2 (ILC2) comme les lymphocytes Th2, expriment le facteur de transcription GATA-3 (*GATA binding protein 3*) et sécrètent l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-9 et l'IL-13.

- Les ILC de type 3 (ILC3) comme les lymphocytes Th17/Th22, expriment le facteur de transcription ROR γ t et sécrètent de l'IL-17 et/ou de l'IL-22. Les cellules inductrices des tissus lymphoïdes (LTi-lymphoid tissue inducer cells) font partie des ILC3 (55). Les ILC3 forment en fait un groupe hétérogène dont les membres se distinguent par l'expression des récepteurs activateurs NCR (*natural cytotoxicity receptors*). On différencie ainsi les ILC3 NCR⁺ qui expriment à leur surface la protéine NKp46 chez la souris, et NKp44 chez l'homme, des ILC3 NCR⁻ qui n'expriment pas de NCR à leur membrane.

La **Figure 12** présente les 3 grandes familles d'ILC.

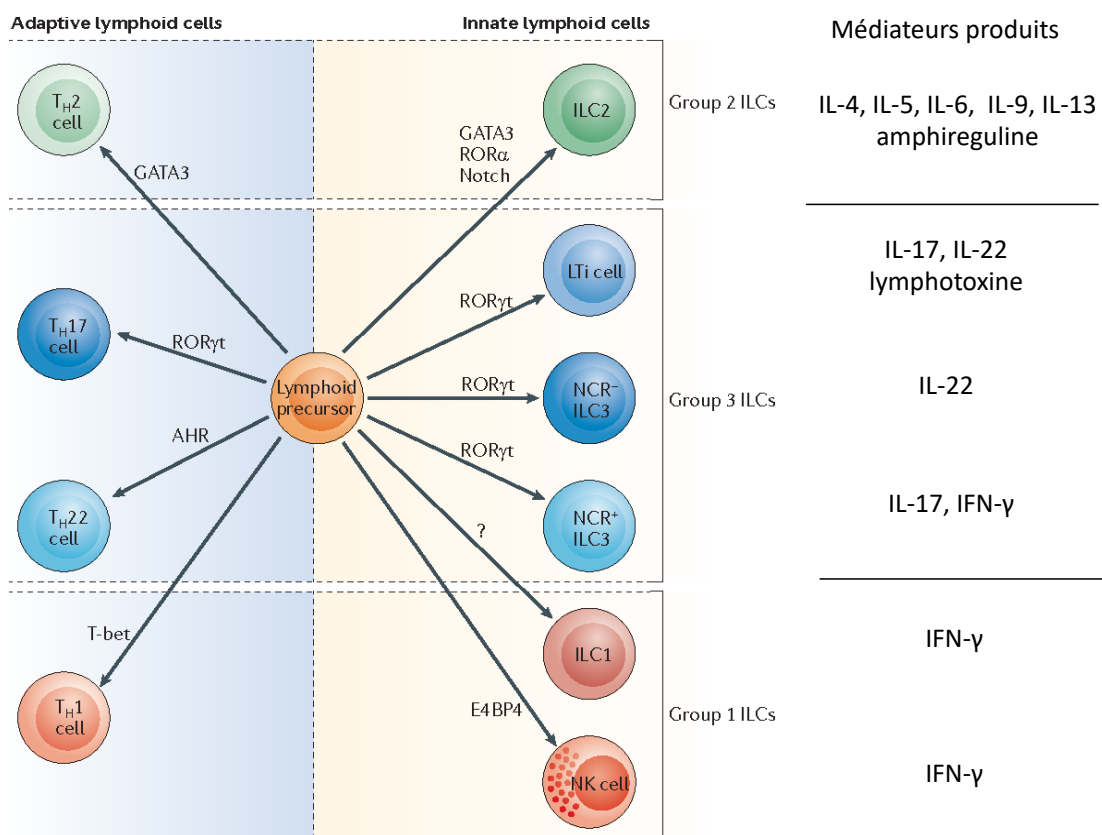


Figure 12 : Présentation des populations de lymphocytes T auxiliaires (Th) et des cellules lymphoïdes innées (ILC).

Les 2 populations sont représentées en parallèle selon leur production cytokinique et leur facteur de transcription. AHR, récepteur aux hydrocarbures aromatiques ; E4BP4, protéine 4 de liaison au promoteur E4 (Modifié d'après Walker et al., 2013 (55)).

Comme pour les lymphocytes T, on distingue les ILC cytotoxiques (les NK) des ILC auxiliaires (ILC1, ILC2 et ILC3). Il existe toutefois une certaine plasticité cellulaire qui permet à certaines ILC de réorienter leurs sécrétions cytokiniques selon le microenvironnement (56).

Dans l'intestin, les ILC1 sont la source innée prédominante d'IFN- γ en réponse à l'IL-12 (57). Cette production d'IFN- γ est nécessaire pour la formation du mucus (cf. 3.1). Les ILC1 participent ainsi à la barrière intestinale (58).

Les ILC3 sont activées par l'IL-23 et l'IL-1 β produites par les CDs lors d'une infection par des microbes extracellulaires. Elles sécrètent de l'IL-17 et de l'IL-22 qui favorisent le recrutement des granulocytes neutrophiles et la libération de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales (cf. 3.2) (59). L'IL-22 joue un rôle important dans l'homéostasie entre l'organisme et les bactéries du microbiote comme en témoigne la publication de Sonnenberg *et al.* qui montre que des bactéries commensales du microbiote intestinal disséminent dans l'organisme induisant une inflammation systémique lors de déplétion en ILC. La dissémination bactérienne et l'inflammation systémique sont contrées par l'administration d'IL-22 (60). Cette dernière n'est pas la seule cytokine produite par les ILC3 pouvant avoir un rôle protecteur. Ces cellules sécrètent également des lymphotoxines qui induisent la production d'IgA par les lymphocytes B de l'intestin (61). Certaines ILC3 qui expriment les antigènes du CMH II pourraient limiter l'activation des lymphocytes T CD4⁺ de la *lamina propria* spécifiques du microbiote lors d'une infection intestinale. En effet, l'inactivation expérimentale des gènes codant les molécules du CMH II dans les ILC3 rend les animaux plus sensibles à la colite médiée par l'activation des lymphocytes T (62).

2.5 Les cellules caliciformes

Egalement appelées cellules à mucus, les cellules caliciformes sont fortement polarisées et disséminées entre les entérocytes dans l'ensemble de l'épithélium intestinal. Atteignant 10 à 15% de la population cellulaire totale de l'épithélium duodéal, la proportion de cellules caliciformes augmente progressivement pour s'élever à 24% dans le côlon distal (63). Le noyau des cellules est en position basale et est surmonté de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique rugueux et volumineux, ainsi que de nombreuses mitochondries. Cette région supranucléaire est le site de la biosynthèse des mucines. La zone apicale révèle quant à elle une quantité importante de granules de sécrétion (cf. **Figure 13**). Ces granules renferment les mucines (64). Les cellules caliciformes se caractérisent également par la présence d'une thèque dont le rôle est primordial pour la sécrétion des grains de mucus par exocytose. La thèque est une structure de soutien qui permet d'isoler les granules de la membrane plasmique et de la région golgienne (65).

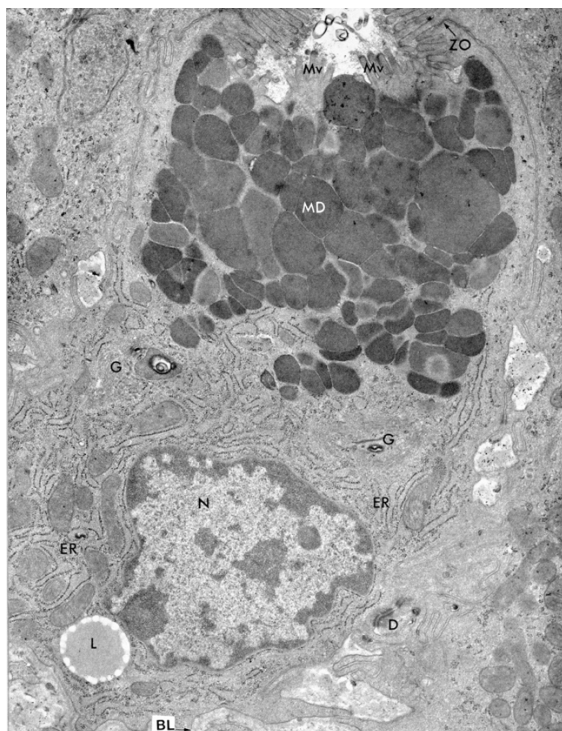


Figure 13 : Ultrastructure d'une cellule caliciforme en microscopie électronique à transmission.

La partie apicale est remplie de granules (MD) qui renferment des mucines de type MUC2 et d'autres peptides protecteurs. Le noyau (N) est en position basale et entouré d'un abondant reticulum endoplasmique (ER). Des éléments de l'appareil de Golgi sont également visibles (G). Des inclusions lipidiques sont fréquentes (L). Une jonction serrée (ZO) et un desmosome (D) sont également visibles en partie apico-latérale et baso-latérale, respectivement. La partie basale de la cellule est en contact avec la lame basale (BL) (D'après Porter et Bonneville p. 54 (66))

Les cellules caliciformes sécrètent de manière constitutive MUC2, présent dans la couche externe de mucus (cf. 3.1). Face à une stimulation nociceptive luminale, l'exocytose peut être massive libérant MUC2 et les autres facteurs de protection contenus dans les granules. Les mécanismes conduisant à cette libération active des granules sont encore mal connus. Toutefois, il a été montré que l'exposition à des produits bactériens ou à des cytokines comme l'IL-22 ou l'IFN- γ provoque cette exocytose (67,68).

Outre leur rôle dans la sécrétion des mucines, les cellules caliciformes libèrent également des molécules impliquées dans la protection et la réparation de la muqueuse comme le Trefoil Factor 3 (TFF3) et la resistin-like (RELM) β (69,70). L'action bactéricide Gram-négatif de RELM β a récemment été montrée chez la souris et l'humain (71).

Par ailleurs, les cellules caliciformes présentent la capacité de prélever des antigènes de la lumière intestinale par endocytose et de les livrer aux CPA de la *lamina propria*. Les cellules caliciformes jouent ainsi également un rôle dans la réponse immunitaire adaptative (72).

2.6 Les cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines (CEE) représentent moins de 1% des cellules de l'épithélium. Elles sont disséminées tout au long du tractus gastro-intestinal et se distinguent par leur

localisation le long du tube digestif et par la nature des hormones ou des peptides qu'elles secrètent. Elles sont caractérisées par une morphologie particulière en forme de poire, dont la base est tournée vers le milieu intérieur (cf. **Figure 14**). Au pôle apical, elles présentent des microvillosités où sont localisés des récepteurs capables de détecter le contenu luminal de l'intestin et d'induire une réponse adaptée par la production et la sécrétion d'une ou plusieurs hormones au pôle basolatéral (73).

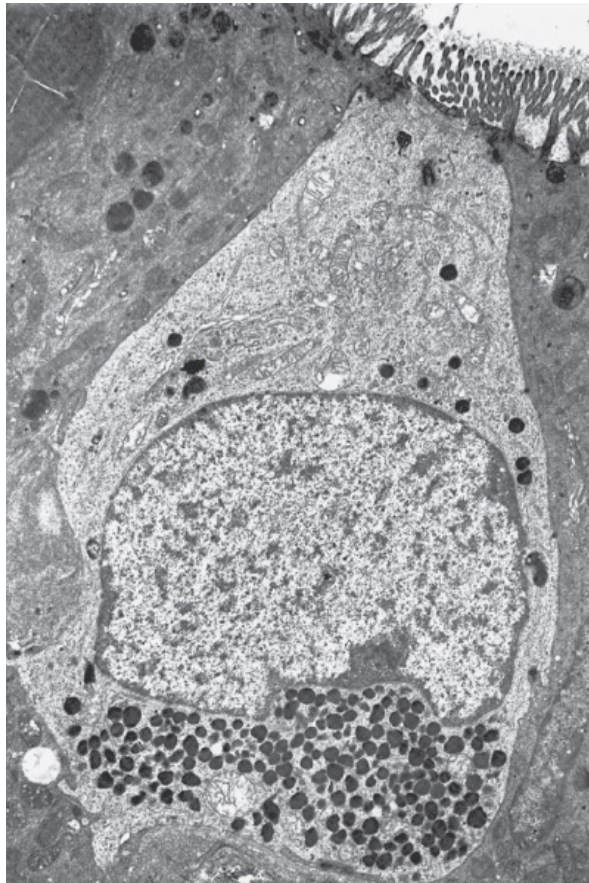


Figure 14 : Ultrastructure d'une cellule entéroendocrine en microscopie électronique.

La partie apicale montre des microvillosités en contact avec la lumière intestinale. La membrane apicale présente des récepteurs capables d'induire la transduction intra-cellulaire du signal aboutissant à la libération de peptides actifs contenus dans des vésicules à la membrane basale ou basolatérale. Ces peptides peuvent avoir des effets endocrines ou paracrines (D'après Junqueira et Mescher, (74)).

Le rôle des CEE est de détecter les composés nutritionnels de la lumière intestinale et de contrôler la réponse métabolique post-prandiale de l'organisme. Plus de 20 hormones sont produites par plus de 10 types de CEE et induisent des effets neuro-, auto-, endo- ou paracrines. Les principales hormones produites par les CEE avec une action sur l'intestin sont résumées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Principales cellules entéroendocrines et leurs rôles.

(Modifié d'après Mace et al., 2015 (73)).

Type cellulaire et localisation	Hormone produite	Principaux effets
D-Pylore et duodénum	Somatostatine	Libération de gastrine
I-Intestin grêle proximal	Cholécystokinine (CCK)	Contraction de la vésicule biliaire, inhibition de la vidange gastrique, stimulation des sécrétions enzymatiques et HCO ₃ ⁻ pancréatiques
K-Intestin grêle proximal	Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP)	Libération d'insuline, sécrétions gastriques acides
S-Intestin grêle proximal	Sécrétine	Libération de bicarbonate, sécrétions acides gastriques, contraction du côlon
L-Intestin grêle proximal	Peptide glucagon-like 1 (GLP-1) et Peptide YY (PYY)	Appétit et prise alimentaire, motilité intestinale, libération d'insuline, inhibition de la libération du glucagon, ralentissement de la vidange gastrique
M-Intestin grêle	Motiline	Régulation des complexes de migration myoélectrique, motilité intestinale
N-Intestin grêle distal et côlon	Neurotensine	Sécrétions d'acides gastriques, sécrétions biliaires, péristaltisme

Au-delà de leur rôle dans le contrôle de l'appétit, de la prise alimentaire, de la digestion et du métabolisme, les CEE peuvent détecter les métabolites microbiens et les Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) et ont la capacité de sécréter des cytokines (75,76). Les cellules entéroendocrines expriment Toll-Like Receptor (TLR)1, 2 et 4 (77). De plus, la plupart des cellules inflammatoires possèdent des récepteurs aux hormones sécrétées par les CEE. Un dialogue entre les CEE et le système immunitaire inné existe donc comme schématisé dans la Figure 15.

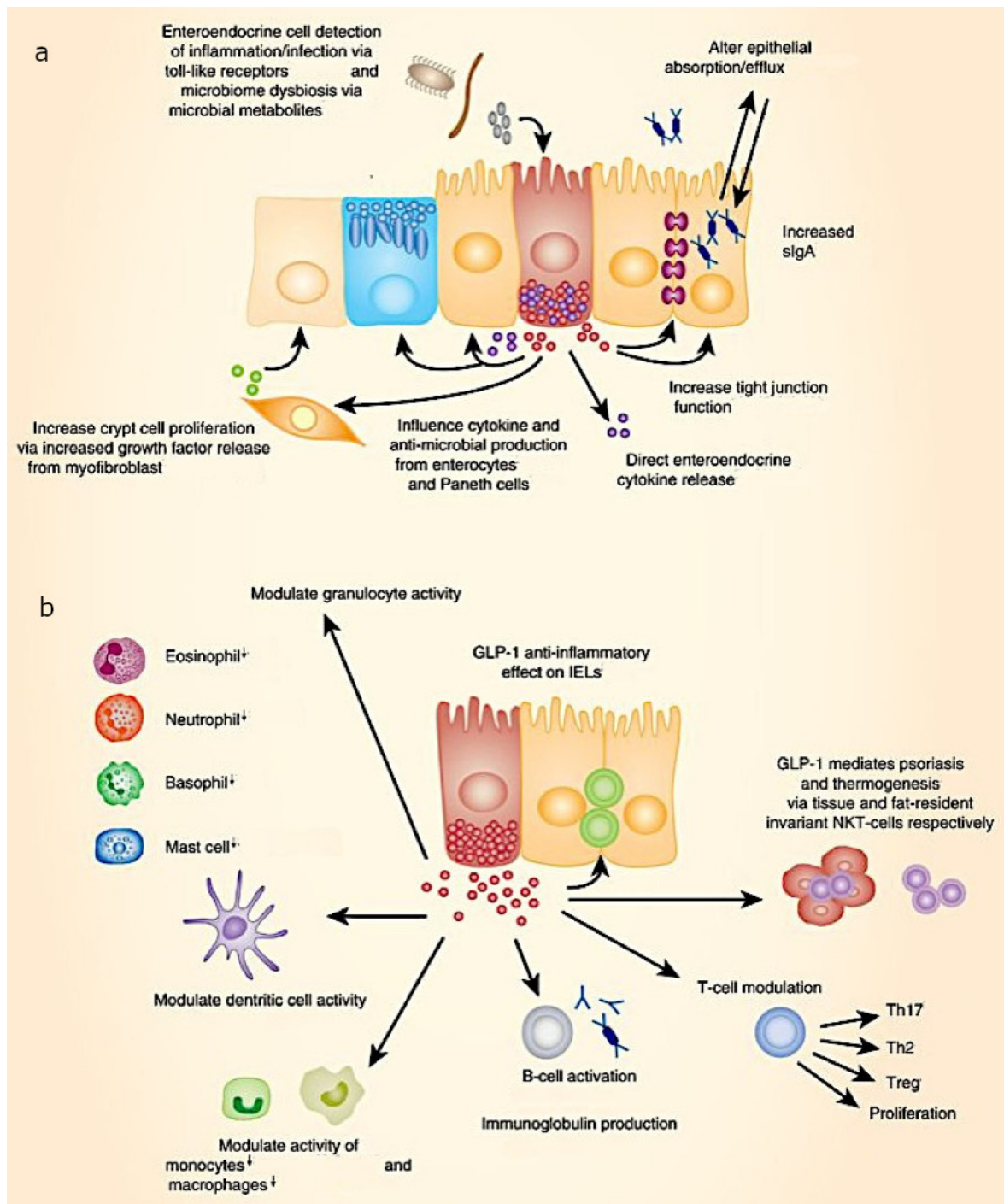


Figure 15 : Rôle des cellules entéroendocrines (CEE) sur la barrière épithéliale et sur les cellules immunitaires.

(a) Les CEE sont équipées de récepteurs permettant la reconnaissance des PAMPs et des métabolites microbiens. En réponse, elles sécrètent des hormones peptidiques et des cytokines qui interagissent avec les autres cellules de l'épithélium et influencent directement la fonction de barrière. (b) De plus, les cellules immunitaires possèdent de nombreux récepteurs des hormones peptidiques sécrétées par les CEE. Les hormones possèdent par ce biais une action "cytokine-like" sur les granulocytes, les mastocytes, les cellules dendritiques, les cellules monocytaires et macrophagiques et les lymphocytes B et T (Modifié d'après Worthington et al, 2018 (76)).

2.7 Activité immunitaire directe des cellules épithéliales

Les cellules épithéliales intestinales (CEI) constituent également une voie d'entrée des antigènes luminaux puisqu'elles possèdent la capacité d'internaliser des macromolécules par des mécanismes d'endocytose (78). Les CEI expriment de façon constitutive les antigènes du CMH II à leur pôle basolatéral (79). Elles sont ainsi capables de présenter l'antigène endocyté au pôle apical, aux lymphocytes T CD4⁺ du chorion sous-jacent. En conditions physiologiques, ces cellules sont en revanche incapables d'exprimer les molécules de co-stimulation CD80 et CD86. Cette présentation antigénique en l'absence de molécules de co-stimulation induirait l'anergie des lymphocytes T CD4⁺, participant à la régulation locale de leur activation. Les IEL CD8⁺ présents dans l'épithélium sont également susceptibles d'être activés par les cellules épithéliales (80).

Les CEI expriment des PRRs comme les TLRs et les récepteurs de type NOD (81,82) (cf 3.4).

Les CEI sécrètent une variété de cytokines et de chimiokines impliquées dans le chimiotactisme des cellules immunitaires telles que les granulocytes neutrophiles et basophiles, les macrophages et les lymphocytes T (83). Les cytokines sécrétées par les CEI sont similaires à celles sécrétées par les cellules immunitaires. Même si la quantité de cytokine sécrétée par cellule est inférieure à celle des cellules immunitaires, l'importance du nombre de CEI (cellules les plus abondantes de l'organisme) peut en théorie donner lieu à une sécrétion globale significative. Cependant, la contribution relative des cytokines sécrétées par les CEI n'a pas été clairement étudiée.

Les CEI sécrètent un certain nombre de chimiokines qui contrôlent les populations de cellules immunitaires de la muqueuse. Parmi elles, l'IL8, le CXCL5, le CXCL1 et le CXCL2 régulent le chimiotactisme des granulocytes neutrophiles (84–86). Par exemple, la sécrétion de CXCL5 est plus tardive mais plus durable que celle de l'IL8, suggérant un rôle distinct de ces chimiokines dans la réponse aux agents pathogènes ou à tout autre stimulus inflammatoire (86).

Egalement, le CCL2, le CCL3 et le RANTES/CCL5 régulent principalement le recrutement de monocytes. MIP1 α semble jouer un rôle majeur dans le recrutement de cellules dendritiques de la muqueuse (86).

Les CEI sécrètent également des chimiokines comme CCL11, CCL20 et CCL22 qui stimulent le recrutement de diverses sous-populations de lymphocytes T dans la muqueuse (87). Ces chimiokines sont essentielles pour diriger le recrutement des IEL (88).

Au-delà de l'orchestration du recrutement d'une variété de cellules immunitaires, les CEI sécrètent également des protéines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-6 (89). Les cytokines agissent localement mais ont également un effet systémique substantiel. A titre d'exemple, le TNF- α agit comme un puissant amplificateur d'inflammation. Il induit la production par les CEI d'enzymes proinflammatoires comme l'oxyde synthase nitroinductible (iNOS) et la cyclooxygénase-2 (COX-2), et active les granulocytes neutrophiles pour générer des espèces réactives d'oxygène (ROS) et leur dégranulation.

En plus des immunomodulateurs solubles sécrétés par les CEI, une variété de molécules d'adhésion sont exprimées et interviennent dans les interactions entre l'épithélium et les cellules immunitaires. L'expression par les CEI de ligands des granulocytes neutrophiles jouerait un rôle majeur dans la régulation de l'adhésion et de la migration transépithéliale (diapédèse) des polynucléaires neutrophiles. Plus précisément, les rôles clés du ligand CD47 et de la protéine SIRP1 α dans la régulation de la migration des granulocytes neutrophiles ont été démontrés dans un modèle *in vitro* de cellules épithéliales intestinales humaines (90).

2.8 Les cellules M

Les cellules M (Microfold cells) sont des cellules épithéliales structurellement distinctes des CEI. Elles sont présentes à la surface des plaques de Peyer et des follicules lymphoïdes isolés (91). Elles forment 5 à 10% des cellules épithéliales du dôme recouvrant le GALT. Structurellement, elles sont dépourvues de lame basale et de bordure en brosse et forment des replis membranaires qui délimitent une « poche » intra-épithéliale dans laquelle viennent se loger des lymphocytes T CD4+, des lymphocytes B et des macrophages (92) (cf. **Figure 16**). Leur glycocalyx est plus fin que celui des autres CEI ce qui leur confère une plus grande proximité avec le contenu luminal.

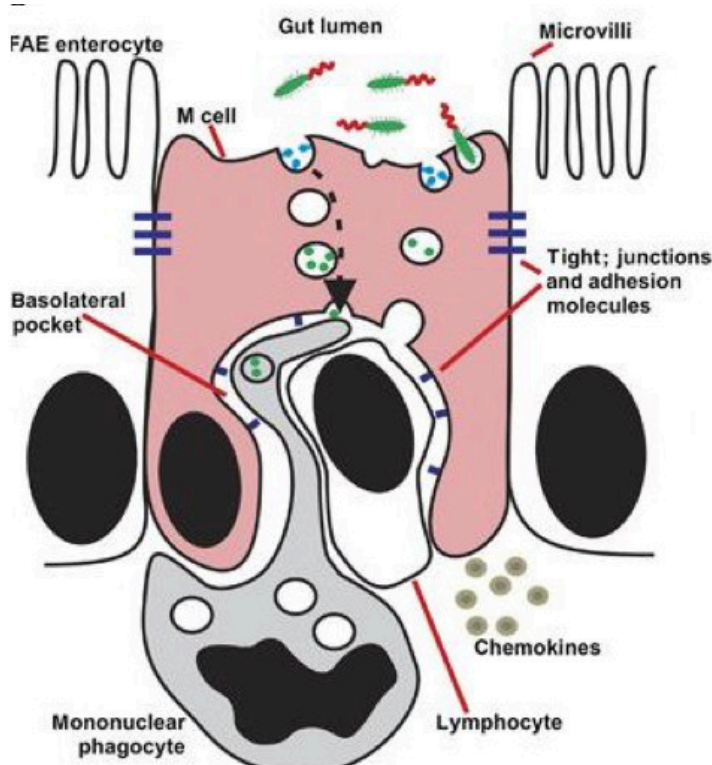


Figure 16 : Représentation de la morphologie des cellules M.

Elles sont dépourvues de microvillosités et présentent une poche basolatérale qui renferme des macrophages et des lymphocytes. (D'après Mabbott et al, 2013 (27))

Les cellules M sont des sentinelles immunitaires qui jouent un rôle important dans l'échantillonnage du microbiote intestinal et la détection d'agents pathogènes (92). Ces cellules sont capables d'endocyter de façon efficace les macromolécules et les particules qui adhèrent à leur surface apicale et de les transporter vers la « poche ». Les cellules M permettent donc essentiellement l'entrée des antigènes et leur transport au contact des nombreuses cellules de l'immunité présentes dans le dôme (cf. 1.3.2).

2.9 Les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth sont présentes à la base des cryptes de Lieberkühn. Chaque crypte contient environ 10 cellules de Paneth. Elles ont une durée de vie de l'ordre de 30 jours contre 3 à 5 jours pour les CEI. Elles présentent un cytoplasme riche en granules qui sont libérés dans les cryptes par exocytose en réponse à divers stimuli comme la présence d'agoniste cholinergique, des bactéries ou des produits bactériens comme les lipopolysaccharides (LPS) ou l'acide lipotéichoïque (93). La composition des granules est variée et variable selon l'espèce. Chez l'homme, des défensines, des lysozymes, la phospholipase A2 et la protéine régénératrice dérivée d'îlots III-alpha (REG3 α) sont les composés prédominants des granules (94). Les données issues d'animaux de laboratoire

indiquent que les défensines constituent environ 15% de l'activité antimicrobienne totale de l'intestin (95). La composition des granules n'est pas connue chez le chien.

Les voies de signalisation conduisant à la dégranulation des cellules de Paneth ne sont pas totalement élucidées mais l'intervention de la voie TLR(2-4)-MyD88 est requise pour la libération des α -défensines (96). De plus, la voie NOD2-RIP2-LRRK2-RAB2A semble nécessaire chez la souris pour induire la libération de lysozyme après stimulation par *Listeria monocytogenes* (97). Ces données montrent une partie du rôle joué par les voies liées à l'immunité innée dans le fonctionnement des cellules de Paneth. Egalement, les études *in vitro* et *in vivo* montrent que l'exposition à l'IFN- γ induit une dégranulation brutale et complète des cellules de Paneth suivie de leur apoptose. Les sources d'IFN- γ sont multiples mais dans un modèle expérimental de toxoplasmose chez la souris, la source était les lymphocytes Th1 CD4+. Après infection toxoplasmique, la libération d'IFN- γ par les Th1 CD4+ induit le relargage massif des granules suivi d'une chute de la sécrétion de lysozyme et de défensine documentée 7 jours après l'infection (98).

2.10 Les cellules chimiosensibles intestinales

Les cellules chimiosensibles de l'intestin grêle sont localisées dans l'épithélium et se distinguent par l'expression de nombreux gènes impliqués dans les processus neuronaux (transduction du goût sucré et salé dans les cellules gustatives) et immunitaires (99). Elles représentent une lignée indépendante de l'épithélium intestinal (100). Le groupe de Jay a défini une combinaison de marqueurs assez robustes pour leur identification en routine, proposant l'utilisation d'anticorps dirigés contre les protéines Cox 1 et 2, la forme hématopoïétique de la prostaglandine D2 synthase, ainsi que la protéine kinase associée aux microtubules DCLK1 (101). Les cellules chimiosensibles intestinales sont impliquées dans la réponse immune anti-parasitaire de type-2 (102). A titre d'exemple, l'étude menée par Howitt et *al.* constate l'augmentation drastique du nombre de ces cellules au sein de l'épithélium intestinal de souris infectées par différents parasites : *Trichomonas muris* (protozoaire) et *Heligmosomoides polygyrus*, *Trichinella spiralis* et *Nippostrongylus brasiliensis* (helminthes) (voir 1 exemple Figure 17) (102).

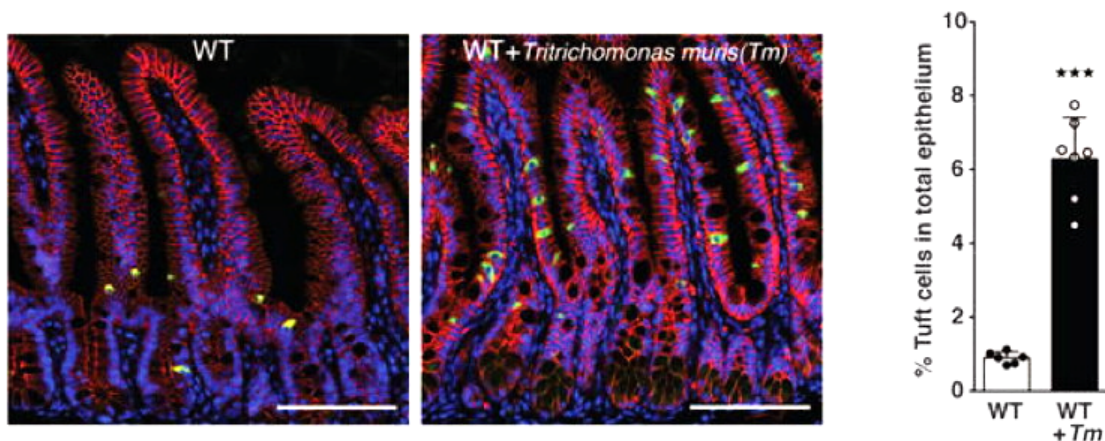


Figure 17 : Fréquence des cellules chimiosensibles lors d'infection par *Trichomonas muris*.

Les cellules chimiosensibles sont marquées grâce à l'utilisation d'un anticorps dirigé contre *DCLK1*. (**Gauche**) Images représentatives d'une muqueuse intestinale de souris non infectée et d'une souris infectée par un protozoaire. Dans ce modèle, *DCLK1* est marqué en vert, la *E-cadherin* en rouge les noyaux cellulaires en bleu. (**Droite**) Représentation graphique de la fréquence des cellules chimiosensibles lors d'infection par le protozoaire (Modifié d'après Howitt et al. 2016 (102)).

Les cellules chimiosensibles détectent les parasites par la protéine G α -gustducine qui active le canal *Trpm5* et induit la dépolarisation cellulaire (102). En réaction aux parasites, les cellules chimiosensibles sécrètent une quantité accrue d'*IL-25* qui entraîne à son tour la production d'*IL-13* par les ILC. Sous l'action de l'*IL-13*, les cellules souches intestinales subissent une reprogrammation à l'origine de la croissance du nombre de cellules chimiosensibles (102).

3 Quelques acteurs moléculaires de l'immunité intestinale

Cette partie a pour objectif de faire le point sur les acteurs dont le rôle dans l'inflammation intestinale est montré ou suspecté. Ainsi, le mucus et les molécules anti-microbiennes sont détaillés. Une part importante de cette synthèse est réservée aux deux familles de récepteurs largement impliqués dans les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin : les récepteurs Nod-Like et les récepteurs Toll-Like.

3.1 Le mucus

Le mucus et les mucines qui le composent peuvent être considérés comme la première ligne de défense contre les agents pathogènes en piégeant les microorganismes (103). Les mucines peuvent être scindées en 2 groupes : les mucines liées aux membranes dont MUC1 est le représentant le plus connu et les mucines sécrétées dont MUC2 est le représentant le plus connu. Ainsi, le mucus est organisé en deux couches (cf.

Figure 18 :

La couche interne, située en surface de la membrane plasmique des cellules épithéliales, a une épaisseur moyenne comprise entre 50 et 60 μm , et assure la protection de l'épithélium. Elle contient les mucines liées aux membranes et concentre les peptides antimicrobiens et les IgA sécrétoires, établissant ainsi une barrière étanche aux bactéries en permettant leur maintien à distance de l'épithélium (104).

La couche externe contient les mucines sécrétées. Elle sert essentiellement à la lubrification et contient un nombre important de bactéries. Les chaînes O-glycosylées présentent un remarquable degré d'hétérogénéité et constituent ainsi un immense répertoire de sites potentiels de liaison des microorganismes. L'adhésion des bactéries aux mucines permet de limiter leur interaction avec l'épithélium et de favoriser leur élimination rapide avec le transit (105).

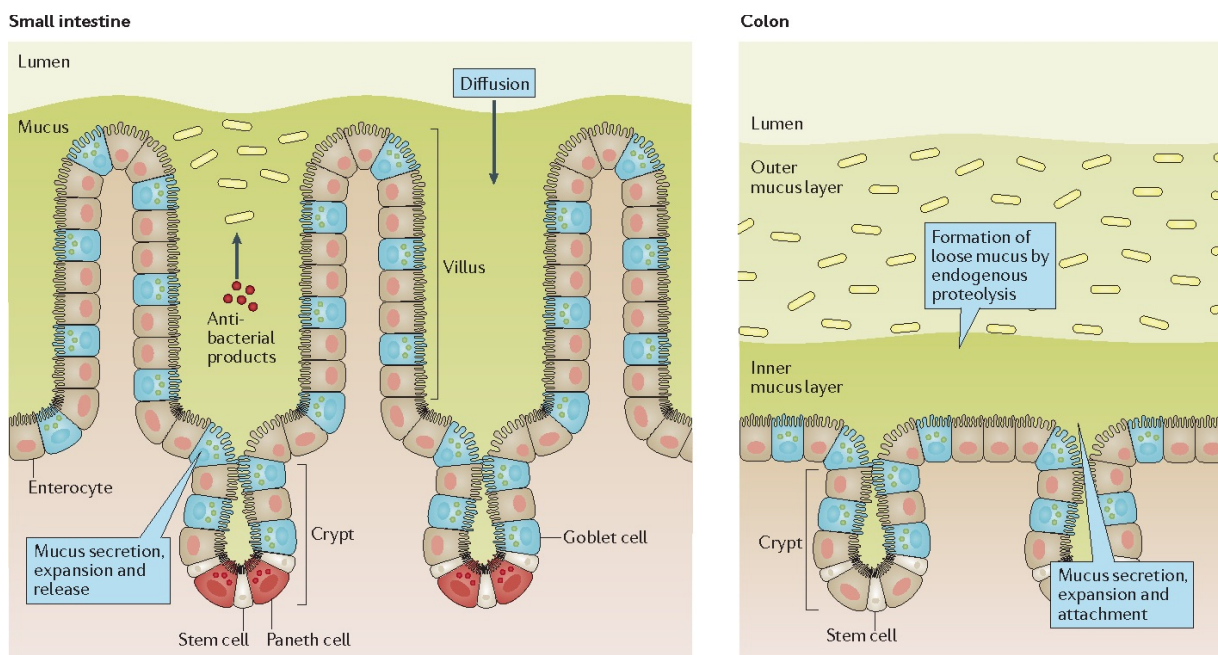


Figure 18 : Le mucus dans l'intestin grêle et dans le côlon.

Dans l'intestin grêle, le mucus forme une barrière de diffusion qui contient les peptides anti-microbiens et les IgA sécrétoires qui limitent la pénétration des bactéries. Dans le côlon, les bactéries sont contenues dans la couche externe et évacuées par les mouvements péristaltiques. La couche interne en contact avec l'épithélium est très pauvre en bactéries et protège l'épithélium (Johansson et Hansson, 2016 (103)).

L'importance du mucus a notamment été illustrée chez les souris déficientes en MUC2 qui développent une colite spontanée due au contact des bactéries avec l'épithélium intestinal, associée à une importante pénétration bactérienne dans les cryptes (106).

3.2 Les molécules anti-microbiennes

Plusieurs molécules anti-microbiennes sécrétées par l'épithélium intestinal participent à l'intégrité de la barrière intestinale. Les peptides anti-microbiens (PAMs) regroupent les défensines et les cathélicidines.

- Les défensines sont de petits peptides cationiques aux propriétés bactéricides Gram-négatif et Gram-positif en lésant la membrane bactérienne. Les défensines sont divisées en α - et β -défensine selon la position de leur pont disulfure (107). Les α -défensines HD-5 et HD-6 sont synthétisées de façon constitutive par les cellules de Paneth essentiellement dans l'intestin grêle (108). Elles sont sécrétées sous forme inactive et subissent un clivage protéolytique par la trypsine dans la lumière intestinale (109).

Les β -défensines sont synthétisées par plusieurs cellules de l'épithélium intestinal dont les entérocytes eux-mêmes. On les retrouve tout au long de l'intestin grêle et du côlon.

En plus de leurs propriétés anti-microbiennes, les défensines ont la capacité d'induire une réponse inflammatoire innée ou immunitaire adaptative grâce à leurs propriétés chimio-attractives (110).

- Les cathélicidines constituent la 2^{ème} classe de PAMs. Hase et *al.* ont montré par immunohistochimie que l'expression de LL-37/hCAP18 (LL-37/human Cationic Antimicrobial Protein 18), un exemple de cathélicidine, était limitée aux cellules épithéliales au sommet des villosités coliques chez l'humain (111). LL-37/hCAP18 présente des propriétés bactéricides larges contre les bactéries Gram-négatif et Gram-positif qui ont été montrées *in vitro* dès les années 1990 (112). Ses effets sont synergiques avec les défensines (113). Des effets chimiotactiques sur les granulocytes neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes T sont également démontrés chez l'humain (114).

Les molécules anti-microbiennes n'appartenant pas aux 2 classes de PAMs sont les lectines de type C et de type X et les lysozymes C.

- La lectine de type C humaine la plus étudiée est REG3 α . Son homologue murin est REG3 γ . Après activation protéolytique par la trypsine, les lectines exercent leurs actions antimicrobiennes contre les bactéries Gram-positif (115). Contrairement aux PAMs, l'expression des lectines de type C est inductible *via* la stimulation des TLRs des cellules de Paneth (116). La voie de signalisation fait intervenir MyD88 comme en témoigne l'expérience des souris déficientes pour MyD88 dans les cellules de Paneth et qui présentent une forte diminution de la synthèse de REG3 γ et une augmentation de la translocation bactérienne détectée dans les nœuds lymphatiques mésentériques (116) (cf **Figure 19**).

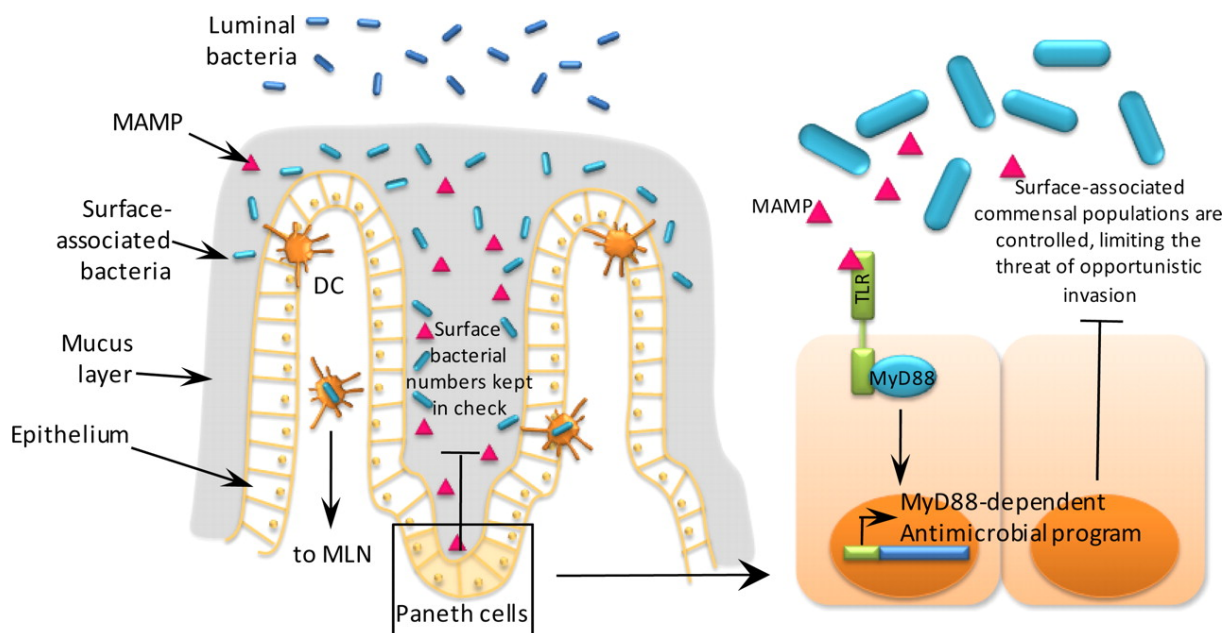


Figure 19 : Régulation de l'expression des molécules antimicrobiennes par le microbiote.

Les cellules de Paneth détectent directement les bactéries commensales via les récepteurs Toll-Like et induisent l'expression des gènes codants pour Reg3 γ chez la souris (Vaishnava et al., 2008 (116)).

Les cellules épithéliales intestinales peuvent également sécréter REG3 γ . Cette sécrétion est stimulée par l'IL-22 et l'IL-33 comme en témoignent les modèles murins délétés pour les gènes codant pour l'IL-22 ou l'IL-33. Les voies de signalisation font intervenir mTOR, STAT3 et ERK1/2 (117).

- Les intélectines sont classées parmi les lectines de type X et sont produites par les cellules caliciformes et les cellules de Paneth (118). L'intélectine humaine reconnaît les motifs bactériens glycosylés (119).

3.3 Les immunoglobulines A

Les immunoglobulines de type A (IgA) sont le facteur immunitaire adaptatif le plus abondant dans la lumière intestinale grêle. Leur concentration est moindre dans le côlon (120). Les IgA font l'objet d'un processus de sécrétion dans la lumière intestinale. Elle sont alors nommées IgA sécrétoires (SIgA).

3.3.1 Structure des IgA

Les immunoglobulines sont des protéines composées de chaînes lourdes et légères, chaque chaîne contenant une partie constante (C) et une partie variable (V). Les gènes codant les chaînes légères ou lourdes se situent à différents endroits du génome.

1. Chaînes lourdes (μ , δ , γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , α_1 , α_2 , ϵ) : Les gènes sont localisés sur le chromosome 14 chez l'homme
2. Chaînes légères kappa (κ) : Les gènes sont localisés sur le chromosome 2 chez l'homme
3. Chaîne légère lambda (λ) : Les gènes sont localisés sur le chromosome 22 chez l'homme

3.3.2 Commutation de classe des immunoglobulines et hypermutation des lymphocytes

Les cellules B naïves n'expriment que les gènes codant pour les IgM ou IgD. Le processus de commutation de classe permet la synthèse des autres Ig. En bref, les régions constantes des différentes Ig sont codées par plusieurs exons organisés dans l'ordre suivant : C_μ , C_δ , C_γ , C_ϵ et C_α pour les chaînes lourdes des Ig. Le processus de commutation de classe consiste en une recombinaison de l'ADN où l'exon C_μ est remplacé par l'exon C_α pour l'exemple de l'IgA. Cette délétion-recombinaison nécessite l'intervention d'une enzyme, la Activate-Induced Desaminase (AID) et implique la génération de ruptures de l'ADN double-brin suivies de réparations. La région variable fixant l'antigène n'est pas altérée.

L'hypermutation somatique des lymphocytes B est un phénomène qui permet de générer la diversité des immunoglobulines. Le principe repose sur l'engagement d'un clone de lymphocytes B activé vers un processus de recombinaisons génétiques des régions hypervariables des chaînes légères et lourdes. Le processus d'hypermutation somatique dépend également de l'activité de l'enzyme AID (121). Muramatsu et *al.* ont montré en 2000 que l'inactivation du gène codant pour l'AID chez des souris $AID^{-/-}$ abolit le processus d'hypermutation et la commutation de classe alors que la surexpression de l'enzyme lors de lymphome augmente la commutation des IgM en IgA. L'expression de l'enzyme AID dans les lymphocytes B est induite par l'interaction CD40L-CD40 et par l'activation de la voie NF κ B (121).

Les processus de commutation de classe des Ig et d'hypermutation des lymphocytes conduisent à la sélection et à l'expansion au sein des centres germinatifs de lymphocytes B produisant des IgA, IgG, ou IgE de haute affinité pour l'antigène (122).

L'orientation particulière de la commutation de classe des Ig vers l'isotype A au sein des muqueuses, et notamment dans le compartiment intestinal, semble dépendante de la sécrétion de TGF- β 1, produit par les lymphocytes T. Complexé aux récepteurs TGF- β RI/II présents sur les lymphocytes B, le TGF- β 1 conduit à l'activation de la voie de signalisation SMAD qui active la transcription de C α (123). La sécrétion de TGF- β 1 est finement régulée et implique la dissociation de la forme active de son complexe latent (LAP-latency-associated peptide). Les différents signaux moléculaires requis ne sont pas complètement identifiés mais nécessitent pour partie l'action de métalloprotéases (MMPs) notamment produites par les CD α s et les M Φ environnants (124). Par ailleurs, l'expression du récepteur TGF- β R α II à la surface des lymphocytes B est dépendante de la présence de monoxyde d'azote (NO). Ainsi, les CD α s et leur activité NO synthase inductible (iNOS $^{+}$) présentes dans les plaques de Peyer, les nœuds lymphatiques mésentériques, et qui prédominent dans la *lamina propria*, pourraient jouer un rôle important dans l'initiation des réponses IgA intestinales. Ce mécanisme est soutenu par les observations de Tezuka et *al.* selon lesquels les souris iNOS $^{-/-}$ et les souris sauvages traitées avec un inhibiteur de iNOS ont une quantité moindre de lymphocytes B IgA $^{+}$ dans leur GALT et des concentrations sérique et fécale moindres en IgA (125).

La différenciation terminale des pré-plasmocytes en plasmocytes sécréteurs d'IgA implique la coopération des CEI, des CD α s, des M Φ , et d'autres cellules de l'immunité innée avec celles de l'immunité adaptative, lymphocytes B et T. Les centres germinatifs des plaques de Peyer reconstituent ce microenvironnement qui assure à la fois la capture des antigènes et le recrutement des cellules immunocompétentes. La structure réticulée qui caractérise ces formations lymphoïdes secondaires, favorise le contact entre les CPA et les lymphocytes B et T. Par ailleurs, à la différence des autres structures lymphoïdes secondaires périphériques, les plaques de Peyer présentent une activation constante de leurs centres germinatifs induite par la présence microbienne intestinale. Ces structures semblent donc plus particulièrement propices à l'initiation des réponses IgA intestinales induites par le microbiote. Toutefois, le lieu où les lymphocytes B effectuent leur commutation de classe vers le type A fait débat. Les souris déficientes pour CD40 sont en effet incapables de développer des centres germinatifs mais présentent une réponse IgA intestinale normale. Inversement, des souris déficientes pour AID présentent un défaut de production d'IgA qui est associé à une

hyperplasie des centres germinatifs des formations lymphoïdes intestinales (126). Ces données suggèrent l'absence de relation directe entre l'activation des centres germinatifs des structures lymphoïdes et l'initiation des réponses IgA intestinales, bien que ces deux phénomènes soient fortement induits par la colonisation bactérienne. En effet, des données récentes suggèrent que l'induction du changement de classe des Ig vers l'isotype A implique différents mécanismes dissociables ou non de la réaction des centres germinatifs :

1. Des mécanismes de commutation de classe T-dépendants via l'interaction CD40L-CD40 s'établissant lors de la réaction des centres germinatifs, et
2. Des mécanismes T-indépendants ne nécessitant pas l'intervention des centres germinatifs (127).

Les CEI jouent un rôle important dans le processus de production des IgA intestinales. En effet, elles interviennent dans le recrutement des lymphocytes B et produisent de manière constitutive des facteurs qui stimulent directement la production d'IgA *via* l'IL-6 et induisent une commutation de classe des lymphocytes B (32). Egalement, l'immunité innée *via* l'activation des voies de signalisation impliquant les TLRs contribue à la production d'IgA dans la lumière intestinale. Ceci est illustré par l'étude de Shang et *al.* qui a consisté à produire une lignée de souris transgéniques exprimant constitutivement une forme active de TLR4 dans leurs cellules épithéliales intestinales. Ils observent alors un recrutement de lymphocytes B dans la *lamina propria* et une augmentation de la concentration des IgA fécales. Le recrutement des lymphocytes B semble lié à l'expression des chimiokines CCL20 et CCL28 par les CEI. La cytokine APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand), membre de la superfamille des TNFs, est impliquée dans l'induction du changement de classe des Ig vers l'isotype A (128). Ceci illustre un mécanisme T-indépendant ne nécessitant pas l'intervention des centres germinatifs.

3.3.3 Sécrétion trans-épithéliale des Immunoglobulines A

Les IgA sont principalement sécrétées par les plasmocytes sous forme de dimères. Les monomères sont associés par une pièce jointe nommée « pièce J ». Cette dernière possède la capacité de se lier de façon non covalente au récepteur des Ig polymériques exprimé au pôle basolatéral des entérocytes. Ce récepteur réalise la transcytose des Ig polymériques à travers la cellule épithéliale intestinale. Une partie du récepteur des Ig polymériques, la pièce sécrétoire, reste associée aux Ig libérées dans la lumière intestinale (cf. **Figure 20**).

Le transport des IgM intestinales pentamériques au travers de l'épithélium est identique à celui des IgA alors que les IgG intestinales diffusent passivement à travers les espaces intercellulaires (129).

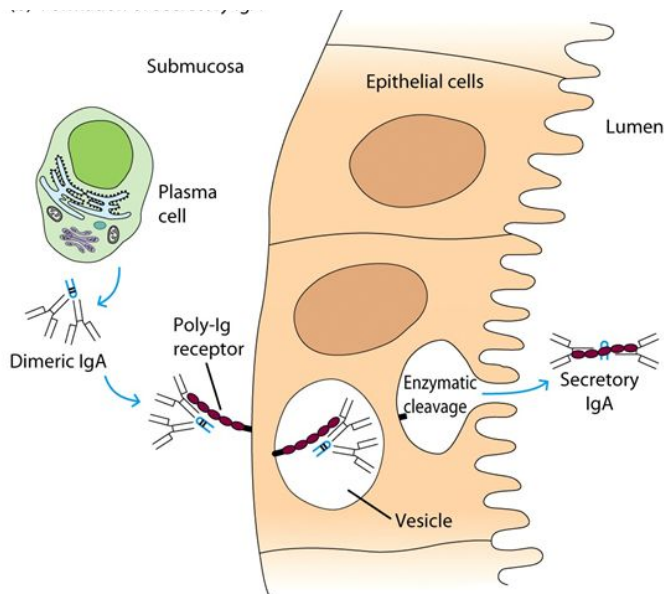


Figure 20 : Transcytose des IgA sécrétoires dans la lumière intestinale.

Les IgA polymériques produites par les plasmocytes de la lamina propria se fixent aux récepteurs (Poly-Ig receptor) situés au pôle basal des cellules épithéliales. L'IgA fixée au récepteur est transportée par endocytose vers le pôle apical. Le récepteur subit un clivage enzymatique qui libère l'IgA et un fragment de récepteur nommé « pièce sécrétoire » (Punt et al., 2018 (130)).

3.3.4 Rôles des IgA

Les SIgA exercent une action d'exclusion immunitaire en fixant les micro-organismes de manière non covalente. Ce processus permet de bloquer les adhésines microbiennes, d'inhiber la motilité et de faciliter leur piégeage dans le mucus (131). Ce mécanisme permet l'élimination des complexes SIgA-bactéries par le flux luminal favorisé par l'interaction de la pièce sécrétoire au mucus (132). Les SIgA qui se complexent aux bactéries de la lumière contrôlent à la fois la translocation bactérienne dans la muqueuse intestinale, leur dissémination en périphérie et participent à réguler la densité et la diversité des populations bactériennes lumineales (133). Les IgA intestinales assurent à la fois un rôle de défense immune contre les pathogènes bactériens ou viraux et un rôle de tolérance immune en régulant les rapports homéostatiques entre l'hôte et son microbiote (129). Les mécanismes de régulation de l'écologie microbienne par les IgA ne sont cependant pas clairement identifiés. De façon remarquable, Wesener et *al.* montrent que la compensation de l'absence d'IgA par une hyperproduction d'IgM chez les souris déficientes en AID ne permet ni de contenir les bactéries dans la lumière, ni de réguler l'écologie microbienne et conduit à une

hyperactivation des centres germinatifs intestinaux et systémiques chez les souris (134). Ces résultats renforcent l'hypothèse d'un rôle clé des IgA dans le contrôle de l'homéostasie avec le microbiote. Par ailleurs, une étude récente utilisant un modèle murin porteur d'une mutation bloquant spécifiquement l'activité de l'AID a permis de souligner l'importance de la diversité du répertoire des IgA produites en réponse à la colonisation bactérienne, dans la régulation des rapports homéostatiques hôte-microbiote. En effet, en l'absence d'IgA hypermutées les bactéries prolifèrent dans la lumière intestinale et traversent la muqueuse (135). Ces derniers résultats montrent, qu'en conditions physiologiques, la fonction de protection des IgA sécrétées dans la lumière du tube digestif n'est effective que lorsque celles-ci subissent le processus d'hypermutation somatique. Ceci soulève en outre la question du degré d'affinité et donc nécessairement de la spécificité des IgA induites par la colonisation microbienne.

3.4 Les Récepteurs à Reconnaissance de Forme

Les PRRs jouent un rôle essentiel dans l'activité du système immunitaire inné car ils permettent la détection initiale des microbes. Les PRR reconnaissent PAMPs ou les motifs endogènes issus de la dégradation cellulaire (DAMP). Les PRRs activent les voies de signalisation qui conduisent à l'induction de la réponse immunitaire innée en produisant des cytokines inflammatoires comme les interférons. Ce processus, en plus d'induire une réponse immunitaire immédiate via l'inflammation, initie une réponse adaptative spécifique d'antigène.

Plusieurs classes de PRRs sont présentes chez les mammifères (136) :

- Les récepteurs *Toll-Like* (TLR),
- Les récepteurs *nucleotide-binding and oligomerization domain* (NOD)-Like (NLRs),
- Les récepteurs *retinoic acid inducible gene-1* (RIG-I)-Like (RLRs),
- Les récepteurs lectine de type C (CLR),
- Les récepteurs de type *absent-in-melanoma* (AIM)-Like (ALRs),
- Les détecteurs intra-cellulaires d'ADN de type cGAS.

Les ALRs et les détecteurs intra-cellulaires d'ADN de type cGAS ne sont pas développés ici. Les RLRs et CLR sont présentés rapidement. Une partie importante de cette synthèse est

réservée aux NLRs et aux TLRs car leur implication dans les MICI de l'homme a été montrée.

3.4.1 Les récepteurs de type RIG-I-Like

La famille des RLRs est composée de RIG-I, de melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) et de LGP2 (137). Les RLRs sont structurés en 2 domaines N-terminaux caspase recruteur (CARDs), d'un domaine central DEAD box helicase/ATPase et d'un domaine régulateur C-terminal. Ils sont localisés dans le cytoplasme et reconnaissent l'ARN viral. L'expression des RLRs est nettement augmentée sous l'effet de l'IFN γ ou lors d'infection virale (138).

3.4.2 Les récepteurs lectine de type C

La famille des CLR est composée de Dectine-1, Dectine-2 et MINCLE. Elle est caractérisée par un domaine fixant les chaînes glucidiques. Les CLR sont exprimés essentiellement par les CD. Ils reconnaissent les glucides des microorganismes comme les virus, les mycobactéries et les *fungi* (139). Après reconnaissance des motifs glucidiques portés par l'agent pathogène, Dectine-1, Dectine-2 et MINCLE induisent l'expression de gènes codant pour des cytokines proinflammatoires. Le facteur de transcription NF- κ B est un des médiateurs clés de l'induction de l'expression génique des cytokines. D'autres CLR comme DC-SIGN, CLEC4C, DCIR et MICL modulent l'expression génique des cytokines induites par la voie des TLRs (139).

3.4.3 Les récepteurs NOD-Like

Les protéines NOD1 et NOD2 pour « Nucleotide-binding and Oligomerization Domain» ont donné leur nom à cette famille. Chez l'humain, 22 NLRs sont identifiés et peuvent être classés en 4 sous-familles selon leur domaine N-terminal (140) :

1. Les NLRA sont caractérisés par leur domaine de transactivation acide
2. Les NLRB sont caractérisés par leur domaine de type inhibiteur du baculovirus
3. Les NLRC sont caractérisés par leur domaine d'activation et de recrutement caspase (CARD)
4. Les NLRP sont caractérisés par leur domaine pyrine.

Certains NLRs n'interviennent pas directement dans la reconnaissance des PAMPs et DAMPs et jouent un rôle dans la régulation immunitaire. Par exemple, CIITA qui appartient à la sous-famille des NLRA, régule l'expression des molécules du CMH II avec une action directe sur la transcription. Seuls sont détaillés ici les NLRs qui interviennent en tant que PRR.

Le **Tableau 3** répertorie les principaux NLRs avec une action de PRR.

Tableau 3 : Principaux récepteurs de type NOD-Like (NLRs) et leur fonction PRR.
(Modifié d'après Kim et al., 2016 (141)).

Sous-famille	PRRs	Ligand	Fonction
NLRB	NAIP	Flagelline	Pyroptose et inhibition de l'apoptose
NLRC	NOD1	Acide diaminopimélique (Gram -)	Autophagie
	NOD2	muramyl-dipeptide (Gram + et Gram -) et ARN viral	Autophagie
	NLRC4	Flagelline	Pyroptose et maturation des phagosomes
NLRP	NLRP1	muramyl-dipeptide (Gram + et Gram -) et toxine léthale de l'anthrax	
	NLRP3	DAMPs	
	NLRP7	Lipopeptides	

3.4.3.1 Structure et localisation des NLRs

Les protéines NLRs possèdent une organisation centrale commune dite NACHT, un domaine N-terminal effecteur et un domaine C-terminal riche en leucines. Le domaine NACHT est impliqué dans l'activité dNTPase et l'oligomérisation (142). L'extrémité C-terminale est impliquée dans la reconnaissance des ligands. L'extrémité N-terminale a une fonction effectrice en interagissant avec d'autres protéines. La localisation des NLRs est cytoplasmique (143).

3.4.3.2 Fonctions des NLRs

L'activité des NLRs avec fonction PRR peut être scindée en 3 catégories : l'autophagie, la production de cytokines inflammatoires et la formation de l'inflammasome.

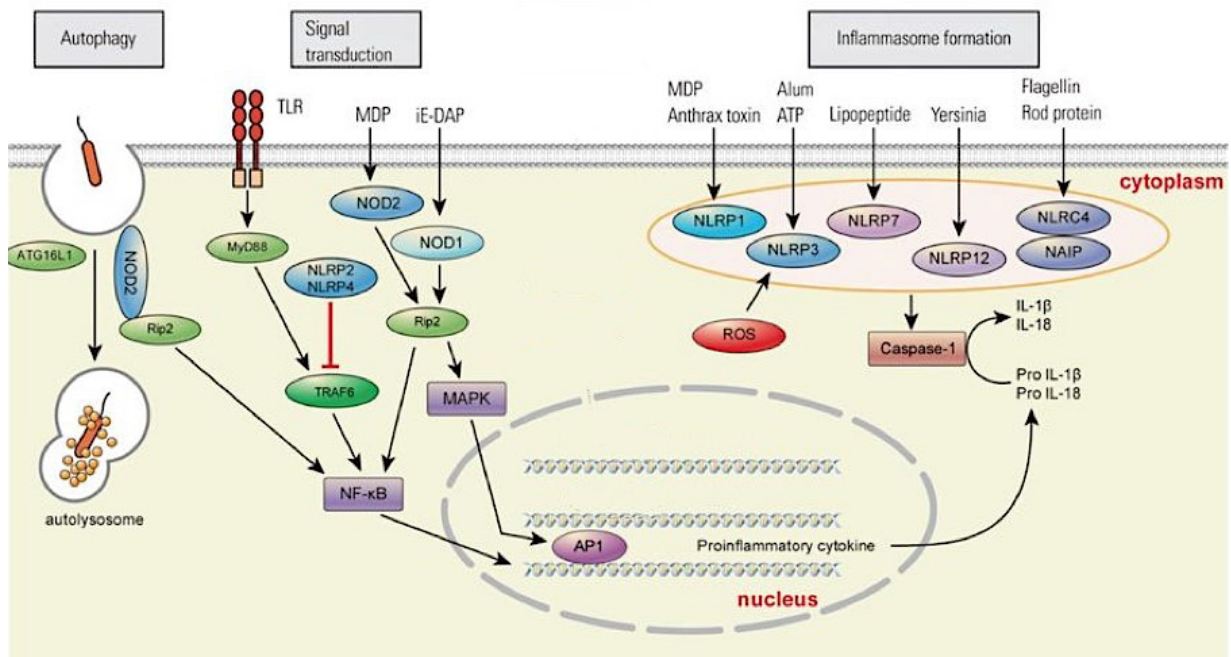


Figure 21 : Fonctions des récepteurs NOD-like (NLRs) ayant un rôle de PRR.

NOD2 induit l'autophagie des bactéries en recrutant *ATG16L1* à la membrane plasmique. *NOD1* et *NOD2* reconnaissent l'acide diaminopimélique (iE-DAP) et le muramyldipeptide (MDP) bactérien respectivement ; puis, ils activent les voies impliquant *NF-κB* et *MAP* kinase (*MAPK*) aboutissant à la production de cytokines proinflammatoires. *NLR2* et *NLR4* régulent négativement la voie de *NF-κB*. Les NLRs situés dans le cercle orange forment l'inflammasome et convertissent les procytokines en formes actives d'*IL-1β* et d'*IL-18* par activation de la *caspase-1* (Modifié d'après Kim et al, 2016 (141)).

3.4.3.3 Autophagie

Le processus d'autophagie est un mécanisme fondamental de l'homéostasie cellulaire au cours duquel la cellule autodigère une partie de son cytoplasme. Ce processus est utilisé par la cellule eucaryote pour éliminer des organelles ou des agents pathogènes. D'autres rôles biologiques qui dépassent le cadre de cette présentation sont également bien documentés : développement, vieillissement, dégénérescence, présentation d'antigènes via le MHC II (144). *NOD1* et *NOD2* peuvent induire l'autophagie d'agents pathogènes en recrutant la protéine membranaire *Autophagy-related 16-like-1* (*ATG16L1*) (145) (cf. **Figure 22**).

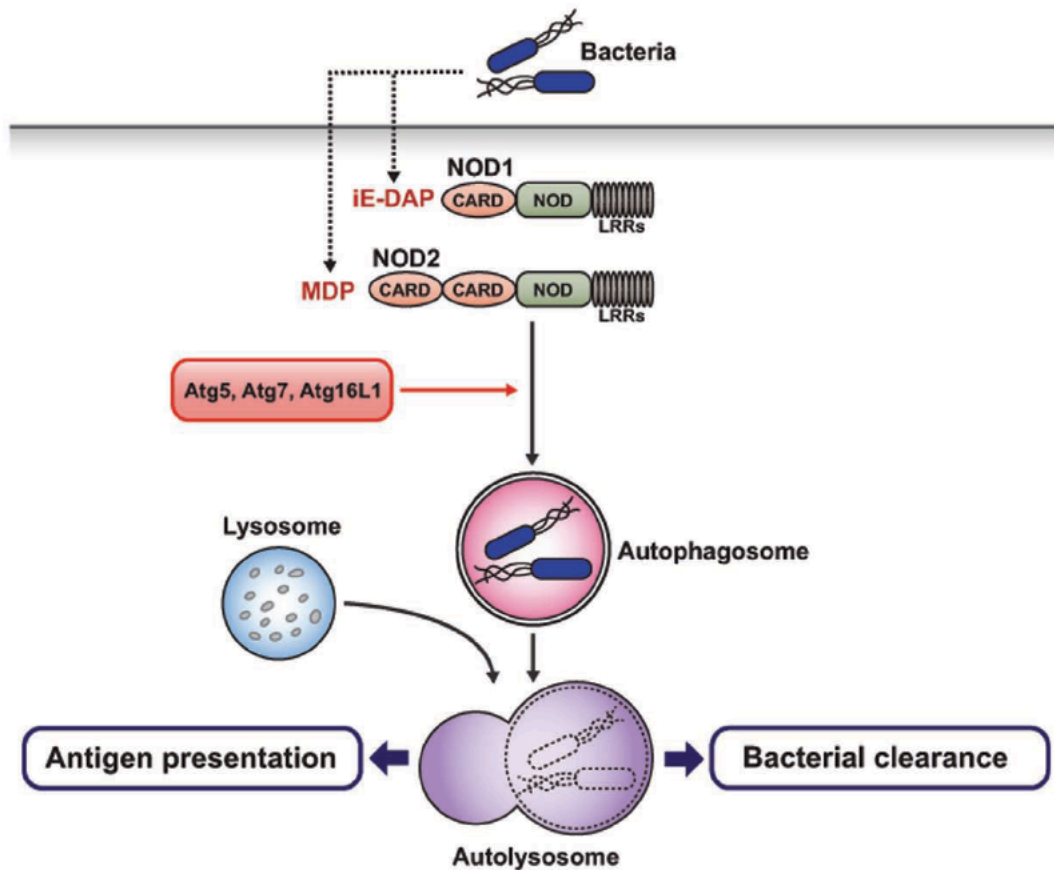


Figure 22 : Induction de l'autophagie par les récepteurs NOD-like.

L'extrémité C-terminale riche en leucine de NOD1 et NOD2 reconnaît les motifs bactériens acide diaminopimélique (iE-DAP) et le muramyldipeptide (MDP), respectivement, dans le cytosol. NOD1 et NOD2 induisent la formation de l'autophagosome après intervention des protéines Autophagy-related (ATG) 5, 7 et 16-like-1. Après fusion avec un lysosome, l'autolysosome élimine la bactérie et participe à la présentation de l'antigène en s'appuyant sur les molécules du MHC II (Oh et Lee, 2014 (146)).

3.4.3.4 Production de cytokines inflammatoires

NOD1 reconnaît l'acide diaminopimélique (iE-DAP) qui est un peptidoglycan de la membrane des bactéries Gram-négatif (147). NOD2 reconnaît le muramyldipeptide (MDP) de la membrane des bactéries Gram-négatif et Gram-positif (148). NOD1 et NOD2 activent les voies de NF- κ B et MAPK aboutissant à l'expression de cytokines proinflammatoires (147). Plus précisément, la dégradation de la protéine inhibitrice I κ B- α par phosphorylation et ubiquitination permet la libération de NF- κ B dans le cytosol et son passage jusqu'au noyau. NF- κ B induit alors l'activation de la transcription des gènes codant pour les cytokines proinflammatoires (149).

En revanche, NLRC3 et NLRP2/4 ont un effet de régulation négative de la voie impliquant NF- κ B en modifiant le TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) (150).

3.4.3.5 Formation de l'inflammasome

L'inflammasome est un complexe protéique multimérique qui active la caspase-1 (151). Cette dernière induit le processus de maturation des procytokines en IL-1 β et IL-18 ainsi que le processus de pyroptose qui désigne la mort cellulaire inflammatoire. La pyroptose conduit à la libération massive de DAMPs et au renforcement de la réponse immunitaire. L'inflammasome est activé par 8 membres des NLRs (NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12, NLRC4 et NAIP). La formation de l'inflammasome est initiée par des PAMPs bactériens, viraux, fongiques et protozoaires ainsi que par des DAMPs et des stimulants environnementaux (silice, radiation UV, ...) (151).

3.4.4 Les Toll-Like Receptors

Parmi les PRRs, les TLRs sont les mieux caractérisés. Le nom de TLR vient de l'homologie avec une famille de molécules retrouvée chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*), dont le principal membre est *Toll*.

La famille des TLRs comprend 10 membres (TLR1 – TLR10) chez l'humain et chez le chien alors que 12 membres sont identifiés chez la souris (152).

Les TLRs sont des récepteurs membranaires qui reconnaissent les PAMPs comme les lipides, les lipoprotéines, les protéines ou les acides nucléiques (136).

3.4.4.1 Structure générale et localisation des TLRs

Les TLRs sont des dimères associés en hétérodimères (TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6) ou en homodimères. Chaque TLR est composé d'un domaine externe, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine interne qui initie les voies effectrices de signalisation. Le domaine externe est riche en leucines. C'est le site d'interaction spécifique avec les PAMPs (153).

La partie interne (cytoplasmique) est constituée d'un domaine Toll/IL-1R (TIR) impliqué dans la transduction du signal. Le recrutement cytoplasmique de protéines contenant des domaines TIR telles que MyD88 et TRIF est à l'origine de l'activation des voies de signalisation impliquant NF- κ B, IRFs ou MAP kinase et aboutissant à l'expression de cytokines, de chimiokines ou d'IFN de type I. La localisation cellulaire est importante dans

la régulation de la signalisation. De même, les spécificités cellulaires des voies effectrices impliquées déterminent les particularités de la réponse immune innée.

Les TLRs sont exprimés dans les cellules immunitaires innées telles que les CD et les MΦ ainsi que les cellules non-immunitaires comme les fibroblastes et les cellules épithéliales. Les TLRs peuvent être scindés en 2 catégories selon leur localisation : la membrane cytoplasmique et la membrane des endosomes.

- Les TLRs de la membrane cytoplasmique incluent TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10
- Les TLRs localisés à la membrane des endosomes incluent TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 chez l'homme et le chien auxquels s'ajoutent TLR11, TLR12 et TLR13 chez la souris (154).

3.4.4.2 Reconnaissance des PAMPs par les TLRs

Les TLRs de la membrane cytoplasmique reconnaissent essentiellement les composés de la paroi microbienne comme les lipides, les lipoprotéines et les protéines (cf. **Tableau 4**). TLR4 reconnaît les LPS bactériens. TLR2 en combinaison avec TLR1 ou TLR6 reconnaît une variété de PAMPs comme les lipoprotéines, les peptidoglycanes, l'acide lipotéichoïque, le zymosane, les mannanes et le glycosylphosphatidylinositol (154). TLR5 reconnaît la flagelline des bactéries flagellées (136). Chez l'humain et le chien, TLR10 s'associe à TLR2 pour reconnaître les ligands issus de *Listeria* (155). TLR10 est également impliqué dans la reconnaissance du virus influenza A (156).

Les TLR de la membrane des endosomes (TLR3, 7, 8 et 9) reconnaissent les acides nucléiques bactériens et viraux ainsi que l'acide nucléique endogène comme lors de maladie auto-immune (157). TLR3 reconnaît l'ARN viral double brin, les petits ARN interférents et l'ARN endogène issu de la dégradation cellulaire (158). TLR7 est préférentiellement exprimé par les CD plasmacytoïdes et reconnaît l'ARN viral simple brin et l'ARN de *Streptococcus B* (159). TLR8 reconnaît l'ARN viral et bactérien (160). TLR9 reconnaît l'ADN bactérien et viral riche en motifs CpG non méthylés.

Tableau 4 : Principaux récepteurs Toll-Like (TLRs) identifiés et leurs ligands chez l'humain.

(Modifié d'après Kim et al, 2016 (141))

PRRs	Localisation	Principaux ligands	Provenance du ligand
TLR			
TLR1	Membrane plasmatique	Triacyl lipoprotéine	Bactérie
TLR2	Membrane plasmatique	Lipoprotéine	Bactéries, virus, parasites, antigènes du soi
TLR3	Endolysosome	ARN	Virus
TLR4	Membrane plasmatique	LPS	Bactéries, virus, soi
TLR5	Membrane plasmatique	Flagelline	Bactéries
TLR6	Membrane plasmatique	Diacyl lipoprotéine	Bactéries, virus
TLR7	Endolysosome	ARN	Bactéries, virus, soi
TLR8	Endolysosome	ARN	Bactéries, virus, soi
TLR9	Endolysosome	Motifs CpG	Virus, bactéries, protozoaires, soi
TLR10	Endolysosome	Inconnu	Inconnu

Globalement, la signalisation des TLRs peut être séparée en 2 grandes voies : la voie impliquant MyD88 et la voie impliquant TRIF :

- Voie de signalisation impliquant MyD88 : Cette voie concerne tous les TLRs sauf TLR3. Après l'activation d'un TLR, MyD88 forme un complexe avec un membre de la famille des IRAK kinases. Le complexe ainsi formé est nommé Myddosome (161). Au cours de la formation du Myddosome, IRAK4 active IRAK1 qui est ensuite autophosphorylé sur plusieurs sites et libéré (162,163). IRAK1 est associé au domaine RING de l'ubiquitine ligase TRAF6 qui favorise la polyubiquitination de TRAF6 lui-même et du complexe protéine kinase TAK1. TAK1 est un membre de la famille des MAPKKK (MAP kinase kinase kinase) et forme un complexe avec les sous-unités régulatrices TAB1, TAB2 et TAB3 qui interagissent avec les chaînes ubiquitines générées par TRAF6 et qui activent TAK1 (164,165). A son tour, TAK1 active la voie du complexe IKK-NF- κ B et la voie MAPK. TAK1 se fixe au complexe IKK via les chaînes ubiquitines ce qui permet la phosphorylation et l'activation d'IKK β . Le complexe IKK induit également la phosphorylation de la protéine inhibitrice d'NF- κ B, I κ B α . Cette dernière subit alors une dégradation par le protéasome permettant ainsi la translocation d'NF- κ B dans le noyau et l'induction de l'expression de gènes codants pour des protéines proinflammatoires (cf. **Figure 23**).
- Voie de signalisation impliquant TRIF : Cette voie concerne TLR3 (voie exclusive) et TLR4. TRIF interagit avec TRAF6 et TRAF3. TRAF6 recrute la kinase RIP-1 qui à son tour active le complexe TAK1 aboutissant à la libération d'NF- κ B, l'activation des MAPKs et l'induction de cytokines inflammatoires.

En revanche, TRAF3 recrute les kinases TBK1 et IKKi ainsi que NEMO pour la phosphorylation de IRF3. IRF3 forme alors un dimère qui est transloqué dans le noyau et qui induit l'expression des gènes codant pour les IFNs de type I (154).

Les E3 ubiquitine ligases de la famille Pellino sont impliquées dans la signalisation des TLRs (166). Pellino-1 est phosphorylée par TBK1/IKKi et facilite ainsi l'ubiquitination de RIP-1 puis l'activation d'NF- κ B par la voie TRIF (167). De plus, Pellino-1 régule l'activation d'IRF3 en fixant le facteur de transcription DEAF-1 qui favorise l'interaction entre IRF3 et le promoteur IFN β (166) (cf **Figure 23**).

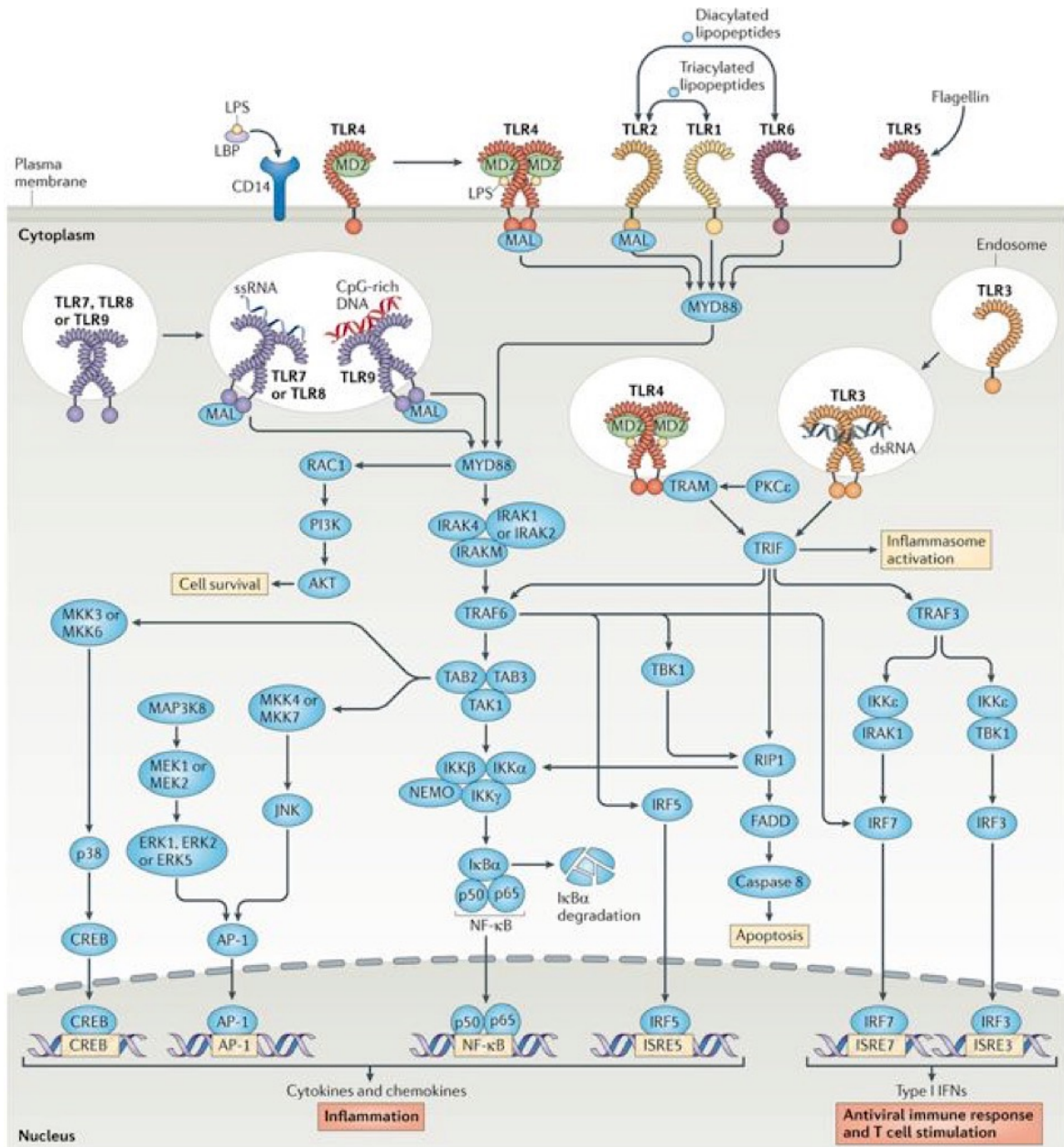


Figure 23 : Les 2 principales voies de signalisation des TLRs.

Les voies impliquant MyD88 sont utilisées par tous les TLRs excepté TLR3. La voie impliquant MyD88 donne lieu à l'activation des complexes MAPKK et IKK résultant en l'activation et la translocation nucléaire de AP-1 et NF-κB. TLR4 peut également induire la voie impliquant TRIF. Cette voie de signalisation est la seule possible pour TLR3. TRIF peut interagir avec TRAF6 de la voie MyD88-dépendante et aboutir à l'activation d'AP-1 et NF-κB. Elle peut également interagir avec RIP-1 et induire la formation de NF-κB. Egalement, TRIF peut interagir avec TRAF3 ce qui induit la translocation nucléaire de IRF3 et IRF7 (Modifié d'après Gay et al., 2014 (168)).

La structure de différents TLRs associés à leurs ligands respectifs a été déterminée par cristallographie. C'est le cas pour les LPS fixés à TLR4, les lipopeptides fixés à TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6, la flagelline fixée à TLR5, l'ARN double brin fixé à TLR3 et l'imidazoquinoline R848 fixé à TLR8 (169–171). Le dimère fixé à son ligand prend une forme de « M » qui permet la proximité entre l'extrémité C-terminale du domaine externe et la partie juxtamembranaire.

Le rapprochement de l'extrémité C-terminale de la partie juxtamembranaire permet la dimérisation du domaine TIR et l'initiation des voies de signalisation.

L'analyse cristallographique des complexes protéiques montre que les voies de signalisation reposent sur des interactions homo- et hétérotypiques entre les domaines TIRs et les protéines adaptatrices MyD88, MAL, TRIF ou TRAM. Les modélisations suggèrent que le domaine TIRs forme un homodimère symétrique au sein duquel se forme une boucle « BB » où les interactions moléculaires sont importantes (172). A titre d'exemple, les voies de signalisation de TLR4 peuvent impliquer MAL/MyD88 et TRAM/TRIF. Les modèles prévoient une fixation de MAL et TRAM aux mêmes sites symétriques formés à l'interface avec le dimère TIR. Il n'est pas connu si MAL et TRAM peuvent se fixer simultanément au domaine TIR. La fixation de MAL ou TRAM à TIR crée une nouvelle conformation dans laquelle MyD88 et TRIF peuvent s'insérer. La structure de ce complexe protéique fixant MyD88 ou TRIF n'est pas décrite ce qui peut signifier que les liaisons sont transitoires et/ou faibles (171). La structure cristalline des différents domaines TIRs suggère qu'il n'existe pas une dimérisation commune à tous les TLRs mais plutôt une spécificité de conformation qui correspond sans doute à une spécificité d'interaction et de fonction de chaque domaine TIR (173).

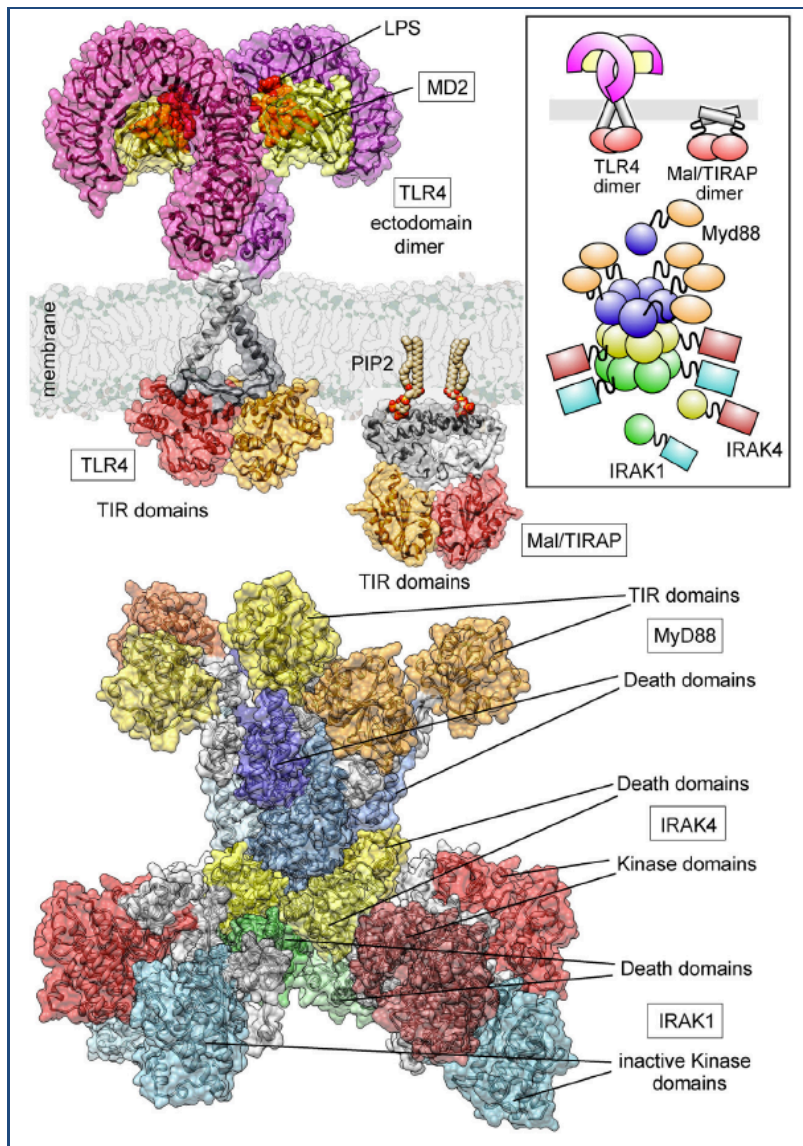


Figure 24 : Modélisation macromoléculaire de Toll-Like Receptor 4 (TLR4) et du Myddosome.

Le récepteur dimérique et le complexe Myddosome sont représentés schématiquement dans l'encadré en haut à droite et de manière plus réaliste dans l'image principale. Les différents domaines sont montrés avec des couleurs différentes (Bryant et al., 2015 (171))

En plus de son domaine TIR, MyD88 possède un *death domaine* (DD) à l'extrémité N-terminale. Après fixation du domaine TIR de MyD88 au domaine TIR du TLR, le DD change de conformation et peut ainsi recruter IRAK. Les études biophysiques montrent que le DD de MyD88 s'assemble avec IRAK-4 sous la forme du complexe stable nommé Myddosome. L'analyse cristallographique du Myddosome montre l'assemblage de six MyD88, quatre IRAK-4 et quatre IRAK-2DDs (171).

Encadré 1 : Organisation macromoléculaire des Toll-Like Receptors et des voies de signalisation.

3.4.4.3 Mécanismes de régulation des TLRs

La protéine aux multiples domaines transmembranaires UNC93B1 contrôle le trafic intracellulaire des TLRs du réticulum endoplasmique vers les endosomes. UNC93B1 régule la suractivation de TLR7 via l'action contre-régulatrice de TLR9. La protéine PRAT4 (Protein Associated with TLR4) intervient également dans le contrôle du trafic intracellulaire en régulant la sortie de TLR1, TLR2, TLR4, TLR7 et TLR9 du RE vers les endosomes ou la membrane plasmique (174). La protéine gp96 fonctionne comme une protéine chaperon pour la plupart des TLRs y compris les TLRs de la membrane cytoplasmique et les TLRs des membranes endosomales (175). Yang *et al.* montrent *in vitro* que les MΦ n'exprimant pas la protéine gp96 ne répondent pas aux ligands de TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, and TLR9. Ils montrent également que l'absence de réponse n'est pas due à une anomalie transcriptionnelle ou traductionnelle mais bel et bien à une perte de fonction des TLRs en l'absence de gp96 (175).

Dans les endosomes, les TLRs impliqués dans la reconnaissance d'acides nucléiques subissent un clivage protéolytique par les cathepsines B, S, L, H et K et par l'asparginyldopeptidase pour aboutir à leur conformation fonctionnelle (176).

Les deux voies de signalisation précédemment décrites interagissent entre elles et font l'objet de mécanismes de régulation :

- TLR4 active simultanément les voies impliquant MyD88 et celles impliquant TRIF. TRAF3 est incorporée dans le complexe MyD88 ainsi que dans le complexe TRIF lors de stimulation du TLR4. TRAF3 dans le complexe MyD88 est ensuite dégradé ce qui induit l'activation de TAK1. Par conséquent, en plus de son rôle de stimulation de la voie impliquant TRIF, TRAF3 inhibe la voie impliquant MyD88.

NRDP-1, une E3 ubiquitine ligase, fixe et ubiquitine MyD88 et TBK1 ce qui atténue la production de cytokines inflammatoires et induit une réponse préférentiellement axée sur la production d'IFN I (177).

Les molécules du MHC II localisées dans les endosomes des CPA activent la tyrosine kinase Btk via une costimulation avec le récepteur CD40. Btk activé interagit avec MyD88 et TRIF et promeut leur voie respective aboutissant à la production de cytokines inflammatoires et d'IFN I (178).

- Plusieurs récepteurs transmembranaires modulent la signalisation des TLRs. A titre d'exemple, CD14 agit comme co-récepteur de TLR4 et MD-2 pour la reconnaissance

des LPS. Il induit l'endocytose de TLR4 médiée par ITAM-Syk et PLC γ 2. La fusion avec les endosomes est à l'origine de l'activation des voies impliquant TRIF (179). CD14 est également impliqué dans les voies initiées par TLR7 et TLR9 (180).

- Les voies de signalisation des TLRs sont régulées négativement par un certain nombre de molécules et de voies régulatrices. Par exemple, la voie MyD88 est inhibée par ST2825, SOCS1 et Cbl-b. La voie TRIF est inhibée par SARM et TAG (181). Toutes ces molécules s'associent à MyD88 ou à TRIF pour inhiber la fixation aux TLRs et aux molécules effectrices. TRAF3 est régulé négativement par SOCS3 et DUBA (182). Les molécules inhibitrices de TRAF6 sont A20, USP4, CYLD, TANK, TRIM38 et SHP (183,184). TAK1 est inhibé par TRIM30 α et A29 (185). Par ailleurs, le facteur de transcription NF- κ B est inhibé par Bcl-3, I κ BNS, Nurr1, ATF3 et PDLIM2 alors qu'IRF3 est négativé par Pin1 et RAUL (186). La stabilité des ARNm codants pour les molécules de signalisation est régulée par les microARN comme miR-146a, miR-199a, miR-155, miR-126, miR-21, miR-29, miR-148/152 et miR-4661 (184). Egalement, la stabilité des ARNm codants pour les cytokines est régulée par Regnase-1 et TTP (184).

Les données mécanistiques sont essentiellement issues de modèles d'animaux de laboratoire et, pour certaines, de l'humain (cf. **Encadré 3**). Les mécanismes spécifiques au chien sont peu documentés.

Etude bibliographique

II

MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES

Comme l'humain, le chien développe des entéropathies chroniques (EC) caractérisées par des signes cliniques comme des vomissements, de la diarrhée, des borborygmes, de l'hyporexie, de la douleur abdominale, des nausées et/ou une perte de poids. Le diagnostic repose sur l'exclusion des causes extra-intestinales (maladie hépatique, pancréatique ou rénale, hypocorticisme et hypercalcémie), les causes infectieuses ou parasitaires et les maladies intestinales d'une autre origine (corps étranger, tumeur,...) (187).

L'objectif de cette partie est de faire le point sur les connaissances actuelles sur les MICI de l'homme et du chien, et de faire le lien avec les perturbations immunitaires qui accompagnent la maladie.

1 Classification des entéropathies chroniques du chien

La classification des entéropathies chroniques du chien a longtemps reposé sur le type lésionnel à l'examen histologique. Ainsi, on distinguait les entérites lymphoplasmocytaires (les plus fréquentes), des entérites éosinophiliques, des entérites neutrophiliques, des entérites granulomateuses. La limite de cette classification a été montrée par de nombreuses études qui constatent l'absence de lien entre le type lésionnel le plus fréquent (infiltration lymphoplasmocytaire) et l'éventuelle nécessité d'un traitement immunomodulateur (188). Pour cela, une classification reposant essentiellement sur la réponse thérapeutique est actuellement utilisée (cf. **Tableau 5**). Les EC peuvent donc être subdivisées rétrospectivement en :

1. Entéropathie répondant au changement alimentaire (FRE pour *Food Responsive Enteropathy*),
2. Entéropathie répondant aux antibiotiques (ARE pour *Antibiotic Responsive Enteropathy*),
3. Entéropathie répondant au traitement immunomodulateur (IRE pour *Immunomodulatory Responsive Enteropathy*),
4. Entéropathie réfractaire (189).

Cette classification a le mérite de pouvoir être utilisée en clinique quotidienne car elle reprend la démarche diagnostique et thérapeutique en pratique (cf II 3 Démarche diagnostique générale). Par exemple, la réponse au changement alimentaire est fréquente (47% des cas) lors de diarrhée chronique chez le chien mais il est rarement possible

d'identifier la raison de l'amélioration constatée (intolérance, allergie, modulation du microbiote, ...) (190).

Toutefois, certaines entités s'intègrent difficilement dans cette classification car elle ne tient pas compte des données lésionnelles ou mécanistiques lorsqu'elles sont connues. Par exemple, les entéropathies avec pertes de protéines (PLE pour *Protein Losing Enteropathy*) connaissent de nombreuses causes et peuvent répondre à un changement alimentaire, mais peuvent aussi relever d'un traitement immunomodulateur pour contrôler un processus inflammatoire ou relever d'une chimiothérapie anti-cancéreuse lors de lymphome digestif. Autre exemple, la colite granulomateuse des boxers et des bouledogues français (cf. **Encadré 2**) est une maladie inflammatoire dont les caractéristiques lésionnelles sont proches de la MC mais dont le traitement relève de l'antibiothérapie. *Stricto sensu*, la colite granulomateuse des boxers et des bouledogues français fait partie des entéropathies répondant aux antibiotiques. Toutefois, le processus diagnostique est nettement plus complexe que le simple essai de traitement.

Quand le terme de MICI est utilisé chez le chien, il implique que :

- Les causes extra-intestinales aient été écartées,
- Les causes infectieuses et parasitaires aient été écartées,
- Les causes non-inflammatoires (corps étranger ou tumeurs) aient été écartées,
- Les essais de changements alimentaires aient été effectués et qu'ils aient échoué,
- Un essai de traitement antibiotique ait été mené et qu'il ait échoué,
- Une infiltration inflammatoire du tube digestif ait été mise en évidence sur l'analyse des biopsies,
- Un traitement immunomodulateur soit nécessaire

Tableau 5 : Classification actuelle des entéropathies chroniques canines.

Abréviation	Signification	Caractéristiques
FRE	Food-Responsive Enteropathy	Amélioration clinique après changement alimentaire
ARE	Antibiotic-Responsive Enteropathy	Amélioration clinique avec le traitement antibiotique
PLE	Protein Losing Enteropathy	Mise en évidence d'une hypoalbuminémie sans pertes urinaires et sans insuffisance hépatique. Possibilité d'évaluer les pertes protéiques fécales en mesurant l'inhibiteur de la protéase- α 1 dans les selles.
MICI	Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin	<ul style="list-style-type: none"> • Bilan complet permettant d'écartier les causes extra-intestinales et intestinales de troubles digestifs chroniques (cf. Tableau 8). • Absence d'amélioration avec les essais diététiques et antibiotiques. • Confirmation d'une inflammation et exclusion d'une infiltration tumorale sur l'analyse des biopsies digestives. • Nécessité d'un traitement immunomodulateur. • Peut être sous-classée en IRE ou NRE
IRE	Immunomodulatory-Responsive Enteropathy	Amélioration clinique avec le traitement corticoïde ou autre immunomodulateur
NRE	Non-Responsive Enteropathy	Absence d'amélioration clinique avec le traitement corticoïde ou autre immunomodulateur.

Chez l'humain, les MICI comprennent la Maladie de Crohn (MC) et la Recto-Colite Hémorragique (RCH). Les causes exactes des MICI chez l'humain et chez le chien sont inconnues. Il a été proposé que leur physiopathologie implique certainement une réponse immunitaire inadaptée envers des antigènes commensaux du microbiote chez des individus génétiquement prédisposés (191). À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif. La maladie est gérée par une combinaison de traitements immunomodulateurs, des adaptations diététiques, des antibiotique et parfois une résection chirurgicale.

2 Aspects cliniques

2.1 Symptômes

Les manifestations cliniques des MICI sont assez variées et peu spécifiques.

Chez le chien, les signes sont influencés par la phase active ou inactive de la maladie et par la survenue de complications telles que des pertes protéiques digestives et/ou un déficit en cobalamine (192). Les vomissements et la diarrhée sont les signes les plus fréquemment observés et ils sont parfois accompagnés d'une diminution de l'appétit et d'une perte de poids. L'inflammation gastrique et duodénale est plus souvent associée à des vomissements et de la diarrhée liquide. L'inflammation colique est plus fréquemment associée à une

diarrhée bouseuse, de l'hématochézie, du mucus, du ténesme et de l'épreinte. Les maladies affectant à la fois le côlon et l'intestin grêle induisent généralement des signes gastro-intestinaux mixtes. Les entérites graves peuvent être à l'origine de pertes protéiques plasmatiques qui entraînent de l'ascite, de l'épanchement pleural et/ou des œdèmes périphériques déclives (193). Un prurit est sporadiquement rapporté (194).

L'expression clinique de la maladie est généralement cyclique et caractérisée par des phases d'exacerbation spontanée et de rémission. Les facteurs à l'origine des phases d'aggravation ne sont que rarement identifiés mais un changement alimentaire, l'exposition à un agent pathogène ou à un médicament sont parfois impliqués.

Chez l'humain, les symptômes de MC sont assez variables et incluent habituellement de la douleur abdominale, une perte de poids et une diarrhée chronique. Des signes systémiques comme de l'anorexie sont assez fréquents. Des signes nocturnes, des manifestations extra-intestinales concernant la bouche, la peau, les yeux ou les articulations, des épisodes d'abcès ou de fissures anales sont possibles (3).

Les symptômes de RCH dépendent de l'étendue et de la gravité de la maladie et incluent une diarrhée hémorragique, des saignements rectaux, du ténesme et des défécations impérieuses voire de l'incontinence fécale. Des défécations nocturnes et une importante fatigue sont fréquemment rapportées. Une augmentation de la fréquence des défécations, de la douleur abdominale, de l'anorexie et de la fièvre peuvent être présents dans les cas graves. Une arthropathie axiale ou périphérique, une épisclérite et un *erythema nodosum* accompagnent les signes cliniques dans 10 à 20 % des cas et peuvent précéder les symptômes digestifs chez 10 % des patients (195).

2.2 Index d'activité clinique de la maladie

La description clinique de la maladie est une étape importante permettant de la caractériser. Les index cliniques sont les plus largement utilisés chez l'humain et chez le chien. Ils évaluent l'intensité de la maladie au moment du diagnostic et permettent d'apprécier la réponse au traitement et d'évaluer le pronostic (196). La plupart des index cliniques validés chez l'homme et chez le chien reposent sur des paramètres similaires comme présentés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Comparaison des index cliniques utilisés chez l'humain et chez le chien atteints de MICI.

CCECAI : Canine Chronic Enteropathy Clinical Activity Index ; CDAI : Crohn Disease Activity Index ; SCCAI : Simple Clinical Colitis Activity Index; NA: Non applicable. (197–199)

Items	MICI Chien		MC humain	RCH humain
	CIBDAI	CCECAI	CDAI	SCCAI
Selles	Fréquence Consistance	Fréquence Consistance	Nombre de selles liquides/très molles (7 derniers jours) Nécessité d'avoir recours aux traitements anti-diarrhéiques (7 derniers jours)	Fréquence de défécation le jour Fréquence de défécation la nuit Présence de sang
<i>Autres signes digestifs</i>	Vomissements	Vomissements	Douleur abdominale : intensité journalière (7 derniers jours) Présence d'une masse abdominale	–
Poids	Perte de poids	Perte de poids	Pourcentage de déviation par rapport au poids standard	–
Répercussion générale	Etat général/ Activité Appétit	Etat général/ Activité Appétit	Etat général (7 derniers jours)	Etat général
Signes extra-digestifs	NA	Ascite/Oedème Prurit	Présence de signes extra-digestifs : arthrite, uvéite, stomatite aphteuse, érythème noueux, pyoderma gangrenosum, fièvre > 38°C, fissure, fistule ou abcès anaux ou périnéaux, ...	Anomalies extra-coliques : arthrite, uvéite, stomatite aphteuse, érythème noueux, pyoderma gangrenosum
Analyses biologiques	NA	Albumine sérique	Hématocrite (<0.47 chez l'homme, 0.42 chez la femme)	–

Chez le chien, le premier index validé par Jergen et *al.* en 2006 est le CIBDAI (Canine Inflammatory Bowel Disease Activity Index). Il attribue une note entre 0 et 3 à 6 paramètres cliniques (état général, appétit, vomissements, consistance des selles, fréquence des selles et perte de poids) selon l'importance du changement (cf. [Figure 25](#)). La somme des notes fournit le score CIBDAI et permet de classer la MICI en cliniquement non significative, faible, modérée ou importante. Les auteurs montrent une corrélation entre le score et

l'augmentation de la protéine C réactive (CRP) et recommandent l'utilisation du score CIBDAI pour le suivi des MICI.

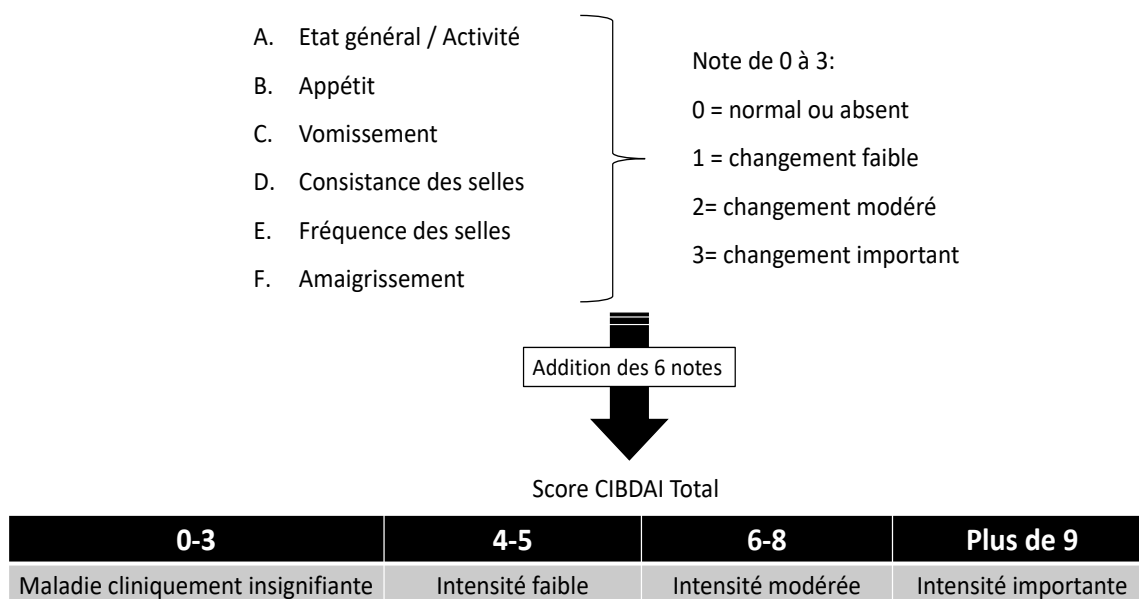


Figure 25 : Modalités de calcul du score CIBDAI.

(Jergen et al., 2003 (200)).

En 2007, Allenspach et *al.* élargissent l'utilisation du CIBDAI à l'ensemble des entéropathies chroniques et proposent de l'incrémenter de 3 paramètres supplémentaires (présence de prurit, présence d'œdème périphérique ou d'ascite, présence d'une hypoalbuminémie) (cf. **Tableau 7**). Ce nouveau score nommé CCECAI (Canine Chronic Enteropathy Clinical Activity Index) est utilisé quelle que soit la nature de l'entéropathie chronique. La somme des notes fournit le score CECCAI et permet de classer l'EC en cliniquement non significative, faible, modérée ou importante.

Tableau 7 : Détail des 9 paramètres utilisés pour le calcul du score CCECAI.
(Allenspach et al., 2007 (197)).

Etat général / Activité 0 normal 1 faiblement diminué 2 modérément diminué 3 gravement diminué	Perte de poids 0 absence 1 faible (<5%) 2 modérée (5–10%) 3 importante (>10%)
Appetit 0 normal 1 faiblement diminué 2 modérément diminué 3 gravement diminué	Prurit 0 absence 1 occasionnel 2 régulier mais s’interrompt pendant le sommeil 3 régulier y compris pendant le sommeil
Vomissements 0 aucun 1 peu fréquents (1/semaine) 2 fréquents (2–3/semaine) 3 très fréquents (>3/semaine)	Ascite et/ou œdèmes périphériques 0 absence 1 ascite et/ou œdèmes périphériques discrets 2 ascite et/ou œdèmes périphériques modérés 3 ascite et/ou œdèmes périphériques importants
Consistance des selles 0 normale 1 faiblement altérée 2 modérément altérée 3 gravement altérée	Albuminémie 0 albumine >20g/L 1 albumine 15–19.9 g/L 2 albumine 12–14.9 g/L 3 albumine <12 g/L
Fréquence des selles 0 normale 1 faiblement augmentée (2-3/jour) ou présence de sang/mucus 2 modérément augmentée (4-5/jour) 3 gravement augmentée (>5/jour)	

Le CCECAI présente un intérêt diagnostique et pronostique car il permet de classer les EC en 2 catégories :

- Les EC à score CCECAI bas (< ou =12) qui sont plus fréquemment des FRE, des ARE ou des IRE dont le pronostic est favorable
- Les EC à score CCECAI élevé (>12) qui sont plus fréquemment des IRE, des entéropathies avec pertes de protéines, des tumeurs. Le pronostic est plus réservé (194).

Chez l’humain, plusieurs index cliniques sont utilisées pour la MC. La classification clinique de Montréal repose sur trois paramètres/items : l’âge d’apparition des signes, la localisation des lésions et le comportement de la maladie (198).

Une seconde classification est basée sur la réponse thérapeutique (Répondant ou non aux corticoïdes).

Le CDAI (Crohn's Disease Activity Index) présente des similitudes avec le CCECAI utilisé chez le chien (cf. **Tableau 6**) (199). A la différence du chien, certains paramètres comme la présence de selles liquides ou très molles, la nécessité du recours aux médicaments anti-diarrhéiques, la présence d'une douleur abdominale et l'état général sont évalués sur la période des sept derniers jours.

D'autres index sont utilisés pour évaluer l'activité de la RCH. Le SCCAI (Simple Clinical Colitis Activity Index) fait appel uniquement à des paramètres cliniques (cf. **Tableau 6**) (201).

3 Démarche diagnostique générale des MICI du chien

En toute rigueur, la prise en charge diagnostique d'un chien présentant des signes d'EC explore toutes les causes connues de troubles digestifs chroniques. Une liste de maladies pouvant entraîner des signes d'EC est présentée dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Causes de troubles digestifs chroniques chez le chien et moyens d'exploration.

Catégorie	Maladie	Moyen d'exploration
Causes métaboliques	Maladie rénale avancée	Mesure des concentrations sanguines d'urée et de créatinine
	Insuffisance hépatique	Mesures des paramètres sanguins fonctionnels hépatiques (albumine, urée, cholestérol, acides biliaires, ...)
	Insuffisance pancréatique exocrine	Mesure de la Trypsine Like Immunoreactivity (TLI)
	Maladie d'Addison	Test de stimulation à l'ACTH avec mesure du cortisol
	Hyperthyroïdie	Dosage sanguin de la T4t ou T4l
Parasitoses	Parasitoses digestives (Trichurose, giardiose, coccidiose, ...)	Analyses coprologiques + traitement antiparasitaire large spectre (fenbendazole)
Entéropathies inflammatoires	Entéropathie répondant aux changements alimentaires	Changements alimentaires
	Entéropathie répondant au métronidazole	Métronidazole 12,5 mg/kg BID
	Entéropathie répondant aux immunomodulateurs	Prednisolone, ciclosporine, ...
Entéropathies avec pertes de protéines	Lymphangiectasie, cryptite d'origine inflammatoire, tumorale ou infectieuse	Dosage sanguin de l'albuminémie, mesure fécale de l' α 1-PI, biopsies digestives
Entéropathie tumorale	Tumeur	Echographie, ponction, biopsie

Les examens complémentaires suivants trouvent leur place dans la démarche diagnostique :

- L'analyse coprologique : l'analyse coprologique par flottation présente l'avantage d'explorer l'ensemble des causes parasitaires (protozoaires, cestodes, nématodes, ...). L'excrétion parasitaire pouvant être intermittente, une meilleure sensibilité de détection des parasites est obtenue en renouvelant les prélèvements et les analyses pendant 3 jours consécutifs. Certains agents parasitaires peuvent faire l'objet de recherche spécifique comme *Giardia sp.* dont il est possible de détecter un antigène de surface grâce au test ELISA rapide disponible commercialement (Idexx Snap

Giardia® par exemple). En pratique, il n'est pas toujours possible de réaliser les 3 prélèvements recommandés. Dans ce cas, l'exclusion des causes parasitaires s'appuie sur la combinaison d'une unique analyse coprologique par flottation et l'administration d'un traitement anti-parasitaire empirique large spectre comme le fenbendazole (50 mg/kg/j pendant 5 jours consécutifs).

- L'analyse sanguine est une étape diagnostique importante car elle permet 1) d'exclure les causes métaboliques, 2) d'identifier les entéropathies avec pertes de protéines (albuminémie < 20g/L) et 3) d'évaluer les répercussions de l'entéropathie (déshydratation, hypocalcémie, hypocobalaminémie, ...). Concrètement, l'examen hématologique peut mettre en évidence une anémie ferriprive (hypochrome microcytaire) évocatrice de saignement chronique (notamment digestif) ou une anémie d'inflammation, modérée, peu régénérative évocatrice d'un phénomène inflammatoire à répercussions systémiques. Une éosinophilie oriente vers une parasitose, une allergie alimentaire, une maladie d'Addison, une mastocytose (cutanée, hépatique ou splénique) ou une MICI éosinophilique. Une thrombocytose est fréquente lors de saignements chroniques. La mesure du TLI (Trypsinogen-Like Immunoreactivity) permet d'explorer l'hypothèse d'insuffisance pancréatique exocrine. Une hypocobalaminémie (vitamine B12) < 200 ng/L peut être présente lors d'IPE, de lésion iléale distale ou de dysbiose intestinale. Une hyperfolatémie > 12 µg/L est observée lors de dysbiose intestinale. L'hypofolatémie est possible lors de lésion de l'intestin grêle proximal (duodénum).
- Les changements alimentaires font partie intégrante de la démarche diagnostique car ils permettent de diagnostiquer les FRE. Des essais cliniques randomisés montrent que l'utilisation d'un régime d'éviction (protéines animales rares, protéines végétales fragmentées) permet une amélioration durable des signes lors de FRE (202). Walker *et al.* ont examiné les changements pathologiques de biopsies duodénales de chiens atteints de FRE avant et après traitement avec un aliment à base de protéines hydrolysées (203). Précisément, les auteurs analysent les modifications histopathologiques, immunohistochimiques et ultrastructurales en microscopie électronique et démontrent une diminution du score moyen des cellules mononucléées (bien que le score histologique global reste identique) et une amélioration significative des lésions ultrastructurales des entérocytes dans les 6

semaines qui suivent le changement de régime. D'autres études ont comparé le score histologique et le nombre de cellules CD3⁺ avant et après résolution clinique chez le chien souffrant de FRE et aucune évolution significative n'a été observée (188,194). Ces résultats mettent en évidence l'intérêt limité du suivi endoscopique et histologique lors de FRE chez le chien.

Il n'existe pas de recommandation nutritionnelle ayant fait l'objet d'une validation rigoureuse mais, en pratique, le schéma proposé dans la **Figure 26** est utilisé. Il est couramment admis qu'un recul de 10 jours après la fin de la transition alimentaire est suffisant pour évaluer l'efficacité du changement.

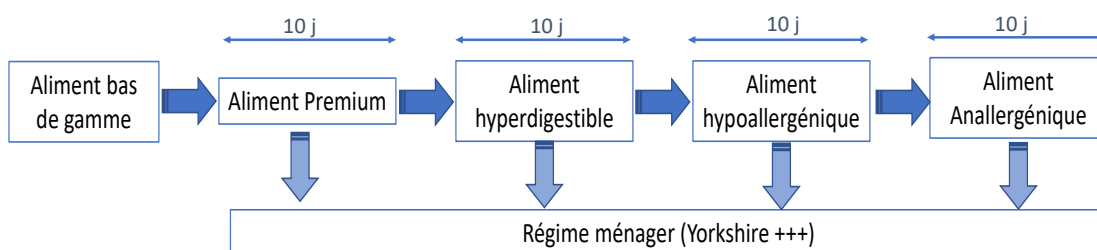


Figure 26 : Proposition de schéma de prise en charge nutritionnelle lors d'entéropathie chronique chez le chien.

Une publication regroupant 11 Yorkshire terriers atteints d'entéropathie avec pertes de protéines fait état d'une réponse favorable avec le seul changement alimentaire. Une transition vers un régime ménager est privilégiée dans cette étude (204).

- Le traitement métronidazole fait également partie intégrante du processus diagnostique car il permet d'identifier les ARE. Les antibiotiques sont souvent utilisés comme traitement de deuxième intention après l'échec des changements alimentaires. L'oxytétracycline, le métronidazole et la tylosine étaient les plus utilisés. L'efficacité de la tylosine a été confirmée lors d'un essai clinique prospectif en double aveugle (205). Le rôle exact de l'antibiotique reste incertain, mais ses effets bénéfiques reposent sans doute sur la modulation du microbiote. Après l'arrêt du traitement antibiotique, les rechutes sont fréquentes (12 animaux sur 14 dans l'étude de Westermarck *et al.* (206)). La prise de conscience de la nécessité de limiter l'utilisation des antibiotiques pour prévenir l'antibiorésistance amène à se restreindre désormais à l'utilisation du métronidazole (12,5 mg/kg BID pendant 1 mois). En cas de rechute, il convient alors de s'interroger sur la nécessité d'un traitement plus long

ou sur la nécessité de recourir à d'autres modalités de traitement de la dysbiose (prébiotiques, probiotiques, transplantation de microbiote).

- L'examen échographique abdominal est une étape cruciale si les premières étapes n'ont pas permis d'identifier le processus causal. L'épaississement de la paroi intestinale est le signe le plus fréquemment rencontré lors de processus inflammatoire. Ce signe est peu spécifique. La symétrie de l'épaississement, son extension et la préservation ou non de la structure en couches sont des paramètres permettant d'orienter vers une lésion inflammatoire ou vers une lésion tumorale. Les lésions inflammatoires sont en général caractérisées par un épaississement pariétal peu marqué, étendu, symétrique avec conservation de la structure en couches. La présence de ponctuations hyperéchogènes dans la muqueuse grêle est un signe en faveur de l'origine inflammatoire (207). L'aspect festonné des intestins est souvent associé à un processus inflammatoire. On observe ce signe lors d'entérite mais il est également présent lors de pancréatite, de péritonite, de tumeur abdominale ou d'ischémie intestinale. Dans les cas d'entérite très importante, on peut observer une perte de la structure en couche. L'épaississement de la musculature peut être présent lors d'entérite chronique mais ce signe est peu spécifique et peut être présent lors de lymphome notamment. La présence de stries hyperéchogènes perpendiculaires à la lumière digestive ou de foyers nodulaires hyperéchogènes situés dans la muqueuse représentent le plus probablement des lésions de lymphangiectasie (208). La présence concomitante d'un épanchement est fréquente lors d'entéropathie avec pertes de protéines.
- La réalisation de biopsies digestives est nécessaire lorsque les étapes précédentes n'ont pas permis d'identifier une cause et de la traiter. Si les signes associent des troubles gastriques (vomissements, appétit pour l'herbe, léchage compulsif, bâillements excessifs, position de la prière...), l'exploration endoscopique par voie haute s'impose. Si les signes sont principalement coliques (selles bouseuses, glaires, sang en nature,...) l'exploration endoscopique par voie basse est indiquée. Quand les signes évoquent une atteinte de l'intestin grêle, l'accès peut être obtenu par voie haute (duodénum) et par voie basse (iléon). Les lésions sont souvent réparties de manière non uniforme et le choix peut être guidé par l'aspect échographique. En l'absence d'élément discriminant, une double exploration gastro-duodénale et iléo-colique est

indiquée. Si les lésions sont pariétales profondes (couche musculuse par exemple) ou segmentaires à l'échographie, des biopsies transpariétales étagées réalisées à la faveur d'une laparotomie sont recommandées.

La séquence d'exploration d'une EC chez le chien peut être guidée par l'intensité clinique de la maladie. Le schéma de la [Figure 27](#) propose la démarche adoptée au sein de la consultation de Médecine interne du Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Oniris.

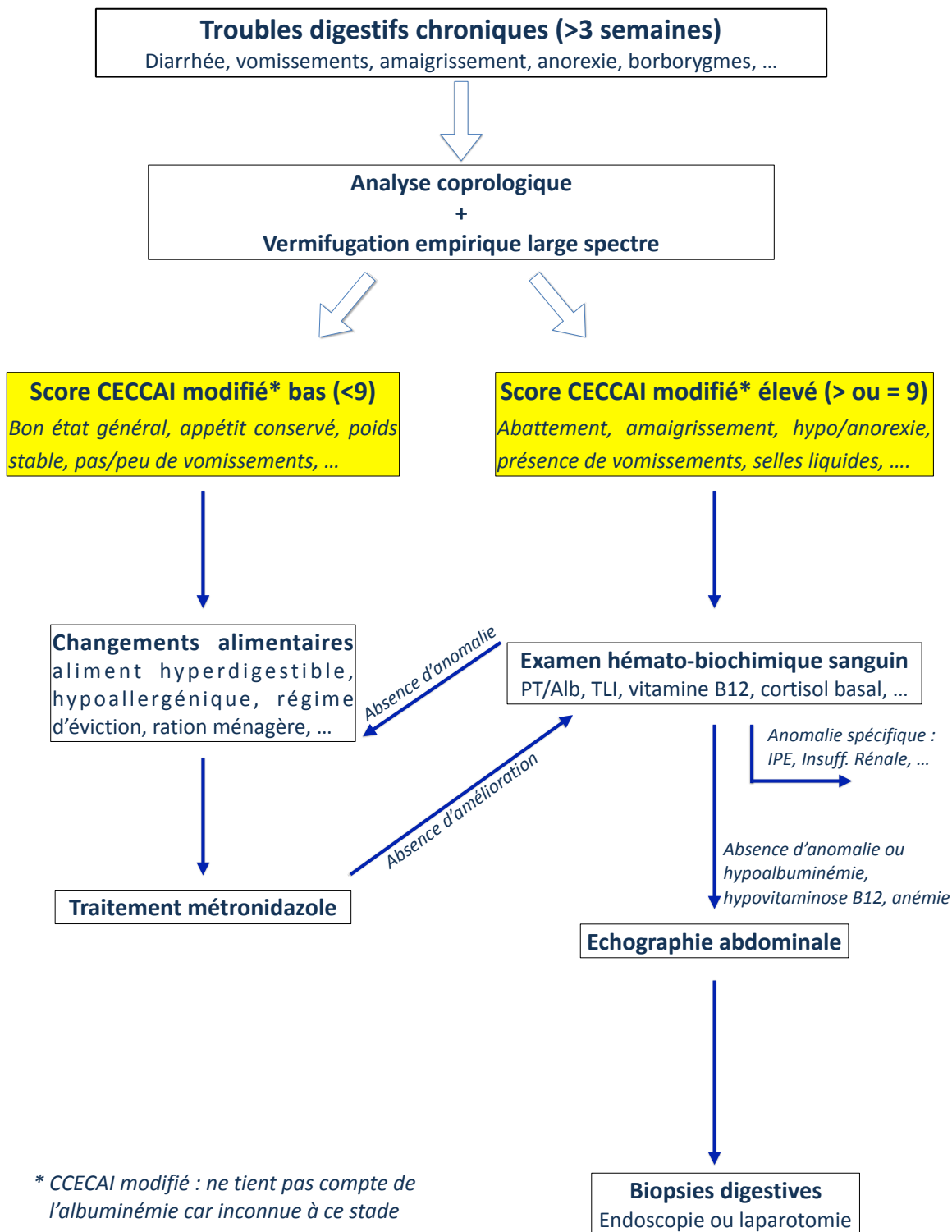


Figure 27 : Démarche diagnostique lors de troubles digestifs chroniques chez le chien.
IPE : Insuffisance Pancréatique Exocrine.

4 Aspects endoscopiques

Que ce soit chez l'humain ou le chien, l'évaluation endoscopique est incontournable pour réaliser les biopsies nécessaires à l'élimination de l'hypothèse tumorale et confirmer l'infiltration inflammatoire.

Chez le chien, l'examen endoscopique est indiqué chez les animaux ne répondant pas aux essais diététiques et antibiotiques. Les biopsies servent alors à 1) écarter un processus tumoral diffus comme un lymphome et 2) confirmer et évaluer l'inflammation intestinale (192). Ce processus diagnostique souffre quelques exceptions comme les animaux très gravement atteints (lors d'hypoalbuminémie grave par exemple) chez qui le temps de faire des essais thérapeutiques n'est pas permis ou ceux chez qui une origine tumorale ou infectieuse atypique (colite granulomateuse des boxers et des bouledogues français, pythiose, ...) est fortement suspectée.

Les observations endoscopiques les plus communément rapportées chez le chien atteint de MICI sont une friabilité excessive, une granularité excessive ou des érosions de la muqueuse (209) (cf. **Figure 28**).

Les lésions peuvent être diffuses ou focales. À ce jour, il n'existe pas d'index endoscopique permettant d'évaluer les MICI du chien et les recommandations de la World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) indiquent de décrire l'apparence de la muqueuse en termes de friabilité, granularité, érosion, hyperémie, dilatation lymphatique et la présence éventuelle de masse (210). L'association entre les lésions endoscopiques et l'activité clinique de la maladie n'a été que peu explorée à ce jour en médecine vétérinaire (210).

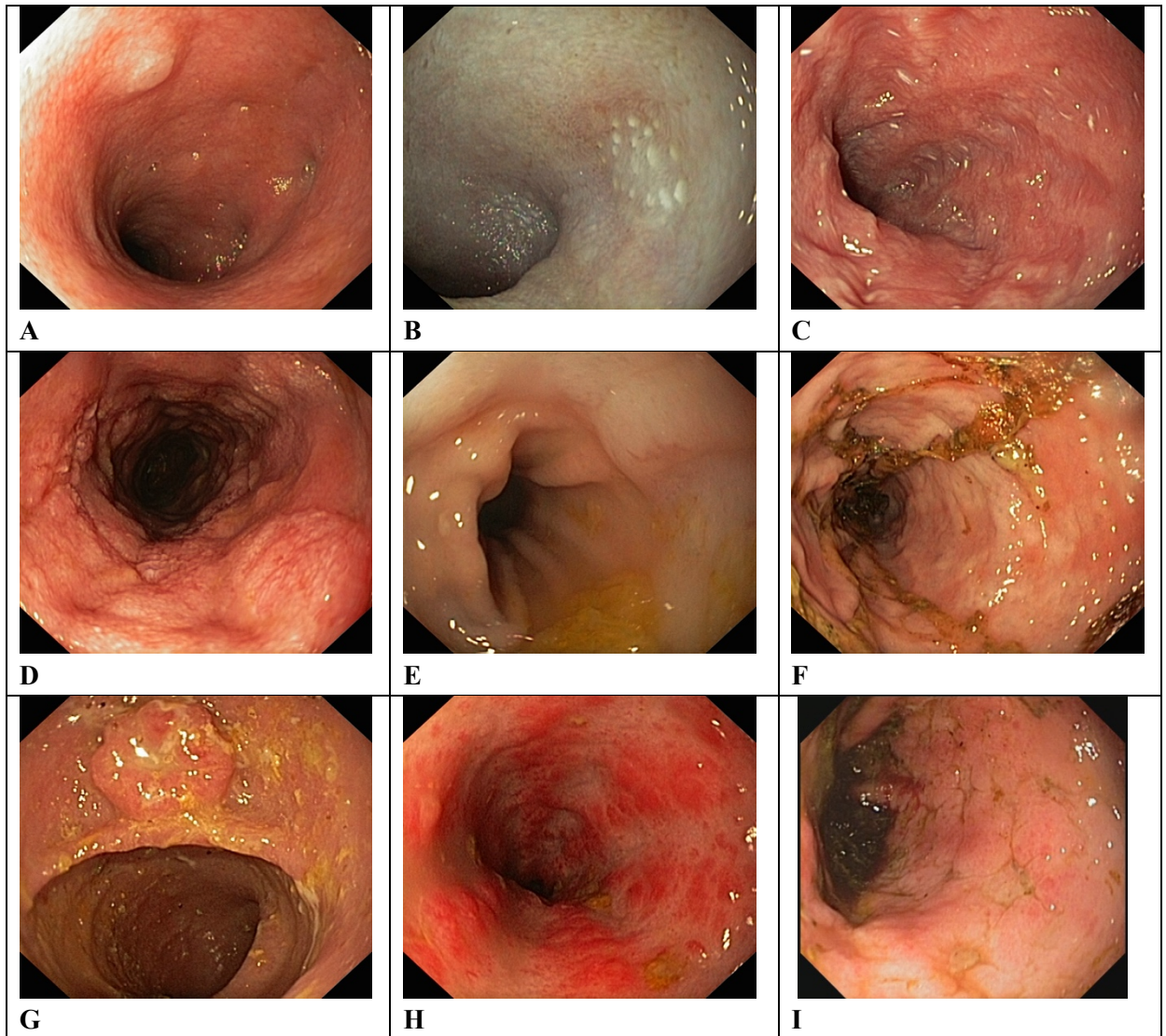


Figure 28 : Planche d'images endoscopiques duodénales et coliques chez le chien.

A) Aspect endoscopique normal du duodénum. La granularité est normale. La papille pancréatico-duodénale est visible en haut à gauche. Les dépressions correspondent aux plaques de Peyer. B) Aspect endoscopique normal d'une plaque de Peyer. Noter la dépression et les ponctuations blanchâtres. C) Aspect endoscopique d'une duodénite chronique. La muqueuse est très irrégulière. La granularité est excessive. Présence de petites spicules blanchâtres évoquant la présence de lésions de lymphangiectasie. L'analyse des biopsies endoscopiques a montré la présence d'une infiltration lymphoplasmocytaire avec lymphangiectasie. D) Aspect endoscopique d'une duodénite chronique. La surface est également irrégulière et la granularité augmentée. L'analyse des biopsies a montré la présence d'une infiltration éosinophilique. E) Aspect endoscopique normal du côlon de chien. La muqueuse est lisse et homogène. F) Aspect endoscopique d'une colite chronique. La muqueuse est irrégulière et de coloration très hétérogène. L'analyse des biopsies a montré une colite lymphoplasmocytaire. G) Aspect endoscopique de la jonction iléo-caeco-colique. Les biopsies iléales peuvent être obtenues par cathétérisme de la valvule iléo-colique. H) Aspect endoscopique d'un lymphome colique. La muqueuse est irrégulière et présente des lésions très rouges, surélevées et rigides à la prise de biopsies. L'analyse histologique a montré une infiltration de la lamina propria par une population lymphoïde monotone avec exocytose épithéliale importante. I) Aspect endoscopique d'une colite ulcéraive chez un boxer. (Crédit photo : J. Hernandez)

Chez le patient humain, l'endoscopie aide à la distinction entre MC et RCH et les observations endoscopiques sont utilisées pour évaluer la gravité de la maladie (211).

Lors de MC, la répartition des lésions est souvent hétérogène. Les atteintes iléales terminales ou anales sont les plus fréquentes. A la différence de la RCH, la MC est souvent associée à des complications de sténose, d'abcès ou de fistule péritonéale. Les ulcères de la MC tendent à être longitudinaux et sont souvent associés à un aspect en « nid d'abeille » de l'iléon ou du côlon. La région rectale est souvent épargnée. La prise de biopsies sur les bords des ulcères ou des érosions augmente la probabilité d'identifier les lésions granulomateuses typiques de la maladie. Les index endoscopiques SES-CD (Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease) et CDEIS (Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity) sont communément utilisés en soin courant (212).

Lors de RCH, les lésions endoscopiques débutent typiquement proximale à la marge anale. Elles s'étendent de manière continue, confluyente et concentrique. La démarcation entre la zone inflammée et la zone normale est souvent nette (213). Une muqueuse friable, des saignements spontanés et des ulcérations sont observés lors de RCH grave (214). Le UCEIS (Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity) est le premier score endoscopique permettant d'évaluer la gravité des lésions lors de RCH (215).

5 Aspects histologiques

Chez le chien, l'analyse histologique des biopsies est nécessaire pour établir un diagnostic définitif. Une infiltration inflammatoire minimale à marquée de la muqueuse gastrique et/ou intestinale éventuellement associée à des perturbations architecturales caractérisent la maladie. À cause de la grande variabilité d'interprétation inter-observateur, des efforts de standardisation ont été menés par la WSAVA (216). Des monographies listent les anomalies morphologiques de la muqueuse et décrivent la nature et l'intensité de l'infiltrat inflammatoire (217). Malgré tout, la corrélation entre pathologistes est faible et l'intensité histologique des lésions ne corrèle pas avec l'intensité de la maladie (192). Très récemment (2019), Allenspach *et al.* publient le *Simplified Histopathologic Scoring System for Gastrointestinal Inflammation* qui corrèle avec les scores CIBDAI et CCECAI (218). Ce nouveau score histologique donne un poids important aux anomalies morphologiques (fibrose, dilatation des cryptes, raccourcissement des villosités, dilatation des chylifères, lésions épithéliales) (cf. **Tableau 9**).

Tableau 9 : Paramètres évalués par le *Simplified Histopathologic Scoring System for Gastrointestinal Inflammation*.
(Allenspach *et al.* 2019 (218))

Localisation	Paramètres histologiques
Estomac	Fibrose Lymphocytes intraépithéliaux Infiltration de la <i>lamina propria</i> par lymphocytes/plasmocytes, éosinophiles, neutrophiles et/ou macrophages
Duodénum et iléon	Atrophie villositaire Dilatation des cryptes Dilatation des chylifères Lésions épithéliales superficielles Infiltration de la <i>lamina propria</i> par lymphocytes/plasmocytes, éosinophiles, neutrophiles et/ou macrophages
Côlon	Dilatation des cryptes Fibrose Nombre de cellules caliciformes Lésions épithéliales superficielles Infiltration de la <i>lamina propria</i> par lymphocytes/plasmocytes, éosinophiles, neutrophiles et/ou macrophages

Histologiquement, les MICI canines peuvent être classées selon le type cellulaire inflammatoire prédominant dans la *lamina propria* et selon la localisation anatomique.

La forme la plus fréquemment rapportée est caractérisée par une augmentation des lymphocytes T CD3⁺ et des plasmocytes IgA⁺ et IgG⁺ dans la *lamina propria* et une augmentation des lymphocytes T CD3⁺ intra-épithéliaux (219–222). Ces observations caractérisent les entérites lymphoplasmocytaires.

Les formes éosinophiliques sont nettement plus rares ; elles représentent moins de 10% des cas (192).

Les formes neutrophiliques sont très occasionnelles et amènent à rechercher une cause infectieuse. Des entérites mixtes sont également rapportées.

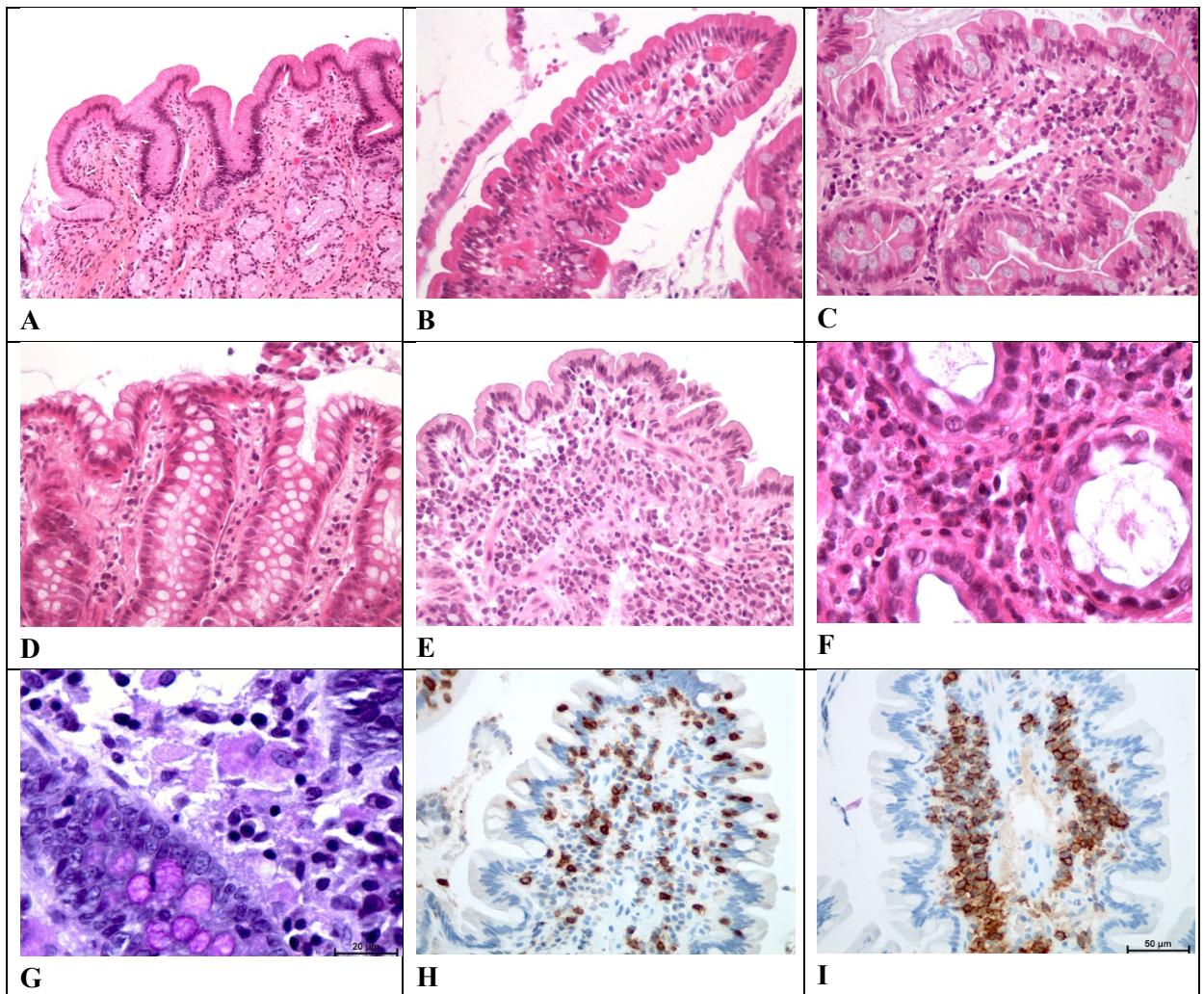


Figure 29 : Images microscopiques de biopsies intestinales de chiens sains et de chiens atteints de MICI:

(A) Estomac. Muqueuse gastrique normale, HES, objectif 10x; (B) Duodénum. Muqueuse duodénale normale, HES, objectif 10x; (C) Ileum. Muqueuse iléale normale, HES, objectif 20x; (D) Côlon. Muqueuse colique normale, HES, objectif 20x; (E) Duodénum. Inflammation neutrophilique dans la *lamina propria*, HES, objectif 20x; (F) Duodénum. Inflammation éosinophilique dans la *lamina propria*, HES, Objectif 40x; (G) Côlon. Présence dans la *lamina propria* de macrophages épithélioïdes avec matériau granulaire intracytoplasmique coloré en rose (PAS), objectif 40x; (H) Duodénum. Marquage immunohistochimique CD3 montrant les cellules T à la fois dans l'épithélium et dans la *lamina propria*, Objectif 20x; (I) Duodénum. Marquage immunohistochimique CD20 montrant les cellules B dans la *lamina propria*, objectif 20x. (Crédit photo : Laboratoire Histopathologie Animale, Oniris).

Chez l'humain atteint de MC ou de RCH, les lésions histologiques sont bien décrites et font consensus au sein de l'*European Society of Pathology* et de l'*European Crohn's and Colitis organization guidelines* (223).

Les observations lors de MC incluent souvent une muqueuse épaissie, une inflammation transpariétale, des ulcérations avec fissures et des granulomes non-caséeux dans le côlon (191). Les mêmes lésions auxquelles s'ajoutent une architecture villositaire irrégulière peuvent être présentes au niveau de l'iléon. Les granulomes sont caractérisés par un agrégat histiocytaire épithélioïde aux bords mal définis. Seuls les granulomes situés dans la *lamina propria* et indépendants des lésions cryptiques actives peuvent être considérés comme un argument fort en faveur de la MC (223). De plus, il n'est pas rare d'observer des lésions digestives hautes telles qu'une gastrite ou une duodénite.

Lors de RCH, seules la muqueuse et la sous-muqueuse montrent des lésions inflammatoires superficielles. Les observations microscopiques peuvent être classées en 4 catégories : les anomalies de l'architecture muqueuse, la cellularité de la *lamina propria*, la présence d'une infiltration neutrophilique et les lésions épithéliales. Le diagnostic histologique repose sur l'identification d'une distorsion des cryptes, d'une atrophie de la muqueuse et d'une infiltration diffuse avec une prédominance de plasmocytes. La phase inflammatoire active est caractérisée par une cryptite voire des abcès cryptiques. La plasmocytose est l'observation histologique la plus précoce et la plus pertinente (224). L'inflammation va *decrecendo* dans la direction rectum-côlon (223).

L'**Encadré 2** présente les caractéristiques cliniques et histopathologiques de la colite granulomateuse des boxers et des bouledogues français.

Les jeunes (<4 ans) boxers et les bouledogues français présentent une forme particulière de MICI caractérisée par une inflammation granulomateuse de la muqueuse colique. La première description remonte à 1965 où Van Kruiningen et *al.* décrivent une colite dont les caractéristiques histologiques ressemblent à celles de la maladie de Whipple (225). Une population de macrophages présentant une réaction positive à l'acide Periodic Schiff (PAS) est abondamment présente dans la *lamina propria* colique de chiens de race boxer. Dans certaines régions, les glandes sont remplies par un plus grand nombre de macrophages PAS+ avec des ruptures de continuité de l'épithélium et une inflammation suppurative et fibrineuse concomitante. A la différence de la MC, l'inflammation est diffuse plutôt que nodulaire et la profondeur de la lésion granulomateuse est limitée par la couche musculaire interne. Les couches musculuse et séreuse du côlon sont normales. Le caecum est souvent moins atteint. C'est en 2006 que Simpson et *al.* révèlent l'implication d'une souche invasive et adhérente de *E. coli* (AIEC) similaire à celle impliquée dans les formes iléales de MC (226). En 2009, Mansfield et *al.* montrent la régression de l'infiltrat histocytaire après élimination de la bactérie (227) (cf. **Figure 30**).

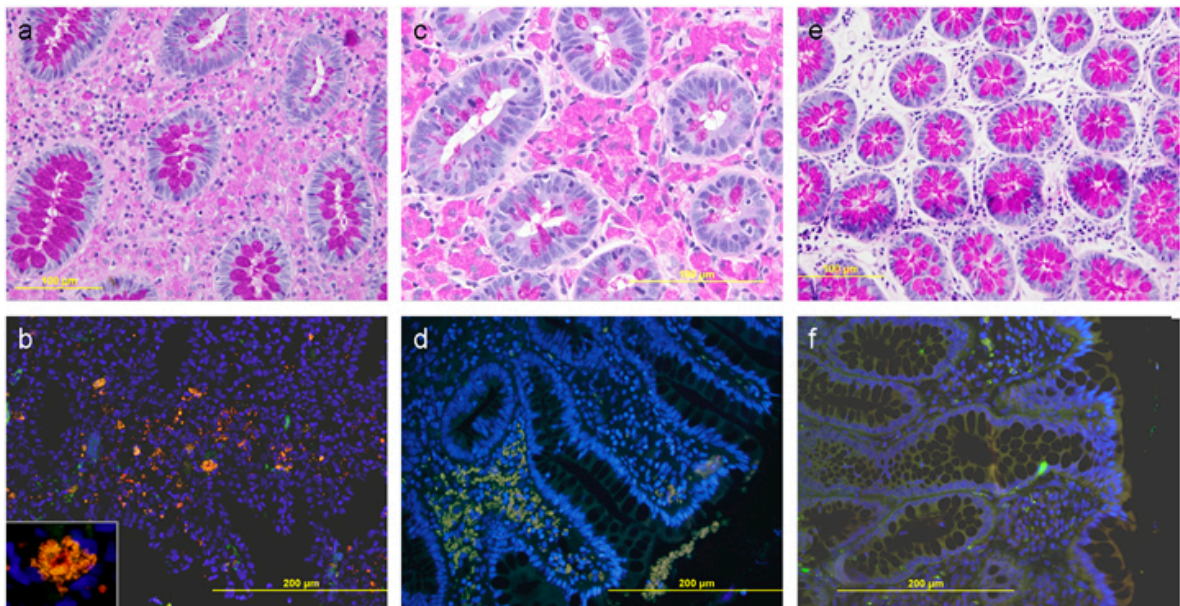


Figure 30 : Analyse histologique et par hybridation in situ en fluorescence (FISH) du côlon d'un boxer atteint de colite granulomateuse avant et après traitement avec l'enrofloxacin.

Les biopsies coliques lors du diagnostic initial sont dominées par des macrophages réagissant positivement à l'acide périodique de Schiff (PAS) (a) et des bactéries intramuqueuses invasives marquées avec la sonde Cy - 3 β de *Escherichia coli* (b- les bactéries sont orange et les noyaux bleus). Après 2 semaines d'enrofloxacin, l'infiltration de la muqueuse par les macrophages PAS-positifs persiste (c) mais plus aucune bactérie invasive n'est visualisée par FISH (d). Sept mois après le diagnostic, l'infiltration macrophagique PAS-positif est résorbée (e) et l'analyse FISH (f) reste négative (D'après Mansfield et *al.* 2009 (227)).

L'étude de la cartographie génétique du chien menée par Hayward et *al.* a permis d'identifier une région de 400 kb sur le chromosome 38 associée à la colite granulomateuse des boxers

et des bouledogues français (228). Cette région est également associée aux MICI chez l'homme. Elle contient des gènes codant pour des membres de la famille des protéines SLAM dont le rôle dans la bactéricidie a été montré chez la souris (229).

Cliniquement, les boxers et les bouledogues français atteints de colite granulomateuse présentent des signes typiques d'atteinte colique (diarrhée fréquente à petit volume, hématochézie, selles mucoïdes et ténésme). L'hématochézie peut être très importante. Les chiens affectés perdent du poids et peuvent devenir cachectiques (230). L'examen endoscopique révèle des signes de colite très marquée caractérisée par une rougeur, une irrégularité de la muqueuse et des ulcérations. Le diagnostic est établi après identification des lésions de colite granulomateuse avec macrophages PAS positifs à l'examen histologique de biopsies, exclusion des autres causes de colite granulomateuse (pythiose, salmonellose, mycose, ...) et confirmation de la présence d'un *E. coli* entéro-invasif dans la muqueuse colique par FISH. Le processus diagnostique doit être complété au minimum jusqu'à l'étape histologique (avec réaction PAS) avant d'envisager la prescription du traitement car ce dernier repose sur l'utilisation d'une substance classée « critique » par la réglementation française actuelle. En effet, le traitement repose sur l'administration d'un antibiotique efficace contre *E. coli* et qui diffuse dans le secteur intra-cellulaire. La plupart des publications font état de l'utilisation des fluoroquinolones pendant 6 semaines (230).

La nature granulomateuse des lésions et l'implication d'une souche AIEC rapprochent la colite granulomateuse des boxers et des bouledogues français des formes iléales de MC.

Encadré 2 : La colite granulomateuse des boxers et des bouledogues français, des similitudes avec la Maladie de Crohn.

6 Prise en charge thérapeutique des MICI

Si on élargit cette discussion à l'ensemble des entéropathies chroniques, force est de constater que, contrairement à l'homme, la majorité des chiens présentant une diarrhée chronique répondent durablement à une modification de leur régime alimentaire (190). Une fraction supplémentaire de malades s'améliore avec une antibiothérapie et une petite proportion nécessite un traitement immunosuppresseur. Par ailleurs, alors que l'on estime que 40 à 50% des patients humains atteints de MICI sont opérés dans les 10 ans suivant le diagnostic, il n'existe que très peu d'indications chirurgicales (formes granulomateuses focales en particulier) chez le chien (231).

Chez l'humain, l'utilisation de sulfasalazine et de métronidazole chez l'adulte atteint de MC n'est quasiment plus indiquée (232). Les recommandations nutritionnelles s'appliquent à la phase de poussée aiguë et consistent essentiellement à limiter les produits laitiers, les graisses et les résidus alimentaires (fibres). Le soutien par alimentation parentérale est nécessaire lors de dénutrition (233).

6.1 Traitements immunosuppresseurs

Chez le chien, le traitement immunosuppresseur est indiqué dès lors que 1) les essais de changements alimentaires et antibiotique ont échoués et que 2) une inflammation de la muqueuse est confirmée sur les biopsies intestinales. A ce stade, même si un traitement immunosuppresseur est mis en place, certains chiens bénéficient du maintien des mesures diététiques déjà instaurées.

Les médicaments immunosuppresseurs utilisables à cet effet comprennent les corticoïdes (prednisolone, budésonide), l'azathioprine, le chlorambucil et la ciclosporine.

Plusieurs essais cliniques randomisés fournissent des preuves de haut niveau qui soutiennent l'utilisation des glucocorticoïdes comme traitement d'induction chez les chiens atteints de MICI (202). La prednisolone est largement utilisée chez le chien. Le traitement est réduit graduellement si la réponse est favorable afin d'identifier la plus petite dose efficace de glucocorticoïdes ou intensifié graduellement si la réponse n'est pas favorable.

Une étude compare l'efficacité de la prednisone par rapport à la prednisone + métronidazole dans le traitement d'induction chez les chiens atteints de MICI. Aucune différence de réponse entre ces 2 protocoles n'a été observée (234). Le métronidazole ne semble donc pas devoir être systématiquement associé à la prednisolone.

Un essai clinique randomisé à double issue compare le budésonide et la prednisone pour le traitement d'induction des MICI chez le chien. Aucune différence de rémission n'a été observée entre les groupes de traitement, la fréquence et l'intensité des effets indésirables étaient similaires pour les 2 groupes de traitement.

Deux autres études rapportent l'utilisation de la ciclosporine (même dose et même formulation) chez des chiens ne répondant pas à la prednisolone, avec un succès variable allant de 25% à 79%. Les preuves d'efficacité de la ciclosporine chez les chiens atteints d'une MICI réfractaire aux corticoïdes sont faibles car les cohortes décrites sont de petite taille (235).

Bien que l'azathioprine soit largement utilisé chez l'homme pour maintenir la rémission, une seule étude compare un protocole prednisolone + azathioprine à un protocole prednisolone + chlorambucil lors d'entéropathie avec pertes de protéines chez le chien. Une supériorité de l'association prednisolone + chlorambucil est montrée (236).

Chez l'homme, le traitement médical est central et vise à contrôler l'inflammation. Différents types d'agents immunosuppresseurs sont utilisés seuls ou en association pour induire puis maintenir la rémission. La réponse au traitement est définie par l'amélioration clinique et la cicatrisation de la muqueuse documentée par le suivi endoscopique (237). Les MC actives sont traitées avec du budésonide ou avec des corticostéroïdes administrés par voie systémique. Chez certains patients atteints de formes récurrentes, il peut être approprié de reprendre l'administration de glucocorticoïdes en association avec un agent immunomodulateur tel que l'azathioprine ou la mercaptopurine.

Une stratégie basée sur les anti-TNF α peut être utilisée comme alternative pour les patients réfractaires ou intolérants aux corticoïdes. Des essais contrôlés ont confirmé l'efficacité de deux anticorps anti-TNF α dans la MC active (238). L'infliximab et l'adalimumab sont des anticorps monoclonaux IgG anti-TNF α dotés d'effets anti-inflammatoires puissants. Le certolizumab pegol est un fragment d'anticorps anti-TNF α ayant une efficacité clinique prouvée malgré l'absence d'effets pro-apoptotiques (239,240). Le védolizumab est une alternative appropriée chez les patients réfractaires aux corticoïdes et/ou aux anti-TNF α . Le védolizumab est un anticorps monoclonal humanisé qui se lie spécifiquement à l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, exprimé préférentiellement sur les cellules T auxiliaires soumises à l'écotaxie intestinale. En se liant à l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ de certains lymphocytes, le védolizumab inhibe l'adhésion de ces cellules à la molécule MAdCAM-1 (241).

Une intervention chirurgicale pour entérectomie partielle est une alternative envisagée chez les patients présentant une maladie réfractaire au traitement médical conventionnel.

6.2 Probiotiques, prébiotiques et symbiotiques

Chez le chien, il existe de nombreuses publications sur l'utilisation des probiotiques mais peu concernent des essais cliniques randomisés en aveugle. Parmi les plus rigoureusement menées, l'étude de Rossi et *al.* évalue l'efficacité d'un probiotique multi-souches (VSL#3) dans le traitement des MICI dans le cadre d'un essai clinique randomisé en aveugle. Après le diagnostic, 10 chiens ont été traités avec le probiotique multi-souches VSL3 et 10 autres avec le traitement conventionnel prednisone + métronidazole. Durant les 8 semaines de l'étude, les signes cliniques de la maladie gastro-intestinale ont régressé chez les chiens des deux groupes. L'amélioration clinique et histopathologique était identique dans les 2 groupes mais seul le groupe probiotique voyait l'augmentation de l'expression de l'ARNm des protéines de jonction (E-cadhérine, Occludine et Claudine-2) dans l'intestin. L'expression accrue de ces protéines chez ces chiens pourrait suggérer un effet favorable sur la barrière épithéliale (242). D'autres études cliniques sont publiées mais manquent nettement de robustesse à cause du manque de caractérisation des cas inclus et de la faible taille des groupes.

Chez l'humain, le probiotique *E coli Nissle 1917* a démontré son efficacité à maintenir une rémission équivalente à la méسالazine chez les patients atteints de RCH (243).

7 Pathogénie des MICI

Le paradigme actuel des MICI implique une interaction complexe entre des facteurs environnementaux tel que le microbiote et une réponse immunitaire aberrante chez un individu génétiquement prédisposé.

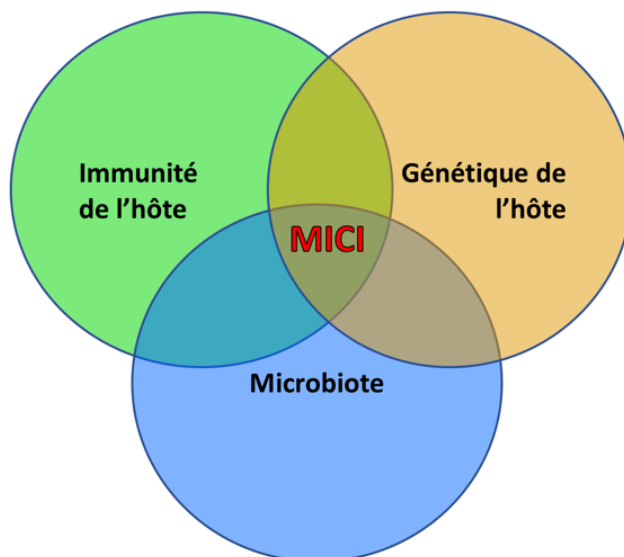


Figure 31 : Facteurs contribuant à l'apparition et à l'entretien des MICI.

Nombre d'informations mécanistiques sont aujourd'hui connues grâce aux travaux réalisés sur les modèles animaux de MICI. L'**Encadré 3** fait une synthèse des principaux modèles animaux d'étude des MICI.

Les modèles expérimentaux animaux de MICI ont très largement contribué aux connaissances en matière d'immunité muqueuse et de rupture de l'homéostasie immunitaire rencontrée lors de processus inflammatoire. Aucun modèle ne permet de reproduire la complexité des MICI de l'homme. Chacun apporte un éclairage sur un ou plusieurs aspects de la maladie. L'inflammation peut être induite par un agent chimique ou par manipulation génétique.

Colite induite par le Sodium Dextran Sulfate (DSS) : L'apport de DSS dans l'eau de boisson des animaux (souris, rat, porc, hamster) induit une colite très reproductible pouvant être chronique ou aiguë suivant la dose et la durée d'administration. Les altérations observées après traitement sont proches de celles observées au cours de la RCH : perte de poids, sang dans les fèces, diarrhées, ulcérations, érosions et une importante infiltration par des lymphocytes et des granulocytes neutrophiles (244). Le DSS exerce une toxicité cryptique qui compromet l'intégrité de la barrière intestinale et entraîne une translocation de bactéries dans la muqueuse. L'inflammation résultante de cette altération de la barrière s'avère être majoritairement de type inné. En effet, il a été montré qu'après traitement par le DSS, des souris déficientes en cellules T ou B (souris atteintes de Severe Combined ImmunoDeficiency-SCID ou invalidées pour le Recombinant Activating gene 2-Rag2^{-/-}) développent une colite. L'immunité acquise n'est donc pas essentielle dans la réponse au DSS (245). Le profil de cytokines des animaux ayant une inflammation induite par le DSS est différent selon le caractère aigu ou chronique de l'atteinte. Une inflammation aiguë au DSS est associée à une réponse inflammatoire de type Th1/Th17 (IL-6, IL-17, TNF α). Une inflammation chronique implique une réponse de type Th2 (IL-4, IL-10) ce qui la rapproche de la RCH de l'homme (246). Le modèle DSS est couramment utilisé pour étudier la réponse immunitaire innée ainsi que les mécanismes de perturbation de la barrière intestinale lors de la colite (247). Une répétition des cycles de traitements au DSS entraîne une dysplasie suivie d'un risque accru de développement de tumeur colorectale comme lors de MICI chez l'homme (248).

Colite induite par l'acide trinitro- ou dinitrobenzène sulfonique (TNBS ou DNBS) : L'administration intra-rectale de TNBS ou DNBS dissout dans l'éthanol à 50%, à des souris ou des rats sains, induit une colite. L'éthanol est utilisé afin d'altérer l'intégrité de la paroi intestinale alors que le TNBS/DNBS rend les protéines du côlon ou du microbiote immunogènes pour le système immunitaire de l'hôte, activant les cellules T (249). L'administration de TNBS/DNBS entraîne une diarrhée importante, un amaigrissement et un prolapsus rectal. La réaction inflammatoire est caractérisée par l'augmentation des cytokines de type Th1 et une infiltration de la muqueuse par des lymphocytes CD4⁺, des granulocytes neutrophiles et des macrophages. Ces caractéristiques sont semblables à ce qui est observé lors de MC (250). Ce modèle de colite chimio-induite est souvent utilisé pour l'étude de différents aspects de l'inflammation intestinale, incluant le profil de sécrétion des cytokines, les mécanismes de tolérance, d'adhésion cellulaire ou encore d'immunothérapie. Chez la souris, le processus inflammatoire induit par le TNBS/DNBS est dépendant de la souche de souris utilisée mais également de l'optimisation individuelle du protocole d'administration (251).

Colite induite par l'oxazolone : L'administration intra-rectale d'oxazolone à des souris induit une colite dont les caractéristiques ressemblent à celles de la RCH. L'inflammation est de type Th2 dépendante aussi bien de la production d'IL-13 par les cellules NK que d'IL-4 et d'IL-5 par les cellules T (252). Ce modèle permet le développement rapide d'une colite majoritairement confinée au côlon distal. Une infiltration par des lymphocytes, des granulocytes neutrophiles et des macrophages de la muqueuse est observée ainsi qu'un œdème de la *lamina propria* et des ulcérations (253).

Souris génétiquement modifiées : Allant de l'inactivation pour des gènes codants pour des protéines impliquées dans la reconnaissance des motifs moléculaires bactériens (NOD2, ATG16L1, TLR, ...) jusqu'à l'inactivation pour des gènes codants pour des protéines impliquées dans les voies effectrices de l'inflammation (IL-10, TGF- β 1, MyD88, ...), de très nombreux modèles de souris invalidés pour un gène d'intérêt ont été développés.

Le modèle de souris invalidées pour l'IL-10 est fréquemment rapporté dans la littérature. L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire produite par les lymphocytes B et T et les macrophages. Elle a pour rôle de diminuer la fonction des cellules Th1, NK et des macrophages. Les souris invalidées pour le gène codant pour l'IL-10 présentent une inflammation spontanée du côlon et de l'intestin grêle caractérisée par une infiltration de lymphocytes, de macrophages et de granulocytes neutrophiles (22). L'inflammation semble initialement médiée par une réponse de type Th1 comme en témoigne l'amélioration des lésions chez les souris surexprimant l'IL-12p40 (254). Cependant la sécrétion d'IL-12 et d'IFN-g diminue pour être remplacée par une augmentation de l'IL-4 et de l'IL-13 suggérant le passage à une réponse de type Th2 (255).

Le microbiote intestinal joue un rôle important dans ce modèle car les souris axéniques invalidées pour l'IL-10 ne présentent d'inflammation que quelques semaines après ensemencement de leur tube digestif. L'action du microbiote semble médiée par les TLRs car les souris déficientes en MyD88 dans leurs cellules monocytaires coliques ne développent pas de colite (256).

Encadré 3 : Modèles d'étude des Maladies Inflammatoires de l'Intestin chez l'animal de laboratoire

7.1 Facteurs génétiques

Les avancées en génétique humaine et canine ont eu lieu grâce aux approches de séquençage à haut débit. Deux types d'approches sont utilisées : les études d'association qui comparent la distribution des allèles d'un marqueur génétique polymorphe dans une population de malades et dans une population témoin (approche Single nucleotide polymorphism-SNP), et les études de liaison qui tentent de détecter, dans des familles avec plusieurs membres atteints, une transmission préférentielle d'un des allèles parentaux du marqueur aux sujets atteints.

Dès 1996, la démarche de localisation des gènes de susceptibilité a permis de localiser sur le chromosome 16 un premier locus de susceptibilité à la MC (IBD1) (257). C'est en 2001 que le premier gène de susceptibilité pour la MC, NOD2/CARD15, a été identifié (258). Depuis, d'autres gènes de susceptibilité ont été reconnus sur les chromosomes 5 et 10 appelés respectivement *OCTN* (*Organic cation transporter*) et *DLG5* (*discs large MAGUK scaffold protein 5*) (259,260).

Plus de 30 mutations ayant potentiellement un effet biologique ont été répertoriées sur le gène NOD2/CARD15. Trois mutations sont fréquentes (variants R702W, G908R et 1007fs). Ces mutations aboutissent à une modification de la charge du domaine C terminal riche en leucine.

D'autres *loci* impliquant d'autres molécules de la voie de signalisation ITCH comme NDFIP1 et TNFAIP3 ont également été identifiés. Les variants des gènes codants pour ces protéines donnent lieu à une activation inappropriée des lymphocytes T, à une anomalie de la polarisation des lymphocytes Th et à une inflammation intestinale (261).

L'étude d'association pangénomique de Duerr et *al.* a identifié le gène codant pour le récepteur de l'IL23 (*IL23r*) comme un gène de prédisposition aux MICI (262). Il est essentiellement exprimé par les lymphocytes Th17 et les ILC3.

Une délétion du gène codant pour STAT3 affectant l'intégrité épithéliale a été identifiée chez les malades de MICI (263).

Chez le chien, plusieurs variants géniques ont été associés aux MICI. Par exemple, Kathrani et *al.* identifient les variants NOD2 (264).

Certaines études orientent vers une interrelation entre les facteurs génétiques et le microbiote intestinal dans la genèse des MICI chez le chien. Par exemple, chez le berger allemand atteint de MICI, on observe l'association d'une dysbiose et d'une surexpression de l'ARNm codant pour TLR4 et une sous-expression de l'ARNm codant pour TLR5 (265). L'hypothèse d'une implication de variants alléliques de TLR4 et TLR5 a été explorée avec l'approche SNP. Trois SNP dans TLR5 et 2 SNP dans TLR4 ont été identifiés puis évalués. Une association significative avec le développement d'une MICI a été confirmée (266). De plus, de multiples variants ont été identifiés dans le gène codant pour NOD2 chez des chiens atteints de MICI (berger allemand et autres races) suggérant une contribution de mutations de NOD2 dans l'apparition de l'inflammation (264).

7.2 Facteurs immunitaires

- Rôle du mucus et des molécules anti-microbiennes : dans un modèle de colite induite par le dextran sulfate sodium (DSS) (cf. **Encadré 3**) chez des souris déficientes en IL-10, Shwerbrock et *al.* constatent une réduction d'un facteur 10 de la sécrétion de MUC2 et observent une pénétration des bactéries dans la couche profonde du mucus au contact de l'épithélium (267). Cette observation a également été faite chez l'humain atteint de RCH (268).

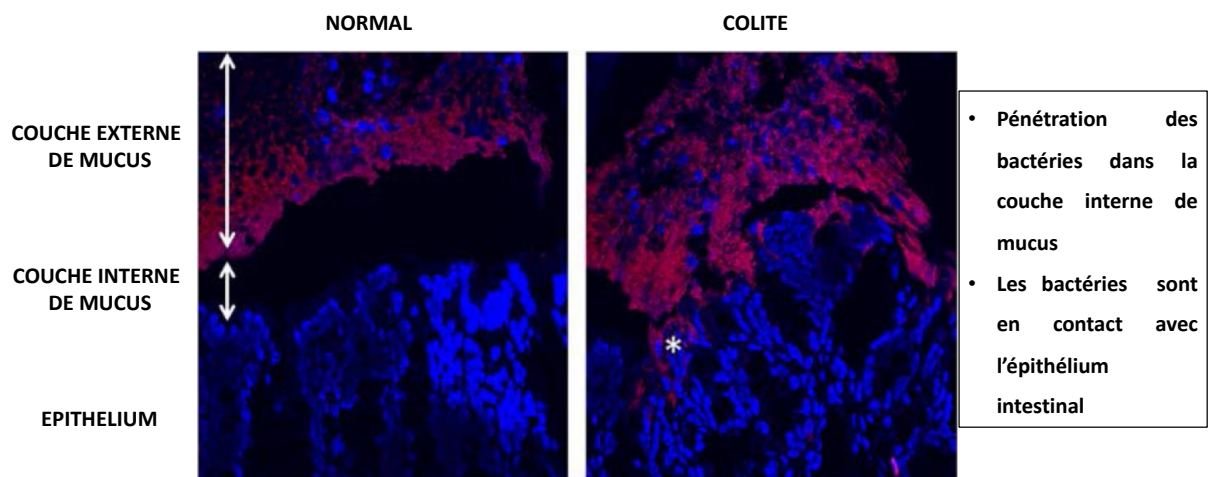


Figure 32 : Analyse par hybridation fluorescence in situ d'une biopsie colique de souris normale et d'une souris déficiente en IL-10 présentant une colite induite (DSS) montrant une pénétration des bactéries dans la couche profonde de mucus au contact de l'épithélium.

Rouge : bactéries ; bleu : épithélium (Schwerbrock et *al.*, 2004 (267)).

Nakazawa et *al.* ont récemment montré que l'expression en ARNm relative de la *bactericidal/permeability increasing protein* (BPI), de la lactoferrine et du *secretory leukocyte peptidase inhibitor* (SLPI) était significativement plus élevée chez les chiens atteints de MICI par rapport aux témoins sains (269). Les profils d'expression des PAMs des chiens atteints de MICI sont différents de ceux atteints de lymphome intestinal. Ces résultats suggèrent que les profils d'expression des PAMs pourraient servir de marqueur permettant de différencier les MICI des lymphomes intestinaux chez le chien.

Chez le malade de Crohn porteur d'un variant muté du gène codant pour NOD2, la sécrétion de HD-5 et HD-6 est diminuée ce qui laisse préjuger qu'une partie des défensines est inductible via la stimulation des récepteurs NOD2 (270).

Les humains et les souris dépourvus sélectivement d'IgA présentent peu de symptômes car le déficit semble partiellement compensé par la sécrétion d'IgM (271). Chez le chien berger allemand, le déficit en IgA est associé à certaines entéropathies chroniques. Litter et *al.* ont montré une diminution du taux d'IgA fécale chez les berger allemand par rapport aux autres races. Cette diminution n'est pas associée à une réduction du nombre de plasmocytes IgA+ sur les biopsies duodénales et coliques des animaux atteints d'entéropathie chronique (272). Il pourrait donc s'agir d'une anomalie du processus de sécrétion des IgA dans la lumière intestinale.

- Rôle des CEI : l'augmentation de la perméabilité membranaire observée chez les humains atteints de MICI est associée à une altération de la structure des jonctions serrées, ainsi qu'à une diminution de leur nombre. L'altération de la perméabilité intestinale a été décrite aussi chez les apparentés de premier degré de malades atteints de MC, ainsi que chez les conjoints, ce qui suggère le rôle de facteurs environnementaux (273). L'importance de la E-cadhérine a été montrée chez des souris déficientes qui présentent de la diarrhée grave avec une évolution fatale (274). Il est également documenté que la E-cadhérine est sous-exprimée chez les humains souffrant de MICI sans que l'on sache si la sous-expression précède la maladie ou si elle accompagne le processus inflammatoire et contribue à sa progression (275). Les données chez le chien sont inexistantes.

Les CEI sont également connues pour sécréter des antagonistes des récepteurs des IL qui peuvent neutraliser leurs effets proinflammatoires. Par exemple, l'action proinflammatoire d'IL-1 est contrée par la sécrétion de l'antagoniste de son récepteur IL-1ra. L'équilibre IL-1 et IL-1ra est perturbé lors de MICI chez l'homme ce qui a donné lieu à une voie de recherche thérapeutique importante au début des années 2000 (276). Par ailleurs, le récepteur CX3CR1 de la fractalkine est physiologiquement exprimé dans le lymphocytes NK, les monocytes et certaines sous-populations de lymphocytes T. L'expression de l'ARNm codant pour la fractalkine et les niveaux protéiques sont significativement plus élevés dans la muqueuse duodénale des chiens atteints de MICI (277). Ces observations sont comparables à celles effectuées chez l'humain (278). La fractalkine exprimée par les CEI pourrait contribuer à la migration des cellules exprimant le récepteur CX3CR1 du sang périphérique vers l'épithélium intestinal et concourir ainsi à l'apparition de l'inflammation intestinale (277).

- Rôle des cellules de Paneth : Liu et *al.* rapportent des anomalies structurelles et fonctionnelles des cellules de Paneth plus fréquentes chez les patients pédiatriques humains atteints de MC par rapport aux témoins. Ces anomalies sont associées à une dysbiose chez les malades de Crohn avec une réduction des bactéries « protectrices » comme *Faecalibacterium* sp. et un enrichissement en bactéries proinflammatoires comme *Corynebacterium* sp. et les Erysipelotrichaceae. Ces observations suggèrent que les cellules de Paneth ont un rôle dans le maintien de l'eubiose (279). Dans ce sens, des études de séquençage à haut débit du génome de patients, montrent un risque exacerbé de développer la MC chez les sujets présentant des polymorphismes ponctuels au sein de régions codantes pour des gènes impliqués dans l'autophagie, en particulier ATG16L1. Les expériences fondées sur des modèles de déficiences génétiques en autophagie ont permis de démontrer l'importance de ce processus dans l'homéostasie des cellules de Paneth. Les travaux de Cadwell et *al.* ont porté sur le variant à risque d'ATG16L1 qui résulte en une autophagie défectueuse à l'encontre des microorganismes. Dans les cellules de Paneth, ce variant conduit à un défaut d'élimination par autophagie de bactéries comme les souches AIEC associées à la MC. Les cellules de Paneth des patients porteurs de ce polymorphisme présentent une persistance accrue de ces bactéries. Des défauts similaires, dont la présence de structures aberrantes dans les cellules de Paneth, ont été retrouvés dans le modèle murin exprimant le variant ATG16L1 (280). Ces données révèlent le rôle des cellules de Paneth dans l'autophagie, dans le maintien de l'eubiose intestinale et dans la contribution à l'apparition de la MC.
- Rôle des cellules dendritiques : Kathrani et *al.* ont évalué la population de CDs dans la muqueuse duodénale, iléale et colique de chiens atteints de MICI en utilisant le marqueur CD11c (281). Les auteurs constatent une diminution significative du nombre de cellules CD11c⁺ dans le groupe MICI (n=12) par rapport au groupe de chiens sains (n=10). Cette observation tend à montrer un déséquilibre de la population de cellules dendritiques lors de MICI .
- Rôle d'IL-22 : l'IL-22 est une cytokine dont l'importance dans l'homéostasie épithéliale a été montrée. Ses effets protecteurs dans différents modèles de colite *via* ses effets antimicrobiens et réparateurs ont été décrits. La majeure partie de l'IL-22 est produite par les ILC3 sous l'action du facteur de transcription ROR γ t (282). Les études portant

sur des patients atteints de MC montrent une diminution des ILC3 sécrétant l'IL-22 dans la *lamina propria* (283). Ces observations orientent vers un rôle central des ILC3 (et d'autres cellules sécrétant IL-22) dans la régulation de l'homéostasie immunitaire intestinale.

- **Rôle de NFκB** : chez l'humain atteint de MICI, l'activation du facteur de transcription NFκB est très marquée et oriente l'inflammation muqueuse vers la production d'IL-23. Il est démontré que l'IL-23 favorise la différenciation des lymphocytes CD4⁺ qui produisent l'IL-17 et qui activent à leur tour à nouveau NFκB et son cortège d'effecteurs inflammatoires lors de MC (284). Chez le chien, il est montré que NFκB est plus élevé dans les lymphocytes de la *lamina propria* des biopsies intestinales des chiens atteints de MICI par rapport au groupe contrôle (285).

7.3 Facteur microbiotique

Le microbiote intestinal est une communauté d'agents bactériens, fongiques, protozoaires, viraux et archées, cohabitant au sein du tractus digestif de tous les mammifères (286). Il contient environ 10¹⁴ bactéries, pèse 1 à 2 kg chez l'humain adulte et comprend 6 à 10 phyla bactériens majeurs et environ 3000 espèces qui portent aux alentours de 10 millions de gènes (287). La contribution du microbiote à la survie des entérocytes, au développement du système nerveux et du système immunitaire, au métabolisme de base, à l'homéostasie métabolique, et à l'équilibre neurohormonal, n'est plus à prouver. A titre d'exemple, la maturation structurelle et fonctionnelle des structures lymphoïdes secondaires ne s'achève qu'après la colonisation microbienne en période post-natale. En effet, l'analyse histologique des plaques de Peyer de souris axéniques montre une hypoplasie associée à une réduction du nombre et de la taille des centres germinatifs. Les souris axéniques présentent une faible quantité de plasmocytes IgA⁺ au sein de ces structures (288).

Par rapport aux données sur le microbiote humain, peu d'informations sont disponibles pour le chien. La plupart des données proviennent de l'analyse des matières fécales à l'aide du séquençage du gène 16S de l'ADN ribosomal. Il a été démontré que des altérations du microbiote intestinal étaient associées aux MICI canines (289). Une réduction de la diversité avec une surreprésentation des *Enterobacteriaceae* et une réduction de la part des *Bacteroidales* et de *Clostridiales* est présente chez les chiens avec signes d'EC (290–293). Chez le chien atteint de MICI, la part du phylum *Bacteroidetes* est réduite mais l'abondance

du phylum *Proteobacteria* est augmentée par rapport aux chiens sains (292,294). En plus de la moindre abondance des *Bacteroidetes*, Xenoulis et al. identifient une plus grande abondance de la famille des *Enterobacteriaceae* et de la famille des *Clostridiaceae* chez les chiens atteints de MICI (291). Aucune différence majeure dans la composition du microbiote intestinal n'a été observée entre les différentes causes d'entéropathie chez le chien (lymphome intestinal, FRE, les diarrhées aiguës non hémorragiques et les diarrhées aiguës hémorragiques). Toutefois, quelques observations peuvent être rapportées comme la surreprésentation des genres *Actinomyces*, *Porphyromonas* et *Helicobacter* chez les chiens atteints d'EC non-lymphomateuse (295). Kalenyak et al. rapportent que la famille des *Neisseriaceae* est plus abondante dans les biopsies digestives des chiens souffrant de MICI par rapport à ceux souffrant de FRE, tandis que les genres *Bilophila* et *Burkholderia* étaient plus abondants dans le groupe FRE par rapport au groupe MICI (296). Une autre étude a montré une diminution de l'abondance de *Faecalibacterium spp.* et *Fusobacteria spp.* dans les prélèvements fécaux de chiens atteints d'EC par rapport aux chiens atteints d'entéropathie aiguë. La même étude a montré que les chiens présentant une diarrhée aiguë hémorragique ont une proportion plus faible de *Ruminococcus spp.*, *Blautia spp.* et *Turicibacter spp.* par rapport aux chiens atteints d'EC (297). Les chiens atteints de diarrhée aiguë présentent une réduction de la diversité microbienne, avec moins de *Bacteroidetes* et *Faecalibacterium* et davantage de *Clostridium* (298).

Chez l'humain, certains *Firmicutes* et *Bacteroides* sont associés à une bonne santé et sont souvent déficients chez des patients en rémission (ex. : *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lachnospiraceae*, and *Akkermansia*) (299). La réduction de *Faecalibacterium prausnitzii* dans la muqueuse iléale des patients atteints de MC est associée à un risque accru de récurrence endoscopique. *Faecalibacterium prausnitzii* stimule la production de l'IL-10 dans les cellules mononucléées du sang périphérique, ce qui peut expliquer au moins en partie son effet protecteur (300). Des études récentes suggèrent qu'une souche AIEC exploite les défauts de phagocytose et d'autophagie de l'hôte résultant de polymorphismes liés à la MC et favoriserait l'inflammation chronique chez l'hôte prédisposé (301). Certaines *Firmicutes* et *Proteobacteraceae* sont fréquemment associées à des formes actives de MICI (ex. : *Enterobacteriaceae*, *Ruminococcus gnavus*, and *Desulfovibrio*) (302). L'abondance des souches de *Ruminococcus* dans la muqueuse des MICI peut laisser suspecter une contribution de ces microbes au défaut de barrière observé dans les MICI.

Outre les bactéries, le tractus gastro-intestinal héberge divers autres micro-organismes, notamment des champignons, des virus et des parasites (303). Les interactions complexes de ces organismes avec l'hôte et le microbiote bactérien ne sont pas bien comprises. Des études récentes ont utilisé un séquençage de nouvelle génération avec des amorces panfongiques pour révéler la composante fongique du microbiote chez le chien (304). Les *Ascomycètes* et *Basidiomycètes* sont les phyla fongiques les plus abondants dans les selles des chiens (304). Les phyla fongiques *Glomeromycètes* et *Zygomycètes* ont également été identifiés, *Nacaseomyces* étant le genre le plus abondant dans l'étude de Handlet *al.* et *Candida sp.* le genre le plus abondant dans l'étude de Foster et *al.* (304,305). Cependant, aucune différence significative n'a été observée dans les populations fongiques entre les chiens sains et les chiens malades.

Les études sur la composante virale dans le tractus gastro-intestinal du chien sont limitées. Swanson et *al.* ont montré que 99% des séquences virales identifiées dans les prélèvements fécaux pouvaient être classées comme bactériophages (306).

Nettement moins étudié, il existe toutefois quelques données montrant une association et le rôle potentiel du mycobiote et du virobiote lors de MICI chez l'humain (307–309).

Des études de génétique fonctionnelle établissent un lien entre ces changements de composition et la capacité fonctionnelle des communautés microbiennes. Chez l'homme, il a été démontré que les modifications fonctionnelles impliquant les voies du stress oxydatif et la diminution de la biosynthèse des acides aminés, sont plus spécifiques que les modifications phylogénétiques (293,297).

Minamoto et *al.* ont effectué une analyse métabolomique non ciblée sur le sérum de chiens atteints de MICI et ont constaté une augmentation de plusieurs métabolites, notamment le 3-hydroxybutyrate, l'acide hexuronique, le ribose et l'acide gluconique. Le ribose et l'acide gluconique sont tous deux impliqués dans la voie du pentose phosphate qui protège les cellules du stress oxydatif (293). Une étude préliminaire utilisant une analyse métabolomique non ciblée sur les selles de chiens atteints de MICI a montré une diminution des métabolites du tryptophane, des acides biliaires secondaires et des phytostérols ainsi qu'une augmentation des acides biliaires primaires par rapport aux chiens en bonne santé (293,310). Les voies du stress oxydatif et de l'absorption des nutriments sont augmentées alors que les voies du métabolisme des glucides et de la biosynthèse des acides aminés sont diminuées (311). L'analyse des métabolites fécaux montre une réduction des acides biliaires secondaires avec une élévation importante de l'acide biliaire 3-OH-sulphaté chez les

malades en phase active de MICI chez l'humain et chez le chien (312). Ces substances reflètent les activités défailantes de déconjugaison et de désulfatation du microbiote ce qui est susceptible de promouvoir directement la réponse inflammatoire de l'hôte (313). Les niveaux fécaux d'acides gras à courte chaîne sont considérablement diminués chez les patients atteints de MICI. Ces molécules étant exclusivement issues du métabolisme du microbiote, il existe un lien entre la réduction des organismes producteurs et des métagènes associée à leurs productions.

Il est alors cohérent de penser que la dysbiose, les anomalies fonctionnelles associées et la réponse de l'hôte qui en résulte peuvent constituer des éléments déterminants dans l'apparition des MICI (299).

QUESTIONNEMENT SCIENTIFIQUE

Dans les interactions entre le système immunitaire et le microbiote intestinal, susceptible de jouer un rôle majeur dans l'homéostasie et la pathologie intestinale, les TLRs ont un rôle prépondérant. L'expression et l'activation des TLRs sont régulées dans le temps et dans l'espace et leur distribution spatiale est un facteur de régulation important. A titre d'exemple, l'analyse immunohistochimique de l'expression du TLR2 dans l'iléon fœtal humain montre une localisation à la membrane basolatérale des cellules cryptiques et une faible expression au niveau de la bordure en brosse (314). De même, le TLR3 est présent dans le cytoplasme des cellules épithéliales intestinales et coliques chez l'humain sain alors qu'il présente une localisation basolatérale chez le patient atteint de RCH (315). L'analyse en immunofluorescence du TLR4 dans l'intestin humain montre une localisation à la membrane plasmique basolatérale des cellules épithéliales cryptiques chez le fœtus et des cellules épithéliales coliques chez l'adulte (314). Le TLR5 quant à lui est détecté à la surface basolatérale des cellules épithéliales coliques chez la souris (316). Cette distribution est mise en lien avec la prévention de la stimulation de TLR5 par son ligand et la prévention d'une réaction immunitaire inadaptée. Dans la cellule épithéliale colique humaine en culture, le TLR9 est détecté au niveau de la membrane apicale et basolatérale (317).

Chez le chien, une surexpression de l'ARNm codant pour les TLR2, 4 et 9 a été montrée dans le duodénum et le côlon des chiens atteints de MICI en comparaison aux chiens contrôles sains (318). De plus, les chiens gravement atteints surexpriment davantage l'ARNm codant pour le TLR2 dans le duodénum (319). En revanche, l'étude de l'expression protéique des TLR2, TLR4, TLR5 et TLR9 menée par immunohistochimie est plutôt discordante avec celle de l'expression de l'ARNm. En effet, Schnyder et *al.* montrent que TLR4 et TLR5 sont régulés positivement dans les cellules inflammatoires de la *lamina propria* dans le duodénum et le côlon des chiens atteints de MICI. Dans cette même étude, l'expression de TLR2 et TLR9 est régulée négativement dans les cellules de la *lamina propria* et dans l'épithélium (le TLR9 uniquement dans l'épithélium) (320).

Dans ce contexte, le premier objectif de notre travail est d'étudier l'expression des TLRs impliqués dans la reconnaissance de motifs bactériens dans la muqueuse intestinale de chiens atteints de MICI.

Par ailleurs, certaines études ont documenté une dérégulation de l'immunité humorale chez le chien atteint de MICI. Une réduction de la quantité d'IgA fécale est bien documentée dans la race berger allemand (321,322). Plus récemment, Soontarak et *al.* ont montré que les chiens atteints de MICI avaient des pourcentages et des quantités globales d'IgG liées à leurs

bactéries intestinales significativement plus élevés que les chiens sains. Dans cette même étude, un pourcentage significativement plus élevé de bactéries intestinales était fixé à des IgA alors que la reconnaissance par des anticorps sériques des bactéries intestinales n'était pas différente entre les chiens sains et les chiens atteints de MICI. Ces observations apportent des preuves d'une production locale plutôt que systémique des IgG et des IgA (323).

Par conséquent, le second objectif de notre travail est d'étudier la réaction immunitaire humorale systémique spécifiquement dirigée contre des motifs bactériens reconnus par les TLRs et d'établir un lien avec la dysrégulation éventuelle de l'expression des TLRs.

ETUDE EXPERIMENTALE

L'étude expérimentale est divisée en 2 parties :

1. L'étude épidémiologique des entéropathies inflammatoires chroniques dans la population de chiens présentés et explorés au CHV Frégis ou au CHUV d'Oniris de novembre 2016 à février 2018.
2. L'étude de l'expression des TLRs et de la réaction immunitaire humorale dirigée contre des motifs bactériens chez les chiens atteints de MICI. Cette partie est présentée sous la forme d'un article actuellement soumis à *Inflammatory Bowel Disease*.

1 Etude épidémiologique de la population de chiens atteints d'entéropathie inflammatoire

1.1 Matériels et méthodes

1.1.1 Cohorte

Le recrutement a été réalisé prospectivement et a consisté à inclure des chiens présentant des signes gastro-intestinaux chroniques (vomissements, diarrhée et/ou perte de poids) et ayant subi une exploration endoscopique avec réalisation de biopsies. Les animaux ont été recrutés dans 2 structures : le Centre Hospitalier Vétérinaire (CHV) Fregis (Arcueil, France) entre novembre 2016 et août 2017 et le Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire (CHUV) d'Oniris (Nantes, France) entre avril 2017 et février 2018.

Tous les chiens ont reçu un traitement à base de fenbendazole (50 mg/kg par jour pendant 5 jours consécutifs) avant d'être recrutés. Les tests diagnostiques effectués pour exclure les causes sous-jacentes comprennent une numération et formule sanguine (NFS), une analyse biochimique sérique, une analyse d'urine et une analyse de selle par flottation pour recherche de parasites. Une mesure de l'immunoréactivité sérique du trypsinogène et de la concentration sérique de la cobalamine et des folates ont également été réalisées. Un examen échographique abdominal a complété le bilan. Enfin, des biopsies de la muqueuse de l'estomac, du duodénum, de l'iléon et du côlon ont été réalisées à la faveur d'une exploration endoscopique.

- Les chiens présentant des pertes protéiques digestives documentées par la mise en évidence d'une hypoalbuminémie ≤ 20 g/L avec exclusion de pertes protéiques urinaires et sans signe d'insuffisance hépatique ont été classés dans le groupe PLE.
- Tous les autres chiens ont initialement été traités avec un régime d'éviction (aliment hypoallergénique ou ration ménagère) pendant 10 jours. Les chiens qui ont répondu au régime d'élimination au cours des 10 premiers jours (signes cliniques résolus) ont été classés dans le groupe FRE.
- Les chiens qui n'ont pas répondu dans les 10 premiers jours de traitement (les signes cliniques ont persisté pendant le régime d'éviction) ont été traités avec du métronidazole (10-15 mg/kg deux fois par jour pendant 10 jours). Les chiens qui ont répondu au traitement métronidazole ont été classés dans le groupe ARE.

- Le diagnostic de MICI a été avancé après exclusion des causes de troubles digestifs chroniques, absence de réponse au changement alimentaire et au traitement métronidazole et mise en évidence d'une inflammation lymphoplasmocytaire et/ou éosinophilique à l'examen des biopsies duodénales, iléales et/ou coliques. Les chiens du groupe MICI ont ensuite été rétrospectivement classés en IRE ou NRE selon leur réponse ou leur absence de réponse au traitement à base de prednisolone par voie orale (1-2 mg/kg par jour PO) pendant 10 jours.

Le protocole de l'étude et l'exploitation des prélèvements biologiques ont été approuvés par le comité d'éthique d'Oniris pour la recherche clinique et épidémiologique (Numéro d'agrément: CERVO-2016-13-V) (cf. **Annexe 1**). Le consentement éclairé du propriétaire a été obtenu au moment de l'inclusion des chiens (cf. **Annexe 2**).

1.1.2 Evaluation clinique

L'évaluation clinique est réalisée grâce au score CCECAI dont la modalité de calcul est présentée **Tableau 7**. Pour rappel, neuf paramètres sont pris en compte : l'état général, l'appétit, la perte de poids, la consistance des selles, la fréquence des selles, la présence de vomissements, l'albuminémie, la présence d'épanchement cavitaire et/ou œdème et de prurit. L'évaluation donne lieu à un score d'activité clinique noté sur 27.

1.1.3 Analyse histologique intestinale

Une endoscopie du tractus gastro-intestinal a été réalisée chez tous les chiens recrutés et des biopsies de la muqueuse ont été prélevées dans l'estomac, le duodénum, l'iléon et/ou le côlon. Six spécimens de tissus ont été obtenus dans chaque région et soumis à un examen histopathologique. Les spécimens ont été placés dans des cassettes et fixés dans du formol à 10% pendant 48 h, traités et incorporés dans de la paraffine, coupés en sections et colorés à l'Hématoxyline, à l'Eosine et au Safran (HES). L'évaluation histopathologique initiale a été réalisée au Laboratoire d'Histopathologie Animale (LHA) d'Oniris dans le cadre de la procédure diagnostique de routine.

1.1.4 Analyses statistiques

Les données n'étant pas normalement distribuées, les différences de paramètres quantitatifs entre les groupes ont été évaluées à l'aide du test non paramétrique (test de Mann-Whitney) et les statistiques descriptives de ces données sont présentées sous forme de médianes et de plages. L'association entre deux variables continues a été analysée en utilisant la corrélation de Pearson (pour deux variables paramétriques) ou la corrélation de rang de Spearman (pour deux variables non paramétriques ou une variable non paramétrique avec une variable paramétrique). Une valeur P de 0,05 ou moins a été considérée comme statistiquement significative. L'analyse a été réalisée avec Microsoft® Excel pour Mac (version 16.16.18) et GraphPad Prism® (version 6.00 pour Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA).

1.2 Résultats

1.2.1 Population

Un total de 50 chiens référés au CHUV d'Oniris et au CHV Frégis entre novembre 2016 et février 2018 ont été recrutés dans l'étude. La classification (FRE, ARE, MICI, IRE, NRE), les données démographiques et l'évaluation de l'indice d'activité clinique CCECAI sont présentées dans le **Tableau 10** et les **Figure 33** et **Figure 34**.

Tableau 10 : Classification, données démographiques et CCECAI des chiens recrutés dans l'étude globale.

	Nombre (%)	Âge	Sexe (M/F)	Poids	CCECAI
FRE	4 (8 %)	5,5 (3-12)	2/2	10,5 (7-21)	4,5 (1-7)
ARE	5 (10 %)	7 (4-13)	2/3	10,8 (6-38)	4 (1-7)
MICI/IRE	27 (54 %)	5 (0,7-16)	15/12	11 (3,4-32)	4 (1-11)
MICI/NRE	0	-	-	-	-
PLE	14 (28 %)	5 (2-11)	5/9	11 (8-44)	10,5 (3-18)

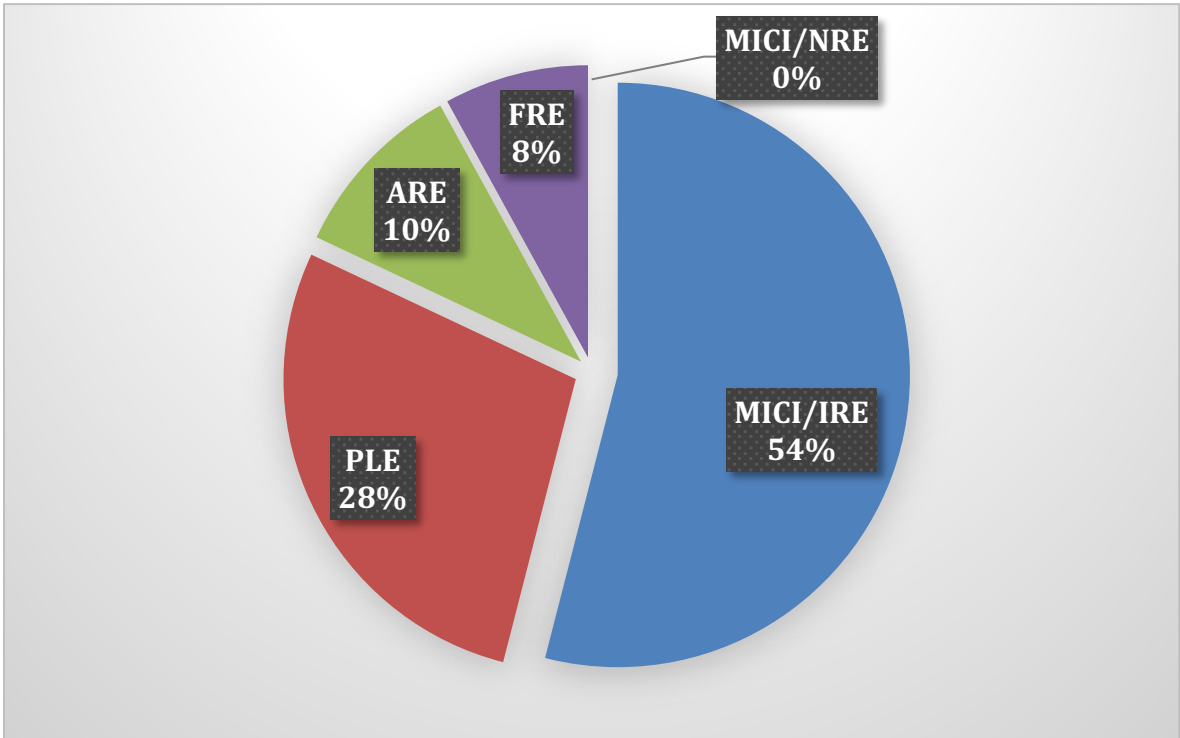


Figure 33 : Répartition des cas d'entéropathie recrutés selon leur classification.

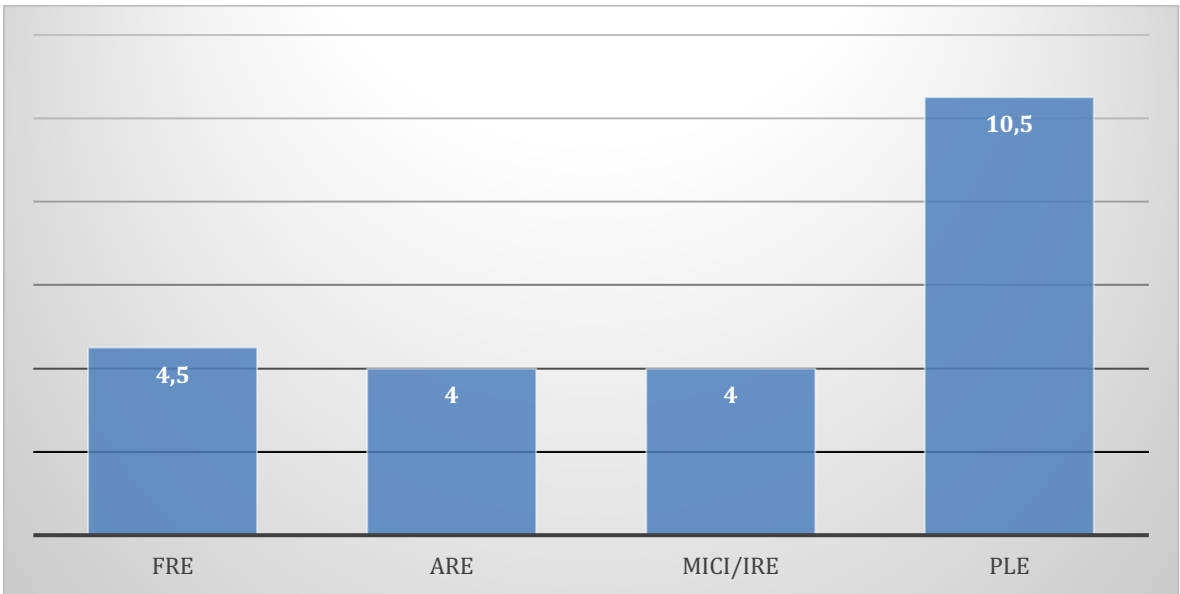


Figure 34 : Répartition des scores médians d'activité clinique (CCECAI) selon le type d'entéropathie.

La comparaison des données épidémiologiques et cliniques montre un score CCECAI significativement plus élevé dans le groupe PLE (médiane = 10,5 ; intervalle = 3-18) par rapport aux groupes MICI/IRE, FRE et ARE (médianes respectives = 4 ; 4,5 ; 4 et intervalles respectifs = 1-11 ; 1-7 ; 1-7). L'âge, le poids et le sexe-ratio ne sont pas différents entre les groupes.

La répartition raciale dans chaque groupe est retranscrite dans la

Figure 35. Le bouledogue français, le Yorkshire terrier, le Jack Russel terrier, le berger allemand et les croisés sont les races les plus représentées dans le groupe MICI/IRE (cf. Figure 35a). Dans le groupe PLE, aucune race ne semble se dégager car seul le bouledogue français est représenté avec deux individus. Les autres races n'ont qu'un seul représentant (cf. **Figure 35b**). De même, les races qui composent les groupes FRE et ARE n'ont qu'un seul représentant chacune (cf. **Figure 35c**). On constate par ailleurs une importante diversité avec plus de 30 races différentes tous groupes confondus.

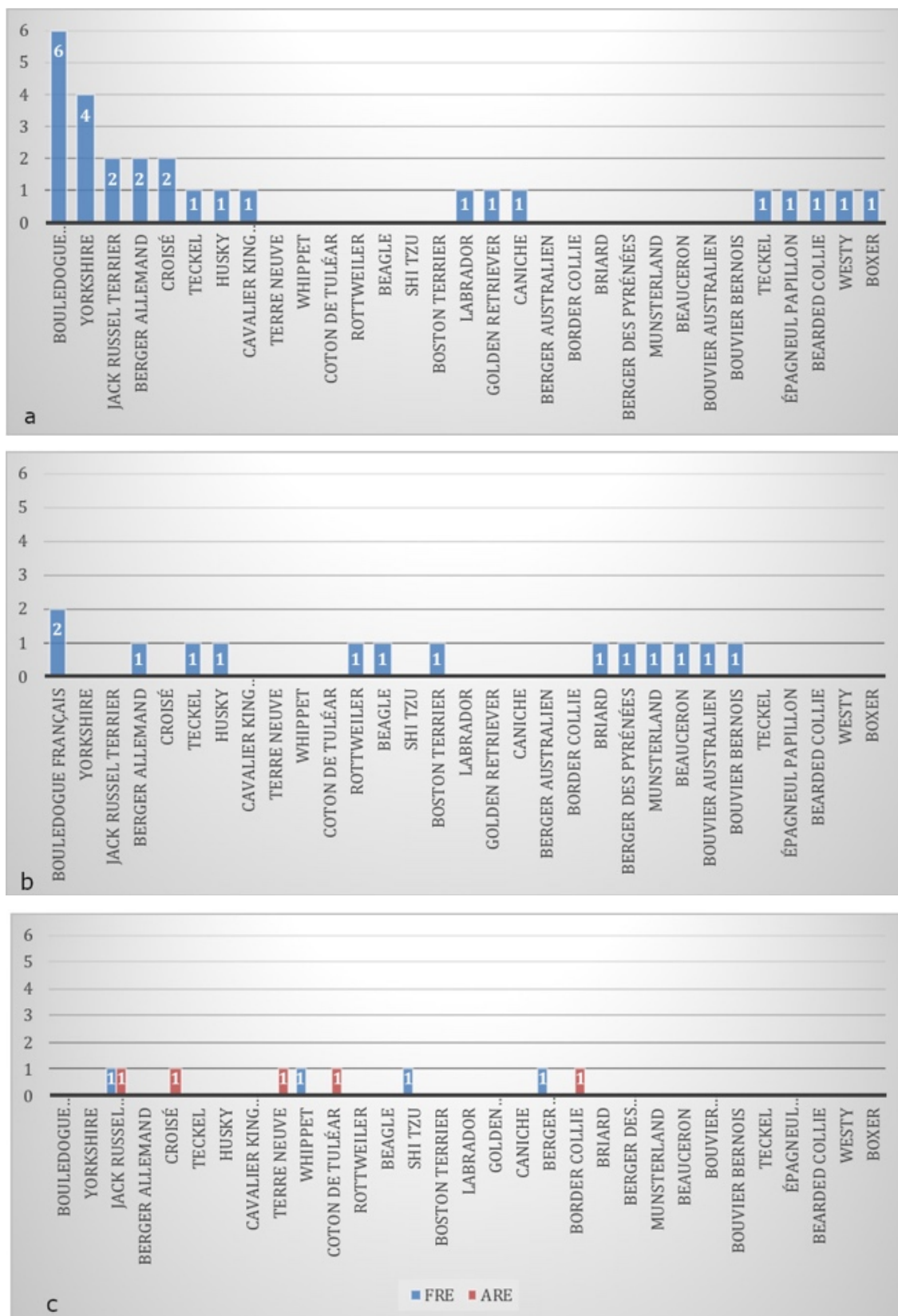


Figure 35 : Répartition des races représentées dans la cohorte selon le type d'entéropathie.

a : groupe MICI/IRE, b : groupe PLE, c : groupe FRE et ARE

1.2.2 Expression clinique

Les motifs de consultation et les signes cliniques sont dominés par la diarrhée et les vomissements dans tous les groupes d'entéropathie (cf. **Tableau 11** et **Figure 36**).

La diarrhée est essentiellement de type colique (selles molles, fréquence augmentée, présence de mucus et/ou de sang en nature) dans les groupes FRE, ARE et MICI/IRE alors qu'elle est exclusivement de type grêle (selles liquides) dans le groupe PLE. L'abattement et la dysorexie ne sont présents que chez les chiens des groupes MICI/IRE et PLE. L'ascite n'est décelable que dans le groupe PLE.

Tableau 11 : Caractéristiques cliniques des chiens recrutés selon le type d'entéropathie.

	Signes cliniques (pourcentage de cas où le signe est présent)
FRE (n=4)	<ol style="list-style-type: none">1. Diarrhée colique (50%)2. Vomissements (50%)3. Pica (25%)4. Dilatations gastriques (25%)
ARE (n=5)	<ol style="list-style-type: none">1. Vomissements (80%)2. Diarrhée colique (60%)3. Ténésme, épreintes (20%)
MICI/IRE (n=27)	<ol style="list-style-type: none">1. Vomissements (74%)2. Dysorexie (56%)3. Abattement (52%)4. Diarrhée colique (48%)5. Amaigrissement (33%)6. Diarrhée grêle (7%)7. Hématochézie (7%)
PLE (n=14)	<ol style="list-style-type: none">1. Diarrhée grêle (93%)2. Amaigrissement (71%)3. Abattement (52%)4. Dysorexie (43%)5. Ascite décelable cliniquement (43%)6. Vomissements (29%)

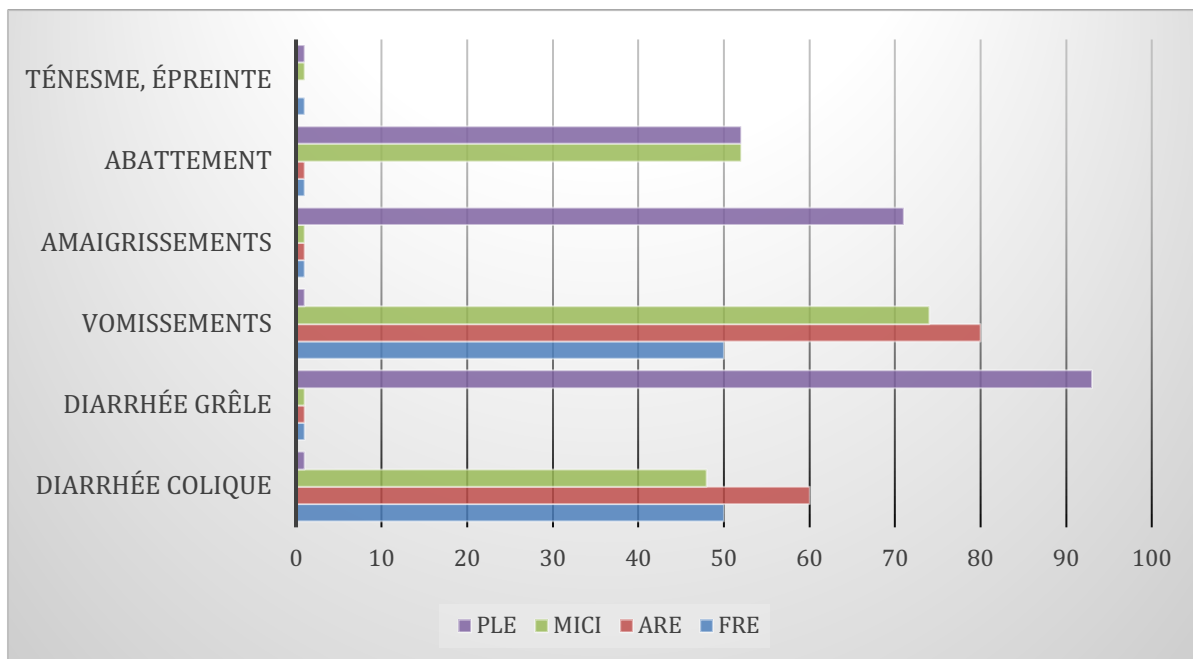


Figure 36 : Répartition des signes cliniques selon le type d'entéropathie.

1.2.3 Analyse histologique

A ce stade, l'analyse histologique a été réalisée dans le cadre de la procédure diagnostique de routine. Les résultats retranscrits dans le **Tableau 12** sont ceux figurant sur les comptes-rendus du LHA. La relecture en aveugle et la comparaison à un groupe de chiens sains n'a été réalisée que dans l'étude suivante portant sur le groupe MICI.

Des biopsies duodénales ont été obtenues chez 2 chiens atteints de FRE, 5 chiens atteints d'ARE, 24 chiens atteints de MICI/IRE et 11 chiens atteints de PLE.

Des biopsies iléales ont été obtenues chez 1 chien atteint de FRE, 0 chien atteint d'ARE, 8 chiens atteints de MICI/IRE et 6 chiens atteints de PLE.

Des biopsies coliques ont été obtenues chez 2 chiens atteints de FRE, 2 chiens atteints d'ARE, 14 chiens atteints de MICI/IRE et 10 chiens atteints de PLE.

Tableau 12 : Résumé des observations histologiques selon le type d'entéropathie (Comptes rendus LHA).

Duo : duodénum ; Il : Iléon ; Col : côlon ; LP : lymphoplasmocytaire ; Eos : éosinophile ; Neu : neutrophile ; Hist : histiocytaire ; NA : Non applicable.

Les sigles 0 (jamais observée), + (occasionnellement observée), ++ (fréquemment observée), +++ (très fréquemment observée) représentent la fréquence avec laquelle l'observation est rapportée dans les comptes rendus. Ils ne représentent pas l'intensité de l'anomalie.

		FRE			ARE			MICI/IRE			PLE		
		Duo (n=2)	Il (n=0)	Col (n=2)	Duo (n=5)	Il (n=0)	Col (n=2)	Duo (n=24)	Il (n=8)	Col (n=14)	Duo (n=11)	Il (n=6)	Col (n=10)
Infiltration inflammatoire	Infiltration de la <i>lamina propria</i>	LP + Eos 0 Neu 0	NA	LP + Eos 0 Neu 0	LP + Eos 0 Neu 0	NA	LP + Eos 0 Neu 0	LP ++ Eos + Neu 0	LP ++ Eos + Neu 0	LP + Eos + Neu 0 Hist+	LP +++ Eos + Neu +	LP +++ Eos + Neu 0 Hist +	LP +++ Eos + Neu 0
	Dilatation chylifères	0	NA	NA	0	NA	NA	0	0	NA	+++	+++	NA
Lésions morphologiques	Atrophie villositaire	0	NA	NA	0	NA	NA	+	+	NA	+	+	NA
	Dilatation des cryptes	0	NA	0	0	NA	0	0	0	+	++	++	+
	Lésions épithéliales superficielles	0	NA	0	0	NA	0	0	0	0	+	+	+
	Fibrose	NA	NA	0	NA	NA	0	NA	NA	+	NA	NA	0
	Réduction du nombre de cellules caliciformes	NA	NA	0	NA	NA	0	NA	NA	0	NA	NA	0

		FRE	ARE	MICI	PLE
Infiltration inflammatoire	Infiltration de la <i>lamina propria</i>	LP +	LP +	LP ++ Eos +	LP +++ Eos + Neu + Hist +
	Dilatation chylifères	0	0	0	+++
Lésions morphologiques	Atrophie villositaire	0	0	+	+
	Dilatation des cryptes	0	0	+	++
	Lésions épithéliales superficielles	0	0		+
	Fibrose	0	0	+	0
	Réduction du nombre de cellules caliciformes	0	0	NA	NA

Concernant l'inflammation, l'observation la plus fréquemment rapportée est une infiltration lymphoplasmocytaire d'intensité faible à modérée de la *lamina propria*. Elle est présente dans tous les groupes d'entéropathies et à tous les étages qui ont fait l'objet de biopsies. L'infiltration par des granulocytes éosinophiles est rare et uniquement présente de manière discrète dans un cas de MICI/IRE et un cas de PLE à tous les étages. Une infiltration polymorphe incluant des granulocytes neutrophiles et également présente dans un cas du groupe MICI/IRE et un cas du groupe PLE. Enfin, un cas du groupe PLE présente une discrète infiltration histiocytaire.

Seules les biopsies en provenance d'animaux du groupe PLE présentent des lésions morphologiques. Les plus fréquentes sont la dilatation des chylifères et la dilatation des cryptes. Les lésions morphologiques ne sont que peu rapportées dans les groupe FRE, ARE et MICI/IRE.

1.3 Discussion

1.3.1 Cohorte

La cohorte est composée de 50 chiens avec une majorité (82%) de chiens appartenant aux groupes MICI/IRE et PLE. Cette répartition contraste avec les résultats de Volkmann et *al.* qui rapportent une représentation des FRE de 47% dans leur population de chiens atteints de diarrhée chronique (190). Les FRE ne représentent que 6% de notre population. Cette différence tient aux modalités de recrutement. En effet, nos cas étaient essentiellement des animaux référés à un stade avancé de la démarche diagnostique. Les étapes des changements alimentaires et de l'essai de traitement métronidazole avaient été franchies par le vétérinaire traitant dans la plupart des cas.

1.3.2 Signes cliniques et score clinique

Les observations cliniques réalisées sur notre cohorte concordent avec celles d'autres études. Les signes cliniques dominants sont la diarrhée et les vomissements chroniques. Les animaux atteints de FRE, d'ARE et de MICI/IRE présentent plus fréquemment une diarrhée avec des caractéristiques d'atteinte colique alors que les animaux atteints de PLE présentent souvent une diarrhée avec des caractéristiques d'atteinte grêle.

L'analyse des scores d'activité clinique CCECAI met en évidence une valeur significativement plus élevée dans le groupe PLE (médiane de 10,5 dans le groupe PLE

versus 4 dans le groupe MICI). Cette observation est corroborée par les études antérieures. A titre d'exemple, Equilino et *al.* comparent une cohorte de 29 cas de PLE à 18 cas de FRE (324). Quarante-trois pour cent (27/29) des chiens atteints de PLE présentent des signes graves à très graves (CCECAI >9) alors que seuls 17% (3/18) des chiens atteints de FRE présentent des signes graves (CCECAI entre 9 et 11). Parmi ces derniers, aucun ne présente de signes très graves (CCECAI >11).

Cette différence d'intensité des signes cliniques tient aux répercussions métaboliques des pertes de protéines. Ces dernières entraînent une fonte musculaire importante et l'apparition d'œdèmes ou d'épanchements cavitaires qui majorent le score CCECAI.

1.3.3 Race

On observe une très importante diversité des races présentes dans notre cohorte. Cette observation est en accord avec les données de la littérature. La méta-analyse réalisée par Equilino et *al.* sur les PLE réunit un total de 469 chiens de 61 races différentes avec une plus forte représentation des Yorkshire terriers, des borders collies, des bergers allemands et des rottweilers (324). La surreprésentation des bouledogues français dans notre cohorte de MICI et de PLE est vraisemblablement liée à la surreprésentation de cette race dans la clientèle du CHV Frégis dont l'activité est fortement orientée vers la prise en charge des maladies de cette race (syndrome des races brachycéphales, hernies discales ...) . Six des huit bouledogues inclus ont été recrutés au sein de ce site.

1.3.4 Choix de la cohorte pour l'analyse de l'expression des TLRs

La faible taille des groupes ARE et FRE nous a conduits à ne pas poursuivre les investigations dans ces deux groupes. Par ailleurs, les observations épidémiocliniques amènent à constater que les deux entités restantes (MICI et PLE) présentent, outre l'hypoalbuminémie, deux différences fondamentales :

1. L'intensité clinique des PLE est nettement plus élevée que celle des MICI.
2. Les lésions histologiques morphologiques sont plus importantes et systématiques dans le groupe PLE.

Ces différences conduisent à penser que ces deux entités sont distinctes et que leur étude peut être menée séparément. Nous avons donc décidé de concentrer l'étude de l'expression des TLRs sur la cohorte de chiens atteints de MICI/IRE.

2 Etude de l'expression des récepteurs Toll-Like 2, 4, 5 et 9 dans la muqueuse intestinale et de la réaction immunitaire humorale dirigée contre des motifs bactériens chez le chien atteint de Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

2.1 Introduction à la publication

Afin d'étudier l'expression protéique des TLR2, 4, 5 et 9 et d'évaluer la réponse immunitaire humorale dirigée contre des motifs bactériens, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- Etape 1 : Constitution d'un groupe témoin en recrutant une cohorte de chiens cliniquement sains. Les témoins sont des beagles et des briards de colonie logés dans des cages individuelles et nourris deux fois par jour avec une alimentation commerciale. L'eau est fournie *ad libitum*. Les chiens témoins ne présentent aucun signe clinique de maladie gastro-intestinale et leurs examens de laboratoire sont normaux y compris NFS, analyse biochimique sérique et examen parasitologique des selles. Les spécimens contrôles ont été obtenus dans le cadre d'un projet approuvé par le comité d'éthique C2EA44 Pays de Loire (décision APAFIS#13800-2017071917541410v4) pour les beagles et après euthanasie dans le cadre d'un protocole sans lien avec le nôtre pour les briards.
- Etape 2 : Caractérisation de la population d'étude et de la population témoin au plan :
 - Histologique en procédant à la lecture en aveugle des cas de MICI et des cas témoins à l'aide du score histologique *Simplified Histopathologic Scoring System for Gastrointestinal Inflammation*.
 - Immunohistochimie des populations de lymphocytes CD3+, de lymphocytes CD20+, de macrophages CD204+ et de lymphocytes Treg FOXP3+.
 - Du profil de cytokines et de chimiokines tissulaires en dosant dans les biopsies intestinales des cas de MICI et des cas témoins le GM-CSF, l'IFN- γ , l'IL-2, l'IL-6, l'IL-7, l'IL-8, l'IL-10, l'IL-15, l'IL-18, l'IP-10, le KC-like, le MCP-1 et le TNF- α .
- Etape 3 : Evaluation de l'expression protéique des TLR2, 4, 5 et 9 dans la muqueuse intestinale des chiens atteints de MICI et des cas témoins par immunohistochimie.
- Etape 4 : Evaluation de la réponse immunitaire humorale en :
 - Comparant les dosages d'IgA dans la muqueuse intestinale des cas de MICI à ceux des cas témoins.

- Comparant les dosages des IgA et IgG sériques anti-flagelline et anti-LPS des chiens atteints de MICI à ceux des chiens témoins.

Notre travail a été réalisé sur la cohorte restreinte des 27 chiens atteints de MICI/IRE. Cinq chiens ont été écartés à cause d'un score clinique insignifiant (CCECAI<3, n=4) et à cause de prélèvements en quantité insuffisante (n=1). L'étude a donc été menée sur 22 chiens atteints de MICI.

2.2 Publication

Is non-hypoalbuminemic form of canine Inflammatory Bowel Disease a relevant spontaneous model of human IBD?

J. Hernandez¹, E. Rouillé², F. Chocteau², M. Allard¹, K. Haurogné¹, F. Lezin², J. Hervé¹, JM Bach¹, J. Abadie², B. Lieubeau¹

¹ IECM, INRAE, USC1383, Nantes, France

² LabOniris, Oniris, UBL, Nantes, France

Soumis à *Inflammatory Bowel Disease*

Inflammatory Bowel Diseases

Is non-hypoalbuminemic form of canine Inflammatory Bowel Disease a relevant spontaneous model of human IBD?

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original Research Articles - Basic Science
Section/Category:	Inflammation
Keywords:	Inflammatory Bowel Disease; Dog; Toll-like Receptors; Chemokines; Microbial ligands
Corresponding Author:	Blandine Lieubeau, Ph.D IECM, Immuno-Endocrinology, Oniris, INRAe, USC1383 Nantes, FRANCE
First Author:	Juan Hernandez, DVM, MS
Order of Authors:	Juan Hernandez, DVM, MS Elodie Rouillé, DVM Florian Chocteau, DVM Marie Allard Karine Haurogné Florence Lezin Julie M. Hervé, DVM, PhD Jean-Marie Bach, DVM, PhD Jérôme Abadie, DVM, PhD Blandine Lieubeau, Ph.D
Manuscript Region of Origin:	FRANCE
Abstract:	<p>Background</p> <p>The incidence of IBD (Inflammatory Bowel Disease) is increasing worldwide, emphasizing the need of relevant models, as dog spontaneously affected by IBD might be, for better knowledge of the disease physiopathology.</p> <p>Methods</p> <p>We studied 22 client-owned dogs suffering from IBD without protein loss and 14 control dogs. Biopsies were obtained from duodenum, ileum and colon. Inflammatory grade was assessed by histopathology, immunohistochemistry and chemokine analysis. Expression of Toll-Like Receptors (TLR) in mucosa was immunohistochemically evaluated. Antibody levels against bacterial ligands (LPS and flagellin) were measured in sera using ELISA.</p> <p>Results</p> <p>IBD dogs showed low to severe clinical diseases. Histopathologically, gut of IBD dogs did not exhibit significant alterations compared to controls except in the colon. The number of CD3 + T lymphocytes was decreased in the ileum and colon of IBD dogs compared to control, while the numbers of Foxp3 + , CD20 + and CD204 + cells were similar in the two groups. Three chemokines (KC-like, IL-8 and MCP-1), but no cytokines, were detected at the protein level in the mucosa and the disease poorly affected their tissue concentrations. IBD dogs exhibited higher serum reactivity against LPS and flagellin than controls, however similar immunoreactivity against their receptors TLR4 and TLR5. TLR2 and TLR9 also showed similar patterns of expression in control and IBD dogs.</p>

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	<p>Conclusions</p> <p>Our data support the hypothesis of dysregulated immune response in dogs affected by IBD without protein loss. However, the inflammation appeared to be less severe than in human IBD.</p>
--	--

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63

Is non-hypoalbuminemic form of canine Inflammatory Bowel Disease a relevant spontaneous model of human IBD?

Juan Hernandez, DVM, MS,* Elodie Rouillé, DVM,** Florian Chocteau, DVM,** Marie Allard,* Karine Haurogné,* Florence Lezin**, Julie M. Hervé, DVM, PhD,* Jean-Marie Bach, DVM, PhD,* Jérôme Abadie, DVM, PhD,** Blandine Lieubeau, PhD*

*IECM, Immuno-Endocrinology, Oniris, INRAe, USC1383, 44300, Nantes, France

**Laboniris, Oniris, 44300, Nantes, France

Address correspondence to: Blandine Lieubeau, IECM, Oniris, la Chantrerie, CS44706, F-44300 Nantes, France; telephone number: (33) 240-687-718; e-mail: blandine.lieubeau@oniris-nantes.fr

Conflicts of interest: All authors declare that there is no conflict of interest to disclose.

Supported by: Hill's Pet Nutrition. The founder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions: JH and BL conceived and designed experiments; MA, KH, FL and JMH performed experiments; JH, ER, FC, JA and BL analysed results; JH, JMH, JMB, JA and BL prepared the manuscript. All authors approved the final manuscript.

Abstract (<250 words)

Background

The incidence of IBD (Inflammatory Bowel Disease) is increasing worldwide, emphasizing the need of relevant models, as dog spontaneously affected by IBD might be, for better knowledge of the disease pathophysiology.

Methods

We studied 22 client-owned dogs suffering from IBD without protein loss and 14 control dogs. Biopsies were obtained from duodenum, ileum and colon. Inflammatory grade was assessed by histopathology, immunohistochemistry and chemokine analysis. Expression of Toll-Like Receptors (TLR) in mucosa was immunohistochemically evaluated. Antibody levels against bacterial ligands (LPS and flagellin) were measured in sera using ELISA.

Results

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

IBD dogs showed low to severe clinical diseases. Histopathologically, gut of IBD dogs did not exhibit significant alterations compared to controls except in the colon. The number of CD3⁺ T lymphocytes was decreased in the ileum and colon of IBD dogs compared to control, while the numbers of Foxp3⁺, CD20⁺ and CD204⁺ cells were similar in the two groups. Three chemokines (KC-like, IL-8 and MCP-1), but no cytokines, were detected at the protein level in the mucosa and the disease poorly affected their tissue concentrations. IBD dogs exhibited higher serum reactivity against LPS and flagellin than controls, however similar immunoreactivity against their receptors TLR4 and TLR5. TLR2 and TLR9 also showed similar patterns of expression in control and IBD dogs.

Conclusions

Our data support the hypothesis of dysregulated immune response in dogs affected by IBD without protein loss. However, the inflammation appeared to be less severe than in human IBD.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease, Dog, Toll-like Receptors, Chemokines, Microbial ligands

Topic: Animal models, Spontaneous disease, Gut mucosa, Histopathology,

Subject: Inflammation

Issue Section: Basic Science Research

Summary (40 words)

Dog inflammatory bowel disease (IBD) was proposed as a relevant spontaneous model for human IBD. In this study we showed that dog IBD, like in human, is characterized by dysregulated immune response against microbiota, despite less severe histopathological gut alterations.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63

Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD) are complex multifactorial diseases characterized by chronic inflammation in the gastrointestinal tract that seriously affect the quality of life of the patients. In human, they include Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Both are thought to arise in genetically prone individuals under the influence of environmental factors that trigger excessive activation of the innate and adaptive arms of the host immune response.

The gut, by itself, constitutes a complex ecosystem, and environmental factors greatly influence the composition of the microbiota¹. The importance of the interactions between the host and the microbiota in gut homeostasis and diseases is now well established. IBD is thus associated with dysregulated immune response to gut microbiota although it is not yet clear whether this is a causative factor or a consequence of the disease².

Interactions between host cells and microbiota are mediated by different receptors including Toll-like receptors (TLR)-2, -4, -5 and -9, which recognize specific bacterial Pathogen-Associated Molecular Patterns. The generation of genetically-engineered mice in combination with the development of experimentally-induced colitis models allowed identifying the role of specific gene products in gut homeostasis. For example, mice deficient for TLR-2 and -4 were shown to be highly susceptible to dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis demonstrating that these TLRs mediate major protective effects in the gut³. In these models, the chemically induced alterations of the mucosal barrier compromise epithelial barrier function and trigger increased exposure of the mucosa to bacterial ligands. In this respect, Sanders *et al.* described a MyD88-dependent serum antibody response to endogenous flagellin following DSS treatment in mouse, suggesting that, in inflammatory conditions, TLR signalling promotes production of antibodies to bacterial ligands⁴. Even if highly contributive to gut immunology, murine models suffer however from a lack of genetic heterogeneity, lack of environmental factors' exposure and a small size to test preventive or curative approaches to human IBD.

In this context, pig was proposed as a more relevant model to explore the mechanisms involved in intestinal inflammation⁵ and to test preventive or therapeutic anti-inflammatory properties of various treatments^{6,7}.

Veterinary medicine also provides interesting models for comparative pathology, and naturally occurring diseases in companion animals might help to improve our understanding of human physiopathology, especially regarding diseases triggered by environmental factors in genetically diverse individuals⁸. Indeed, human beings and their companion animals share their

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
--

environment and exposome. Dogs actually develop IBD and the differences and similarities between human and dog IBD have been reviewed previously⁹. More generally, dogs develop chronic enteropathy (CE) characterized by classical gastro-intestinal clinical signs such as vomiting, diarrhoea, abdominal pain and weight loss present for a duration of 3 weeks at least, after exclusion of extra-intestinal causes¹⁰.

The current management of CE in dogs first includes exclusion of extra-intestinal causes, diet modification, followed by antibiotic treatment if there is no clinical improvement. Enteropathies that respond to food trial or antibiotic treatment are retrospectively classified as food-responsive (FRE) and antibiotic-responsive enteropathy (ARE), considered as different entities. The term Inflammatory Bowel Disease has to be restricted to patients for whom the diet changes and antibiotic trials failed. Diagnosis of IBD is then confirmed by endoscopic examination and histological analyses of intestinal biopsies highlighting signs of mucosal inflammation, while ruling out the presence of neoplastic infiltration. These patients require an immunosuppressive therapy as human patients do.

When associated with hypoalbuminemia, IBD merges into protein-losing enteropathies (PLE) although the aetiology of PLE in dog is multiple¹¹. In human, an intestinal protein loss also represents a severe, but fortunately rare, complication of IBD¹².

If some data suggest that dog might be used for translational research, major questions still need to be addressed. In particular, whether IBD dogs display aberrant immune responses against bacteria or bacterial products has been poorly investigated until now. To our knowledge, only two recent publications showed separately (i) increased reactivity against bacteria¹³ and (ii) dysregulated TLRs protein expression in dogs suffering from chronic enteropathies^{13,14}.

In this context, the aim of our study was, in a comparative perspective with human data, to analyse mucosal inflammation with evaluation of the expression of several TLRs and to reveal systemic immune response against bacterial ligands, in a homogeneous cohort of hypoalbuminemia-free IBD dogs.

Materials and Methods

Study population

The IBD cohort included 22 client-owned dogs with chronic gastrointestinal signs diagnosed with IBD based on clinical, clinicopathologic, endoscopic, and histopathologic criteria. They were recruited between November 2016 and February 2018 in two hospitals: 15 dogs at the Fregis Hospital (Arcueil, France) and 7 dogs at the Small Animal Teaching Hospital of Oniris (Nantes,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

France). According to standard diagnosis evaluation, we focused on dogs that did suffer neither from FRE nor ARE. Dogs with intestinal protein loss (documented by hypoalbuminemia < 20 g/l) were not included in the cohort.

Briefly, the diagnosis of IBD was based on gastro-intestinal clinical signs (including vomiting, diarrhoea, weight loss...) of at least 3 weeks' duration, after exclusion of extra-intestinal diseases such as hepatic, pancreatic or renal diseases, exclusion of infectious diseases and failure to respond to dietary and antibiotic treatments. Diagnostic tests included Complete Blood Count, serum biochemical analysis, urinalysis and analyses of fecal samples for parasites using flotation techniques. Additional tests included assessment of serum concentration of canine trypsin-like immunoreactivity and measurements of serum cobalamin and folate concentration, as well as abdominal ultrasound examination.

Clinical activity of the disease was graded using the Canine Chronic Enteropathy Clinical Activity Index (CCECAI), which considers nine items each graded from 0 to 3: general attitude and activity, appetite, frequency of vomiting, stool consistency and frequency of defecation, weight loss, serum albumin concentration, peripheral oedema and ascites, and pruritus (Allenspach 2007). The disease is considered very severe when CCECAI>12. The comparison of the CCECAI with basic clinical indexes used in human is shown in Supplementary Table 1.

The IBD cohort included male and female dogs from 13 breeds and two cross-breed ones. Their median age and weight were respectively 4 years (range 0.7 to 16 years) and 10.4 kg (range 3.4 to 32 kg). Their CCECAI ranged from 3 to 11 with a median score of 5.

Control samples (mucosal biopsies and sera) were obtained from laboratory healthy dogs. Their median age and weight were respectively 5 years (range 3 to 5 years) and 11 kg (range 9.8 to 35 kg).

Pathologic evaluation

Biopsy specimens were collected in the small (duodenum/ileum) and/or the large (colon) intestine depending on clinical signs, biological and ultrasonographic data. Six tissue specimens were obtained from each region as routinely required for reliable diagnosis assessment. Tissue samples were processed for histopathological examination according to standard protocols. Briefly, specimens were placed in cassettes and fixed in 10% formalin for 48 h, before dehydration and paraffin embedding. Four μm sections were cut and stained with Hematoxylin- Eosin-Saffran (HES). Initial histopathological assessment was performed at the Laboniris as part of the routine diagnostic procedure.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

At the end of the study, all slides were reviewed by a board-certified pathologist in a blinded fashion according to the most recent World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group guidelines¹⁵. For each sample, the severity of the lesions were recorded using a 4-point grading system where 0 = normal, 1 = mild, 2 = moderate, and 3 = severe histopathologic changes. Morphologic criteria included crypt dilation, epithelial injury plus, in duodenum and ileum, villous stunting and lacteal dilation, and, in colon, goblet cell loss and fibrosis. Inflammatory parameters included *lamina propria* lymphocytes and plasma cells, eosinophils, neutrophils plus, in colon, *lamina propria* macrophages. A summative score, which is expected to represent mucosal alterations, was calculated for each sample. The maximum scores could be respectively 12 and 9 in the small intestine for morphologic and inflammatory criterias; and 12 in the colon for both types of parameters.

Immunohistochemical analyses

Immunohistochemical labelling was carried out on sections of formalin- fixed paraffin- embedded tissues with the Ventana Benchmark XT Automate (Roche Diagnostics). All details about primary antibodies and associated detection systems are provided in Supplementary Table 2. Conventional T lymphocytes were stained using an anti-CD3 antibody, regulatory T cells with an anti-foxp3 antibody, B lymphocytes with an anti-CD20 antibody and macrophages with the anti-CD204 antibody. Expression of TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9 was assessed using antibodies raised against human proteins, cross-reacting with dog antigens.

Quantification of CD3, CD20, CD204 and foxp3 positive cells in duodenal and ileal samples was performed on high power field (x 400) images including for two villi and their corresponding crypts; the number of immunolabelled cells was determined and the result was expressed as number of positive cells per surface unit (mm²). In the colon, the same analysis was performed on two adjacent crypts.

TLRs' expression was analysed in term of location (epithelium *versus lamina propria*) and semi-quantitatively graded from 0 (no expression/ absence of positive cells) to 3 (strong expression in a high number of cells).

Anti-flagellin and anti-LPS immunoglobulins levels

Serum anti-flagellin- and anti-LPS immunoglobulin levels (IgA and IgG) were determined using an ELISA test adapted from the method described for detection of these antibodies in human sera¹⁶. Serial dilutions (1/8; 1/40; 1/200; 1/1000; 1/50000) of sera were incubated, in duplicate, in purified *E. Coli* LPS (O128:B12, 1µg/well, Sigma-Aldrich), or *S. Typhymirium* flagellin

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

(100ng/well, Clinisciences) -coated wells in ELISA plates. Sera were also systematically incubated in antigen non-coated blank wells to determine background reactions of individual samples. Levels of IgG and IgA were respectively assessed by incubation with HorseRadish Peroxydase (HRP)-conjugated anti-dog IgG or IgA (Euromedex), followed by addition of the HRP colorimetric substrate. Results were expressed as the optical density differences (ΔOD) between coated and uncoated wells. In each experiment, a reference serum was included to standardize data. The use of serial dilutions of sera confirmed signals' specificity. Finally, the relative quantification of antibodies was calculated for the 1/200 dilution. Results were finally expressed as arbitrary units (AU) compared to the reference serum set to 100. When the signal-to-noise ratio was too high for a given sample, it was excluded. The 1 value was arbitrarily assigned to sera for which no specific immunoglobulins were detected.

Quantification of cytokines and IgA in biopsies.

Biopsies obtained through endoscopic procedures were quickly frozen at -80°C and stored before protein extraction. Samples were mechanically disrupted in PBS ($250\mu\text{l}$) containing protease inhibitors (Sigma-Aldrich) using a dounce homogeniser. Cell lysates were centrifuged at $20\,000g$ for 30min at 4°C . Supernatants were aliquoted and stored at -80°C until further analyses. Total protein quantification was performed using the microBCA assay (Pierce). The cytokine multiplex assay (CCYTOMAG-90K-PX13, Merck-Millipore) was then used to assess the levels of GM-CSF, IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, IP-10, KC-like, MCP-1 and TNF α in $25\mu\text{l}$ protein samples as recommended by the manufacturer. Data were expressed related to the protein content of each sample (pg/mg). Total IgA in mucosal samples was assayed with the Dog IgA ELISA quantitation kit (Bethyl Laboratories).

Statistical analysis

Analyses were performed with GraphPad Prism (GraphPad Software version 6.00, La Jolla California USA). Differences of quantitative variables between groups were assessed using non-parametric tests. For comparison between 2 groups (control versus IBD), the Mann-Whitney test was used. The Kruskal-Wallis test was used when comparing the 3 different locations (duodenum, ileum, colon) in control gut, followed by Dunn's test for multiple comparisons.

Statistical significance appears as stars on charts (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$); each dot represents one sample issued from a single dog while lines denote medians.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

Ethical considerations

All experimental procedures were carried out in compliance with the EU directive 2010/63 for animal experiment. All sampling procedures on control beagles were approved by the C2EA44 Pays de Loire ethic committee in the context of a project registered with the agreement APAFIS#13800-2017071917541410v4. Five Briard, housed at the Boisbonne animal facility, were sampled post-mortem at the end of unrelated studies. For client owned, IBD dogs, procedures were approved by the Oniris' ethic committee for clinical and epidemiological research (decision CERVO-2016-13-V).

Results

Mucosal pathology

Mucosal inflammation was first quantified on HES-stained sections (Figure 1). For most IBD samples, the inflammatory infiltrate was identified as lymphocytic and plasmacytic and graded from 0 to 2. Only two samples showed signs of associated infiltration by eosinophils in the duodenum or the ileum, and one by macrophages into the colon. The most commonly found morphological alteration in the small intestine was villous stunting (11/18 in the duodenum and 5/6 in the ileum) but the overall grade was found to be low (0-4) to mild (5-6) in both parts of the small intestine. The most significant lesions were found in the colon of IBD dogs with scores ranging from 3 to 11 (median=7) with a poor contribution of the inflammatory components compared to the morphological ones (≤ 2).

In control dogs, despite the absence of any clinical signs of enteropathy, the HES scores from the duodenum and ileum were not significantly different from the ones obtained in IBD dogs. The only significant difference in HES scores between control and IBD dogs was found in the colon.

A deeper histological analysis was then performed on tissue sections from the same samples in order to phenotype the immune cell population, using classical markers (Figure 2). As expected, CD3⁺ lymphocytes were found in the *lamina propria* and in the epithelial compartment of the duodenum, ileum and colon. In control dogs, when comparing the three segments of the gut, the highest number of T lymphocytes was found in the ileum (Kruskall-Wallis, $p=0.0016$, post test ileum vs colon $p<0.01$). The number of duodenal mucosal T lymphocytes was not different in control and IBD dogs; however, significant lower CD3⁺ lymphocyte numbers were observed in ileal ($p<0.05$) and colonic ($p<0.01$) mucosa of IBD dogs as compared to control ones. In contrast,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

identical numbers of foxp3⁺ regulatory T cells, mainly located in the *lamina propria*, were found in samples from control and IBD dogs at any location.

CD20⁺ B lymphocytes were exclusively detected in the *lamina propria* of the three segments of the gut with lower numbers in the ileum compared to duodenum and colon (Kruskall-Wallis, p=0.0034; post test p<0.01 for duodenum and p<0.05 for colon). The number of B lymphocytes was identical in control and IBD samples in the three segments of the gut.

Finally, the CD204⁺ macrophage *lamina propria* population, known to display anti-inflammatory properties, was analysed. CD204⁺ cells were more numerous in the small intestine than in the colon (Kruskall-Wallis, p<0.0001, post tests p<0.01 for duodenum compared to colon and p<0.001 for ileum compared to colon). No difference between control and IBD samples was found in the 3 gut segments.

Chemokine and IgA expression in mucosal samples

A total of 47 biopsies were sampled from the upper and lower digestive tract of 9 control and 11 IBD dogs. The median total protein recovery was 869 μg [range: 410-1793 μg]. Cytokines/chemokines quantification was performed by multiplex analysis.

Only 3 among the 13 measured analytes, namely KC-like, IL-8 and MCP-1, were detected in nearly all the samples (Figure 3). Their levels poorly differed in IBD *versus* control dogs except for MCP-1 in the ileum and KC-like in the colon which were significantly higher in IBD compared to control dogs (p<0.05 for both). GM-CSF was detected in 12 samples (6 control and 6 IBD dogs) while IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, IL-15, IL-18, IFN γ , IP-10 and TNF α were sporadically found (in less than 7 samples).

In addition, IgA expression was quantified in all samples. The levels of IgA were significantly lower in duodenal mucosal samples from IBD dogs compared to control dogs (Figure 3). This difference between control and IBD dogs was not observed in biopsies taken from the ileum and the colon.

Serum reactivity against bacterial antigens

Serum anti-flagellin and anti-LPS antibodies levels were assessed using ELISA in 13 control dogs and 21 IBD dogs. For most of them, antibody level quantification was possible; an example of curves is shown in Supplementary Figure 1A. The anti-LPS IgA assay was not found to be sufficiently sensitive to reproducibly assess anti-LPS IgA levels in dog serum.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

As shown in Figure 4, we found significantly higher levels of anti-flagellin and anti-LPS IgGs in IBD dogs compared to control dogs ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively) (Figure 4). In contrast, anti-flagellin IgAs levels were similar in the control and IBD groups (Supplementary Figure 1B).

Expression of TLRs in the gut mucosa

Representative images of TLRs' expression pattern in the different segments of normal gut are shown in Figure 5. Quantification of TLR-2 and-5 stainings in duodenum, ileum and colon of normal versus IBD dogs are shown in Figure 6.

* TLR2

In control animals, duodenal and ileal epithelium were stained both in the villi and in the crypts with staining slightly more intense in the villi than in the corresponding crypts. Same pattern was observed at the apical and basal parts of the colonic crypts with a significant reduced expression in the colon compared to small intestine.

Staining was mainly cytoplasmic and diffuse although scattered membrane staining was observed to some extent. TLR2 positive leucocytic cells were also found in the *lamina propria* in the three segments of the gut.

The overall staining was found to be higher in the duodenum than in the ileum and the colon (Kruskall-Wallis $p = 0.0063$, post-test $p < 0.01$ with the ileum, $p < 0.05$ with the colon) (Figure 6).

Indeed, TLR2 was systematically detected in the duodenum and not in the ileum and colon.

No significant difference of TLR2 expression was found in the duodenum, ileum and colon when comparing control dogs to IBD patients.

* TLR4

In control dogs, TLR4 expression was detected exclusively in the *lamina propria* of gut mucosa and not in the epithelium whatever the location (from duodenum to colon). The staining pattern of positive cells was cytoplasmic and diffuse within small leucocytic cells.

TLR4 expression was found to be identical in the duodenum, ileum and colon and similar in control and IBD dogs in the three parts of the gut (not shown).

* TLR5

In control dogs, TLR5 was detected in the epithelium and in the *lamina propria* of the three parts of the gut, with the strongest expression in the colon mucosa (Kruskall-Wallis, $p = 0.0148$; post test, $p < 0.05$ colon vs ileum, Figure 6). Epithelial cells were stained continuously and weakly in both apical and basal areas of the crypts. There was also basal granular staining of intra-epithelial small round cells in the crypts, supposedly epitheliotropic T lymphocytes. The number

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

of these cells decreased from duodenum, ileum to colon. In the *lamina propria*, different types of cells were TLR positive, morphology consistent with lymphocytes, plasma cells, macrophages and endothelial cells. The staining pattern seemed to be strongly granular and cytoplasmic (Figure 5).

The overall expression of TLR5 was not different in the three segments of the gut when comparing control and IBD dogs (Figure 6).

* TLR9

In control dogs, TLR9 was detected in the epithelium and in the *lamina propria* of the duodenum, the ileum and the colon. Positive cells were equally distributed in crypts and villi.

In the duodenum and the ileum, the staining in the villus was accentuated at the apical pole of epithelial cells. Cells positive for TLR9 in the *lamina propria* were composed of a homogenous group of small round cells, supposedly lymphocytes and plasma cells.

No difference in TLR9 expression was detected in the duodenum, the ileum and the colon between control and IBD dogs (not shown).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

Discussion

IBD is a complex, multifactorial disease, whose incidence in human is in constant increase, stressing the need to develop efficient preventive and curative approaches.

Like in humans, the disease in dog has a genetic component as shown by the strong susceptibility observed in a few breeds¹⁷. Among the cohort of 22 IBD dogs we studied, four dogs belonged to these susceptible breeds.

Another feature of the cohort is that we focused on IBD dogs, free of protein-losing enteropathy, often associated with disease severity. Hence, in our study, IBD dogs were not affected by very severe disease, with CCECAI scores ranging from 3 to 11 (median=5). Also, IBD dogs presented few extra-intestinal signs since none of them exhibited oedema, and only three of them displayed pruritus.

In tissues, the level of morphological architectural alterations (villous stunting, crypt dilation, lacteal dilatation and epithelial injury) in the duodenum and ileum was limited as shown by the low grading of tissue lesions. This is in agreement with previous data showing that morphological lesions such as lacteal dilation and epithelial injury, that positively impact the score, were more frequent in case of hypoalbuminemic IBD¹⁸. In the colon, histopathological scores were higher in IBD dogs as compared to control ones. The low extent and intensity of morphological alterations we observed in the cohort of dogs is clearly distinctive from alterations reported in human IBD¹⁹.

In the majority of IBD cases, mucosal inflammation was qualified as lymphocytic and plasmacytic with only sporadic infiltration by eosinophils. However, we did not observe significant differences in the grading score of lymphocytic and plasmacytic infiltration when comparing IBD dogs to control dogs using the method used for routine diagnosis on HES stained sections. The recent report by Allenspach *et al.* also described significant lymphocytic and plasmacytic infiltration in control dogs¹⁵. Altogether, these data may question the benefit of scoring lymphocytic and plasmacytic infiltration for pathological assessment of dogs with IBD without protein loss.

Surprisingly, the number of CD3⁺ T lymphocytes was lower in the ileum and colon of IBD dogs as compared to control dogs despite identical numbers of foxp3⁺ T regulatory lymphocytes. There is now growing evidences that innate lymphoid cells play a key role in IBD²⁰ and it would be interesting to better characterize these cell populations in dogs in order to reveal their potential role in disease. The population of CD204⁺ macrophages was similar in control and IBD

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

dogs. Previous studies demonstrated decreased numbers of regulatory T cells and CD204⁺ macrophages but they were based on data obtained on heterogeneous cohorts of IBD dogs containing hypoalbuminemic patients which may account for these contrasting results^{21,22}.

In human, CD is traditionally associated with activation of Th1 cells while UC is rather Th2 mediated. To get further insights into cytokinic environment of the gut mucosa of IBD dogs, we measured chemokine levels in gut tissues. In dogs, cytokine expression was previously assessed through mRNA quantification, in duodenal and colonic biopsies and no clear evidence of upregulation of any cytokines was observed^{23,24,24}. One study reported undetectable IL-10 levels but similar IFN γ and IL-17 protein levels in duodenal biopsies from patients compared to controls²⁴. In our study, the assay sensitivity was not as good as expected. We did not detect IL-6, which was often associated to pronounced inflammation in chemically induced experimental models of colitis in pigs^{25,26}. The only analytes that were detected in nearly all biopsies were KC-like, IL-8 and MCP1 chemokines independently of dogs' status (control versus IBD). Epithelial cells are known to produce different chemokines such as IL-8 and MCP1 and those were previously associated with IBD in human²⁷. For example, Reinecker *et al.* reported constitutive expression of MCP-1 in the colonic mucosa with increased expression in IBD patients²⁸. In our study, we found moderate increase in chemokine levels in IBD patients as compared to control dogs.

Also, in human, increased circulating levels of IL-6 and TNF α , to a lesser extent, are considered to be markers of IBD²⁹. We detected IL-6 in a single serum sample of IBD patients (data not shown). We did not either detect TNF α with an assay that allowed detection of concentration above 7.8pg/ml (data not shown) in agreement with previous data³⁰. Also, Titmarsh *et al.*, in a study without a control group, reported levels of TNF α below 4pg/ml in the majority of IBD dogs (21 upon 23)³¹, which fits with TNF α levels reported in different cohorts of healthy dogs³². Altogether, these data suggest that most IBD dogs did not exhibit elevated serum TNF α .

Mucosal immune protection mechanisms include local IgA production, thought to provide the first line of defence in the gut mucosa³³. In control dogs, we found lower quantity of IgA in the ileum compared to the duodenum, which is in accordance with the gut anatomy in dog. Indeed, Peyer's patches are more developed in the duodenum than in the ileum in adults with an associated decrease of IgA⁺ cells in the *lamina propria* from the proximal to the distal part of the small intestine³⁴. As previously reported³⁵, we also detected significantly lower IgAs level in the duodenum of IBD dogs compared to control dogs.

Local IgA production was also proposed to control the systemic spread of commensal bacteria³⁶. We actually found increased circulating antibody levels against two bacterial antigens, flagellin

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

and LPS, in IBD dogs compared to control dogs. In human, flagellin was recognized as a dominant antigen in Crohn patients although it is not clear whether antibodies against flagellin are directed against flagellin from specific flagelleted bacteria or not^{37,38}.

Sensing of bacterial ligands occurs especially though TLRs expressed by different cell types in gut mucosa. Since compartmentalisation of the TLRs was proposed as a key factor to maintain gut homeostasis³⁹, we assessed TLRs expression in gut mucosa by immunohistochemistry. We detected TLR2, TLR5 and TLR9 expression in the epithelium and in the *lamina propria* of the different parts of the gut, while TLR4 was only expressed by *lamina propria* cells. This pattern of expression is similar to the one recently reported by Schnyder *et al.* in dogs¹³. However, in contrast with their study, we did not find any significant modulation of TLRs expression in the gut mucosa of dogs suffering from IBD compared to control dogs. Again, this discrepancy might be explained by the difference in the cohorts of IBD dogs since we focused on a homogeneous group of dogs without hypoproteinemia and severe disease.

In human, despite the large numbers of studies showing expression of TLRs mRNA in intestinal cell lines, isolated gut epithelial cells or gut biopsies, the expression of TLRs at the protein level in the different part of the gut has been poorly investigated.

In human, while previous studies reported TLR2 and TLR4 expression in the *lamina propria* of IBD patients^{40,41}, most recent studies confirmed that TLR2 and TLR4 expression were observed in *lamina propria* cells but the main expression were found in the epithelial compartment of normal ileum and colon and were particularly high in cryptic epithelium⁴² and in enteroendocrine cells⁴³. Of note, TLR4, but not TLR2 was also detected in the epithelium of ileal villi in control samples and both TLR2 and TLR4 were upregulated in the epithelial compartment in patients with UC⁴⁴. Less has been done as far as TLR5 and TLR9 are concerned but they were also detected in the gut epithelium^{40,45}.

Thus, the expression pattern of the different TLRs appears to be different in human and dog, especially concerning TLR4, which was not found in the epithelial compartment of gut mucosa in dogs.

Conclusion

In the present study, we aim to characterise biological and pathological features of gut mucosal immunity actors as potential component of the physiopathology of canine IBD as model of the corresponding human disease. Altogether, our data highlight some singularities in non hypoalbuminemic forms of canine IBD when compared to human IBD. Especially, the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

lymphocytic and plasmacytic infiltration in the gut mucosa might not be as important as previously thought in the pathogenesis of this disease in dogs. Indeed, we found that this feature was not significantly associated with the clinical score and symptoms in IBD dogs compared to control dogs, while morphological alterations of the intestinal epithelial barrier were also scarce in our cohort. Moreover, we described differential expression of the different TLRs in term of location and intensity in small and large intestines. This feature suggests that TLR signalling is probably important in the dog as in human for the regulation of the dynamic equilibrium that exists between the gut microbiota and the immune system activity. We also found an increase in antibody levels against bacterial ligands in IBD dogs compared to controls, which corroborates the existence of dysregulated immune responses in IBD animals. Thus, our data constitute a step further towards a better understanding of the interactions between the host and gut microbiota in health and disease, even if further experiments are still warranted to validate the dog as a spontaneous model of human intestinal inflammation.

Acknowledgements

We acknowledge members of the Oniris Medecine service, especially Amandine Drut for dog recruitment. We are grateful to Jack-Yves Deschamps and Patrick Nguyen who permitted access to control samples and to Maud Chétiveaux at the Therassay platform. We also thank the pet owners who accepted inclusion of their dogs in this study.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

References

1. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448:427–434.
2. Ni J, Wu GD, Albenberg L, et al. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017;14:573–584.
3. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118:229–241.
4. Sanders CJ, Yu Y, Moore DA, et al. Humoral immune response to flagellin requires T cells and activation of innate immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2006;177:2810–2818.
5. Jiminez JA, Uwiera TC, Douglas Inglis G, et al. Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals. *Gut Pathog.* 2015;7:29.
6. Munyaka PM, Sepehri S, Ghia J-E, et al. Carrageenan Gum and Adherent Invasive Escherichia coli in a Piglet Model of Inflammatory Bowel Disease: Impact on Intestinal Mucosa-associated Microbiota. *Front. Microbiol.* 2016;7:462.
7. Xiao Y, Yan H, Diao H, et al. Early Gut Microbiota Intervention Suppresses DSS-Induced Inflammatory Responses by Deactivating TLR/NLR Signalling in Pigs. *Sci. Rep.* 2017;7:3224.
8. Kol A, Arzi B, Athanasiou KA, et al. Companion animals: Translational scientist's new best friends. *Sci. Transl. Med.* 2015;7:308ps21.
9. Cerquetella M, Spaterna A, Laus F, et al. Inflammatory bowel disease in the dog: differences and similarities with humans. *World J. Gastroenterol.* 2010;16:1050–1056.
10. Dandrieux JRS. Inflammatory bowel disease versus chronic enteropathy in dogs: are they one and the same? *J. Small Anim. Pract.* 2016;57:589–599.
11. Craven MD, Washabau RJ. Comparative pathophysiology and management of protein-losing enteropathy. *J. Vet. Intern. Med.* 2019;33:383–402.
12. Furfaro F, Bezzio C, Maconi G. Protein-losing enteropathy in inflammatory bowel diseases. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 2015;61:261–265.
13. Schnyder M, Oevermann A, Doherr M, et al. Dysregulation of Toll-Like Receptors in Dogs with Chronic Enteropathies. *J. Inflamm. Bowel Dis. Disord.* 3.
14. Soontarak S, Chow L, Johnson V, et al. Humoral immune responses against gut bacteria in dogs with inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2019;14:e0220522.
15. Allenspach KA, Mochel JP, Du Y, et al. Correlating Gastrointestinal Histopathologic Changes to Clinical Disease Activity in Dogs With Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. *Vet. Pathol.* 2019;56:435–443.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

16. Ziegler TR, Luo M, Estivariz CF, et al. Detectable serum flagellin and lipopolysaccharide and upregulated anti-flagellin and lipopolysaccharide immunoglobulins in human short bowel syndrome. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008;294:R402-410.
17. Kathrani A, Werling D, Allenspach K. Canine breeds at high risk of developing inflammatory bowel disease in the south-eastern UK. *Vet. Rec.* 2011;169:635.
18. Wennogle SA, Priestnall SL, Webb CB. Histopathologic Characteristics of Intestinal Biopsy Samples from Dogs With Chronic Inflammatory Enteropathy With and Without Hypoalbuminemia. *J. Vet. Intern. Med.* 2017;31:371–376.
19. Magro F, Langner C, Driessen A, et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J. Crohns Colitis.* 2013;7:827–851.
20. Ebbo M, Crinier A, Vély F, et al. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2017;17:665–678.
21. Maeda S, Ohno K, Fujiwara-Igarashi A, et al. Changes in Foxp3-Positive Regulatory T Cell Number in the Intestine of Dogs With Idiopathic Inflammatory Bowel Disease and Intestinal Lymphoma. *Vet. Pathol.* 2016;53:102–112.
22. Wagner A, Junginger J, Lemensieck F, et al. Immunohistochemical characterization of gastrointestinal macrophages/phagocytes in dogs with inflammatory bowel disease (IBD) and non-IBD dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2018;197:49–57.
23. Jergens AE, Sonea IM, O'Connor AM, et al. Intestinal cytokine mRNA expression in canine inflammatory bowel disease: a meta-analysis with critical appraisal. *Comp. Med.* 2009;59:153–162.
24. Tamura Y, Ohta H, Yokoyama N, et al. Evaluation of selected cytokine gene expression in colonic mucosa from dogs with idiopathic lymphocytic-plasmacytic colitis. *J. Vet. Med. Sci.* 2014;76:1407–1410.
25. Kim CJ, Kovacs-Nolan J, Yang C, et al. L-cysteine supplementation attenuates local inflammation and restores gut homeostasis in a porcine model of colitis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1790:1161–1169.
26. Young D, Ibuki M, Nakamori T, et al. Soy-derived di- and tripeptides alleviate colon and ileum inflammation in pigs with dextran sodium sulfate-induced colitis. *J. Nutr.* 2012;142:363–368.
27. Kulkarni N, Pathak M, Lal G. Role of chemokine receptors and intestinal epithelial cells in the mucosal inflammation and tolerance. *J. Leukoc. Biol.* 2017;101:377–394.
28. Reinecker HC, Loh EY, Ringler DJ, et al. Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

Gastroenterology. 1995;108:40–50.

29. Korolkova OY, Myers JN, Pellom ST, et al. Characterization of Serum Cytokine Profile in Predominantly Colonic Inflammatory Bowel Disease to Delineate Ulcerative and Crohn's Colitides. *Clin. Med. Insights Gastroenterol*. 2015;8:29–44.

30. McCann TM, Ridyard AE, Else RW, et al. Evaluation of disease activity markers in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *J. Small Anim. Pract*. 2007;48:620–625.

31. Titmarsh HF, Gow AG, Kilpatrick S, et al. Low Vitamin D Status Is Associated with Systemic and Gastrointestinal Inflammation in Dogs with a Chronic Enteropathy. *PLOS ONE*. 2015;10:e0137377.

32. Richter KR, Nasr AN, Mexas AM. Cytokine Concentrations Measured by Multiplex Assays in Canine Peripheral Blood Samples. *Vet. Pathol*. 2018;55:53–67.

33. Lycke NY, Bemark M. The regulation of gut mucosal IgA B-cell responses: recent developments. *Mucosal Immunol*. 2017;10:1361–1374.

34. HogenEsch H, Felsburg PJ. Immunohistology of Peyer's patches in the dog. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 1992;30:147–160.

35. Maeda S, Ohno K, Uchida K, et al. Decreased immunoglobulin A concentrations in feces, duodenum, and peripheral blood mononuclear cells of dogs with inflammatory bowel disease. *J. Vet. Intern. Med*. 2013;27:47–55.

36. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*. 2004;303:1662–1665.

37. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, et al. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J. Clin. Invest*. 2004;113:1296–1306.

38. Sitaraman SV, Klapproth J-M, Moore DA, et al. Elevated flagellin-specific immunoglobulins in Crohn's disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2005;288:G403-406.

39. Yu S, Gao N. Compartmentalizing intestinal epithelial cell toll-like receptors for immune surveillance. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*. 2015;72:3343–3353.

40. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect. Immun*. 2000;68:7010–7017.

41. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, et al. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2002;122:1987–2000.

42. Furrie E, Macfarlane S, Thomson G, et al. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

2005;115:565–574.

43. Bogunovic M, Davé SH, Tilstra JS, et al. Enteroendocrine cells express functional Toll-like receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2007;292:G1770-1783.

44. Frolova L, Drastich P, Rossmann P, et al. Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 2008;56:267–274.

45. Lee J, Mo J-H, Katakura K, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 2006;8:1327–1336.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

Figure legends

Figure 1: Scoring of the histopathological lesions in the different segments of the gut mucosa in control (black squares) and IBD (black triangles) dogs.

HES stained slides were evaluated on a blind fashion. Scoring of morphological alterations and inflammatory parameters were assessed as described in the Material and Methods section. For each biopsy, the total score is plotted.

Figure 2: Quantification of different populations of immune cells in the mucosa of control (black squares) and IBD (black triangles) dogs.

Immunostainings were performed with anti-CD3, anti-CD20, anti-foxp3 and anti-CD204 antibodies as described in the Material and Methods section.

Figure 3: Quantification of chemokines and IgA, at the protein level, in the mucosa of control (black squares) and IBD (black triangles) dogs.

Proteins were extracted from biopsies and quantification of CXCL-1, IL-8 and MCP-1 was performed by Multiplex analysis while IgA levels were assayed with an ELISA kit. Results are expressed as quantity per mg of total proteins in the samples.

Figure 4: Quantification of anti-flagellin and anti-LPS IgGs in the serum of control (black squares) and IBD (black triangles) dogs.

Specific antibody levels were assessed using an ELISA assay. Data are expressed in arbitrary unit related to a reference sample as described in the Material and Methods section.

Figure 5: Representative pictures of TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9 expression detected by immunohistochemistry in the duodenum, ileum and colon mucosae of control dogs. Bar=100 μ m. a-c: TLR2, marked (duodenum), mild (ileum) and low (colon) cytoplasmic staining of epithelial cells (arrows) with scattered positive leucocytes in the *lamina propria* (arrowhead).

Pictures d-f: TLR4, scattered positive leucocytes in the *lamina propria* (arrowhead). Note the absence of staining in the epithelium.

Pictures g-i: TLR5, mild (duodenum and ileum) to marked (colon) cytoplasmic staining of epithelial cells (arrow) and clusters of positive leucocytes in the *lamina propria* (arrowhead).

Pictures j-l: TLR9, mild (duodenum and ileum) to marked (colon) cytoplasmic staining of epithelial cell (arrow) and clusters of positive leucocytes in the *lamina propria* (arrowhead).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

Figure 6: Quantification of TLR2 and TLR5 stainings in the mucosa of control (black squares) and IBD (black triangles) dogs.

Sections were processed for immunostainings with anti-TLR2 and anti TLR5 antibodies as described in the Material and Methods section.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

Supplementary Table 1: Comparison of the clinical activity index used in dog with basic indexes used in human patient.

CCECAI: Canine Chronic Enteropathy Clinical Activity Index; HBI: Harvey Bradshaw Index; SCCAI: Simple Clinical Colitis Activity Index. The HBI is a simple version of the CDAI, which one is computed on a diary completed by the patient for 7 days.

Supplementary Table 2: Primary antibodies (all directed against human proteins) and protocols used for immunohistochemical analyses with the Benchmark XT Ventana automate (Roche Diagnostics). All dilutions were performed using the commercially available diluent (Ventana Medical Systems). ^aOptiview: multimer-technology based 3,3'-diaminobenzidine (DAB) detection system. ^bIview: indirect biotin streptavidin DAB detection system adapted for goat primary antibodies with a rabbit anti-goat Ig (Dako Cytomation). CC1: demasking buffer.

Supplementary Figure 1: Detection of anti-flagellin antibodies in the sera of dogs using ELISA. A- Example of the curves obtained in the ELISA assay. The dashed line corresponds to the reference serum. B- Quantification of anti-flagellin IgA quantification in control (black squares) and IBD (black triangles) dogs.

Figure 3

[Click here to access/download/Image;Figure 3.tiff](#)

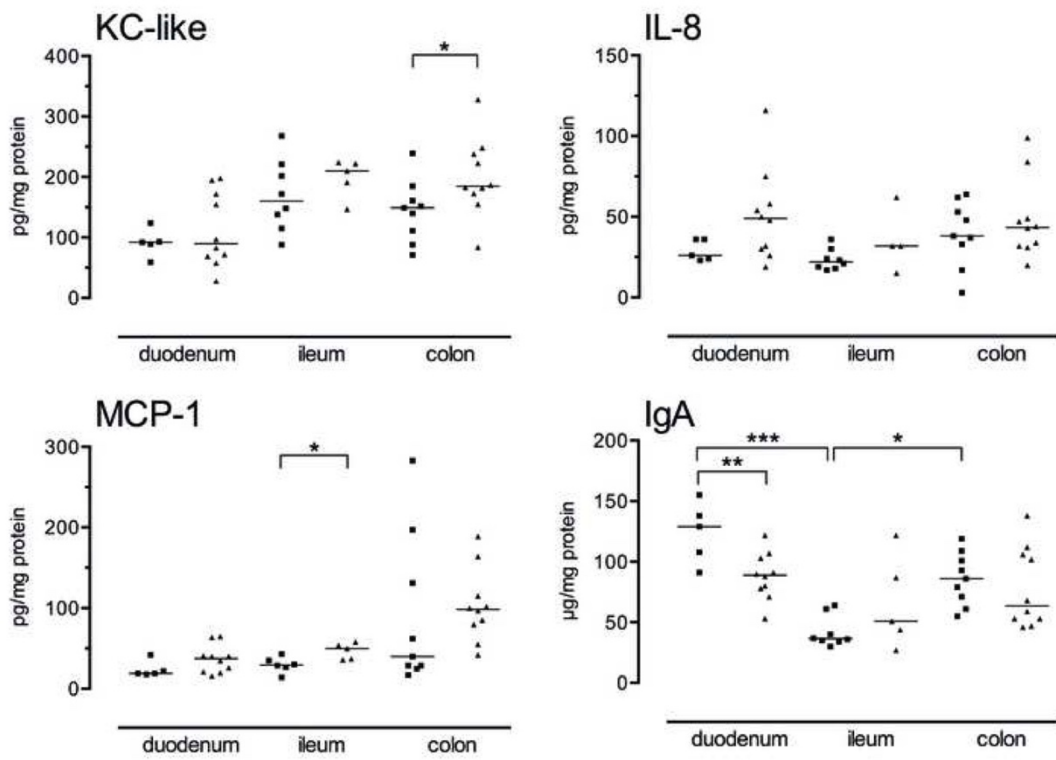


Figure 4

[Click here to access/download/Image;Figure 4.tiff](#)

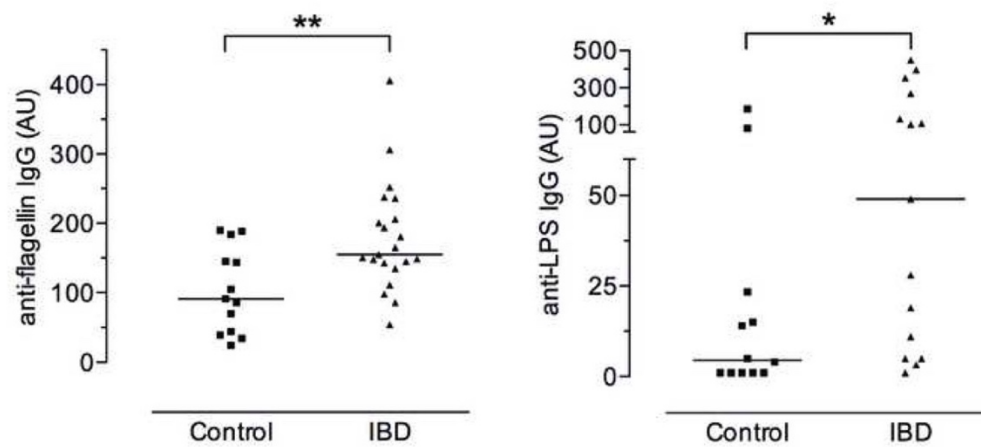
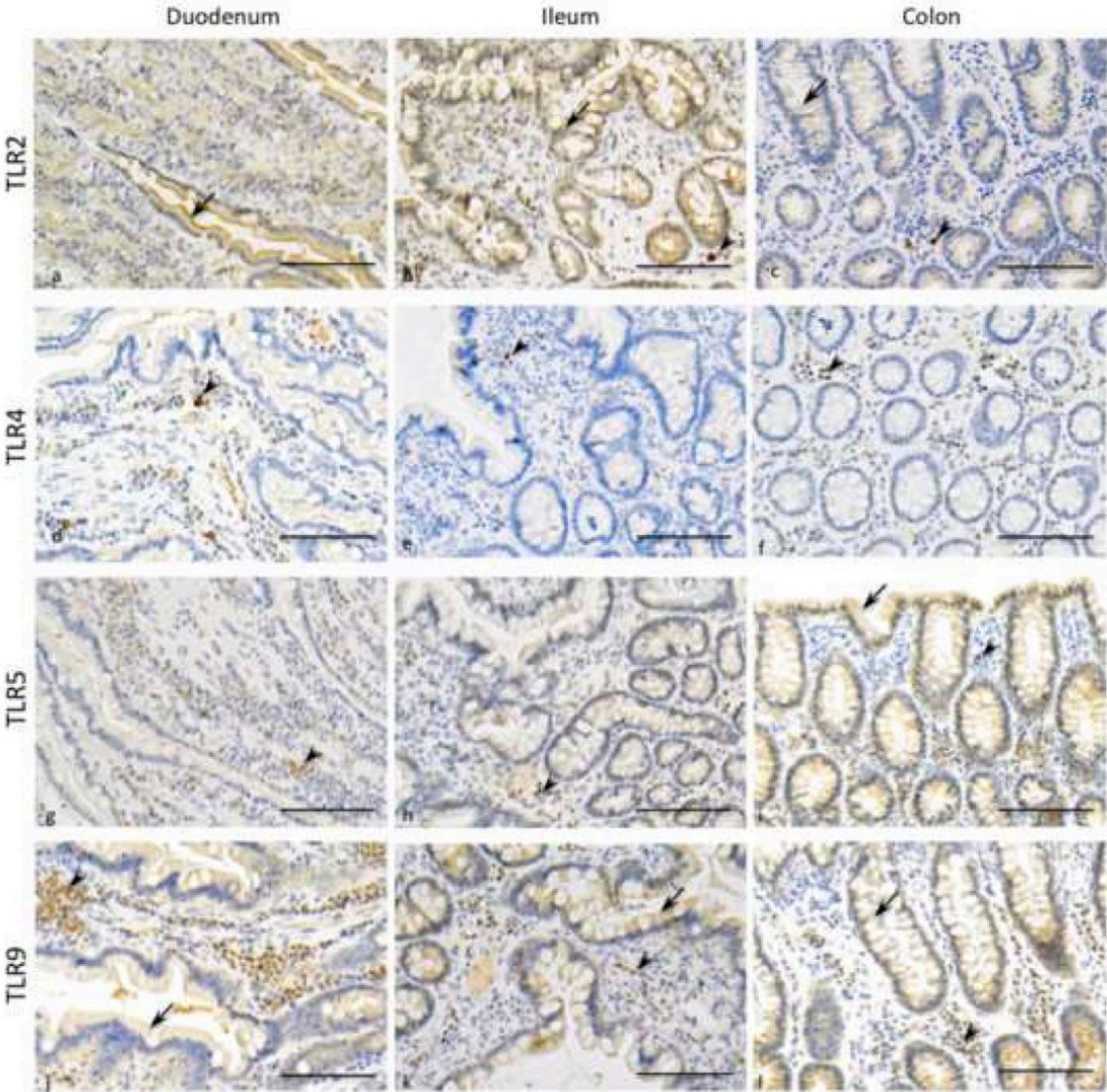
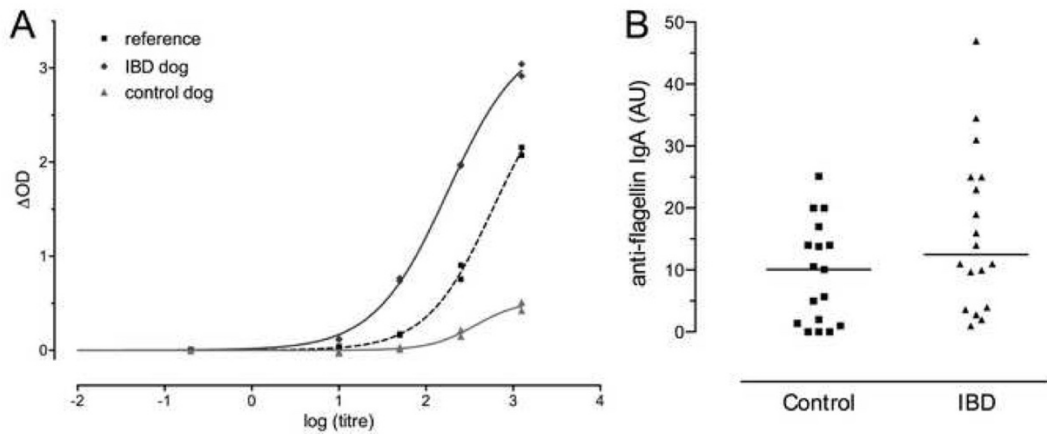
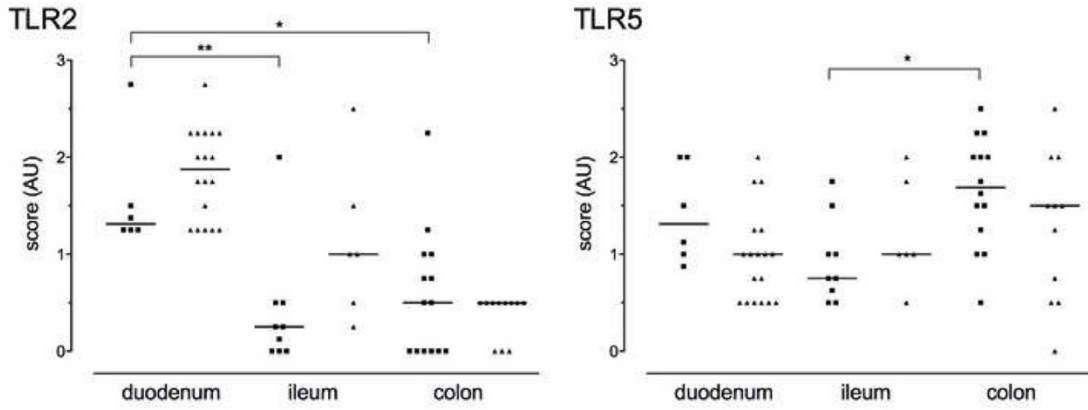


Figure 5

[Click here to access/download;Image;Figure 5](#)





Supplementary Figure 1: Detection of anti flagellin antibodies in the sera of dogs using ELISA.
 A- Example of the curves obtained in the ELISA assay. Dashed line corresponds to the reference serum.
 B- Quantification of anti-flagellin IgA in control (black squares) and IBD (black triangles) dogs.

Supplementary Table 1

Supplementary Table 1: Comparison of the clinical activity index used in dog with basic indexes used in human patient.

CCECAI: Canine Chronic Enteropathy Clinical Activity Index; HBI: Harvey Bradshaw Index; SCCAI: Simple Clinical Colitis Activity Index.

The HBI is a simple version of the CDAI (Crohn Disease Activity Index), which one is computed on a diary completed by the patient for 7 days, and takes into account others parameters such as weight loss, anti-diarrhoea drug use and haematocrit.

	Dog IBD	Human CD	Human UC
Items	CCECAI	HBI	SCCAI
Stools	<ul style="list-style-type: none"> - Frequency - Consistency 	<ul style="list-style-type: none"> - Frequency of liquid/soft ones 	<ul style="list-style-type: none"> - Increased frequency during the day and during the night - Urgency of defaecation - Presence of blood
Other intestinal and extra-intestinal signs	<ul style="list-style-type: none"> - Vomiting - Ascites/Oedema - Pruritus 	<ul style="list-style-type: none"> - Abdominal pain - Presence of an abdominal mass - Other clinical signs associated with the disease (e.g. arthralgia, stomatitis, fever, anal fistula...) 	<ul style="list-style-type: none"> - Extracolonic features (e.g. arthritis, erythema nodosum, pyoderma gangrenosum, uveitis)
Weight	<ul style="list-style-type: none"> - Weight loss 	<ul style="list-style-type: none"> - Criteria not used 	<ul style="list-style-type: none"> - Criteria not used
Behavior	<ul style="list-style-type: none"> - Attitude/Activity - Appetite 	<ul style="list-style-type: none"> - General well-being 	<ul style="list-style-type: none"> - General well-being
Biological analyses	<ul style="list-style-type: none"> - Serum albumin concentration (<20g/l) 	<ul style="list-style-type: none"> - Criteria not used 	<ul style="list-style-type: none"> - Criteria not used

Supplementary Table 2

Supplementary Table 2: Primary antibodies (all directed against human proteins) and protocols used for immunohistochemical analyses with the Benchmark XT Ventana automate (Roche Diagnostics). All dilutions were performed using the commercially available diluent (Ventana Medical Systems). ^aOptiview: multimer-technology based 3,3'-diaminobenzidine (DAB) detection system. ^bIview: indirect biotin streptavidin DAB detection system adapted for goat primary antibodies with a rabbit anti-goat Ig (Dako Cytomation). CC1: demasking buffer.

		CD3	CD20	FOXP3	CD204	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9
Antigen Retrieval		32 min (95°C-CC1)	32 min (95°C-CC1)	32 min (95°C-CC1)	40 min (95°C-CC1)	32 min (95°C-CC1)	32 min (95°C-CC1)	32 min (95°C-CC1)	32 min (95°C-CC1)
Antibody	kind	rabbit monoclonal 2GV6	rabbit polyclonal PA5-16401	mouse monoclonal eBio7979	mouse monoclonal SRA-E5	goat polyclonal ab1655	mouse monoclonal TLR4/230	mouse monoclonal 19D759.2	mouse monoclonal 26C593.2
	brand	Ventana	ThermoFisher	eBioscience	Abnova	Abcam	Novus Biologicals	Novus Biologicals	Abcam
	dilution	1/4	1/800	1/150	1/1500	1/1000	1/50	1/50	1/600
Incubation time		32 min	32 min	1 h 32 min	32 min	32 min	40 min	36 min	32 min
Detection		Optiview ^a	Optiview ^a	Optiview ^a	Optiview ^a	Iview ^b	Optiview ^a	Optiview ^a	Optiview ^a

Is non-hypoalbuminemic form of canine Inflammatory Bowel Disease a relevant spontaneous model of human IBD?

Juan Hernandez, DVM, MS,* Elodie Rouillé, DVM,** Florian Chocteau, DVM,** Marie Allard,* Karine Haurigné,* Florence Lezin**, Julie M. Hervé, DVM, PhD,* Jean-Marie Bach, DVM, PhD,* Jérôme Abadie, DVM, PhD,** Blandine Lieubeau, PhD*

*IECM, Immuno-Endocrinology, Oniris, INRAe, USC1383, 44300, Nantes, France

**Laboniris, Oniris, 44300, Nantes, France

Address correspondence to: Blandine Lieubeau, IECM, Oniris, la Chantrerie, CS44706, F-44300 Nantes, France; telephone number: (33) 240-687-718; e-mail: blandine.lieubeau@oniris-nantes.fr

Conflicts of interest: All authors declare that there is no conflict of interest to disclose.

Supported by: Hill's Pet Nutrition. The founder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions: JH and BL conceived and designed experiments; MA, KH, FL and JM performed experiments; JH, ER, FC, JA and BL analysed results; JH, JM, JMB, JA and BL prepared the manuscript. All authors approved the final manuscript.

Abstract (<250 words)

Background

The incidence of IBD (Inflammatory Bowel Disease) is increasing worldwide, emphasizing the need of relevant models, as dog spontaneously affected by IBD might be, for better knowledge of the disease physiopathology.

Methods

We studied 22 client-owned dogs suffering from IBD without protein loss and 14 control dogs. Biopsies were obtained from duodenum, ileum and colon. Inflammatory grade was assessed by histopathology, immunohistochemistry and chemokine analysis. Expression of Toll-Like Receptors (TLR) in mucosa was immunohistochemically evaluated. Antibody levels against bacterial ligands (LPS and flagellin) were measured in sera using ELISA.

Results

IBD dogs showed low to severe clinical diseases. Histopathologically, gut of IBD dogs did not exhibit significant alterations compared to controls except in the colon. The number of CD3⁺ T lymphocytes was decreased in the ileum and colon of IBD dogs compared to control, while the numbers of Foxp3⁺, CD20⁺ and CD204⁺ cells were similar in the two groups. Three chemokines (KC-like, IL-8 and MCP-1), but no cytokines, were detected at the protein level in the mucosa and the disease poorly affected their tissue concentrations. IBD dogs exhibited higher serum reactivity against LPS and flagellin than controls, however similar immunoreactivity against their receptors TLR4 and TLR5. TLR2 and TLR9 also showed similar patterns of expression in control and IBD dogs.

Conclusions

Our data support the hypothesis of dysregulated immune response in dogs affected by IBD without protein loss. However, the inflammation appeared to be less severe than in human IBD.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease, Dog, Toll-like Receptors, Chemokines, Microbial ligands

Topic: Animal models, Spontaneous disease, Gut mucosa, Histopathology,

Subject: Inflammation

Issue Section: Basic Science Research

Summary (40 words)

Dog inflammatory bowel disease (IBD) was proposed as a relevant spontaneous model for human IBD. In this study we showed that dog IBD, like in human, is characterized by dysregulated immune response against microbiota, despite less severe histopathological gut alterations.

2.3 Communication à des congrès

2.3.1 Poster Journées de l'Ecole Doctorale Biologie-Santé 2018

Anti-LPS and anti-flagelline seroreactivity in dogs with Inflammatory Bowel Disease

J. Hernandez¹, M. Allard¹, K. Haurogné¹, J. Abadie², JM Bach¹, J. Hervé¹, B. Lieubeau¹

¹ IECM, INRA Oniris, UBL, Nantes, France

² LabOniris, Oniris, UBL, Nantes, France

2.3.2 Poster congrès *European College of Veterinary Internal Medicine* 2019

Expression and distribution of Toll-Like Receptor (TLR)2, TLR4, TLR5 and TLR9 in the colonic mucosa of dogs with Inflammatory Bowel Disease

J. Hernandez¹, F. Chocteau², E. Rouillé², J. Hervé¹, JM Bach¹, B. Lieubeau¹, J. Abadie²

¹ IECM, INRA Oniris, UBL, Nantes, France

² LabOniris, Oniris, UBL, Nantes, France

2.3.3 Poster congrès *European College of Veterinary Pathology* 2019

Immunohistochemical evaluation of Toll-Like Receptors (TLRs) expression in the intestinal mucosa of dogs with Inflammatory Bowel Disease

E. Rouillé¹, J. Hernandez², F. Chocteau¹, F. Lezin¹, K. Haurogné², JM Bach², J. Hervé², B. Lieubeau², J. Abadie¹

¹ LabOniris, Oniris, UBL, Nantes, France

² IECM, INRA Oniris, UBL, Nantes, France

DISCUSSION

1 Principaux résultats et implications majeures

1.1 Inflammation intestinale dans les MICI sans pertes de protéines

1.1.1 Histologie conventionnelle

L'analyse histologique des biopsies duodénales, iléales et coliques obtenues par endoscopie des chiens atteints de MICI a été réalisée en aveugle selon les critères recommandés par la WSAVA et la grille proposée par Allenspach *et al.* (*Simplified Histopathologic Scoring System for Gastrointestinal Inflammation*) (218).

L'analyse des chiens atteints de MICI a été réalisée une première fois dans le cadre de la procédure diagnostique entre 2016 et 2018, puis une seconde fois dans le cadre du protocole de lecture en aveugle en 2019. On constate une différence d'appréciation des lésions morphologiques entre la première lecture et la seconde lecture (cf. **Tableau 12**). Les lésions morphologiques ne sont que peu rapportées dans le groupe MICI lors de la première lecture alors qu'elles sont fréquentes lors de la seconde lecture (cf. 2.2) Cette différence tient probablement au fait que l'importance des lésions morphologiques a été mise en lumière par la publication d'Allenspach *et al.* en 2019 (218).

Contrairement aux résultats d'Allenspach *et al.*, **aucune corrélation n'a été observée entre le score histologique et le score clinique de la maladie.** Cette différence de résultat est probablement liée à la non-inclusion dans notre cohorte des entéropathies avec pertes de protéines. En effet, le *Simplified Histopathologic Scoring System for Gastrointestinal Inflammation* attribue 50% des points aux lésions morphologiques (dilatation des cryptes, dilatation des chylifères, érosions épithéliales, ...). Or, ces lésions sont fréquemment associées à des pertes de protéines. Le poids du score morphologique est donc mineur dans notre cohorte.

Les scores histologiques ne sont pas statistiquement différents entre le groupe MICI et le groupe témoin à l'étage duodéal et à l'étage iléal. En revanche, on observe une **différence significative du score histologique entre les deux groupes à l'étage colique.** Une analyse plus approfondie du score histologique à l'étage colique montre que le poids relatif du score morphologique est supérieur à celui du score inflammatoire. La prise en compte de la diminution du nombre de cellules caliciformes a été déterminante car le seuil de significativité n'est pas atteint si ce paramètre n'est pas intégré.

L'analyse au cas par cas montre des composantes inflammatoires similaires entre les 2 groupes à tous les étages biopsiés ce qui laisse présager que l'inflammation cellulaire n'est pas déterminante dans l'expression de signes cliniques.

1.1.2 Phénotypage par immunohistochimie des cellules inflammatoires

L'analyse immunohistochimique des biopsies duodénales, iléales et coliques des chiens de notre cohorte a permis d'évaluer les populations de lymphocytes CD3+, de lymphocytes CD20+, de macrophages CD204+ et de lymphocytes Treg FOXP3+. Nous avons observé une diminution significative du nombre de lymphocytes CD3+ dans la muqueuse de l'iléon et du côlon dans le groupe MICI par rapport au groupe témoin.

Ces résultats contrastent avec ceux de German et *al.* qui ont évalué en 2001 les marqueurs CD3, CD4, CD8, IgG, IgM, IgA, L1, CMH II, TCR $\alpha\beta$ et TCR $\gamma\delta$ dans le duodénum de plusieurs populations de chiens atteints d'entéropathie chronique dont 9 cas de MICI et plusieurs populations témoins (chiens sains, chiens avec maladie extra-digestive et chiens avec maladie digestive sans atteinte grêle) (219). Les auteurs constatent une augmentation significative du nombre de cellules marquées CD3+ dans la *lamina propria* duodénale entre le groupe MICI et les groupes témoins (médiane IBD=62 cell/10 000 μm^2 versus sains=39 cell/10 000 μm^2 , $p=0,001$) **Figure 37**. La publication de German et *al.* ne fournit aucune information sur l'intensité clinique et sur la présence éventuelle de pertes de protéines chez les chiens étudiés.

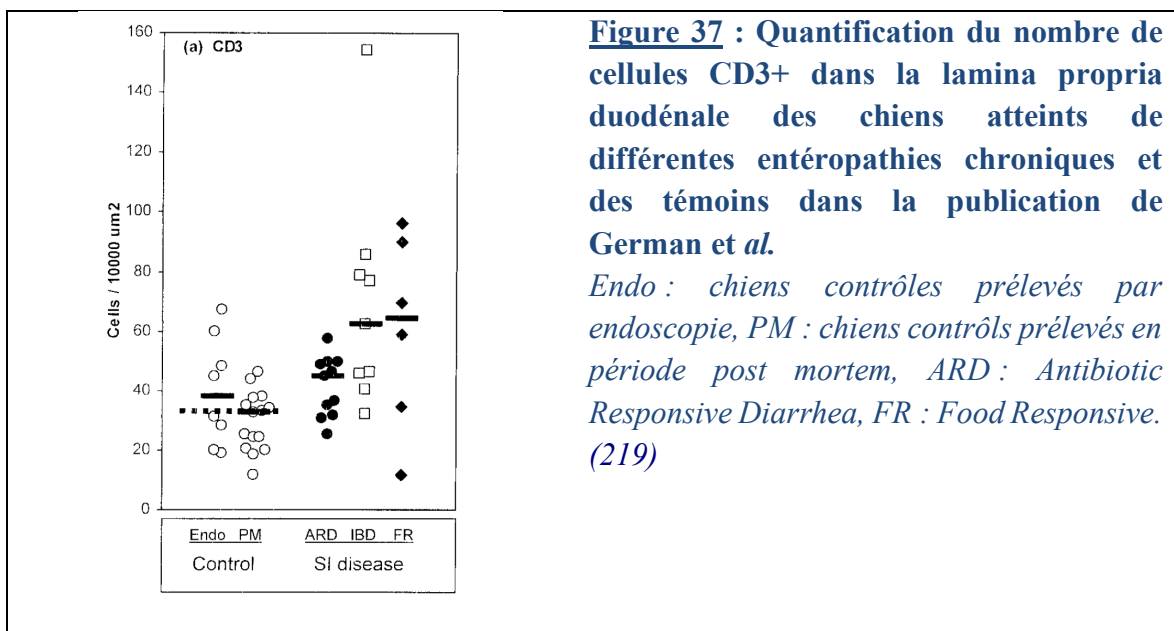


Figure 37 : Quantification du nombre de cellules CD3+ dans la lamina propria duodénale des chiens atteints de différentes entéropathies chroniques et des témoins dans la publication de German et al.

Endo : chiens contrôles prélevés par endoscopie, *PM* : chiens contrôles prélevés en période post mortem, *ARD* : Antibiotic Responsive Diarrhea, *FR* : Food Responsive. (219)

Plus récemment, Schreiner et *al.* n'ont pas mis en évidence de différence dans le nombre de cellules CD3⁺ dans la *lamina propria* de biopsies endoscopiques duodénales et coliques avant et après traitement corticoïdes chez des chiens atteints de MICI (188). Ils n'identifient pas non plus de différence entre le groupe MICI et le groupe FRD. L'intensité clinique des animaux de leur cohorte est plus élevée que dans la nôtre (CECCAI médian=10).

Nos résultats ainsi que ceux de Schreiner et *al.* tendent à montrer que l'infiltration par des cellules inflammatoires de la muqueuse intestinale, et notamment par les lymphocytes T CD3⁺, n'est pas un élément déterminant l'expression clinique des MICI du chien.

La caractérisation des populations d'ILC reste une étape à venir importante chez le chien.

1.1.3 Et si l'inflammation cellulaire n'était pas déterminante ... ?

Comme explicité dans la première partie, le concept actuel de l'inflammation intestinale chronique repose sur le triptique :

Prédisposition génétique – Microbiote - Dysimmunité de l'hôte

Une lecture consiste à penser que les signes cliniques surviennent dès lors que plusieurs facteurs parmi les 3 précités sont réunis. Ainsi, nos chiens asymptomatiques présenteraient, certes, une inflammation à bas bruit, mais l'absence de déséquilibre du microbiote ou de facteur génétique les protégerait de l'expression clinique de la maladie. Cette hypothèse est possible et nous ne disposons d'aucune donnée génétique ou microbiotique permettant de l'approcher.

Toutefois, dresser le constat que l'infiltration inflammatoire des chiens symptomatiques n'est pas différente de celle des chiens asymptomatiques amène à remettre en question le présumé initial selon lequel l'inflammation est essentielle. D'autres acteurs de l'immunité, cellulaires ou non, peuvent être impliqués dans l'apparition des signes mais il semble opportun d'ouvrir le champ de la réflexion vers de nouvelles théories accordant une place centrale à d'autres acteurs : microbiote digestif et/ou le système nerveux entérique par exemple.

1.1.4 Vers une refonte de la nosographie des entéropathies chroniques du chien

Actuellement, le diagnostic de MICI chez le chien repose sur l'identification d'une inflammation de la muqueuse intestinale à l'analyse histologique. Tous les animaux malades de notre cohorte ont reçu un diagnostic de MICI sur la base de cette constatation lors du processus diagnostique d'inclusion. Or, force est de constater que l'inflammation intestinale,

telle qu'elle décelable à l'analyse histologique, **des chiens malades n'est guère différente de celle des chiens cliniquement sains**. Ce constat est en contradiction avec le présupposé de départ qui met en avant le principe d'une inflammation pathologique de la muqueuse intestinale chez les animaux symptomatiques. Les publications vétérinaires admettent volontiers ce paradigme et aucune ne vient le contredire. Or, le paradoxe auquel nous sommes confrontés est uniquement lié au cadre nosographique dans lequel nous nous sommes volontiers enfermés en adoptant une terminologie dont la seule légitimité est d'être adaptée aux maladies de l'homme. Nos résultats incitent donc à sortir de ce cadre nosographique et à **réfuter le terme de MICI** pour désigner les maladies du chien. La classification clinique (FRE, ARE, IRE, ...) est extrêmement imprécise mais présente l'avantage de ne pas s'engager sur un terrain inconnu. Les IRE regroupent vraisemblablement plusieurs entités qu'il convient de décrire avec précision au fur et à mesure que les données mécanistiques seront connues avant de leur trouver un cadre nosographique.

1.2 Expression des TLRs

Nos observations permettent de décrire l'expression protéique des TLR2, 4, 5 et 9 chez le chien. Le **Tableau 13** résume les observations réalisées.

Horizontalement, on observe une expression des quatre TLRs étudiés aux étages duodénale, iléal et colique. Pour le TLR2, l'expression est significativement plus intense à l'étage duodénal. Elle est équivalente pour les TLR4, 5 et 9 aux trois étages.

Verticalement, on observe une expression dans l'épithélium et dans la *lamina propria* des TLR2, 5 et 9. TLR4 n'est pas décelé dans l'épithélium.

Ces observations sont en accord avec celles de Schnyder et *al.* (320)

Tableau 13 : Résumé de l'expression des TLR2, 4, 5 et 9 selon la localisation.

	Duodénum		Iléon		Côlon	
	<i>Epithélium</i>	<i>Lamina propria</i>	<i>Epithélium</i>	<i>Lamina propria</i>	<i>Epithélium</i>	<i>Lamina propria</i>
TLR2	++ Villosités ++/Cryptes+	++	+ Villosités ++/Cryptes+	+	+ Apex cyptes++/base crypte+	+
TLR4	0	+ Petites cellules rondes, cell. endothéliales capillaires	0	+ Petites cellules rondes, cell. endothéliales capillaires	0	+ Petites cellules rondes, cell. endothéliales capillaires
TLR5	+ Cellules épithéliales et cellules rondes intraépithéliales	+ Lymphocytes, plasmocytes, macrophages, cellules endothéliales vasculaires	+ Cellules épithéliales et cellules rondes intraépithéliales	+ Lymphocytes, plasmocytes, macrophages, cellules endothéliales vasculaires	++ Cellules épithéliales et cellules rondes intraépithéliales	++ Lymphocytes, plasmocytes, macrophages, cellules endothéliales vasculaires
TLR9	+ Partie apicale de la villosité	+ Petites cellules rondes	+ Partie apicale de la villosité	+ Petites cellules rondes	+	+ Petites cellules rondes

Contrairement aux études en ARNm et à l'étude de Schnyder et *al.* en immunohistochimie, **nous n'avons pas montré de différence d'expression protéique des TLR2, 4, 5 et 9 entre les chiens atteints de MICI et les chiens témoins.** Il n'en reste pas moins que les variations d'expression des protéines peuvent être subtiles et peuvent donc ne pas avoir été détectées par la quantification en immunohistochimie. Egalement, il reste important de considérer que l'absence de variation de l'expression protéique ne préjuge pas de variations de l'activité fonctionnelle des TLRs. Cet aspect peut faire l'objet d'explorations futures. Pour ce faire, la méthodologie utilisée par Figueiredo et *al.* pourrait être exploitée. Les auteurs mettent en suspension les cellules inflammatoires de la muqueuse intestinale de chiens atteints de leishmaniose en réalisant une lyse pariétale sous l'action d'une collagénase (333). Ils analysent par cytométrie de flux la suspension après marquage avec des anticorps spécifiques des protéines d'intérêt. Dans le cadre de l'évaluation fonctionnelle des TLRs, cette même technique pourrait être utilisée pour exposer les cellules de la muqueuse intestinale en suspension aux ligands des TLRs et évaluer la réponse effectrice qui en découle. Toutefois, Figueiredo et *al.* utilisent des fragments d'intestin récoltés à la faveur

d'une autopsie. La petite taille des biopsies obtenues par endoscopie risque d'être un facteur limitant important.

Egalement, Swerdlow et *al.* ont isolé et cultivé des cellules épithéliales coliques de chiens sains. Une fois la culture primaire arrivée à confluence de 75%, les auteurs ont étudié l'expression de l'ARNm de cytokines sous l'action des ligands LPS ou peptidoglycanes (334). Cette méthodologie pourrait être utilisée pour comparer l'effet des ligands des TLRs sur les cellules épithéliales de chiens atteints de MICI *versus* de chiens sains. Une fois encore, les auteurs utilisent des fragments de côlon obtenus à l'autopsie. La faisabilité de la mise en culture à partir de biopsies obtenues par endoscopie est très incertaine.

Le modèle organoïde intestinal, dont la description a récemment été faite chez le chien à partir de biopsies obtenues par endoscopie, peut également être utilisé dans ce sens (335).

1.3 Expression des IgA dans la paroi intestinale des chiens atteints de MICI

La mesure des IgA pariétales est significativement abaissée sur les biopsies duodénales des chiens du groupe MICI par rapport au groupe témoin. **Ce résultat conforte l'implication d'une anomalie immunitaire humorale dont l'origine peut être locale ou systémique.**

Nos résultats sont en accord avec ceux de Maeda et *al.* qui montrent une diminution de la quantité d'IgA fécale, de la quantité d'IgA dans la muqueuse duodénale et du nombre de plasmocytes IgA⁺ dans la *lamina propria* duodénale chez les chiens atteints de MICI par rapport aux chiens témoins sains (325).

Egalement, Soontararak et *al.* constatent qu'une plus grande proportion des bactéries fécales des chiens atteints de MICI sont fixées à des IgM et à des IgA comparativement aux animaux sains (323). De plus, les auteurs observent que la reconnaissance des bactéries fécales par les Ig sériques n'est pas différente entre le groupe MICI et le groupe sain. Ces observations orientent vers une anomalie immunitaire humorale locale et non systémique.

D'autres études sont nécessaires pour, *primo*, conforter nos observations sur une plus large cohorte et, *secundo*, déterminer le(s) niveau(x) de défaillance dans la synthèse/sécrétion des IgA.

1.4 Séro-réactivité anti-flagelline et anti-LPS des chiens atteints de MICI

Nos résultats montrent une séro-positivité anti-flagelline et anti-LPS plus importante dans le groupe MICI par rapport au groupe témoin. Outre la contribution apportée à la connaissance du processus physiopathologique, cette observation ouvre la porte au **développement de nouveaux marqueurs de l'inflammation intestinale**.

En médecine humaine, les marqueurs sériques ont une place dans la démarche diagnostique de la MC et de la RCH. Les marqueurs les mieux documentés sont les anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) et les anticorps périmucléaires anti-neutrophiles atypiques (pANCA atypique). La combinaison du dosage de ces deux anticorps permet de différencier la MC de la RCH avec une spécificité supérieure à 90% et avec une sensibilité de l'ordre de 50% (326). Le **Tableau 14** résume les résultats de Mokrowiecka et *al.* dans une cohorte de patients composée de 71 cas de RCH, de 31 cas de MC et de 23 cas de colite d'origine indéterminée.

Tableau 14 : Sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative des sérologies pANCA et ASCA dans le diagnostic de la MC et de la RCH.

(D'après Mokrowiecka et *al.* (326))

	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
pANCA+ dans RCH	68%	84%	75%	78%
ASCA+ dans MC	81%	78%	45,5%	95%
pANCA+/ASCA- dans RCH	42%	100%	100%	43%
pANCA-/ASCA+ dans MC	52%	98,6%	94%	82%

Chez le chien, Luckschander et *al.* ont comparé la séropositivité pANCA entre un groupe atteint de FRE et un groupe atteint d'IRE. Le pourcentage de séropositifs est significativement plus élevé dans le groupe FRE (62% vs 23%) (327). Egalement, les auteurs constatent une différence statistiquement significative du titrage médian entre les 2 groupes (1:100 dans le groupe FRE vs <1:10 dans le groupe IRE). Cependant, la séropositivité

pANCA n'est pas spécifique de l'évolution d'une EC et peut également être observée au cours de maladies à médiation immunitaire, infectieuses ou néoplasiques (328,329).

La sérologie anti-ASCA a également été évaluée chez le chien par Allenspach et *al.* qui rapportent une positivité dans 44% des cas d'IRE (330).

Plusieurs anticorps anti-flagellines sont documentés chez l'humain. Modes et *al.* montrent des niveaux d'anticorps anti-CBir1 et anti-FlaX significativement plus élevés chez les patients atteints de MC par rapport à ceux atteints de RCH ce qui conforte l'intérêt de l'analyse sérologique dans la distinction entre les 2 entités (331). Plus récemment, Plevy et *al.* ont proposé un algorithme basé sur le modèle Random Forests (ou algorithme des forêts d'arbres décisionnels) en intégrant 8 marqueurs sérologiques (Anticorps anti-flagelline (CBir1, A4-Fla2 et FlaX), ASCA-IgA, ASCA-IgG, ANCA, pANCA, anti-OmpC (porine de *E. coli*) et anticorps anti-pancréas), 4 marqueurs génétiques (variants génétiques de ATG16L1, de NKX2-3, de ECM1, de STAT3) et 5 marqueurs inflammatoires (VEGF, CRP, SAA, ICAM-1, et VCAM-1) (332). La sensibilité et la spécificité de l'algorithme à correctement distinguer les patients MICI des patients non-MICI est respectivement de 73,4% et 89,6%. Pour les patients classés dans le groupe MICI, l'algorithme classe correctement 88,9% des patients atteints de MC et 97,7% des patients atteints de RCH.

Les cliniciens vétérinaires sont en attente de nouveaux marqueurs permettant de simplifier la démarche diagnostique et thérapeutique. Les dosages sanguins sont de nature à répondre à cette attente. Toutefois, la mise en application exige la confirmation de nos résultats sur une plus large cohorte de chiens et l'inclusion d'animaux souffrant d'autres maladies digestives (infectieuses, tumorales, FRD, ...) et de maladies extra-digestives (maladies parodontales, ...) afin de déterminer les caractéristiques d'un tel dosage. A l'image de ce qui est proposé en médecine humaine, son intégration dans un algorithme pourra également être analysée.

Toutefois, outre la nécessité d'une validation prospective, le développement de ce genre d'outils diagnostiques se heurtera inévitablement aux limites de la nosographie des entéropathies en médecine vétérinaire (cf. 1.1).

2 Limites de l'étude

2.1 La cohorte

De petite taille par rapport aux publications en médecine humaine, notre cohorte de 22 individus est de taille somme toute assez conséquente par comparaison aux publications vétérinaires. L'étude de German et *al.* sur le marquage des cellules inflammatoires de la *lamina propria* duodénale contenait 9 animaux dans le groupe malade (219). Cette étude est la seule montrant une différence du nombre de cellules CD3⁺ entre les malades et les sains. Notre étude possède donc à priori la puissance statistique suffisante pour détecter une telle différence si elle avait existé.

Notre cohorte présente une particularité phénotypique importante dont il convient de tenir compte dans les conclusions : les animaux malades sont relativement peu symptomatiques avec un score CECCAI médian de 5,5 alors que la plupart des publications rapportent des animaux qui évoluent entre 6 et 10. Cette différence tient à la non-inclusion des chiens présentant une entéropathie avec pertes de protéines. Il est donc prudent de **restreindre nos conclusions aux seules « entéropathies de score clinique faible » ou « aux entéropathies sans pertes de protéines »**.

2.2 Les témoins

L'obtention de témoins sains est une véritable gageure en recherche clinique vétérinaire. Ceci est d'autant plus vrai qu'il n'existe pas chez le chien, contrairement à l'homme, de ligne de démarcation franche entre zones saines et zones lésées qui pourrait justifier que le malade lui-même soit son propre témoin. Pour des raisons éthiques évidentes, il n'est pas possible de réaliser des biopsies endoscopiques sur des animaux sains de propriétaire. Le recours à l'animal de laboratoire est donc souvent nécessaire. Nous avons utilisé les prélèvements de neuf beagles et cinq briards. Certains auteurs évoquent les limites de l'utilisation de beagle de colonie en tant que chien témoin car une inflammation sub-clinique pourrait exister. Par exemple, Schnyder et *al.* mentionnent dans leur discussion : "It has been shown in several studies that Beagles may not represent a good control group as they may have subclinical GI disease despite being clinically healthy." (320). Cette assertion n'est pas accompagnée de référence source. Hanifeh et *al.* mentionnent dans leur étude effectuée sur beagle sains, un score histologique de 0 mais sans lecture en aveugle et sans comparer à des animaux symptomatiques (336).

La publication d'Allenspach et *al.* sur la validation du *Simplified Histopathologic Scoring System for Gastrointestinal Inflammation* fait intervenir 12 beagles et 7 chiens croisés beagles asymptomatiques dont les biopsies duodénales, iléales et coliques ont été analysées en aveugle (218). L'analyse des données brutes montre, outre une certaine variabilité inter-observateur, des scores histologiques allant de 0 à 7 (sur 21) dans le duodénum et l'iléon et allant de 0 à 9 (sur 24) dans le côlon. Ces résultats concordent avec ceux de nos témoins. En conséquence, **les données factuelles de la littérature ne soutiennent pas l'hypothèse de l'existence d'une inflammation intestinale « pathologique » communément présente chez les chiens de colonie.**

2.3 Validation des anticorps anti-TLRs

Les anticorps utilisés pour marquer les TLR2, 4, 5 et 9 n'ont pas fait l'objet de validation interne. Plusieurs publications utilisent des anticorps anti-TLR2, 4, 5 et 9 pour un marquage en immunohistochimie ou en cytométrie de flux chez le chien. Le **Tableau 15** récapitule les différents anticorps utilisés dans les publications sur le chien.

Les brochures des fabricants ayant fourni les anticorps utilisés sur notre cohorte font état d'une réaction croisée avec les TLRs canins. Après avoir interrogé directement les fabricants, aucune information sur la sensibilité et la spécificité de la réaction dans l'application immunohistochimie chez le chien n'est toutefois accessible. **La réaction croisée annoncée par les fabricants repose sur l'homologie supérieure à 80% (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) des séquences en acides aminés des TLRs canins par rapport aux TLRs humains et sur la publication de Moreira et *al.* qui utilisent les anticorps anti-TLR9 issus du même clone en cytométrie de flux.**

Tableau 15 : Principaux fournisseurs et type d'anticorps utilisés dans les publications sur le marquage des TLRs chez le chien.

IHC : Immunohistochimie.

	Publication chien	Technique utilisée	Fabricant	Type	Clone
TLR2	Figueiredo et al. (333)	Cytométrie de flux	SouthernBiotech®	Anti-TLR2 humain ; monoclonal de souris	2B4A1
	Moreira et al. (337)	Cytométrie de flux	Novus Biologicals®	Anti-TLR2 humain, monoclonal de souris	TL2.1
	Reineking et al. (338)	Cytométrie de flux	Bio-Rad®	Anti-TLR2 humain, monoclonal de souris	2.1
	Schnyder et al. (320)	IHC	Non commercialisé, production interne	Anti-TLR2 canin ; polyclonal de lapin purifié	
	Nos animaux	IHC	Abcam®	Anti-TLR2 humain, polyclonal de chèvre	Ab1655
TLR4	Moreira et al. (337)	Cytométrie de flux	Novus Biologicals®	Anti-TLR4 humain, monoclonal de souris	HTA125
	Reineking et al. (338)	Cytométrie de flux	Bio-Rad®	Anti-TLR4 humain, monoclonal de souris	HTA125
	Boozer et al. (339)	IHC	Santa Cruz Biotechnology®	Anti-TLR4 humain, polyclonal de chèvre	
	Schnyder et al. (320)	IHC	Non commercialisé, production interne	Anti-TLR4 canin ; polyclonal de lapin purifié	
	Nos animaux	IHC	Novus Biologicals®	Anti-TLR4 humain, monoclonal de souris	TLR4/230
TLR5	Moreira et al. (337)	Cytométrie de flux	Novus Biologicals®	Anti-TLR5 humain, monoclonal de souris	85B152.5
	Reineking et al. (338)	Cytométrie de flux	Acris Antibodies®	Anti-TLR5 humain, monoclonal de souris	85B152.5
	Schnyder et al. (320)	IHC	Non commercialisé, production interne	Anti-TLR5 canin ; polyclonal de lapin purifié	
	Nos animaux	IHC	Novus Biologicals®	Anti-TLR5 humain, monoclonal de souris	19D759.2
TLR9	Figueiredo et al. (333)	Cytométrie de flux	SouthernBiotech®	anti-TLR9 humain ; monoclonal de souris	IMG-305A
	Moreira et al. (337)	Cytométrie de flux	Novus Biologicals®	Anti-TLR9 humain, monoclonal de souris	26C593.2
	Reineking et al. (338)	Cytométrie de flux	Bio-Rad®	Anti-TLR9 humain, monoclonal de souris	5G5
	Boozer et al. (339)	IHC	Santa Cruz Biotechnology®	Anti-TLR9 humain, polyclonal de chèvre	
	Schnyder et al. (320)	IHC	Non commercialisé, production interne	Anti-TLR9 canin ; polyclonal de lapin purifié	
	Nos animaux	IHC	Abcam®	Anti-TLR9 humain, monoclonal de souris	26C593.2

2.4 Dosages des cytokines et chimiokines

Nous avons mesuré les cytokines et chimiokines dans la muqueuse duodénale, iléale et colique des chiens malades et sains à l'aide de la technologie Luminex®. C'est une technologie de détection/quantification de molécules basée sur la technique ELISA sur billes doublement fluorescentes qui permet des analyses multiplexées. Le kit de dosage utilisé permet la mesure simultanée de 13 molécules différentes dans 25µL de spécimen contrairement au test ELISA standard qui permet le dosage d'une seule molécule. Cette technologie présente l'avantage d'être économiquement avantageuse, rapide et peu consommatrice de matériel biologique.

Parmi les 13 molécules mesurées, seules 3 (CXCL1, IL-8 et MCP-1) étaient quantifiables dans tous nos échantillons. Deux d'entre elles sont significativement augmentées dans le groupe MICI par rapport au groupe témoin : CXCL1 et MCP-1.

La quantité des autres molécules était très certainement inférieure au seuil de détection. Le **Tableau 16** compare la limite inférieure de détection (LID) des dosages de cytokines et de chimiokines chez le chien entre la technologie Milliplex®, la technologie Meso Scale Discovery® (MSD®) et quelques tests ELISA standards. Ces chiffres sont issus des données techniques fournies par les fabricants. On constate que les technologies Milliplex® et MSD® présentent des LID nettement inférieures à celles de la plupart des tests ELISA standards. Les LID avec la technologie MSD® sont nettement inférieures pour les dosages de l'IL-8 (divisé par 17) et du TNFα (divisé par 37) mais comparables pour les autres dosages existants. A titre de comparaison, le coût des réactifs (anticorps, ...) est 7 fois plus important avec la technologie MSD® par rapport à la technologie Milliplex®.

Tableau 16 : Comparaison des sensibilités de détection des cytokines/chimiokines entre les techniques Milliplex®, Meso Scale Delivery® et Elisa standard.

(Source fiche technique des fabricants).

Cytokine Chimiokine	Milliplex® <u>Limite inférieure de détection</u> <i>Kit Canine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (pg/mL)</i>	Meso Scale Discovery® <u>Limite inférieure de détection</u> <i>Kit Canine ProInflammatory Panel 3 Assay (pg/mL)</i>	Elisa standard <u>Limite inférieure de détection</u> (pg/mL)
GM-CSF	9.2	ND	ND
IFN-γ	13.6		100 (IFN gamma Canine ELISA Kit, <i>ThermoFisher®</i>)
IP-10	3.2	ND	ND
IL-2	3.5	7,6	400 (Canine IL-2 ELISA Kit , <i>RayBio®</i>)
IL-6	3.7	2,4	100 (Canine IL-6 ELISA Kit, ab193686, <i>Abcam®</i> ou Canine IL-6 ELISA, <i>RayBio®</i>)
IL-7	7.5	ND	ND
IL-8	21.7	1,3	6 (Canine IL8 ELISA Kit, ab155465, <i>Abcam®</i>)
IL-10	8.5	5,9 (Canine IL-10 Assay Ultra- Sensitive Kit, <i>Mesoscale®</i>)	100 (Canine IL-10 ELISA Kit, ab193685, <i>Abcam®</i>)
IL-15	9.0	ND	ND
IL-18	5.8	ND	ND
KC-like	5.3	ND	ND
MCP-1	21.0	ND	ND
TNFα	6.1	0,17	2 (Canine TNF alpha ELISA Kit ab193687, <i>Abcam®</i>)

La technologie de dosage Simoa® est ultra-sensible et permet des LID de l'ordre du femtogramme (10^{-3} pg). Toutefois, aucun anticorps canin n'est actuellement disponible par cette technique pour effectuer des dosages chez le chien.

En conclusion, il pourrait être nécessaire d'utiliser une technologie de dosage plus sensible que celle utilisée dans notre étude. A ce jour, la technologie MSD® peut répondre à cette attente pour le dosage de l'IL-8 et du TNFα uniquement.

2.5 Analyse du microbiote

L'analyse du microbiote digestif n'a pas été effectuée sur notre cohorte. La séroréactivité anti-flagelline et anti-LPS constatée ainsi que la diminution du dosage des IgA dans la muqueuse duodénale amènent à penser qu'un déséquilibre du microbiote digestif peut exister (cause, conséquence ou association ?). Cette analyse peut être effectuée sur des prélèvements fécaux ou, pour répondre davantage aux variations du microbiote selon l'étage du tube digestif, à partir de biopsies de muqueuses duodénales, iléales et coliques.

3 Conclusions et perspectives

Notre travail apporte des éléments en faveur de l'implication d'une **dysrégulation immunitaire humorale** dans les Entéropathies Répondant au traitement Immunomodulateur (ERI) de faible intensité chez le chien. Nous avons en effet observé une séro-réactivité anti-flagelline et anti-LPS des chiens malades, orientant vers l'existence d'une réaction immunitaire humorale dirigée contre des éléments bactériens du microbiote. La diminution des IgA dans la muqueuse duodénale est également en faveur d'une perturbation de l'immunité humorale locale. **Ces observations ouvrent la porte au développement de nouveaux marqueurs sanguins diagnostiques des ERI chez le chien.**

L'étude de l'expression des TLRs liés à la reconnaissance de motifs bactériens ne permet pas de les impliquer dans l'activation immunitaire humorale observée car nous n'avons pas observé d'expression différentielle entre les chiens cliniquement atteints et les sains. A noter toutefois que ces derniers présentaient une infiltration leucocytaire intestinale très significative.

En effet, nos résultats permettent également de dresser le constat que **l'inflammation cellulaire de la muqueuse intestinale n'est pas corrélée à la présence de signes cliniques lors d'ERI de faible intensité**. D'autres facteurs (rôle des ILC, réaction immunitaire humorale, génétique, dysbiose, activation nerveuse entérique, ...) doivent être recherchés pour expliquer l'apparition des signes cliniques. Cette constatation amène à ne plus mettre l'infiltration cellulaire leucocytaire au coeur du processus pathogénique et remet donc fondamentalement en cause le concept même de MICI chez le chien. A ce titre, **nous proposons de ne plus utiliser ce terme lors de signes cliniques de faible intensité et de se restreindre au terme d'Entéropathie Répondant au traitement Immunomodulateur** en attendant une clarification nosographique.

Les voies de recherche à venir doivent permettre de mieux caractériser les différents types d'entéropathies en élargissant notre analyse immunohistochimique et cytokinique aux FRE, ARE, MICI/NRE et PLE. La séro-réactivité anti-flagelline et anti-LPS doit confirmer son intérêt dans le processus diagnostique et thérapeutique en élargissant son étude à tous les types d'entéropathies y compris les causes infectieuses et tumorales. L'étude de

l'implication des TLRs mérite d'être complétée par une analyse de la fonctionnalité des TLR2, 4, 5 et 9. Enfin, deux acteurs non explorés dans notre étude appellent de futures recherches : le microbiote intestinal et le système nerveux entérique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*. déc 2017;390(10114):2769-78.
2. Chouraki V, Savoye G, Dauchet L, Vernier-Massouille G, Dupas J-L, Merle V, et al. The changing pattern of Crohn's disease incidence in northern France: a continuing increase in the 10- to 19-year-old age bracket (1988-2007): *Epidemiology of inflammatory bowel disease*. *Aliment Pharmacol Ther*. mai 2011;33(10):1133-42.
3. Ha F, Khalil H. Crohn's disease: a clinical update. *Ther Adv Gastroenterol*. nov 2015;8(6):352-9.
4. Aspinall V, Cappello M. *Introduction to Veterinary Anatomy and Physiology Textbook - E-Book*. 2015.
5. EURELL J-A., FRAPPIER B.L. *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology - 6th Edition*. Blackwell Publishing; 2006. 419 p.
6. Eurell JAC, Frappier BF, Dellmann H-D, éditeurs. *Dellmans textbook of veterinary histology*. 6th ed. Ames, IO: Blackwell; 2006. 405 p.
7. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. mars 2014;14(3):141-53.
8. Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang S-Y, Ko H-J, Vallance BA. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol*. févr 2019;40(2):174.
9. Fenoglio-Preiser C. *The Nonneoplastic Small Intestine*. In: *Gastrointestinal Pathology, an atlas and text (3rd Ed)*. Wolters Kluwer; 2007.
10. Lee SH. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. *Intest Res*. 2015;13(1):11.
11. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. nov 2009;9(11):799-809.
12. Furuse M. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol*. 1 déc 1994;127(6):1617-26.
13. Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, Ye D, Youssef M, Ma T. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. juin 2011;300(6):G1054-64.
14. Tamura A, Hayashi H, Imasato M, Yamazaki Y, Hagiwara A, Wada M, et al. Loss of Claudin-15, but Not Claudin-2, Causes Na⁺ Deficiency and Glucose Malabsorption in Mouse Small Intestine. *Gastroenterology*. mars 2011;140(3):913-23.
15. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. mars 2008;1778(3):660-9.
16. Hinck L. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol*. 1 juin 1994;125(6):1327-40.
17. Hanson PJ, Moran AP, Butler K. Paracellular permeability is increased by basal lipopolysaccharide in a primary culture of colonic epithelial cells; an effect prevented by an activator of Toll-like receptor-2. *Innate Immun*. juin 2011;17(3):269-82.
18. Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol*. janv 2008;1(1):31-7.
19. Gregersen PK, Behrens TW. Genetics of autoimmune diseases — disorders of immune homeostasis. *Nat Rev Genet*. déc 2006;7(12):917-28.
20. Kelsall B. Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages. *Mucosal Immunol*. nov 2008;1(6):460-9.

21. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol.* mars 2010;10(3):159-69.
22. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* oct 1993;75(2):263-74.
23. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature.* mai 2008;453(7195):620-5.
24. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. Interaction entre *Escherichia coli* et plaques de Peyer dans la maladie de Crohn: Le rôle des *long polar fimbriae*. *médecine/sciences.* juin 2011;27(6-7):572-3.
25. Junt T, Scandella E, Ludewig B. Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol.* oct 2008;8(10):764-75.
26. Nakato G, Hase K, Sato T, Kimura S, Sakakibara S, Sugiyama M, et al. Epithelium-Intrinsic MicroRNAs Contribute to Mucosal Immune Homeostasis by Promoting M-Cell Maturation. Otsuka M, éditeur. *PLOS ONE.* 1 mars 2016;11(3):e0150379.
27. Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* juill 2013;6(4):666-77.
28. Lelouard H, Fallet M, de Bovis B, Méresse S, Gorvel J. Peyer's Patch Dendritic Cells Sample Antigens by Extending Dendrites Through M Cell-Specific Transcellular Pores. *Gastroenterology.* mars 2012;142(3):592-601.e3.
29. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol.* juin 2004;4(6):478-85.
30. Schulz O, Jaensson E, Persson EK, Liu X, Worbs T, Agace WW, et al. Intestinal CD103⁺, but not CX3CR1⁺, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med.* 21 déc 2009;206(13):3101-14.
31. Borsutzky S, Cazac BB, Roes J, Guzmán CA. TGF- β Receptor Signaling Is Critical for Mucosal IgA Responses. *J Immunol.* 1 sept 2004;173(5):3305-9.
32. Mora JR, Iwata M, Eksteen B, Song S-Y, Junt T, Senman B, et al. Generation of Gut-Homing IgA-Secreting B Cells by Intestinal Dendritic Cells. *Science.* 17 nov 2006;314(5802):1157-60.
33. Mora JR, von Andrian UH. Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal Immunol.* mars 2008;1(2):96-109.
34. Chiba K, Matsuyuki H, Maeda Y, Sugahara K. Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus. *Cell Mol Immunol.* févr 2006;3(1):11-9.
35. Park EJ, Mora JR, Carman CV, Chen J, Sasaki Y, Cheng G, et al. Aberrant activation of integrin $\alpha 4\beta 7$ suppresses lymphocyte migration to the gut. *J Clin Invest.* 4 sept 2007;117(9):2526-38.
36. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song S-Y. Retinoic Acid Imprints Gut-Homing Specificity on T Cells. *Immunity.* oct 2004;21(4):527-38.
37. Mora JR, von Andrian UH. Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal Immunol.* mars 2008;1(2):96-109.
38. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, et al. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest.* 3 janv 2005;115(1):66-75.
39. Mowat AM, Bain CC. Mucosal Macrophages in Intestinal Homeostasis and Inflammation. *J Innate Immun.* 2011;3(6):550-64.

40. Rugtveit J, Bakka A, Brandtzaeg P. Differential distribution of B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) costimulatory molecules on mucosal macrophage subsets in human inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol.* sept 1997;110(1):104-13.
41. MacDonald KPA, Palmer JS, Cronau S, Seppanen E, Olver S, Raffelt NC, et al. An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood.* 11 nov 2010;116(19):3955-63.
42. Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol.* juin 2008;8(6):435-46.
43. Coombes JL, Siddiqui KRR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun C-M, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β - and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med.* 6 août 2007;204(8):1757-64.
44. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* avr 2001;2(4):361-7.
45. Niess JH. CX3CR1-Mediated Dendritic Cell Access to the Intestinal Lumen and Bacterial Clearance. *Science.* 14 janv 2005;307(5707):254-8.
46. Rescigno M. Dendritic Cells Shuttle Microbes Across Gut Epithelial Monolayers. *Immunobiology.* 2001;204(5):572-81.
47. Ma H, Tao W, Zhu S. T lymphocytes in the intestinal mucosa: defense and tolerance. *Cell Mol Immunol.* mars 2019;16(3):216-24.
48. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine.* juill 2015;74(1):5-17.
49. Seo G-Y, Youn J, Kim P-H. IL-21 ensures TGF- β 1-induced IgA isotype expression in mouse Peyer's patches. *J Leukoc Biol.* mai 2009;85(5):744-50.
50. Nurieva RI, Chung Y. Understanding the development and function of T follicular helper cells. *Cell Mol Immunol.* mai 2010;7(3):190-7.
51. Geuking MB, McCoy KD, Macpherson AJ. The continuum of intestinal CD4⁺ T cell adaptations in host-microbial mutualism. *Gut Microbes.* nov 2011;2(6):353-7.
52. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lécuyer E, Mulder I, Lan A, Bridonneau C, et al. The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. *Immunity.* oct 2009;31(4):677-89.
53. Denning TL, Wang Y, Patel SR, Williams IR, Pulendran B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol.* oct 2007;8(10):1086-94.
54. Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, Okada Y. Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology.* mai 1993;79(1):32-7.
55. Walker JA, Barlow JL, McKenzie ANJ. Innate lymphoid cells — how did we miss them? *Nat Rev Immunol.* févr 2013;13(2):75-87.
56. Cella M, Otero K, Colonna M. Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1 reveals intrinsic functional plasticity. *Proc Natl Acad Sci.* 15 juin 2010;107(24):10961-6.
57. Klose CSN, Flach M, Möhle L, Rogell L, Hoyler T, Ebert K, et al. Differentiation of Type 1 ILCs from a Common Progenitor to All Helper-like Innate Lymphoid Cell Lineages. *Cell.* avr 2014;157(2):340-56.
58. Bernink JH, Peters CP, Munneke M, te Velde AA, Meijer SL, Weijer K, et al. Human type

- 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol.* mars 2013;14(3):221-9.
59. Klose CSN, Artis D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol.* juill 2016;17(7):765-74.
60. Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, Fung TC, Hutnick NA, Kunisawa J, et al. Innate Lymphoid Cells Promote Anatomical Containment of Lymphoid-Resident Commensal Bacteria. *Science.* 8 juin 2012;336(6086):1321-5.
61. Kruglov AA, Grivennikov SI, Kuprash DV, Winsauer C, Prepens S, Seleznik GM, et al. Nonredundant Function of Soluble LT 3 Produced by Innate Lymphoid Cells in Intestinal Homeostasis. *Science.* 6 déc 2013;342(6163):1243-6.
62. Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC, Ziegler CGK, Grunberg S, Sinha R, et al. Innate lymphoid cells regulate CD4⁺ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature.* juin 2013;498(7452):113-7.
63. Cheng H, Bjerknes M, Amar J. Methods for the determination of epithelial cell kinetic parameters of human colonic epithelium isolated from surgical and biopsy specimens. *Gastroenterology.* janv 1984;86(1):78-85.
64. Specian RD. Mechanism of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine. *J Cell Biol.* 1 juin 1980;85(3):626-40.
65. Specian RD, Neutra MR. Cytoskeleton of intestinal goblet cells in rabbit and monkey. *Gastroenterology.* déc 1984;87(6):1313-25.
66. Porter KR, Bonneville MA. Fine structure of cells and tissues. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1973. 204 p.
67. Turner J-E, Stockinger B, Helmby H. IL-22 Mediates Goblet Cell Hyperplasia and Worm Expulsion in Intestinal Helminth Infection. Wynn TA, éditeur. *PLoS Pathog.* 10 oct 2013;9(10):e1003698.
68. Songhet P, Barthel M, Stecher B, Müller AJ, Kremer M, Hansson GC, et al. Stromal IFN- γ -Signaling Modulates Goblet Cell Function During Salmonella Typhimurium Infection. Bereswill S, éditeur. *PLoS ONE.* 28 juill 2011;6(7):e22459.
69. Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci.* 18 janv 2000;97(2):799-804.
70. Artis D, Wang ML, Keilbaugh SA, He W, Brenes M, Swain GP, et al. RELM /FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci.* 14 sept 2004;101(37):13596-600.
71. Prohete DC, Chara AL, Harris TA, Ruhn KA, Hooper LV. Resistin-like molecule β is a bactericidal protein that promotes spatial segregation of the microbiota and the colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci.* 17 oct 2017;114(42):11027-33.
72. McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, Wang B, Konjufca V, Knoop KA, et al. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103⁺ dendritic cells in the small intestine. *Nature.* mars 2012;483(7389):345-9.
73. Mace OJ, Tehan B, Marshall F. Pharmacology and physiology of gastrointestinal enteroendocrine cells. *Pharmacol Res Perspect.* août 2015;3(4):e00155.
74. Junqueira LCU, Mescher AL, éditeurs. Junqueira's basic histology: text & atlas. 12. ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2010. 467 p.
75. Karaki S, Mitsui R, Hayashi H, Kato I, Sugiya H, Iwanaga T, et al. Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell Tissue Res.* juin 2006;324(3):353-60.

76. Worthington JJ, Reimann F, Gribble FM. Enteroendocrine cells-sensory sentinels of the intestinal environment and orchestrators of mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* janv 2018;11(1):3-20.
77. Bogunovic M, Davé SH, Tilstra JS, Chang DTW, Harpaz N, Xiong H, et al. Enteroendocrine cells express functional Toll-like receptors. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* juin 2007;292(6):G1770-83.
78. Ladinsky MS, Araujo LP, Zhang X, Veltri J, Galan-Diez M, Soualhi S, et al. Endocytosis of commensal antigens by intestinal epithelial cells regulates mucosal T cell homeostasis. *Science.* 8 mars 2019;363(6431):eaat4042.
79. Lin XP, Almqvist N, Telemo E. Human small intestinal epithelial cells constitutively express the key elements for antigen processing and the production of exosomes. *Blood Cells Mol Dis.* sept 2005;35(2):122-8.
80. Perera L, Shao L, Patel A, Evans K, Meresse B, Blumberg R, et al. Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells: *Inflamm Bowel Dis.* mars 2007;13(3):298-307.
81. Abreu MT, Thomas LS, Arnold ET, Lukasek K, Michelsen KS, Arditi M. TLR signaling at the intestinal epithelial interface. *J Endotoxin Res.* 1 oct 2003;9(5):322-30.
82. Kim JG, Lee SJ, Kagnoff MF. Nod1 Is an Essential Signal Transducer in Intestinal Epithelial Cells Infected with Bacteria That Avoid Recognition by Toll-Like Receptors. *Infect Immun.* 1 mars 2004;72(3):1487-95.
83. Pott J, Hornef M. Innate immune signalling at the intestinal epithelium in homeostasis and disease. *EMBO Rep.* 17 juill 2012;13(8):684-98.
84. McCormick BA. Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol.* 1 nov 1993;123(4):895-907.
85. Keates S, Keates AC, Mizoguchi E, Bhan A, Kelly CP. Enterocytes are the primary source of the chemokine ENA-78 in normal colon and ulcerative colitis. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* juill 1997;273(1):G75-82.
86. Dwinell MB, Johanesen PA, Smith JM. Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa. *Surgery.* juin 2003;133(6):601-7.
87. Kulkarni N, Pathak M, Lal G. Role of chemokine receptors and intestinal epithelial cells in the mucosal inflammation and tolerance. *J Leukoc Biol.* févr 2017;101(2):377-94.
88. Gasperini S, Marchi M, Calzetti F, Laudanna C, Vicentini L, Olsen H, et al. Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 avr 1999;162(8):4928-37.
89. Sitaraman SV, Merlin D, Wang L, Wong M, Gewirtz AT, Si-Tahar M, et al. Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal lumenal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6. *J Clin Invest.* 1 avr 2001;107(7):861-9.
90. Liu Y, Bühring H-J, Zen K, Burst SL, Schnell FJ, Williams IR, et al. Signal Regulatory Protein (SIRP α), a Cellular Ligand for CD47, Regulates Neutrophil Transmigration. *J Biol Chem.* 22 mars 2002;277(12):10028-36.
91. Kiyono H, Fukuyama S. NALT- versus PEYER'S-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol.* sept 2004;4(9):699-710.
92. Kraehenbuhl J-P, Neutra MR. Epithelial M Cells: Differentiation and Function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* nov 2000;16(1):301-32.
93. Satoh Y, Habara Y, Ono K, Kanno T. Carbamylcholine- and catecholamine-induced

- intracellular calcium dynamics of epithelial cells in mouse ileal crypts. *Gastroenterology*. mai 1995;108(5):1345-56.
94. Clevers HC, Bevins CL. Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. *Annu Rev Physiol*. 10 févr 2013;75(1):289-311.
95. Pütsep K, Axelsson L-G, Boman A, Midtvedt T, Normark S, Boman HG, et al. Germ-free and Colonized Mice Generate the Same Products from Enteric Prodefensins. *J Biol Chem*. 22 déc 2000;275(51):40478-82.
96. Menendez A, Willing BP, Montero M, Wlodarska M, So CC, Bhinder G, et al. Bacterial Stimulation of the TLR-MyD88 Pathway Modulates the Homeostatic Expression of Ileal Paneth Cell α -Defensins. *J Innate Immun*. 2013;5(1):39-49.
97. Wang H, Zhang X, Zuo Z, Zhang Q, Pan Y, Zeng B, et al. Rip2 Is Required for Nod2-Mediated Lysozyme Sorting in Paneth Cells. *J Immunol*. 1 mai 2017;198(9):3729-36.
98. Raetz M, Hwang S, Wilhelm CL, Kirkland D, Benson A, Sturge CR, et al. Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ -dependent elimination of Paneth cells. *Nat Immunol*. févr 2013;14(2):136-42.
99. Bezençon C, Fürholz A, Raymond F, Mansourian R, Métairon S, Le Coutre J, et al. Murine intestinal cells expressing Trpm5 are mostly brush cells and express markers of neuronal and inflammatory cells. *J Comp Neurol*. 10 août 2008;509(5):514-25.
100. Gerbe F, van Es JH, Makrini L, Brulin B, Mellitzer G, Robine S, et al. Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J Cell Biol*. 7 mars 2011;192(5):767-80.
101. Gerbe F, Brulin B, Makrini L, Legraverend C, Jay P. DCAMKL-1 Expression Identifies Tuft Cells Rather Than Stem Cells in the Adult Mouse Intestinal Epithelium. *Gastroenterology*. déc 2009;137(6):2179-80.
102. Howitt MR, Lavoie S, Michaud M, Blum AM, Tran SV, Weinstock JV, et al. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science*. 18 mars 2016;351(6279):1329-33.
103. Johansson MEV, Hansson GC. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat Rev Immunol*. oct 2016;16(10):639-49.
104. van der Waaij LA, Harmsen HJM, Madjipour M, Kroese FGM, Zwieters M, van Dullemen HM, et al. Bacterial Population Analysis of Human Colon and Terminal Ileum Biopsies with 16S rRNA-based Fluorescent Probes: Commensal Bacteria Live in Suspension and Have No Direct Contact with Epithelial Cells. *Inflamm Bowel Dis*. oct 2005;11(10):865-71.
105. Gaudier E, Hoebler C. [Physiological role of mucins in the colonic barrier integrity]. *Gastroenterol Clin Biol*. sept 2006;30(8-9):965-74.
106. Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, Velcich A, Meijerink JPP, Van Goudoever JB, et al. Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology*. juill 2006;131(1):117-29.
107. Muniz LR, Knosp C, Yeretssian G. Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Front Immunol* [Internet]. 2012 [cité 24 juill 2019];3. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00310/abstract>
108. Bevins CL. The Paneth cell and the innate immune response. *Curr Opin Gastroenterol*. nov 2004;20(6):572-80.
109. Chairatana P, Chu H, Castillo PA, Shen B, Bevins CL, Nolan EM. Proteolysis triggers self-assembly and unmasks innate immune function of a human α -defensin peptide. *Chem Sci*. 2016;7(3):1738-52.

110. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol.* août 2005;17(4):359-65.
111. Hase K. Cell Differentiation Is a Key Determinant of Cathelicidin LL-37/Human Cationic Antimicrobial Protein 18 Expression by Human Colon Epithelium. *Infect Immun.* 1 févr 2002;70(2):953-63.
112. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci.* 4 août 1998;95(16):9541-6.
113. Nagaoka I, Hirota S, Yomogida S, Ohwada A, Hirata M. Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflamm Res.* 1 févr 2000;49(2):73-9.
114. De Yang, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, et al. LL-37, the Neutrophil Granule-Derived Cathelicidin, Utilizes Formyl Peptide Receptor-Like 1 (Fpr1) as a Receptor to Chemoattract Human Peripheral Blood Neutrophils, Monocytes, and T Cells. *J Exp Med.* 2 oct 2000;192(7):1069-74.
115. Cash HL. Symbiotic Bacteria Direct Expression of an Intestinal Bactericidal Lectin. *Science.* 25 août 2006;313(5790):1126-30.
116. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci.* 30 déc 2008;105(52):20858-63.
117. Xiao Y, Huang X, Zhao Y, Chen F, Sun M, Yang W, et al. Interleukin-33 Promotes REG3 γ Expression in Intestinal Epithelial Cells and Regulates Gut Microbiota. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019;8(1):21-36.
118. Tsuji S, Uehori J, Matsumoto M, Suzuki Y, Matsuhisa A, Toyoshima K, et al. Human Intelectin Is a Novel Soluble Lectin That Recognizes Galactofuranose in Carbohydrate Chains of Bacterial Cell Wall. *J Biol Chem.* 29 juin 2001;276(26):23456-63.
119. Wesener DA, Wangkanont K, McBride R, Song X, Kraft MB, Hodges HL, et al. Recognition of microbial glycans by human intelectin-1. *Nat Struct Mol Biol.* août 2015;22(8):603-10.
120. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen F-E, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* janv 2008;1(1):11-22.
121. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell.* sept 2000;102(5):553-63.
122. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol.* janv 2008;8(1):22-33.
123. Cerutti A. Location, location, location: B-cell differentiation in the gut lamina propria. *Mucosal Immunol.* janv 2008;1(1):8-10.
124. Horiguchi M, Ota M, Rifkin DB. Matrix control of transforming growth factor- function. *J Biochem (Tokyo).* 1 oct 2012;152(4):321-9.
125. Tezuka H, Abe Y, Iwata M, Takeuchi H, Ishikawa H, Matsushita M, et al. Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature.* août 2007;448(7156):929-33.
126. Bergqvist P, Gärdby E, Stensson A, Bemark M, Lycke NY. Gut IgA Class Switch Recombination in the Absence of CD40 Does Not Occur in the Lamina Propria and Is Independent of Germinal Centers. *J Immunol.* 1 déc 2006;177(11):7772-83.
127. Bergqvist P, Stensson A, Lycke NY, Bemark M. T Cell-Independent IgA Class Switch Recombination Is Restricted to the GALT and Occurs Prior to Manifest Germinal Center Formation.

J Immunol. 1 avr 2010;184(7):3545-53.

128. Shang L, Fukata M, Thirunarayanan N, Martin AP, Arnaboldi P, Maussang D, et al. Toll-Like Receptor Signaling in Small Intestinal Epithelium Promotes B-Cell Recruitment and IgA Production in Lamina Propria. *Gastroenterology*. août 2008;135(2):529-538.e1.
129. Brandtzaeg P. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int J Med Microbiol*. janv 2003;293(1):3-15.
130. Punt J. *Kuby immunology*. 8th edition. New York, NY: W. H. Freeman; 2018.
131. Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's Complex Roles in Immunity and Mucosal Homeostasis in the Gut. *Mucosal Immunol*. nov 2011;4(6):603-11.
132. Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl J-P, Edelman L, Sansonetti PJ, Corthésy B. Secretory Component. *Immunity*. juill 2002;17(1):107-15.
133. Sait LC, Galic M, Price JD, Simpfendorfer KR, Diavatopoulos DA, Uren TK, et al. Secretory antibodies reduce systemic antibody responses against the gastrointestinal commensal flora. *Int Immunol*. 7 févr 2007;19(3):257-65.
134. Suzuki K, Meek B, Doi Y, Muramatsu M, Chiba T, Honjo T, et al. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc Natl Acad Sci*. 17 févr 2004;101(7):1981-6.
135. Wei M, Shinkura R, Doi Y, Maruya M, Fagarasan S, Honjo T. Mice carrying a knock-in mutation of Aicda resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. *Nat Immunol*. mars 2011;12(3):264-70.
136. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. févr 2006;124(4):783-801.
137. Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev*. janv 2009;227(1):75-86.
138. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. mars 2010;140(6):805-20.
139. Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol*. juill 2009;9(7):465-79.
140. Zhong Y, Kinio A, Saleh M. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol* [Internet]. 2013 [cité 3 sept 2019];4. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00333/abstract>
141. Kim YK, Shin J-S, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med J*. 2016;57(1):5.
142. Koonin EV, Aravind L. The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci*. mai 2000;25(5):223-4.
143. Inohara N, Chamaillard M, McDonald C, Nuñez G. NOD-LRR PROTEINS: Role in Host-Microbial Interactions and Inflammatory Disease. *Annu Rev Biochem*. juin 2005;74(1):355-83.
144. Oh JE, Lee HK. Modulation of Pathogen Recognition by Autophagy. *Front Immunol* [Internet]. 2012 [cité 4 sept 2019];3. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00044/abstract>
145. Travassos LH, Carneiro LAM, Ramjeet M, Hussey S, Kim Y-G, Magalhães JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol*. janv 2010;11(1):55-62.
146. Oh JE, Lee HK. Pattern Recognition Receptors and Autophagy. *Front Immunol* [Internet]. 25 juin 2014 [cité 10 oct 2019];5. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00300/abstract>

147. Girardin SE. Nod1 Detects a Unique Muropeptide from Gram-Negative Bacterial Peptidoglycan. *Science*. 6 juin 2003;300(5625):1584-7.
148. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. *J Biol Chem*. 14 mars 2003;278(11):8869-72.
149. Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science*. 10 mars 1995;267(5203):1485-8.
150. Cui J, Li Y, Zhu L, Liu D, Songyang Z, Wang HY, et al. NLRP4 negatively regulates type I interferon signaling by targeting the kinase TBK1 for degradation via the ubiquitin ligase DTX4. *Nat Immunol*. avr 2012;13(4):387-95.
151. Davis BK, Wen H, Ting JP-Y. The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. *Annu Rev Immunol*. 23 avr 2011;29(1):707-35.
152. Cuscó A, Sánchez A, Altet L, Ferrer L, Francino O. Non-synonymous genetic variation in exonic regions of canine Toll-like receptors. *Canine Genet Epidemiol*. 2014;1(1):11.
153. Cai X, Chiu Y-H, Chen ZJ. The cGAS-cGAMP-STING Pathway of Cytosolic DNA Sensing and Signaling. *Mol Cell*. avr 2014;54(2):289-96.
154. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. mai 2010;11(5):373-84.
155. Regan T, Nally K, Carmody R, Houston A, Shanahan F, MacSharry J, et al. Identification of TLR10 as a Key Mediator of the Inflammatory Response to *Listeria monocytogenes* in Intestinal Epithelial Cells and Macrophages. *J Immunol*. 15 déc 2013;191(12):6084-92.
156. Lee SMY, Kok K-H, Jaume M, Cheung TKW, Yip T-F, Lai JCC, et al. Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci*. 11 mars 2014;111(10):3793-8.
157. Blasius AL, Beutler B. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity*. mars 2010;32(3):305-15.
158. Bernard JJ, Cowing-Zitron C, Nakatsuji T, Muehleisen B, Muto J, Borkowski AW, et al. Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat Med*. août 2012;18(8):1286-90.
159. Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, Akira S, et al. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol*. juin 2009;10(6):587-94.
160. Guiducci C, Gong M, Cepika A-M, Xu Z, Tripodo C, Bennett L, et al. RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 16 déc 2013;210(13):2903-19.
161. Lin S-C, Lo Y-C, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*. juin 2010;465(7300):885-90.
162. Kollwe C, Mackensen A-C, Neumann D, Knop J, Cao P, Li S, et al. Sequential Autophosphorylation Steps in the Interleukin-1 Receptor-associated Kinase-1 Regulate its Availability as an Adapter in Interleukin-1 Signaling. *J Biol Chem*. 13 févr 2004;279(7):5227-36.
163. Jiang Z, Ninomiya-Tsuji J, Qian Y, Matsumoto K, Li X. Interleukin-1 (IL-1) Receptor-Associated Kinase-Dependent IL-1-Induced Signaling Complexes Phosphorylate TAK1 and TAB2 at the Plasma Membrane and Activate TAK1 in the Cytosol. *Mol Cell Biol*. 15 oct 2002;22(20):7158-67.
164. Chen ZJ. Ubiquitination in signaling to and activation of IKK: Ubiquitin-mediated activation of IKK. *Immunol Rev*. mars 2012;246(1):95-106.
165. Ajibade AA, Wang HY, Wang R-F. Cell type-specific function of TAK1 in innate immune

signaling. *Trends Immunol.* juill 2013;34(7):307-16.

166. Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion. *Nat Rev Immunol.* janv 2012;12(1):35-48.

167. Lim R, Barker G, Lappas M. Pellino 1 is a novel regulator of TNF and TLR signalling in human myometrial and amnion cells. *J Reprod Immunol.* juin 2018;127:24-35.

168. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol.* août 2014;14(8):546-58.

169. Yoon S -i., Kurnasov O, Natarajan V, Hong M, Gudkov AV, Osterman AL, et al. Structural Basis of TLR5-Flagellin Recognition and Signaling. *Science.* 17 févr 2012;335(6070):859-64.

170. Song DH, Lee J-O. Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors. *Immunol Rev.* nov 2012;250(1):216-29.

171. Bryant CE, Symmons M, Gay NJ. Toll-like receptor signalling through macromolecular protein complexes. *Mol Immunol.* févr 2015;63(2):162-5.

172. Núñez Miguel R, Wong J, Westoll JF, Brooks HJ, O'Neill LAJ, Gay NJ, et al. A Dimer of the Toll-Like Receptor 4 Cytoplasmic Domain Provides a Specific Scaffold for the Recruitment of Signalling Adaptor Proteins. *Kleefstrom J, éditeur. PLoS ONE.* 29 août 2007;2(8):e788.

173. Valkov E, Stamp A, DiMaio F, Baker D, Verstak B, Roversi P, et al. Crystal structure of Toll-like receptor adaptor MAL/TIRAP reveals the molecular basis for signal transduction and disease protection. *Proc Natl Acad Sci.* 6 sept 2011;108(36):14879-84.

174. Takahashi K, Shibata T, Akashi-Takamura S, Kiyokawa T, Wakabayashi Y, Tanimura N, et al. A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *J Exp Med.* 26 nov 2007;204(12):2963-76.

175. Yang Y, Liu B, Dai J, Srivastava PK, Zammit DJ, Lefrançois L, et al. Heat Shock Protein gp96 Is a Master Chaperone for Toll-like Receptors and Is Important in the Innate Function of Macrophages. *Immunity.* févr 2007;26(2):215-26.

176. Garcia-Cattaneo A, Gobert F-X, Muller M, Toscano F, Flores M, Lescure A, et al. Cleavage of Toll-like receptor 3 by cathepsins B and H is essential for signaling. *Proc Natl Acad Sci.* 5 juin 2012;109(23):9053-8.

177. Wang C, Chen T, Zhang J, Yang M, Li N, Xu X, et al. The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 « preferentially » promotes TLR-mediated production of type I interferon. *Nat Immunol.* juill 2009;10(7):744-52.

178. Liu X, Zhan Z, Li D, Xu L, Ma F, Zhang P, et al. Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk. *Nat Immunol.* mai 2011;12(5):416-24.

179. Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, et al. CD14 Controls the LPS-Induced Endocytosis of Toll-like Receptor 4. *Cell.* nov 2011;147(4):868-80.

180. Baumann CL, Aspalter IM, Sharif O, Pichlmair A, Blüml S, Grebien F, et al. CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9. *J Exp Med.* 22 nov 2010;207(12):2689-701.

181. Palsson-McDermott EM, Doyle SL, McGettrick AF, Hardy M, Husebye H, Banahan K, et al. TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. *Nat Immunol.* juin 2009;10(6):579-86.

182. Kayagaki N, Phung Q, Chan S, Chaudhari R, Quan C, O'Rourke KM, et al. DUBA: A Deubiquitinase That Regulates Type I Interferon Production. *Science.* 7 déc 2007;318(5856):1628-32.

183. Skaug B, Chen J, Du F, He J, Ma A, Chen ZJ. Direct, Noncatalytic Mechanism of IKK Inhibition by A20. *Mol Cell.* nov 2011;44(4):559-71.

184. Kondo T, Kawai T, Akira S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol.* sept 2012;33(9):449-58.
185. Shi M, Deng W, Bi E, Mao K, Ji Y, Lin G, et al. TRIM30 α negatively regulates TLR-mediated NF- κ B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. *Nat Immunol.* avr 2008;9(4):369-77.
186. Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, et al. Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol.* juin 2006;7(6):598-605.
187. Simpson KW, Jergens AE. Pitfalls and Progress in the Diagnosis and Management of Canine Inflammatory Bowel Disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* mars 2011;41(2):381-98.
188. Schreiner NMS, Gaschen F, Gröne A, Sauter SN, Allenspach K. Clinical Signs, Histology, and CD3-Positive Cells before and after Treatment of Dogs with Chronic Enteropathies. *J Vet Intern Med.* sept 2008;22(5):1079-83.
189. Dandrieux JRS. Inflammatory bowel disease versus chronic enteropathy in dogs: are they one and the same? *J Small Anim Pract.* nov 2016;57(11):589-99.
190. Volkmann M, Steiner JM, Fosgate GT, Zentek J, Hartmann S, Kohn B. Chronic Diarrhea in Dogs – Retrospective Study in 136 Cases. *J Vet Intern Med.* 1 juill 2017;31(4):1043-55.
191. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* juin 2011;474(7351):307-17.
192. Craven M, Simpson JW, Ridyard AE, Chandler ML. Canine inflammatory bowel disease: retrospective analysis of diagnosis and outcome in 80 cases (1995-2002). *J Small Anim Pract.* juill 2004;45(7):336-42.
193. D. BOTA, A. LECOINDRE, A. POUJADE, M. CHEVALIER, P. LECOINDRE, F. BAPTISTA, E. GOMES, J. HERNANDEZ. Protein losing enteropathy in Yorkshire Terriers – Retrospective study in 31 dogs. *Revue Méd Vét.* 2016;2-9.
194. Allenspach K, Wieland B, Gröne A, Gaschen F. Chronic enteropathies in dogs: evaluation of risk factors for negative outcome. *J Vet Intern Med Am Coll Vet Intern Med.* août 2007;21(4):700-8.
195. Isene R, Bernklev T, Høie O, Munkholm P, Tsianos E, Stockbrügger R, et al. Extraintestinal manifestations in Crohn's disease and ulcerative colitis: results from a prospective, population-based European inception cohort. *Scand J Gastroenterol.* 4 mars 2015;50(3):300-5.
196. Naber AHJ, de Jong DJ. Assessment of disease activity in inflammatory bowel disease; relevance for clinical trials. *Neth J Med.* avr 2003;61(4):105-10.
197. Allenspach K, Wieland B, Gröne A, Gaschen F. Chronic enteropathies in dogs: evaluation of risk factors for negative outcome. *J Vet Intern Med Am Coll Vet Intern Med.* août 2007;21(4):700-8.
198. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol J Can Gastroenterol.* sept 2005;19 Suppl A:5A-36A.
199. Best WR, Beckett JM, Singleton JW. Rederived values of the eight coefficients of the Crohn's Disease Activity Index (CDAI). *Gastroenterology.* oct 1979;77(4 Pt 2):843-6.
200. Jergens AE, Schreiner CA, Frank DE, Niyo Y, Ahrens FE, Eckersall PD, et al. A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. *J Vet Intern Med Am Coll Vet Intern Med.* juin 2003;17(3):291-7.
201. Peyrin-Biroulet L, Panés J, Sandborn WJ, Vermeire S, Danese S, Feagan BG, et al. Defining

Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. *Clin Gastroenterol Hepatol.* mars 2016;14(3):348-354.e17.

202. Makielski K, Cullen J, O'Connor A, Jergens AE. Narrative review of therapies for chronic enteropathies in dogs and cats. *J Vet Intern Med.* janv 2019;33(1):11-22.

203. Walker D, Knuchel-Takano A, McCutchan A, Chang Y-M, Downes C, Miller S, et al. A Comprehensive Pathological Survey of Duodenal Biopsies from Dogs with Diet-Responsive Chronic Enteropathy. *J Vet Intern Med.* 1 juill 2013;27(4):862-74.

204. Rudinsky AJ, Howard JP, Bishop MA, Sherding RG, Parker VJ, Gilor C. Dietary management of presumptive protein-losing enteropathy in Yorkshire terriers: Management of Yorkshire terrier PLE with diet. *J Small Anim Pract.* févr 2017;58(2):103-8.

205. Kilpinen S, Spillmann T, Syrjä P, Skrzypczak T, Louhelainen M, Westermarck E. Effect of tylosin on dogs with suspected tylosin-responsive diarrhea: a placebo-controlled, randomized, double-blinded, prospective clinical trial. *Acta Vet Scand.* 2011;53(1):26.

206. Westermarck E, Skrzypczak T, Harmoinen J, Steiner JM, Ruaux CG, Williams DA, et al. Tylosin-Responsive Chronic Diarrhea in Dogs. *J Vet Intern Med.* 1 mars 2005;19(2):177-86.

207. Gaschen L, Kircher P, Stüssi A, Allenspach K, Gaschen F, Doherr M, et al. Comparison of ultrasonographic findings with clinical activity index (CIBDAI) and diagnosis in dogs with chronic enteropathies. *Vet Radiol Ultrasound Off J Am Coll Vet Radiol Int Vet Radiol Assoc.* févr 2008;49(1):56-64.

208. Kull PA, Hess RS, Craig LE, Saunders HM, Washabau RJ. Clinical, clinicopathologic, radiographic, and ultrasonographic characteristics of intestinal lymphangiectasia in dogs: 17 cases (1996-1998). *J Am Vet Med Assoc.* 15 juill 2001;219(2):197-202.

209. García-Sancho M, Rodríguez-Franco F, Sainz A, Mancho C, Rodríguez A. Evaluation of clinical, macroscopic, and histopathologic response to treatment in nonhypoproteinemic dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis. *J Vet Intern Med.* févr 2007;21(1):11-7.

210. Slovak JE, Wang C, Sun Y, Otoni C, Morrison J, Deitz K, et al. Development and validation of an endoscopic activity score for canine inflammatory bowel disease. *Vet J.* mars 2015;203(3):290-5.

211. Rameshshanker R. Endoscopy in inflammatory bowel disease when and why. *World J Gastrointest Endosc.* 2012;4(6):201.

212. Khanna R, Zou G, Stitt L, Feagan BG, Sandborn WJ, Rutgeerts P, et al. Responsiveness of Endoscopic Indices of Disease Activity for Crohn's Disease. *Am J Gastroenterol.* oct 2017;112(10):1584-92.

213. Manes G, Imbesi V, Ardizzone S, Cassinotti A, Bosani M, Massari A, et al. Appropriateness and diagnostic yield of colonoscopy in the management of patients with ulcerative colitis: A prospective study in an open access endoscopy service. *Inflamm Bowel Dis.* août 2008;14(8):1133-8.

214. Travis SPL, Schnell D, Krzeski P, Abreu MT, Altman DG, Colombel J-F, et al. Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut.* avr 2012;61(4):535-42.

215. de Jong DC, Löwenberg M, Koumoutsos I, Ray S, Mawdsley J, Anderson S, et al. Validation and Investigation of the Operating Characteristics of the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 17 oct 2018 [cité 14 mars 2019]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/ibdjournal/advance-article/doi/10.1093/ibd/izy325/5134157>

216. Washabau RJ, Day MJ, Willard MD, Hall EJ, Jergens AE, Mansell J, et al. Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. *J Vet Intern Med.* févr 2010;24(1):10-26.

217. Day MJ, Bilzer T, Mansell J, Wilcock B, Hall EJ, Jergens A, et al. Histopathological

standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *J Comp Pathol.* avr 2008;138 Suppl 1:S1-43.

218. Allenspach KA, Mochel JP, Du Y, Priestnall SL, Moore F, Slayter M, et al. Correlating Gastrointestinal Histopathologic Changes to Clinical Disease Activity in Dogs With Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. *Vet Pathol.* mai 2019;56(3):435-43.

219. German AJ, Hall EJ, Day MJ. Immune cell populations within the duodenal mucosa of dogs with enteropathies. *J Vet Intern Med.* févr 2001;15(1):14-25.

220. Jergens AE, Gamet Y, Moore FM, Niyo Y, Tsao C, Smith B. Colonic lymphocyte and plasma cell populations in dogs with lymphocytic-plasmacytic colitis. *Am J Vet Res.* avr 1999;60(4):515-20.

221. Kleinschmidt S, Meneses F, Nolte I, Hewicker-Trautwein M. Characterization of mast cell numbers and subtypes in biopsies from the gastrointestinal tract of dogs with lymphocytic-plasmacytic or eosinophilic gastroenterocolitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 15 déc 2007;120(3-4):80-92.

222. Stonehewer J, Simpson JW, Else RW, Macintyre N. Evaluation of B and T lymphocytes and plasma cells in colonic mucosa from healthy dogs and from dogs with inflammatory bowel disease. *Res Vet Sci.* août 1998;65(1):59-63.

223. Magro F, Langner C, Driessen A, Ensari A, Geboes K, Mantzaris GJ, et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis.* nov 2013;7(10):827-51.

224. Schumacher G, Sandstedt B, Kollberg B. A prospective study of first attacks of inflammatory bowel disease and infectious colitis. Clinical findings and early diagnosis. *Scand J Gastroenterol.* mars 1994;29(3):265-74.

225. Van Kruiningen HJ, Montali RJ, Strandberg JD, Kirk RW. A granulomatous colitis of dogs with histologic resemblance to Whipple's disease. *Pathol Vet.* 1965;2(6):521-44.

226. Simpson KW, Dogan B, Rishniw M, Goldstein RE, Klaessig S, McDonough PL, et al. Adherent and Invasive *Escherichia coli* Is Associated with Granulomatous Colitis in Boxer Dogs. *Infect Immun.* 1 août 2006;74(8):4778-92.

227. Mansfield CS, James FE, Craven M, Davies DR, O'Hara AJ, Nicholls PK, et al. Remission of Histiocytic Ulcerative Colitis in Boxer Dogs Correlates with Eradication of Invasive Intramucosal *Escherichia coli*. *J Vet Intern Med.* sept 2009;23(5):964-9.

228. Hayward JJ, Castelhana MG, Oliveira KC, Corey E, Balkman C, Baxter TL, et al. Complex disease and phenotype mapping in the domestic dog. *Nat Commun [Internet].* déc 2016 [cité 21 janv 2019];7(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/ncomms10460>

229. Berger SB, Romero X, Ma C, Wang G, Faubion WA, Liao G, et al. SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages. *Nat Immunol.* oct 2010;11(10):920-7.

230. Craven M, Mansfield CS, Simpson KW. Granulomatous colitis of boxer dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* mars 2011;41(2):433-45.

231. Frolkis AD, Dykeman J, Negrón ME, deBruyn J, Jette N, Fiest KM, et al. Risk of Surgery for Inflammatory Bowel Diseases Has Decreased Over Time: A Systematic Review and Meta-analysis of Population-Based Studies. *Gastroenterology.* nov 2013;145(5):996-1006.

232. Moja L, Danese S, Fiorino G, Del Giovane C, Bonovas S. Systematic review with network meta-analysis: comparative efficacy and safety of budesonide and mesalazine (mesalamine) for Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* juin 2015;41(11):1055-65.

233. Forbes A, Escher J, Hébuterne X, Kłęk S, Krznaric Z, Schneider S, et al. ESPEN guideline: Clinical nutrition in inflammatory bowel disease. *Clin Nutr.* avr 2017;36(2):321-47.

234. Jergens AE, Crandell J, Morrison JA, Deitz K, Pressel M, Ackermann M, et al. Comparison of oral prednisone and prednisone combined with metronidazole for induction therapy of canine inflammatory bowel disease: a randomized-controlled trial. *J Vet Intern Med Am Coll Vet Intern Med.* avr 2010;24(2):269-77.
235. Allenspach K, Rüfenacht S, Sauter S, Gröne A, Steffan J, Strehlau G, et al. Pharmacokinetics and clinical efficacy of cyclosporine treatment of dogs with steroid-refractory inflammatory bowel disease. *J Vet Intern Med Am Coll Vet Intern Med.* avr 2006;20(2):239-44.
236. Dandrieux JRS, Noble P-JM, Scase TJ, Cripps PJ, German AJ. Comparison of a chlorambucil-prednisolone combination with an azathioprine-prednisolone combination for treatment of chronic enteropathy with concurrent protein-losing enteropathy in dogs: 27 cases (2007–2010). *J Am Vet Med Assoc.* 15 juin 2013;242(12):1705-14.
237. Dave M, Loftus EV. Mucosal healing in inflammatory bowel disease—a true paradigm of success? *Gastroenterol Hepatol.* janv 2012;8(1):29-38.
238. Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, Present DH, Sutherland LR, Kamm MA, et al. An engineered human antibody to TNF (CDP571) for active Crohn’s disease: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Gastroenterology.* mai 2001;120(6):1330-8.
239. Danese S, Vuitton L, Peyrin-Biroulet L. Biologic agents for IBD: practical insights. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* sept 2015;12(9):537-45.
240. Hazlewood GS, Rezaie A, Borman M, Panaccione R, Ghosh S, Seow CH, et al. Comparative Effectiveness of Immunosuppressants and Biologics for Inducing and Maintaining Remission in Crohn’s Disease: A Network Meta-analysis. *Gastroenterology.* févr 2015;148(2):344-354.e5.
241. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn’s Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis.* janv 2017;11(1):3-25.
242. Rossi G, Pengo G, Caldin M, Palumbo Piccionello A, Steiner JM, Cohen ND, et al. Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One.* 2014;9(4):e94699.
243. Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukás M, Fixa B, Kascák M, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut.* nov 2004;53(11):1617-23.
244. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology.* mars 1990;98(3):694-702.
245. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology.* déc 1994;107(6):1643-52.
246. Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen T-E, Conklin LS, et al. Distinct Cytokine Patterns Identified from Multiplex Profiles of Murine DSS and TNBS-Induced Colitis: Inflamm Bowel Dis. mars 2009;15(3):341-52.
247. Johansson MEV, Gustafsson JK, Sjöberg KE, Petersson J, Holm L, Sjövall H, et al. Bacteria Penetrate the Inner Mucus Layer before Inflammation in the Dextran Sulfate Colitis Model. *Ernberg IT, éditeur. PLoS ONE.* 18 août 2010;5(8):e12238.
248. Cooper HS, Murthy S, Kido K, Yoshitake H, Flanigan A. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis.* 1 avr 2000;21(4):757-68.

249. Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. *Int Rev Immunol.* 2000;19(1):51-62.
250. Neurath MF. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med.* 1 nov 1995;182(5):1281-90.
251. Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* mars 2015;1(2):154-70.
252. Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity.* nov 2002;17(5):629-38.
253. Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone Colitis: A Murine Model of T Helper Cell Type 2 Colitis Treatable with Antibodies to Interleukin 4. *J Exp Med.* 16 nov 1998;188(10):1929-39.
254. Shiraki M, Aihara H, Kinouchi Y, Takahashi S, Oki M, Noguchi M, et al. IL-12 p40 prevents the development of chronic enterocolitis in IL-10-deficient mice. *Lab Invest.* nov 2004;84(11):1491-500.
255. Spencer DM, Veldman GM, Banerjee S, Willis J, Levine AD. Distinct inflammatory mechanisms mediate early versus late colitis in mice. *Gastroenterology.* janv 2002;122(1):94-105.
256. Hoshi N, Schenten D, Nish SA, Walther Z, Gagliani N, Flavell RA, et al. MyD88 signalling in colonic mononuclear phagocytes drives colitis in IL-10-deficient mice. *Nat Commun [Internet].* janv 2012 [cité 7 août 2019];3(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/ncomms2113>
257. Hugot J-P, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature.* févr 1996;379(6568):821-3.
258. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 31 mai 2001;411(6837):599-603.
259. Martínez A, del Carmen Martín M, Mendoza JL, Taxonera C, Díaz-Rubio M, de la Concha EG, et al. Association of the organic cation transporter OCTN genes with Crohn's disease in the Spanish population. *Eur J Hum Genet.* févr 2006;14(2):222-6.
260. Friedrichs F, Henckaerts L, Vermeire S, Kucharzik T, Seehafer T, Möller-Krull M, et al. The Crohn's disease susceptibility gene DLG5 as a member of the CARD interaction network. *J Mol Med.* avr 2008;86(4):423-32.
261. Ramon HE, Riling CR, Bradfield J, Yang B, Hakonarson H, Oliver PM. The ubiquitin ligase adaptor Ndfip1 regulates T cell-mediated gastrointestinal inflammation and inflammatory bowel disease susceptibility. *Mucosal Immunol.* mai 2011;4(3):314-24.
262. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene. *Science.* 1 déc 2006;314(5804):1461-3.
263. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med.* 6 juill 2009;206(7):1465-72.
264. Kathrani A, Lee H, White C, Catchpole B, Murphy A, German A, et al. Association between nucleotide oligomerisation domain two (Nod2) gene polymorphisms and canine inflammatory bowel disease. *Vet Immunol Immunopathol.* sept 2014;161(1-2):32-41.
265. Allenspach K, House A, Smith K, McNeill FM, Hendricks A, Elson-Riggins J, et al. Evaluation of mucosal bacteria and histopathology, clinical disease activity and expression of Toll-like receptors in German shepherd dogs with chronic enteropathies. *Vet Microbiol.* 15 déc 2010;146(3-4):326-35.

266. Peiravan A, Allenspach K, Boag AM, Soutter F, Holder A, Catchpole B, et al. Single nucleotide polymorphisms in major histocompatibility class II haplotypes are associated with potential resistance to inflammatory bowel disease in German shepherd dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* déc 2016;182:101-5.
267. Schwerbrock NMJ, Makkink MK, van der Sluis M, Büller HA, Einerhand AWC, Sartor RB, et al. Interleukin 10-Deficient Mice Exhibit Defective Colonic Muc2 Synthesis Before and After Induction of Colitis by Commensal Bacteria: *Inflamm Bowel Dis.* nov 2004;10(6):811-23.
268. Johansson MEV, Gustafsson JK, Holmén-Larsson J, Jabbar KS, Xia L, Xu H, et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut.* févr 2014;63(2):281-91.
269. Nakazawa M, Maeda S, Omori M, Kaji K, Yokoyama N, Nakagawa T, et al. Duodenal expression of antimicrobial peptides in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease and intestinal lymphoma. *Vet J.* juill 2019;249:47-52.
270. Wehkamp J. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal -defensin expression. *Gut.* 1 nov 2004;53(11):1658-64.
271. Lougaris V, Sorlini A, Monfredini C, Ingrassiotta G, Caravaggio A, Lorenzini T, et al. Clinical and Laboratory Features of 184 Italian Pediatric Patients Affected with Selective IgA Deficiency (SIgAD): a Longitudinal Single-Center Study. *J Clin Immunol* [Internet]. 25 mai 2019 [cité 4 juill 2019]; Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s10875-019-00647-y>
272. Lee A, Kathrani A, Priestnall SL, Smith K, Werling D, Allenspach K. Lack of Correlation between Mucosal Immunoglobulin A-positive Plasma Cell Numbers and TLR5 Genotypes in German Shepherd Dogs with Idiopathic Chronic Enteropathy. *J Comp Pathol.* févr 2015;152(2-3):201-5.
273. Breslin NP, Nash C, Hilsden RJ, Hershfield NB, Price LM, Meddings JB, et al. Intestinal permeability is increased in a proportion of spouses of patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* oct 2001;96(10):2934-8.
274. Schnoor M. E-cadherin Is Important for the Maintenance of Intestinal Epithelial Homeostasis Under Basal and Inflammatory Conditions. *Dig Dis Sci.* avr 2015;60(4):816-8.
275. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Efstathiou J, Valizadeh A, Noda M, Playford RJ, et al. Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease. *J Pathol.* août 1998;185(4):413-8.
276. Arend WP. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann Rheum Dis.* 1 nov 2000;59(90001):60i-64.
277. Maeda S, Ohno K, Nakamura K, Uchida K, Nakashima K, Fukushima K, et al. Increased expression of fractalkine and its receptor CX3CR1 in canine inflammatory bowel disease and their possible role in recruitment of intraepithelial lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 15 août 2012;148(3-4):226-35.
278. Kobayashi T, Okamoto S, Iwakami Y, Nakazawa A, Hisamatsu T, Chinen H, et al. Exclusive increase of CX3CR1+CD28-CD4+ T cells in inflammatory bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes: *Inflamm Bowel Dis.* juill 2007;13(7):837-46.
279. Liu T-C, Gurram B, Baldrige MT, Head R, Lam V, Luo C, et al. Paneth cell defects in Crohn's disease patients promote dysbiosis. *JCI Insight* [Internet]. 2 juin 2016 [cité 13 août 2019];1(8). Disponible sur: <https://insight.jci.org/articles/view/86907>
280. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature.* nov 2008;456(7219):259-63.
281. Kathrani A, Schmitz S, Priestnall SL, Smith KC, Werling D, Garden OA, et al. CD11c+

- Cells are Significantly Decreased in the Duodenum, Ileum and Colon of Dogs with Inflammatory Bowel Disease. *J Comp Pathol.* nov 2011;145(4):359-66.
282. Sawa S, Lochner M, Satoh-Takayama N, Dulauroy S, Bérard M, Kleinschek M, et al. ROR γ t⁺ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat Immunol.* avr 2011;12(4):320-6.
283. Takayama T, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Kitazume MT, Chang J, et al. Imbalance of NKp44⁺NKp46⁻ and NKp44⁻NKp46⁺ Natural Killer Cells in the Intestinal Mucosa of Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology.* sept 2010;139(3):882-892.e3.
284. McGovern D, Powrie F. The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut.* 1 oct 2007;56(10):1333-6.
285. Luckschander N, Hall JA, Gaschen F, Forster U, Wenzlow N, Hermann P, et al. Activation of nuclear factor- κ B in dogs with chronic enteropathies. *Vet Immunol Immunopathol.* 15 févr 2010;133(2-4):228-36.
286. Barko P c., McMichael M a., Swanson K s., Williams D a. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med.* 1 janv 2018;32(1):9-25.
287. MetaHIT Consortium, Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol.* août 2014;32(8):834-41.
288. Moreau MC, Ducluzeau R, Guy-Grand D, Muller MC. Increase in the population of duodenal immunoglobulin A plasmocytes in axenic mice associated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin. *Infect Immun.* août 1978;21(2):532-9.
289. Deng P, Swanson KS. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *Br J Nutr.* janv 2015;113(S1):S6-17.
290. Vázquez-Baeza Y, Hyde ER, Suchodolski JS, Knight R. Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nat Microbiol* [Internet]. déc 2016 [cité 16 avr 2019];1(12). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/nmicrobiol2016177>
291. Xenoulis PG, Palculict B, Allenspach K, Steiner JM, Van House AM, Suchodolski JS. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease: Small intestinal microbial communities in canine IBD. *FEMS Microbiol Ecol.* déc 2008;66(3):579-89.
292. Suchodolski JS, Xenoulis PG, Paddock CG, Steiner JM, Jergens AE. Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Vet Microbiol.* mai 2010;142(3-4):394-400.
293. Minamoto Y, Otoni CC, Steelman SM, Büyükleblebici O, Steiner JM, Jergens AE, et al. Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes.* 2015;6(1):33-47.
294. Suchodolski JS, Dowd SE, Wilke V, Steiner JM, Jergens AE. 16S rRNA Gene Pyrosequencing Reveals Bacterial Dysbiosis in the Duodenum of Dogs with Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE* [Internet]. 15 juin 2012 [cité 25 nov 2015];7(6). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3376104/>
295. Omori M, Maeda S, Igarashi H, Ohno K, Sakai K, Yonezawa T, et al. Fecal microbiome in dogs with inflammatory bowel disease and intestinal lymphoma. *J Vet Med Sci.* 6 oct 2017;
296. Kalenyak K, Isaiah A, Heilmann RM, Suchodolski JS, Burgener IA. Comparison of the intestinal mucosal microbiota in dogs diagnosed with idiopathic inflammatory bowel disease and dogs with food-responsive diarrhea before and after treatment. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. 1 févr 2018 [cité 16 avr 2019];94(2). Disponible sur: <https://academic.oup.com/femsec/article/doi/10.1093/femsec/fix173/4705888>
297. Suchodolski JS. Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic

- Inflammatory Bowel Disease. In: Highlander SK, Rodriguez-Valera F, White BA, éditeurs. *Encyclopedia of Metagenomics* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2015 [cité 16 avr 2019]. p. 183-6. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-7475-4_433
298. Guard BC, Barr JW, Reddivari L, Klemashevich C, Jayaraman A, Steiner JM, et al. Characterization of Microbial Dysbiosis and Metabolomic Changes in Dogs with Acute Diarrhea. *PLoS ONE* [Internet]. 22 mai 2015 [cité 25 nov 2015];10(5). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4441376/>
299. Dubinsky M, Braun J. Diagnostic and Prognostic Microbial Biomarkers in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. oct 2015;149(5):1265-1274.e3.
300. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux J-J, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci*. 28 oct 2008;105(43):16731-6.
301. Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet*. mars 2011;43(3):242-5.
302. Tong M, Li X, Wegener Parfrey L, Roth B, Ippoliti A, Wei B, et al. A Modular Organization of the Human Intestinal Mucosal Microbiota and Its Association with Inflammatory Bowel Disease. Mizoguchi E, éditeur. *PLoS ONE*. 19 nov 2013;8(11):e80702.
303. Zuo T, Ng SC. The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory Bowel Disease. *Front Microbiol* [Internet]. 25 sept 2018 [cité 16 avr 2019];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02247/full>
304. Foster ML, Dowd SE, Stephenson C, Steiner JM, Suchodolski JS. Characterization of the Fungal Microbiome (Mycobiome) in Fecal Samples from Dogs. *Vet Med Int*. 2013;2013:1-8.
305. Handl S, Dowd SE, Garcia-Mazcorro JF, Steiner JM, Suchodolski JS. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats: Fecal microbiota in dogs and cats using pyrosequencing. *FEMS Microbiol Ecol*. mai 2011;76(2):301-10.
306. Swanson KS, Dowd SE, Suchodolski JS, Middelbos IS, Vester BM, Barry KA, et al. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J*. avr 2011;5(4):639-49.
307. Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD, et al. The human gut virome: Inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res*. 1 oct 2011;21(10):1616-25.
308. Norman JM, Handley SA, Baldrige MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, et al. Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Cell*. janv 2015;160(3):447-60.
309. Iliev ID, Funari VA, Taylor KD, Nguyen Q, Reyes CN, Strom SP, et al. Interactions Between Commensal Fungi and the C-Type Lectin Receptor Dectin-1 Influence Colitis. *Science*. 8 juin 2012;336(6086):1314-7.
310. Honneffer JB. Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World J Gastroenterol*. 2014;20(44):16489.
311. Ursell LK, Haiser HJ, Van Treuren W, Garg N, Reddivari L, Vanamala J, et al. The Intestinal Metabolome: An Intersection Between Microbiota and Host. *Gastroenterology*. mai 2014;146(6):1470-6.
312. Duboc H, Rajca S, Rainteau D, Benarous D, Maubert M-A, Quervain E, et al. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut*. avr 2013;62(4):531-9.
313. Devkota S, Wang Y, Musch MW, Leone V, Fehlner-Peach H, Nadimpalli A, et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in *Il10*^{-/-} mice. *Nature*. juill

2012;487(7405):104-8.

314. Fusunyan RD, Nanthakumar NN, Baldeon ME, Walker WA. Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: toll-like receptors on fetal enterocytes. *Pediatr Res.* avr 2001;49(4):589-93.

315. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun.* déc 2000;68(12):7010-7.

316. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting Edge: Bacterial Flagellin Activates Basolaterally Expressed TLR5 to Induce Epithelial Proinflammatory Gene Expression. *J Immunol.* 15 août 2001;167(4):1882-5.

317. Lee J, Mo J-H, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu Y-T, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol.* déc 2006;8(12):1327-36.

318. Burgener IA, König A, Allenspach K, Sauter SN, Boisclair J, Doherr MG, et al. Upregulation of toll-like receptors in chronic enteropathies in dogs. *J Vet Intern Med Am Coll Vet Intern Med.* juin 2008;22(3):553-60.

319. Ishii M, Hashimoto M, Oguma K, Kano R, Moritomo T, Hasegawa A. Molecular cloning and tissue expression of canine Toll-like receptor 2 (TLR2). *Vet Immunol Immunopathol.* 15 mars 2006;110(1-2):87-95.

320. Schnyder M, A O, Mg D, N L, A Z, Ia B. Dysregulation of Toll-Like Receptors in Dogs with Chronic Enteropathies. *J Inflamm Bowel Dis Disord* [Internet]. 2018 [cité 24 sept 2019];03(01). Disponible sur: <https://www.omicsonline.org/open-access/dysregulation-of-tolllike-receptors-in-dogs-with-chronic-enteropathies-2476-1958-1000127-104708.html>

321. Batt RM, Barnes A, Rutgers HC, Carter SD. Relative IgA deficiency and small intestinal bacterial overgrowth in German shepherd dogs. *Res Vet Sci.* janv 1991;50(1):106-11.

322. Littler RM, Batt RM, Lloyd DH. Total and relative deficiency of gut mucosal IgA in German shepherd dogs demonstrated by faecal analysis. *Vet Rec.* 11 mars 2006;158(10):334-41.

323. Soontarak S, Chow L, Johnson V, Coy J, Webb C, Wennogle S, et al. Humoral immune responses against gut bacteria in dogs with inflammatory bowel disease. *Jacobs J, éditeur. PLOS ONE.* 1 août 2019;14(8):e0220522.

324. Equilino M, Théodoloz V, Gorgas D, Doherr MG, Heilmann RM, Suchodolski JS, et al. Evaluation of serum biochemical marker concentrations and survival time in dogs with protein-losing enteropathy. *J Am Vet Med Assoc.* janv 2015;246(1):91-9.

325. Maeda S, Ohno K, Uchida K, Nakashima K, Fukushima K, Tsukamoto A, et al. Decreased Immunoglobulin A Concentrations in Feces, Duodenum, and Peripheral Blood Mononuclear Cells of Dogs with Inflammatory Bowel Disease. *J Vet Intern Med.* janv 2013;27(1):47-55.

326. Mokrowiecka A, Daniel P, Słomka M, Majak P, Malecka-Panas E. Clinical utility of serological markers in inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology.* févr 2009;56(89):162-6.

327. Luckschander N, Allenspach K, Hall J, Seibold F, Gröne A, Doherr MG, et al. Perinuclear Antineutrophilic Cytoplasmic Antibody and Response to Treatment in Diarrheic Dogs with Food Responsive Disease or Inflammatory Bowel Disease. *J Vet Intern Med.* 2006;20(2):221.

328. Mancho C, Sainz Á, García-Sancho M, Villaescusa A, Rodríguez-Franco F. Evaluation of perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibodies in sera from dogs with inflammatory bowel disease or intestinal lymphoma. *Am J Vet Res.* oct 2011;72(10):1333-7.

329. Karagianni AE, Solano-Gallego L, Breitschwerdt EB, Gaschen FP, Day MJ, Trotta M, et al. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in dogs infected with various vector-borne

- pathogens and in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *Am J Vet Res.* sept 2012;73(9):1403-9.
330. Allenspach K, Luckschander N, Styner M, Seibold F, Doherr M, Aeschbach D, et al. Evaluation of assays for perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibodies and antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in dogs with inflammatory bowel disease. *Am J Vet Res.* sept 2004;65(9):1279-83.
331. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR, et al. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest.* 1 mai 2004;113(9):1296-306.
332. Plevy S, Silverberg MS, Lockton S, Stockfish T, Croner L, Stachelski J, et al. Combined Serological, Genetic, and Inflammatory Markers Differentiate Non-IBD, Crohn's Disease, and Ulcerative Colitis Patients: *Inflamm Bowel Dis.* mai 2013;19(6):1139-48.
333. Figueiredo MM, Amorim IF, Pinto AJ, Barbosa VS, de Jesus Pinheiro L, Deoti B, et al. Expression of Toll-like receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with *Leishmania infantum*. *BMC Immunol.* 2013;14(1):22.
334. Swerdlow MP, Kennedy DR, Kennedy JS, Washabau RJ, Henthorn PS, Moore PF, et al. Expression and function of TLR2, TLR4, and Nod2 in primary canine colonic epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* déc 2006;114(3-4):313-9.
335. Chandra L, Borchering DC, Kingsbury D, Atherly T, Ambrosini YM, Bourgois-Mochel A, et al. Derivation of adult canine intestinal organoids for translational research in gastroenterology. *BMC Biol* [Internet]. déc 2019 [cité 15 nov 2019];17(1). Disponible sur: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-019-0652-6>
336. Hanifeh M, Rajamäki MM, Mäkitalo L, Syrjä P, Sankari S, Kilpinen S, et al. Identification of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Activities within Intestinal Mucosa of Clinically Healthy Beagle Dogs. *J Vet Med Sci.* 2014;76(8):1079-85.
337. Moreira ML, Costa-Pereira C, Alves MLR, Marteleto BH, Ribeiro VM, Peruhype-Magalhães V, et al. Vaccination against canine leishmaniasis increases the phagocytic activity, nitric oxide production and expression of cell activation/migration molecules in neutrophils and monocytes. *Vet Parasitol.* avr 2016;220:33-45.
338. Reineking W, Junginger J, Mischke R, Hewicker-Trautwein M. Canine primary jejunal and colonic epithelial cells predominantly express TLR5 and TLR9 but do not change TLR expression pattern after stimulation with certain Toll-like receptor ligands. *Vet Immunol Immunopathol.* déc 2018;206:16-24.
339. Boozer LB, Davis TW, Borst LB, Zseltvay KM, Olby NJ, Mariani CL. Characterization of immune cell infiltration into canine intracranial meningiomas. *Vet Pathol.* sept 2012;49(5):784-95.

ANNEXES

Annexe 1 : Validation éthique du protocole d'étude clinique.



Oniris' ethics committee for
clinical and epidemiological veterinary research
Atlanpole- La Chantrerie
44307 Nantes Cedex 03
FRANCE
e-mail: secretariat.cervo@oniris-nantes.fr
Tel: +33-240687718

Nantes, January 30th 2017

To Mr Juan HERNANDEZ and Mrs Blandine LIEUBEAU,
Unité de Recherche IECM - Oniris

Dear investigators,

Thank you for having submitted your project entitled "Rôle des récepteurs TLRs dans les entéropathies inflammatoires chroniques idiopathiques du chien" to the Oniris' Ethics Committee for clinical and epidemiological Veterinary Research (CERVO).

Your submission was reviewed during the Committee meeting held on 09-14-2016.

Considering submitted documents, the way animal welfare was taken into account and answers given to questions from our experts, I am pleased to inform you that CERVO members approved your protocol. Your approval number is CERVO-2016-13-V.

If your need to modify the protocol in any way, (i.e. change in clinical procedure, change in the number of subjects, extension of time...) an amendment will have to be submitted to the CERVO before implementation of any change.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Solenn Kerloch".

Solenn Kerloch
Chair of the CERVO

Annexe 2 : Formulaire de consentement éclairé signé par les propriétaires des chiens.

CERVO- Annexe 2- Modèle de lettre de consentement éclairé – Juin 2016

La lettre de consentement éclairé est à joindre à la lettre d'information et devrait *a minima* comporter les mentions suivantes :

« Je, soussigné (Nom Prénom), demeurant
..... (Adresse) à (Localité) reconnaît avoir été informé(e) par le Dr
..... (Nom Prénom) de l'intégralité des procédures mises en jeu lors de
l'étude clinique *MICI chez le chien* dans lequel j'accepte librement que mon animal
..... (Nom), (type et numéro
d'identification), (espèce), de race et âgé de
..... an(s), soit inclus.

J'atteste avoir compris les bénéfices attendus et les risques potentiels (*cf* tableau au verso de cette page) liés à la mise en œuvre de cette étude et qui l'ont été clairement énoncés par le Dr
..... (Nom Prénom).

J'ai noté que la participation à l'étude clinique n'occasionne aucun frais supplémentaire à ma charge et qu'elle ne s'accompagne pas non plus d'une rémunération associée.

J'ai été prévenu(e) que j'ai le droit à tout moment et pour quelle que raison que ce soit de retirer mon animal de l'étude.

J'autorise les équipes de recherche d'Oniris et/ou leurs partenaires à utiliser les données et les prélèvements de mon animal de manière anonyme dans le but d'améliorer l'état des connaissances scientifiques et techniques sur le sujet. Je consens cependant à la levée de l'anonymat si celle-ci est demandée par les autorités publiques.

Je déclare avoir eu de la part du Dr (Nom Prénom) toutes les réponses à mes questions.

Fait à
le 20..

Signature du propriétaire
ou détenteur de l'animal

Etude clinique : *MICI chez le chien*
Investigateur Principal : *Juan Hernandez*

Bénéfices attendus	Contraintes éventuelles
<ul style="list-style-type: none">• Amélioration des connaissances scientifiques sur les Maladies Inflammatoires Intestinales du chien et, par extension, de l'humain• Vers la découverte de nouveaux tests diagnostiques plus simples des Maladies Inflammatoires Intestinales• Vers la découverte de nouveaux axes de traitement des Maladies Inflammatoires Intestinales	<ul style="list-style-type: none">• Faire don d'une partie du sang prélevé pour analyses• Autoriser la réalisation de 4 biopsies endoscopiques supplémentaires lors de l'exploration• Autoriser la réalisation d'un prélèvement de salive pendant l'anesthésie

Fait à,
le 20..

Signature de l'investigateur
principal ou son mandataire

Signature du propriétaire
ou détenteur de l'animal

Titre : Expression des récepteurs Toll-Like dans la muqueuse intestinale et évaluation de l'immunoréactivité antimicrobienne chez les chiens atteints de Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

Mots clés : TLR, Chien, MICI, Immunohistochimie, Entéropathie chronique, Anticorps, Biomarqueur

Résumé : Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) sont fréquentes chez le chien. Leur origine n'est pas connue mais une réaction immunitaire inadaptée est suspectée. Cinquante chiens atteints d'entéropathie chronique (4 répondants au changement alimentaire, 5 répondants au métronidazole, 27 MICI et 14 entéropathies avec pertes de protéines-PLE) ont été recrutés. Le score d'activité clinique CCECAI est significativement plus élevé dans le groupe PLE par rapport aux autres types d'entéropathies. L'analyse histologique et immunohistochimique conduite sur 22 chiens atteints de MICI et 14 chiens témoins a montré une différence significative entre les 2 groupes du score histologique global à l'étage colique alors qu'aucune différence n'est observée à l'étage duodénal et iléal. Le nombre de lymphocytes CD3+ est significativement plus faible dans la muqueuse iléale et colique du

groupe MICI par rapport aux témoins. MCP-1 et CXCL1 sont significativement plus élevés, respectivement dans l'iléon et le côlon des malades par rapport aux témoins. La mesure des IgA pariétales montre une quantité moindre dans le duodénum des chiens malades par rapport aux témoins. L'expression protéique des TLR2, 4, 5 et 9 évaluée par immunohistochimie ne montre pas de différence entre les 2 groupes. L'analyse sérologique montre une augmentation significative des quantités d'IgG anti-flagelline et anti-LPS dans le groupe malade par rapport aux témoins. Nos résultats remettent en question la nosographie actuelle des entéropathies chroniques canines et placent la réaction immunitaire humorale dirigée contre des éléments du microbiote au cœur du processus physiopathologique. Ces données ouvrent la porte au développement de nouveaux marqueurs sanguins.

Title: Expression of Toll-Like receptors in the intestinal mucosa and evaluation of the antimicrobial immunoreactivity in dogs with Inflammatory Bowel Disease

Keywords: TLR, Dog, IBD, Immunohistochemistry, Chronic enteropathy, Antibodies, Biomarker

Abstract : Inflammatory Bowel Diseases (IBD) are common in dogs. Their origin is unknown, but an inappropriate immune response is suspected. We recruited 50 dogs with chronic enteropathy (4 Food Responsive Enteropathies, 5 Antibiotic Responsive Enteropathies, 27 IBD and 14 protein losing enteropathies-PLE). The CCECAI clinical activity score was significantly higher in the PLE group compared to other types of enteropathies. The histological and immunohistochemical analysis carried out on 22 dogs with IBD and 14 control dogs showed a significant difference in the overall histological score in the colon while no difference was observed in the duodenum and the ileum. The number of CD3+ lymphocytes was significantly lower in the ileal and colonic mucosa of the IBD group compared to control

group. MCP-1 and CXCL1 were significantly higher, respectively in the ileum and colon of sick dogs compared to control dogs. The measurement of the parietal IgA showed a lower amount in the duodenum of IBD dogs than in control dogs. The protein expression of TLR2, 4, 5 and 9 evaluated by immunohistochemistry did not show any difference between both groups. Serological analysis showed a significant increase in the amounts of anti-flagellin and anti-LPS IgG in the sick group compared to control group. Our results challenge the current nosography of chronic canine enteropathies and place the humoral immune response directed against the microbiota at the heart of the pathophysiological process. These data open the door to the development of new blood markers.