



HAL
open science

Régulation de la réponse inflammatoire intestinale par la fumée de cigarette : caractérisation des mécanismes cellulaires et moléculaires chez la souris

Muriel Montbarbon

► To cite this version:

Muriel Montbarbon. Régulation de la réponse inflammatoire intestinale par la fumée de cigarette : caractérisation des mécanismes cellulaires et moléculaires chez la souris. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. NNT : 2013LIL2S003 . tel-00951219

HAL Id: tel-00951219

<https://theses.hal.science/tel-00951219>

Submitted on 24 Feb 2014

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

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

Université Droit et Santé

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE II
Discipline: immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Muriel MONTBARBON

Le 08 mars 2013

**Régulation de la réponse inflammatoire
intestinale par la fumée de cigarette :
caractérisation des mécanismes cellulaires et
moléculaires chez la souris**

Thèse dirigée par le Pr. Sébastien DHARANCY et le Dr. Benjamin BERTIN

Membres du jury

Pr. Jean-Marie REIMUND

Pr. Philippe NAQUET

Dr. Harry SOKOL

Dr. Philippe GOSSET

Pr. Antoine CORTOT

Dr. Benjamin BERTIN

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Thèse préparée au sein du laboratoire dirigé par le Pr. Pierre Desreumaux :

Inflammation : Mécanismes de Régulation et Interactions avec la Nutrition et les Candidoses

Équipe : Maladies inflammatoires digestives : physiopathologie et développement de cibles thérapeutiques

Inserm U995 - Université Lille Nord de France

*Rien ne vaut la recherche lorsqu'on veut trouver quelque chose (...).
Quand on cherche, on trouve généralement quelque chose, mais ce n'est pas
toujours exactement ce qu'on voulait.*

J. R. R. Tolkien

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Pierre DESREUMAUX de m'avoir accueillie au sein de l'Unité 995, de m'avoir intégrée à son équipe et confié ce projet de recherche.

J'adresse mes sincères remerciements au Dr. Benjamin BERTIN pour m'avoir guidée et conseillée tout au long de ce travail. Merci de m'avoir permis de faire cette thèse, et de la confiance que tu m'as accordée. Merci également au Pr. Sébastien DHARANCY d'avoir été présent dans les moments clés de ce travail.

J'adresse des remerciements tout aussi sincères au Dr. Muriel PICHAVANT et au Dr. Philippe GOSSET, des collaborateurs hors-pairs. Merci de votre soutien sans faille.

Je tiens également à remercier très chaleureusement mes 3 compères : François MAGGIOTTO, Edmone ERDUAL et Dr. Noura EL JAMAL (dans le désordre et sans préférence ;oP). Sans vous, le quotidien de ma thèse aurait été pour le moins différent ! Merci pour votre soutien, votre aide, votre gentillesse, votre bonne humeur et pour tout en fait !

Merci enfin à tous les membres de l'équipe qui m'ont accueillie durant ces quelques années. Je vous remercie pour les conseils et les réponses que vous m'avez apportés.

Je remercie tous ceux et celles, amis ou collègues (de ce labo ou d'un autre) qui m'ont aidée, lors de ces années bien particulières, à progresser, à garder la tête haute ou encore simplement à garder le sourire contre vents et marées.

Un très "special thanks" à ma SOPHIE ! Je crois qu'on peut vraiment dire que tu as vécu tout ça avec moi et en 1^{ère} ligne. Je partage donc mon mérite avec toi et te décerne un Doctorat en amitié =D. Tu as été mon ancre, mon compas, mon radeau et ma corne de brume ...! Je ne vais pas en faire un paragraphe de 20 lignes, mais tu sais que je n'en pense pas moins ^^.

Il va sans dire que je remercie de manière incomparable mes parents pour leur soutien intemporel. Les valeurs qu'ils m'ont transmises et la force et la persévérance que j'ai hérité de ma mère ont à coup sûr été la clé qui a permis l'aboutissement de ce travail.

Pour finir, je voudrais dédicacer cette thèse à mon grand-père, le Dr. BOZZI. J'aurais aimé que tu sois là pour voir ça, j'aurais aimé voir la fierté briller dans tes yeux. Tu as toujours été un modèle d'excellence et de réussite pour moi.

Curriculum Vitae

PROJETS DE RECHERCHE

Régulation de la réponse inflammatoire intestinale par la fumée de cigarette : caractérisation des mécanismes cellulaires et moléculaires chez la souris

Responsable de projet - Inserm U995 (2010-2012)

Étude structurale et fonctionnelle de Pf 13 dans le contrôle de la protéine phosphatase de type 1 chez *P. falciparum*

Responsable de projet - CILL/Inserm U1019/UMR 8204 (2007-2010)

Implication du gène MIF dans l'interaction *Biomphalaria glabrata* / *Schistosoma mansoni*

Assistante ingénieur - stage - Inserm U547 (2007)

Séquençage et génotypage de gènes potentiellement impliqués dans le diabète néo-natal.

Technicienne - stage - Institut de Biologie de Lille/UMR 8090 (2005)

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

2011-2012 : ATER en parasitologie, hématologie, immunologie
faculté de pharmacie, Université Lille 2

2008-2011 : Monitorat en biologie moléculaire, immunologie, bactériologie
faculté de pharmacie, Université Lille 2

2004 : CDD de technicienne (6 semaines)
laboratoire d'analyses Vermeulen

CURSUS UNIVERSITAIRE

2008 - 2012 : Doctorat en Biologie et Santé	<i>soutenance en Mars</i>	Université Lille 2
2007 - 2008 : Master 2 Recherche Biologie et Santé	mention TB	Université Lille 2
2004 - 2007 : IUP génomique et protéomique (M1)	mention AB	USTL (Lille)
2002 - 2004 : DUT génie biologique (option ABB)	mention AB	IUT de Toulon/Var

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Communication orale. Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive 2012, Paris

Récompensée du prix "jeune-chercheur"

Le tabac contrôle la réponse inflammatoire intestinale via l'activation des lymphocytes NKT au cours de la colite expérimentale murine. M. Montbarbon, M. Pichavant, A. Langlois, E. Erdual, S. Dharancy, L. Dubuquoy, F. Trottein, P. Desreumaux, P. Gosset, B. Bertin.

Poster. 7th Congress of ECCO - Inflammatory Bowel Diseases 2012, Barcelona, Spain

Cigarette smoke improves colonic inflammation through NKT cells activation in mice. M. Montbarbon, M. Pichavant, A. Langlois, E. Erdual, S. Dharancy, L. Dubuquoy, F. Trottein, P. Desreumaux, P. Gosset, B. Bertin.

Poster. Digestive Disease Week 2012, San Diego, California, USA

Cigarette smoke improves selectively colon and not small bowel inflammation through NKT cell activation. M. Montbarbon, M. Pichavant, A. Langlois, E. Erdual, S. Dharancy, L. Dubuquoy, F. Trottein, P. Desreumaux, P. Gosset, B. Bertin.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

***Plasmodium falciparum* Inhibitor 3 homolog increases protein phosphatase type 1 activity and is essential for parasitic survival.** Freville A, Landrieu I, Garcia-Gimeno MA, Vicogne J, Montbarbon M, Bertin B, Verger A, Kalamou H, Sanz P, Werkmeister E, Pierrot C, Khalife J - J Biol Chem. 2012 Jan 6;287(2):1306-21.

Colonic inflammation in mice is improved by cigarette smoke through iNKT cell recruitment. M. Montbarbon, M. Pichavant, A. Langlois, E. Erdual, F. Maggiotto, C. Neut, T. Mallevaey, S. Dharancy, L. Dubuquoy, F. Trottein, A. Cortot, P. Desreumaux, P. Gosset, B. Bertin – Plos One – *in revision*

ENSEIGNEMENTS

ATER – Faculté de pharmacie (Univ. Lille 2)

2011-2012 :	TP de parasitologie	4° année	63h
	TP d'hématologie	2° année	30h

Monitorat – Faculté de pharmacie (Univ. Lille 2)

2008-2009 :	TP de bactériologie	3° année	48h
	TP de biologie moléculaire	2° année	48h
2009-2010 :	TP de biologie moléculaire	2° année	48h
	TP d'immunologie	3° année	36h
2010-2011 :	TP de biologie moléculaire	2° année	64h

ENCADREMENT DE STAGIAIRES

2011 :	Elodie Dejardin	Stage de fin d'étude de 10 semaines	I.U.T. Biologie 2° année
2011 :	Cécile Bera	Stage d'initiation à la recherche de 4 semaines	M1 biologie santé
2010 :	Maximilien Lefebvre	Stage d'initiation à la recherche de 4 semaines	M1 biologie santé

COMPETENCES TECHNIQUES

Biologie moléculaire : RT-qPCR, clonage, mutagenèse dirigée, PCR, ARN interférence

Biologie cellulaire : culture de lignées cellulaires, de levures, de bactéries et de parasites (*P. Falciparum*), transfections cellulaires

Protéomique : production de protéines recombinantes (bactéries), SDS Page, test d'activité phosphatase, GST pull-down

Expérimentation en manipulation sur animaux vivants (habilitation niveau 1) : contention, injections (i.p., s.c.), gavages

Immunologie : western blot, ELISA, cytométrie de flux (notions de base)

I. Introduction	1
1. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)	1
1.1. Description	1
1.1.1. <i>La maladie de Crohn (MC)</i>	1
1.1.2. <i>La rectocolite hémorragique (RCH)</i>	1
1.1.3. <i>Symptomatologie</i>	2
1.2. Épidémiologie descriptive	3
1.3. Épidémiologie analytique	4
1.3.1. <i>Facteurs génétiques</i>	4
1.3.2. <i>Facteurs microbiens</i>	6
1.3.3. <i>Facteurs environnementaux</i>	7
2. Physiopathologie des MICI	9
2.1. Inflammation et réponse immune	9
2.1.1. <i>La réponse innée</i>	9
2.1.2. <i>La réponse adaptative</i>	10
2.2. Perturbation de la barrière intestinale dans les MICI	11
2.2.1. <i>Perturbation de la barrière immunologique</i>	11
2.2.2. <i>Perturbation de la barrière physique</i>	14
2.3. Les modèles de colite expérimentale	16
2.3.1. <i>Modèles d'inflammation spontanée</i>	17
2.3.2. <i>Modèles génétiques</i>	17
2.3.3. <i>Modèles de colite chimio-induite</i>	17
3. Tabac et réponse immunitaire	19
3.1. Effet du tabac sur la réponse immunitaire	19
3.1.1. <i>Effet sur la réponse innée</i>	20
3.1.2. <i>Effet sur la réponse adaptative</i>	21
3.1.3. <i>Conclusion</i>	22
3.2. Tabac et MICI	23
3.2.1. <i>Tabac et MC</i>	23
3.2.2. <i>Tabac et RCH</i>	26
3.3. Les mécanismes à l'origine des effets ambivalents du tabac dans les MICI	29
3.3.1. <i>Effet du tabac sur l'inflammation intestinale chez les patients atteints de MICI</i>	30
3.3.2. <i>Effet du tabac sur l'inflammation intestinale dans les modèles animaux</i>	30
3.3.3. <i>Effet du tabac sur la flore intestinale dans les modèles animaux</i>	38
4. Les cellules NKT	40
4.1. Description	40
4.2. Classification	40
4.2.1. <i>Cellules NKT de Type I ou iNKT</i>	41
4.2.2. <i>Cellules NKT de Type II ou vNKT</i>	43
4.2.3. <i>Cellules NKT-like</i>	43

4.3. Distribution et homéostasie	44
4.3.1. Localisation	44
4.3.2. Ontogénie des cellules iNKT	45
4.4. Activation des cellules iNKT	48
4.4.1. La molécule CD1d	48
4.4.2. Les ligands reconnus par les cellules iNKT	49
4.4.3. Mécanisme d'activation	52
4.4.4. Facteur modulant l'activation	53
4.4.5. Cinétique d'activation	54
4.5. Fonctions biologiques des cellules iNKT	55
4.5.1. Propriétés cytotoxiques	56
4.5.2. Production cytokinique	56
4.5.3. Partenaires cellulaires	57
4.6. NKT et pathologies	58
4.7. Les cellules NKT dans l'intestin	59
4.7.1. Expression de CD1d	60
4.7.2. Fonction des iNKT dans l'intestin	61
4.8. NKT et MICI	64
4.8.1. Rôle des NKT dans les modèles animaux de colite	64
4.8.2. Rôle des NKT dans les MICI	65
II. Hypothèses de travail & but du projet de recherche	68
III. Résultats	69
1. Effets de la fumée de cigarette sur l'inflammation colique	69
1.1. Résumé des résultats présentés dans l'article	69
1.2. Manuscrit de l'article en révision à Plos One	70
Abstract	71
Introduction	72
Material and methods	74
Results	76
Discussion	85
References	89
Supplementary data	91
1.3. Résultats complémentaires	94
1.3.1. Transfert de cellules iNKT dans les souris $J\alpha 18^{-/-}$	94
1.3.2. Mécanismes moléculaires associés à la protection induite par les cellules iNKT	96
1.3.3. Analyse bactériologique du côlon	98
2. Effets de la fumée de cigarette sur l'inflammation iléale	101
2.1. Effet de la fumée de cigarette sur l'inflammation induite par l'indométacine	101

2.1.1. Matériel & Méthodes	101
2.1.2. Résultats	102
2.2. Implication des cellules iNKT dans l'inflammation de l'intestin grêle	104
2.2.1. Matériel & Méthodes	104
2.2.2. Résultats	105
2.3. Impact de l'exposition à la fumée de cigarette sur les populations leucocytaires	107
2.3.1. Matériel & Méthodes	107
2.3.2. Résultats	107
IV. Discussion	109
1. Effet du tabac sur le côlon	109
2. Effet du tabac sur les cellules immunitaires dans le côlon	111
3. Effet du tabac sur les cellules iNKT et rôle de ces cellules	111
3.1. Mécanismes à l'origine de la réponse des cellules iNKT	113
3.2. Mécanismes à l'origine de la régulation de la réponse immune	115
4. Effet comparé du tabac sur l'iléon et sur le colon	116
V. Conclusion - perspectives	118
VI. Références	119
Abréviations	139

I. Introduction

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

1.1. Description

Les MICI (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin) désignent une inflammation chronique de l'intestin grêle ou du gros intestin. Ces maladies provoquent des manifestations cliniques diverses et leur évolution est généralement chronique et récidivante, alternant les phases de rémissions et les phases de poussées aiguës. Bien que l'étiologie exacte de ces maladies reste inconnue, l'hypothèse la plus communément admise les décrit comme des maladies complexes liées à une anomalie de régulation de la réponse muqueuse chez des individus génétiquement prédisposés sous l'influence de facteurs environnementaux (Sartor, R.B., 1995).

Les formes majoritaires de MICI sont la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Ces deux formes présentent des distinctions anatomiques et pathologiques importantes en particulier concernant l'étendue et la profondeur des lésions.

1.1.1. La maladie de Crohn (MC)

La MC touche l'ensemble du tractus digestif de la bouche à l'anus bien que l'inflammation soit principalement localisée au niveau du côlon et de l'iléon. Plus rarement (4% des cas) une inflammation de l'œsophage et de l'estomac est observée chez les patients.

En fonction des localisations de l'inflammation, 3 grandes classes de MC sont caractérisées, avec une prévalence différente : dans 28% des cas, l'inflammation se localise au niveau de l'iléon (Crohn iléal), dans 47% des cas elle atteint l'iléon terminal et le gros intestin (MC iléo-colique) et dans 21% des cas elle ne touche que le gros intestin (Crohn colique) (Baumgart, D.C. *et al.*, 2007).

Les lésions de la MC sont discontinues, caractérisées par une alternance de parois saines et de parois lésées. Ces lésions sont profondes, dites transmursales, et touchent les différentes couches de la paroi digestive, de la muqueuse à la séreuse. Cette inflammation transmurale est associée au développement d'agrégats lymphoïdes et de granulomes. La muqueuse présente un aspect friable et érythémateux, avec une perte de vascularisation et une hyperplasie lymphoïde dans l'iléon terminal. Des ulcérations et des abcès peuvent être observés au niveau du côlon (Cf. Figure 1). L'inflammation aboutit à un épaississement de la paroi épithéliale et a pour conséquence une diminution de la lumière intestinale (sténose). Elle peut s'étendre aux tissus avoisinants formant ainsi des fistules faisant communiquer deux ou plusieurs organes de voisinage ou à la peau aboutissant alors à une fistule entéro-cutanée. L'inflammation dans la MC est caractérisée par la production prédominante de cytokines de type Th1/Th17 comme l'IFN- γ , l'IL-12 et l'IL-17 (Baumgart, D.C. *et al.*, 2007; Cosnes, J. *et al.*, 2011; Strober, W. *et al.*, 2011).

1.1.2. La rectocolite hémorragique (RCH)

La RCH se caractérise par une inflammation limitée au recto-côlon permettant de définir 3 types de RCH en fonction de l'extension : la pancolite qui correspond à une atteinte de la muqueuse de la totalité du côlon, la rectocolite gauche où l'inflammation ne dépasse pas

l'angle colique gauche et la recto-sigmoïdite qui atteint le rectum et le côlon sigmoïde (Baumgart, D.C. *et al.*, 2007).

L'inflammation au cours de la RCH est continue, superficielle et restreinte à la muqueuse et à la sous muqueuse. Elle est localisée du rectum vers le côlon droit. Elle comprend souvent des abcès cryptiques caractérisés par une infiltration abondante de neutrophiles et de monocytes qui limitent le renouvellement des cellules souches épithéliales. Le côlon atteint est faiblement vascularisé et peut présenter des ulcérations, des pseudo-polypes et des hémorragies (Cf. Figure 1). Entre les poussées, la muqueuse reprend un aspect presque normal, néanmoins marqué par une « trop bonne » visualisation du liseré vasculaire sous-muqueux et la persistance d'une fragilité avec saignement au contact. À la différence de la MC, l'inflammation au cours de la RCH est caractérisée par une production de cytokines de type Th2 comme l'IL-13, l'IL-4 et l'IL-5 (Baumgart, D.C. *et al.*, 2007; Cosnes, J. *et al.*, 2011; Strober, W. *et al.*, 2011).

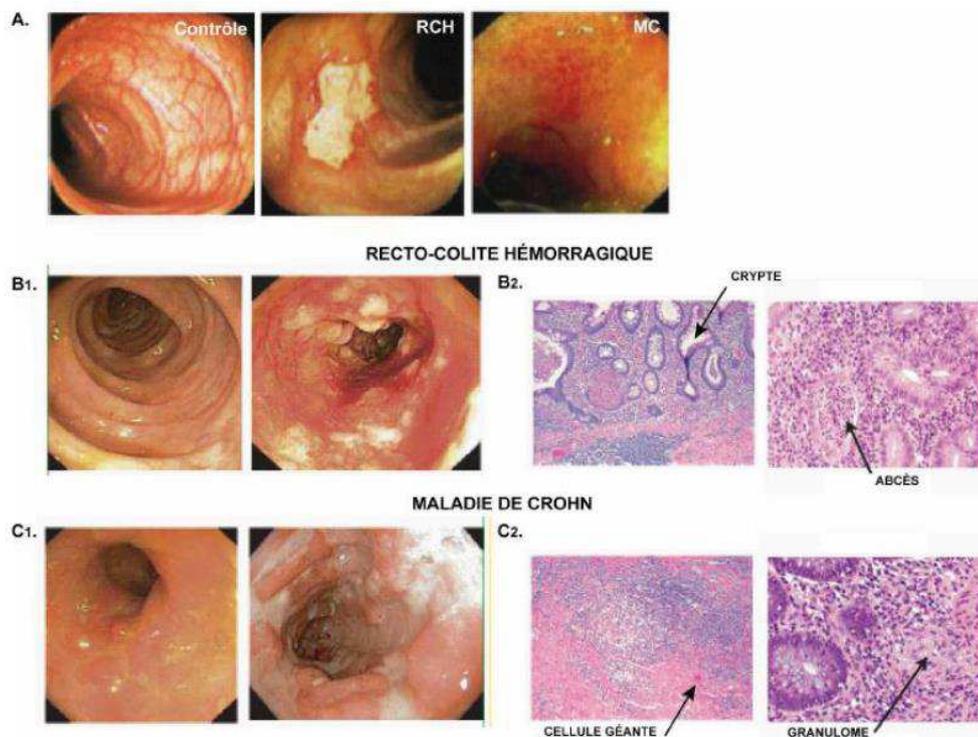


FIGURE 1 : Caractéristiques anatomo-pathologiques des MICI

L'examen endoscopique révèle des atteintes de la muqueuse colique chez les patients (A), caractérisées par une des ulcérations et des polypes dans la RCH (B1) et par un amincissement de la muqueuse et des hyperplasies dans la MC (C1). La coloration des biopsies par hématoxyline-éosine montre une désorganisation de la muqueuse et la présence d'abcès dans la RCH (B2) ainsi que des granulomes dans la MC (C2). Adapté de Xavier, R.J. *et al.*, 2007 et Baumgart, D.C. *et al.*, 2007.

1.1.3. Symptomatologie

Les symptômes cliniques des MICI sont liés à l'inflammation intestinale, les plus fréquents étant les douleurs abdominales et la diarrhée. En plus des manifestations digestives, des manifestations extra-digestives non spécifiques (articulaires, cutanées, oculaires ou muqueuses) sont également souvent présentes.

Manifestations intestinales

Le tableau clinique est dominé par des douleurs abdominales et de la diarrhée, souvent sanglante en cas de RCH. Le diagnostic différentiel entre la MC et la RCH s'établit sur les signes cliniques, anatomopathologiques et endoscopiques (Cf. Figure 2).

	RCH	MC
Site	Côlon et rectum	Intestin grêle et côlon
Distribution	Continue	Segmentée
Surface muqueuse	Granuleuse, ulcères superficiels	Pavée, aphteuse, ulcères profonds
Inflammation	Muqueuse, circonférentielle	Transmurale, excentrée
Pseudo-polypes	Communs	Peu communs
Épaississement de la paroi intestinale	Modérée	Généralement importante
Implication de la graisse méésentérique	Rare	Commune
Raccourcissement du côlon	Oui (hypertrophie musculaire)	Oui (fibrose)
Rétrécissements (sténoses)	Peu communs	Communs
Atteintes péri-anales	Rares	Communes
Fistules	Rares	Communes
Abcès	Rares	Communs
Récurrence après chirurgie	Rare	Commune
Lésions orales	Rares	Communes
Risque de cancer	Modéré	Faible

Figure 2 : Différences pathologiques et endoscopiques entre la RCH et la MC

D'après Roberts-Thomson, I.C. *et al.*, 2011.

Manifestations extra-intestinales

Elles touchent entre 21 et 40% des patients atteints de MICI (Danese, S. *et al.*, 2005) et peuvent être ostéo-articulaires (arthrites inflammatoires aiguës ou chroniques, arthralgies) (Evans, P.E. *et al.*, 2007), cutanéomuqueuses (aphtes buccaux, érythème noueux, *Pyoderma gangrenosum*) (Evans, P.E. *et al.*, 2007), oculaires (uvéites) (Evans, P.E. *et al.*, 2007), hépatobiliaires, (cholangite sclérosante primitive presque toujours associée à une RCH) (Sano, H. *et al.*, 2011) ou pulmonaires (alvéolite, atteintes parenchymateuses) (Black, H. *et al.*, 2007).

1.2. Épidémiologie descriptive

Les MICI sont plus fréquentes dans les pays du Nord (Europe et Amérique du Nord) et les pays industrialisés malgré une augmentation dans le reste du monde. Une revue systématique des données de 167 études en population générale en Europe (1930-2008) 52 en Asie et au Moyen Orient (1950-2008) et 27 en Amérique du Nord (1920-2004), a permis les conclusions suivantes : les incidences annuelles les plus hautes pour la RCH sont estimées à 24,3/100 000 habitants en Europe, à 6,3 en Asie et au Moyen Orient et à 19,2 en Amérique du Nord, alors que pour la MC elles sont estimées à 12,7, 5,0 et 20,2 respectivement. Les prévalences les plus élevées mesurées sont de 505 en Europe pour la RCH et 322 pour la MC et de 249 pour la RCH et 319 pour la MC en Amérique du Nord (Molodecky, N.A. *et al.*, 2012).

Les taux d'incidence et de prévalence varient également selon un gradient nord/sud similaire en fonction des régions au sein des zones géographiques étudiées. En Europe, par exemple, l'incidence annuelle varie de 0,6 à 24,3 / 100 000 pour la RCH et de 0,3 à 12,7 / 100

000 pour la MC et la prévalence varie de 4,9 à 505 / 100 000 pour la RCH et de 0,6 à 322 / 100 000 pour la MC (compte tenu des rapports établis entre 1930 to 2008) (Molodecky, N.A. *et al.*, 2012)

L'épidémiologie des MICI varie également en fonction du temps. Une augmentation significative de l'incidence des MICI a été observée dans 75% des études pour la MC et dans 60% pour la RCH. L'incidence des MICI est en augmentation ou en stabilisation dans toutes les régions étudiées ces dernières années (Molodecky, N.A. *et al.*, 2012). La forte augmentation de l'incidence observée durant le 20^e siècle peut s'expliquer par l'exposition à un environnement délétère résultant de l'urbanisation. Néanmoins, cette augmentation peut également être partiellement attribuée à un meilleur diagnostic des MICI. On peut individualiser un profil évolutif général de l'épidémiologie des MICI dans les pays en développement : leur incidence semble d'abord basse, puis à mesure que ces pays changent de mode de vie et d'environnement, la RCH apparaît, puis après un intervalle de temps de 10 -15 ans, la MC émerge à son tour pour finalement rejoindre l'incidence de la RCH. Ces données semblent indiquer un rôle crucial des facteurs environnementaux dans l'étiologie des MICI.

Les MICI se développent majoritairement chez des sujets adultes jeunes (Molodecky, N.A. *et al.*, 2012). Le pic d'incidence de la MC se situe entre 20 et 30 ans et celui de la RCH entre 30-40 ans. Les formes pédiatriques avant l'âge de 17 ans représentent moins de 10% de l'ensemble des cas de MICI. Dans le registre EPIMAD, la proportion de formes diagnostiquées dans l'enfance et l'adolescence est de 7,2%, la proportion de MC étant plus élevée que chez les adultes. Les formes pédiatriques de MC augmentent partout dans le monde dans des zones où l'incidence de MC chez l'adulte est stable ou en diminution, indiquant que les facteurs étiologiques (en particulier d'environnement) sont toujours actifs dans ces zones (Chouraki, V. *et al.*, 2011).

Les différences d'incidences pouvant être observées entre les hommes et les femmes ne sont pas consistantes, suggérant que ces maladies frappent de façon similaire les deux sexes (Molodecky, N.A. *et al.*, 2012).

1.3. Épidémiologie analytique

1.3.1. Facteurs génétiques

Les preuves d'une susceptibilité génétique aux MICI ont d'abord reposé sur la fréquence des formes familiales et les études de fréquence parmi les jumeaux. Le pourcentage de formes familiales de MICI (au moins un parent du premier degré atteint) varie de 5 à 20 % (Cooney, R. *et al.*, 2009). Huit à 10 % des sujets atteints de MC ont un ou plusieurs parents, tous liens de parenté confondus, atteints de MC et environ 6 % des sujets atteints de RCH ont un ou plusieurs parents atteints de RCH. La concordance pour une même maladie est la règle mais des formes mixtes (MC et RCH sein d'une même famille) ne sont pas rares, traduisant l'existence de facteurs de risque communs aux deux maladies. Le risque absolu de développer une MC pour les apparentés au premier degré (père, mère, frère, sœur, enfant) d'un malade atteint de MC est de 1 à 3% et pour la RCH de l'ordre de 1 %. Le risque de développer une MC ou une RCH est respectivement de 20 à 35 et de 8 à 15 fois supérieur dans une population apparentée comparé à une population témoin (Parkes, M. *et al.*, 2001). L'argument le plus fort pour évaluer le poids de la génétique repose sur l'étude de la concordance entre jumeaux

homozygotes qui varie de 20 à 62 % pour la MC et 6 à 19% pour la RCH. La part génétique dans l'étiologie de ces maladies est donc importante, mais non prédominante, en particulier pour la RCH (Halfvarson, J. *et al.*, 2007).

Les études des variations d'incidence dans des groupes ethniques ayant migré dans des zones géographiques différentes de leur région d'origine sont particulièrement instructives et illustrent l'interaction génétique / environnement. En effet, les individus migrant depuis des régions de faible prévalence (par exemple l'Asie) vers des pays à forte prévalence (par exemple l'Angleterre) ont un risque de développer une MICI augmenté (Bernstein, C.N. *et al.*, 2008). Chez les Juifs vivants en dehors d'Israël, la prévalence des MICI varie d'un pays à l'autre, mais est toujours plus élevée que chez les non Juifs, ce qui reflète une susceptibilité génétique particulière. Cependant, la prévalence est parallèle à celle de la population générale : quand elle est élevée en population générale, elle est également plus élevée chez les Juifs vivants dans cet environnement que chez les Juifs vivant dans une région à prévalence basse (Loftus, E.V., Jr., 2004).

Les études issues du séquençage du génome humain (*genome wide association studies* (GWAS)) ont permis d'identifier des gènes de susceptibilité prédisposant aux MICI (Cooney, R. *et al.*, 2009; Lee, J.C. *et al.*, 2011; Thompson, A.I. *et al.*, 2011). Une carte chromosomique a ainsi pu être établie situant les loci les plus fortement associés aux MICI sur les chromosomes 1, 3, 5, 6, 12, 14, 16 et 19. Ces loci ont été nommés IBD 1 à 26. A l'heure actuelle, plus d'une centaine de loci ont été associés à une susceptibilité aux MICI et de nombreux autres sont encore étudiés.

L'étude de ces loci a permis de mettre en évidence plusieurs groupes de gènes impliqués dans des fonctions physiologiques importantes et qui pourraient être dérégulées dans les MICI.

Les mutations touchant les récepteurs sensibles à l'environnement comme les TLR et CARD15 pourraient avoir un effet délétère sur le système immunitaire inné. Les mutations du gène NOD2/CARD15 (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain/ Caspase-Activating Recruitment Domain 15*) ont été les plus étudiées. NOD2/CARD15 est un récepteur cytoplasmique impliqué dans la reconnaissance et la liaison d'un composant du peptidoglycane des parois bactériennes, le muramylpeptide (MDP). Ce récepteur est exprimé par les cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes et DC) ainsi que par les cellules de Paneth (Gutierrez, O. *et al.*, 2002). Trois mutations de ce gène ont été décrites (Hugot, J.P. *et al.*, 1996) et au moins une de ces mutations est retrouvée chez 10 à 50% des patients atteints de MC (Lesage, S. *et al.*, 2002). Le risque de développer la MC est multiplié par 2 à 4 pour une personne hétérozygote et par 20 à 40 pour une personne homozygote. Les mécanismes sous-jacents à cette liaison entre NOD2/CARD15 et MC restent encore à élucider.

Par ailleurs, les mutations touchant les gènes de l'immunité adaptative, comme les gènes HLA, ainsi que les gènes codant des sous-unités constituant des cytokines ou des récepteurs aux cytokines (IL-23R et la voie Th17) pourraient causer un déséquilibre entre la réponse des cellules immunes régulatrices et effectrices importantes dans le contrôle de la réaction inflammatoire et dans l'immunité adaptative.

Des mutations sur d'autres gènes ont été mises en évidence plus récemment, comme les gènes de transporteurs (MDR1, OCTN1 et OCTN2) ou ceux impliqués dans l'intégrité de l'épithélium (DLG5, MYO9B) qui pourraient affecter la perméabilité de la barrière intestinale,

les gènes de l'autophagie (ATG16L1 et IRGM en particulier) qui sont associés à la MC et les gènes de la voie de l'IL-10 (Goyette, P. *et al.*, 2007; Cooney, R. *et al.*, 2009; Parkes, M., 2012)

Néanmoins, malgré une association nette entre certains loci et l'augmentation du risque de développer une MICI, les facteurs génétiques ne suffisent pas à expliquer le développement des MICI. En effet, des études sur des jumeaux monozygotes présentant une discordance pathologique indiquent l'implication d'autre facteur dans le développement des MICI (Halfvarson, J. *et al.*, 2007).

1.3.2. Facteurs microbiens

Plusieurs arguments prônent un rôle majeur de la flore microbienne commensale ou pathogène dans le développement ou la persistance des MICI (Farrell, R.J. *et al.*, 2002; Thompson-Chagoyan, O.C. *et al.*, 2005).

Elle joue un rôle majeur dans le maintien et la maturation de la barrière immunitaire en stimulant les lymphocytes intraépithéliaux (IEL) (Bandeira, A. *et al.*, 1990), l'activité phagocytaire (Nicaise, P. *et al.*, 1993) ainsi que la sécrétion des cytokines par les macrophages (Nicaise, P. *et al.*, 1999). Elle participe au développement du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT : *Gut-associated lymphoid tissues*) (Umesaki, Y. *et al.*, 2000; Strauch, U.G. *et al.*, 2005). Il existe une communication importante entre la microflore commensale et la muqueuse *via* des molécules bactériennes principalement reconnues par 2 types de récepteurs : les TLR (*toll-like receptors*) et les protéines NOD. Il est à noter que des altérations ou des polymorphismes dans ces récepteurs sont définis comme facteurs génétiques prédisposant aux MICI (Hugot, J.P. *et al.*, 2001; Franchimont, D. *et al.*, 2004).

Chez les patients atteints de MICI, des modifications qualitatives et quantitatives ont pu être observées dans la flore luminale et dans la flore associée aux muqueuses. La masse bactérienne totale est en effet plus importante chez les patients atteints d'une MICI (Kleessen, B. *et al.*, 2002; Swidsinski, A. *et al.*, 2002; Swidsinski, A. *et al.*, 2005), suggérant un défaut dans les mécanismes normaux de régulation de la flore.

Malgré cet augmentation quantitative, la biodiversité de la flore est réduite chez les patients atteints de MICI (Sokol, H. *et al.*, 2008) avec une diminution des espèces bactériennes potentiellement bénéfiques (*Bifidobacteria*, *Lactobacilli*) et une augmentation des bactéries pathogènes associées à la muqueuse intestinale (*Bacteroides*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*) (Seksik, P. *et al.*, 2003; Tamboli, C.P. *et al.*, 2004). Dans la MC, les zones enflammées sont celles présentant la plus forte concentration en bactéries (Swidsinski, A. *et al.*, 2002). Cette dysbiose pourrait être à l'origine d'une instabilité de l'écosystème intestinal, menant à une réaction inflammatoire bien qu'elle puisse également être la conséquence de la maladie plutôt que sa cause (Ley, R.E. *et al.*, 2007; Kinross, J.M. *et al.*, 2008; Mazmanian, S.K. *et al.*, 2008). Dans certaines situations spécifiques, les traitements antibiotiques se sont montrés efficaces dans le traitement des MICI (Sartor, R.B., 2004). Ces données indiquent clairement un rôle de la flore commensale dans la mise en place et/ou dans la perpétuation de l'inflammation intestinale. Cette hypothèse est étayée par les données épidémiologiques qui associent l'usage excessif d'antibiotiques et la modification du mode de vie alimentaire et sanitaire à une évolution de la composition de la flore digestive (Van Kruiningen, H.J. *et al.*, 2005).

D'autre part, la présence de bactéries est requise pour la mise en place de la plupart des modèles expérimentaux dans lesquels l'inflammation ne peut pas être mise en place chez des

animaux *germ-free* (dépourvus de flore commensale) (Sartor, R.B., 2004). De plus, il a pu être mis en évidence que la sensibilité aux agents pathogènes varierait en fonction de l'espèce bactérienne mais également en fonction de la souche de souris. Ces résultats démontrent clairement que la flore bactérienne constitue une source de stimulation antigénique majeure dans les MICI et que les dispositions génétiques de l'individu vont déterminer l'issue de la réponse immune.

1.3.3. Facteurs environnementaux

Comme développé plus haut (Cf. chapitre I/1.2), la forte hétérogénéité spatiale des MICI, l'augmentation rapide de leur incidence dans les pays développés et en voie d'émergence et l'augmentation du risque de ces maladies chez les migrants démontrent l'implication de facteurs environnementaux dans le développement des MICI. D'autre part, l'augmentation de la fréquence des MICI dans la plupart des pays durant les 50 dernières années, période trop courte pour voir apparaître des modifications génétiques significatives, pointe également l'implication de facteurs environnementaux (Loftus, E.V., Jr., 2004).

Parmi ces facteurs, l'hypothèse de l'hygiène est souvent proposée comme explication des différences d'incidences observées entre les pays industrialisés et les pays en voie de développement (Ghosh, S. *et al.*, 2004). Elle suggère qu'une hygiène importante diminue l'exposition aux antigènes environnementaux, en particulier microbiens, et entrave la maturation du système immunitaire muqueux et la mise en place de la tolérance orale. Ainsi la muqueuse intestinale mettrait en place une réponse immunitaire inadaptée et excessive au cours de la vie aboutissant à l'apparition de pathologies inflammatoires, allergiques ou auto-immunes. Cette hypothèse expliquerait la prévalence quasiment nulle des MICI dans les populations en contact permanent avec des pathogènes potentiels.

Par ailleurs, d'autres facteurs environnementaux, culturels ou alimentaires pourraient être impliqués dans l'étiologie des MICI (Cf. Figure 3). En effet, l'étude des populations migrantes démontre des différences d'incidences en fonction du lieu de migration. Par exemple, une augmentation du nombre de cas de MICI est observée dans les populations asiatiques migrant en Europe et *vice-versa* (Binder, V., 2004). D'une façon plus générale, le risque d'apparition de MICI des populations migrantes se rapproche de celui de leur lieu de migration indiquant que l'environnement a une influence importante. Cette influence est également remarquable dans les études portant sur les jumeaux qui recensent entre 40 et 50% de discordance dans le développement de MICI, bien que leurs prédispositions génétiques soient identiques (Orholm, M. *et al.*, 2000; Halfvarson, J. *et al.*, 2003). L'impact des facteurs environnementaux (tabagisme, alimentation...) est une explication plausible aux discordances observées chez les jumeaux.

Parmi les facteurs environnementaux étudiés, certains sont plus nettement associés au risque de développement des MICI que d'autres. L'impact de certains facteurs comme le stress psychologique (Traue, H.C. *et al.*, 1999; Mardini, H.E. *et al.*, 2004), la prise d'antibiotiques pendant l'enfance (Kronman, M.P. *et al.*, 2012) et l'alimentation (Cashman, K.D. *et al.*, 2003) est encore discuté (voir Lakatos, P.L., 2009 pour une revue récente).

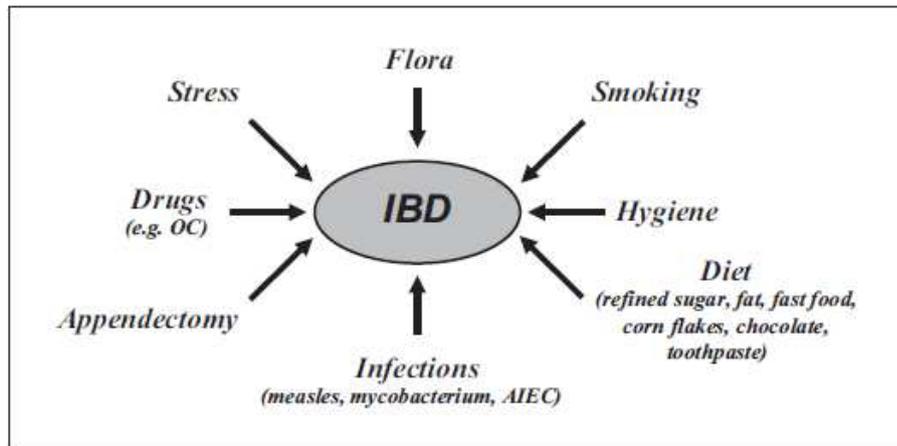


Figure 3 : Facteurs environnementaux dans les MICI

OC : Contraceptifs oraux ; AIEC : *E. Coli* adhérent invasif. D'après Lakatos, P.L., 2009.

À l'heure actuelle, l'appendicectomie et le tabagisme sont les deux facteurs les plus fortement liés au risque d'apparition des MICI.

L'appendicectomie semble jouer un rôle protecteur dans le développement de la RCH. Une méta-analyse de 17 études cas/contrôles démontre que le risque d'apparition de la maladie est réduit de près de 70% chez les sujets ayant subi une ablation de l'appendice (*odd ratio* OR=0,31) (Koutroubakis, I.E. *et al.*, 2002). Ces études suggèrent que les altérations de la réponse immunitaire muqueuse provoquant l'appendicite ou résultant de l'appendicectomie affectent négativement les mécanismes pathogéniques liés à la RCH. La RCH des patients appendicectomisés évolue de façon moins grave avec un risque réduit de colectomie (Cosnes, J. *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'appendicectomie semble avoir un impact moins évident sur l'évolution de la MC. Elle est associée à une MC plus proximale, un risque augmenté de sténose et un risque diminué de fistulisation anale (Cosnes, J. *et al.*, 2006)

Parmi les facteurs étudiés, le tabagisme est le facteur le plus fortement lié au risque d'apparition des MICI. Son rôle est ambivalent dans les pathologies des MICI. Il joue en effet un rôle protecteur dans la RCH et un rôle délétère dans la MC. Son implication sera détaillée plus bas dans ce manuscrit (Cf. chapitre 1/3.2)

2. Physiopathologie des MICI

Comme détaillé ci-dessus, la composante principale des MICI est l'installation d'une réponse inflammatoire intestinale chronique liée à un dérèglement du système immunitaire. L'étiologie exacte de cette inflammation est encore inconnue mais il est certain que chez les patients atteints de MICI, elle est liée à une perturbation de la barrière intestinale.

2.1. Inflammation et réponse immune

L'inflammation est la réponse des tissus vivants vascularisés, à une agression. L'inflammation peut avoir des causes physiques (chaud, froid ou encore radiations ionisantes), chimiques (composés acides ou basiques, ou toxines bactériennes), ou être la conséquence d'une infection (présence d'un organisme pathogène comme une bactérie, un virus, un champignon, ou un parasite). Enfin, l'inflammation peut être la conséquence d'une nécrose tissulaire.

Le but de ce phénomène est de résister à l'agression et aboutit en général à la mise en place d'une réponse immunitaire. Il existe deux composantes à cette réponse : une immunité innée (ou naturelle) et une immunité spécifique (ou adaptative) mettant chacune en jeu des populations cellulaires distinctes (Cf. Figure 4) ayant des rôles spécifiques.

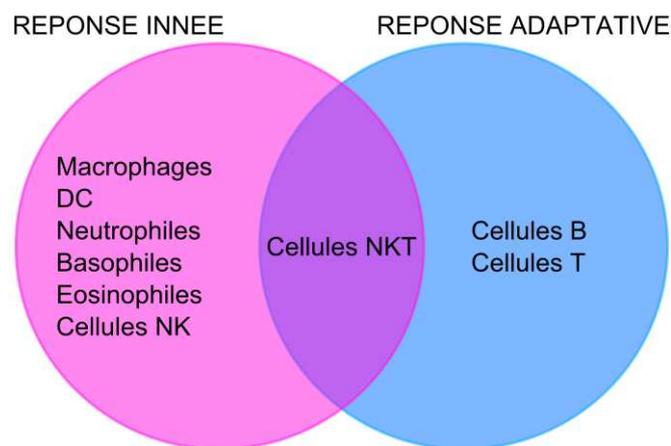


FIGURE 4 : Cellules de la réponse innée et de la réponse adaptative

D'après Van Kaer, L. *et al.*, 2011.

2.1.1. La réponse innée

Son rôle

Le système immunitaire inné comprend les cellules et les mécanismes permettant la défense de l'organisme contre les agents infectieux de façon immédiate (à l'inverse du système immunitaire adaptatif qui confère une protection plus tardive mais plus durable). Le système immunitaire inné existe dans tous les organismes du règne végétal et animal.

Les principales fonctions du système immunitaire inné des vertébrés sont : de constituer une barrière physique et chimique contre les agents infectieux, d'identifier et d'éliminer les corps étrangers présents dans l'organisme (les tissus, le sang et la lymphe), de détecter les agents infectieux et d'induire le recrutement de cellules immunitaires sur le site de l'infection, d'activer l'immunité adaptative à travers la présentation antigénique.

Les populations cellulaires impliquées

La réponse immune innée se base essentiellement sur l'activité des cellules phagocytaires et présentatrices d'antigènes.

Ces cellules comprennent les monocytes/macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les cellules dendritiques (DC). Elles sont responsables de la phagocytose aboutissant d'une part à la destruction de l'agent pathogène, et d'autre part de la présentation d'antigènes microbiens *via* le CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II.

Les cellules Natural Killer (ou cellules NK), sont également des cellules du système immunitaire inné mais elles n'éliminent pas directement les agents infectieux. Les cellules NK éliminent les cellules dont la fonction est altérée, comme les cellules tumorales ou les cellules infectées par un virus.

2.1.2. La réponse adaptative

Son rôle

L'immunité adaptative est activée suite à la reconnaissance d'agents infectieux par le système immunitaire inné. Le système immunitaire adaptatif permet d'amplifier la réponse immunitaire et confère à la fois une réponse spécifique à l'antigène, et donc particulièrement adaptée à l'agent infectieux, et une réponse mémoire permettant une élimination plus efficace du même agent infectieux si l'organisme y est de nouveau confronté. Les cellules de l'immunité adaptative constituent ainsi un complément essentiel de la réponse immunitaire innée.

Les populations cellulaires impliquées

Les deux types cellulaires majeurs du système immunitaire adaptatif sont les lymphocytes T, qui contribuent à l'immunité à médiation cellulaire, et les lymphocytes B qui sont responsables de l'immunité à médiation humorale. Le corps humain contient près de mille milliards de lymphocytes (10^{12}) qui sont présents majoritairement dans le sang mais également dans la lymphe, les organes lymphoïdes et les tissus. Chez l'adulte, les organes lymphoïdes secondaires contiennent des lymphocytes T et des lymphocytes B pouvant être dans au moins trois stades de différenciation :

- Les lymphocytes naïfs sont des lymphocytes qui ont quitté la moelle osseuse ou le thymus, ont circulé dans les vaisseaux lymphatiques, mais n'ont pas encore rencontré leur antigène spécifique.
- Les lymphocytes effecteurs sont des lymphocytes qui ont été activés par leur antigène spécifique et qui sont encore dans le processus d'élimination du pathogène.
- Les lymphocytes « mémoire » sont des lymphocytes activés au cours d'infections antérieures et pouvant être réactivés.

Les **lymphocytes B**, ou cellules B, sont des lymphocytes qui ont pour rôle de fabriquer des anticorps ou immunoglobulines (immunité humorale). Ils sont activés par la reconnaissance d'un antigène spécifique à leur récepteur membranaire (sans nécessité d'une présentation *via* une cellule présentatrice d'antigènes (CPA)) et se différencient alors en plasmocytes capables de produire des anticorps dirigés contre l'antigène activateur.

Les **lymphocytes T**, ou cellules T, sont caractérisés par l'expression à leur surface du récepteur TCR capable de reconnaître un antigène exogène présenté par le CMH. Ils se divisent en 3 sous-populations :

- les cellules T cytotoxiques (CD8) qui détruisent les cellules infectées présentant un antigène exogène *via* leur CMH de classe I.
- les lymphocytes T auxiliaires (CD4+ ou helper ou Th) qui sont des intermédiaires de la réponse immunitaire et agissent pour activer les autres acteurs de la réponse immunitaire *via* leur sécrétion cytokinique. Les lymphocytes Th activés et proliférant peuvent se différencier en deux sous-types principaux, les cellules Th1 et Th2. Ces sous-types sont définis en fonction des cytokines spécifiques qu'elles produisent. Les cellules Th1 produisent majoritairement de l'IFN- γ et de l'IL-12 alors que les cellules Th2 produisent majoritairement de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13.
- les lymphocytes T régulateurs (Treg, CD4+ CD25+) aident à réguler la réponse inflammatoire. Leur rôle principal est de réprimer l'activité des cellules de l'immunité pour éviter l'emballement du système inflammatoire et les réactions auto-immunes. Ils produisent des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- β (*transforming growth factor* β) et l'IL-10.

2.2. Perturbation de la barrière intestinale dans les MICI

La muqueuse intestinale est la plus grande surface d'échange entre l'organisme et le milieu extérieur. L'intestin grêle représente à lui seul plus de 300m² de surface de contact avec l'extérieur. La muqueuse est à la fois un lieu d'échange et une barrière de défense capitale au bon fonctionnement de l'organisme. Cette barrière est constituée de 4 niveaux de défenses : 1) la barrière mécanique liée au péristaltisme, 2) la barrière écologique composée par la flore commensale (qui empêche la colonisation par des bactéries pathogènes), 3) la barrière physique constituée des cellules épithéliales intestinales (IEC) et du mucus qu'elles sécrètent et 4) la barrière immunologique comprenant les cellules immunitaires et leurs sécrétions (cytokines, anticorps...).

Ces unités fonctionnelles interagissent entre elles de façon continue et établissent des relations étroites et finement régulées, permettant le maintien de l'homéostasie.

Bien que l'étiologie des MICI reste obscure, la perturbation de la barrière intestinale est en relation directe avec le développement de la pathologie (Salim, S.Y. *et al.*, 2011). Cette barrière intestinale peut être perturbée à plusieurs niveaux aboutissant à une dérégulation de la défense de l'hôte et à une inflammation. A l'heure actuelle, il n'a pas encore pu être établi si ces modifications sont à l'origine du développement des MICI ou si elles en sont la conséquence.

Outre des perturbations de la barrière écologique décrites plus haut (Cf. chapitre I/1.3.2), des altérations de la barrière immunologique et de la barrière physique ont également été décrites et jouent un rôle majeur dans l'établissement et/ou le développement des MICI.

2.2.1. Perturbation de la barrière immunologique

Description de la barrière immunologique

L'immunité intestinale, de par son contact constant avec le milieu extérieur, présente quelques particularités par rapport aux autres organes.

La barrière immunologique est un mécanisme de défense spécifique associant la production d'anticorps et l'activation de l'immunité locale (Salminen, S. *et al.*, 1998). Cette réponse s'organise au niveau de la muqueuse et des organes lymphoïdes secondaires associés à la muqueuse (Cf. Figure 5). Le réseau lymphoïde intestinal est particulièrement complexe. Il doit être capable d'une part d'instaurer une réponse immune efficace contre les pathogènes et de maintenir d'autre part une tolérance orale vis-à-vis de la flore commensale et des antigènes alimentaires. Ce réseau assure le transport des antigènes et leur présentation aux cellules T et est nommé GALT (Spahn, T.W. *et al.*, 2004).

Le GALT représente le plus grand organe de l'immunité et contient plus de 90% des cellules immunes de l'organisme comprenant la plus grande quantité de lymphocytes du corps humain, 2 à 5% de mastocytes et plus de 10% de macrophages. Ces cellules collaborent avec les IEC pour constituer une barrière immunologique efficace. Il comprend des sites diffus comme la *lamina propria* et les IEL et des sites plus organisés comme les ganglions lymphatiques mésentériques, les plaques de Peyer, les follicules lymphoïdes isolés et les plaques des cryptes (Cf. Figure 5) (Salminen, S. *et al.*, 1998).

Les plaques des cryptes sont des amas peu structurés situés à la base des cryptes épithéliales et sont réparties aléatoirement dans l'intestin (bien que plus importantes dans le grêle que le côlon). Ce sont des organes lymphoïdes secondaires à l'origine de la génération des lymphocytes intra-épithéliaux (Pabst, O. *et al.*, 2005).

Les plaques de Peyer sont des follicules placés sous l'épithélium uniquement au niveau de l'intestin grêle. Elles ont pour rôle d'induire la réponse immune par présentation des antigènes luminaux aux cellules présentatrices d'antigènes. Elles sont organisées en 3 zones fonctionnelles (Cf. Figure 5) :

- le dôme sous-épithélial recouvert d'un épithélium associé au follicule (FAE) formé d'entérocytes et de cellules M. Ces cellules M captent les antigènes de la lumière intestinale par le pôle apical, les intègrent (phagocytose ou endocytose) et les libèrent du côté baso-latéral. Ce dôme est également riche en DC.
- la zone inter-folliculaire, ou zone T-dépendante est le site de prolifération des cellules T CD4+ et CD8+ ainsi que des macrophages.
- le follicule lymphoïde qui contient majoritairement des cellules B et quelques cellules T CD4+ auxiliaires.

Les plaques de Peyer sont indispensables au maintien de la barrière intestinale et sont sous la dépendance du récepteur NOD2. En effet, les souris NOD2 KO disposent d'un nombre trop élevé de plaques de Peyer aboutissant à une réponse immunitaire exacerbée (cytokines pro-inflammatoires) et à une augmentation de la perméabilité membranaire. Ces animaux ont une susceptibilité augmentée à développer une colite sévère (Barreau, F. *et al.*, 2010).

Les follicules lymphoïdes isolés sont structurellement proches des follicules lymphoïdes des plaques de Peyer, cependant ils sont présents aussi bien dans l'intestin grêle que le côlon. Leur rôle est similaire à celui des plaques de Peyer.

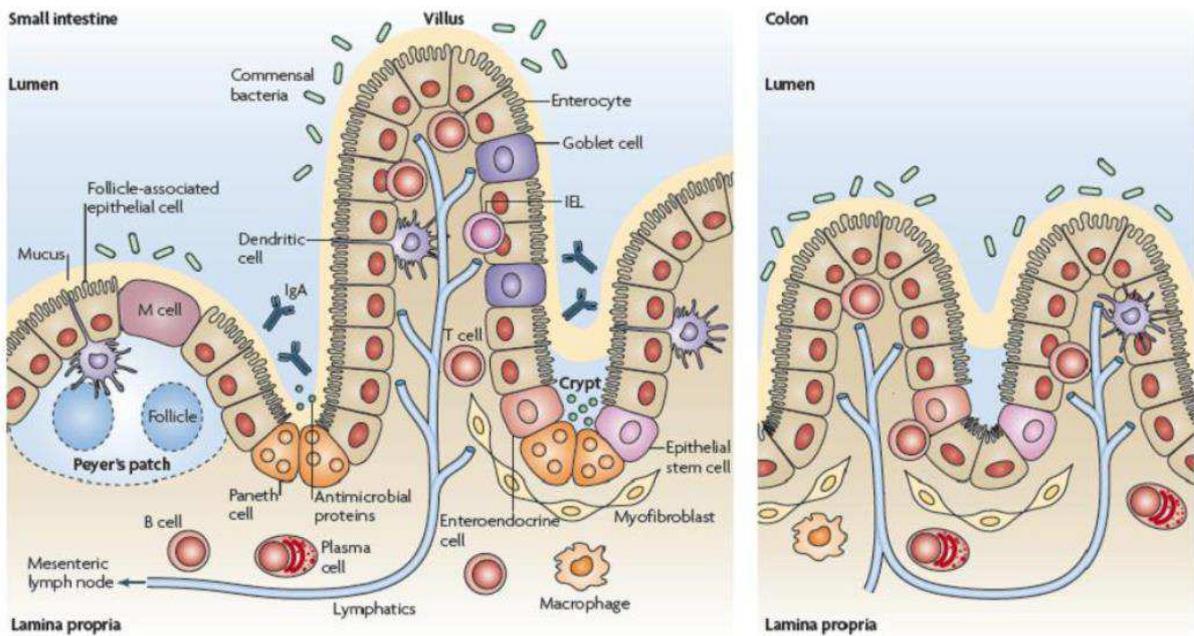


Figure 5 : le système immunitaire au niveau de l'intestin

Composition du GALT au niveau de l'intestin grêle et du côlon. D'après Abreu, M.T., 2010.

Qu'elle en soit la cause ou la conséquence, le dérèglement de la barrière immunologique constitue un des points clés de l'établissement de l'inflammation dans les MICI. En effet, dans la MC, il a été suggéré que l'exacerbation de la réponse immune à l'encontre de la flore intestinale serait due à une communication anormale entre la flore et le GALT (Ardizzone, S. *et al.*, 2002; Xavier, R.J. *et al.*, 2007) aboutissant à la perte de la tolérance orale.

Perturbation de la balance Th1 / Th2.

Les pathologies des MICI sont intimement liées à une dérégulation immunitaire se traduisant par un déséquilibre de la balance Th1/Th2 (Cf. Figure 6).

Au cours de la MC, un dysfonctionnement des réponses aux PRR (*Pattern Recognition Receptor*) conduirait les DC à reconnaître certains antigènes commensaux de façon excessive (Niess, J.H., 2008). Cette perte de la tolérance aboutirait à une réponse de type Th1 par la production par des cellules T ainsi activées de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ et l'IL-12 (Bamias, G. *et al.*, 2003). Au cours de la RCH, à l'inverse, la muqueuse est infiltrée principalement pas des lymphocytes Th2 atypiques produisant de l'IL-5, de l'IL-13 et du TGF- β (Targan, S.R. *et al.*, 2005).

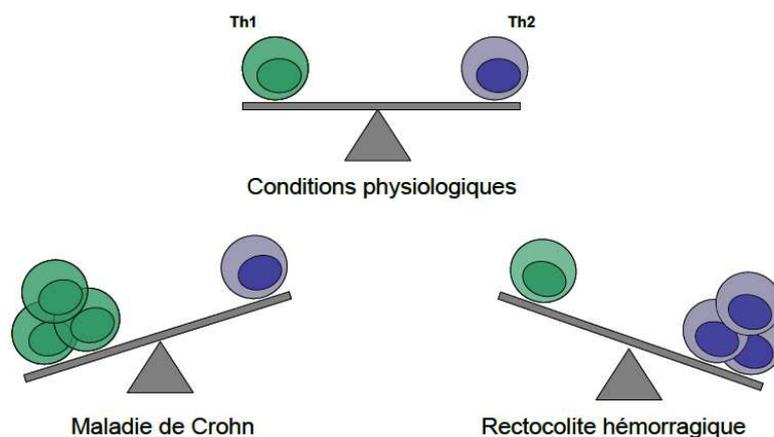


Figure 6 : schématisation du déséquilibre lymphocytaire au cours des MICI

Perturbation de la balance Th17/Treg

Dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MICI, les lymphocytes Th17 sont anormalement abondants (Fujino, S. *et al.*, 2003) et l'expression des cytokines associées est exacerbée (IL-21, IL-22) (Andoh, A. *et al.*, 2005). L'expression de l'IL-23, cytokine impliquée dans la mise en place de la réponse Th17, est également augmentée chez les patients atteints de MC (Schmidt, C. *et al.*, 2005). Cette polarisation du système immunitaire pointe l'IL-17 et l'IL-23 comme des cibles thérapeutiques potentielles en particulier dans la MC (Hueber, W. *et al.*, 2010).

Il a par ailleurs été mis en évidence une diminution du taux circulant des lymphocytes Treg chez les patients atteints de MICI, qui pourrait associer la progression de la maladie à une dérégulation de la balance Th17/Treg (Makita, S. *et al.*, 2004; Takahashi, M. *et al.*, 2006). Paradoxalement, au niveau de la *lamina propria*, des ganglions mésentériques et de la muqueuse intestinale des patients atteints de MICI, le nombre de cellules Treg est augmenté (Makita, S. *et al.*, 2004; Maul, J. *et al.*, 2005; Yu, Q.T. *et al.*, 2007). Ces lymphocytes Treg seraient donc recrutés sur le site de l'inflammation pour contrebalancer la réponse pro-inflammatoire excessive.

2.2.2. Perturbation de la barrière physique

Lors du maintien de l'homéostasie intestinale, il existe une interaction étroite entre la barrière immunitaire et la barrière physique formée par les IEC. En effet, les lymphocytes T activés ont la capacité d'agir sur les protéines de jonctions, indispensables au maintien de la barrière physique (Cf. Figure 7).

Les CPA et les cellules Th1 produisant du TNF et l'IFN- γ vont avoir un impact négatif majeur sur la barrière intestinale. L'expression de ces cytokines est augmentée chez les patients atteints de MICI et peut être mise en relation directe avec la rupture de la barrière physique (Madara, J.L. *et al.*, 1989). Le TNF, d'une part, est impliqué dans l'augmentation de la perméabilité membranaire *via* son action sur les jonctions serrées *in vitro* (Ma, T.Y. *et al.*, 2005; Wang, F. *et al.*, 2005) et *in vivo* chez les patients souffrants de MICI (Blair, S.A. *et al.*, 2006). D'autre part, l'administration d'anticorps anti-TNF chez des patients atteints de MC diminue l'inflammation en améliorant la fonction de barrière (Suenart, P. *et al.*, 2002). L'IFN- γ , quant à lui, jouerait un rôle direct sur les protéines de jonctions (Ivanov, A.I. *et al.*, 2004;

Utech, M. *et al.*, 2005). Le TNF et l'IFN- γ aboutissent tous deux à une contraction du cytosquelette d'actine induisant une augmentation du flux d'antigènes vers la *lamina propria*, amplifiant ainsi le cycle de l'inflammation. Les cellules Th2 semblent également jouer un rôle délétère sur la fonction de la barrière intestinale puisque les cytokines IL-4 et IL-13 produites par ces cellules provoquent l'apoptose des IEC altérant fortement la barrière intestinale (Turner, J.R., 2009). A l'inverse, les cellules Treg vont permettre le maintien de la barrière en inhibant les réactions pro-inflammatoires des autres cellules *via* leur sécrétion d'IL-10 et de TGF- β . Une grande partie de ces réponses coordonnées va donc être liée à la présentation des antigènes par les CPA aboutissant à la différenciation des cellules T vers les différents profils Th1, Th2 ou Treg (Turner, J.R., 2009).

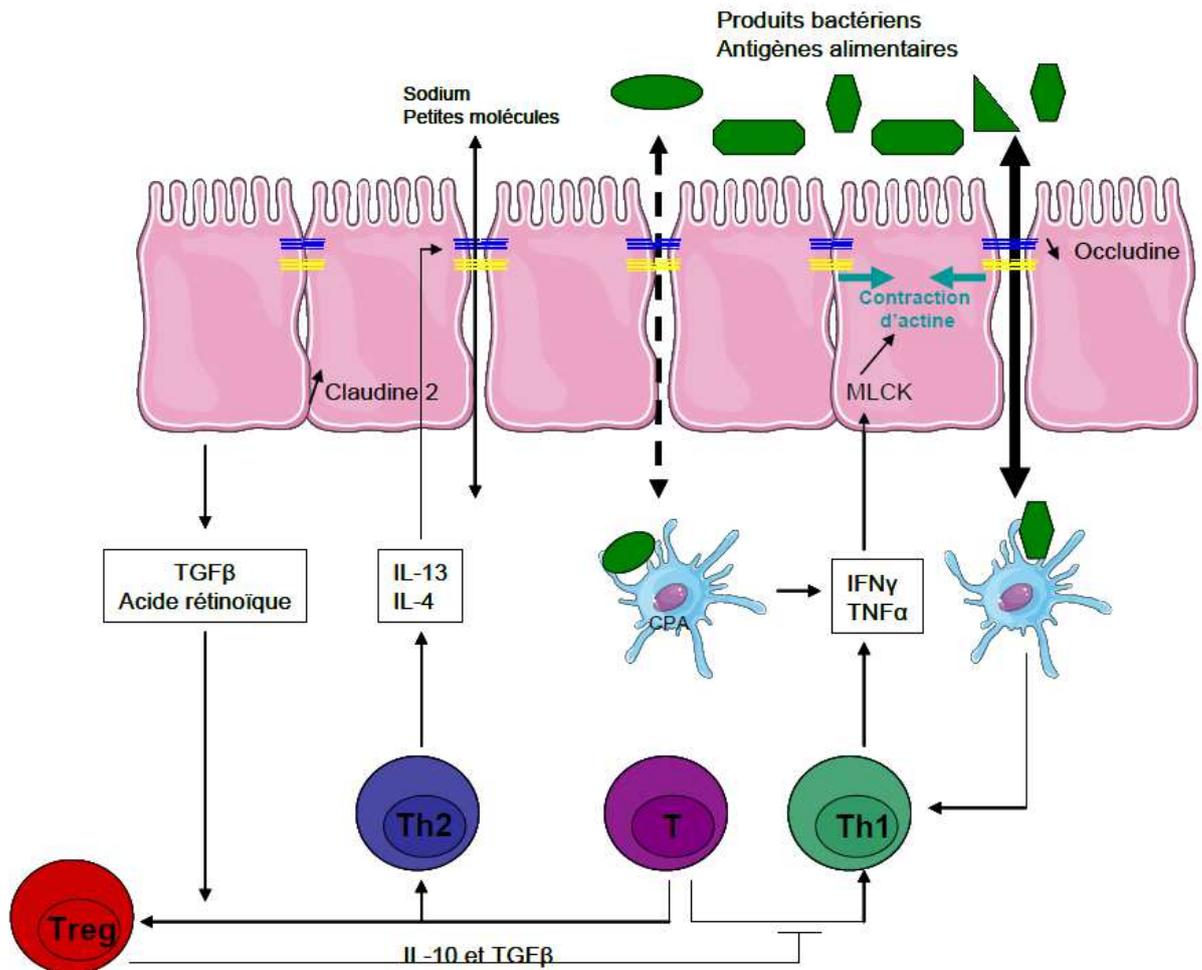


Figure 7 : Interaction entre le système immunitaire et la barrière intestinale

À la suite du passage des antigènes bactériens au travers de la barrière épithéliale intestinale, leur reconnaissance par des CPA entraîne la différenciation des cellules T en cellules effectrices Th1 ou Th2 et peut induire le développement d'une inflammation. Le TNF α et l'IFN γ sécrétés par les CPA et les cellules Th1, vont activer la MLCK ce qui entraîne une contraction du cytosquelette d'actine aboutissant à une augmentation du flux paracellulaire d'antigènes bactériens (amplifiant ainsi l'inflammation). L'IL-4 et l'IL-13, produites par les cellules Th2, provoquent une apoptose épithéliale et une augmentation de l'expression de la claudine-2, entraînant une augmentation des flux de cations. A l'inverse, si les CPA favorisent la différenciation des cellules T en cellules Treg, l'homéostasie de la muqueuse est maintenue et empêche le développement de l'inflammation. Cette différenciation peut être induite par l'acide rétinoïque et le TGF β dérivés des IEC cellules épithéliales et des CPA elles-mêmes. D'après Turner, J.R., 2009.

2.3. Les modèles de colite expérimentale

Plusieurs modèles de colites expérimentales ont été mises au point chez le rongeur (rat et souris) pour imiter l'inflammation intestinale observée lors des MICI. Un premier type de modèle est constitué par des souches de souris développant une colite spontanée de par leur fond génétique. Dans un second type de modèle, la colite est obtenue par manipulation génétique des animaux notamment par l'invalidation de gènes (KO) impliqués dans la régulation de l'inflammation. Dans un troisième type de modèle, l'exposition à des agents physiques ou chimiques est à l'origine de l'inflammation (Strober, W. *et al.*, 2002).

Cependant, ces modèles ne reproduisent en aucun cas l'ensemble des caractéristiques cliniques et physiopathologiques des MICI humaines. Ils permettent néanmoins d'essayer d'appréhender l'implication de certaines voies dans l'établissement de l'inflammation ou de tester de nouveaux agents thérapeutiques.

2.3.1. Modèles d'inflammation spontanée

Plusieurs souches de souris n'ayant subi aucune manipulation volontaire développent une inflammation intestinale spontanée reproduisant une certaine complexité multifactorielle proche des MICI.

Parmi ces souches, les souris C3H/HeJ Bir (déficiente en TLR-4) développent spontanément une colite transmurale au niveau iléocœcale et du côlon proximal. Cette colite se développe à partir de la 3ème semaine de vie et disparaît à partir de la 10ème semaine. Elle est caractérisée par une inflammation de type Th1 (IFN- γ et IL-2) (Westbrook, A.M. *et al.*, 2010) et est liée à une hyperréactivité des lymphocytes T et B contre les bactéries luminales (Brandwein, S.L. *et al.*, 1997).

Les souris SAMP1/Yit développent une inflammation intestinale transmurale de l'iléon proche de la MC (Sugawara, K. *et al.*, 2005). Dans ce modèle la colite est liée à une augmentation de la perméabilité intestinale et les réponses immunes mises en jeu sont de type Th1 et Th2. Une altération des cellules de Paneth ou des cellules caliciformes pourrait être à l'origine de l'inflammation.

2.3.2. Modèles génétiques

De nombreux modèles murins transgéniques ou KO ont été développés. Ils sont couramment utilisés pour étudier les effets de l'altération de la barrière intestinale et de la régulation immunitaire. Ces modèles rapportent un excès d'activation ou un défaut d'inhibition de l'immunité qui a pu être transposé aux patients atteints de MICI. Parmi les modèles génétiques existants, le modèle de souris déficientes en IL-10 reste le plus utilisé.

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire majeure produite par les lymphocytes B, T et les macrophages qui a pour rôle de réguler les fonctions des cellules Th1. Les souris KO pour l'IL-10 développent une inflammation pouvant toucher l'ensemble de l'intestin (Kuhn, R. *et al.*, 1993) avec un tropisme préférentiel pour le duodénum, le jéjunum et le côlon proximal. L'inflammation évolue en deux phases distinctes, une phase précoce impliquant une réponse Th1 (IL-12) et une phase tardive impliquant une réponse Th2 (IL-4, IL-13) (Spencer, D.M. *et al.*, 2002). En condition SPF (*specific pathogen free*), ces souris développent une inflammation moins sévère et plus limitée (côlon proximal) laissant penser à un rôle de la flore dans ce modèle (Kuhn, R. *et al.*, 1993).

2.3.3. Modèles de colite chimio-induite

Globalement, il existe deux types de modèles de colites chimio-induites provoquant soit une perturbation de la barrière intestinale soit une hypersensibilité induite par un haptène.

Colite induite par le Dextran Sulfate Sodium

Ce modèle consiste à introduire dans l'eau de boisson des animaux (souris, rat, porc, hamster) du DSS (dextran sulfate sodium) qui induit une colite très reproductible. Ce modèle peut être aigu ou chronique selon la dose et le mode de traitement des animaux (cycles

d'expositions). Les symptômes provoqués par le DSS sont proches de ceux observés lors de la RCH : perte de poids, diarrhées hémorragiques, ulcération, érosion des IEC et infiltration de lymphocytes et granulocytes allant jusqu'au développement de tumeurs dans le modèle chronique. L'intégrité de la barrière intestinale dans ce modèle est induite par une atteinte au niveau basal des cryptes entraînant une intrusion de bactéries dans la muqueuse et une réponse immune innée (Cooper, H.S. *et al.*, 1993; Melgar, S. *et al.*, 2005; Johansson, M.E. *et al.*, 2010).

Néanmoins, les souris SCID (déficientes en cellules B et T) développent également une colite après traitement au DSS ce qui indique que l'immunité acquise n'est pas indispensable à la mise en place de l'inflammation dans ce modèle (Dieleman, L.A. *et al.*, 1994). Le profil inflammatoire développé n'est pas le même selon le modèle d'exposition au DSS. Dans le modèle d'inflammation aiguë (exposition à une dose forte pendant 4 à 8 jours), la réponse mise en jeu est de type Th1/Th17 (IL-6, IL-17, TNF), alors que dans le modèle d'inflammation chronique (plusieurs cycles d'exposition à de faible dose de DSS avec des périodes de récupération) provoque une réponse de type Th2 (IL-4, IL-10) (Alex, P. *et al.*, 2009).

Colite induite par un haptène : Oxazolone/TNBS/DNBS

L'administration intra-rectale d'oxazolone aboutit au développement rapide d'une inflammation majoritairement au niveau du côlon distal accompagnée d'une accumulation de neutrophiles et de macrophages dans la muqueuse. Cette infiltration est associée à une forte induction de TGF- β qui permet de limiter l'extension, la sévérité et la durée de l'inflammation. C'est un des rares modèles à induire une inflammation de type Th2 (Boirivant, M. *et al.*, 1998; Heller, F. *et al.*, 2002) présentant de fortes ressemblances histologiques avec la RCH. La colite développée dépend de la production d'IL-13 par les cellules NKT et de la production d'IL-4 et d'IL-5 par les lymphocytes T de la *lamina propria* (Heller, F. *et al.*, 2002).

L'administration intra-rectale d'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) ou de 2,4-dinitrobenzène sulfonique (DNBS) dissous dans l'éthanol à 50%, à des souris ou des rats sains, induit une colite expérimentale dans les 2-3 jours suivant le traitement. L'éthanol est utilisé afin d'altérer l'intégrité de la paroi intestinale. Le TNBS/DNBS quant à lui, par son action d'haptène, va rendre les protéines du côlon ou du microbiote immunogènes pour le système immunitaire de l'hôte, activant les cellules T. Une dose unique de TNBS/DNBS entraîne une réaction inflammatoire aiguë qui diminue au cours du temps jusqu'à disparition. Une inflammation chronique peut également être mise en place en établissant des cycles d'administration. L'inflammation muqueuse aiguë est due à une production excessive de cytokines de type Th1 et Th17 (IFN- γ , TNF, IL-12, IL-17) (Neurath, M.F. *et al.*, 1995; Alex, P. *et al.*, 2009) accompagnée d'une infiltration de neutrophiles et de macrophages au sein de la muqueuse et de la sous-muqueuse (te Velde, A.A. *et al.*, 2006).

3. Tabac et réponse immunitaire

Le tabagisme est la plus importante cause évitable de décès dans le monde. Dans les pays développés, les estimations portent à 37% le nombre de fumeurs et 21% le nombre de fumeuses, et des chiffres encore plus élevés dans les pays en voie de développement (van Zyl-Smit, R.N. *et al.*, 2010).

Fumer augmente le risque de maladie cardiaque, de cancer du poumon et d'infection microbienne (respiratoires, buccales et méningites). Le tabagisme est aussi associé à un ralentissement de la guérison et un plus fort taux d'incidence dans l'athérosclérose, la bronchopneumopathie chronique obstructive, la MC, la polyarthrite rhumatoïde et les cancers du poumon, de la bouche, du larynx, de l'œsophage et de la vessie. Cependant, malgré ses effets nocifs importants, le tabagisme est pressenti pour avoir un rôle bénéfique dans certaines maladies en diminuant leur incidence ou leur sévérité. Les données épidémiologiques suggèrent une protection dans la RCH, la sarcoïdose, l'endométriase, les fibromes utérins, les cancers de l'endomètre, la maladie de Parkinson, le syndrome de Gougerot-Sjögren et peut-être la maladie d'Alzheimer. Il est à noter que la plupart de ces maladies sont des maladies inflammatoires ou ont une forte composante inflammatoire (Sopori, M., 2002).

Les effets du tabagisme opèrent *via* plusieurs mécanismes. Certains composés de la fumée de cigarette sont des carcinogènes (benzopyrènes), des toxines (monoxyde de carbone (CO) et nicotine), des particules réactives (ions métalliques) ou des oxydants (monoxyde d'azote (NO) et anions superoxydes) (Faux, S.P. *et al.*, 2009). Ces derniers induisent la production d'espèces réactives à l'oxygène et s'ils ne sont pas neutralisés par des antioxydants, ils génèrent un stress oxydatif à l'origine d'altération des lipides, des protéines, de l'ADN et des organelles cellulaires (Stampfli, M.R. *et al.*, 2009). Les lésions liées au stress oxydatif sont généralement réparées par autophagie ou aboutissent à un processus de mort programmée des cellules (apoptose) (Kim, H.P. *et al.*, 2008; Verschuere, S. *et al.*, 2012). D'autre part, plusieurs composants de la fumée de cigarette ont un effet immuno-régulateur. Parmi eux, la nicotine joue un rôle immunosuppresseur majeur, que ce soit sur le système immunitaire inné ou adaptatif qui pourrait présenter un intérêt thérapeutique. La nicotine en elle-même n'est pas considérée comme carcinogène, mais, à cause de ces propriétés addictives, ses effets sur le système cardiovasculaire et sur le système immunitaire, elle n'est pas pressentie comme un agent thérapeutique valable (Sopori, M., 2002).

3.1. Effet du tabac sur la réponse immunitaire

L'inhalation chronique de fumée de cigarette altère un grand nombre de fonctions immunitaires, dont les réponses immunes innées et adaptatives (Cf. Figure 8). Ces altérations immunes seraient à l'origine de la plupart des conséquences du tabagisme sur la santé humaine et la théorie selon laquelle le tabagisme serait lié à la dégradation de la santé humaine de par ces changements sur les processus immunitaire et inflammatoire est établie depuis les années 70 (Holt, P.G. *et al.*, 1977). Les effets qualitatifs et quantitatifs de la fumée de cigarette sur le système immunitaire dépendraient de la durée de l'exposition ainsi que du sexe et de l'ethnie du sujet, si bien que l'ampleur des changements sur la réponse immunitaire

humorale et cellulaire observés chez l'Homme varie significativement d'une étude à l'autre (Sopori, M., 2002).

Le tabagisme est associé à la fois à la libération et à l'inhibition de médiateurs pro- et anti-inflammatoires. L'inflammation chronique chez le fumeur implique un large réseau de cytokines pulmonaires et systémiques. La fumée de cigarette induit la libération de TNF, du récepteur au TNF, d'IL-1, d'IL-6, d'IL-8 et de GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) dans le sang. A l'inverse, la fumée de cigarette a également été associée à la diminution de la production d'IL-6 *via* les TLR-2 et -9 et d'IL-10 *via* TLR-2, ainsi qu'à la diminution de la production d'IL-1 β , d'IL-2, de TNF et d'IFN- γ par les cellules mononuclées (Arnson, Y. *et al.*, 2010).

3.1.1. Effet sur la réponse innée

La réponse inflammatoire systémique provoquée par la fumée de cigarette est caractérisée par la stimulation du système hématopoïétique, en particulier la moelle osseuse, aboutissant à une augmentation du taux circulant de leucocytes (leucocytose) et de plaquettes (Holt, P.G. *et al.*, 1977).

Parmi les leucocytes, le taux de **neutrophiles** est particulièrement amplifié par la fumée de cigarette (30% de plus chez les fumeurs (Smith, M.R. *et al.*, 2003)) et ce même chez les fumeurs adolescents (suggérant un effet rapide sur la moelle) (Tell, G.S. *et al.*, 1985). Chez les fumeurs de longue date, les neutrophiles présentent des changements phénotypiques (van Eeden, S.F. *et al.*, 2000) et une réduction/altération de leur fonctionnalité. Les neutrophiles circulants des fumeurs semblent avoir perdu une partie de leur capacité migratoire et sont moins réactifs au chimiotactisme (Corberand, J. *et al.*, 1979). Dans les voies respiratoires des fumeurs, les neutrophiles ont une activité enzymatique protéolytique augmentée. Les protéases sécrétées par les neutrophiles stimulent la libération de mucus par les cellules en gobelet et ont un effet destructeur sur les cellules ciliées et sur la matrice extracellulaire. De plus, la nicotine semble capable d'inhiber la formation de radicaux libres par les neutrophiles et de supprimer plusieurs voies inflammatoires liées aux neutrophiles (Arnson, Y. *et al.*, 2010).

D'autre part, la fumée de cigarette altère également les fonctions des **DC** circulantes en diminuant leur production de cytokines Th1 et en favorisant le développement d'une réponse Th2. La capacité de ces cellules à générer une réponse immune Th1 ou Th2 est régulée par de nombreux facteurs parmi lesquels le type et la dose d'antigènes, le taux de molécules de co-stimulation, la présence de cytokines polarisantes et d'autres médiateurs dans le milieu. La fumée de cigarette réduit les activités d'endocytose et de phagocytose des DC circulantes, diminue leur capacité de *priming* et leur capacité à stimuler la réponse des cellules T. Elle diminue également la sécrétion d'IL-10, d'IL-12 et de molécules de co-stimulation par les DC matures (Vassallo, R. *et al.*, 2005). Paradoxalement, il a été montré que la nicotine seule semble avoir l'effet inverse (Aicher, A. *et al.*, 2003). Au niveau de leurs voies respiratoires, les fumeurs chroniques arborent une augmentation caractéristique des cellules de Langerhans (un sous type de DC myéloïdes) (Bratke, K. *et al.*, 2008). De plus, ces cellules pourraient avoir une capacité augmentée à induire la réponse des cellules T mais une capacité diminuée à migrer dans les ganglions lymphatiques drainants.

Les **macrophages** constituent la population cellulaire pulmonaire majeure de défense de première ligne contre les polluants grâce à leur capacité de phagocytose et à leur fonction de

CPA. Le tabagisme chronique provoque un recrutement de macrophages alvéolaires dans la lumière des voies aériennes des fumeurs (Hoser, G. *et al.*, 2003). Les particules de la fumée de cigarette sont visibles au microscope optique dans le cytoplasme des macrophages alvéolaires des fumeurs, même après une courte période d'exposition et persiste jusqu'à 2 ans après l'arrêt de la consommation de tabac (Skold, C.M. *et al.*, 1996). Chez les fumeurs, le nombre et la morphologie des macrophages alvéolaires sont altérés ainsi que leurs fonctions. En général, ils sont moins matures, sur-expriment CD14 (un marqueur de monocytes), et présentent un cytoplasme hyperdense. Les macrophages des poumons de fumeurs ont un effet inhibiteur sur la prolifération des lymphocytes et des cellules NK plus prononcé que les macrophages des non-fumeurs. Ils présentent également un déficit dans leur capacité à tuer les bactéries intracellulaires (Takeuchi, M. *et al.*, 2001), présentent des capacités phagocytaires réduites (King, T.E., Jr. *et al.*, 1988) et produisent moins de cytokines pro-inflammatoires (indispensables à la réponse précoce aux pathogènes) (McCrea, K.A. *et al.*, 1994). Ils sécrètent plus d'enzymes lysosomales (Reynolds, H.Y., 1987) pouvant provoquer des lésions du tissu conjonctif et des cellules du parenchyme pulmonaire. Ces aberrations dans les fonctions des macrophages sont à l'origine du développement de pathologies pulmonaires (infection, bronchite chronique, emphysème, broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO)...) (Sopori, M., 2002).

Le tabagisme étant associé à un risque important de développement de cancer, plusieurs études ont évalué l'impact de la fumée de cigarette sur la fonction des **cellules NK**. Ces cellules sont capables de lyser des cellules étrangères à l'organisme de manière indépendante de l'antigène et sans activation préalable (à la différence des lymphocytes T et B) et sont reconnues pour leur rôle de surveillance dans la croissance tumorale. L'activité des cellules NK circulants de fumeurs est diminuée par rapport à celle des non-fumeurs (Ferson, M. *et al.*, 1979; Phillips, B. *et al.*, 1985; Barbour, S.E. *et al.*, 1997). De même, dans les modèles animaux, la résistance à la croissance de tumeur implantée est diminuée chez les souris exposées à la cigarette (Holt, P.G. *et al.*, 1977). De plus les rats exposés chroniquement à la fumée présentent une fréquence augmentée de tumeur du poumon spontanée (Dalbey, W.E. *et al.*, 1980). L'activité des cellules NK est également diminuée dans les poumons des fumeurs (Takeuchi, M. *et al.*, 1988) (probablement en partie à cause de l'inhibition de la prolifération liée aux macrophages altérés par la fumée de cigarette (Takeuchi, M. *et al.*, 2001)).

3.1.2. Effet sur la réponse adaptative

Une des caractéristiques principales de la réponse adaptative est la production d'anticorps (immunoglobulines (Ig)) produites par les **cellules B**. Plusieurs études ont montré que l'exposition chronique à la fumée de cigarette réduit de 10 à 20% le taux d'immunoglobulines circulantes (IgA, IgG, et IgM) chez l'Homme (Ferson, M. *et al.*, 1979; Carrillo, T. *et al.*, 1991; Barbour, S.E. *et al.*, 1997) tout en présentant un taux d'IgE circulant augmenté (Burrows, B. *et al.*, 1982). Le taux de cellules B circulantes ne semble pas altéré chez le fumeur (Tollerud, D.J. *et al.*, 1989). Les études expérimentales animales ont montré des résultats similaires (Holt, P.G. *et al.*, 1977). L'exposition chronique à la nicotine chez le rat aboutit à l'inhibition de la réponse des cellules B qui deviennent tolérantes à des antigènes normalement immunogènes. De plus, la nicotine inhibe la réponse des cellules B, ce qui corrobore l'observation de la diminution du taux circulant d'anticorps (Geng, Y. *et al.*, 1996). Cependant la fumée de cigarette augmente le taux d'auto-anticorps comme par exemple les anticorps dirigés contre le

facteur nucléaire rhumatoïde (anti-nuclear rheumatoid factors) (Masdottir, B. *et al.*, 2000) ce qui pourrait expliquer au moins partiellement la susceptibilité élevée des fumeurs aux infections et à certaines maladies auto-immunes.

Par ailleurs, les fumeurs présentent également un nombre total de **cellules T** circulantes augmenté (Tanigawa, T. *et al.*, 1998) mais la capacité de prolifération de ces cellules est diminuée (Sopori, M., 2002; Robbins, C.S. *et al.*, 2008). L'augmentation du taux de cellules T semble ne pas concerner toutes les sous-populations de cellules T mais les résultats sont controversés. Une étude montre que chez les fumeurs, le taux des cellules T CD4+ serait augmenté aboutissant à un ratio CD4+/CD8+ (helper/suppresseur) augmenté (Tollerud, D.J. *et al.*, 1989). Des résultats inverses ont néanmoins été observés plus récemment (Barbour, S.E. *et al.*, 1997). Par ailleurs, l'exposition chronique à la nicotine chez le rat aboutit à l'inhibition de la réponse des cellules T. Les cellules T traitées à la nicotine ont une activité réduite et ne répondent plus à la liaison d'un antigène sur leur TCR. Comparées aux cellules T d'animaux non traitées, les cellules T traitées présentent un état d'activation basal suggérant que la fumée de cigarette rendrait les cellules T anergiques et contribuerait à un état d'immunosuppression (Geng, Y. *et al.*, 1996).

3.1.3. Conclusion

D'après les différentes études menées jusqu'alors, la fumée de cigarette semble avoir un impact complexe sur le système immunitaire. Le tabagisme (et la nicotine) semble avoir un rôle ambivalent en promulguant/inhibant d'une part la réponse pro-inflammatoire et d'autre part en altérant la réponse anti-inflammatoire. Ces effets se traduisent par des modifications aussi bien dans la réponse innée que dans la réponse adaptative, que ce soit par la modification du taux de cellules circulantes et résidentes ou par l'altération de leurs fonctions (Cf. Figure 8).

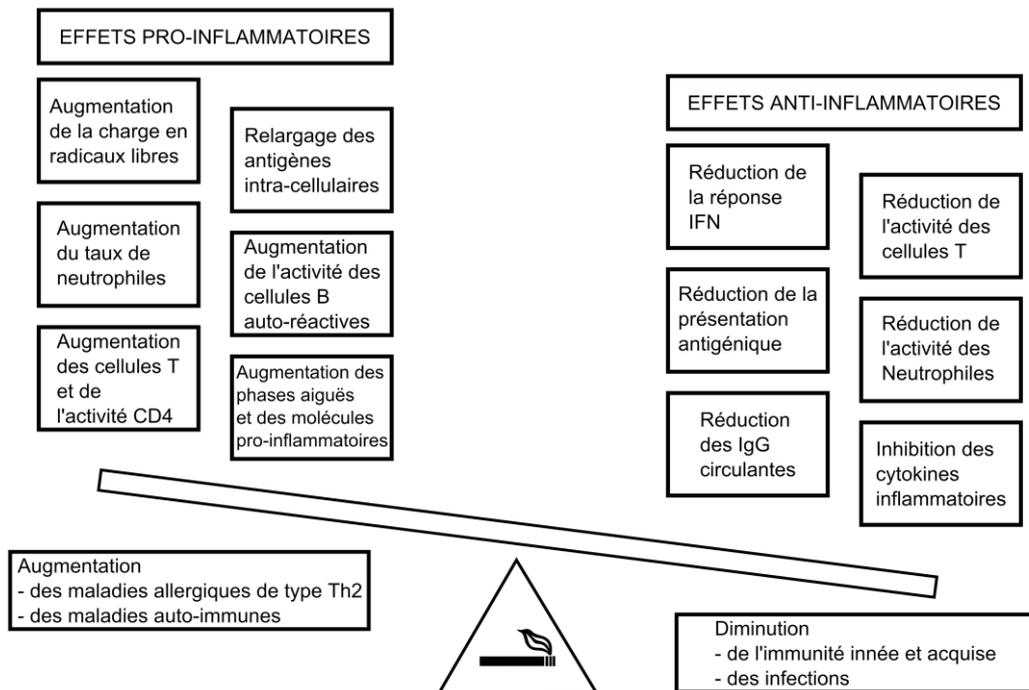


Figure 8 : Effet du tabagisme sur la réponse immunitaire.

D'après Arnson, Y. *et al.*, 2010.

3.2. Tabac et MICI

Le lien entre tabagisme et MICI a été établi pour la première fois en 1982 par Harries *et al.* qui ont remarqué que parmi les patients atteints de RCH seule une petite proportion étaient fumeurs (Harries, A.D. *et al.*, 1982). De nombreuses études menées depuis ont permis de mettre en évidence une forte ambivalence dans le rôle du tabac. En effet, le tabac protège de la RCH et en atténue l'évolution mais aggrave le risque d'apparition de la MC ainsi que son expression clinique, comme présenté dans les chapitres suivants.

De façon originale, le tabagisme est plus fréquent chez les patients présentant une MC (72.8%) que chez ceux présentant une RCH (31.9%) (Bustamante, M. *et al.*, 1998). Le tabagisme pourrait donc être à l'origine de la présentation de l'une ou l'autre des formes de MICI (chez des patients prédisposés génétiquement). Cette hypothèse a été testée dans plusieurs études de cas familiaux avec des résultats concluants.

Ainsi au sein d'une fratrie, la MC survient presque exclusivement chez les fumeurs et la RCH chez les non-fumeurs. L'étude de Bridger *et al.* a porté sur des paires de fratrie atteints de MICI avec une discordance sur la consommation de tabac. Parmi les 89 paires, 23 paires ne présentaient pas la même forme de MICI avec dans 21 % des cas une MC chez le fumeur et une RCH chez le non-fumeur (Bridger, S. *et al.*, 2002).

Ce rôle du tabac a été confirmé dans au moins deux études chez des jumeaux. Dans la première étude (portant sur des jumeaux dont au moins un souffrant de MICI), la fréquence de fumeurs est plus faible chez les jumeaux présentant une RCH (Orholm, M. *et al.*, 2000). Dans la seconde étude, lorsque deux frères jumeaux ont l'un une MC et l'autre une RCH, la MC survient presque toujours chez des fumeurs et la RCH chez des non-fumeurs (Halfvarson, J. *et al.*, 2003).

Ces données suggèrent que le tabagisme orienterait l'expression phénotypique de la maladie vers une MC chez des patients génétiquement prédisposés.

3.2.1. Tabac et MC

Épidémiologie

La MC survient deux fois plus souvent chez les fumeurs : 50 à 60 % des patients sont fumeurs au moment du diagnostic (Cortot, A. *et al.*, 2009).

La première étude mettant en évidence l'association entre le tabac et la MC a été menée par Somerville *et al.* en 1984 et démontre d'une part que les fumeurs sont significativement plus nombreux parmi les patients atteints de MC que parmi les cas contrôles et d'autre part que l'association est plus forte parmi les patients qui fumaient déjà avant le déclenchement de leur maladie (risque relatif pour les fumeurs 4,8 vs. 3,5 pour les non-fumeurs) (Somerville, K.W. *et al.*, 1984). Ces données ont été confirmées dans de nombreuses études par la suite (Franceschi, S. *et al.*, 1987; Tobin, M.V. *et al.*, 1987; Lindberg, E. *et al.*, 1988; Persson, P.G. *et al.*, 1990; Bustamante, M. *et al.*, 1998; Corrao, G. *et al.*, 1998). En résumé, près de 50% (39-72%) des patients atteints de MC sont fumeurs ce qui est plus élevé que les statistiques concernant les fumeurs dans la population (environ 30% de la population française, Cf. Figure 9). Par ailleurs, l'effet de la consommation de cigarette pourrait être dépendant du nombre de cigarette par jour (Lindberg, E. *et al.*, 1992; Cottone, M. *et al.*, 1994; Cosnes, J. *et al.*, 1999).

Lindberg *et al.* ont démontré que les gros fumeurs (plus de 10 cigarettes/jour) ont une MC grêlique plus souvent que les patients fumant moins ($P = 0.045$) (Lindberg, E. *et al.*, 1992).

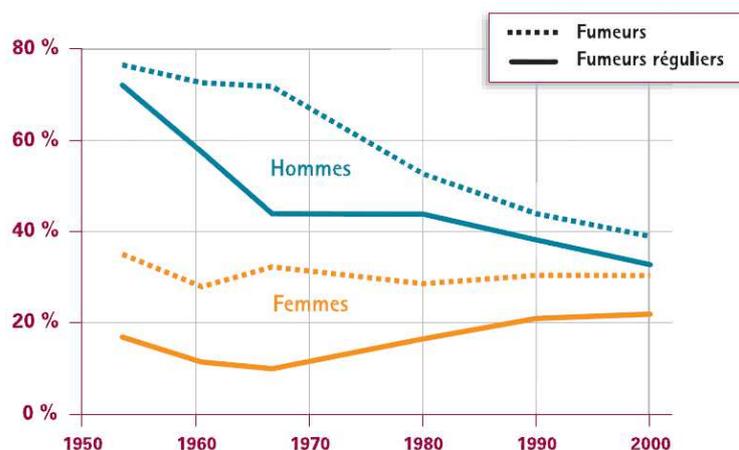


Figure 9 : Évolution de la proportion de fumeurs en France (1950-2000)

Source : Hill C., Laplanche A. Histoire de la consommation de tabac en France. Villejuif : Institut Gustave Roussy, Rapport technique. La Documentation Française 2003.

Une importante méta-analyse menée par Calkins confirme un lien important entre MC et tabagisme avec un odd ratio OR de 2,0 pour les fumeurs comparé aux non-fumeurs atteints de MC (Calkins, B.M., 1989). D'autre part, elle révèle que les anciens fumeurs conservent un risque augmenté de développer une MC avec un OR de 1,8 pour les anciens fumeurs comparés aux non-fumeurs, ce qui n'avait pas été mis en évidence dans les rapports précédents (Tobin, M.V. *et al.*, 1987; Lindberg, E. *et al.*, 1988).

Plusieurs analyses ont été menées sur des différences d'impact du tabagisme en fonction du sexe mais les résultats sont ambigus. Persson *et al.* ont démontré un risque de développer une MC augmenté chez les femmes qui fument (5 fois plus important) comparé aux hommes (fold 1,3) (Persson, P.G. *et al.*, 1990). Ces résultats n'ont pas été décrits dans 2 autres études (Franceschi, S. *et al.*, 1987; Lindberg, E. *et al.*, 1988) et une troisième étude réfute ces résultats (Corrao, G. *et al.*, 1998). Une étude récente de Cosnes *et al.* démontre cependant que le tabagisme serait plus dangereux chez les femmes atteintes de MC que chez les hommes, avec un développement plus précoce et plus sévère de la maladie (Cosnes, J. *et al.*, 2004). L'effet dose dépendant pourrait être par ailleurs exacerbé chez les femmes (Sutherland, L.R. *et al.*, 1990; Breuer-Katschinski, B.D. *et al.*, 1996; Cosnes, J. *et al.*, 1996) mais ces données sont controversées (Timmer, A. *et al.*, 1998; Odes, H.S. *et al.*, 2001).

Impact du tabac sur le comportement et l'évolution clinique de la MC

Le tabagisme est donc un facteur de risque de développer une MC, mais il aggrave également l'évolution de la MC (Cosnes, J., 2010).

Holdstock *et al.* furent les premiers à démontrer que les fumeurs atteints d'une MC colique subissent plus de rechutes et souffrent plus que les non-fumeurs, alors que les fumeurs avec une MC iléale voient leur probabilité d'hospitalisation et de chirurgie augmentée par rapport aux non-fumeurs (Holdstock, G. *et al.*, 1984).

L'ensemble des données collectées à ce jour montrent clairement l'effet délétère du tabac sur l'évolution de la MC (Cf. Figure 10).

Les fumeurs ont significativement plus de symptômes au quotidiens que les non-fumeurs (Kurata, J.H. *et al.*, 1992) et les fumeuses souffrant de MC ont une qualité de vie moins bonne que les non-fumeuses (Russel, M.G. *et al.*, 1996).

Le tabagisme a un impact négatif sur le risque de récurrence et de rechute de la MC et est un facteur de risque indépendant de récurrence clinique (hazard ratio 1.46), chirurgicale (hazard ratio = 2,0), ou endoscopique (OR = 2,2) (Cottone, M. *et al.*, 1994). Le tabagisme est associé à un risque de rechute 2 fois plus élevé (augmentation de l'index d'activité de la MC) chez les patients en rémission (Timmer, A. *et al.*, 1998).

Le tabagisme est également associé à une augmentation des complications intestinales pénétrantes comme le développement de sténoses, d'abcès et de fistules (Lindberg, E. *et al.*, 1992; Mahid, S.S. *et al.*, 2007)

En terme de réponse aux traitements anti-inflammatoires, les fumeurs sont nettement désavantagés avec un taux et une durée de réponse plus faible à l'infliximab et aux anti-TNF que les non-fumeurs (Parsi, M.A. *et al.*, 2002). De plus le tabagisme augmente la nécessité de recourir aux traitements à base de corticostéroïdes et d'immunosuppresseurs (Russel, M.G. *et al.*, 1998; Cosnes, J. *et al.*, 2001). Plus concrètement, dix ans après le diagnostic, 52 % des fumeurs auront été traités avec des immunosuppresseurs contre 24 % des non-fumeurs. Six ans après une résection iléale, 73 % des fumeurs sans traitement immunosuppresseur auront eu une récurrence clinique et 24 % une intervention chirurgicale contre respectivement 40 et 8 % des non-fumeurs (Cortot, A. *et al.*, 2009).

- Diminution de la qualité de vie (chez les fumeuses)
- Augmentation du risque de développement de rechute clinique, chirurgicale et endoscopique
- Augmentation de la sévérité clinique et endoscopique des rechutes
- Risque augmenté de chirurgie précoce
- Effet négatif sur le besoin de corticostéroïdes et d'immunosuppresseurs
- Taux de réponse plus faible et plus court au traitement par infliximab
- Progression de l'inflammation vers des formes fistulisantes ou sténosantes, plus d'abcès et de fistules
- Augmentation du risque d'ostéoporose chez les fumeuses atteintes de MICI

Figure 10 : Effets délétères du tabagisme sur la MC

D'après Birrenbach, T. *et al.*, 2004

Par ailleurs, la fumée de cigarette semble influencer la topographie de la MC, avec une plus grande prévalence des atteintes iléales (Lindberg, E. *et al.*, 1992; Brant, S.R. *et al.*, 2003) et une diminution des atteintes coliques chez les fumeurs (Bustamante, M. *et al.*, 1998; Russel, M.G. *et al.*, 1998). Bridger *et al.* ont montré que, chez les hommes fumeurs atteints de MC, la prévalence de la maladie est plus forte au niveau de l'intestin grêle (OR : 3,68) et que le côlon est protégé (OR = 0,27) (Bridger, S. *et al.*, 2002) bien que ces différences n'ont pas été retrouvées dans l'étude de Cosnes *et al.* (Cosnes, J. *et al.*, 1996). Brant *et al.* ont montré que les patients fumeurs lors du diagnostic avaient un risque élevé d'intervention chirurgicale au niveau de l'iléon, mais pas au niveau du côlon (Brant, S.R. *et al.*, 2003).

Sevrage tabagique & évolution de la MC

Dans le but d'évaluer l'impact de l'arrêt de tabac chez les patients atteints de MC, une importante étude a été menée par Cosnes *et al.* (Cosnes, J. *et al.*, 2001)

Cette étude révèle que le sevrage diminue de moitié le risque de rechutes dès la première année (de la même façon qu'un traitement immunosuppresseur) avec un risque intermédiaire

de l'ordre de 1,7 qui disparaît après 3 à 4 années. L'ensemble des impacts négatifs de la fumée de cigarette sur le développement de la MC est aboli chez les patients qui cessent de fumer, ceux-ci retrouvent alors une évolution clinique similaire aux non-fumeurs (Duffy, L.C. *et al.*, 1990; Lindberg, E. *et al.*, 1992; Cosnes, J. *et al.*, 2001; Brant, S.R. *et al.*, 2003). Une étude récente insiste sur l'importance de l'arrêt du tabac pour réduire le risque de récurrence opératoire (Ryan, W.R. *et al.*, 2004).

3.2.2. Tabac et RCH

Épidémiologie

Contrairement à la MC, le tabagisme a un impact bénéfique sur la RCH. La méta-analyse réalisée par Calkins *et al.* révèle un OR de 0,41 pour les fumeurs comparés aux non-fumeurs traduisant une corrélation négative entre tabac et RCH (Calkins, B.M., 1989). Plusieurs études épidémiologiques ont obtenu des données similaires dans différentes populations (Gyde, S. *et al.*, 1982; Vessey, M. *et al.*, 1986; Samuelsson, S.M. *et al.*, 1991; Tysk, C. *et al.*, 1992).

La RCH est 2,5 fois moins fréquente chez les fumeurs, avec un risque de développer la maladie réduit de 40% par rapport aux sujets n'ayant jamais fumé (Harries, A.D. *et al.*, 1982). Environ 10 % des patients sont fumeurs au moment du diagnostic contre 25 à 40 % dans une population adulte appariée (Tobin, M.V. *et al.*, 1987; Lindberg, E. *et al.*, 1988; Corrao, G. *et al.*, 1998).

Ce rôle bénéfique n'est que transitoire puisque le risque de RCH n'est pas diminué chez les anciens fumeurs, qui présentent même une augmentation de 70% de développer la maladie surtout dans les 2 ans suivant le sevrage (OR = 1,64 d'après Calkins, B.M., 1989).

Cet effet protecteur est corrélé positivement à la quantité de cigarettes consommées (Nakamura, Y. *et al.*, 1994) (contesté par Silverstein, M.D. *et al.*, 1994) et semble plus important chez les hommes. Par ailleurs, les effets protecteurs du tabagisme passif restent controversés.

Impact du tabac sur le comportement et l'évolution clinique de la RCH

En plus de réduire le risque d'apparition de la RCH, le tabagisme est lié à une amélioration de la maladie chez les patients ayant déclaré la maladie.

La RCH est moins sévère chez les fumeurs : le tabagisme est associé à une amélioration des symptômes (Rudra, T. *et al.*, 1989; Green, J.T. *et al.*, 1998), des troubles intestinaux plus modérés (Russel, M.G. *et al.*, 1996) avec une diminution de la fréquence des poussées (Fraga, X.F. *et al.*, 1997) et à une maladie moins extensive (Odes, H.S. *et al.*, 2001) (les fumeurs développent moins souvent de pancolite (Mokbel, M. *et al.*, 1998)). Chez les fumeurs, les traitements à base de corticothérapie orale sont moins souvent nécessaires (Mokbel, M. *et al.*, 1998) et le taux d'hospitalisation est diminué (Boyko, E.J. *et al.*, 1988; Odes, H.S. *et al.*, 2001) ainsi que le risque de colectomie (Fraga, X.F. *et al.*, 1997; Mokbel, M. *et al.*, 1998; Odes, H.S. *et al.*, 2001).

Certaines études n'ont pas retrouvé l'ensemble de ces effets bénéfiques. En particulier, les associations entre tabagisme et diminution des interventions chirurgicales n'ont pas systématiquement pu être mises en évidence (Benoni, C. *et al.*, 1984; Boyko, E.J. *et al.*, 1988;

Moum, B. *et al.*, 1997; Medina, C. *et al.*, 1998) ainsi que celles entre tabagisme et nécessité de traitement immunosuppresseurs ou corticostéroïdes (Odes, H.S. *et al.*, 2001).

Sevrage tabagique & évolution de la RCH

L'ensemble des données épidémiologiques suggèrent fortement que l'arrêt du tabac aggrave la pathologie et sa reprise l'améliore (Cosnes, J., 2004; Cortot, A. *et al.*, 2009).

Une étude récente de Beaugerie *et al.* montre que les patients atteints de RCH qui cessent de fumer voient la sévérité de leur maladie augmenter (augmentation de la fréquence d'années avec une maladie active, d'années avec hospitalisation et d'années avec une thérapie médicale majeure dont la corticothérapie orale et intraveineuse). De plus, le recours à l'azathioprine est plus fréquent et plus long chez les ex-fumeurs comparé aux fumeurs. Par contre, l'arrêt du tabac n'a pas d'impact sur le taux de colectomie (Beaugerie, L. *et al.*, 2001).

Des études ont été menées concernant le temps nécessaire entre l'abandon du tabac et la dégradation des symptômes de la RCH. Elles ont démontré que plus de 50% des patients qui cessent de fumer développent des symptômes dans les 3 ans suivant l'arrêt avec un pic la première année (Motley, R.J. *et al.*, 1987; Green, J.T. *et al.*, 1998; Abraham, N. *et al.*, 2003).

D'autre part, le risque de développer une RCH est augmenté chez les personnes qui cessent de fumer (OR = 1,64 d'après Calkins, B.M., 1989). Dans un tiers des cas d'ex-fumeurs qui développent une RCH le diagnostic survient dans les 2 ans suivant l'arrêt avec un temps de latence moyen de 6,4 ans (Lindberg, E. *et al.*, 1988). Le rapport de Boyko *et al.* estime que le risque de contracter une RCH est le plus élevé entre 4 et 6 ans après l'arrêt de tabac (Boyko, E.J. *et al.*, 1987).

Il est difficile de concevoir un mécanisme par lequel l'arrêt du tabac impacterait sur le risque de développer une RCH, surtout après plusieurs années. Néanmoins, l'hypothèse selon laquelle le tabagisme protège de la RCH ou au moins retarde son apparition est confortée par le fait que les hommes non-fumeurs développent la maladie à un plus jeune âge que les patients fumeurs ou ex-fumeurs (Motley, R.J. *et al.*, 1988; Cosnes, J. *et al.*, 2004).

Essais cliniques de la nicotine sur la RCH

La nicotine est des composants actifs majeurs de la fumée de cigarette et a donc été suggérée comme un agent protecteur actif dans l'effet protecteur observé lors de la RCH. Les mécanismes à l'origine de l'effet de la nicotine pourraient être des changements dans l'immunité humorale et cellulaires, dans les niveaux d'expression des cytokines et des eicosanoïdes, du mucus au niveau du côlon, des radicaux libres de l'oxygène et dans la perméabilité et la motilité intestinale et la pression sanguine (Birrenbach, T. *et al.*, 2004). Bien que le mécanisme d'action exact de la nicotine ne soit pas véritablement déterminé, la nicotine a néanmoins été testée dans plusieurs essais thérapeutiques. En effet, 50% des fumeurs intermittents avec une RCH rapportent que fumer 20 cigarettes par jour pendant 6 semaines améliore leur symptômes (Rudra, T. *et al.*, 1989). Des essais thérapeutiques ont été entrepris en utilisant des chewing-gums à base de nicotine ou de la nicotine sous forme transcutanée ou orale.

Chewing-gums

Les études cliniques utilisant des chewing-gums à base de nicotine n'ont pas mené à des résultats concluants. Bien que quelques études aient initialement rapporté des effets bénéfiques à l'utilisation de chewing-gums chez des ex-fumeurs ayant une RCH active, ces effets n'ont pas été retrouvés chez des patients non-fumeurs (Perera, D.R. *et al.*, 1984; Lashner, B.A. *et al.*, 1990; Watson, J.P. *et al.*, 1995).

Nicotine transcutanée

L'application de patch délivrant de la nicotine de façon transcutanée aboutit une augmentation de la concentration de nicotine plasmatique directement proportionnelle à la dose de nicotine reçue par des fumeurs (Bannon, Y.B. *et al.*, 1989). Des patchs de nicotine ont donc été testés dans de nombreux essais cliniques sur des patients atteints de RCH.

L'étude de Pullan *et al.* a testé l'effet de patchs nicotiniques (vs. placebo) sur 72 patients sur une période de 6 semaines (avec en traitement de fond une thérapie standard (mesalamine +/- glucocorticoïdes). Les patients des 2 groupes (nicotine et placebo) ont perçu une amélioration. Néanmoins l'amélioration clinique et histologique était meilleure dans le groupe traité avec la nicotine. De plus, une rémission complète a été observée chez 17/35 patients traités à la nicotine contre seulement 9/37 traités au placebo (Pullan, R.D. *et al.*, 1994). Des résultats similaires ont été obtenu avec de la nicotine transcutanée à la dose tolérée maximum sur une période de 4 semaine avec un effet bénéfique pour 39% des patients traités avec des patchs de nicotine contre 9% des patients traités avec le placebo. Néanmoins aucune amélioration histologique n'a été observée (Sandborn, W.J. *et al.*, 1997).

Deux études ont été menées en comparant la nicotine transcutanée (6 semaines) et la prednisolone orale (5 semaines) et n'ont montré aucune différence significative entre les 2 groupes, avec même une tendance à une meilleure efficacité de la corticothérapie remettant en cause l'utilité d'un traitement à base de nicotine (Thomas, G.A. *et al.*, 1996; Guslandi, M. *et al.*, 1998).

Une étude plus récente de McGrath *et al.* démontre que la nicotine transcutanée permet d'obtenir l'induction de la rémission chez des patients présentant une RCH active mais n'a identifié aucun avantage significatif à l'utilisation de nicotine par rapport aux traitements médicaux standards (corticostéroïdes ou mésalazine), d'autant que les effets secondaires de la nicotine sont importants et limitent son utilisation (McGrath, J. *et al.*, 2004).

L'impact d'un traitement à base de nicotine transcutanée a également été testé pour maintenir les patients atteints de RCH en phase de rémission mais aucun effet bénéfique n'a pu être observé après une période de 6 mois (Thomas, G.A. *et al.*, 1995). Néanmoins, une étude portant sur le maintien de la rémission chez des patients avec une RCH distale a suggéré qu'un traitement à base de mésalazine et de nicotine transcutanée induit des périodes de rémission plus longues qu'un traitement à base de mésalazine et de prednisolone orale (Guslandi, M., 1999).

D'autres études semblent donc nécessaires pour trancher sur l'utilisation transcutanée de la nicotine en tant qu'agent thérapeutique dans la RCH, d'autant que ses effets secondaires ne sont pas négligeables. Bien que modérés, ils sont fréquemment observés (>50% des cas) surtout chez les non-fumeurs (comparés aux ex-fumeurs). Les principaux effets secondaires de la nicotine transcutanée comporte des dermatites de contact, des nausées et vomissements,

des étourdissements, des maux de tête, des perturbations du sommeil, la stimulation du système nerveux central, des tremblements et de la tachycardie. Ces effets peuvent être réduits en administrant des doses initiales faibles et en augmentant progressivement le dosage. Aucune addiction n'a pu être observée, ce qui est cohérent avec la théorie selon laquelle l'administration transcutanée ne provoque pas le pic de taux plasmatique de nicotine observé lors de la consommation de tabac qui serait à l'origine de la dépendance (Thomas, G.A. *et al.*, 1995).

Autres voies d'administration de la nicotine

Pour réduire ces effets secondaires, en particulier l'irritation locale causée par les patches, d'autres formes d'administration ont été testées en particulier une formulation orale avec un délai de relargage et les lavements intra-rectaux.

Après administration topique (*i.e.* transcutanée) environ 60% de la nicotine est métabolisée en cotinine dû à l'effet de premier passage hépatique diminuant la dose systémique de nicotine à l'origine des effets secondaires. La formulation orale à base de tartrate de nicotine permettant une libération différée aboutit à une biodisponibilité de 40% de la nicotine (75%–90% de biodisponibilité en patch) (Compton, R.F. *et al.*, 1997).

Deux études préliminaires sur des patients avec une RCH distale active montrent que les lavements intra-rectaux avec du tartrate de nicotine ou de la nicotine complexée avec un carbomère polyacrylique sont cliniquement efficaces malgré un taux sérique de nicotine indétectable et entraînent des effets secondaires minimes (Green, J.T. *et al.*, 1997; Sandborn, W.J. *et al.*, 1997; Ingram, J.R. *et al.*, 2004; Ingram, J.R. *et al.*, 2008). Néanmoins cette forme d'administration n'est pas aisément concevable et des études cliniques supplémentaires semblent nécessaires pour déterminer la place de cette molécule dans l'arsenal thérapeutique.

3.3. Les mécanismes à l'origine des effets ambivalents du tabac dans les MICI

Les mécanismes d'action à l'origine de l'effet ambivalent du tabac sont à ce jour très mal connus. La complexité de la composition de la fumée de cigarette qui peut contenir plusieurs milliers de substances différentes (nicotine, radicaux libres, CO, etc...) ne facilite pas l'identification d'un processus en particulier.

Malgré une littérature relativement abondante, il est à l'heure actuelle impossible de définir quelles sont les propriétés immuno-modulatrices précises au tabac (pro- vs. anti-inflammatoire) compte tenu de la variabilité des différentes études concernant les organes, cellules et composants de la fumée de cigarette étudiés. D'autre part, il semblerait que la fumée de cigarette ou ses composants puissent agir à différents niveaux comme la couche de mucus, la production de cytokines et d'éicosanoïdes, la fonction des macrophages (cellules immunitaires) et la micro-vascularisation. Aucun des mécanismes proposés à ce jour ne permet à lui seul d'offrir une explication satisfaisante quant à l'ambivalence du tabagisme dans la MC et la RCH (Cosnes, J., 2010).

3.3.1. Effet du tabac sur l'inflammation intestinale chez les patients atteints de MICI

Au cours de la RCH, l'épaisseur de mucus au niveau colique est significativement diminuée et la perméabilité intestinale augmentée (Pullan, R.D., 1996). Le tabac pourrait avoir un effet protecteur en augmentant l'épaisseur du mucus et réduisant ainsi la perméabilité colique. La nicotine semble capable d'augmenter *ex vivo* la synthèse de mucines sur des biopsies coliques de patients atteints de RCH (Finnie, I.A. *et al.*, 1996) mais l'administration transcutanée de nicotine chez des patients atteints de RCH et non-fumeurs n'a pas d'effet sur la transcription des gènes codants les mucines (Louvet, B. *et al.*, 1999).

La fumée de cigarette, ou du moins la nicotine semble générer une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires probablement *via* le blocage de la prolifération des cellules T, orientant ainsi la réponse cytokinique. Il semblerait que la nicotine soit capable d'induire une diminution de la synthèse d'IL-8 dans la muqueuse colique (Louvet, B. *et al.*, 1999). Sher *et al.* ont montré que la concentration en IL-8 dans les biopsies muqueuses d'individus sains était plus élevée chez les fumeurs que chez les non-fumeurs. A l'inverse, dans la muqueuse des patients atteints de MC, l'IL-8 est diminué chez les fumeurs comparé aux non-fumeurs. De même chez les patients atteints de RCH, les concentrations d'IL-1 β et d'IL-8 sont significativement diminuées chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs (Sher, M.E. *et al.*, 1999).

Par ailleurs, le tabac augmente la production muqueuse de radicaux libres (probablement à l'origine de lésions inflammatoires). Ces radicaux libres sont habituellement modulés par la présence d'antioxydants tels que la vitamine C, le β -carotène et l' α -tocophérol qui sont par ailleurs souvent diminués chez les fumeurs (Cortot, A. *et al.*, 2009).

3.3.2. Effet du tabac sur l'inflammation intestinale dans les modèles animaux

Bien qu'un grand nombre d'études épidémiologiques aient été menées sur l'effet du tabagisme dans les MICI, assez peu d'études expérimentales se sont penchées sur les mécanismes des effets de la fumée de cigarette au niveau du tractus intestinal et sur l'inflammation en particulier.

La fumée de cigarette contient plus de 4500 molécules chimiques, la plupart d'entre elles étant toxiques et interférant avec le système immunitaire. Parmi ces molécules, la nicotine, le CO, le NO sont connus pour leur capacité immuno-régulatrices et sont des médiateurs potentiels des MICI, mais d'autres constituants pourraient également interagir avec l'immunité et les fonctions intestinales (Mehta, H. *et al.*, 2008).

Le problème majeur rencontré par le monde scientifique dans l'étude des interactions entre la fumée de cigarette et l'intestin est de trouver un bon modèle d'étude. D'une part, les études sur les humains sont complexes et la conception des études cliniques demande les définitions des statuts de fumeurs et non-fumeurs qui sont parfois variables entre les études. De plus d'autres paramètres peuvent interférer avec les études comme les traitements médicaux utilisés ou la classe sociale des patients. D'autre part, des études *in vitro* sur des lignées cellulaires ou *ex vivo* en utilisant des cellules issues de patients peuvent être menée en soumettant ces cellules à des extraits de fumée. Bien que ce genre d'études soit plus

facilement standardisable, il ne reflète pas nécessairement la réalité clinique et des différences de reproductibilité entre les différents laboratoires et les techniques utilisées rendent les résultats difficiles à interpréter. La dernière possibilité pour étudier l'impact de la cigarette sur l'intestin est l'utilisation de modèles animaux permettant d'induire une inflammation au niveau intestinal.

La recherche dans ce domaine souffre grandement de l'absence d'un modèle expérimental validé permettant l'étude de l'influence du tabac sur l'inflammation intestinale. En effet, une grande variabilité expérimentale est constatée dans la littérature (Verschuere, S. *et al.*, 2012).

D'une part, les différentes études dans ce domaine utilisent des modèles différents pour induire l'inflammation intestinale (DSS, TNBS, oxazolone...). Ces modèles sont certes tous reconnus pour présenter des similitudes avec l'inflammation retrouvée au niveau de la muqueuse des patients atteints de MICI. Cependant les mécanismes induisant l'inflammation sont spécifiques à chaque modèle ce qui rend difficile la comparaison des résultats entre les différents modèles (exemple : DSS vs. oxazolone).

D'autre part, les protocoles utilisés pour tester les effets du tabagisme sont très hétérogènes, allant de l'administration d'un composant *per os* (nicotine, dioxine...) à l'exposition à la fumée de cigarette (Cf. Figure 11). Dans les descriptions méthodologiques, il est parfois difficile de discerner clairement les protocoles pouvant être assimilés à du tabagisme actif (dont la fumée est extraite au travers du filtre) aux protocoles de tabagisme passif (dont la fumée provient de l'extrémité incandescente de la cigarette). Reproduire la consommation de fumée chez les animaux est techniquement compliquée et génère un biais dans les expérimentations (stress de conditionnement, exposition de tout l'animal à la fumée...). Par ailleurs, les protocoles mis en place sont très variables d'une étude à l'autre à plusieurs niveaux (ratio air/fumée, durée d'exposition, quantité de cigarette, type de cigarette... ; Cf. Figure 11) rendant la comparaison des résultats ardue.

	Voie d'administration	Durée d'exposition	Animaux	références
Nicotine	PO ; 12,5-250 µg/mL	2-3 semaines	Souris, rat	Eliakim, R. <i>et al.</i> , 2002 Eliakim, R. <i>et al.</i> , 2001 Eliakim, R. <i>et al.</i> , 1998 Eliakim, R. <i>et al.</i> , 2003
	PO ; 5-100 µg/mL	2 semaines	Rat	Sykes, A.P. <i>et al.</i> , 2000
	PO ; 20 µg/mL	15 jours	Souris	Ghia, J.E. <i>et al.</i> , 2006
	PO ; 10-60 µg/mL	17 jours	Rat	Galeazzi, F. <i>et al.</i> , 1999
	SC ; 0,5 – 2 mg/kg/jour	2 semaines	Lapin	Zijlstra, F.J. <i>et al.</i> , 1994
	SC ; 7,5 – 2 mg/kg ; 2 jours	5 jours	Souris	Galitovskiy, V. <i>et al.</i> , 2011
	PO ; 25-200 µg/mL puis SC ; 200 µg/jour	8 jours PO puis 2 semaines SC	Souris	Van Dijk, J.P. <i>et al.</i> , 1995
IP ; 0,04-0,4 mg/kg	7 jours	Souris	Snoek, S.A. <i>et al.</i> , 2010	
Fumée de cigarette	5-40 bouffées/jour	1-2 fois par jour, 17 jours	Rat	Galeazzi, F. <i>et al.</i> , 1999
	2-4% dans l'air	1h/jour, 3-11 jours	Rat, souris	Ko, J.K. <i>et al.</i> , 2005 Guo, X. <i>et al.</i> , 2001 Guo, X. <i>et al.</i> , 1999 Guo, X. <i>et al.</i> , 2001 Sun, Y.P. <i>et al.</i> , 2007 Ko, J.K. <i>et al.</i> , 2001 Liu, E.S. <i>et al.</i> , 2003
	Ratio 1:6 (fumée/air)	30 min 4 fois par jour, 24 semaines	Souris	Verschuere, S. <i>et al.</i> , 2011

Figure 11 : Variabilité des protocoles expérimentaux dans les modèles animaux

PO : per os, SC sous-cutanée, IP intra-péritonéale. D'après Verschuere, S. *et al.*, 2012.

Comme détaillé dans ce manuscrit, les principaux résultats obtenus dressent une controverse importante sur les effets immuno-régulateurs de la fumée de cigarette et de la nicotine (pro- vs. anti-inflammatoire) au niveau de l'intestin.

Études expérimentales portant sur la nicotine

Plusieurs études expérimentales ont été menées en utilisant la nicotine, en partant du principe qu'il s'agit du composé actif principal de la fumée de cigarette. Ces études utilisent plusieurs voies d'administration (orale, sous-cutanée, intrapéritonéale) avec différentes posologies dans différents modèles animaux (Cf. Figure 12). Les résultats sont donc difficiles à compiler et l'extrapolation au contexte clinique chez l'Homme est périlleuse. Une polémique subsiste en particulier concernant les voies d'administration de la nicotine et leur efficacité à mimer l'inhalation de fumée par l'Homme.

La plupart des études menées utilisent la nicotine en administration orale dans l'eau de boisson (Eliakim, R. *et al.*, 1998; Sykes, A.P. *et al.*, 2000; Eliakim, R. *et al.*, 2001; Ghia, J.E. *et al.*, 2006) et démontrent un effet de la nicotine dose dépendant et organe dépendant (bénéfique sur le côlon / délétère sur l'intestin grêle).

Dans le modèle de colite induite au TNBS chez le rat, la nicotine par voie orale diminue les lésions au niveau macroscopique et histologique ainsi que l'activité MPO (Eliakim, R. *et al.*, 1998; Sykes, A.P. *et al.*, 2000). Elle n'a pas d'effet sur l'activité de iNOS, la production de PGE2 et d'IL-1 β mais augmente le taux de Leucotriène B4 (LTB4, un éicosanoïde pro-inflammatoire) (Eliakim, R. *et al.*, 1998). Ces effets sont plus évidents après administration de doses modérées de nicotine, les doses plus importantes ont moins d'impact (Sykes, A.P. *et al.*, 2000) allant jusqu'à provoquer un effet délétère (Eliakim, R. *et al.*, 1998).

D'autre part, les mêmes auteurs ont pu montrer que l'administration chronique de nicotine (dans les modèles de colites induites au TNBS ou à l'iodoacétamide) à une dose protectrice pour le côlon aggrave l'inflammation du jéjunum induite par l'iodoacétamide (Eliakim, R. *et al.*, 2001). Les mêmes conclusions ont pu être tirées en utilisant un modèle d'inflammation du jéjunum et du côlon chez des souris IL-10 $^{-/-}$ (Eliakim, R. *et al.*, 2002).

Ces différences suggèrent que certains mécanismes de défenses de la muqueuse pourraient varier entre l'intestin grêle et le côlon. En effet, dans le jéjunum de rat sain, l'administration chronique de nicotine diminue la production de PGE2 et augmente l'activité iNOS mais n'a pas d'effet sur la microcirculation. À l'inverse dans le côlon de rat sain, la nicotine provoque une augmentation de la microcirculation mais n'a pas d'effet sur l'activité iNOS, ni sur la production de PGE2 (Eliakim, R. *et al.*, 2001). L'administration de nicotine a également un effet différent sur la production de cytokines au niveau du jéjunum et du côlon chez le rat sain. L'administration de nicotine diminue la production d'IL-2 et d'IL-10 et augmente l'IL-6 au niveau du jéjunum alors qu'elle augmente la production d'IL-2 dans le côlon, sans impact sur les taux d'IL-10 et d'IL-6. Par ailleurs les rats traités à la nicotine présentent des taux sanguin d'IL-6 et d'IL-2 plus bas que les rats contrôles (Eliakim, R. *et al.*, 2003). Ces données mettent clairement en évidence des différences de réponse immune locales dans l'intestin mais n'expliquent cependant pas les résultats expérimentaux détaillés plus haut (effet bénéfique dans le côlon vs. délétère dans le grêle)

D'autres mécanismes d'action de la nicotine ont été proposés pour expliquer cet effet ambivalent sur le côlon et l'intestin grêle.

Chez la souris IL10^{-/-}, la nicotine augmente significativement l'expression de somatostatine et d'ITL (*intestinal trefoil factor*) dans le côlon mais pas dans le jéjunum. L'expression de la mucine-2 n'est pas altérée par la nicotine (Eliakim, R. *et al.*, 2002). La somatostatine est un neuropeptide qui inhibe de nombreuses fonctions immunes (*i.e.* inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires) et stimule la production intestinale de mucus. ITF est un facteur sécrété par la muqueuse intestinale qui augmente la viscosité du mucus et permet la cicatrisation de l'épithélium. Le rôle anti-inflammatoire de la nicotine pourrait donc provenir d'une part de son effet sur la production de somatostatine aboutissant à une inhibition de la réponse immune (Sopori, M.L. *et al.*, 1998) et d'autre part de la stimulation de la production de mucus à l'origine de la protection de l'épithélium (Eliakim, R. *et al.*, 2002).

L'étude de Ghia *et al.* propose un mécanisme d'action de la nicotine mettant en jeu la voie cholinergique anti-inflammatoire. Les souris ayant subi une vagotomie sont plus sensibles aux colites induites par le DSS et DNBS avec une augmentation du score macroscopique et histologique, de l'indice d'activité de la maladie (DAI), de l'activité MPO et de l'expression dans le côlon des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF). L'administration orale de nicotine protège de la colite les souris ayant subi une vagotomie (ainsi que les souris contrôles). A l'inverse, le traitement à l'hexaméthonium (antagoniste de nAChR) aggrave la colite chez les souris contrôles. Ces données suggèrent que le nerf vague pourrait jouer un rôle anti-inflammatoire impliquant les récepteurs nicotiques nAChR (Ghia, J.E. *et al.*, 2006). Ainsi la nicotine semble jouer le même rôle que l'acétylcholine libérée par le nerf vague ce qui explique son action de protection des souris contre la colite (par diminution l'activité des macrophages).

Toutes les études présentées plus haut sont en accord pour proposer un effet bénéfique de l'administration orale de nicotine dans les modèles de colites expérimentales. D'autres voies d'administration ont par ailleurs été testées avec des résultats différents.

L'étude de Galitovskiy *et al.* compare l'administration sous-cutanée de nicotine dans deux modèles de colite. D'une part, la nicotine atténue la colite à l'oxazolone chez la souris, avec une augmentation du taux des cellules Treg et une diminution du taux des cellules Th17 dans le côlon. D'autre part, la nicotine aggrave la colite au TNBS et est associée à une augmentation des cellules Th17 parmi les cellules T CD4⁺ du côlon. Cette action ambivalente résulte de la régulation de l'expression du récepteur $\alpha 7$ -AChR sur les cellules T CD4⁺ en fonction des cytokines présentes dans le milieu. Le récepteur est surexprimé par les cellules T CD4⁺ dans l'inflammation liée à l'oxazolone (caractérisée par de fort taux d'IL-4) et est sous-exprimé dans l'inflammation liée au TNBS (caractérisée par de fort taux d'IL-12) (Galitovskiy, V. *et al.*, 2011). Ces données pourraient expliquer l'ambivalence observée chez les patients atteints de MICI puisque les caractéristiques de la RCH et de la MC diffèrent de par leur type de réponse immune globale (Th1/Th2).

Dans l'étude de Snoek *et al.*, l'administration intra-péritonéale quotidienne de nicotine est comparée à l'injection de 2 agonistes du récepteur $\alpha 7$ -AChR (AR-R17779 ou GSK1345038A) dans 2 modèles de colite (DSS et TNBS) chez la souris. Cette étude confirme, tout d'abord, que la nicotine et les 2 agonistes testés réduisent le taux de cytokines pro-inflammatoires *ex vivo* dans du sang total et dans des cultures de macrophages. Dans le modèle de colite au DSS, la nicotine réduit la production d'IL-6 et IL-17 dans le côlon mais n'altère pas les paramètres

cliniques de l'inflammation. Paradoxalement, les agonistes du récepteur $\alpha 7$ -AChR aggravent tous les deux la colite et l'agoniste AR-R17779 augmente l'expression colique du TNF, de l'IL-6 et de l'IL-17. Aucun impact des deux agonistes du récepteur $\alpha 7$ -AChR n'a été obtenu dans le modèle de colite au TNBS. Les auteurs concluent de cette étude que, les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* avec les agonistes du récepteur $\alpha 7$ -AChR sont difficilement comparables et qu'ils diffèrent également en fonction du modèle d'inflammation intestinal utilisé et préconise la prudence concernant le ciblage thérapeutique du récepteur $\alpha 7$ -AChR dans le traitement des MICI (Snoek, S.A. *et al.*, 2010).

Études expérimentales portant sur la fumée de cigarette

Plusieurs études ont mis en place une exposition à la fumée de cigarette de rats ayant une colite induite au TNBS ou au DNBS. Selon ces études, la fumée de cigarette aggrave (Galeazzi, F. *et al.*, 1999; Guo, X. *et al.*, 1999) ou améliore (Ko, J.K. *et al.*, 2001) la colite induite par ces haptènes.

L'étude menée par Galeazzi *et al.* est la seule à décrire un modèle d'exposition à la fumée utilisant un dispositif permettant d'imiter le tabagisme humain. Les rats sont placés dans une chambre d'exposition spécialisée et la fumée est générée de façon rythmique. Dans ce modèle, l'exposition aboutit à l'aggravation de la colite induite au DNBS. Cette aggravation est neutralisée par l'administration d'Hexaméthonium (un antagoniste de nAChR) ce qui suggère que les effets liés à la fumée de cigarette impliquent une voie de signalisation neuronale (Galeazzi, F. *et al.*, 1999).

L'aggravation de la colite au TNBS chez le rat par la fumée de cigarette a été rapidement confirmée par l'étude de Guo *et al.* Cette étude montre que le tabagisme passif accentue l'infiltrat des neutrophiles dans la muqueuse ainsi que la production de radicaux libres. Ainsi l'exposition à la fumée de cigarette accentue l'augmentation due au TNBS de l'activité myéloperoxydase (MPO), du taux LTB4 et de l'activité de l'oxyde nitrique synthase iNOS (un catalyseur de la synthèse du NO), tous trois à l'origine des lésions intestinales. Néanmoins, l'exposition à la fumée augmente l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) qui détruit les radicaux libres. Les effets délétères de la fumée dans ce modèle sont diminués après traitement avec la cyclosporine A (un immunosuppresseur), la NG-Nitro-L-arginine méthylester (un inhibiteur d'iNOS) et avec le DMSO (un piège à radicaux libres) (Guo, X. *et al.*, 1999).

Un des mécanismes sous-jacents à l'effet délétère du tabac dans ce modèle serait lié à l'augmentation de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) par les neutrophiles activés en infiltrés au niveau du côlon sous l'action du LTB4 (induisant chimiotactisme et activation des neutrophiles) (Guo, X. *et al.*, 2001). Ces résultats sont cohérents avec certaines observations faites chez les patients souffrant de MICI. En effet, les lésions muqueuses chez ces patients sont liées à un stress oxydatif (Simmonds, N.J. *et al.*, 1992; McKenzie, S.J. *et al.*, 1996; Holmes, E.W. *et al.*, 1998) et des ROS générés lors de ce stress oxydatif sont produits de façon excessive dans le côlon inflammé chez l'Homme (Keshavarzian, A. *et al.*, 1992) et le rat (Millar, A.D. *et al.*, 1996). Par ailleurs, la provenance principale de ces ROS chez l'Homme semble également être les neutrophiles (Suematsu, M. *et al.*, 1987).

Un autre mécanisme potentiel dans ce modèle serait lié à l'action de la cyclooxygénase-2 (COX2). COX-2 est une enzyme pro-inflammatoire qui permet la formation des prostaglandines. Son expression est augmentée dans le côlon suite au traitement par le TNBS

et cette augmentation est aggravée par la fumée de cigarette. Les inhibiteurs de la COX2 protègent de la colite au TNBS et atténuent l'impact négatif de la cigarette dans ce modèle. L'augmentation de COX-2 (et donc des prostaglandines) serait donc un des mécanismes à l'origine de l'effet délétère du tabac dans la colite (Guo, X. *et al.*, 2001).

Plus récemment, Sun *et al.* ont démontré que l'effet délétère de la fumée de cigarette (dans le modèle TNBS chez le rat) est lié à une augmentation de l'expression du récepteur $\alpha 7$ -AchR dans le côlon (Sun, Y.P. *et al.*, 2007).

Le système nerveux périphérique a une implication majeure dans la régulation de l'immunité *via* la voie « cholinergique anti-inflammatoire ». Brièvement, le nerf vague est à l'origine de la libération en périphérie d'acétylcholine, un neurotransmetteur reconnu par le récepteur $\alpha 7$ -AchR qui est exprimé par les macrophages, les cellules T et les cellules B. L'activation de ce récepteur par la nicotine réduit la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (TNF, IL-1 β et IL-6) supprimant ainsi la réponse inflammatoire Th1/Th17 sans impacter sur leur réponse Th2 (IL-10) (Borovikova, L.V. *et al.*, 2000). De plus, $\alpha 7$ -AchR est exprimé à la surface des cellules T CD4+ et est surexprimé lors de leur activation. La nicotine réduit la prolifération des cellules T activées ainsi que leur production de cytokines Th1 (TNF et IFN- γ) et Th17 (IL-17, IL-17F, IL-21, et IL-22) tout en augmentant leur production d'IL-4 indiquant un passage vers une lignée Th2 (Nizri, E. *et al.*, 2009). Le récepteur $\alpha 7$ -AchR est essentiel à la mise en place de la voie anti-inflammatoire liée au nerf vague (Wang, H. *et al.*, 2003). La stimulation électrique du nerf vague aboutit par ailleurs à une protection contre la colite au TNBS chez le rat, avec réduction de l'infiltrat de neutrophiles (Meregnani, J. *et al.*, 2011).

En toute logique, la nicotine provenant de la fumée de cigarette étant reconnue par le récepteur $\alpha 7$ -AchR, elle devrait conduire à une diminution de la réponse pro-inflammatoire des macrophages et des cellules T activées lors de l'inflammation et avoir un effet bénéfique sur la colite (confirmé par (Ghia, J.E. *et al.*, 2006), voir plus bas). Il semblerait donc que d'autres composants que la nicotine soient capables dans la fumée de cigarette d'avoir un impact négatif sur cette voie de signalisation en aboutissant à un signal pro-inflammatoire.

Les résultats des études précédentes ne sont pas cohérents avec la réalité clinique concernant les effets de la fumée de cigarette sur la colite chez les patients atteints de RCH (amélioration par le tabagisme). D'autre part, ils sont contredits par les études menées par Ko *et al.* qui ont testé l'effet du tabagisme passif sur la colite au DNBS chez le rat (Ko, J.K. *et al.*, 2001; Ko, J.K. *et al.*, 2005).

Les résultats de la première étude de Ko *et al.* montrent que l'exposition à la fumée améliore la colite ce qui s'accompagne d'une diminution de l'induction des activités de la MPO et de iNOS, ainsi que des taux de LTB₄, TNF et IL-6 par le DNBS dans le côlon. Cependant, la diminution colique de l'IL-10 liée au traitement par le DNBS n'est pas affectée par la fumée de cigarette. Des effets bénéfiques similaires à ceux obtenus avec la fumée de cigarette ont pu être obtenus dans ce modèle par traitement avec la pentoxifylline (un anti-inflammatoire inhibant la phosphodiesterase PDE4, et donc la synthèse de TNF et de leucotriènes) et la cyclosporine A (Ko, J.K. *et al.*, 2001). Dans une seconde étude, Ko *et al.* complètent leur travail précédent et montrent que la fumée de cigarette réduit la taille des lésions, ainsi que l'activité MPO, la génération de radicaux libres et les taux de LTB₄, d'IL-1 β et de MCP-1 (*monocyte*

chemoattractant protein 1 aussi nommée CCL2) dans le côlon des animaux traités au DNBS (Ko, J.K. *et al.*, 2005).

Une seule étude a été menée sur les effets de la cigarette dans le modèle de colite induite au DSS chez la souris. Dans cette étude l'analyse porte essentiellement sur l'impact de la cigarette sur la formation d'adénome colique après un traitement chronique au DSS. Les résultats de cette étude ne montrent pas d'impact de la cigarette sur l'ampleur de la colite en elle-même (œdème, score pathologique, sévérité de l'inflammation). Cette étude démontre par ailleurs que la fumée de cigarette augmente la formation d'adénomes/adénocarcinomes coliques associés à l'inflammation provoquée par le DSS. Cette tumorigenèse est associée à une inhibition de l'apoptose cellulaire et à une augmentation de l'angiogenèse provoquée par la fumée (Liu, E.S. *et al.*, 2003).

La dernière étude en date sur l'impact de la fumée de cigarette porte sur le système immunitaire muqueux de l'intestin grêle et en particulier sur le GALT et les plaques de Peyer (en condition non inflammatoire). L'exposition chronique (24 semaines) de souris à la fumée de cigarette induit une augmentation de l'apoptose dans l'épithélium associé aux follicules (FAE) et d'importants changements dans la composition en cellules immunes des plaques de Peyer. En effet, le nombre de DC, de cellules T CD4⁺ (dont les Treg) et T CD8⁺ est augmenté significativement par la fumée de cigarette (Verschuere, S. *et al.*, 2011). Ces résultats obtenus chez le rongeur suggèrent une plus grande susceptibilité vis-à-vis de l'inflammation chez les fumeurs.

Conclusion

A l'heure actuelle, dans ces modèles, il apparaît difficile de conclure sur les mécanismes exacts du tabac dans le développement de l'inflammation intestinale. Comme résumé dans la figure 12 ci-dessous, l'ensemble des résultats obtenus est très hétérogène (de même que les protocoles utilisés).

Cependant, il paraît évident dans les modèles étudiés que le tabagisme a un effet différent sur le côlon et sur l'intestin grêle. Cet effet ambivalent est cohérent avec les données épidémiologiques chez les patients atteints de MICI. L'ensemble des études semble également s'accorder sur un effet délétère de la fumée de cigarette sur l'inflammation au niveau de l'intestin grêle (Eliakim, R. *et al.*, 2001; Eliakim, R. *et al.*, 2002; Eliakim, R. *et al.*, 2003; Verschuere, S. *et al.*, 2011). Au niveau du côlon, néanmoins les résultats restent ambigus. Il semblerait que le modèle d'inflammation mis en place (Th1 ou Th2) influe sur l'effet observé suite à l'exposition à la fumée de cigarette (Van Dijk, J.P. *et al.*, 1995; Guo, X. *et al.*, 1999; Guo, X. *et al.*, 2001; Eliakim, R. *et al.*, 2002; Eliakim, R. *et al.*, 2003).

Modèle	Constituant	Effet sur l'inflammation	références
TNBS	CS	Effet aggravant	Guo, X. <i>et al.</i> , 2001 ; Guo, X. <i>et al.</i> , 1999 ; Guo, X. <i>et al.</i> , 2001 ; Sun, Y.P. <i>et al.</i> , 2007
	Nicotine SC	Effet aggravant	Galitovskiy, V. <i>et al.</i> , 2011
	Nicotine PO	Effet bénéfique à faible dose Effet aggravant à forte dose	Eliakim, R. <i>et al.</i> , 1998 Sykes, A.P. <i>et al.</i> , 2000
Iodoacetamide	Nicotine PO	Effet aggravant sur la jéjunite Effet bénéfique sur la colite	Eliakim, R. <i>et al.</i> , 2001
Souris IL10 -/-	Nicotine PO	Effet aggravant sur la jéjunite Effet bénéfique sur la colite	Eliakim, R. <i>et al.</i> , 2002
DNBS	CS	Effet bénéfique	Ko, J.K. <i>et al.</i> , 2005 ; Ko, J.K. <i>et al.</i> , 2001
		Effet aggravant	Galeazzi, F. <i>et al.</i> , 1999
	Nicotine SC	Effet bénéfique	Ko, J.K. <i>et al.</i> , 2005
	Nicotine PO	Effet aggravant	Galeazzi, F. <i>et al.</i> , 1999
Oxazolone	Nicotine SC	Effet bénéfique	Galitovskiy, V. <i>et al.</i> , 2011
DSS	CS	Pas d'effet	Liu, E.S. <i>et al.</i> , 2003
	Nicotine PO	Effet bénéfique	Ghia, J.E. <i>et al.</i> , 2006
	Nicotine IP	Pas d'effet	Snoek, S.A. <i>et al.</i> , 2010

Figure 12 : Récapitulatif des effets du tabagisme (nicotine et CS) dans les modèles animaux.

PO : per os, SC sous-cutanée, IP intra-péritonéale, CS fumée de cigarette. D'après Verschuere, S. *et al.*, 2012.

Dans une revue très récente, Verschuere *et al.* ont essayé de modéliser l'effet du tabagisme à partir de l'ensemble des données obtenues dans les modèles animaux d'inflammation intestinale (Cf. Figure 13).

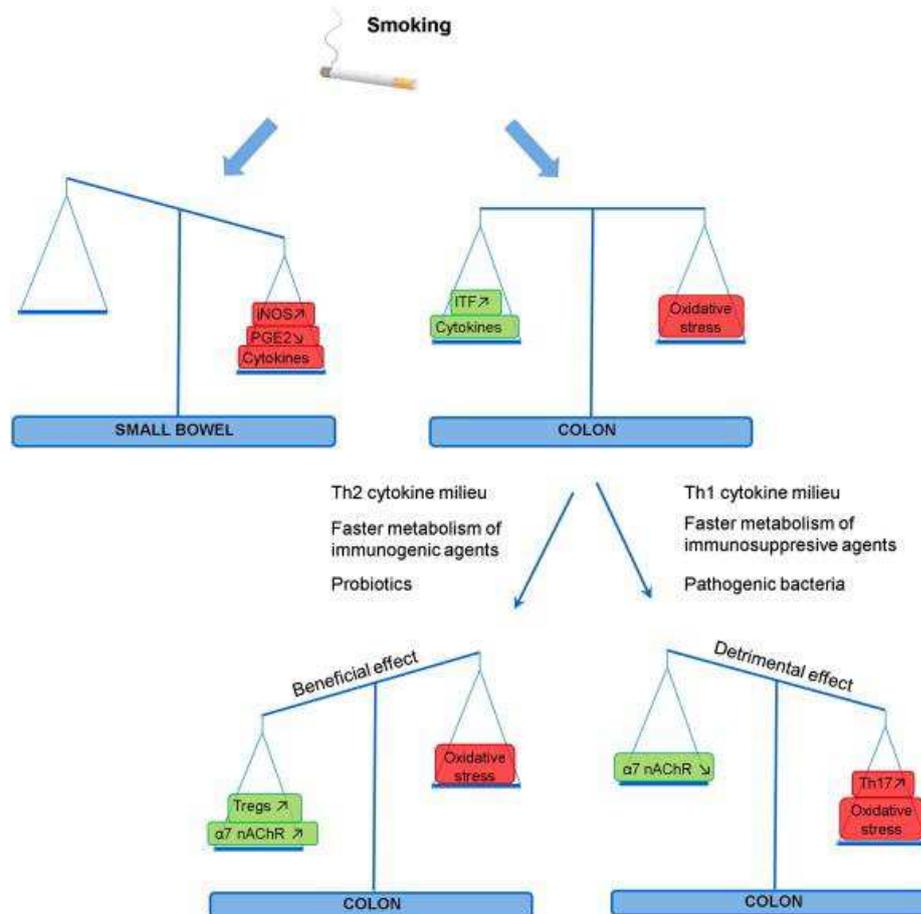


Figure 13 : Modélisation des effets divergents du tabac sur l'intestin grêle et le côlon.

D'après Verschuere, S. *et al.*, 2012.

3.3.3. Effet du tabac sur la flore intestinale dans les modèles animaux

Très récemment, quelques études se sont penchées sur l'impact du tabagisme sur la flore intestinale.

L'étude de Benjamin *et al.* a analysé des échantillons de selles de 101 patients atteints de MC (dont 29% de fumeurs) et de 58 patients contrôles (dont 14% de fumeurs) par hybridation *in situ* de sondes d'ARN ribosomal 16s de différentes espèces bactériennes (*Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium coccoides*, *Eubacterium rectale*, *Escherichia coli*, et *Faecalibacterium prausnitzii*). Après une analyse multivariée, les résultats mettent en évidence un effet significatif et indépendant du tabagisme sur la flore chez les patients atteints de MC. Les patients fumeurs présentent significativement plus de bactéries des groupes *Bacteroides* et *Prevotella* que les patients non-fumeurs. Une différence similaire est observée entre les fumeurs et les non-fumeurs du groupe contrôle. Les patients fumeurs atteints de MC présentent plus de bifidobactéries, de *Bacteroides* et de *Prevotella* et moins de *F. prausnitzii* que les contrôles sains. La fumée de cigarette a donc un impact important sur la flore intestinal qui pourrait être à l'origine des effets néfastes du tabac chez les patients atteints de MC (Benjamin, J.L. *et al.*, 2012).

Un essai prospectif interventionnel (non publié) démontre également un impact du tabagisme sur la flore intestinale. Cette étude porte sur l'impact de l'arrêt de la consommation de tabac sur la flore intestinal et compare la composition bactérienne des selles de 13 sujets

arrêtant de fumer à celle de 5 fumeurs et de 5 non-fumeurs par RFLP (restriction fragment length polymorphism) et par pyroséquençage. Ces deux techniques d'analyses mettent en évidence une évolution dans la composition de la flore dans le groupe de sujets arrêtant de fumer (mais pas dans les deux groupes contrôles). Ces sujets présentent une augmentation du nombre de Firmicutes et d'Actinobactéries et une diminution du nombre de Protéobactéries (Biedermann, L. *et al.*, 2011).

Deux études ont également été menées dans des modèles animaux. Chez la souris, le tabagisme passif induit des changements dans la flore intestinale en augmentant la quantité de *Clostridium clostridiforme* et de MIB (*Mouse intestinal bacteria*, un nouveau taxon appartenant au sous-groupe de *Bacteroides*) et en diminuant la teneur en Firmicutes (*Lactococcus* et *Ruminococcus*) en *Enterobacteriaceae* et en bactéries filamenteuses segmentées dans les fèces (Wang, H. *et al.*, 2012). Chez le rat, le tabagisme (actif) diminue significativement la quantité de *Bifidobacterium* dans les fèces (Tomoda, K. *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces données suggère donc que l'impact de la fumée de cigarette dans les MICI pourrait également se faire par le biais d'un changement de la flore bactérienne qui induirait un changement d'équilibre au niveau du système immunitaire intestinal.

4. Les cellules NKT

4.1. Description

Typiquement, les cellules du système immunitaire sont regroupées en deux catégories : les cellules du système de défense inné et celles du système adaptatif (ou acquis). Les cellules du système immunitaire inné expriment différents récepteurs PRR qui réagissent à des motifs moléculaires conservés présents chez les microorganismes. Les cellules du système immunitaire adaptatif, présentes uniquement chez les vertébrés, expriment des récepteurs divers capables de reconnaître spécifiquement des antigènes. Ces cellules sont à l'origine d'une réponse plus rapide et plus robuste suite à des stimulations répétées avec le même antigène, propriété communément nommée mémoire immunologique (Van Kaer, L. *et al.*, 2011). Les cellules T Natural Killer (NKT) font partie d'une sous population de lymphocytes appartenant à la fois au système immunitaire inné et adaptatif (Cf. Figure 4, p.14).

Les cellules NKT sont des lymphocytes T initialement nommés ainsi car elles co-expriment le complexe TCR/CD3 des lymphocytes T et des récepteurs de surface typiques des cellules NK (NK1.1 (souris) / CD161 (Homme), Ly-49...) (Godfrey, D.I. *et al.*, 2004). Bien que ces cellules représentent moins de 1% des lymphocytes T circulants, elles exercent une influence critique sur un grand nombre de réponses immunes et de pathologies.

La plupart des cellules NKT expriment un TCR semi-invariant fortement conservé entre l'humain et la souris, ce qui implique que les NKT reconnaissent un nombre restreint d'antigènes importants, bien que ceux-ci restent très difficiles à identifier. À la différence des lymphocytes T conventionnels qui reconnaissent les peptides liés à des molécules hautement polymorphiques du CMH de classe I et II, les NKT reconnaissent des antigènes glycolipidiques présentés par CD1d, une molécule atypique du CMH de classe I non polymorphique.

L'antigène le plus connu est l' α -galactosylcéramide (α GalCer), un glycosphingolipide provenant d'une éponge marine *Agelas mauritanus*, qui est le plus couramment utilisé en expérimentation pour stimuler les cellules NKT *in vivo* ou *in vitro*. Cette molécule est également utilisée pour identifier les cellules NKT grâce à un tétramère de CD1d chargé avec de l' α GalCer (tetCD1d/ α GalCer) qui a permis de redéfinir plus précisément la classification de ces cellules et d'en apprendre davantage sur leur développement (Matsuda, J.L. *et al.*, 2000). En effet, la classification initialement établie basée sur l'expression du marqueur de surface NK1.1 s'est avérée trop imprécise, ce marqueur étant régulé en fonction de l'état d'activation des cellules NKT mais également des cellules T.

4.2. Classification

La classification des cellules NKT a pendant longtemps été problématique et variable d'un auteur à l'autre. L'évolution récente des moyens techniques permettant leur identification (tetCD1d/ α GalCer) a fortement contribué à établir une nouvelle classification.

Cette classification divise les NKT en trois classes principales : 1) les NKT de type I, ou iNKT (comme ils seront nommés dans ce manuscrit) qui présentent un TCR invariant et sont dépendants du CD1d, 2) les NKT de type II également dépendants de CD1d mais présentant un TCR variable et 3) les NKT-like qui regroupent plusieurs populations de cellules non dépendantes de CD1d mais exprimant à la fois TCR et NK1.1 (Cf. Figure 14).

	type I (iNKT)	type II (vNKT)	Type III (NKT-like)	
			autres	Cellules MAIT
Restriction	CD1d	CD1d	CD1a, CD1b, CD1c	MR1
TCR- α	V α 14J α 18 (souris) V α 24J α 18 (Homme)	Divers dont V α 3.2J α 9, V α 8 (souris) et des cellules $\gamma\delta$ T	Divers dont des cellules $\gamma\delta$ T	V α 19J α 33 (souris) V α 7.2J α 33 (Homme)
TCR- β	V β 8.2, 7, 2 (souris) V β 11 (Homme)	Divers dont V β 8 (souris)	Divers	V β 8, V β 6 (souris) V β 13, V β 2 (Homme)
CD4 et CD8	CD4+ or DN (souris) CD4+, DN, CD8+ (Homme)	CD4+ ou DN (souris)	CD4+, DN, CD8+	DN (souris) DN, CD8 α + (Homme)
NK1.1	+ (cellules matures) -/low (cellules immatures ou activées)	+/-	+	+
Réactivité à l' α GalCer	Oui + analogues OCH, C20:2, α -C-GalCer).	Non	Non	Non
Autres ligands	iGb3, α -GluCer β -GalCer, β -GluCer, α -GalDAG α -Gal-uronosyl-Cer α -Glu-uronosyl-Cer GD3	Sulfatide, lysosulfatide, Lysophosphatidylcholine, PPBF	Sulfatide, Didehydroxymycobactin, Mycolic acid, Glucosemonomycolate, Diacylated Sulphoglycolipid, PIM, LAM, GM1, Hexoysl-1-phosphoisoprenoid, Mannosyl- β 1-phosphomycoketides	α -ManCer? Peptides?
cytokines	IL-4, IFN- γ	IL-4, IFN- γ	IFN- γ	IFN- γ

Figure 14 : Caractéristiques des différentes classes de cellules NKT

α -C-GalCer : α -GalCer avec liaison glycosidique basées sur le carbone ; α -GluCer : α -glucosylcéramide ; α -GalDAG : α -galactosyl-diacylglycerol ; α -Gal-uronosyl-Cer : α -galacturonosylcéramide ; α -glu-uronosyl-Cer : α -glucuronosylcéramide ; α -ManCer : α -mannosylcéramide ; β -GalCer : β -galactosylcéramide ; β -GluCer : β -glucosylcéramide ; DN : double negative ; GD3 : disialo-ganglioside ; iGb3 : isoglobotrihexosylcéramide ; LAM : lipoarabinomannan ; MAIT : mucosal-associated invariant T ; PIM : phosphatidylinositol mannoside ; PPBF : phenyl 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonate. D'après Godfrey, D.I. *et al.*, 2004 et Godfrey, D.I. *et al.*, 2010.

4.2.1. Cellules NKT de Type I ou iNKT

Les lymphocytes de type I ou iNKT sont des NKT possédant un TCR particulier dit invariant. Un TCR fonctionnel classique est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β générées par recombinaison somatique de plusieurs *loci* génétiques. Pour la chaîne β , il s'agit des segments de gènes V (variable), D (diversité) et J (jonction) et pour la chaîne α des segments V et J. Au niveau chromosomique, les loci pour ces segments sont très nombreux (Cf. Figure 15) et se recombinent pour former le récepteur TCR durant le développement de la lignée cellulaire (voir la revue de (Turner, S.J. *et al.*, 2006)). La particularité des cellules iNKT est la recombinaison systématique entre les fragments V α 14/24 (V α 14 chez la souris et V α 24 chez l'Homme) et J α 18 pour composer la chaîne α de leur TCR nommé donc TCR invariant. Par ailleurs, le panel de recombinaison retrouvé pour la chaîne β est également limité (V β 8.2, V β 7, et V β 2 chez la souris et V β 11 chez l'Homme) et pourrait déterminer des sous-populations de cellules fonctionnellement distinctes (Godfrey, D.I. *et al.*, 2004; Mallevaey, T. *et al.*, 2012).

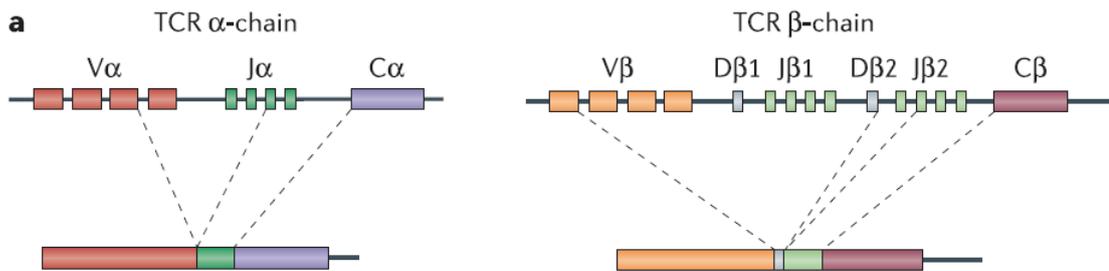


Figure 15 : Génération de la diversité du TCR par recombinaison de segments de gènes

D'après Turner, S.J. *et al.*, 2006.

Ces iNKT sont fortement dépendants de CD1d (c'est-à-dire que leur activation nécessite la présentation de l'antigène par CD1d) et sont réactifs à l' α GalCer. On distingue deux populations selon leur niveau d'expression de NK1.1 : les iNKT NK1.1⁺ et les iNKT NK1.1⁻.

En utilisant tetCD1d/ α GalCer pour identifier le iNKT indépendamment de l'expression de NK1.1, il a pu être mis en évidence que les lymphocytes iNKT subissent, après stimulation *in vivo* avec l' α GalCer, une vague d'expansion clonale dans le foie, la rate et la moelle osseuse, qui augmente leur nombre de 6 à 10 fois la normale en 3 jours après stimulation et redescend graduellement au bout de 9 à 12j. Cette expansion clonale est associée à une production soutenue de cytokines, mettant en évidence le fait que les lymphocytes iNKT sont des acteurs de la réponse immune de façon plus importante que ce qui avait été initialement présumé (Godfrey, D.I. *et al.*, 2004).

Un des paradoxes majeurs de ces cellules vient de leur capacité équivoque à favoriser et à supprimer la réponse immune. Cette capacité est probablement due à l'existence de populations distinctes de cellules iNKT. Chez l'Homme, deux populations de cellules iNKT ont pu être établies en fonction de leur expression ou absence d'expression du marqueur CD4. La population de cellules iNKT CD4⁺ humaine produit à la fois des cytokines de type Th1 et Th2 alors que la population CD4⁻ produit majoritairement des cytokines de type Th1. Ces populations CD4⁺ et CD4⁻ expriment également des récepteurs aux chimiokines différents, ce qui pourrait également traduire l'existence d'autres sous-populations distinctes (Gumperz, J.E. *et al.*, 2002; Kim, C.H. *et al.*, 2002; Berzins, S.P. *et al.*, 2011). Par ailleurs, une population de cellules iNKT CD8⁺ a pu être mise en évidence chez l'Homme (mais pas chez la souris) et se comporte de façon similaire à la population de cellules iNKT CD4⁻ CD8⁻ (double négative : DN) si ce n'est qu'elle semble produire moins d'IL-4 que les cellules iNKT DN (Takahashi, T. *et al.*, 2002). Cette population CD8⁺ représente une grande partie des cellules iNKT chez l'Homme. En effet, près de 50% des cellules iNKT expriment CD8 α (Gumperz, J.E. *et al.*, 2002) et une petite fraction exprime CD8 β (Takahashi, T. *et al.*, 2002).

Chez la souris, les différences fonctionnelles observées entre les populations CD4⁺ et CD4⁻ sont moins apparentes mais l'expression du marqueur NK1.1 délimite deux populations fonctionnellement distinctes. Les cellules iNKT NK1.1⁻ produisent de grandes quantités d'IL-4 et peu d'IFN- γ alors que les cellules iNKT NK1.1⁺ produisent peu d'IL-4 et beaucoup d'IFN- γ (Pellicci, D.G. *et al.*, 2002; Godfrey, D.I. *et al.*, 2010).

La relevance concernant la distinction entre ces populations a été remise en cause. Plusieurs études montrent que, dans le thymus, les iNKT NK1.1⁻ sont des précurseurs des iNKT NK1.1⁺ qui migrent ensuite en périphérie où elles sont supposées continuer leur maturation (Benlagha, K. *et al.*, 2002; Pellicci, D.G. *et al.*, 2002). Il est néanmoins peu probable que tous les

iNKT NK1.1- soient des précurseurs immatures car il a été montré *in vitro* que les iNKT NK1.1+ peuvent diminuer l'expression de NK1.1 suite à une stimulation (Wilson, M.T. *et al.*, 2003). Donc, bien que les iNKT NK1.1- soient des cellules immatures dans le thymus, une part de ces cellules pourraient être des cellules iNKT NK1.1+ répondant à des antigènes dans d'autres organes, et ce en fonction du statut immunitaire de l'animal (Godfrey, D.I. *et al.*, 2004).

Très récemment, une étude de Uldrich *et al.* a décrit, chez la souris, une nouvelle population de cellules iNKT réactives à l' α GalCer et exprimant un TCR invariant $V\alpha 10$ - $J\alpha 50$ et majoritairement $V\beta 8$. Cette population cellulaire est retrouvée chez les souris $J\alpha 18$ -/- déficientes en iNKT « classiques » (mais pas chez les souris $CD1d$ -/-). Le TCR $V\alpha 10$ - $J\alpha 50$ présente de nombreuses différences par rapport à la séquence peptidique du TCR $V\alpha 14$ / $J\alpha 18$ et présente des affinités différentes de ce dernier pour les ligands glycolipidiques. Par exemple, les cellules iNKT $V\alpha 10$ - $J\alpha 50$ répondent plus fortement à l' α GlcCer (α -glucosylcéramide) qu'à l' α GalCer et présentent des affinités pour les ligands différentes de celles de cellules iNKT « classique ». Ces cellules sont majoritairement présentes dans le foie et dans la rate et sont capables de produire de grandes variétés de cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-13, IL-17) à l'instar des cellules iNKT $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$ mais l'ampleur de leur réponse varie sensiblement de ces dernières en fonction du ligand présenté par $CD1d$ (Uldrich, A.P. *et al.*, 2011).

4.2.2. Cellules NKT de Type II ou vNKT

Les lymphocytes NKT de type II, aussi nommés vNKT, sont décrits comme des NKT dépendants de $CD1d$ mais non-invariants (ils n'expriment pas un TCR $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$) et non réactif à l' α GalCer. Cette population est moins bien caractérisée car elle ne peut pas être identifiée en utilisant le tet $CD1d/\alpha$ GalCer. Un des seuls moyens d'étudier leur fonction est d'analyser les différences de réponses entre les souris $J\alpha 18$ -/-, qui sont déficientes en iNKT et les souris $CD1d$ -/- qui sont déficientes en cellules T dépendantes de $CD1d$ (dont les NKT de type I et II). La prévalence de ces cellules et leur expression de NK1.1 restent encore mal connues.

Cette population comprend beaucoup de cellules qui expriment un TCR constitué d'une chaîne α de type $V\alpha 3$ - $J\alpha 9$ or $V\alpha 8$ combinée avec $V\beta 8.2$, mais le TCR dans cette population est plus diversifiée que chez les cellules iNKT. De plus, cette population inclut également un panel de cellule T $\gamma\delta$ -TCR+.

Le développement et l'activation de ces NKT de type II est différent de celui des iNKT puisqu'il ne requiert pas le ciblage endosomal de $CD1d$, indiquant qu'ils reconnaissent différents ligands dans le contexte de $CD1d$ (Godfrey, D.I. *et al.*, 2004).

4.2.3. Cellules NKT-like

En plus des NKT de type I et II, d'autres cellules sont parfois classées dans la catégorie des NKT.

Ces lymphocytes nommés NKT-like comprennent un ensemble de cellules non dépendantes de $CD1d$, non réactives à l' α GalCer mais exprimant le marqueur NK1.1. Cette classe de cellules est assez hétérogène. Elle comprend des cellules T conventionnelles, qui expriment NK1.1 suite à une activation, et les cellules T invariantes qui sont dépendantes de molécules du CMH de classe I autres que $CD1d$.

Ces dernières comprennent les cellules T invariantes associées aux muqueuses ou MAIT (*mucosal-associated invariant T*) qui expriment un TCR invariant hautement conservé $V\alpha 19$ -

J α 33 (V α 7.2-J α 33 chez l'Homme) et sont sélectionnées par MR1 (molécule CMH-I like exprimée par les lymphocytes B) et non par CD1d. Ces cellules sont majoritairement localisées dans la muqueuse intestinale d'où leur nom. (Treiner, E. *et al.*, 2003).

Bien que les autres cellules NKT soient présentes chez les souris *germ-free* (dépourvues de flore commensale), les cellules MAIT sont absentes chez ces animaux, indiquant que la flore commensale est indispensable à leur migration et leur expansion clonale au niveau de l'intestin (Park, S.H. *et al.*, 2000). Leur ontogenèse a lieu dans le thymus (puisque les MAIT sont absentes chez les souris *nude*, dont le thymus est absent ou détérioré) mais ne s'y accumulent pas et sont certainement très rapidement exportées en périphérie.

Bien que le degré de conservation du système cellules MAIT / MR1 soit très important parmi les mammifères, l'étude des cellules MAIT chez la souris reste compliquée puisque ces cellules sont 5 à 10 fois moins représentées chez la souris que chez l'Homme (Treiner, E. *et al.*, 2005).

Le manque de marqueur spécifique pour la mise en évidence de ces cellules rend leur étude difficile. La fonction des cellules MAIT reste largement inconnue mais semble fortement liée à leur localisation dans la muqueuse intestinale, qui est le tissu le plus largement en contact avec le milieu extérieur. Les cellules MAIT pourraient donc intervenir dans la réponse contre les pathogènes oraux en contrôlant le type de réponse immune (Th), et éventuellement être impliquées dans la mise en place de la tolérance orale (Treiner, E. *et al.*, 2005).

La plupart des informations bibliographiques concernant les cellules NKT concernent les cellules iNKT, ce manuscrit se focalisera essentiellement sur cette classe de cellules.

4.3. Distribution et homéostasie

4.3.1. Localisation

Les cellules NKT sont localisées de façon ubiquitaire dans l'organisme, que ce soit dans les organes lymphoïdes ou non lymphoïdes. Chez la souris, elles sont majoritairement localisées au niveau du foie (10 à 30% des cellules T) et également présentes en plus faible quantité (moins de 1%) dans la rate, le thymus, les ganglions lymphatiques, le sang, les poumons et l'intestin. Chez l'Homme, bien que moins bien documentée, la distribution est similaire mais la fréquence des cellules NKT est beaucoup plus faible.

La compartimentalisation des cellules NKT varie en fonction de leur classe. Chez la souris, les cellules iNKT sont essentiellement présentes dans le foie (90% des NKT du foie), le thymus et la moelle osseuse avec en général au moins 5×10^5 cellules par site. Les cellules NKT de type II sont préférentiellement localisées dans la rate (50% des NKT), dans le thymus et dans le sang. Enfin les cellules NKT-like sont essentiellement présentes dans la rate et la moelle osseuse.

Ces différences de tropisme peuvent s'expliquer par une expression différentielle de récepteurs aux chimiokines et/ou de récepteurs de domiciliation, induisant des interactions particulières avec les populations résidentes des différents organes. Par exemple, en fonction de l'expression de leurs récepteurs aux chimiokines, les cellules iNKT de la souris peuvent migrer vers des sites inflammatoires comme les poumons, le foie et la rate (Kronenberg, M., 2005)

4.3.2. Ontogénie des cellules iNKT

Les données sur l'ontogénie des cellules NKT chez la souris sont nombreuses mais concernent quasiment exclusivement les cellules iNKT (de par leur facilité d'identification par le tetCD1d/ α GalCer). Les mécanismes décrits ci-dessous concernent donc ce type cellulaire en particulier. Il est néanmoins raisonnable de penser que les cellules NKT type II, également restreintes par CD1d, ont une ontogénie proche des cellules iNKT.

Le précurseur de cellules iNKT

Les cellules iNKT se développent dans le thymus dans la période périnatale et n'atteignent pas des taux significatifs avant la 3^{ème} semaine de vie chez la souris. L'absence de cellules iNKT chez les souris *nude* démontre clairement que le thymus est nécessaire et suffisant au développement des cellules iNKT (Pellicci, D.G. *et al.*, 2002).

Deux modèles ont été proposés sur l'origine développementale des cellules iNKT (Cf. Figure 16). Le premier modèle, dit « pré-engagé » propose que la lignée à l'origine des cellules iNKT se sépare très précocement au cours du développement de la lignée précurseur des cellules T. Le second modèle dit « instructif » propose que les cellules T et iNKT partagent un précurseur commun et que les deux lignées divergent au stade thymocyte double positif (DP) CD4⁺ CD8⁺. Les thymocytes ayant réarrangé de façon aléatoire leurs chaînes α et β pour former un TCR semi invariant typique des cellules iNKT sont ensuite sélectionnés positivement *via* CD1d. Ce second modèle est actuellement communément admis comme valide (MacDonald, H.R., 2002; Kronenberg, M., 2005).

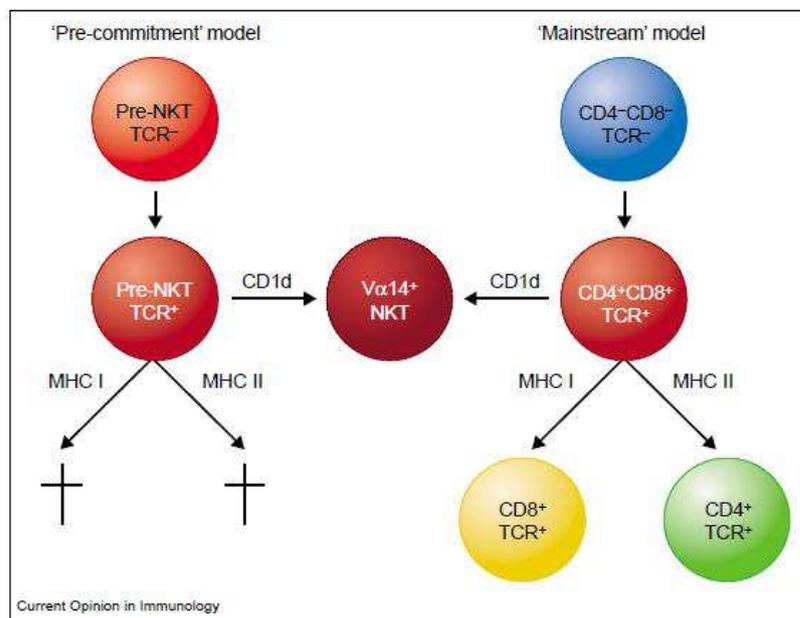


Figure 16 : Schématisation des 2 modèles d'origine développementale des cellules iNKT.

Pre-commitment model : modèle pré-engagé ; mainstream model : modèle instructif. V α 24⁺ NKT : iNKT. D'après MacDonald, H.R., 2002.

Sélection des cellules iNKT

La sélection des cellules iNKT à partir du précurseur se fait par une sélection double, positive puis négative, à l'instar des cellules T conventionnelle, avec néanmoins un certain nombre de particularité.

Les thymocytes corticaux DP CD4⁺ CD8⁺ exprimant un TCR semi-invariant sont sélectionnés *via* leur interaction avec CD1d. Cette sélection positive se fait par l'intermédiaire de thymocytes corticaux exprimant CD1d (et non par des cellules épithéliales thymiques comme les cellules T conventionnelles). CD1d est indispensable à cette sélection, si bien que les souris CD1d KO ne possèdent pas de NKT. Cette sélection requiert également la présentation par CD1d d'un auto-antigène glycolipidique. La nature du ou des lipides endogènes impliqués reste encore obscure et pourrait inclure le glycosphingolipide iGb3. Néanmoins, des études récentes ont réfuté cette hypothèse en montrant que des souris déficientes en une enzyme nécessaire à la biosynthèse d'iGb3 n'ont pas de déficience en NKT (Porubsky, S. *et al.*, 2007). (Kronenberg, M., 2005; Godfrey, D.I. *et al.*, 2010; Mallevaey, T. *et al.*, 2012). Cette étape de sélection positive est également associée à un certain nombre de signaux co-stimulateurs produit par les thymocytes. Le développement des NKT est en particulier hautement dépendant de la signalisation liée à la famille des récepteurs de surface SLAM (Cf. Figure 17) (Godfrey, D.I. *et al.*, 2010).

Étant donné la nature aléatoire de la génération du TCR des cellules iNKT et la diversité de leurs chaînes TCR β , il est fortement probable que les cellules iNKT subissent une étape de sélection négative pour éliminer les cellules auto-réactive. Cette étape est une étape importante dans le développement des cellules T conventionnelles et représente un mécanisme de prévention de l'auto-immunité capitale. Ceci laisse supposer qu'elle est également de mise dans le développement des cellules iNKT (Godfrey, D.I. *et al.*, 2010).

Cette hypothèse est étayée par le fait que la présence d' α GalCer ou de DC sur-exprimant CD1d est à l'origine d'une abolition du développement des cellules iNKT (Chun, T. *et al.*, 2003; Pellicci, D.G. *et al.*, 2003). De plus, des souris exprimant CD1d au niveau des thymocytes mais pas des DC présentent des NKT périphériques hyper-réactifs à l' α GalCer ce qui suggère une sélection négative des cellules à une haute avidité par les DC (Wei, D.G. *et al.*, 2005).

Maturation des cellules iNKT

Les cellules iNKT sélectionnées suivent une expansion rapide et un processus de maturation hautement orchestré, marqué par l'expression ou la perte de certains marqueurs couplés à l'acquisition de propriétés fonctionnelles. Quatre stades de différenciation ont été établis en se basant sur la variation d'expression de NK1.1, CD44 et CD24 (Cf. Figure 17), et ont été largement décrits (Kronenberg, M., 2005; Bendelac, A. *et al.*, 2007; Godfrey, D.I. *et al.*, 2010; Mallevaey, T. *et al.*, 2012).

Les premières cellules iNKT apparaissent dans le thymus avec un phénotype CD44⁻ CD24⁺ CD4⁺ (stade 0). Elles sont peu nombreuses et peu prolifératives. Au stade 1, l'expression de CD24 et CD4 diminue et les cellules iNKT prolifèrent de façon intense. Cette prolifération continue au stade 2 avec l'acquisition de CD44. Ces trois premiers stades de maturation ont lieu dans le thymus. Le stade 3 est marqué par l'acquisition des marqueurs de cellules NK, notamment NK1.1. A ce stade les cellules iNKT sont donc CD24⁻ CD44⁺ NK1.1⁺. La transition au stade 3 est dépendante de CD1d ce qui suggère un rôle du complexe TCR/CD1d et pourrait représenter un point de contrôle supplémentaire pour l'expression d'un TCR approprié par les cellules iNKT. Les cellules iNKT matures peuvent résider à long terme dans le thymus. Leur persistance thymique peut durer plus d'un an chez la souris.

Cette étape a longtemps été considérée comme la dernière étape de maturation. Néanmoins l'existence de cellules iNKT NK1.1- capables de produire de l'IL-17 en périphérie laisse penser que la migration des cellules hors du thymus pourrait commencer à la fin du stade 2 ou que l'expression de NK1.1 serait inhibée en périphérie (McNab, F.W. *et al.*, 2007).

En parallèle de l'acquisition de leurs marqueurs de surface, les cellules iNKT développent également leurs propriétés fonctionnelles. Ces dernières ont pu être mises en évidence par stimulation avec l' α GalCer qui, bien que non physiologique, permet de caractériser des différences majeures entre les différents stades. Ainsi, aux stades 1 et 2, les cellules iNKT sont capables de produire de l'IL-4 et de l'IL-10 en réponse à l' α GalCer mais ne produisent pas d'IFN- γ . Au stade 3, par contre, les cellules iNKT produisent majoritairement de l'IFN- γ et peu d'IL-4 (mais pas d'IL-10).

En fin de maturation, la plupart des cellules iNKT présentent un phénotype activé/mémoire à l'état stationnaire, caractérisé notamment par une forte expression de CD44 et CD69 et une faible expression de CD62L. Cet état basal suggère que les cellules iNKT sont sélectionnées par un ligand agoniste dans le thymus.

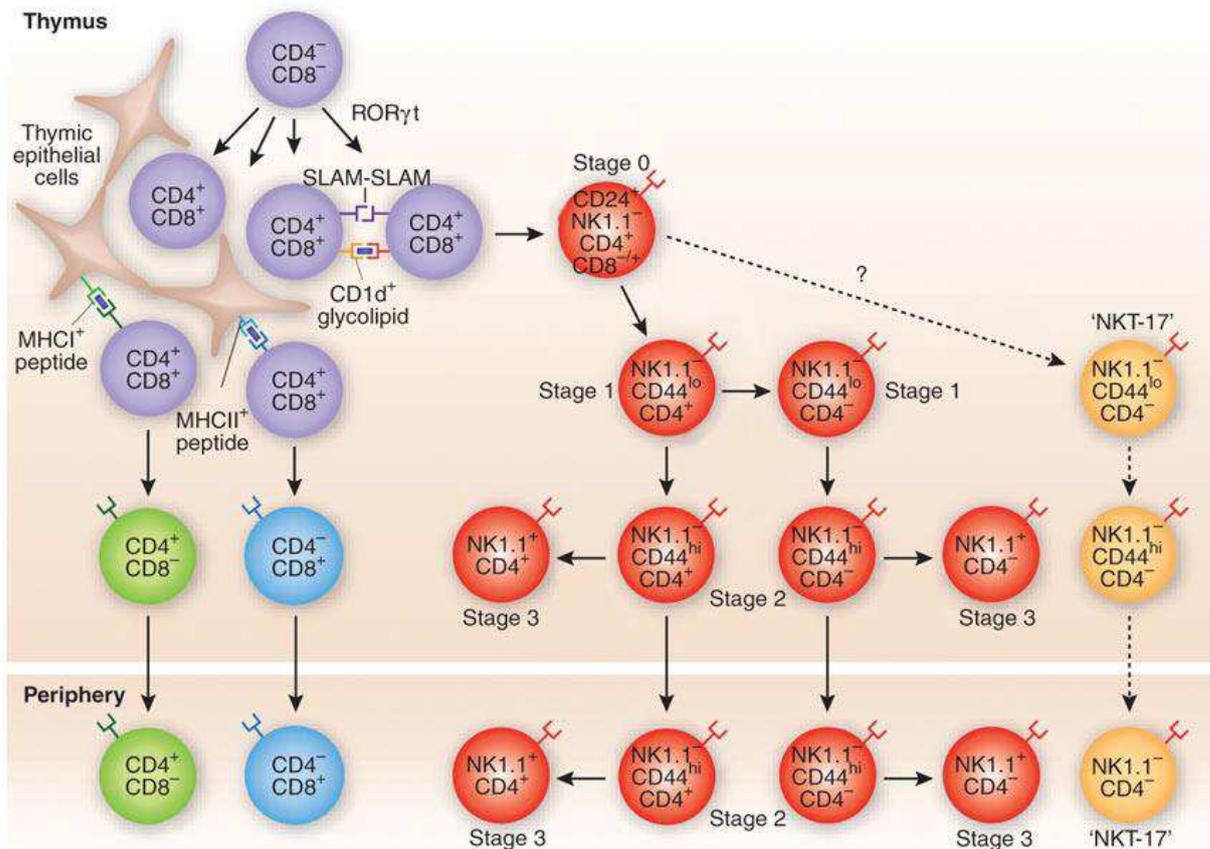


FIGURE 17 : Développement et maturation des cellules NKT

D'après Godfrey, D.I. *et al.*, 2010.

Chez l'Homme, bien que nettement moins bien décrit, le processus de maturation opère à partir de précurseurs CD4⁻ CD161⁻ et semble assez similaire à celui observé chez la souris et détaillé dans ce chapitre.

4.4. Activation des cellules iNKT

4.4.1. La molécule CD1d

CD1 regroupe une famille de molécules présentatrices d'antigènes apparentée au CMH de classe I. Ces glycoprotéines transmembranaires ne sont pas polymorphes et sont hétérodimériques. Elles sont constituées d'une chaîne α à 3 domaines associée de façon non covalente à la β 2-microglobuline (Kim, H.S. *et al.*, 1999).

Chez l'Homme, il existe cinq isoformes (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d et CD1e) alors que chez la souris seule l'isoforme CD1d est exprimée. Ces protéines sont très conservées au cours de l'évolution d'où une forte cross réactivité inter-espèce (Brossay, L. *et al.*, 1998).

L'isoforme CD1d est exprimée par la majorité des cellules hématopoïétiques des organes lymphoïdes primaires et secondaires, et dans un nombre restreint de types cellulaires parmi lesquels les thymocytes, les cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles, les kératinocytes et, de façon intéressante, les IEC. De plus, dans l'intestin, les DC, les macrophages et les cellules B expriment CD1d (van de Wal, Y. *et al.*, 2003). Le niveau d'expression de CD1d varie en fonction du type cellulaire et peut être modulé au cours d'infections ou en réponse à des cytokines. La contribution relative de ces différents types cellulaires dans l'activation des NKT, que ce soit en condition saine ou pathologique, est encore inconnue (Zeissig, S. *et al.*, 2007).

La molécule CD1d est indispensable à la fois à la sélection et la maturation des cellules iNKT mais également à leur fonction dans les différents processus immuns (réponse aux pathogènes, régulation inflammatoire...). En effet, la présentation d'antigène par le CD1d et la liaison au TCR des cellules iNKT est une voie d'activation majeure de ces cellules.

Le chargement de l'antigène glycolipidique dans le sillon de CD1d n'a pas lieu (ou peu) à la surface cellulaire et dépend de processus cellulaires complexes de recyclage de CD1d et de dégradation de l'antigène. Après synthèse dans le réticulum endoplasmique, CD1d est transporté à surface plasmique et débute alors un processus de recyclage continu et intense entre le compartiment endosome/lysosome et la membrane plasmique. Ce processus dépend d'un motif tyrosine de partie cytoplasmique de CD1d qui se lie aux protéines adaptatrices AP-2 et AP-3 de la membrane lysosomale et permet l'accumulation de CD1d dans les endosomes/lysosomes (Cf. Figure 18) (Bendelac, A. *et al.*, 2007).

Parallèlement, les particules lipidiques (exogènes ou endogènes) sont internalisées et véhiculées jusque dans les endosomes par l'intermédiaire de lipoprotéines spécialisées (comme les VLDL ou LDL). Une fois dans ce compartiment, les glycolipides sont dégradés grâce à des enzymes spécialisées (hydrolases...) et un environnement favorable. Les lipides ainsi dégradés peuvent ensuite se lier à CD1d, être présentés à la surface de la cellule lors du recyclage de la protéine CD1d et être reconnus par le TCR des cellules NKT (Cf. Figure 18) (Bendelac, A. *et al.*, 2007).

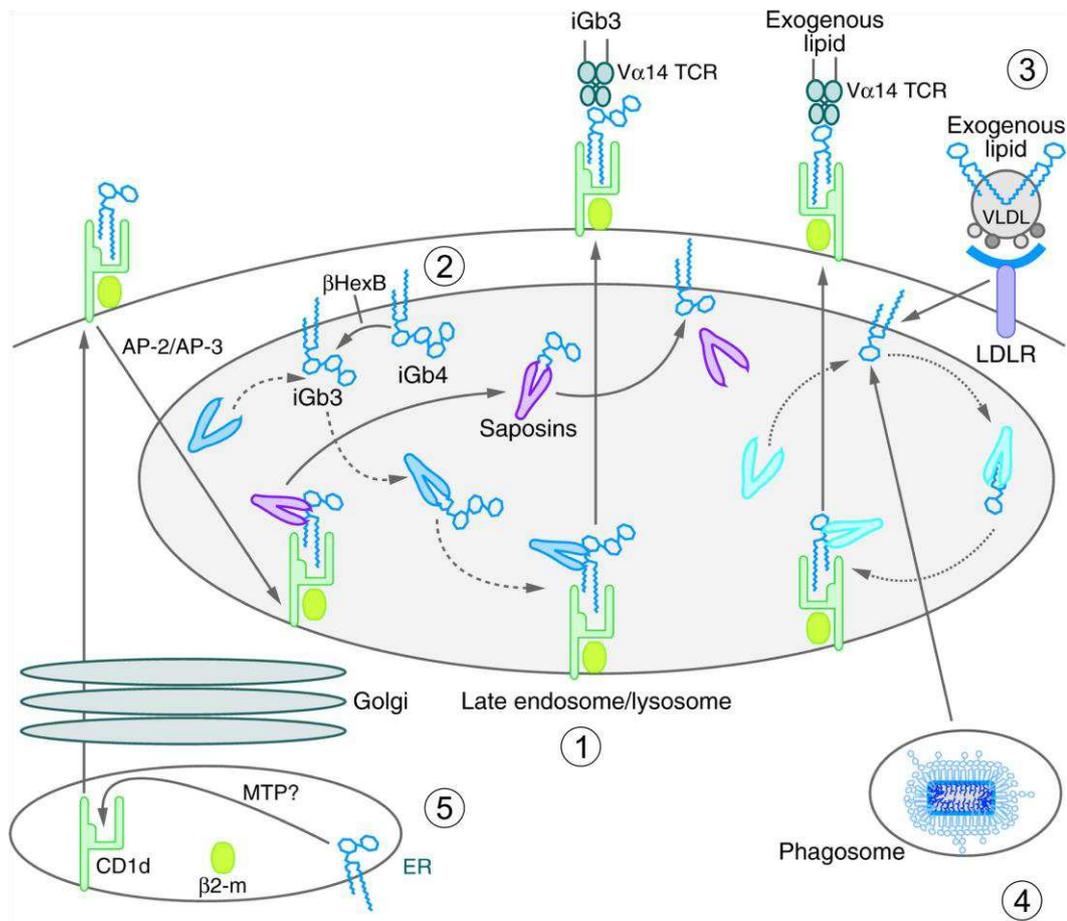


FIGURE 18 : Trafic intracellulaire de CD1d et présentation de l'antigène lipidique.

1) Les molécules de CD1d néosynthétisées, contenant sûrement des chaînes lipidiques, atteignent la membrane plasmique et sont internalisées dans le compartiment endosome/lysosome *via* la voie AP-2/AP-3 et subissent un échange de lipides effectué par les saponines. 2) Le ligand endogène iGb3 est produit par dégradation lysosomale d'iGb4 par la β-hexosaminidase. 3) Les lipides exogènes entrent dans la cellule dans les particules de VLDL *via* la voie de signalisation du récepteur LDL. 4) Les lipides microbiens sont libérés dans les lysosomes après fusion avec le phagosome (dans lequel ils ont été internalisés et digérés). Un recyclage important de CD1d a lieu entre les lysosomes et la membrane plasmique, permettant davantage d'échanges lipidiques. 5) Des échanges lipidiques supplémentaires peuvent être impliqués dans ces procédés particulièrement durant la biosynthèse de lipides endogènes lors de laquelle un rôle de la protéine MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*) est suggéré. Modifié d'après Bendelac, A. *et al.*, 2007.

4.4.2. Les ligands reconnus par les cellules iNKT

Les cellules iNKT reconnaissent une grande variété d'antigènes lipidiques issus de microbes et de mammifères. La plupart des antigènes identifiés à ce jour partagent une architecture globale commune, c'est-à-dire une partie acide gras, généralement un céramide ou un diacylglycérol qui s'ancre dans la poche de CD1d, et une partie glycanne hydrophile à l'extérieur de CD1d reconnaissable par le TCR.

L' α GalCer : Ligand expérimental non physiologique

Les cellules iNKT (humaines et murines), quel que soit leur usage des chaînes $V\beta$ -D β -J β , reconnaissent l' α GalCer dérivé d'une éponge marine *Agelas mauritianus* et fortement apparenté aux α -glycuronylcéramides microbiens (Kinjo, Y. *et al.*, 2005; Mattner, J. *et al.*, 2005; Sriram, V. *et al.*, 2005).

L' α GalCer est l'antigène le plus connu capable d'activer fortement et spécifiquement les cellules iNKT (Kawano, T. *et al.*, 1997). Il s'agit d'un glycosphingolipide initialement identifié pour ses propriétés anti-métastatiques chez la souris (Kawano, T. *et al.*, 1997). Les chercheurs s'accordent aujourd'hui à penser que l' α GalCer est dérivé de la bactérie *Sphingomonas* qui colonise ces éponges. En effet, de nombreux glycolipides ayant des similarités avec l' α GalCer et activant les cellules iNKT ont été découverts dans la paroi de cette espèce bactérienne (Kinjo, Y. *et al.*, 2005; Mattner, J. *et al.*, 2005; Sriram, V. *et al.*, 2005).

Cet antigène est actuellement synthétisé chimiquement et disponible commercialement sous le nom de KRN7000. Il est utilisé dans la plupart des études réalisées sur les cellules iNKT soit pour stimuler ces cellules *in vivo* ou *in vitro*, soit sous une forme liée à un tétramère de CD1d pour l'identification spécifique des cellules iNKT.

L' α GalCer induit une forte production de cytokines par les cellules iNKT humaines ce qui en fait un candidat potentiel pour l'immunothérapie, mais son utilisation induit une longue anergie des cellules (voir « cinétique d'activation ») (Parekh, V.V. *et al.*, 2007). De plus, les cellules iNKT ainsi stimulées produisent des cytokines Th1 et des cytokines Th2 ayant des propriétés antagonistes. Ainsi, la recherche clinique se tourne actuellement vers la recherche et la synthèse de molécules analogues à l' α GalCer permettant de diminuer l'anergie et d'induire spécifiquement l'un ou l'autre type de réponse cytokinique.

Ligands exogènes

La majorité des ligands naturels des cellules iNKT proviennent des microbes. De nombreuses molécules ont été identifiées comme capables d'activer les cellules iNKT ou une partie de cette population cellulaire.

De nombreuses revues (Venkataswamy, M.M. *et al.*, ; Van Kaer, L. *et al.*, 2011; Wu, L. *et al.*, 2011; Mallevaey, T. *et al.*, 2012) listent de façon plus ou moins détaillée les multiples lipides et glycolipides d'origine microbienne reconnus par les cellules iNKT. Parmi les plus cités, on retrouve le cholesteryl α -glucoside de *Helicobacter pylori*, le lipophosphoglycane du parasite *Leishmania donovani*, le lipopeptidophosphoglycane de la membrane d'*Entamoeba histolytica*, le phosphatidylinositol tetramannosylé (PIM4) de *Mycobacterium bovis* et le glycosylphosphatidylinositol (GPI) de *Plasmodium* et de *Trypanosoma* (bien que la capacité activatrice de ces 2 derniers ligands ait été remise en cause).

Des travaux récents démontrent que les α -glycuronosylcéramides de *Sphingomonas* (α -galacturonosylcéramide et α -glucuronosylcéramide) et d'*Ehrlichia* et le BbGL-II de *Borrelia* et des espèces *Streptocoques* stimulent de façon indéniable les cellules iNKT *via* CD1d. Il n'a néanmoins pas été déterminé si la reconnaissance directe de ces composés est à l'origine de la réponse antibactérienne des iNKT détectée lors de ces infections (Matsuda, J.L. *et al.*, 2008).

Certains de ces antigènes n'activent qu'une petite fraction des populations de cellules iNKT, mais la plupart ont de fortes propriétés d'adjuvant et peuvent potentiellement être activateurs. De nombreux dérivés synthétiques de glycolipides liés en α ont été étudiés. Certains donnent des résultats prometteurs en immunothérapie et en vaccination, comme l' α -C-GalCer, C:2035 et les analogues du plakoside A (un glycosphingolipide naturel présentant des similarités avec l' α GalCer) qui engendre des réponses orientées Th1 alors que d'autre comme l'OCH (un analogue tronqué de l' α GalCer) conduisent à une réponse plutôt pro-Th2 (Mallevaey, T. *et al.*, 2012).

Ligands endogènes

En plus de reconnaître des ligands exogènes, les cellules iNKT sont également capables de reconnaître des ligands endogènes (ou self-Ag) présentés par CD1d. En effet, les cellules iNKT ont un phénotype activé dans le sang de cordon (D'Andrea, A. *et al.*, 2000) et les souris *germ-free* (Park, S.H. *et al.*, 2000), et une auto-réactivité à CD1d peut être mesurée *in vitro* dans certaines conditions, comme par exemple lorsque CD1d est surexprimé (Kronenberg, M., 2005).

Les mammifères ne pouvant pas synthétiser de glycolipides liés en α , les ligands endogènes des cellules iNKT sont pressentis pour présenter des différences structurales avec les ligands exogènes. Outre des glycolipides liés en β (probablement des glycosphingolipides similaires à α GalCer), d'autres molécules ont été montrées comme capables d'être présentées par CD1d, dont des lipopeptides (Moody, D.B. *et al.*, 2004), des phospholipides (dont le phosphatidylinositol et la phosphatidylethanolamine) (Gumperz, J.E. *et al.*, 2000) et des lyso-phospholipides (de type lyso-phosphatidylcholine ou lyso-sphingomyéline) (Fox, L.M. *et al.*, 2009). Ces dernières servent de messagers lipidiques en conditions physiologiques et sont augmentés lors de la réponse inflammatoire (Fox, L.M. *et al.*, 2009). Il a également été démontré que suite à un signal de danger, le stress provoqué au sein des CPA induit la synthèse de nouveaux ligands endogènes présentés par le CD1d et capables d'activer les cellules iNKT. Par exemple, la réponse des cellules iNKT en réponse à des agonistes TLR-7 et -9 dépend de la néosynthèse de glycolipides endogènes chargé sur CD1d (Paget, C. *et al.*, 2007).

Beaucoup de travaux se sont focalisés sur l'identification de ligands endogènes impliqués dans le développement des cellules iNKT. Le candidat le plus probable est l'iGb3, un glycosphingolipide lysosomal lié en β (Zhou, D. *et al.*, 2004). Bien que l'iGb3 puisse activer les cellules iNKT humaines et murines, sa relevance physiologique dans le développement et la fonction des cellules iNKT est encore débattue (Gapin, L., 2010). En effet, iGb3 n'a pas pu être détecté dans les thymocytes humains et murins, ni dans les DC (Speak, A.O. *et al.*, 2007). De plus, les cellules iNKT se développent normalement dans les souris déficientes en iGb3 synthase (Porubsky, S. *et al.*, 2007). Cette controverse concernant iGb3 est actuellement un sujet récurrent de débat dans le domaine de recherche des cellules iNKT.

Récemment, Facciotti *et al.* ont isolé de nouveaux lipides endogènes impliqués dans le développement des cellules iNKT. En effet, ils ont mis en évidence que les mono-alkyl glycerophosphates lié en éther, ainsi que des précurseurs et des produits de dégradation des éther-phospholipides étaient capables de stimuler les cellules iNKT. Par ailleurs, l'enzyme GNPAT (glyceronephosphate O-acyltransferase) contenue dans les peroxysomes est essentielle à la synthèse des lipides liés en éther et les souris déficientes en GNPAT présentent des

altérations dans la maturation thymique des cellules iNKT et leur taux est réduit dans le thymus et les organes périphériques. Les lipides liés en éther ont donc un rôle majeur dans le développement des cellules iNKT et pour la génération d'un répertoire de cellules iNKT complets (Facciotti, F. *et al.*, 2012).

4.4.3. Mécanisme d'activation

Il existe 2 mécanismes principaux menant à l'activation des cellules iNKT. Dans le mécanisme d'activation directe, des antigènes lipidiques (microbiens ou autres) sont dégradés par les CPA et présentés *via* CD1d pour une reconnaissance par le TCR des cellules iNKT. Dans le mécanisme d'activation indirecte, des agonistes des TLR se lient au TLR des CPA aboutissant à la production de cytokines et à l'activation des cellules iNKT (impliquant ou non une interaction CD1d/TCR) (Wu, L. *et al.*, 2011).

Activation directe

Le mécanisme d'activation directe passe par la présentation d'un ligand *via* le CD1d d'une CPA. Le ligand mis en jeu est une molécule d'origine microbienne (exogène) traitée ou non par les CPA. Dans ce cas d'activation, le pathogène est internalisé et détruit par le système lysosomal qui procède alors au chargement d'un ligand exogène (modifié ou non) ou d'un ligand endogène produit en réponse à l'activation des CPA. Ce ligand est ensuite présenté aux cellules iNKT qui le reconnaissent *via* leur TCR. De nombreuses études ont ainsi montrées que des structures glycolipidiques issues de différents micro-organismes pouvaient activer les cellules iNKT de manière CD1d dépendante (Cf. Figure 19A) (Schofield, L. *et al.*, 1999; Fischer, K. *et al.*, 2004; Kinjo, Y. *et al.*, 2005; Mattner, J. *et al.*, 2005; Kinjo, Y. *et al.*, 2006).

Activation indirecte

Une autre voie d'activation des cellules iNKT a été mise évidence suite au constat de l'activation de ces cellules en l'absence d'antigènes lipidiques.

En effet, il a pu être démontré que des bactéries Gram-négatives (comme *Salmonella typhimurium*) ou Gram-positives (comme *Staphylococcus aureus*) mises en culture avec des DC peuvent stimuler les cellules iNKT en absence de glycolipides (Brigl, M. *et al.*, 2003; Mattner, J. *et al.*, 2005). Cette stimulation est bloquée par des anticorps anti-CD1d et anti-IL-12 suggérant que ces microorganismes activent les cellules iNKT indirectement *via* la stimulation des CPA. Ce mécanisme est dépendant des TLR des CPA (Mattner, J. *et al.*, 2005). En effet, la stimulation des CPA par des agonistes des TLR module les voies de biosynthèse des lipides et induit une augmentation de l'expression en surface de CD1d présentant un antigène (Cf. Figure 19B).

D'autre part, le LPS de *E. coli* reconnu par le TLR-4 des CPA induit une stimulation des cellules iNKT indépendante de CD1d (Nagarajan, N.A. *et al.*, 2007). Dans ce cas, l'exposition aux bactéries combinée à de l'IL-12 et de l'IL-18 est suffisante pour obtenir une activation des cellules iNKT en absence de présentation d'antigène par CD1d (Cf. Figure 19C).

De plus, l'activation des TLR-7 et -9 (sensibles aux acides nucléiques) par des pathogènes intracellulaires des DC aboutit également à la stimulation des cellules iNKT (Paget, C. *et al.*, 2007). Dans ce système, l'activation requiert une co-stimulation par l'interféron de type I et la présentation d'un glycosphingolipide de nature endogène (Cf. Figure 19D) (Paget, C. *et al.*, 2007).

En résumé, le concept général de l'activation indirecte des cellules iNKT met en jeu l'activation de CPA *via* leurs TLR aboutissant à la production de cytokines (IL-12, IL-18 et/ou interférons de type I) qui synergisent l'activation des cellules iNKT, *via* ou non la présentation de self-antigène par leur CD1d. Cette voie d'activation est suffisamment conservée pour permettre l'activation des cellules iNKT dans d'autres situations, comme les réponses inflammatoires associées avec de nombreuses conditions pathologiques (Wu, L. *et al.*, 2011).

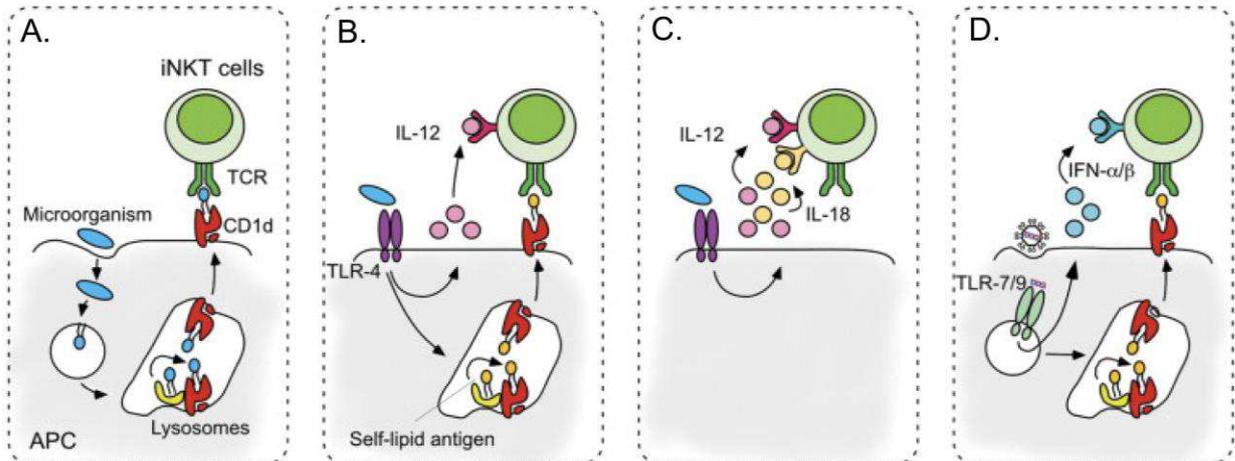


FIGURE 19 : Les différents mécanismes d'activation des cellules iNKT.

A. Voie d'activation directe par des microorganismes pathogènes contenant des glycolipides reconnus par CD1d. B. Voie d'activation indirecte des NKT *via* la présentation de lipides endogènes par CD1d en co-stimulation avec l'IL-12 suite à l'activation du TLR-4 par le LPS de certaines bactéries. C. Voie d'activation indirecte *via* l'IL-12 et de l'IL-18 sécrétés par la CPA suite à une stimulation bactérienne de la voie des TLR (sans présentation antigénique CD1d-dépendante). D. Voie d'activation par présentation d'un lipide endogène et une co-stimulation IFN- α/β suite à la stimulation de TLR-7 et /ou TLR-9 par un pathogène intracellulaire. D'après Matsuda, J.L. *et al.*, 2008.

4.4.4. Facteur modulant l'activation

La capacité des cellules iNKT à produire des cytokines entraînant des réponses antagonistes reste encore largement discutée dans la littérature. Plusieurs hypothèses se confrontent et indiquent globalement que la réponse des cellules iNKT est sûrement orientée par de nombreux facteurs.

Un premier type de facteur pourrait être **intrinsèque** aux cellules iNKT comme leur localisation, leur phénotype de surface cellulaire ou leur état d'activation. Une seconde catégorie de facteur serait **indépendante** des cellules elles-mêmes comme par exemple les ligands, les autres types cellulaires pouvant co-stimuler les cellules NKT en réponse à des stimuli extérieurs ou en réponse à la stimulation des iNKT eux-mêmes, ou encore les cytokines et chimiokines présentes sur le lieu d'action des iNKT. L'ensemble des hypothèses suggère que les cellules iNKT sont prêtes à sécréter immédiatement des cytokines Th1 et Th2 et que sous certaines conditions la production de cytokines se polarise vers un profil Th1 ou Th2 (Crowe, N.Y. *et al.*, 2003; Kronenberg, M., 2005).

Les différences de fonction des cellules iNKT selon leur tissu de résidence ont pu être démontrées de façon convaincante par Crowe *et al.* (Crowe, N.Y. *et al.*, 2005). Le rejet de tumeur provoqué par les cellules iNKT est plus efficace avec les cellules du foie comparé aux cellules de la rate ou du thymus. Un autre exemple de phénotype dépendant de la localisation

des cellules iNKT concerne une population stable de cellules iNKT NK1.1- identifiée dans le foie et la rate qui semble se comporter comme d'autres populations NK1.1+ et différemment des cellules NK1.1- du thymus (McNab, F.W. *et al.*, 2007).

Les cytokines extracellulaires présentes dans le milieu peuvent moduler la réponse des cellules iNKT. C'est le cas de l'IL-12 par exemple qui est produit au niveau des sites inflammatoires et oriente la réponse des cellules iNKT vers une production d'IFN- γ . D'autre part, l'IL-7 semble promouvoir la sécrétion d'IL-4. D'autres cytokines comme l'IL-21 peuvent également affecter la prolifération et augmenter la production de cytokines des cellules iNKT (Coquet, J.M. *et al.*, 2007).

De plus le type ou le statut des CPA présentes dans le microenvironnement des cellules iNKT peut altérer leur réponse. Il a été montré qu'une co-stimulation par CD28 ou 4-1BB était indispensable à une production optimale d'IL-4 et d'IFN- γ par les cellules iNKT. Les interactions CD154-CD40, OX40L-OX40 ou l'engagement de cellules CxCR6 semblent également être des facteurs importants pour la production d'IFN- γ (Matsuda, J.L. *et al.*, 2008; Wu, L. *et al.*, 2011).

Des différences qualitatives dans la liaison TCR / antigène pourraient être à l'origine des différences de réponses cytokiniques des cellules iNKT. Par exemple, plusieurs agonistes synthétiques analogues à l' α GalCer ont des effets distincts. Les analogues OCH et C20:2 orientent la réponse vers un profil de type Th2 alors que l' α -C-GalCer induit une réponse de type Th1. Ces différences pourraient s'expliquer par une affinité de liaison pour le TCR variable entre les agonistes. De même, des variations de solubilité, de résistance/sensibilité à la dégradation enzymatique *in vivo*, la liaison à des protéines de transport lipidique, la compartimentalisation cellulaire, l'affinité et la cinétique de liaison avec CD1d pourraient affecter la réponse qualitative et quantitative des cellules iNKT (Matsuda, J.L. *et al.*, 2008; Van Kaer, L. *et al.*, 2011; Wu, L. *et al.*, 2011).

En résumé, la sécrétion de cytokines par les cellules iNKT peut être influencée dans son amplitude et dans sa polarisation par le phénotype, l'état de maturation, leur origine tissulaire, les facteurs environnementaux (cytokines, chimiokines, molécules de co-stimulation) ainsi que l'antigène lipidique à l'origine de l'activation.

Toutes ces observations soulignent la difficulté de prédiction de fonction des cellules iNKT. Des études supplémentaires sont nécessaires pour établir la discrimination entre association circonstancielle ou directe entre phénotype et fonction des cellules iNKT.

4.4.5. Cinétique d'activation

La dynamique des cellules iNKT en réponse à une stimulation directe a été largement étudiée en utilisant l' α GalCer (Parekh, V.V. *et al.*, 2007).

Rapidement après le traitement *in vivo* de souris à l' α GalCer, cette molécule est présentée aux cellules iNKT par les DC ou les macrophages. Les cellules iNKT s'activent alors en quelques heures, induisant l'expression des marqueurs d'activation CD69 et CD25 et produisant de nombreuses cytokines. Cette capacité à produire très rapidement des cytokines est liée à l'expression constitutive par les cellules iNKT des ARN messages de l'IL-4 et IFN- γ (Stetson, D.B. *et al.*, 2003).

Les cellules iNKT activées par l' α GalCer produisent de l'IL-4 plus abondamment durant les premières heures suivant leur activation, puis la production de cytokines bascule dans les 8 à 24h suivantes vers une production d'IFN- γ , après quoi la production de cytokines diminue (Crowe, N.Y. *et al.*, 2003).

Dans les 6 à 18h suivant le traitement α GalCer, les cellules iNKT diminuent transitoirement l'expression de leur TCR, ce qui les rend difficiles à détecter. L'expression du marqueur NK1.1 est également diminuée mais seulement 12 à 24h après traitement, et peut être prolongée jusque 6 mois (Wilson, M.T. *et al.*, 2003).

Suite à leur activation, les cellules iNKT prolifèrent rapidement ce qui aboutit à une expansion importante de leur population jusqu'à 10 fois dans la rate, 5 fois dans le sang, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques et 2 ou 3 fois dans le foie. Le pic d'expansion a lieu 3 ou 4 jours après le traitement à l' α GalCer, après quoi la population de cellules iNKT retrouve un taux normal. L'apoptose des cellules iNKT semble provoquée par le facteur pro-apoptotique Bim de la famille Bcl-2 puisque chez les souris déficientes en Bim le taux de cellules iNKT ne revient pas à la normale (Crowe, N.Y. *et al.*, 2003).

La réponse secondaire des cellules iNKT à l' α GalCer ne met pas en jeu une réponse mémoire (Parekh, V.V. *et al.*, 2005; Parekh, V.V. *et al.*, 2007). Au contraire, la réponse secondaire est plus faible comparée à la réponse primaire à l'antigène. Ce phénotype de réponse faible, caractérisé par le blocage de la prolifération et de la production cytokinique, est intrinsèque aux cellules iNKT et représente un état d'anergie immunologique (Parekh, V.V. *et al.*, 2005). Cette anergie est maintenue par le blocage de la production d'IL-2 et par des molécules de co-stimulation comme PD-1 (*programmed death-1*) et ses ligands, PD-L1 et PD-L2. La balance entre les molécules de co-stimulation activatrices ou inhibitrices joue donc un rôle critique dans la portée de la réponse immunitaire suite à l'activation des cellules iNKT. Ce mécanisme est également retrouvé en condition physiologique et les cellules iNKT peuvent devenir anergiques suite à la stimulation *in vivo* de souris avec des pathogènes bactériens et des agonistes TLR (Kim, S. *et al.*, 2008).

4.5. Fonctions biologiques des cellules iNKT

Les cellules iNKT sont de véritables « couteaux-suisse » du système immunitaire (Cf. Figure 20) et possèdent un très large panel de fonctions à l'origine de leur rôle clé dans la régulation de la réponse immunitaire (Matsuda, J.L. *et al.*, 2008).

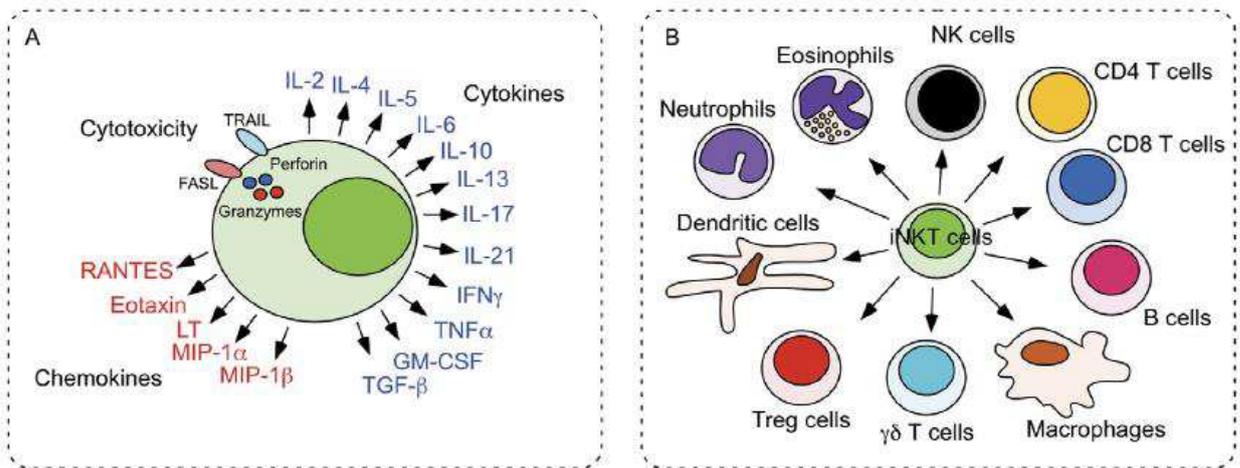


FIGURE 20 : Potentiel d'action des cellules iNKT activées

A. Les cellules iNKT actives exercent une activité cytotoxique et sécrètent une grande variété de cytokines (en bleu) et de chimiokines (en rouge). B. Les cellules iNKT activées peuvent influencer (activer ou inhiber) la réponse de nombreuses cellules du système immunitaire inné et adaptatif. D'après Matsuda, J.L. *et al.*, 2008.

4.5.1. Propriétés cytotoxiques

Les cellules iNKT actives ont une fonction cytotoxique directe (Cui, J. *et al.*, 1997) liée aux perforines, aux granzymes B et à FasL qui dépendent du TCR, à la différence de l'activité des NK (Cf. Figure 20 A) (Metelitsa, L.S. *et al.*, 2001).

L'injection d' α GalCer provoque l'expression de FasL à la surface des cellules iNKT aboutissant à la lyse des cellules Fas+. Cette activité cytotoxique dépend du niveau d'expression de CD1d à la surface des cellules cibles (Wingender, G. *et al.*, 2010).

Les cellules iNKT exercent également une activité cytotoxique indirecte vis-à-vis des cellules tumorales qui met en jeu d'autres populations cellulaires, comme les NK ou les T CD8+ cytotoxiques (Takeda, K. *et al.*, 2000).

4.5.2. Production cytokinique

Les lymphocytes iNKT sont connus pour leur capacité à produire une quantité importante de cytokines très rapidement après stimulation, et de façon précise lors de la réponse immune.

La liaison du TCR des NKT aboutit à une sécrétion rapide et importante des cytokines Th1 comme l'IFN γ ou le TNF, de type Th2 comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et de type Th17 comme l'IL-17 ou l'IL-22 ou encore l'IL-2, l'IL-10, l'IL-21 et dans certains cas GM-CSF, TGF- β (Cf. Figure 20 A) (Kronenberg, M., 2005; Mallevaey, T. *et al.*, 2012).

L'amplitude et la cinétique de production des cytokines par les cellules iNKT diffèrent de celles des cellules T conventionnelles. Premièrement, alors que plusieurs jours sont nécessaires aux cellules T conventionnelles pour générer une réponse cytokinique mesurable, les cytokines produites par les cellules iNKT sont détectables dans le sérum seulement quelques minutes à quelques heures après activation. Deuxièmement, une cellule iNKT a la capacité à elle seule de produire des cytokines antagonistes les unes par rapport aux autres, comme par exemple l'IL-4 et l'IFN qui sont normalement produites par des lignées fonctionnellement distinctes de cellules T conventionnelles. Ainsi la réponse des cellules iNKT

est parfois nommée « Th0 ». L'implication des cellules iNKT dans de nombreuses maladies suggèrent que ces cellules ont un rôle hautement versatile *in vivo*. Les cytokines de type Th2 produites par les cellules iNKT sont à l'origine de l'apparition de l'asthme (Lisbonne, M. *et al.*, 2003) mais peuvent participer à la fonction bénéfique des iNKT dans plusieurs maladies auto-immunes, comme le diabète (Hong, S. *et al.*, 2001). De même, les cytokines de type Th1 produites par les cellules iNKT favorisent le développement de l'athérosclérose (Nakai, Y. *et al.*, 2004) et de la drépanocytose (Wallace, K.L. *et al.*, 2009) tout en protégeant de la croissance tumorale (Cui, J. *et al.*, 1997).

Ce haut degré de plasticité fonctionnelle fait des cellules iNKT une cible attrayante pour les thérapies immunes.

4.5.3. Partenaires cellulaires

Les cellules iNKT sont capables d'une interaction / communication importante avec de nombreuses autres cellules du système immunitaire inné et adaptatif, altérant ainsi la vigueur et le caractère de la réponse immunitaire (Cf. Figure 20B). En effet, les grandes quantités de cytokines produites par les cellules iNKT peuvent notamment recruter ou influencer la réponse des DC, des neutrophiles, des lymphocytes T conventionnels, des cellules NK, des cellules B et des cellules myéloïdes suppressives. Les cellules iNKT peuvent ainsi orienter la réponse cytokinique de ces types de cellules vers un profil différent (Th1, Th2 ou Th17) (Berzins, S.P. *et al.*, 2011; Mallewaey, T. *et al.*, 2012).

L'impact des cellules iNKT a majoritairement été étudié en condition de stimulation par l' α GalCer et a permis de mettre en évidence de nombreuses réponses cellulaires (Cf. Figure 21).

Les cellules iNKT activées recrutent les neutrophiles et induisent leur production d'IFN- γ ce qui contribue à l'augmentation de la réponse inflammatoire. Elles provoquent également l'activation et la prolifération des cellules NK (*via* la sécrétion d'IL-12 et d'IFN- γ), leur sécrétion d'IFN- γ et leur activité cytotoxique (Sullivan, B.A. *et al.*, 2010) ainsi que l'activation des cellules B, et donc leur sécrétion d'immunoglobulines (Berzins, S.P. *et al.*, 2011; Mallewaey, T. *et al.*, 2012).

Dans de nombreux cas, les cellules iNKT influencent également la qualité de la réponse immunitaire en régulant la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves en cellules effectrices Th, les rendant plus à même d'aider les cellules T CD8⁺. De plus, l' α GalCer a un rôle d'adjuvant qui augmente la magnitude de la réponse des cellules T CD8⁺ (Wu, L. *et al.*, 2011).

L'activation des cellules iNKT provoque également l'activation des lymphocytes T conventionnels et d'autres sous types de cellules T dont les cellules Treg (La Cava, A. *et al.*, 2006) et les cellules T CD8⁺ régulatrices (Varthaman, A. *et al.*, 2010).

La plupart des effets de l'activation des cellules iNKT est néanmoins liée à leur communication avec les DC CD1d⁺ (Kronenberg, M., 2005). La stimulation des iNKT aboutit à une amélioration de la maturation des DC. La production d'IFN- γ par les cellules iNKT associée à l'interaction CD40-D40L conduit à une activation des DC et des macrophages. Ainsi activés, les DC et les macrophages produisent des molécules de co-stimulation et des cytokines comme l'IL-12 et TNF- α .

Ces interactions complexes entre les cellules iNKT et les autres cellules du système immunitaire sont influencées par la nature du stimulus et sont à la base de la capacité des cellules iNKT de moduler de nombreuses réponses immunes.

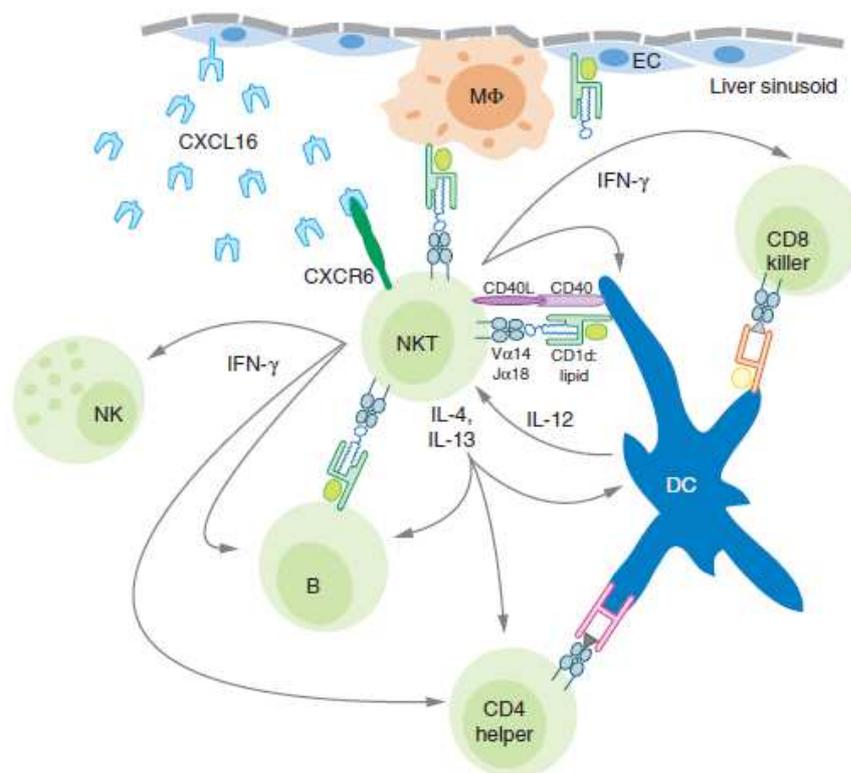


FIGURE 21 : Voies cellulaires et moléculaires modulées par les cellules iNKT.

Voies cellulaires et moléculaires activées par l' α GalCer. Les DC, et probablement les cellules de Kupffer (macrophages) tapissant les sinusoides hépatiques (où sont accumulées les cellules iNKT) sont le centre d'un réseau d'activation transversale. Cette activation débute avec l'augmentation de l'expression de CD40L par les cellules iNKT et la sécrétion de cytokines Th1 et Th2 ainsi que de chimiokines. Cette réaction des cellules iNKT aboutit à la super-activation des DC qui initie alors la réponse adaptative en activant les cellules T CD4 et CD8. Les cellules iNKT peuvent également interagir directement avec les cellules B pour promouvoir leur production d'anticorps et peuvent par ailleurs activer rapidement les cellules NK. L'interaction CXCR6/CXCL16 est un signal de survie essentiel pour le maintien de ces cellules iNKT. EC : cellules endothéliales. D'après Bendelac, A. *et al.*, 2007.

4.6. NKT et pathologies

Les cellules NKT ont été associées de façon bénéfique ou délétère à de nombreuses maladies humaines. Ces maladies peuvent être groupées en 3 catégories.

La première catégorie concerne les maladies qui sont dues à un défaut des cellules NKT que ce soit une insuffisance ou une production altérée des cytokines. Ce défaut compromettant la régulation immunitaire chez le porteur, le prédisposant ainsi à des maladies auto-immunes (diabète de type I, lupus, cancers...) et certaines infections (tuberculose, maladie de Lyme...) ainsi qu'à des cancers (Cf. Figure 22a) (Bendelac, A. *et al.*, 2007; Terabe, M. *et al.*, 2008; Wu, L. *et al.*, 2009).

Dans la seconde catégorie, les cellules NKT sont normales en nombre et en fonctionnalité mais elles sont à l'origine d'une réponse immunitaire pathogénique qui contribue à des maladies

comme l'athérosclérose, la maladie du greffon contre l'hôte, l'asthme, l'allergie et des troubles de la peau (Cf. Figure 22b) (Bendelac, A. *et al.*, 2007; Balato, A. *et al.*, 2009).

La troisième catégorie regroupe les maladies dans lesquelles les cellules NKT ne contribuent pas nécessairement à la pathologie mais la stimulation de ces cellules (par exemple par l'administration de glycolipides) peut être bénéfique pour traiter ces maladies (Wu, L. *et al.*, 2009).

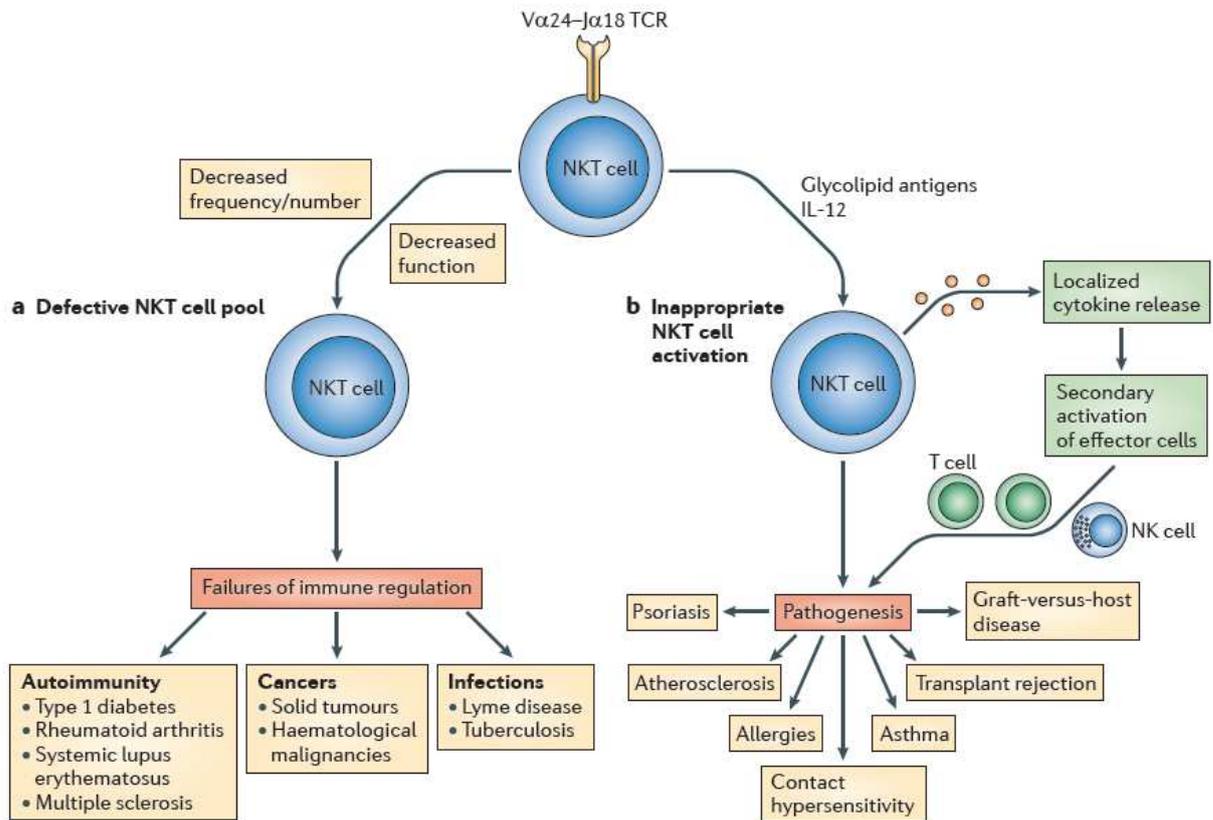


FIGURE 22 : Implication des cellules NKT dans les pathologies humaines.

L'association entre les cellules NKT et l'établissement de pathologies humaines est encore peu caractérisé mais implique probablement 2 mécanismes : a) un défaut quantitatif ou qualitatif de cellules NKT qui aboutit un défaut de régulation immunitaire normalement associée aux cellules NKT ; b) une réponse inappropriée des cellules NKT (dont le nombre et les fonctions ne sont pas altérés) aboutissant à un déséquilibre du système immunitaire. D'après Berzins, S.P. *et al.*, 2011.

Dans ce manuscrit nous nous intéresserons spécifiquement à l'impact de ces cellules dans les MICI et laisserons de côté les maladies citées ci-dessus pour nous concentrer sur l'impact des cellules NKT au niveau de l'intestin.

4.7. Les cellules NKT dans l'intestin

La fonction principale de l'intestin est la digestion et l'absorption des nutriments issus de l'alimentation ainsi que de l'eau et des électrolytes. De plus, l'intestin est le siège d'un important compartiment immunitaire. En effet, le tractus gastro-intestinal est le lieu de résidence d'un nombre incommensurable de bactéries commensales et une porte d'entrée pour les microorganismes pathogènes. L'enjeu majeur pour le maintien de l'homéostasie consiste donc à établir une tolérance immunitaire vis-à-vis des bactéries commensales, tout en

éliminant efficacement les pathogènes. Une réponse muqueuse inadaptée ou mal contrôlée peut aboutir à des infections ou des pathologies auto-immunes comme les MICI.

Du fait de leur réponse rapide, les cellules iNKT constitueraient une défense de 1^o ligne parfaite et pourraient jouer un rôle majeur de surveillance au niveau de l'intestin.

En effet, la présence des cellules iNKT est avérée au niveau de la muqueuse intestinale humaine et murine. Néanmoins, de par le manque d'homogénéité dans les moyens d'identifications des cellules et dans l'expression des résultats dans les différentes études, le pourcentage réel de cellules iNKT présent dans le compartiment intra-épithélial et dans la *lamina propria* est encore incertain.

L'analyse directe des cellules iNKT par détection de V α 14/V α 24 ou par marquage avec tetCD1d/ α GalCer indique des proportions de cellules iNKT peu élevées allant de 1% des IEL à 2% des lymphocytes de la *lamina propria* (LPL) dans l'intestin grêle (Matsuda, J.L. *et al.*, 2000; Fuss, I.J. *et al.*, 2004; Ronet, C. *et al.*, 2005; van Dieren, J.M. *et al.*, 2007; Wingender, G. *et al.*, 2008). L'étude récente de Wingender *et al.* analyse de façon différentielle les populations cellulaires du côlon et de l'intestin chez la souris C57BL/6 grêle grâce au tetCD1d/ α GalCer. Ils ont mis en évidence que les cellules iNKT sont plus abondantes dans l'intestin grêle (1,13% des IEL et 2,5% des LPL) que dans le côlon (0,28% des IEL et 0,7% des LPL). D'autre part, la majorité des cellules iNKT intestinales sont CD4⁺ NK1.1⁺, à l'exception de des cellules iNKT des IEL du côlon qui présentent une diminution de l'expression de NK1.1 (Wingender, G. *et al.*, 2012).

Néanmoins, la majorité des cellules NKT présentes dans l'intestin n'est pas dépendantes de CD1d (cellules MAIT) et les cellules iNKT ne représenteraient que 0,4% des cellules T intestinales (Fuss, I.J. *et al.*, 2004). Elles sont localisées majoritairement dans la *lamina propria* et sont fonctionnellement actives comme en témoigne leur production de cytokines en réponse à une stimulation par l' α GalCer (O'Keeffe, J. *et al.*, 2004).

Bien que leur proportion soit faible dans ce compartiment, les cellules iNKT jouent un rôle physiologique important dans l'homéostasie intestinale et les pathologies associées comme en témoigne l'expression de CD1d dans l'intestin.

4.7.1. Expression de CD1d

Comme détaillé plus haut, les cellules iNKT peuvent établir une réponse même en absence de CD1d. Cependant, l'expression de CD1d est manifestement un prérequis pour l'activation spécifique des iNKT par un antigène bactérien local.

Dans l'intestin, les DC, les macrophages et les cellules B expriment CD1d. De plus les IEC sont également capables de lier et de présenter des antigènes comme l' α GalCer aux cellules iNKT *via* CD1d et de les activer (Panja, A. *et al.*, 1993; van de Wal, Y. *et al.*, 2003). Néanmoins, l'expression de CD1d par les IEC humaines et murines fait l'objet de nombreuses controverses.

Une des raisons à l'origine de ces controverses est l'expression par les IEC d'une forme inhabituelle de CD1d. En effet, la majorité des molécules CD1d exprimées par les IEC n'est pas glycosylée ni associée à la β 2-microglobuline. Leur expression est restreinte à la surface apicale des IEC (Balk, S.P. *et al.*, 1994; Kim, H.S. *et al.*, 1999; Somnay-Wadgaonkar, K. *et al.*, 1999). La forme habituelle de CD1d (liée à la β 2-microglobuline) est faiblement exprimée par les IEC, avec un tropisme préférentiel pour la surface basale des cellules (Somonay-Wadgaonkar, K. *et al.*, 1999).

La fonction de cette forme particulière de CD1d reste encore à élucider mais il n'existe pas de preuves qu'elle soit reconnue par les cellules iNKT, bien qu'il ait été suggéré que des cellules T (sûrement des cellules NKT de type II) reconnaissent les molécules CD1d indépendamment de la β 2-microglobuline (Balk, S.P. *et al.*, 1991; Panja, A. *et al.*, 1993). Les anticorps monoclonaux utilisés pour détecter CD1d ne reconnaissent pas cette forme, ce qui contribue à la controverse exposée plus haut.

Les données concernant l'expression de CD1d chez les patients atteints de MICI sont également controversées. Une étude démontre une augmentation de l'expression de CD1d dans les tissus affectés (Page, M.J. *et al.*, 2000), alors que deux autres études démontrent une diminution (Ge, Y. *et al.*, 2006; Perera, L. *et al.*, 2007).

Les fonctions de CD1d dans l'intestin furent mises en évidence pour la première fois lorsqu'il fut montré que les IEC pouvaient activer les cellules iNKT et induire une cytotoxicité (Panja, A. *et al.*, 1993). Par ailleurs, les cellules exprimant CD1d sont également des cellules ciblées par la réponse cytotoxique des cellules NKT intestinales (Balk, S.P. *et al.*, 1991). Ceci suggère que, *in vivo*, les IEC exprimant CD1d sont une cible auto-lytique pour les cellules NKT, ce qui contribuerait à la phase chronique de l'inflammation intestinale (van Dieren, J.M. *et al.*, 2007).

L'expression de CD1d au niveau intestinal n'est pas seulement importante pour l'activation des cellules iNKT et est aussi impliquée dans la réponse anti-inflammatoire des IEC. La liaison d'un ligand sur CD1d des IEC aboutit à la production d'IL-10 par ces cellules qui peut protéger la barrière intestinale de dysfonction provoquée par l'IFN γ (Colgan, S.P. *et al.*, 1999). Cette production d'IL-10 requiert un domaine intra cytoplasmique de CD1d intact, indiquant une signalisation cellulaire liée à CD1d (Colgan, S.P. *et al.*, 1999).

De plus, les souris présentant un déficit en une protéine du réticulum endoplasmique responsable du transfert lipidique sont incapables de charger et de présenter des antigènes *via* le CD1d des IEC. Elles sont par ailleurs protégées de la colite à l'oxazolone (Brozovic, S. *et al.*, 2004). L'expression de CD1d au niveau de l'intestin est donc probablement essentielle à la modulation de la réponse muqueuse par son rôle dans la communication IEC/NKT et dans la réponse des IEC (Zeissig, S. *et al.*, 2007).

Malgré cela, la contribution relative des cellules exprimant CD1d dans l'activation des cellules NKT en condition saine ou pathologique reste inconnue.

4.7.2. Fonction des iNKT dans l'intestin

Les cellules de la muqueuse intestinales exprimant CD1d, elles établissent une communication étroite avec les cellules NKT. De par leur capacité à polariser la réponse immunitaire, ces dernières sont impliquées dans la régulation de la colonisation et de l'invasion bactérienne ainsi que dans l'induction de la tolérance orale. Néanmoins, bien que plusieurs études aient recherché la fonction des cellules NKT dans les maladies intestinales, les connaissances actuelles sur le rôle physiologique et pathologique des NKT dans l'intestin restent encore limitées (Zeissig, S. *et al.*, 2007).

Rôle des cellules NKT dans la régulation du microbiote intestinal

Les cellules NKT jouent un rôle fonctionnel majeur dans l'homéostasie muqueuse chez l'Homme et la souris. En effet, les souris déficientes en CD1d ou en cellules NKT sont plus

susceptibles à certaines infections et sont victimes d'infection spontanées par des bactéries commensales (van Dieren, J.M. *et al.*, 2007).

Les cellules NKT CD1d dépendantes ont été impliquées dans la régulation de la colonisation de l'intestin murin par les bactéries Gram-positives et Gram-négatives commensales ou pathogènes (Nieuwenhuis, E.E. *et al.*, 2009). En effet, chez des souris déficientes en CD1d, l'administration intra-gastrique de *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, ou *Lactobacillus gasseri* aboutit à la colonisation anormale de l'intestin grêle. D'autre part, l'administration d' α GalCer chez des souris sauvages diminue la colonisation intestinale par ces mêmes bactéries. Il semblerait que cette régulation implique les cellules de Paneth, un sous type de cellules épithéliales qui résident au niveau des cryptes intestinales et capables de sécréter des peptides antimicrobiens (α -défensines). Ces cellules expriment CD1d (Lacasse, J. *et al.*, 1992) et sont défectueuses chez les souris CD1d^{-/-} (Nieuwenhuis, E.E. *et al.*, 2009). Leur stimulation par les cellules NKT activées aboutirait donc à la diminution de la charge bactérienne intestinale (Nieuwenhuis, E.E. *et al.*, 2009).

Les cellules NKT jouent un rôle avéré dans la protection de l'intestin contre les pathogènes. Le TCR des cellules NKT reconnaît en effet directement les glycolipides exprimés à la surface de certaines bactéries Gram-négatives et des spirochètes. De plus, même en l'absence d'antigènes microbiens, ces cellules répondent aux cytokines sécrétées par les DC activées par les bactéries (Cf. chapitre I/4.4.3). Ces modes d'activation permettent aux cellules NKT de répondre à une grande variété d'agents infectieux (revue détaillée (Tupin, E. *et al.*, 2007)). Les cellules NKT ont en effet été impliquées dans la réponse immune dirigée contre de nombreux pathogènes bactérien, viraux, champignons et parasites, parmi lesquelles les infections muqueuses impliquant *Salmonella typhimurium* (Berntman, E. *et al.*, 2005), *Listeria monocytogenes* (Ranson, T. *et al.*, 2005), et *Toxoplasma gondii* (Ronet, C. *et al.*, 2005). L'ensemble de ces données, bien que certaines aient parfois été contredites, indiquent que, bien que les cellules NKT ne sont pas forcément suffisantes à elles seules à la protection contre l'infection par un agent microbien, elles influencent clairement la réponse immune vis à vis de certains pathogènes et modulent la colonisation (Zeissig, S. *et al.*, 2007).

Par ailleurs, la relation entre cellules iNKT et microbiote semble être bilatérale. En effet, la flore intestinale semble jouer un rôle dans l'établissement des fonctions des cellules iNKT comme en témoignent 2 études récentes (Olszak, T. *et al.*, 2012; Wingender, G. *et al.*, 2012). L'étude de Olszak *et al.* montre que la colonisation intestinale par la flore commensale est indispensable à la mise en place d'un réseau normal de cellules iNKT. En effet, chez les souris *germ-free*, les cellules iNKT s'accumulent anormalement dans les poumons et la *lamina propria* du côlon comparé à des souris élevées en conditions SPF. D'autre part, ces souris sont plus sensibles à la colite à l'oxazolone (un modèle dans lequel les cellules iNKT sont suspectées de jouer un rôle délétère ; Cf. chapitre I/4.8.1 plus bas) en liaison à la surexpression de CD1d par les IEC et les cellules hématopoïétiques. La colonisation de souris *germ-free* néonatales avec une flore conventionnelle empêche cette accumulation (ce qui ne peut pas être reproduit chez des souris adulte). Ces données indiquent qu'un contact à un âge précoce avec la flore commensale est indispensable à l'établissement des cellules iNKT au niveau des muqueuses et à leur rôle dans la tolérance orale (Cf. chapitre I/4.7.2 ci-dessous) (Olszak, T. *et al.*, 2012). L'étude de Wingender *et al.*, quant à elle, démontre que les souris SPF provenant de fournisseurs différents présentent une flore intestinale différente et que les cellules iNKT

isolées de ces souris présentent un répertoire de TCR V β 7 ainsi qu'une réponse cytokinique variables. Les cellules iNKT extraites de souris *germ-free* présente un phénotype moins mature et sont répondeur faiblement à l' α GalCer (Wingender, G. *et al.*, 2012).

Ces travaux démontrent donc que la flore intestinale peut influencer le phénotype et la fonction des cellules iNKT (à priori chez les sujets jeune), et que ces dernières, une fois matures et fonctionnelles sont également capables de réguler la flore intestinale pour maintenir l'homéostasie.

Rôle des cellules NKT dans l'induction de la tolérance orale

La tolérance orale se caractérise par la suppression de la réponse immune contre un antigène suite à la pré-administration orale de cet antigène. C'est un mécanisme majeur pour l'induction de la tolérance périphérique et la prévention des réponses immunes contre les protéines alimentaires et bactériennes.

Dans un modèle de tolérance orale chez la souris, l'administration de CEP (colitis-extracted proteins) protège de la colite au TNBS chez la souris (Neurath, M.F. *et al.*, 1996). Cette protection est liée au développement de lymphocytes Treg sécréteurs de TGF- β et de cytokines Th2 et à l'inhibition de la maturation des DC qui sont alors considérés comme tolérogènes. D'après plusieurs études, les cellules NKT jouent un rôle majeur dans la mise en place de cette tolérance.

En effet, la protection contre la colite peut être obtenue par transfert adoptif de splénocytes issus de souris tolérantes dans des souris non tolérantes traitées au TNBS alors que le transfert des mêmes splénocytes déplétés en cellules NKT n'aboutit pas à une amélioration de la colite (Trop, S. *et al.*, 1999; Trop, S. *et al.*, 2002; Margalit, M. *et al.*, 2005). Ces résultats indiquent que les cellules NKT participent activement à la mise en place de la tolérance orale observée dans le modèle de colite. De plus, le transfert adoptif par des cellules NKT rendues tolérogènes par traitement *in vitro* permet également de protéger de la colite (Shibolet, O. *et al.*, 2004). Pour finir, les souris déficientes en cellules iNKT ou en CD1d ne peuvent pas être rendues tolérantes par administration orale d'ovalbumine, contrairement aux souris sauvages (Kim, H.J. *et al.*, 2006). L'ensemble de ces données démontrent que la présence des cellules NKT est indispensable à la mise en place de la tolérance orale.

Elles joueraient ce rôle majeur en influençant la réponse immune des autres cellules. Dans le modèle d'induction de la tolérance par administration orale d'ovalbumine, il a été montré que les cellules iNKT, *via* leur production cytokinique, sont nécessaires à l'inhibition de l'activation des DC, rendant ces cellules tolérogènes (Kim, H.J. *et al.*, 2006). Elles induisent également la tolérance orale en supprimant certaines cellules à l'origine de la réponse primaire contre l'antigène. C'est le cas du modèle de tolérance orale au nickel, les souris déficientes en cellules iNKT ne peuvent pas être rendues tolérantes par administration de nickel et ne génèrent pas de cellules Treg (Roelofs-Haarhuis, K. *et al.*, 2004). Il a pu être montré que l'IL-4 et l'IL-10 produits par les cellules iNKT jouent un rôle majeur (Roelofs-Haarhuis, K. *et al.*, 2004). L'augmentation de la production d'IL-10 permettrait le maintien des DC sous leur forme immature (De Smedt, T. *et al.*, 1997) alors que l'IL-4 augmenterait l'expression de FasL par les cellules iNKT elles même (régulation autocrine) (Kaneko, Y. *et al.*, 2000). Cette

augmentation de FasL permet la destruction par les cellules iNKT des cellules B activées en induisant leur apoptose (Nowak, M. *et al.*, 2006).

L'étude des cellules NKT du foie montre également que la proportion et la fonction cytotoxique de ces cellules sont augmentées lors de la mise en place de la tolérance orale (Samsonov, D. *et al.*, 2000; Shibolet, O. *et al.*, 2004). Ces cellules NKT induisent une réponse immune anti-inflammatoire dans un environnement tolérogène et une réponse pro-inflammatoire dans un environnement non tolérogène (Menachem, Y. *et al.*, 2005).

4.8. NKT et MICI

4.8.1. Rôle des NKT dans les modèles animaux de colite

L'hypothèse communément admise sur l'étiologie des MICI suppose que la pathologie résulte d'une réponse immune excessive dirigée contre les bactéries commensales de l'intestin. Plusieurs types cellulaires ont été impliqués dans l'établissement et le maintien de cette réponse dont les cellules T, Les cellules B, les CPA et les cellules épithéliales.

L'étude des cellules NKT dans les modèles expérimentaux a montré que ces cellules peuvent jouer un rôle protecteur ou délétère dans l'inflammation intestinale qui semble dépendre du type de réponse inflammatoire en jeu et des antigènes lipidiques reconnus par ces cellules (van Dieren, J.M. *et al.*, 2007).

L'implication des cellules NKT a été étudiée dans 3 modèles de colites expérimentales caractérisées par une réponse immune de type Th1 : 1) la colite par transfert adoptif de cellules T, 2) la colite au DSS et 3) la colite induite par l'haptène TNBS et dans un modèle de colite de type Th2 : 4) la colite induite à l'oxazolone.

Colite par transfert adoptif de cellules T

Dans ce modèle expérimental, le transfert de cellules T CD4⁺ naïves dans des souris immunodéficientes (SCID) induit une colite chronique. Les cellules transférées migrent vers le côlon et expriment des cytokines de type Th1 avec de fort taux d'IFN- γ , de TNF et d'IL-2. Le co-transfert de cellules NKT DX5⁺ inhibe le développement de la colite en induisant la mort cellulaire des cellules T CD4⁺ *via* le CD1d (Hornung, M. *et al.*, 2006). Cependant, seule une minorité des cellules NKT DX5⁺ sont CD1d dépendantes, et le type de cellules NKT responsable de la protection n'est pas déterminé (Pellicci, D.G. *et al.*, 2005).

Colite induite au DSS

Deux études ont analysé le rôle des cellules NKT dans le modèle de colite au DSS et ont montré que l' α GalCer et l'OCH (un analogue tronqué de l' α GalCer) améliore la colite (Saubermann, L.J. *et al.*, 2000; Ueno, Y. *et al.*, 2005). Le traitement à l'OCH a pour effet une polarisation Th2 et aboutit donc à la diminution de l'expression de l'IFN- γ et à l'augmentation de l'expression de l'IL-4 et d'IL-10 (Ueno, Y. *et al.*, 2005). La présentation de l' α GalCer par les IEC pourrait être un mécanisme d'amélioration de la maladie, argument en faveur du rôle régulateur des cellules NKT dans la colite (Saubermann, L.J. *et al.*, 2000).

Ces données sont en accord avec les observations faites par Burdin *et al.* qui ont montré que les cellules NKT stimulées par l' α GalCer provoquent un shift dans la balance de la réponse immune vers un profil Th2 (Burdin, N. *et al.*, 1999).

D'autre part, les cellules NKT améliorent également la colite chronique au DSS. Dans ce modèle, l'expression de CD1d est augmentée dans les cellules épithéliales coliques et est indispensable à l'établissement de la protection liée aux cellules NKT (Hornung, M. *et al.*, 2006).

La colite induite au TNBS

Dans ce modèle, la déplétion des cellules NK1.1+ a un effet favorable sur le développement de la colite au TNBS (Trop, S. *et al.*, 2002; Shibolet, O. *et al.*, 2004) et les cellules NKT sont à l'origine d'une réponse pro-inflammatoire (Trop, S. *et al.*, 2003; Menachem, Y. *et al.*, 2005). De plus, le transfert de splénocytes NK1.1+ aboutit à une aggravation de la colite au TNBS (Margalit, M. *et al.*, 2005). Ces données suggèrent que les cellules NKT joueraient un rôle pathogénique dans la colite au TNBS.

Néanmoins, une étude conteste l'effet de la déplétion des cellules NK1.1 lors de la colite au TNBS en indiquant qu'elle n'aurait pas d'effet aggravateur marqué mais plutôt un effet bénéfique (Heller, F. *et al.*, 2002). D'autre part l'administration de β -glucosylcéramide (β GlcCer) permettait de prévenir la colite au TNBS (Zigmond, E. *et al.*, 2007) impliquant un rôle bénéfique des cellules NKT.

La colite induite à l'oxazolone

Dans ce modèle, Heller *et al.* ont démontré que les souris CD1d^{-/-} et les souris sauvages injectées avec des anticorps anti-CD1d sont protégées de la colite, ce qui indique une contribution cruciale des NKT dans l'établissement de la pathologie (Heller, F. *et al.*, 2002). Bien que les iNKT n'aient pas été différentiellement analysés, les LPL de souris traitées à l'oxazolone secrètent de grandes quantités d'IL-13 après stimulation avec de l' α GalCer. De plus, les souris J18 α ^{-/-} (déficientes en cellules iNKT mais pas en NKT non invariants) et les souris CD1d^{-/-} (déficientes en cellules T restreintes par le CD1d) sont protégées de la colite à l'oxazolone, montrant que les iNKT, mais pas les NKT non invariant, sont nécessaires au développement de cette colite liée à une réponse de type Th2.

4.8.2. Rôle des NKT dans les MICI

L'ensemble des données collectées dans les modèles animaux laissent penser que les cellules NKT activées par un agoniste permettraient d'orienter la réponse immunitaire intestinale d'un profil de cytokine Th1 délétère vers un profil protecteur Th2 dans les pathologies intestinales inflammatoires. Les cellules NKT peuvent en effet moduler la réponse inflammatoire en orientant, d'une part, la production de cytokines par certaines cellules immunitaires et en engendrant, d'autre part, l'apoptose d'autres populations. Ainsi, dans ces modèles animaux, les cellules NKT pourraient être impliquées dans le développement de la pathologie, avec un rôle potentiellement protecteur dans les modèles de colite de type Th1 et potentiellement délétère dans les modèles de colite de type Th2. Le rôle des cellules NKT dans la réponse inflammatoire en absence d'agoniste reste néanmoins à démontrer et leur rôle chez les patients atteints de MICI est encore flou.

Très peu d'études se focalisent sur l'activation des cellules NKT chez les patients souffrants de MICI mais elles suggèrent que ces cellules joueraient un rôle important. Cependant, cette théorie est encore fortement débattue dans les publications. D'une part, la RCH et la MC sont 2 pathologies bien distinctes et il n'est pas évident d'établir une fonction commune des

cellules NKT dans ces maladies. D'autre part, la diversité des moyens d'études utilisés pour l'analyse des cellules NKT chez les patients atteints de MICI rend les résultats difficiles à comparer. En effet, les sous populations de cellules NKT étudiées ne sont pas les mêmes entre les différentes études et leur description phénotypique n'est pas systématique (marquage cellules, cytokines exprimées...).

De nouveau, deux hypothèses majeures se dégagent de l'ensemble de la bibliographie, l'une attribuant aux cellules NKT un rôle pro-inflammatoire et l'autre un rôle anti-inflammatoire (van Dieren, J.M. *et al.*, 2007; Wingender, G. *et al.*, 2008; Nieuwenhuis, E.E. *et al.*, 2009).

Rôle anti-inflammatoire

La première hypothèse développée ici propose que les cellules NKT joueraient un rôle régulateur dans la MC. Dans ce cas, la réponse Th1 exagérée dans la MC serait due à un manque ou une altération des cellules NKT régulatrices. La réponse inefficace des cellules NKT participerait à un défaut de cytokines régulatrices ou anti-inflammatoires. Une étude récente montre une diminution de l'expression de CD1d dans l'épithélium intestinale de patients atteints de MICI. Cette diminution pourrait être à l'origine d'un dysfonctionnement de la fonction régulatrice des cellules NKT (Perera, L. *et al.*, 2007).

De plus, l'absence de NKT aurait également pour conséquence une dérégulation de la flore luminaire qui engendrerait une invasion bactérienne à l'origine de l'inflammation chronique. En effet, Nieuwenhuis *et al.* ont démontré que les cellules NKT stimulent les cellules de Paneth ce qui aboutit à une diminution de la charge bactérienne (Nieuwenhuis, E.E. *et al.*, 2009).

Pour étayer cette hypothèse, des études cliniques ont rapporté une réduction significative du nombre de cellules iNKT (V α 24/V β 11+ ou tetCD1d/ α GalCer+) parmi les PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) des patients et une réduction du nombre de cellules V α 24+ dans leurs intestins (van der Vliet, H.J. *et al.*, 2001; Grose, R.H. *et al.*, 2007). Une diminution similaire des cellules iNKT du sang périphérique et de l'intestin est également constatée chez les patients atteints de maladie cœliaque (Grose, R.H. *et al.*, 2007).

Rôle pro-inflammatoire

Plusieurs études incriminent les cellules NKT dans la pathogénèse des MICI et dans l'initiation de l'inflammation intestinale, au moins au cours de la RCH.

L'inflammation dans les MICI pourrait d'une part être liée à l'activation des NKT par des ligands endogènes, différents des antigènes de la flore commensale. Effectivement, les IEC de l'iléon terminal de patients atteints de MC contiennent des lysosomes chargés en substance lipidiques qui pourraient servir de ligands potentiels pour activer les cellules NKT (Marin, M.L. *et al.*, 1984).

D'autre part, leur activation pourrait être liée à une élévation de l'expression de CD1d chez les patients, et donc à l'augmentation de la présentation d'antigènes et à la lyse cellulaire des cellules présentant CD1d par les cellules NKT. En effet, l'expression de CD1d est plus forte dans l'épithélium de l'iléon terminal enflammé des patients atteints de MC et dans le caecum affecté des patients atteints de RCH que chez les patients contrôles. Cette surexpression serait à l'origine d'un recrutement de cellules pro-inflammatoires réactives à CD1d aboutissant à la destruction de la muqueuse (Page, M.J. *et al.*, 2000).

En outre, les cellules iNKT sont capables de produire de fortes quantités d'IFN- γ et de générer ainsi une forte réponse Th1 et une cytotoxicité importante (à l'origine de l'effet anti-tumoral de l'IL-12) (Cui, J. *et al.*, 1997). Ces données suggèrent donc que les cellules NKT pourraient être activées dans les MICI et générer une réponse inflammatoire à l'origine de la destruction de l'épithélium.

Cette hypothèse est corroborée par l'étude de Fuss *et al.* qui a démontré qu'une population de NKT de type II de la *lamina propria* de patients atteints de RCH produit de fortes quantités d'IL-13 et d'IL-5 et possède des propriétés cytotoxiques envers les IEC *ex vivo*. Ces cellules NKT possèderaient donc un rôle délétère majeur dans la RCH (Fuss, I.J. *et al.*, 2004). D'autre part, l'IL-13 est directement impliquée dans la rupture de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal associée à la RCH en affectant les jonctions serrées et en induisant l'apoptose des IEC (Heller, F. *et al.*, 2005). Par ailleurs, chez les patients atteints de MC, ces mêmes cellules NKT produisent de grandes quantités d'IFN- γ et pourraient donc également jouer un rôle pro-inflammatoire délétère (Fuss, I.J. *et al.*, 2004). Si cette hypothèse est avérée, l'inhibition ou la modulation de l'activation des cellules NKT pourrait devenir un nouveau moyen de traitement dans la RCH.

II. Hypothèses de travail & but du projet de recherche

L'étiologie et le développement des MICI restent encore à ce jour très mal compris. Il s'agit à priori de maladies complexes et multifactorielles, caractérisées par une dérégulation de la réponse immunitaire des muqueuses dirigée contre des éléments de la flore intestinale, chez des individus génétiquement prédisposés. Les facteurs environnementaux, et le tabac en particulier semble jouer un rôle inhérent à l'établissement et au développement de la maladie.

Comme développé au cours de l'introduction, le rôle du tabac est ambivalent : il protège de la RCH mais aggrave la MC et les mécanismes sous-jacents à ces effets restent encore mal établis. Malgré une littérature relativement abondante et compte tenu de la variabilité des différentes études concernant les organes, cellules et composants de la fumée de cigarette étudiés, il est à l'heure actuelle impossible d'assigner définitivement des propriétés immuno-modulatrices particulières au tabac (pro- vs. anti-inflammatoire). Par ailleurs, aucun des modes d'actions potentiels du tabac proposés à ce jour n'explique l'ambivalence observée entre la MC et la RCH. L'hypothèse la plus probable est celle d'un effet du tabac différent sur le côlon et l'intestin grêle. En effet, les études épidémiologiques sur les cas familiaux de MICI et sur les fumeurs atteints de MC (Orholm, M. *et al.*, 2000; Bridger, S. *et al.*, 2002; Halfvarson, J. *et al.*, 2003), ainsi que les études expérimentales sur la nicotine en condition inflammatoire (Eliakim, R. *et al.*, 2001; Eliakim, R. *et al.*, 2002), laissent penser que le tabac aurait un rôle protecteur au niveau du côlon et délétère au niveau de l'iléon.

Partant de ces observations cliniques, ce travail de thèse a pour but de caractériser un (ou plusieurs) des mécanismes impliqués dans le rôle immuno-modulateur du tabac. Cette étude se porte sur l'effet du tabac d'une part au niveau du côlon et d'autre part au niveau de l'iléon afin de mettre en évidence, par une analyse différentielle, les effets spécifiques du tabac sur le processus inflammatoire.

La première partie de ce travail se focalise sur l'effet immuno-modulateur du tabac au niveau du côlon. Un protocole d'exposition à la fumée de cigarette associé à une colite induite au DSS a été mis au point chez la souris afin d'obtenir un modèle reproduisant au mieux le tabagisme actif et permettant l'étude de l'inflammation colique. Les résultats obtenus font l'objet d'un article actuellement en révision dans le journal *Plos One* et sont présentés ci-dessous (Cf. chapitre III/1.1). Des résultats complémentaires seront également apportés dans ce manuscrit (Cf. chapitre III/1.3).

La seconde partie de ce travail s'intéresse à l'impact du tabac sur l'inflammation au niveau de l'intestin grêle. Un modèle d'inflammation jéjuno-iléale induite à l'indométacine couplé au protocole d'exposition à la fumée de cigarette a donc été mis en place chez la souris. Les résultats obtenus ont pour but de comparer les effets cellulaires et moléculaires du tabac entre l'iléon et le côlon afin d'identifier un mécanisme à l'origine de l'ambivalence du tabagisme observé chez les patients

III. Résultats

1. Effets de la fumée de cigarette sur l'inflammation colique

1.1. Résumé des résultats présentés dans l'article

La première partie de ce travail se focalise sur l'effet immuno-modulateur du tabac au niveau du côlon.

Pour cette étude, un modèle d'inflammation colique a été mis en place sur des souris C57Bl/6 exposées à la fumée de cigarette. Les souris sont pré-exposées pendant 2 semaines à la fumée de cigarette *via* un protocole standardisé (InExpose® exposure system-Scireq Inc) reproduisant au mieux le tabagisme humain. Lors de la troisième semaine, l'inflammation est induite par traitement au DSS (Cf. Figure 1 ; page 75).

Chez les souris sauvages, l'exposition à la fumée de cigarette réduit significativement l'expression clinique de la colite (perte de poids, score clinique et ratio poids-taille du côlon) (Cf. Figure 1). Cet effet se traduit par une diminution significative de l'expression des cytokines pro-inflammatoires du type Th1/Th17 dans le côlon (Cf. Figure 2 et 3 ; pages 76 et 77).

Ces observations nous ont conduits à analyser les populations leucocytaires pouvant être régulées par la fumée de cigarette au niveau intestinal. De façon surprenante, le recrutement et l'activité des neutrophiles, largement incriminés dans les lésions liées au traitement au DSS, ne sont pas altérés par l'exposition à la fumée de cigarette (Cf. Figure 4 ; page 78). Le recrutement des cellules T et NK ne sont pas non plus modifiés par la fumée de cigarette (Cf. Figure 5 ; page 79). Par ailleurs, une augmentation de la proportion de cellules iNKT au niveau du foie et du côlon des souris exposées à la fumée de cigarette a été observée (Cf. Figure 6 ; page 80).

Cette population cellulaire pourrait être à l'origine de l'effet protecteur du tabac sur la colite expérimentale au DSS. En effet, les cellules iNKT sont reconnues pour avoir un rôle clé dans la balance immunitaire et dans le maintien de l'homéostasie intestinale et sont sensibles aux variations de l'environnement intestinal. Pour tester leur implication dans la protection liée à la fumée de cigarette, des souris déficientes en cellules NKT fonctionnelles ($J\alpha 18^{-/-}$ et $CD1d^{-/-}$) ont été soumises au protocole DSS/cigarette. Les résultats démontrent une absence de régulation de l'inflammation colique par la fumée de cigarette chez ces souris que ce soit au niveau clinique (Cf. Figure 7 et 9 ; pages 81 et 83) ou moléculaire (absence de régulation de l'expression des cytokines Th1/Th17 par la fumée de cigarette) (Cf. Figure 8 ; page 82). Ces résultats indiquent clairement un rôle important des cellules iNKT dans la protection du côlon liée à la fumée de cigarette.

Ce travail démontre clairement que, expérimentalement, la fumée de cigarette protège les souris de la colite. Pour la première fois, les cellules iNKT ont été identifiées comme ayant un rôle majeur dans la protection du côlon liée à la fumée de cigarette.

1.2. Manuscrit de l'article en révision à Plos One

Colonic inflammation in mice is improved by cigarette smoke through iNKT cells recruitment.

Short title: Smoking improves colitis through iNKT cells

Muriel Montbarbon MSc ^{1,2,9}, Muriel Pichavant PhD ^{1,3,4,5,9}, Audrey Langlois MSc ^{1,2}, Edmone Erdual MSc ^{1,2}, François Maggiotto MSc ^{1,2}, Christel Neut PhD ^{1,2,8}, Thierry Mallevaey PhD ⁶, Sébastien Dharancy MD, PhD ^{1,7}, Laurent Dubuquoy PhD ^{1,2}, François Trottein PhD ^{1,3,4,5}, Antoine Cortot MD ^{1,2,7}, Pierre Desreumaux MD, PhD ^{1,2,7}, Philippe Gosset PhD ^{1,3,4,5}, Benjamin Bertin PhD ^{1,2,8}

1 Université Lille Nord de France, Lille, France

2 Inserm U995, F-59045 Lille, France

3 LI3- Team 8, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille; Institut Pasteur de Lille, Lille, France

4 Inserm U1019, Lille, France

5 CNRS, UMR 8204, Lille, France

6 Department of Immunology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

7 CHU Lille, Service des Maladies de l'Appareil Digestif et de la Nutrition, Hôpital Claude Huriez, Lille, France

8 UDSL, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lille, France

9 These authors contributes equally to this work

Corresponding author:

Benjamin Bertin, PhD, Inserm U995, Boulevard du Pr Jules Leclercq, 59045 Lille, Cedex.

Tel: +33 3 20 97 42 08

E-mail: benjamin.bertin-2@univ-lille2.fr

Abbreviations: CD: Crohn's disease, CS: cigarette smoke, DSS: dextran sodium sulfate, IBD: inflammatory bowel disease, NKT: natural killer T cells, TCR: T-cell receptor, UC: ulcerative colitis, WT: wild-type,

Abstract

Cigarette smoke (CS) protects against intestinal inflammation during ulcerative colitis. Immunoregulatory mechanisms sustaining this effect remain unknown. The aim of this study was to assess the effects of CS on experimental colitis and to characterize the intestinal inflammatory response at the cellular and molecular levels.

Using the InExpose® System, a smoking device accurately reproducing human smoking habit, we pre-exposed C57BL/6 mice for 2 weeks to CS, and then we induced colitis by administration of dextran sodium sulfate (DSS).

This system allowed us to demonstrate that CS exposure improved colonic inflammation (significant decrease in clinical score, body weight loss and weight/length colonic ratio). This improvement was associated with a significant decrease in colonic proinflammatory Th1/Th17 cytokine expression, as compared to unexposed mice (TNF ($p=0.0169$), IFN γ ($p<0.0001$), and IL-17 ($p=0.0008$)). Smoke exposure also induced an increased expression of IL-10 mRNA ($p=0.0035$) and a marked recruitment of iNKT (invariant Natural Killer T; CD45 $^{+}$ TCR β^{+} CD1d tetramer $^{+}$) cells in the colon of DSS-untreated mice. Demonstration of the role of iNKT cells in CS-dependent colitis improvement was performed using two different strains of NKT cells deficient mice. Indeed, in J α 18KO and CD1dKO animals, CS exposure failed to induce significant regulation of DSS-induced colitis both at the clinical and molecular levels.

Thus, our study demonstrates that iNKT cells are pivotal actors in the CS-dependent protection of the colon. These results highlight the role of intestinal iNKT lymphocytes and their responsiveness to environmental stimuli. Targeting iNKT cells would represent a new therapeutic way for inflammatory bowel diseases.

Key words: cigarette smoke; colonic inflammation; DSS colitis; NKT lymphocytes; tobacco

Introduction

Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are chronic, relapsing immune-mediated disorders of the gastrointestinal tract of unknown etiology. Emerging evidence suggests that disease development involves a deregulated dialogue between the intestinal flora and components of both the innate and adaptive immune systems in genetically susceptible individuals, under the influence of environmental factors (1, 2). The genetic contribution is now well characterized as genome wide association studies (GWASs) have identified a number of susceptibility genes that predispose to CD and/or UC (3). Environmental factors likely affect the incidence and disease history of inflammatory Bowel diseases (IBD) and among them active smoking has been established as the most robust risk factor (4, 5)

However, the effect of smoking appears to be ambivalent: smoking was shown to double the risk of developing CD and to worsen its course, increasing the need for steroids, immunosuppressants, and surgery (4, 5). On the contrary, smoking has been described as protective against UC (UC is 2.5 less frequent in smokers) and, after disease onset, improves its course, decreasing the frequency of flare-up episodes, the need for steroids, and the colectomy rate (4, 5). Finally it has been established that smoking cessation improves CD and worsens UC.

In contrast to this well-established relationship between IBD and tobacco, few experimental works have been undertaken in order to explore the role of cigarette smoke (CS) on intestinal homeostasis and to date, the underlying mechanism(s) of the effect of smoking in IBD still remain(s) unclear. It appears to be complex, probably involving different substances, including at least nicotine, oxygen free radicals, and carbon monoxide, and acting on different hypothetical targets such as mucus layer, cytokine and eicosanoid production, immune cell functions, gastrointestinal motility and microvasculature (5-7). Despite some limitations, animal models of chemically-induced colitis are widely used to study intestinal homeostasis and pathophysiology of IBD and some of them have been used to study the effect of CS (or one of its component) on the development of intestinal inflammation giving conflicting results (8). For example, Galeazzi *et al.* described an aggravation of DNBS-induced colitis by CS exposure and nicotine administration in rat (9), whereas a few years later, Ko *et al.* reported beneficial effects of CS inhalation and nicotine administration in the same experimental model (10, 11). More importantly, most studies are far from accurately reproducing tobacco intoxication since only one CS component (most often nicotine) was administered orally or subcutaneously.

Natural killer T (NKT) cells are a population of T lymphocytes that express NK cell markers and recognise glycolipid antigens presented by the non-classical MHC molecule CD1d (12). Due to their capacity to produce large amount of cytokines and chemokines, they are potent immunoregulatory cells in various physiological or pathological situations (13, 14). Invariant (i) NKT cells are a subgroup characterized by their expression of a restricted TCR repertoire composed of an invariant TCR- α (V α 14-J α 18 in mice and V α 24-J α 18 in humans) and are present in the intestine of both humans and mice. Their contributions to the gut homeostasis remain elusive, since they were shown to display both protective and deleterious roles in IBD patients and in murine models of experimental colitis (15, 16). Moreover iNKT cells are highly sensitive to environmental stimuli, notably to intestinal microbiota (17, 18) and *ex vivo* to CS extract (19).

Smoking improves colitis through iNKT cells

Based, on the epidemiological and clinical observations that link cigarette smoking and modulation of intestinal inflammation, we hypothesized that identifying the mechanism involved in the effect of CS on colitis might lead to the characterization of a new anti-inflammatory process involved in colon protection. In order to experimentally reproduce the clinical effect of smoking on colonic inflammation, we used the InExpose® System, a smoking device accurately reproducing human smoking habit. The present study investigated the effect of main stream smoke exposure on experimental colitis induced by DSS in C57BL/6 mice with the aim to characterize the colonic inflammatory response both at the cellular and molecular levels.

Material and methods

Ethic Statement

Animal experiments were performed in the accredited Institution of Pasteur animal care facility (Institut Pasteur de Lille, France) according to governmental guidelines and approved by the “Comité d’Ethique en Expérimentation Animale Nord-Pas de Calais” (CEEA n°75 ; ethic committee for animal experimentation of the region Nord-Pas de Calais – France ; number of protocol acceptance: CEEA 012012).

Animals

Specific pathogen-free male C57BL/6 mice (7-8 weeks old) were obtained from Janvier Company (France) and J α 18^{-/-} and CD1d^{-/-} mice (7-11 weeks old) were obtained from the animal facility of the Pasteur Institute in Lille (France). Mice were fed with a standard laboratory diet and given autoclaved tap water ad libitum. They were kept in an air-conditioned room with controlled temperature (22±1°C), humidity (65-70%), and day/night cycle (12h light, 12h dark). Mice were acclimatized for 1 week before entering the study. Each group contained 6 to 10 animals. Animals were monitored daily for behavior, aspect alteration and body weight loss. Animals presenting signs of suffering (weight loss > 20%, prostration, tremors...) were instantaneously euthanized.

Cigarette smoke exposure

Research cigarettes (3R4F reference cigarette, purchased from the University of Kentucky) were used throughout the experiment. A maximum of 20 mice were placed in the ventilated smoking chamber of InExpose[®] System (Scireq Inc) (see Sup. Fig. 1) and exposed to the mainstream smoke of 5 cigarettes (8 puffs/ cigarettes, 1 puff of 3 seconds/minutes), five days a week.

Experimental colitis

Colitis was induced during the third week of CS exposure and mice were sacrificed at day 8 following colitis induction. Control animals were either untreated or only received DSS or CS alone (see Fig. 1A for detailed protocol)

Colitis was induced by the administration of DSS (molecular weight 40000, TdB consultancy). 2.5% DSS were resuspended in autoclaved tap water and given ad libitum. Fresh DSS solution was prepared daily. Control groups received tap water. Mice were weighed every day through DSS exposition. Mice were euthanized by cervical dislocation. The entire colon was removed from the caecum to the anus, then measured, emptied and weighed. A clinical score ranging from 0 to 10 was used to evaluate the severity of the colitis. Score was defined as follows: loss in body weight (0=no loss; 1=5–10%; 2=10–15%; 3=15–20%; 4=>20%), stool consistency (0=Normal pellets; 1=slightly loose feces, 2=Loose feces; 3=Watery diarrhea), colon weight/length ratio (0=<25mg/cm; 1=26-35mg/cm; 2=36-45mg/cm; 3=>45mg/cm). Mucosal samples from the lower half of the colon were frozen and stored at -80°C for subsequent analysis of inflammatory marker expression.

RNA extraction and qPCR analysis

Total RNA from colon was isolated from tissue using Nucleospin RNA III kit (Macherey Nagel), according to the manufacturer's instructions. Total RNA from ileum (10 first cm from the caecum to the stomach) was isolated from total ileum homogenate using Trizol reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions, followed by DNase I (Invitrogen) digestion.

First strand cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and primers described in supplemental table 1. Expression levels of each gene were normalized using β-actin gene expression, yielding the relative expression value.

Preparation of intestinal cells

Intestinal cells from mice were prepared by classical procedures. Colons and liver were excised and finely minced, followed by two enzymatic digestions for 30 min at 37°C in RPMI 1640 containing 1 mg/ml collagenase type VIII (Sigma Aldrich) and 1 µg/ml DNase type I (Sigma Aldrich). After wash, homogenates were resuspended in a 20% Percoll gradient and centrifuged at 2000 rpm, without brake, at room temperature for 10 min. After centrifugation, pelleted cells were aspirated and washed in PBS 2% FCS. RBCs were removed with lysis buffer (Sigma Lysis).

Flow cytometry

Cells were prepared as previously described, and stained for 30 min at 4°C with the following Abs: mAbs against mouse CD5 (FITC-conjugated), NK1.1 (PerCp-Cy5.5-conjugated), TCR-β (V450-conjugated), CD45 (Q-dot605-conjugated), and isotypes controls were purchased from Biolegend (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France). PE-conjugated PBS57-loaded CD1d tetramer was from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Tetramer Facility (Emory University, Atlanta, GA). mAbs against mouse CD4 (APC-H7-conjugated), CD11c (PE-CY7-conjugated), CD11b (V450-conjugated), Ly6G (Alexa-700-conjugated) and F4/80 (PE-conjugated) were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Cells were acquired and analyzed on a Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson, Rungis, France), and using the FlowJo software respectively. Gating strategy for the different cell populations is described in supplemental figure 2.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA) (nonparametric Mann-Whitney test). Differences were considered statistically significant when p value was < 0.05. All data were expressed as mean ± SEM or SD.

Results

Cigarette smoke exposure improves DSS-induced colitis.

We have first evaluated the impact of CS exposure on the severity of DSS-induced colitis in C57BL/6 WT mice. A standard protocol of exposure was defined and used throughout this study (Fig. 1A). Mice were exposed for three weeks to CS (InExpose® System, Sup. Fig. 1). Colitis was induced during the third week (2.5% DSS in drinking water).

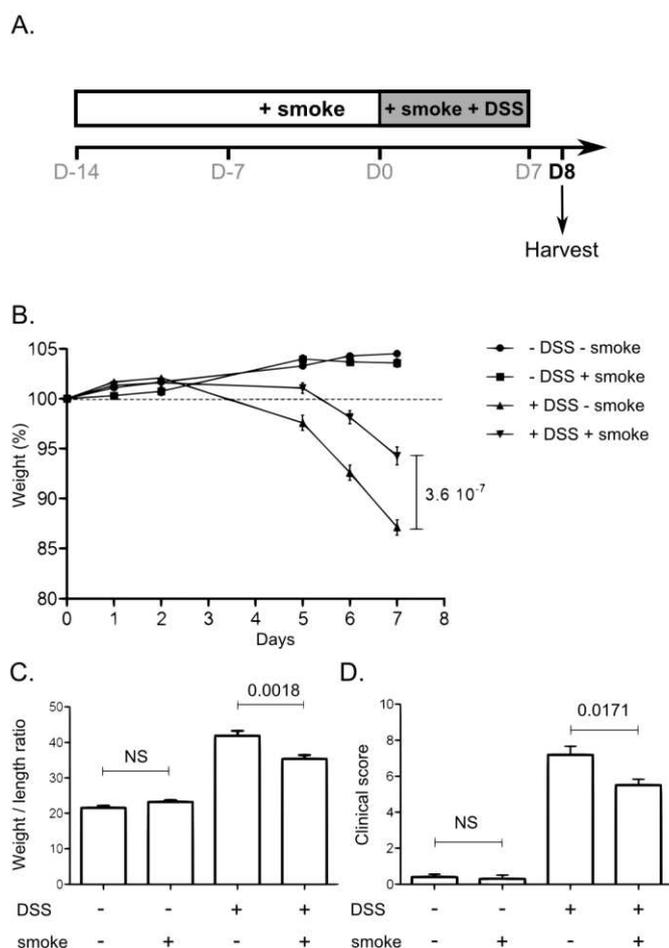


FIGURE 1: Effect of CS exposure on clinical parameters of colitis induced by DSS

A. Overview of the protocol for CS exposure and experimental colitis. Mice were exposed to CS once a day for three weeks using InExpose® System (Scireq Inc). During the third week, mice were fed 2.5% DSS in their drinking water for 7 days. Mice were killed at day 8. **B.** Mice body weight changes during induction of colitis. Body weight changes were calculated by dividing body weight on the specified day by the weight of the starting day (day 0) and expressed in percent. $25 < n < 30$; error bars represent SEM. Number on the graph represents p value. **C.** Colon weight/length ratio represented in mg per cm of colon. Colon were excised from anus to caecum, measured and emptied before being weighed. Graph represents the mean value and error bars represent SEM ($17 < n < 19$). Number on the graph represents p value. **D.** Clinical scores were established according to stool consistency, body weight loss at day 8 and colonic weight/length ratio. Graph represents the mean value of the clinical score and error bars represent SEM ($n=10$). NS, non significant. Number on the graph represents p value.

As expected, mice treated with DSS alone (DSS-smoke) developed colitis as assessed by body weight loss (Fig. 1B), the increased weight/length ratio of the colon (Fig. 1C) and the measurement of clinical score (Fig. 1D). CS exposure alone had no effect on these parameters. DSS and CS co-treated (DSS+smoke) mice displayed a milder colitis, compared to DSS-smoke mice, as characterized by a delayed body weight loss (Fig. 1B, $p=3.6 \times 10^{-7}$), a reduced colonic weight/length ratio (Fig. 1C, $p=0.0018$) and clinical score (Fig. 1D, $p=0.0171$). Histological analysis was performed on samples taken 1 cm above the rectum, but no difference of histological score (as described by Dieleman (20)) was observed between groups (data not shown).

Cigarette smoke exposure decreases pro-inflammatory cytokine expression during colitis

To further characterize the inflammation, we have analyzed the mRNA expression of cytokines in intestinal tissue homogenates. DSS treatment increased the expression of colonic TNF and IL-1 β by over 20 and 200 fold respectively (Fig. 2). Exposition to CS reduced the expression of DSS-induced TNF in the colon (Fig. 2, $p=0.0169$) whereas the expression of IL-1 β tended to be decreased ($p=NS$). Interestingly, CS exposure alone increased the expression of the IL-10 cytokine (Fig. 2, $p=0.0035$). Compared to DSS-smoke mice, DSS+smoke mice showed a higher level of IL-10 and TGF- β cytokines in the colon but values were not statistically significant.

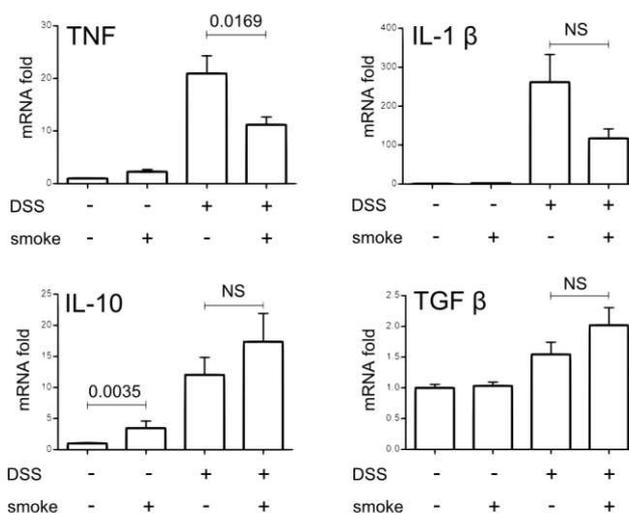


FIGURE 2: Effect of CS exposure on colonic pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine expression induced by DSS.

Cytokine expression in colon homogenates was determined by real time qPCR analysis and normalized by the β -actin expression. Graph represents the mean of the fold expression of each cytokine with the expression level measured to control animals (no CS exposure, no DSS) used as a reference and set to one. Data are pooled from two independent experiments with a total of 17-20 mice/group; error bars represent SEM. NS, Non significant; Number on the graph represents p value.

DSS treatment strongly increased mRNA expression of Th1/Th17 proinflammatory cytokines IFN γ , IL-21, IL-17 and IL-22 (Fig. 3, fold risen up from 100 to 300), which confirms previous observations (21). CS exposure drastically decreased the expression of DSS-induced IFN γ (Fig. 3, $p<0.0001$), IL-21 ($p<0.0001$), IL-17 ($p=0.0008$) and IL-22 ($p=0.0016$). IL-12/IL-23 sub-unit p40

Smoking improves colitis through iNKT cells

mRNA expression was also analyzed but no significant difference was observed between the two DSS-treated groups (data not shown). Concerning Th2 cytokines, IL-5 and IL-13 were increased by DSS treatment to a lesser extent (Fig. 3, up to 8-fold increase). IL-13 expression in the colon was up-regulated by CS exposure alone ($p=0.0057$) and decreased in DSS+smoke compared to DSS-smoke mice ($p=0.0379$). CS exposure had no effect on IL-5 expression and IL-4 was never detected in the colon of mice (not shown).

Our results demonstrate that CS exposure is able to limit acute colonic inflammation induced by DSS treatment and that this effect is linked to a down-regulation of Th1/Th17 cytokine expression in inflamed colon.

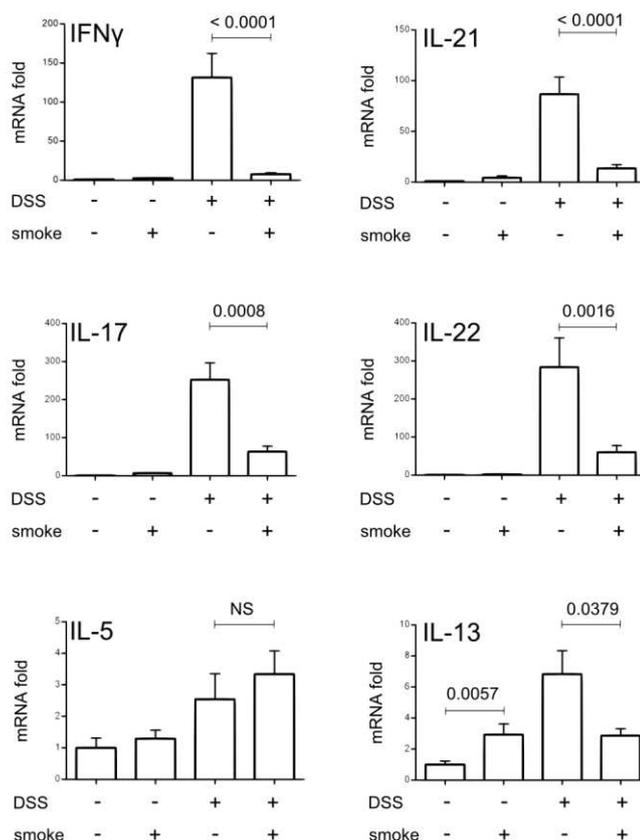


FIGURE 3: Effect of CS exposure on colonic Th1/Th2/Th17 cytokine expression induced by DSS.

Cytokine expression in colon homogenates was determined by real time qPCR analysis and normalized by the β -actin expression. Graph represents the mean of the fold expression of each cytokine with the expression level measured to control animals (no CS exposure, no DSS) used as a reference and set to one. Data are pooled from two independent experiments with a total of 17-20 mice/group; error bars represent SEM. NS, Non significant; Number on the graph represents p value.

Cigarette smoke protection is not linked with modification in neutrophil recruitment or activation in the colon

Neutrophils constitute one of the most prominent infiltrating cells and have been suggested to contribute significantly to the generation of tissue injury in intestinal inflammation (22, 23). It is therefore logical to assume that neutrophil recruitment could be

decreased by CS exposure and could lead to the protecting effect observed in our model. We therefore evaluated CXCL1/KC and CXCL2/MIP-2 mRNA expression, two critical effectors for neutrophil trafficking. Their expression were up-regulated by DSS treatment but were not modulated by CS exposure (Fig. 4A) suggesting that neutrophil recruitment was not impacted by CS. Similarly, DSS-induced colitis was associated with an increase in colonic neutrophil infiltration (Fig. 4B) and myeloperoxidase (MPO) levels (Fig. 4C) which were not modulated by CS.

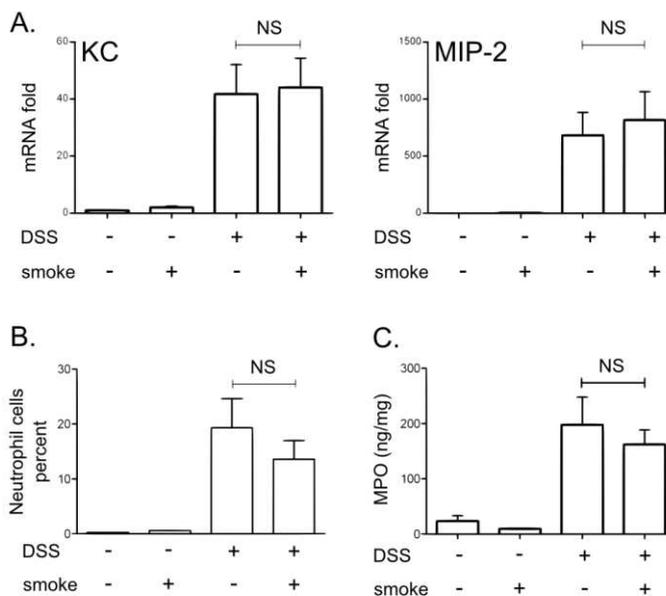


FIGURE 4: Effect of CS exposure on neutrophils recruitment and activation induced by DSS colitis.

A. CXCL1/KC and CXCL2/MIP-2 mRNA expression in colon homogenates was determined by real time qPCR analysis and normalized by the β -actin expression. Data are pooled from two independent experiments with a total of 17-20 mice/group; error bars represent SEM. NS, Non significant; Number on the graph represents p value. **B.** Mean +/- SD of neutrophil (CD11c- Ly6G+) percentages of CD45+ cells in the colonic lamina propria (n=5). NS, non significant **C.** Colonic MPO level determined by ELISA. The graph represents the mean +/- SD of the final values of MPO level expressed in ng/mg of protein (n=10). NS, non significant.

The decrease of inflammation associated with CS exposure in DSS treated mice is not linked to a modification in neutrophil recruitment or activation.

Cigarette smoke modulates iNKT cell numbers in the colon and the liver

In order to identify a particular cell population that could be targeted by CS and involved in the protection from colitis, we have analyzed the leukocyte populations in the colon of mice only exposed to CS as compared with air exposed mice. Flow cytometry analysis revealed that CS exposure did not alter T cell (CD5+, NK1.1-), NK cell (CD5-, NK1.1+) nor total NKT cell (CD5+, NK1.1+) populations in the colon (Fig. 5, gating Sup. Fig. 2). Interestingly, iNKT cells (CD45+ TCR β + PBS57-loaded CD1d tetramer+; gating Sup. Fig. 2) were recruited in the colon by CS exposure (Fig. 6A ; p=0.0411).

Smoking improves colitis through iNKT cells

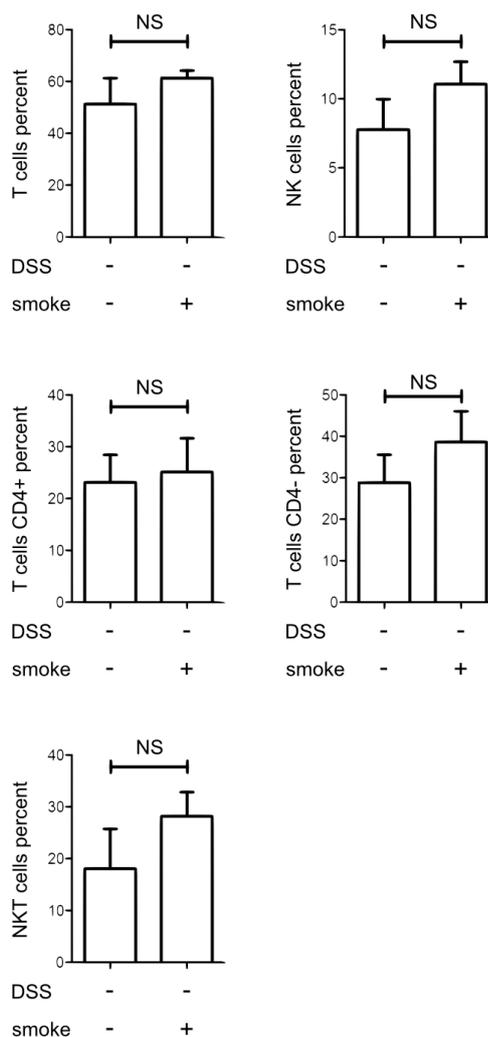


FIGURE 5: Effect of CS exposure on colonic cell recruitment.

The percentages of lymphocyte cell population (conventional T cells, NK cells and total NKT cells) among CD45+ cells were represented in the colonic mucosa of mice exposed or not to CS (20 mice/groups). Colonic tissues of 5 mice of the same exposure group were pooled before cell extraction in order to obtain enough cells for cytometry analysis. Graph represents the mean value +/- SD of the cell percentage in the colonic mucosa according to CS exposure. Number on the graph represents p value.

Since iNKT cells are recognized as key regulators of intestinal homeostasis (24), we further investigated their implication in the CS-protection against colitis.

We confirmed the recruitment of iNKT cells in the colon of CS exposed mice in three independent experiments by flow cytometry (Fig. 6A) and by qPCR measurement of the V α 14J α 18 TCR gene rearrangement, which is specific to iNKT cells. As expected, V α 14 expression was significantly increased in the colon of mice exposed to CS compared to unexposed mice (Fig. 6B, p=0.015). Since the liver constitutes an important pool of iNKT cells, we analyzed if CS could also mobilize these cells in the liver. As shown in figure 6C, the proportion of iNKT cells was increased in the liver of CS exposed mice compared to naive mice (Fig. 6C, p=0.0159).

Smoking improves colitis through iNKT cells

CS exposure was linked with an increased mobilization of iNKT cells in the colon and the liver whereas the numbers of T, NK and total NKT cells were not modulated.

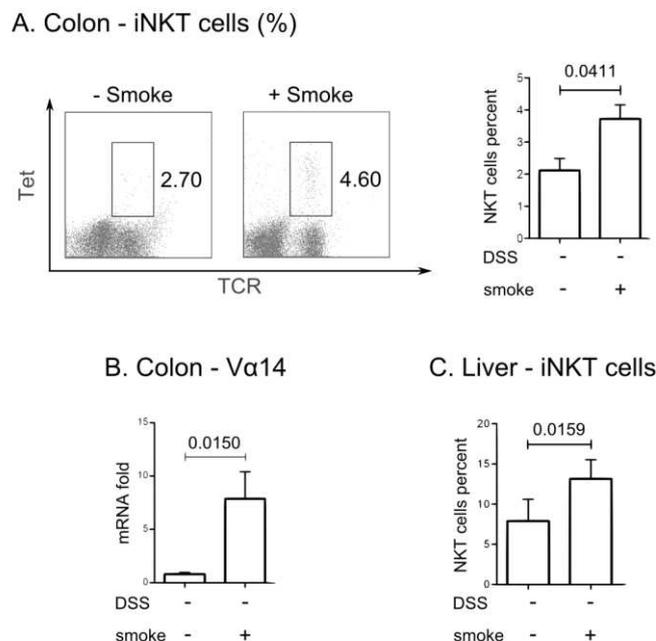


FIGURE 6: Effect of CS exposure on NKT cells recruitment.

A. Percentage of iNKT cells (TCR β ⁺ CD1d tetramer⁺) in CD45⁺ cells in the colonic mucosa of mice exposed or not to CS. Colonic tissues of several mice per group (3 to 5 animals) were pooled before cell extraction in order to obtain enough cell for cytometry analysis. On the left: a representative dot plot is shown. Numbers indicate iNKT cell percentage. On the right: Graph represents the mean value \pm SEM of the iNKT cell percentage in the colonic mucosa according to CS exposure (n=32 mice/condition from 3 independent experiments). Number on the graph represents p value. **B.** V α 14 mRNA expression in the colon as determined by real time qPCR analysis after normalization by the β -actin expression (17<n<20). The expression level measured with control animals un-exposed to CS was set to one. Graph represents mean value \pm SEM. Number on the graph represents p value. **C.** iNKT cells (TCR β ⁺ CD1d tetramer⁺) represented in percent of CD45⁺ cells in the liver of mice exposed or not to CS for 3 weeks (n=5). Graph represents the mean value \pm SD. Number on the graph represents p value.

CS-dependent colitis protection is lost in NKT cell deficient mice

These results led us to test whether iNKT cells were involved in the CS-dependent protection. To address this question, J α 18^{-/-} mice (iNKT cell-deficient mice) were exposed to the same protocol. As shown in figure 7, J α 18^{-/-} mice exposed to CS were not protected against DSS colitis. Indeed, DSS+smoke J α 18^{-/-} mice lost weight in an identical manner (Fig. 7A) and displayed the same clinical score (Fig. 7C) than DSS-smoke mice. Moreover, DSS+smoke J α 18^{-/-} mice showed a higher weight/length ratio of the colon than DSS-smoke J α 18^{-/-} mice (Fig. 7B; p=0.0424).

Smoking improves colitis through iNKT cells

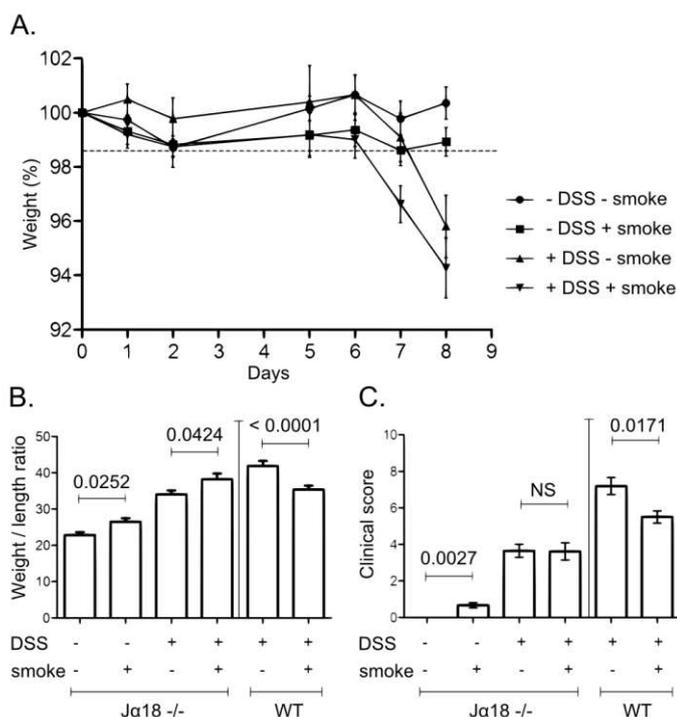


FIGURE 7: Effect of CS exposure on clinical parameters of DSS-induced colitis in Jα18^{-/-} mice.

A. Mice body weight changes during induction of colitis. Body weight changes were calculated by dividing body weight on the specified day by the body weight of the starting day (day 0) and expressed in percent ($7 < n < 12$); error bars represent SD. **B.** Colon weight/length ratio represented in mg per cm of colon. Colon were excised from anus to caecum, measured and emptied before being weighed. Graph represents the mean value and error bars represent SEM (Jα18^{-/-}: $9 < n < 17$; WT: $17 < n < 20$). Number on the graph represents p value. **C.** Clinical scores were established according to stool consistency, body weight loss at day 8 and colonic weight/length ratio (see material and methods). Graph represents the mean value of the clinical score and error bars represent SEM (Jα18^{-/-}: $9 < n < 17$; WT: $17 < n < 20$). NS, non significant.

These observations were corroborated by the expression of cytokines in the large intestine. Whereas in WT mice, CS was able to strongly inhibit the expression of colonic proinflammatory cytokines induced by DSS (Fig. 2 and 3), this effect was lost in Jα18^{-/-} mice as revealed by measurement of TNF, IFN γ , IL-21, IL-17 or IL-22 (Fig. 8). IL-1 β level was even higher in the colon of DSS+smoke Jα18^{-/-} mice compared to DSS-smoke Jα18^{-/-} mice (Fig. 8A, $p=0.0266$).

Smoking improves colitis through iNKT cells

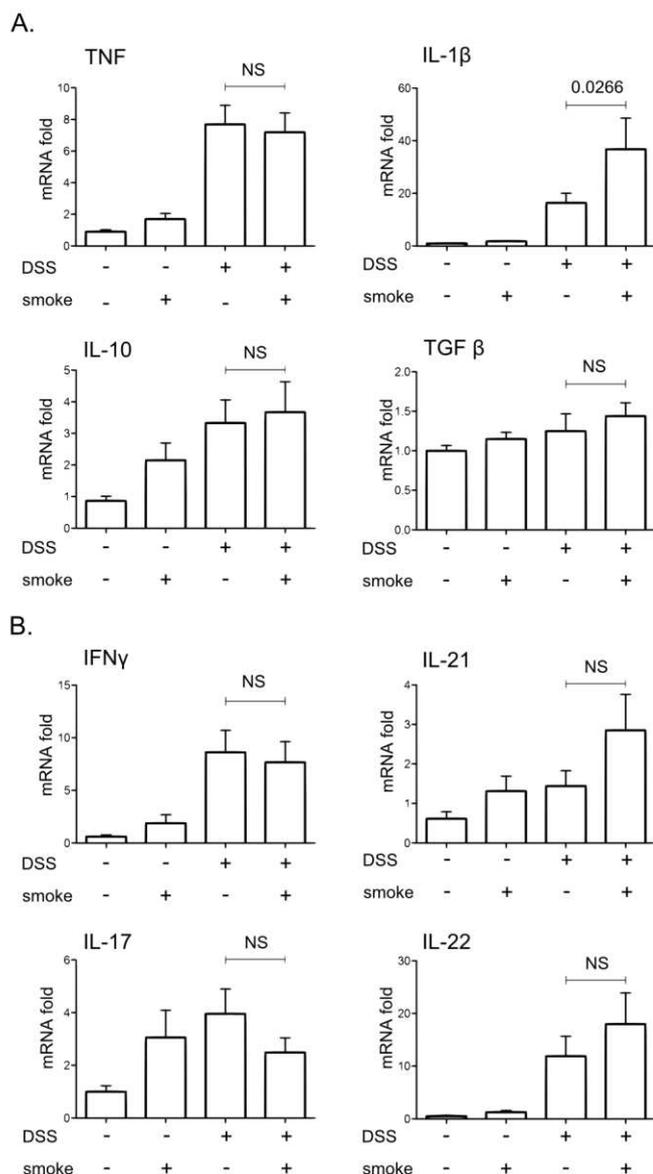


FIGURE 8: Effect of CS exposure on colonic cytokine expression induced by DSS in $\text{J}\alpha 18^{-/-}$ mice.

Cytokines expression in colon homogenates was determined by real time qPCR analysis and normalized by the β -actin expression. Graph represents the mean of the fold expression of each cytokine with the expression level measured to control animals (no CS exposure, no DSS) used as a reference and set to one. Data are pooled from two independent experiments ($11 < n < 17$). Error bars represent SEM. NS, Non significant; Number on the graph represents p value.

As activation of iNKT cells is mainly dependent on the presentation of glycolipids by the CD1d molecule, we used CD1d $^{-/-}$ mice to confirm the role of iNKT cells in the CS protective effect. In DSS-treated CD1d $^{-/-}$ mice, CS exposure did not affect clinical parameters (Fig. 9A-C) and TNF expression level analysis in colon homogenates (Fig. 9D).

Smoking improves colitis through iNKT cells

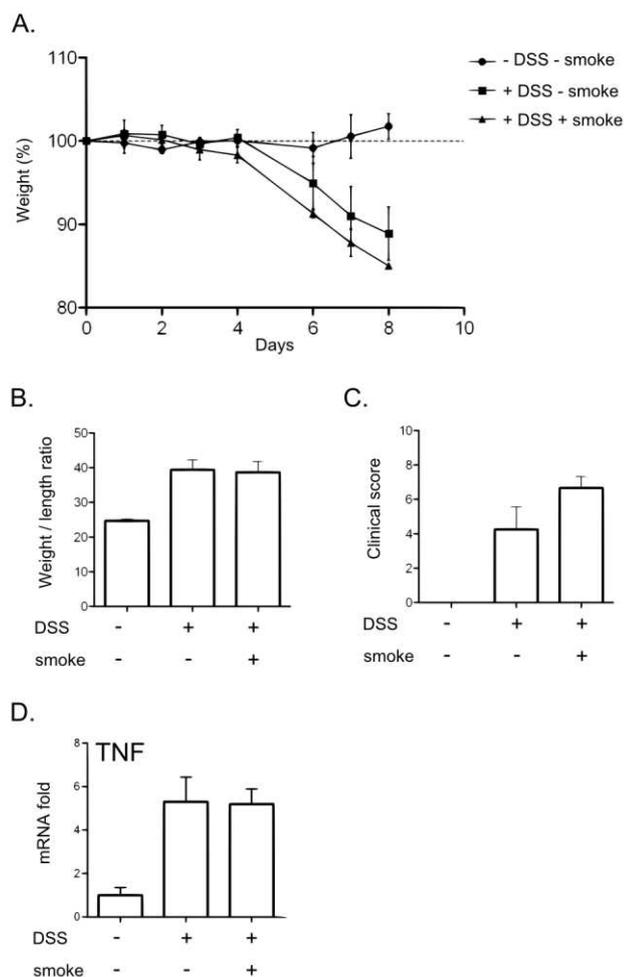


FIGURE 9: CS exposure did not modulate the development of colitis induced by DSS in CD1d^{-/-} mice

A. Mice body weight changes during induction of colitis. Body weight changes were calculated by dividing body weight on the specified day by the body weight of the starting day (day 0) and expressed in percent ($3 < n < 4$); error bars represent SD. **B.** Colon weight/length ratio represented in mg per cm of colon. Colon were excised from anus to caecum, measured and emptied before being weighed. Graph represents the mean value and error bars represent SD ($3 < n < 4$). **C.** Clinical scores were established according to appearance of diarrhea, body weight loss at day 8 and colonic weight/length ratio (see material and methods). Graph represents the mean value of the clinical score and error bars represent SD ($3 < n < 4$). **D.** TNF expression in colon homogenates was determined by real time qPCR analysis and normalized by the β -actin expression. Graph represents the mean \pm SD of the fold expression of TNF with the expression level measured to control animals (no CS exposure, no DSS) used as a reference and set to one ($3 < n < 4$).

Altogether, these results show that in DSS-induced colitis, the CS-dependent protection on colonic inflammation is lost in the absence of iNKT cells.

Discussion

Smoking can influence the risk of emergence and development of IBD with divergent regulatory roles on CD and UC. In this study, we addressed the correlation between smoking and intestinal inflammatory response by evaluating colonic inflammation in mice that have been pre-exposed to CS. We have shown that CS exposure protects the colon from DSS-induced inflammation. Moreover, in an attempt to bring out a particular leukocyte population involved in this process, we have identified the iNKT lymphocytes as a major actor of the CS-dependent protection of the inflammation in the colon. iNKT cells are emerging as an important immunoregulatory population of lymphocytes able to polarize the immune response. iNKT cells are sensitive to environmental stimuli (17, 18) and we showed here for the first time that exposure to an external factor can influence their response in the intestine, bringing a protection against intestinal inflammation.

The effect of cigarette consumption has been investigated in several experimental models of intestinal inflammation, giving conflicting results (8). Oral or subcutaneous administration of only one CS component is far to reproduce accurately tobacco intoxication. It is also important to distinguish the mainstream smoke (emerging from the filter of a cigarette) and the side stream smoke (emerging from the lit end of the cigarette, *i.e.* passive smoking) which differ significantly (25). Most studies evaluated the effect of passive CS on intestinal inflammation (10, 11). To date, only Galeazzi *et al.* examined the role of mainstream smoke on experimental DNBS-induced colitis in rats and described an aggravation of the colitis after CS exposure and oral nicotine administration in rat (9). These results are not concordant with the human studies reporting a protective effect of CS on the occurrence and course of UC. Therefore, to develop a relevant model, we used the InExpose[®] System device, which closely mimics human smoking habits. In this chamber, mice were exposed to the mainstream of CS in a rhythmic fashion with the precise control of any desired puffing profile. A period of 2 weeks allowed us to obtain the impregnation of mice and their habituation to smoking. To induce colonic inflammation, we used the recognized model of colitis induced by DSS which mimics some of the molecular, biological and clinical features of UC (21, 26, 27). This protocol led us to attain a reproducible protective effect of CS exposure on DSS-induced colitis, and to clarify underlying mechanisms.

In this regard, we identified iNKT cells as a central component in CS-induced protection against colitis, highlighting a further role of this cell population within the intestine. In mice, previous studies have shown that NKT cells may exert a protective effect against experimental colitis. Administration of CD1d ligands (α -GalCer and OCH) resulted in a reduction of intestinal inflammation in the colon (28, 29). Adoptive transfer of NKT cells in TNBS- and in DSS-treated mice alleviated colitis (28, 30). Finally, two recent studies have provided evidence that iNKT cells are highly sensitive to environmental stimuli, particularly to intestinal microbiota, in order to achieve their maturation (17, 18). Altogether, these studies are in favor of the control of intestinal tolerance and homeostasis by iNKT cells depending on their location and the inflammatory or environmental context. By demonstrating the iNKT cell involvement in the protective effect of smoking in our model, we now add a new environmental factor that modulates iNKT cell functions in the gut.

By using CD1d tetramer loaded with PBS57 (an α Galcer indistinguishable analog), we found that 2.1 ± 0.36 % of lamina propria lymphocytes in the colon of control mice were iNKT cells. This result is slightly different from those recently reported by Wingender *et al.* who found a relative percentage of 0.71 % using comparable experimental procedure (18). To our knowledge, no other study has evaluated iNKT cell rates in the colon with CD1d tetramer staining. Therefore, it seems currently difficult to know whether this discrepancy is relevant. One possible explanation could be the origin and the different housing condition of our mice provider (Janvier), since results from the Wingender study clearly showed that variation in the environment of mice between different mice vendors impact iNKT cell number and function (18). Nevertheless, these data confirm that iNKT cells constitute a significant lymphocyte population within the colon.

Several mechanisms could explain the activation of CS-exposed iNKT cells. The main activation process of iNKT cells involves CD1d-dependent presentation of glycolipids antigens by Antigen Presenting Cells (APC), including intestinal epithelial cells (IEC) (31). In our model, CS exposure could trigger antigen presentation by IEC resulting in activation and polarization of iNKT cells. Thus, we co-cultured mouse iNKT cells with MODE-K cells (mouse IEC) exposed to soluble CS extract but did not observe any cytokine production by iNKT cells (unpublished data). Another source of CD1d-dependent antigens may be intestinal microflora which may be altered by CS exposure. Even if the role of microbiota on iNKT cells functions is now well established (17, 18), bacterial antigens involved in this process remain to be determined. Finally, iNKT cells have been recently shown to be oriented toward an anti-inflammatory profile by neurotransmitter like noradrenaline (32). One of the main active components of CS is nicotine, which is a known neurotransmitter protective on UC course. In our model, it could act directly on iNKT cells and lead to an anti-inflammatory profile.

On the other hand, AhR (Aryl hydrocarbon receptor) receptor could play a role in the response of iNKT cells to CS in our model. AhR receptor is a transcription factor implicated in the regulation of inflammatory responses. It binds several pollutants like dioxins (33). AhR^{-/-} mice are more sensitive to DSS colitis than WT mice while AhR^{-/+} mice are less sensitive and exhibit a decreased expression of TNF and IL-17 and an increased expression of IL-10 (34) as we observed in our model. Moreover, several recent studies have shown that AhR activation leads to an improvement of DSS colitis (35-39), TNBS colitis and oxazolone colitis (37, 40). As in our own model (Figure 3), it is remarkable that control of intestinal inflammation through AhR pathway involved a reduction of Th1/Th17 cytokines (33, 37). This observation appears to be relevant regarding the cytokines profile (Th1/Th17; Figure 3) regulated by CS in our model. Therefore, activation of AhR by CS components could explain our results. This hypothesis is reinforced by the fact that CS contains significant amounts of dioxin like molecules (41, 42) and is able to activate AhR pathways in vivo and in vitro (43). Furthermore, activation of AhR is linked to modifications of number and activation state of NKT cells in the liver (44). This receptor could therefore play a role in iNKT cell polarization, either directly or indirectly.

Another underlying question is the mechanistic link between iNKT cells and the control of DSS-induced colitis. We showed that mice exposed to CS expressed higher level of IL-10 in their colon than unexposed mice (Fig. 2). To check whether IL-10 was produced by iNKT cells themselves, we stained IL-10 in colonic iNKT cells from smoking and control mice. Unfortunately, we could not detect any change in the intracellular levels of IL-10 when

comparing smoking mice with control animals (unpublished data). Another mechanism could be the IL-10 production by other cells orchestrated by iNKT cells after CS stimulation. Indeed, it was recently demonstrated that soluble factors from human iNKT cells have the properties to instruct peripheral blood monocytes to differentiate into suppressive dendritic cells (DC)-like producing IL-10 (45). Moreover, iNKT cells modulate the immunosuppressive function of IL-10-secreting neutrophils (46). The capacity of CS-exposed iNKT cells to promote the IL-10 production in both DC and neutrophils should be evaluated in the future.

In conclusion, this study demonstrated that mainstream CS exposure protects mice from experimental colitis and, for the first time, we have identified iNKT cells as a major player of the CS-dependent protection in colonic inflammation. Therefore, our study contributes to better elucidate the impact of smoking, as a widespread environmental factor in IBD. Targeting iNKT cells would represent a novel therapeutic way (47). Design of new molecules acting on iNKT cell polarization could reproduce the effects of CS and allow to decrease the inflammation in the colon.

Acknowledgements: We express our gratitude to Prof. JF. Colombel for critical reading of the manuscript and to D. Huges (Université Lille Nord de France) for english editing of the manuscript. We thank C. Dubuquoy for technical assistance.

Conflicts of interest: The authors have no conflict of interest to disclose

Author's contribution: MM, MP, PG and BB designed the study – MM, MP, AL, EE, FM, CN, PG, BB performed experiments and analysis of the data – MM, MP, SD, CN, TM, LD, PD, PG, AC, BB wrote the paper and participated to the critical reading of the manuscript – FT provided knock-out mice.

References

1. Baumgart DC, Carding SR. (2007) Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*;369:1627-40.
2. Abraham C, Cho JH. (2009) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*;361:2066-78.
3. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. (2011) Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*;474:307-17.
4. Cosnes J. (2004) Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*;18:481-96.
5. Birrenbach T, Bocker U. (2004) Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis*;10:848-59.
6. Sopori M. (2002) Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol*;2:372-7.
7. Karban A, Eliakim R. (2007) Effect of smoking on inflammatory bowel disease: Is it disease or organ specific? *World J Gastroenterol*;13:2150-2.
8. Verschuere S, De Smet R, Allais L, et al. (2012) The effect of smoking on intestinal inflammation: what can be learned from animal models? *J Crohns Colitis*;6:1-12.
9. Galeazzi F, Blennerhassett PA, Qiu B, et al. (1999) Cigarette smoke aggravates experimental colitis in rats. *Gastroenterology*;117:877-83.
10. Ko JK, Sham NF, Guo X, et al. (2001) Beneficial intervention of experimental colitis by passive cigarette smoking through the modulation of cytokines in rats. *J Investig Med*;49:21-9.
11. Ko JK, Cho CH. (2005) The diverse actions of nicotine and different extracted fractions from tobacco smoke against hapten-induced colitis in rats. *Toxicol Sci*;87:285-95.
12. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. (2007) The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*;25:297-336.
13. Matsuda JL, Mallevey T, Scott-Browne J, et al. (2008) CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr Opin Immunol*;20:358-68.
14. Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. (2011) Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol*;11:131-42.
15. van Dieren JM, van der Woude CJ, Kuipers EJ, et al. (2007) Roles of CD1d-restricted NKT cells in the intestine. *Inflamm Bowel Dis*;13:1146-52.
16. Middendorp S, Nieuwenhuis EE. (2009) NKT cells in mucosal immunity. *Mucosal Immunol*;2:393-402.
17. Olszak T, An D, Zeissig S, et al. (2012) Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*;336:489-93.
18. Wingender G, Stepniak D, Krebs P, et al. (2012) Intestinal Microbes Affect Phenotypes and Functions of Invariant Natural Killer T Cells in Mice. *Gastroenterology*;143:418-28.
19. Hogan AE, Corrigan MA, O'Reilly V, et al. (2011) Cigarette smoke alters the invariant natural killer T cell function and may inhibit anti-tumor responses. *Clin Immunol*;140:229-35.
20. Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, et al. (1998) Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol*;114:385-91.
21. Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. (2005) Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*;288:G1328-38.
22. Nikolaus S, Bauditz J, Gionchetti P, et al. (1998) Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut*;42:470-6.
23. Wallace JL, McKnight W, Asfaha S, et al. (1998) Reduction of acute and reactivated colitis in rats by an inhibitor of neutrophil activation. *Am J Physiol*;274:G802-8.
24. Wingender G, Kronenberg M. (2008) Role of NKT cells in the digestive system. IV. The role of canonical natural killer T cells in mucosal immunity and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*;294:G1-8.
25. Borgerding M, Klus H. (2005) Analysis of complex mixtures--cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol*;57 Suppl 1:43-73.
26. Yan Y, Kolachala V, Dalmaso G, et al. (2009) Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One*;4:e6073.

Smoking improves colitis through iNKT cells

27. Fang K, Bruce M, Pattillo CB, et al. (2011) Temporal genomewide expression profiling of DSS colitis reveals novel inflammatory and angiogenesis genes similar to ulcerative colitis. *Physiol Genomics*;43:43-56.
28. Saubermann LJ, Beck P, De Jong YP, et al. (2000) Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology*;119:119-28.
29. Ueno Y, Tanaka S, Sumii M, et al. (2005) Single dose of OCH improves mucosal T helper type 1/T helper type 2 cytokine balance and prevents experimental colitis in the presence of valpha14 natural killer T cells in mice. *Inflamm Bowel Dis*;11:35-41.
30. Shibolet O, Kalish Y, Klein A, et al. (2004) Adoptive transfer of ex vivo immune-programmed NKT lymphocytes alleviates immune-mediated colitis. *J Leukoc Biol*;75:76-86.
31. van de Wal Y, Corazza N, Allez M, et al. (2003) Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*;124:1420-31.
32. Wong CH, Jenne CN, Lee WY, et al. (2011) Functional innervation of hepatic iNKT cells is immunosuppressive following stroke. *Science*;334:101-5.
33. Monteleone I, MacDonald TT, Pallone F, et al. (2012) The aryl hydrocarbon receptor in inflammatory bowel disease: linking the environment to disease pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol*;28:310-3.
34. Arsenescu R, Arsenescu V, Zhong J, et al. (2011) Role of the xenobiotic receptor in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*;17:1149-62.
35. Takamura T, Harama D, Matsuoka S, et al. (2010) Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway may ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Immunol Cell Biol*;88:685-9.
36. Furumatsu K, Nishiumi S, Kawano Y, et al. (2011) A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis. *Dig Dis Sci*;56:2532-44.
37. Monteleone I, Rizzo A, Sarra M, et al. (2011) Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*;141:237-48, 248 e1.
38. Benson JM, Shepherd DM. (2011) Aryl hydrocarbon receptor activation by TCDD reduces inflammation associated with Crohn's disease. *Toxicol Sci*;120:68-78.
39. Singh NP, Singh UP, Singh B, et al. (2011) Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of FoxP3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis. *PLoS One*;6:e23522.
40. Huang Z, Jiang Y, Yang Y, et al. (2012) 3,3'-Diindolylmethane alleviates oxazolone-induced colitis through Th2/Th17 suppression and Treg induction. *Mol Immunol*;53:335-344.
41. Muto H, Takizawa Y. (1989) Dioxins in cigarette smoke. *Arch Environ Health*;44:171-4.
42. Lofroth G, Zebuhr Y. (1992) Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in mainstream and sidestream cigarette smoke. *Bull Environ Contam Toxicol*;48:789-94.
43. Kasai A, Hiramatsu N, Hayakawa K, et al. (2006) High levels of dioxin-like potential in cigarette smoke evidenced by in vitro and in vivo biosensing. *Cancer Res*;66:7143-50.
44. Horras CJ, Lamb CL, King AL, et al. (2012) Consequences of TCDD treatment on intra-hepatic lymphocytes during liver regeneration. *J Immunotoxicol*.
45. Hegde S, Jankowska-Gan E, Roenneburg DA, et al. (2009) Human NKT cells promote monocyte differentiation into suppressive myeloid antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol*;86:757-68.
46. De Santo C, Arscott R, Booth S, et al. (2010) Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol*;11:1039-46.
47. Simoni Y, Diana J, Ghazarian L, et al. (2013) Therapeutic manipulation of NKT cells in autoimmunity: Are we close to reality? *Clinical and Experimental Immunology*;171:8-19.

Supplementary data

Supplemental TABLE 1

Name	Sequence
Actin F	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC
Actin R	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG
IFN γ F	ACTGGCAAAGGATGGTGAC
IFN γ R	ACCTGTGGGTTGTTGACCTC
IL-10 F	CCCTTTGCTATGGTGCCTT
IL-10 R	TGGTTTCTCTTCCCAAGACC
IL-12/IL-23p40 F	GGAAGCACGGCAGCAGAAT
IL-12/IL-23p40 R	GGCGGGTCTGGTTTGATG
IL-13 F	CAGTCCTGGCTCTTGCTTG
IL-13 R	CCAGGTCCACACTCCATACC
IL-17A F	GCAAGAGATCCTGGTCCTGA
IL-17A R	AGCATCTTCTCGACCCTGAA
IL-1 β F	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG
IL-1 β R	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
IL-21 F	CCTCCTGATTAGACTTCGTCAC
IL-21 R	GGTTTGATGGCTTGAGTTTGGC
IL-22 F	CAACTTCCAGCAGCCATACA
IL-22 R	GTTGAGCACCTGCTTCATCA
IL-5 F	GAAGTGTGGCGAGGAGAGAC
IL-5 R	GCACAGTTTTGTGGGGTTTT
KC F	GGCGCCTATCGCCAATG
KC R	CTGGATGTTCTTGAGGTGAATCC
MIP-2 F	AGTGAAGTGGCGTGCAATGC
MIP-2 R	CCGCCCTTGAGAGTGGCTAT
TGF β 1 F	ACCATGCCAACTTCTGTCTG
TGF β 1 R	CGGGTTGTGTTGGTTGTAGA
TNF F	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
TNF R	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA
V α 14 F	TGGCTGGCAAGACCCAAG
V α 14 R	GCCTGTGCCTGTTTGAACCAC

Oligonucleotides sequences of the primers used for Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis.

Supplemental FIGURE 1: Cigarette smoke exposure device InExposure® exposure system (Scireq Inc)

A.



B.

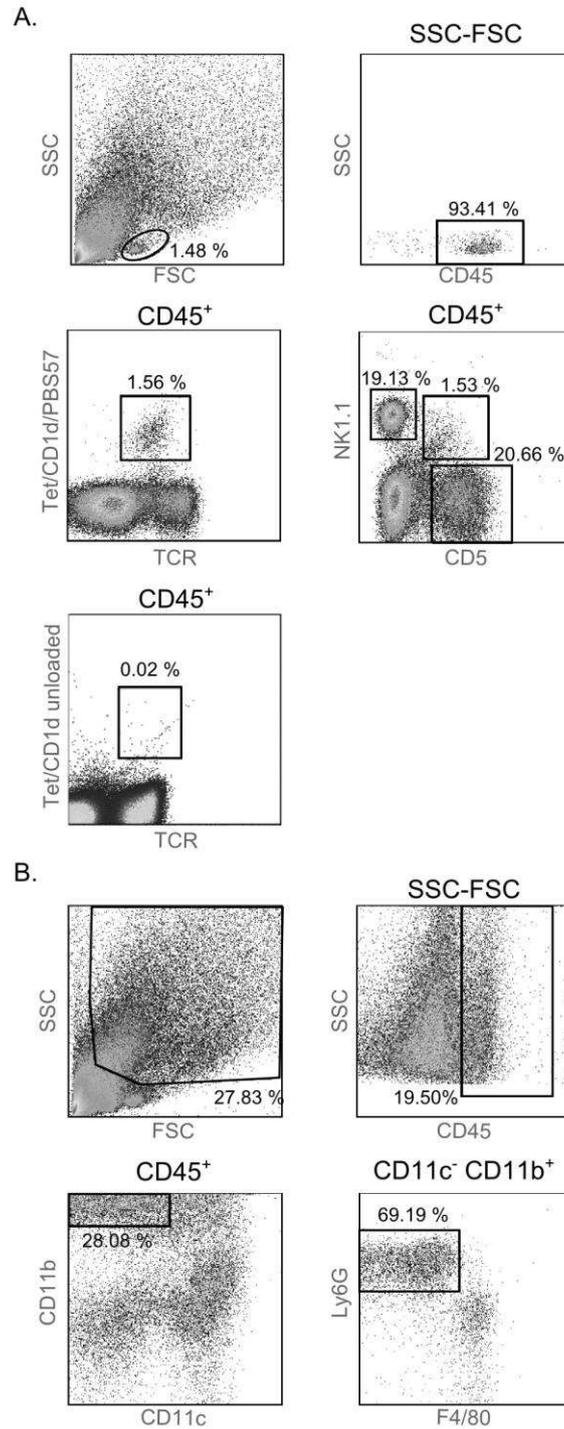


C.



- A. General overview
- B. Smoking device
- C. Exposition chamber

Supplemental FIGURE 2 : Gating strategy for the identification of iNKT cells



A. Gating strategy for iNKT cells (CD45+ CD1d tetramer+ TCR+), total NKT (CD45+ NK1.1+ CD5+), NK cells (CD45+ NK1.1+ CD5-) and conventional T cells (CD45+ NK1.1- CD5+).

B. Gating strategy for neutrophils (CD45+ CD11c- CD11b+ Ly6G+ F4/80-).

1.3. Résultats complémentaires

1.3.1. Transfert de cellules iNKT dans les souris $J\alpha 18^{-/-}$

Pour confirmer l'implication directe des cellules iNKT dans la protection du côlon chez les souris exposées à la fumée de cigarette, une expérience de transfert de cellules iNKT a été réalisée. Cette expérience a pour but de tester l'impact direct de la fumée de cigarette sur les cellules iNKT et son éventuel effet sur la polarisation de ces cellules, qui leur permettrait de présenter un phénotype protecteur.

Matériel et méthodes

Brièvement, 15 souris sauvages C57BL/6 ont été exposées pendant 2 semaines à la fumée de cigarette. Les cellules iNKT « smoke » ont été obtenues après extraction des cellules mononuclées du foie (Cf. page 74) et tri cellulaire (Tet/CD1d/PBS57+ et TCR- β +) en utilisant un trieur cellulaire FACSAria combiné au logiciel BD FACSDiva software (BD Biosciences). La pureté des cellules après tri a été évaluée à plus de 95%.

Environ 1 million de cellules iNKT ainsi triées ont été transférées en intraveineuse à des souris $J\alpha 18^{-/-}$ la veille de l'initiation du traitement au DSS (Cf. Figure 23 B). En parallèle, un groupe de souris contrôle $J\alpha 18^{-/-}$ traitées au DSS a reçu des cellules iNKT « air » provenant du foie de souris non-exposées à la fumée de cigarette (Cf. Figure 23 A). Par ailleurs, des groupes de souris témoins $J\alpha 18^{-/-}$ exposées ou non à la fumée de cigarette et traitées ou non au DSS ont été réalisés afin de valider la procédure expérimentale. Les souris $J\alpha 18^{-/-}$ sont euthanasiées à J8 et les paramètres cliniques sont mesurés comme précédemment (Cf. page 81).

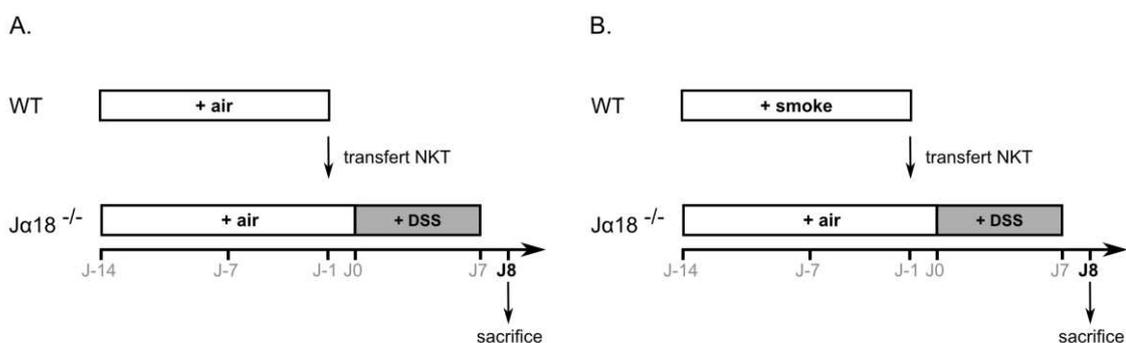


Figure 23 : Protocole expérimental du transfert de cellules iNKT

A. de cellules iNKT issues de souris non exposées (iNKT « air ») et **B.** de cellules iNKT issues de souris exposées à la fumée de cigarette (iNKT « smoke ») à des souris $J\alpha 18^{-/-}$ traitées au DSS.

Résultats

Dans les groupes de souris témoins $J\alpha 18^{-/-}$, les résultats corroborent ceux présentés dans le manuscrit de l'article (page 81). En effet, les souris témoins $J\alpha 18^{-/-}$ traitées au DSS présente des paramètres cliniques comparables qu'elles soient ou non exposées à la fumée de cigarette (Cf. Figure 24), avec une légère aggravation de l'augmentation du ratio poids taille du côlon (Cf. Figure 24 C.). Ces résultats confirment que chez les souris $J\alpha 18^{-/-}$, l'exposition à a fumée de cigarette ne protège pas de l'inflammation induite au DSS et que la procédure expérimentale est valide.

Les souris traitées au DSS et ayant reçu des cellules iNKT « air » perdent très peu de poids et leur courbe de poids est proche de celle des souris témoins non traitées (Cf. Figure 24 A.). De plus, leur score clinique est nettement diminué par rapport aux souris témoins traitées au DSS. (Cf. Figure 24 B.). Cependant, le ratio poids / taille du côlon n'est pas altéré par l'injection de cellules iNKT « air » (Cf. Figure 24 C.). L'injection de cellules iNKT « air » semble avoir un effet positif sur la colite au DSS

Les souris traitées au DSS et ayant reçu des cellules iNKT « smoke » ont une perte de poids similaires au souris témoin traitées au DSS et exposées ou non à la fumée de cigarette (Cf. Figure 24 A.). De plus, leur score clinique (Cf. Figure 24 B.) et leur ratio poids / taille du côlon (Cf. Figure 24 C.) ne sont pas non plus modifiés par rapport aux souris témoins. L'injection de cellules iNKT « smoke » ne semble pas avoir d'impact sur la colite au DSS.

En conclusion, les cellules iNKT « air » semblent avoir un effet protecteur alors que les cellules iNKT « smoke » ne modifient pas les paramètres cliniques de la colite. Ces résultats sont particulièrement surprenants et ne valident pas l'hypothèse selon laquelle la fumée de cigarette induirait l'expression d'un phénotype protecteur par les cellules iNKT. Dans ce cas, le transfert de cellules iNKT « smoke » aboutirait à la reconstitution d'une protection contre l'inflammation induire au DSS ce qui n'est pas observé dans notre expérience. Paradoxalement, les cellules iNKT « air » transférées sont capable de restaurer cette protection.

Les cellules iNKT transférées aux souris $J\alpha 18^{-/-}$ sont triées en utilisant un analogue de l' α GalCer lié à un tétramère de CD1d. Cette étape expérimentale pourrait conduire à une activation ou à une modification de la polarisation des cellules iNKT obtenues. En effet, les cellules iNKT activées par l' α GalCer ou l'OCH sont capables d'induire une protection dans le modèle de colite au DSS (Saubermann, L.J. *et al.*, 2000; Ueno, Y. *et al.*, 2005) (Cf. Chapitre I/4.8.1). Ceci expliquerait donc la protection observée suite au transfert de cellules iNKT « air ».

Par ailleurs, l'expression à la surface des cellules iNKT du TCR- β et du marqueur NK1.1 est diminuée suite à l'activation de ces cellules (Wilson, M.T. *et al.*, 2003) (Cf. Chapitre I/4.4.5). Cette régulation transitoire de ces marqueurs pourrait aboutir à l'absence de détection de certaines sous-populations de cellules iNKT (non-marquées au moment du tri), notamment celles activées par la fumée de cigarette. Ceci expliquerait l'absence de protection suite au transfert de cellules iNKT « smoke », puisqu'une partie des cellules pré-activées n'aurait pas été isolée et transférée.

Les observations faites sur cette expérience de transfert de cellules pourraient donc être liée à un biais expérimental.

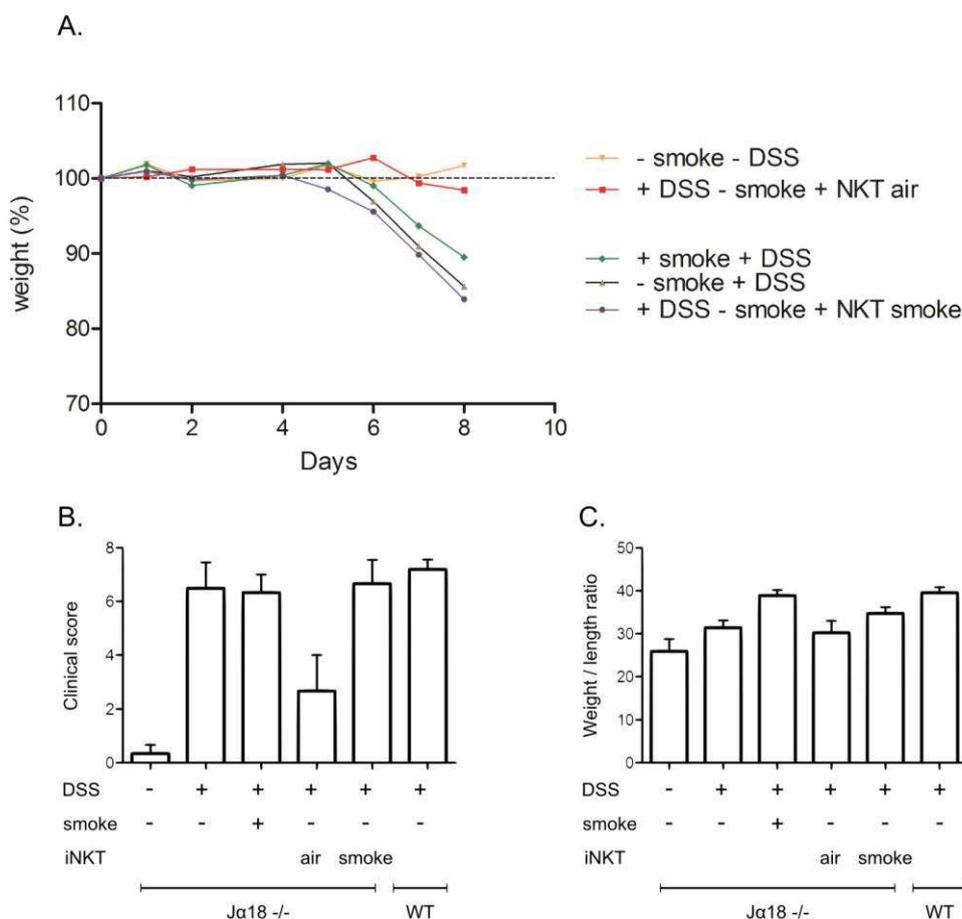


Figure 24 : Impact du transfert de cellules iNKT sur l'inflammation colique

A. Courbe de poids durant l'induction de la colite. Le poids est exprimé en % du poids de la souris à J0 ; **B.** Score clinique établi en fonction de la consistance des selles, de la perte de poids à J8 et du ratio poids / taille du côlon ; **C.** Ratio poids / taille du côlon en mg/cm de côlon. n=3 souris/groupe. Les graphiques représentent les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent la déviation standard (SD).

1.3.2. Mécanismes moléculaires associés à la protection induite par les cellules iNKT

Dans notre modèle, l'exposition à la fumée de cigarette (hors contexte inflammatoire) provoque une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de l'IL-10 au niveau du côlon (Cf. Figure 2). Les cellules iNKT sont également augmentées par la fumée de cigarette dans les mêmes conditions (Cf. Figure 6). La fumée de cigarette pourrait donc activer les cellules iNKT au niveau du côlon et induire chez ces cellules l'expression d'IL-10. Pour tester cette hypothèse et identifier les cellules à l'origine de la production d'IL-10 liée à la fumée de cigarette, une analyse de l'expression de l'IL-10 dans les différentes populations lymphocytaires de la *lamina propria* du côlon a été réalisée par marquage intra-cellulaire.

Matériel et méthodes

Deux groupes de 20 souris sauvages ont été exposées ou non à la fumée de cigarette pendant 2 semaines puis euthanasiées. Le côlon total a été prélevé afin d'en extraire les cellules mononucléées de la *lamina propria* (page 74).

Les cellules mononuclées extraites ont ensuite été mises en culture en suspension dans du milieu RPMI contenant 10 µg/ml de Brefeldine A (Sigma) et stimulées avec 500 ng/ml d'ionomycine et 20 ng/ml de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) pendant 2h à 37°C. Par la suite, les cellules ont été marquées avec les anticorps adéquats permettant l'identification des cellules T (CD45+, NK1.1-, CD5+ ; CD4), des cellules iNKT (CD45+, Tet/CD1d/PBS57+, TCR-β+), des cellules NK (CD45+, NK1.1+, CD5-) et cellules B (CD45+, CD19+) pendant 30min. Elles ont ensuite été fixées et perméabilisées avec le kit BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences) puis incubées avec l'anticorps anti-IL10 ou un anticorps contrôle. Les cellules sont ensuite analysées en cytométrie de flux (page 74).

Résultats

Dans les analyses menées précédemment, l'étude de l'impact de la fumée de cigarette sur les lymphocytes de la *lamina propria* du côlon avait mis en évidence une augmentation du taux de cellules iNKT au niveau du côlon suite à l'exposition à la fumée de cigarette (Cf. Figure 6). Ces résultats ont pu être confirmés lors de cette expérimentation et complétés par l'analyse du recrutement des lymphocytes B. Comme présenté dans la figure 25, l'exposition à la fumée de cigarette aboutit à une diminution du taux de cellules B dans le côlon.

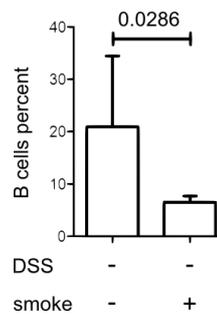


Figure 25 : Impact de la fumée de cigarette sur les lymphocytes B dans le côlon

Pourcentage de cellules B parmi les lymphocytes de la *lamina propria* du côlon. Les barres d'erreurs représentent l'écart type (SD) ; les nombres indiquent les valeurs statistiques de p.

L'analyse des populations lymphocytaires (cellules T, cellules iNKT, cellules NK et cellules B) avec un marquage intra-cellulaire de l'IL-10 ne révèle aucune différence significative du nombre de cellules exprimant l'IL-10 en réponse à la fumée de cigarette, que ce soit en condition de re-stimulation ou non (Cf. Figure 26).

En conclusion, l'IL-10 exprimée dans le côlon suite à l'exposition à la fumée de cigarette ne semble pas produite par les populations lymphocytaires étudiées.

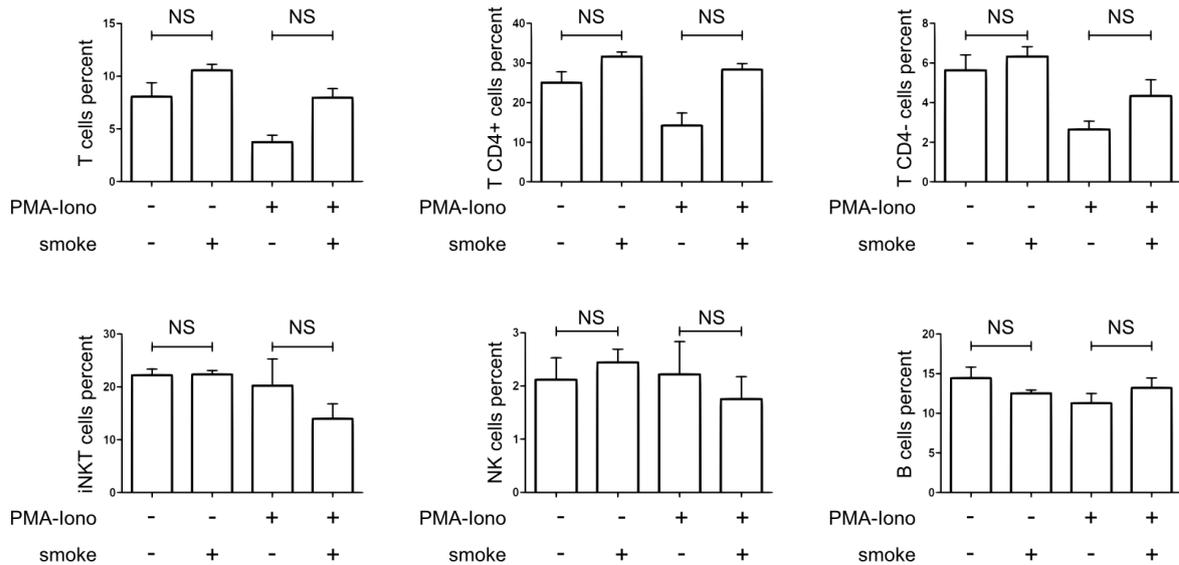


Figure 26 : Expression de l'IL-10 par les différentes populations leucocytaires du côlon

Pourcentage de cellules IL-10 positives parmi les lymphocytes de la *lamina propria* du côlon, avec ou sans stimulation PMA- ionomycine (PMA-iono). Les barres d'erreurs représentent l'écart type (SD) ; les nombres indiquent les valeurs statistiques de p ; NS : non significatif.

Afin d'explorer les mécanismes sous-jacents au rôle protecteur des cellules iNKT dans le côlon des souris exposées à la fumée de cigarette, une caractérisation des marqueurs d'activation et des cytokines exprimées spécifiquement par les cellules iNKT du côlon a été réalisée. Pour cela, les cellules iNKT ont été triées à partir du côlon de souris exposées ou non à la fumée de cigarette. En effet, les cellules iNKT n'étant pas les cellules productrices d'IL-10 dans notre modèle, leur intervention dans la protection de la colite pourrait être liée à l'expression d'autres facteurs régulateurs (cytokines et/ou chimiokines) aboutissant à la régulation de la production de cytokines par les autres types cellulaires.

À partir des cellules mononuclées issues des 20 côlons de souris, il n'a été pas été possible d'obtenir plus de 1000 cellules iNKT après tri cellulaire. Aucune analyse n'a pu être réalisée.

En conclusion, l'IL-10, dont l'expression est augmentée dans le côlon des souris exposée à la fumée de cigarette n'est pas produite directement par les cellules iNKT. Elle n'est pas non plus produite par les lymphocytes de la lamina propria (cellules T, cellules B, NK), ce qui aurait pu être un des mécanismes à l'origine de la protection contre l'inflammation colique liée à la fumée de cigarette.

Pour des raisons techniques, nous n'avons par ailleurs pas été en mesure de définir le phénotype des cellules iNKT du côlon de souris exposées à la fumée de cigarette.

Il n'est donc pas possible de conclure sur les mécanismes moléculaires à l'origine de la protection contre la colite induite par les cellules iNKT chez les souris exposées à la fumée de cigarette

1.3.3. Analyse bactériologique du côlon

Il a été récemment mis en évidence une relation étroite entre la flore intestinale et les cellules iNKT (Cf. chapitre 1/4.7.2 ; Nieuwenhuis, E.E. *et al.*, 2009; Olszak, T. *et al.*, 2012; Wingender, G. *et al.*, 2012). De plus, l'exposition à la fumée de cigarette modifie la

composition de la flore intestinale (Cf. chapitre I/3.3.3 ; Tomoda, K. *et al.*, 2011; Benjamin, J.L. *et al.*, 2012; Wang, H. *et al.*, 2012) ce qui pourrait avoir un impact sur la réponse immune locale. Nous avons donc évalué la composition de la flore intestinale dans notre modèle expérimentale de colite chez les souris exposées à la fumée de cigarette.

Matériel et méthodes

Après avoir soumis les souris au protocole classique d'exposition à la fumée et d'induction de colite au DSS (Cf. Figure 1A), un échantillon de côlon a été prélevé et introduit immédiatement dans un tube pré-pesé contenant 1,5mL de solution de Ringer cystéinée stérile. Après broyage, les échantillons ont été dilués (dilutions décimales de 10^{-2} à 10^{-5}). Chaque dilution a ensuite été étalée et incubée sur gélose non sélective au sang (Columbia agar modifiée) 1 semaine à 37°C en conditions anaérobies, sur gélose McConkey (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et D-coccosel (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) à 37°C pendant 48h en condition aérobie, et sur gélose MRS (Man, Rogosa, Sharpe) à 37°C pendant 48h en atmosphère enrichie en CO₂. Dans chaque condition les unités formant colonie (UFC) ont été dénombrées et identifiées selon des critères morphologiques et biochimiques. Les résultats sont exprimés en log d'UFC avec un seuil de détection de 10^4 UFC/g.

Résultats

Le traitement au DSS provoque des modifications dans la flore intestinale. Le nombre total de bactérie semble augmenté par le traitement au DSS (Cf. Figure 27 A) alors que le nombre de *Lactobacillus sp.* ne semble pas modifié (souris traité vs. souris non traitées (Cf. Figure 27 B). Ceci suggère que d'autres espèces, en particulier des pathogènes opportunistes, pourraient se développer chez les souris traitées au DSS, ce qui est conforté par la tendance à l'augmentation du nombre d'*Enterococcus sp.* et d'entérobactéries dans le côlon des souris traitées (Cf. Figure 27 C et D).

L'exposition à la fumée de cigarette ne semble pas altérer pas la densité de la flore totale (Cf. Figure 27 A) mais a tendance à modifier sa composition. En effet, le nombre de *Lactobacillus sp.*, connue pour faire partie de la flore protectrice du côlon, semble augmenté après exposition à la fumée de cigarette indépendamment du traitement au DSS (Cf. Figure 27 B). De plus, l'augmentation du nombre d'*Enterococcus sp.* et d'entérobactéries liée au traitement au DSS est inhibée par l'exposition à la fumée de cigarette, et leur concentration redevient comparable à celle des souris contrôles (-smoke - DSS) (Cf. Figure 27 C et D).

En conclusion, la fumée de cigarette semble moduler la composition de la flore intestinale. Ces changements laissent penser que la fumée de cigarette favoriserait le développement d'une flore « protectrice » au niveau du côlon, empêchant la colonisation par des pathogènes opportunistes.

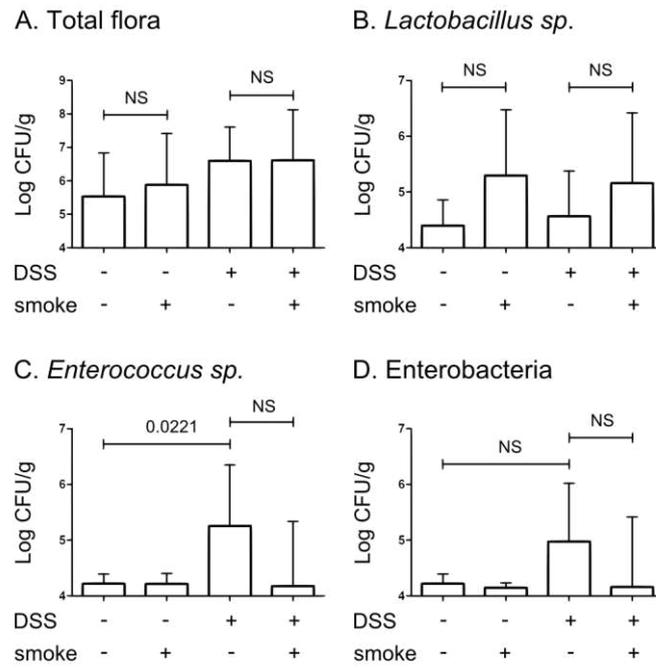


FIGURE 27 : Analyse qualitative et quantitative de la flore du côlon.

Les résultats sont exprimés en UGC/g de côlon pour **A.** la flore totale, **B.** *Lactobacillus sp.* **C.** *Enterococcus sp.* et **D.** les entérobactéries. n=7

Les barres d'erreurs représentent l'écart type (SD) : les nombres indiquent les valeurs statistiques de p ; NS : non significatif.

2. Effets de la fumée de cigarette sur l'inflammation iléale

Le tabac a un effet ambivalent encore inexpliqué dans les MICI. Les manifestations de la MC et la RCH diffèrent entre autre par la localisation de l'inflammation. Une des hypothèses pouvant expliquer l'ambivalence du tabac serait qu'il ait un impact variable sur le côlon et l'intestin grêle.

Cette hypothèse est étayée d'une part, par les données épidémiologiques. En effet, le tabac influencerait le phénotype et la localisation de la maladie dans les fratries et chez des jumeaux (Orholm, M. *et al.*, 2000; Bridger, S. *et al.*, 2002; Halfvarson, J. *et al.*, 2003). De plus, le tabac semble associé à une plus forte localisation iléale de la maladie chez les fumeurs atteints de MC (Cf. chapitre I/3.2 ; Lindberg, E. *et al.*, 1992; Russel, M.G. *et al.*, 1998).

D'autre part, deux études dans un modèle de colite expérimentale indiquent que l'administration de nicotine semble avoir un effet protecteur sur l'inflammation colique et un effet délétère sur l'inflammation de l'intestin grêle (Cf. chapitre I/3.3.2 ; Eliakim, R. *et al.*, 2001; Eliakim, R. *et al.*, 2002). Aucune autre étude ne s'est à ce jour intéressée à l'effet différentiel du tabagisme sur les différentes parties du tractus gastro-intestinal, et aucune étude ne porte sur l'effet de la fumée de cigarette dans l'inflammation en comparant le côlon et l'iléon.

Après avoir mis en évidence un rôle protecteur du tabac associé aux cellules iNKT dans le côlon, la deuxième partie de ce travail de thèse porte donc sur l'étude de l'effet de la fumée de cigarette au niveau de l'intestin grêle. Pour cela, un modèle d'inflammation jéjuno-iléale associé à l'exposition à la fumée de cigarette a été mis au point, afin d'analyser l'effet du tabac sur l'inflammation iléale et de tester l'implication des cellules iNKT dans l'impact différentiel de la fumée de cigarette au niveau du côlon et de l'iléon.

2.1. Effet de la fumée de cigarette sur l'inflammation induite par l'indométacine

2.1.1. Matériel & Méthodes

L'inflammation jéjuno-iléale a été provoquée par l'injection en sous cutanée d'indométacine, un AINS (anti-inflammatoire non stéroïdien) dont les effets secondaires ulcérogènes sont à l'origine de ce modèle d'inflammation. L'injection d'indométacine a été réalisée chez les souris C57BL/6 après 2 semaines d'exposition à la fumée de cigarette (similairement au modèle de colite (Cf. Figure 28 A). Les souris ont été pesées et injectées 2 fois à 24h d'intervalle avec une solution d'indométacine à 10mg/kg. La solution a été préparée extemporanément par dissolution de l'indométacine (Sigma) dans de l'alcool éthylique anhydre suivi d'une dilution dans du NaHCO₃ à 3% pH 7.3. Les souris ont été euthanasiées 24 h après la seconde injection. Afin de permettre la visualisation des lésions iléales, les souris ont reçu une injection de Bleu Evans (1%) en intraveineuse 30 minute avant l'euthanasie. La totalité de l'intestin grêle (entre l'estomac et le caecum) a été excisé et mesuré. L'iléon (les 10 premiers centimètres du grêle à partir du caecum) a été disséqué longitudinalement le long de la bordure anti-mésentérique et les ulcères ont été dénombrés sous microscope optique (Zeiss) relié à une caméra (Nikon DXM 1200C). Des photos de chaque centimètre de l'iléon ont été prises et analysées pour déterminer l'aire des lésions avec le logiciel ImageJ (NIH, USA). Par la suite, la totalité de l'iléon a été congelé dans du Trizol® Reagent (Invitrogen) et congelé à -80°C pour analyse des marqueurs d'expression de l'inflammation.

2.1.2. Résultats

L'injection d'indométacine provoque un œdème important au niveau de l'intestin grêle des souris, en particulier au niveau de l'iléon et du jéjunum (Cf. Figure 28 B 1) alors que le côlon n'est pas affecté par le traitement (Cf. Figure 27 B 2) confirmant la spécificité d'action de l'indométacine.

Dans un premier temps, les paramètres cliniques de l'iléite ont été évalués. La longueur de l'intestin grêle est significativement diminué chez les souris traitées à l'indométacine ($23,4 \pm 3,0$ cm; $p < 0,0001$) comparée au souris contrôles non traitées ($34,5 \pm 3,2$ cm) (Cf. Figure 28 C). De plus, les souris traitées à l'indométacine présentent des lésions ulcéraives caractéristiques au niveau de l'iléon (Cf. Figure 28 D) avec un nombre moyen de $11,7 \pm 3,1$ lésions (Cf. Figure 28 E) et une aire totale moyenne des lésions de $11,9 \pm 6,6$ mm² (Cf. Figure 28 F). L'exposition à la fumée de cigarette ne modifie pas ces paramètres cliniques : aucune modification de la longueur du grêle, ni du nombre des lésions et de leur aires totales n'a été observée (Cf. Figure 28 C, E et F) chez les souris traitées à l'indométacine et exposées à la fumée de cigarette. La fumée de cigarette ne semble donc pas capable de moduler les paramètres cliniques de l'inflammation jéjuno-iléale induite par l'indométacine.

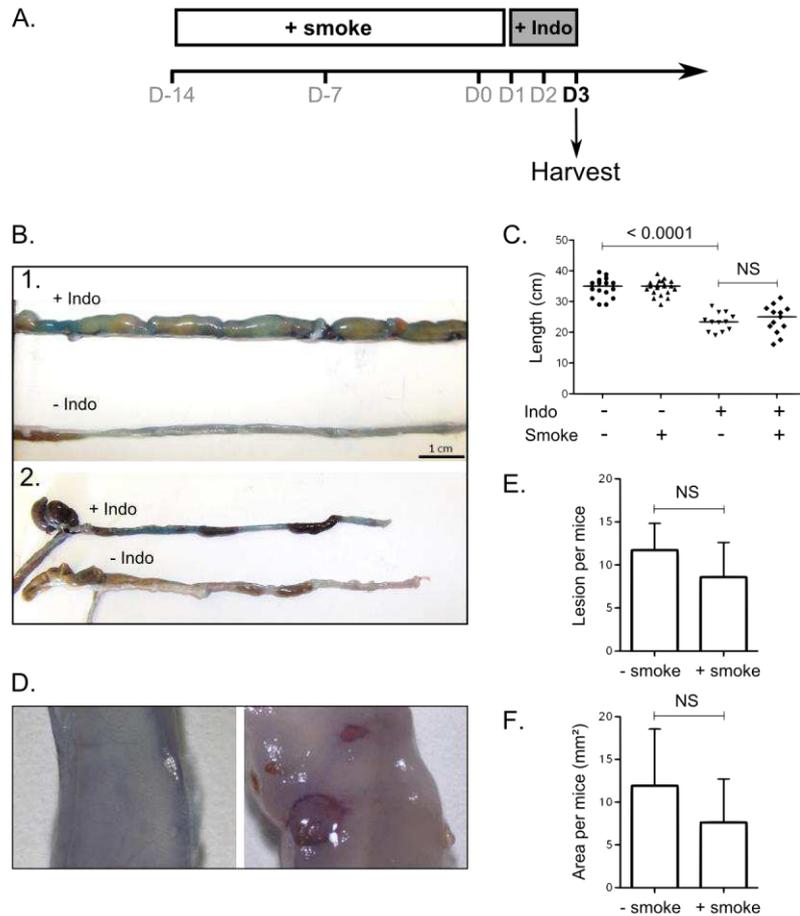


Figure 28 : Effets de la fumée de cigarette sur les paramètres cliniques de l'inflammation de l'intestin grêle.

A. Protocole d'exposition à la fumée de cigarette dans le modèle d'inflammation jéuno-iléale induite à l'indométacine. **B.** Aspect macroscopique représentatif (1) de l'intestin grêle et (2) du côlon de souris traitée ou non à l'indométacine (indo). **C.** Longueur de l'intestin grêle (en centimètre) mesurée entre le caecum et l'estomac. Les données proviennent de 2 expériences indépendantes avec un total de $12 < n < 20$ souris/groupe. **D.** Apparence macroscopique représentatif de la face interne de l'iléon chez une souris contrôle (à gauche) et une souris traitée à l'indométacine (à droite) montrant les lésions ulcératives typiques provoquées par l'indométacine et mises en évidence par le bleu Evans. **E.** Nombre de lésions moyen observées dans les 10 premiers centimètres distaux de l'intestin grêle (iléon) des souris traitées à l'indométacine. Les données proviennent de 2 expériences indépendantes avec un total de $11 < n < 15$ souris par groupe. **F.** Aire totale moyenne des lésions par souris dans les 10 premiers centimètres distaux de l'intestin grêle (iléon) des souris traitées à l'indométacine. L'aire a été déterminée à partir de photos prises tous les centimètres grâce au logiciel ImageJ. Les données proviennent de 2 expériences indépendantes avec un total de $11 < n < 15$ souris par groupe. Les barres d'erreurs représentent la erreur standard à la moyenne (SEM) : les nombres indiquent les valeurs statistiques de p ; NS : non significatif

Dans un deuxième temps, l'expression des cytokines a été étudiée au niveau de l'iléon. L'expression de l'ARNm du TNF n'est que légèrement augmentée par le traitement à l'indométacine (Cf. Figure 29 ; $p=0.0043$) alors que les expressions d'IL-1 β et de KC sont fortement augmentées (Cf. Figure 29 ; $p=0.0079$ et $p=0.043$ respectivement). L'expression de l'IL-10 ne semble pas modifiée par le traitement à l'indométacine. La fumée de cigarette

n'altère pas l'expression de ces cytokines pro-inflammatoires. De plus, l'expression de l'IL-10 n'est pas non plus modifiée par l'exposition à la fumée de cigarette. Ces résultats indiquent que la fumée de cigarette ne semble pas à même de moduler au niveau moléculaire l'inflammation iléale induite par l'indométacine.

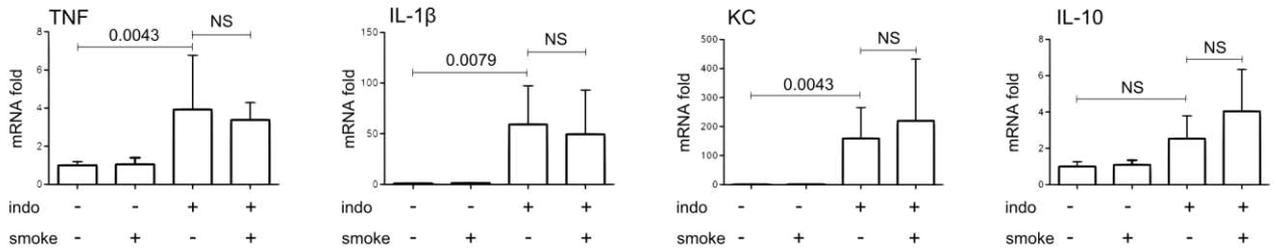


Figure 29 : Effets de la fumée de cigarette sur l'expression de cytokines dans l'iléon.

Expression de l'ARNm des cytokines de l'iléon déterminé par PCR quantitative en temps réel et normalisée par rapport à la β -actine. Les graphiques représentent le fold d'expression moyen de chaque cytokine par rapport au niveau d'expression basal mesuré chez les animaux contrôles (non traités et non exposés à la fumée de cigarette) et paramétré à 1. ($4 < n < 8$).

Les barres d'erreurs représentent l'écart type (SD) : les nombres indiquent les valeurs statistiques de p ; NS : non significatif

L'ensemble de ces résultats indiquent que la fumée de cigarette n'as pas d'impact mesurable sur l'inflammation au niveau de l'iléon dans ce modèle.

2.2. Implication des cellules iNKT dans l'inflammation de l'intestin grêle

Dans la première partie de ce travail, nous avons mis en évidence un contrôle de l'inflammation dans côlon induite par la fumée de cigarette et une participation active des cellules iNKT à ce phénomène. Dans un deuxième temps, nous avons montré que la fumée de cigarette a un impact différent au niveau de l'intestin grêle et n'induit pas de protection. Afin de comprendre les raisons de cette différence, et d'identifier le rôle des cellules iNKT, nous avons appliqué notre modèle d'inflammation jéuno-iléale à des souris déficientes en cellules NKT et exposées à la fumée de cigarette. Cette expérience a pour but de mettre en évidence d'une part le rôle de ces cellules au cours de l'inflammation jéuno-iléale, et d'autre part d'analyser le lien entre l'exposition à la fumée de cigarette et la fonction des cellules iNKT au niveau du grêle.

2.2.1. Matériel & Méthodes

L'analyse en cytométrie de flux des cellules iNKT au niveau de l'intestin grêle a été réalisée comme décrite dans l'article (page 74) à partir d'échantillons comprenant les 20 premiers centimètres distaux de l'intestin grêle (iléon et jéjunum) de 20 souris C57BL/6 sauvages exposées ou non à la fumée de cigarette.

Le protocole d'exposition à la fumée de cigarette et d'induction de l'inflammation jéuno-iléale a été réalisé comme précédemment sur deux souches de souris déficientes en cellules NKT : les souris $J\alpha 18^{-/-}$ et les souris $CD1d^{-/-}$. Les paramètres cliniques de l'inflammation ont été évalués comme décrit dans le chapitre précédent.

2.2.2. Résultats

Dans un premier temps, le pourcentage de cellules iNKT présentes parmi les lymphocytes de la *lamina propria* de l'intestin grêle a été évalué par analyse en cytométrie de flux. Le nombre de cellules iNKT est plus important dans l'intestin grêle ($17,3 \pm 3,8$ % ; Cf. Figure 30 A) que dans le côlon ($2,1 \pm 0,4$ %, Cf. Figure 6A ; page 80). Par ailleurs, l'exposition à la fumée de cigarette ne modifie pas ce taux ($17,6 \pm 3,4$ % ; Cf. Figure 30 A).

Dans un deuxième temps, afin d'identifier l'implication des cellules iNKT, des souris déficientes en cellules NKT ont été soumises au protocole d'inflammation jéjuno-iléale +/- fumée de cigarette.

Chez les souris déficientes, comme chez les souris sauvages, un raccourcissement de l'intestin grêle est observé chez les souris traitées à l'indométacine (CD1d^{-/-} : 20.0 ± 2.6 cm ; J α 18^{-/-} : 24.6 ± 3.7 cm) par rapport au souris non traitées (CD1d^{-/-} : 34.7 ± 1.3 cm ; J α 18^{-/-} : 34.0 ± 0.7 cm) (Cf. Figure 30 B et E). De plus, aucune différence significative n'est mesurée entre les souris sauvages et les souris déficientes concernant l'aire et le nombre de lésions (Cf. Figure 30 C, D et F, G). Ces données suggèrent que les cellules NKT ne seraient pas nécessaires à la mise en place de l'inflammation jéjuno-iléale suite à l'injection d'indométacine.

Cependant, la longueur de l'intestin grêle des souris CD1d^{-/-} traitées à l'indométacine est plus importante chez les souris exposées à la fumée de cigarette ($p=0,0031$, Cf. Figure 30 B) et l'aire totale des lésions semble diminuée par la fumée de cigarette (Cf. Figure 30 D). Ces données suggèrent que la fumée de cigarette pourrait protéger les souris CD1d^{-/-} de l'iléite.

De même, le nombre de lésions est diminué chez les souris J α 18^{-/-} exposées à la fumée de cigarette (Cf. Figure 30 F ; $p=0.0357$) et l'aire totale des lésions semble diminuée chez ces souris (Cf. Figure 30 G).

L'ensemble de ces résultats semble indiquer que, à la différence des observations faites sur le côlon, l'exposition à la fumée de cigarette pourrait limiter l'inflammation de l'intestin grêle chez les souris seulement en l'absence de cellules iNKT. Le rôle des cellules iNKT et leur réponse à l'exposition à la fumée de cigarette serait donc différent au niveau du côlon et de l'intestin grêle.

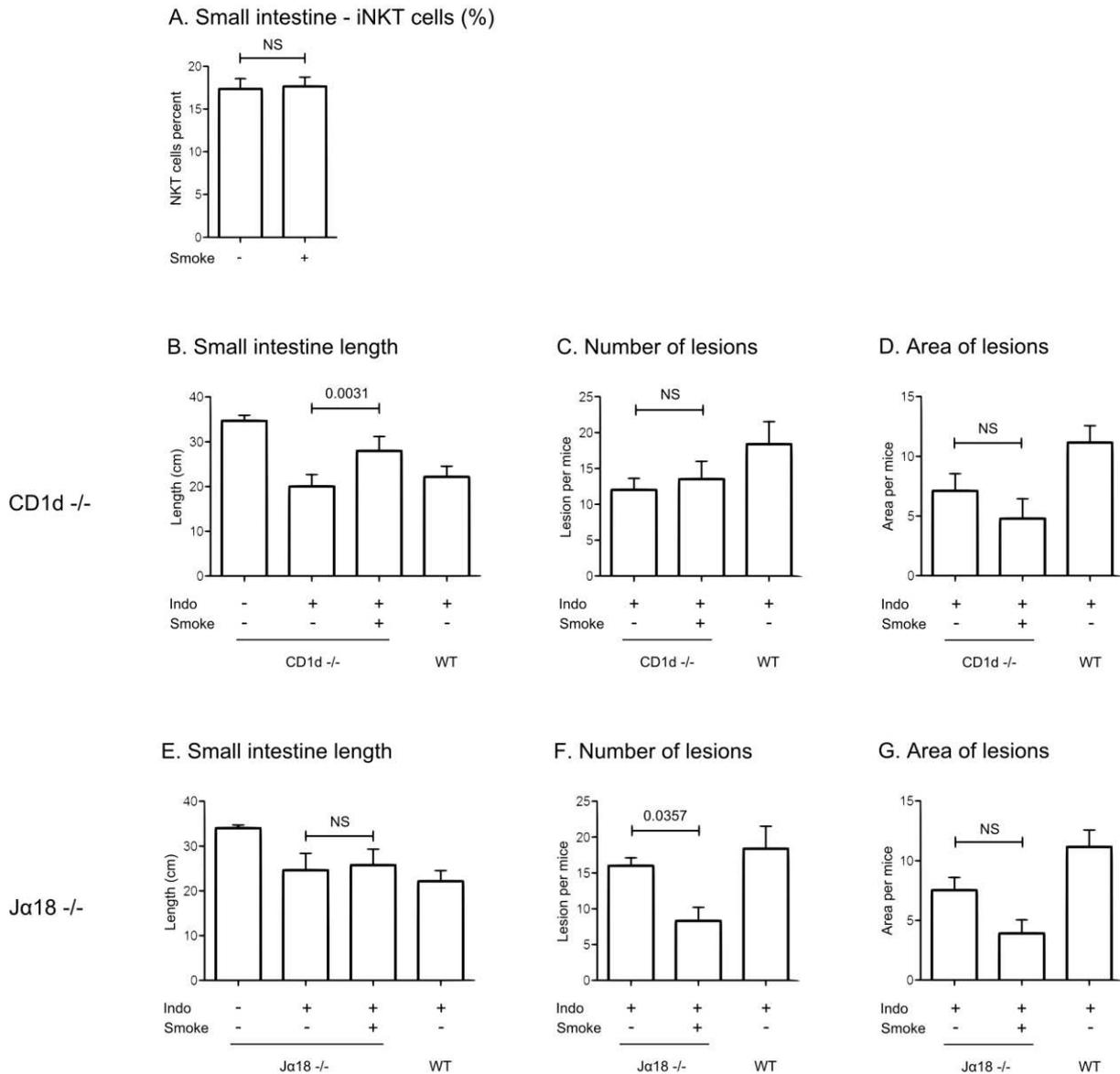


FIGURE 30: Effet de la fumée de cigarette sur l'inflammation iléale de souris déficientes en cellules NKT.

A. Pourcentage de cellules iNKT (TCR β +, Tet/CD1d/PBS57+) dans l'intestin grêle de souris C57BL/6 sauvages exposées ou non à la fumée de cigarette. Les échantillons ont été regroupés de façon à obtenir suffisamment de cellules pour l'analyse en cytométrie (n=20 souris/groupe).

Panel du haut : souris CD1d^{-/-}. **B.** Longueur de l'intestin grêle (en centimètre) mesurée entre le caecum et l'estomac. 3<n<8 souris/groupe. **C.** Nombre de lésions moyen observées dans l'iléon des souris traitées à l'indométacine. 7<n<8 souris/groupe. **D.** Aire totale moyenne des lésions par souris dans l'iléon des souris traitées à l'indométacine. L'aire a été déterminée à partir de photos prises tous les centimètres grâce au logiciel ImageJ. 7<n<8 souris/groupe.

Panel du bas : souris Ja18^{-/-}. **E.** Longueur de l'intestin grêle (en centimètre) mesurée entre le caecum et l'estomac. 2<n<5 souris/groupe. **F.** Nombre de lésions moyen observées dans l'iléon des souris traitées à l'indométacine. 3<n<5 souris/groupe. **G.** Aire totale moyenne des lésions par souris dans l'iléon des souris traitées à l'indométacine. L'aire a été déterminée à partir de photos prises tous les centimètres grâce au logiciel ImageJ. 3<n<5 souris/groupe.

Les barres d'erreurs représentent l'écart type (SD) : les nombres indiquent les valeurs statistiques de p ; NS : non significatif

2.3. Impact de l'exposition à la fumée de cigarette sur les populations leucocytaires

Les souris déficientes en cellules NKT et exposées à la fumée de cigarette répondent différemment à l'indométacine des souris sauvages. Cependant, le pourcentage des cellules iNKT n'est pas altéré par l'exposition à la fumée de cigarette au niveau de l'intestin grêle. Nous avons donc examiné les cellules lymphocytaires de la *lamina propria* de l'intestin grêle chez des souris sauvages afin d'identifier d'autres populations cellulaires pouvant être l'origine de cette différence de réponse. Par ailleurs, cette analyse permettra de mieux caractériser la différence d'impact de la fumée de cigarette au niveau du grêle et du côlon.

2.3.1. Matériel & Méthodes

Les populations lymphocytaires de l'intestin grêle ont été analysées de façon similaire à celles du côlon (page 74). Brièvement, 20 souris ont été exposées ou non à la fumée de cigarette pendant 2 semaines et les lymphocytes de la *lamina propria* ont été isolés à partir des 20 premiers centimètres distaux de l'intestin grêle (à partir du caecum) et analysés en cytométrie de flux avec les marqueurs appropriés à l'identification des cellules NK (CD45+ NK1.1+ CD5-), des cellules T conventionnelles (CD45+ NK1.1- CD5+) et des cellules B (CD45+, CD19+).

2.3.2. Résultats

Dans la *lamina propria* de l'intestin grêle (iléon et jéjunum) de souris sauvages saines, la fumée de cigarette augmente le nombre de cellules T (Cf. Figure 31 ; $p=0,0089$) en particulier la sous population de cellules T CD4+ ($p=0,0052$). D'autre part, le nombre de cellules NK est diminué ($p=0,0001$) suite à l'exposition à la fumée de cigarette. Le nombre de cellules B n'est pas significativement modifié par cette exposition mais présente une tendance à l'augmentation.

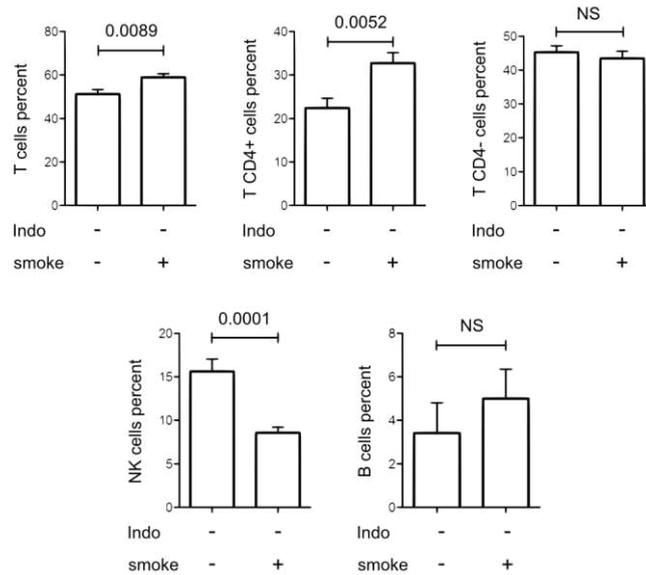


Figure 31 : Impact de la fumée de cigarette sur les populations lymphocytaires de l'intestin grêle.

Pourcentage des différentes populations de lymphocytes de la *lamina propria* de l'intestin grêle (n=20 souris/groupe). Les barres d'erreurs représentent l'écart type (SD) ; les nombres indiquent les valeurs statistiques de p ; NS : non significatif

Ces résultats indiquent clairement que la fumée de cigarette a un impact différent au niveau de l'immunité adaptative dans le côlon et dans l'intestin grêle qui ne met pas en jeu les mêmes populations cellulaires. En effet, dans le côlon la fumée de cigarette provoque une augmentation du nombre de cellules iNKT et une diminution des cellules B de la *lamina propria*, alors que dans l'intestin grêle, la fumée de cigarette provoque une augmentation du nombre de cellules T (CD4+) et une diminution du nombre de cellules NK.

IV. Discussion

Il est maintenant bien établi que le tabagisme peut influencer le risque d'apparition et le développement des MICI. Les données épidémiologiques montrent que la fumée de cigarette a des effets régulateurs divergents, décrits comme bénéfiques dans la RCH et délétères dans la MC. Une des hypothèses les plus probables pour expliquer cet effet serait que la fumée de cigarette ait un impact différent sur les muqueuses du côlon et de l'intestin grêle.

Cette hypothèse est étayée d'une part par de nombreuses études épidémiologiques. En effet, le tabagisme oriente l'expression phénotypique de la maladie vers une MC chez les patients génétiquement prédisposés, comme en témoigne les études de formes familiales de MICI (Orholm, M. *et al.*, 2000; Bridger, S. *et al.*, 2002; Halfvarson, J. *et al.*, 2003). De plus, le tabagisme semble influencer la topographie de la MC, avec une plus grande prévalence des atteintes iléales et une diminution des atteintes coliques chez les fumeurs (Lindberg, E. *et al.*, 1992; Bustamante, M. *et al.*, 1998; Russel, M.G. *et al.*, 1998; Bridger, S. *et al.*, 2002; Brant, S.R. *et al.*, 2003).

D'autre part, les études expérimentales dans les modèles animaux ont démontré un rôle immuno-régulateur du tabac. Les résultats obtenus dans ces différentes études sont controversés en grande partie de par la grande variabilité des modèles utilisés. Plusieurs études montrent néanmoins une différence d'impact assez claire de la nicotine sur le côlon et l'iléon en situation inflammatoire (Eliakim, R. *et al.*, 2001; Eliakim, R. *et al.*, 2002). Cependant l'étude de l'administration de nicotine seule ne peut pas être considérée comme représentative de l'impact de la fumée de cigarette qui est composée de milliers de composants. L'état actuel de la recherche expérimentale dans ce domaine manque de modèles validés alliant l'inflammation intestinale à une exposition à la fumée de cigarette reproduisant au mieux le tabagisme humain chez les animaux.

Dans notre étude, nous avons donc mis au point deux procédures expérimentales permettant de soumettre les animaux à un tabagisme actif tout en induisant une inflammation colique ou iléale. Nous nous sommes particulièrement attachés à l'identification des effets immuno-modulateurs du tabac dans la muqueuse du côlon et de l'iléon des souris.

Dans un premier temps nous avons montré qu'au niveau du côlon, la fumée de cigarette joue un rôle protecteur dépendant des cellules iNKT contre la colite induite au DSS. En effet, les souris déficientes ne sont plus protégées de la colite par l'exposition tabagique. Cet effet du tabagisme n'est pas retrouvé au niveau de l'iléon dans lequel les cellules iNKT semblent jouer un rôle différent. De fait, alors que la fumée de cigarette ne semble pas avoir d'impact mesurable sur l'inflammation jéjuno-iléale induite à l'indométacine chez les souris sauvages, les souris déficientes en cellules NKT exposées à la fumée semblent moins sensibles à l'indométacine que les souris non exposées. Nous avons également pu mettre en évidence, au niveau de la muqueuse saine, que la fumée de cigarette altère différemment les populations lymphocytaires du côlon et de l'intestin grêle.

1. Effet du tabac sur le côlon

L'effet du tabagisme a été étudié dans de nombreux modèles d'inflammation colique, donnant des résultats controversés.

Cette ambiguïté relève en grande partie de la grande variabilité dans les composants de la fumée de cigarette étudiés (nicotine, CO, dioxine...) et dans les modes d'administration de ces composants (*per os*, sous-cutanée...). L'administration d'un seul composant ne paraît pas relevant dans l'étude de la régulation immunitaire liée au tabagisme de par la grande complexité de la fumée de cigarette. Très peu d'études se sont attelées à analyser l'impact de la fumée de cigarette en elle-même sur l'inflammation intestinale. De plus, il est important de faire la distinction entre les études portant sur la fumée émergeant du filtre de la cigarette (et pouvant être assimilée à du tabagisme actif) et la fumée émergeant de la partie incandescente de la cigarette (assimilée au tabagisme passif) car leur composition varie significativement (Borgerding, M. *et al.*, 2005). À l'heure actuelle, la plupart des études utilisent des modèles d'exposition passive et seul Galeazzi *et al.* ont étudié le tabagisme actif. Dans un modèle d'inflammation colique induite au DNBS chez le rat, leur étude montre que la fumée de cigarette aggrave la colite (Galeazzi, F. *et al.*, 1999) mais ce résultat n'est pas concordant avec les études humaines rapportant un effet bénéfique du tabagisme dans la RCH.

Outre le protocole d'exposition à la fumée de cigarette, il semblerait que le modèle d'inflammation mis en place (Th1 ou Th2) influe sur l'effet observé suite à l'exposition tabagique. Ainsi les résultats obtenus dans les différentes études pourtant sur l'effet du tabagisme sont susceptibles d'être modifiés en fonction du modèle utilisé (TNBS, DNBS, oxazolone...) rendant la comparaison entre ces études compliquée (Guo, X. *et al.*, 1999; Guo, X. *et al.*, 2001; Guo, X. *et al.*, 2001; Ko, J.K. *et al.*, 2001; Liu, E.S. *et al.*, 2003; Ko, J.K. *et al.*, 2005; Sun, Y.P. *et al.*, 2007; Verschuere, S. *et al.*, 2011).

Dans le but de développer un protocole d'exposition relevant pour l'étude de l'impact de la fumée de cigarette sur l'inflammation colique, nous avons utilisé l'appareil InExpose® System qui reproduit le schéma d'exposition humain. Les souris sont placées dans une chambre reliée à une pompe qui aspire la fumée provenant du filtre de la cigarette de façon rythmique et standardisée. Les animaux sont pré-exposés pendant 2 semaines avant l'initiation de l'inflammation intestinale. Cette période a été choisie pour reproduire les habitudes d'un fumeur régulier. En effet, l'exposition à la fumée de cigarette avec ce protocole induit dans un premier temps une inflammation aiguë au niveau des poumons de la souris qui se dissipe au bout de 2 semaines laissant place à une accoutumance (communication personnelle de P. Gosset et M. Pichavant).

Pour induire l'inflammation colique, nous avons utilisé le modèle de colite au DSS qui mime certaines des caractéristiques moléculaires, biologiques et cliniques de la RCH (Melgar, S. *et al.*, 2005; Yan, Y. *et al.*, 2009; Fang, K. *et al.*, 2011). Par ailleurs, ce modèle a été très peu étudié dans le contexte du tabagisme, et les modèles d'induction au TNBS/DNBS (précédemment utilisés) donnent des résultats contradictoires selon les études (Guo, X. *et al.*, 1999; Guo, X. *et al.*, 2001; Guo, X. *et al.*, 2001; Ko, J.K. *et al.*, 2001; Ko, J.K. *et al.*, 2005; Sun, Y.P. *et al.*, 2007).

Ce protocole nous a permis d'obtenir des résultats reproductibles concluant à un effet bénéfique du tabagisme sur l'inflammation intestinale. Nos résultats concordent avec des observations faites chez les patients fumeurs atteints de RCH au niveau clinique (diminution des symptômes et de l'inflammation) et moléculaire (diminution de l'IL-1 β et de l'IL-8 dans la muqueuse colique (Sher, M.E. *et al.*, 1999)). Ces résultats ne concernent néanmoins que des mécanismes régulateurs intervenant lors de la phase aiguë d'induction de la colite expérimentale, ce qui diffère de certains aspects de la chronicité observée chez l'Homme.

Ainsi, la mise en place d'un modèle de colite chronique induite au DSS combiné à l'exposition à la fumée de cigarette pourrait apporter des résultats complémentaires instructifs en particulier concernant les mécanismes de régénéscence épithéliale qui ne peuvent pas être étudiés dans un modèle aigu. Par ailleurs, la réponse immune évolue lors de l'inflammation chronique et les populations cellulaires recrutées dans le côlon varient au cours du temps (Hall, L.J. *et al.*, 2010). Il serait donc particulièrement intéressant d'évaluer l'impact de la fumée de cigarette sur cette évolution. Plusieurs modèles d'inflammation chronique induite au DSS sont couramment utilisés, alternant 3 à 5 cycles de traitement avec des cycles de « repos » d'une ou 2 semaines. Par ailleurs, il a également été montré que la colite aiguë induite au DSS pouvait évoluer vers la chronicité chez les souris C57BL/6 (Melgar, S. *et al.*, 2005).

2. Effet du tabac sur les cellules immunitaires dans le côlon

Suite à notre procédure d'exposition à la fumée de cigarette, l'analyse des cellules mononucléées de la *lamina propria* révèlent plusieurs points intéressants.

Les polynucléaires neutrophiles sont fortement recrutés lors de l'inflammation muqueuse et sont incriminés dans les dommages causés au niveau de la muqueuse dans le modèle de colite induite au DSS (Yasukawa, K. *et al.*, 2012) et chez les patients atteints de MICI (Naito, Y. *et al.*, 2007). Ces cellules sont également capables de produire de nombreuses cytokines pro-inflammatoires majeures (TNF, IL-1 β , IFN- γ) (Cassatella, M.A., 1995) dont l'expression est diminuée par la fumée de cigarette dans notre modèle de colite au DSS. Malgré l'amélioration des paramètres cliniques de la colite, l'exposition à la fumée ne modifie par le recrutement ni l'activité des neutrophiles dans le côlon des animaux traités au DSS. Par ailleurs, l'expression d'IL-8 dans le côlon n'est pas non plus altérée par la fumée de cigarette. Cette chimiokine a un effet chimio-attractant majeur sur les neutrophiles et induit plusieurs événements importants dans leur activité (Baggiolini, M. *et al.*, 1992). L'absence de régulation de l'expression de cette chimiokine par la fumée de cigarette confirme les résultats précédents. Il semble donc que la protection du côlon par la fumée de cigarette ne soit pas liée à une régulation de la réponse innée *via* les neutrophiles.

La diminution importante de l'expression des cytokines pro-inflammatoire Th1/Th17 observée dans le côlon des souris traitées au DSS suite à l'exposition tabagique marque indéniablement une modulation de l'immunité par le tabac. Devant l'absence d'impact de la fumée de cigarette sur l'activité des neutrophiles, nous avons focalisé notre étude sur la réponse des lymphocytes de la *lamina propria*, qui sont la source de production majeure des cytokines pro- et anti-inflammatoires.

3. Effet du tabac sur les cellules iNKT et rôle de ces cellules

Un des principaux résultats de notre travail est la caractérisation de la protection par la fumée de cigarette contre la colite induite au DSS, et l'identification des cellules iNKT comme ayant un rôle majeur dans ce processus. Ces données permettent de mettre en évidence un rôle particulier de ces cellules dans l'intestin.

A l'heure actuelle, le rôle de ces cellules dans l'homéostasie intestinale n'est plus à démontré. Les cellules iNKT ont en effet été clairement impliquées dans l'induction de la tolérance orale (Samsonov, D. *et al.*, 2000; Shibolet, O. *et al.*, 2004; Menachem, Y. *et al.*, 2005)

et dans la régulation de la charge bactérienne intestinale (Cf. chapitre I/4.7.2 ; Tupin, E. *et al.*, 2007; van Dieren, J.M. *et al.*, 2007; Nieuwenhuis, E.E. *et al.*, 2009).

Chez les patients souffrant de MICI, leur rôle n'est pourtant pas clairement établi et les études menées n'ont pas permis d'établir un consensus. Deux hypothèses opposées se dégagent de la littérature.

La première hypothèse propose que les cellules iNKT joueraient un rôle anti-inflammatoire au niveau intestinal et que le dérèglement de l'immunité observé dans les MICI serait lié à un défaut dans le nombre ou la fonction des cellules iNKT (van der Vliet, H.J. *et al.*, 2001; Perera, L. *et al.*, 2007). En effet, une déficience et des dysfonctions de cellules iNKT ont été observées chez les patients atteints de MC et de RCH (Grose, R.H. *et al.*, 2007) ainsi qu'un défaut d'expression de CD1d par les IEC chez ces patients (Perera, L. *et al.*, 2007). Le dysfonctionnement des cellules iNKT pourrait également aboutir, d'une part, à une dérégulation de la balance immunitaire et, d'autre part, à une invasion bactérienne à l'origine de l'inflammation chronique.

La deuxième hypothèse incrimine les cellules iNKT dans l'initiation de l'inflammation intestinale. L'inflammation pourrait être liée à l'activation des cellules iNKT par des ligands endogènes (Marin, M.L. *et al.*, 1984) ou à l'augmentation de la présentation d'antigènes liée à l'élévation de l'expression de CD1d chez les patients (Page, M.J. *et al.*, 2000; Fuss, I.J. *et al.*, 2004). Cette activation importante aurait pour conséquence la production de cytokines pro-inflammatoires en forte quantité comme l'INF- γ (Fuss, I.J. *et al.*, 2004) et l'IL-13 (Heller, F. *et al.*, 2005) et une augmentation de l'activité cytotoxique de ces cellules (Cui, J. *et al.*, 1997). Ces deux phénomènes conduiraient à des lésions et à la rupture de la barrière épithéliale.

L'ensemble de ces données suggère un rôle complexe des cellules iNKT intestinales dans le contrôle de l'inflammation chronique qui pourrait impliquer plusieurs facteurs du microenvironnement immunitaire.

L'activation des cellules iNKT dans un contexte intestinal particulier pourrait en effet permettre de réguler la réponse immunitaire. Chez la souris, des études ont montré que les cellules iNKT joueraient un rôle protecteur contre la colite expérimentale induite au DSS (Cf. chapitre I/4.8.1). L'administration de ligands de CD1d (α GalCer et OCH) aboutit à une diminution de l'inflammation lors de la colite au DSS et les cellules NKT sont indispensables à la mise en place de cette protection (Saubermann, L.J. *et al.*, 2000; Ueno, Y. *et al.*, 2005; Hornung, M. *et al.*, 2006). Les cellules NKT stimulées par l' α GalCer provoqueraient une orientation de la réponse immune d'un profil Th1 délétère vers un profil Th2 anti-inflammatoire (Burdin, N. *et al.*, 1999).

Dans un contexte inflammatoire différent, les cellules iNKT pourraient jouer un rôle délétère sur l'établissement de la colite. Les cellules NKT seraient à l'origine d'une réponse pro-inflammatoire dans le modèle de colite au TNBS (Trop, S. *et al.*, 2003; Menachem, Y. *et al.*, 2005) et cette colite est améliorée par la déplétion des cellules NK1.1+ (Trop, S. *et al.*, 2002; Shibolet, O. *et al.*, 2004). Par ailleurs, les souris CD1d^{-/-} sont protégées de la colite à l'oxazolone (Heller, F. *et al.*, 2002).

L'ensemble des données expérimentales disponibles à ce jour suggère donc que les cellules iNKT réguleraient l'inflammation intestinale, et que cette régulation dépendrait de leur état d'activation, de leur localisation et du contexte inflammatoire. D'autre part, des sous-populations distinctes de cellules iNKT pourraient être à l'origine des effets contradictoires

décrits dans la littérature. Enfin, ces cellules sont sensibles aux stimuli de l'environnement (comme la composition de la flore intestinale par exemple (Olszak, T. *et al.*, 2012; Wingender, G. *et al.*, 2012)) qui pourraient également orienter leur réponse et leur rôle dans l'inflammation intestinale.

Notre étude démontre pour la première fois que la fumée de cigarette est un facteur qui pourrait orienter la réponse des cellules iNKT intestinales. L'impact de la fumée de cigarette sur ces cellules n'a été analysé que dans une seule étude récente qui montre que les fumeurs présentent un taux systémique de cellules iNKT diminué. Par ailleurs, l'activité de ces cellules est altérée *ex vivo* par des extraits de fumée de cigarette aboutissant à un défaut de production de cytokines et à une diminution de leur habilité cytolytique (Hogan, A.E. *et al.*, 2011).

Dans notre modèle expérimental d'exposition à la fumée de cigarette, le nombre de cellules iNKT parmi les lymphocytes de la *lamina propria* est augmenté dans le côlon des souris exposées à la cigarette pendant 2 semaines. En utilisant un marquage avec un tétramère de CD1d lié à du PBS57 (un analogue de l' α GalCer), nous avons dénombré $2,1 \pm 0,36$ % de cellules iNKT dans le côlon sain des souris. À notre connaissance, la seule autre étude à avoir évalué le taux de cellules iNKT de l'intestin en utilisant du tetCD1d/ α GalCer met en évidence 0,71% de cellules iNKT dans la *lamina propria* du côlon. Il semble difficile de savoir si cette différence est pertinente. Elle pourrait cependant s'expliquer par la condition d'élevage des souris, puisque les résultats de l'étude de Wingender *et al.* montrent précisément que des variations dans l'environnement des souris entre les différents fournisseurs (en particulier la variation de microbiote intestinal induite par les conditions d'élevage) impactent sur le nombre et la fonction des cellules iNKT (Wingender, G. *et al.*, 2012). Néanmoins, nos résultats confirment que ces cellules constituent une population significative dans le côlon.

3.1. Mécanismes à l'origine de la réponse des cellules iNKT

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'activation des cellules iNKT exposées à la fumée de cigarette.

Le principal mode d'activation de ces cellules implique la présentation d'un ligand glycolipidique *via* CD1d par les CPA (dont les IEC (van de Wal, Y. *et al.*, 2003)). Dans notre modèle, l'exposition à la fumée de cigarette pourrait aboutir à la présentation d'antigène par les IEC provoquant l'activation et la polarisation des cellules iNKT. Pour tester cette hypothèse, une lignée d'IEC de souris (MODE-K) a été co-cultivée avec des cellules iNKT et exposée à des extraits de fumée de cigarette. Cette expérience n'a pas montré de différence de production de cytokines par les IEC de souris (résultats obtenus en collaboration avec l'équipe de P. Gosset et M. Pichavant).

La flore intestinale pourrait également être à l'origine de la présentation de ligands par les CPA. L'impact de la flore intestinale sur les fonctions des cellules iNKT est maintenant bien établi (Olszak, T. *et al.*, 2012; Wingender, G. *et al.*, 2012) bien que les antigènes impliqués dans ce procédé restent inconnus. Dans notre modèle, nous avons observé une possible modification de la flore intestinale par la fumée de cigarette. L'exposition à la fumée de cigarette aboutirait à l'augmentation de la flore protectrice du côlon (*Lactobacillus sp.*) et à la réduction de la prolifération d'espèce de pathogènes opportunistes (*Enterococcus sp.* et entérobactéries). Bien que ces résultats nécessitent d'être confirmés par d'autres expériences et d'être précisés par d'autres techniques analytiques (pyroséquençage de l'ARN ribosomal...),

ils permettent néanmoins de proposer cette hypothèse. La modification de la flore par le tabagisme pourrait être à l'origine d'un environnement favorisant un rôle protecteur des cellules iNKT. Inversement, l'orientation de la réponse immunitaire par les cellules iNKT activées par la fumée de cigarette pourrait favoriser le développement d'espèces bactériennes protectrices et/ou inhiber celui d'espèces délétères à l'origine de la chronicité de la réponse inflammatoire. Des analyses bactériologiques chez des souris déficientes en iNKT et exposées à la fumée de cigarette (avec ou sans traitement au DSS) permettrait d'apporter les premiers éléments de réponses dans le lien de causalité entre la régulation des cellules iNKT et celle de la flore par la fumée de cigarette.

Par ailleurs, les neurotransmetteurs, comme la noradrénaline, seraient capables d'orienter la réponse des cellules iNKT vers un profil anti-inflammatoire (Wong, C.H. *et al.*, 2011). La nicotine est un neurotransmetteur qui pourrait jouer un rôle anti-inflammatoire *via* la voie cholinergique anti-inflammatoire. Cette voie serait mise en jeu lors de la réponse inflammatoire intestinale. En effet, la stimulation électrique du nerf vague aboutit à une protection contre la colite au TNBS chez le rat (Meregnani, J. *et al.*, 2011) et les souris ayant subi une vagotomie sont plus sensibles aux colites induites par le DSS et le TNBS (Ghia, J.E. *et al.*, 2006)). La nicotine joue un rôle similaire à celui de l'acétylcholine produit par le nerf vague en stimulant les récepteurs nAChR (Ghia, J.E. *et al.*, 2006) en particulier le récepteur $\alpha 7$ -AChR (Wang, H. *et al.*, 2003; Snoek, S.A. *et al.*, 2010). Ce récepteur est exprimé par les cellules T, les cellules B et les macrophages. Sa stimulation par la nicotine réduit la réponse inflammatoire Th1/Th17 des macrophages sans impacter sur leur réponse Th2 (Borovikova, L.V. *et al.*, 2000). Elle provoque également un changement de réponse des cellules T en diminuant leur réponse Th1 et en augmentant leur réponse Th2 (Nizri, E. *et al.*, 2009). L'expression de ce récepteur par les cellules iNKT n'est pas encore établi à l'heure actuelle mais pourrait être une des caractéristiques partagées par les cellules NKT et les cellules T. Si les cellules iNKT expriment le récepteur $\alpha 7$ -AChR, sa stimulation par la fumée de cigarette, *via* la nicotine, pourrait être un des mécanismes à l'origine du rôle protecteur des cellules iNKT contre la colite. Le blocage de ce récepteur par un antagoniste comme l' α -Bungarotoxine ou l'Hexaméthonium dans notre modèle de colite chez la souris exposé à la fumée de cigarette pourrait permettre de savoir si ce récepteur a un rôle dans la réponse des cellules iNKT.

Enfin, le récepteur AhR pourrait jouer un rôle dans la réponse des cellules NKT à la fumée de cigarette dans notre modèle. Le récepteur AhR est un facteur de transcription qui joue un rôle important dans de nombreuses fonctions biologiques et a un rôle régulateur dans les réponses inflammatoires. Il reconnaît de nombreux polluants comme les dioxines. Suite à son activation, ce récepteur intra-cytoplasmique migre dans le noyau des cellules, se fixe à des éléments de réponses et module l'expression de gènes pro-inflammatoires et oncogéniques (Monteleone, I. *et al.*, 2012). AhR est fortement exprimé dans les IEL intestinaux et les souris AhR^{-/-} sont plus sensibles à la colite au DSS que les souris sauvages, alors que les souris AhR^{-/+} sont moins sensibles. Ces dernières présentent une diminution d'expression colique des cytokines TNF et IL-17 et une augmentation de l'expression de l'IL-10 (Arsenescu, R. *et al.*, 2011). Ces données sont comparables à celles obtenus dans notre modèle suite à l'exposition à la fumée de cigarette et ce récepteur pourrait donc être impliqué dans l'effet protecteur contre la colite. En effet, la fumée de cigarette contient de faibles quantités de composés de type dioxine (Muto, H. *et al.*, 1989; Lofroth, G. *et al.*, 1992) et est capable d'activer la voie AhR

in vitro et *in vivo* (Kasai, A. *et al.*, 2006). D'autre part, plusieurs études récentes ont montré que l'activation du récepteur AhR aboutit à l'atténuation de la colite au DSS (Takamura, T. *et al.*, 2010; Benson, J.M. *et al.*, 2011; Furumatsu, K. *et al.*, 2011; Monteleone, I. *et al.*, 2011; Singh, N.P. *et al.*, 2011) ainsi qu'à l'atténuation de la colite au TNBS, de la colite induite par transfert de cellules T (Monteleone, I. *et al.*, 2011) et de la colite à l'oxazolone (Huang, Z. *et al.*, 2012). De plus, dans un modèle d'hépatectomie chez la souris, le traitement avec un agoniste du récepteur AhR aboutit à la diminution du nombre des cellules NKT dans le foie et à la modification de leur état d'activation (augmentation de l'expression de CD69) sans altération de l'expression du TNF (Horras, C.J. *et al.*, 2012). Ce récepteur pourrait donc avoir un effet sur la polarisation de cellules NKT et être et être impliqués dans les observations faites dans notre modèle. L'étude du rôle de ce récepteur dans la réponse à la fumée de cigarette et dans la modulation de la réponse des cellules NKT colique apporterait des éléments de réponses nouveaux. L'utilisation d'un antagoniste du récepteur AhR, comme le CH223191 (acide 2-méthyl-2H-pyrazole-3-carboxylique) (Kim, S.H. *et al.*, 2006), dans notre modèle chez des souris sauvages et des souris déficientes en cellules NKT permettrait d'élucider son rôle dans la réponse à la fumée de cigarette et dans la polarisation de la réponse des cellules NKT.

3.2. Mécanismes à l'origine de la régulation de la réponse immune

Une autre question sous-jacente à notre étude subsiste concernant les mécanismes par lesquelles les cellules iNKT sont capables d'instaurer une protection contre la colite au DSS suite à la stimulation par la fumée de cigarette.

L'analyse de l'expression des cytokines, chimiokines, récepteurs *etc.* exprimés par les cellules iNKT dans le côlon de souris exposées à la cigarette en comparaison à celles de souris non exposées aurait apporté des éléments de réponse majeurs dans la compréhension de l'effet du tabac sur les cellules iNKT intestinales. Le tri de ces cellules à partir de 20 côlons de souris ne nous a permis d'isoler suffisamment de cellules iNKT pour permettre ces analyses.

Dans notre étude, nous avons montré que le niveau d'IL-10 dans le côlon des souris était augmenté suite à l'exposition à la fumée de cigarette. De plus, le nombre de cellules iNKT est également augmenté dans le côlon de ces souris. Les cellules iNKT pourraient donc être la source de la production d'IL-10 qui pourrait induire la protection observée dans notre modèle de colite. En effet, l'IL-10 produite par les cellules iNKT joue un rôle majeur dans la réponse immune intestinale lors de l'induction de la tolérance orale (Roelofs-Haarhuis, K. *et al.*, 2004) et permet le maintien des DC sous leur forme immature (De Smedt, T. *et al.*, 1997). Par ailleurs, les cellules iNKT sont capables de réguler l'expression des cytokines de nombreux autres types cellulaires (cellules B, cellules T, macrophages...) qui pourraient être à l'origine de la production d'IL-10 dans le côlon. Nous avons donc exploré par marquage intracellulaire la production d'IL-10 dans les populations lymphocytaires du côlon de souris exposées ou non à la fumée de cigarette.

Nos résultats montrent que la production d'IL-10 n'est pas augmentée par la fumée de cigarette dans les populations étudiées (cellules B, cellules T, cellules NK et cellules iNKT). La conclusion de cette analyse est donc que l'IL-10 serait produite par d'autres types cellulaires (macrophages, neutrophiles, DC, IEC...) en réponse à des composants de la fumée ou *via* une régulation par les cellules iNKT. En effet, il a récemment été démontré que les cellules iNKT sont capables d'orienter la différenciation des monocytes circulants en cellules DC-like

suppressives produisant de l'IL-10 (Hegde, S. *et al.*, 2009) et de moduler les fonctions immunosuppressives des neutrophiles sécrétant de l'IL-10 (De Santo, C. *et al.*). La capacité des cellules iNKT à promouvoir la production d'IL-10 par les DC ou les neutrophiles pourrait donc être une piste d'étude à suivre pour comprendre les mécanismes de la protection du côlon par les cellules iNKT exposées à la fumée de cigarette. Dans un premier temps, pour étudier la source de production de l'IL-10 dans le côlon suite à l'exposition à la fumée de cigarette, un modèle de souris exprimant l'IL-10 couplée à la GFP (*Green Fluorescent Protein*) pourrait être utilisé (souris B6.129S6-Il10^{tm1Flv}/J commercialisées par *The Jackson Laboratory*). Chez ces souris, l'IL-10 couplée à la GFP est exprimée au niveau intestinal en particulier par les macrophages, les cellules dendritiques ainsi que les lymphocytes de la *lamina propria* et les IEL, et son niveau d'expression peut être facilement mesuré en cytométrie de flux. Par ailleurs, la co-culture des cellules suspectées avec des cellules iNKT stimulées par des extraits de fumée de cigarette permettra de tester l'impact de ces cellules et leur capacité à réguler la production d'IL-10.

4. Effet comparé du tabac sur l'iléon et sur le colon

L'objectif principal de cette étude était de tester si la dualité du tabac dans les MICI pouvait être liée à un rôle régulateur différent au niveau du côlon et de l'intestin grêle.

À ce jour, très peu d'études ont examiné cet effet ambivalent. Eliakim *et al.* ont étudié l'effet de la nicotine sur le côlon et le jéjunum et ont montré dans 2 modèles (iodoacétamide et souris IL-10^{-/-}) que l'administration chronique de nicotine protège le côlon et aggrave l'inflammation iléale (Eliakim, R. *et al.*, 2001; Eliakim, R. *et al.*, 2002). Par ailleurs, Verschuere *et al.* ont montré que l'exposition chronique à la fumée de cigarette induit des changements immunitaires au niveau du GALT de l'iléon (en particulier au niveau des FAE et des plaques de Peyer) qui pourraient augmenter la sensibilité iléale à l'inflammation (Verschuere, S. *et al.*, 2011). Ces études semblent donc indiquer que la fumée de cigarette aurait un effet délétère sur l'inflammation au niveau de l'intestin grêle, ce qui n'a jamais été testé.

En utilisant notre protocole d'exposition tabagique, nous avons donc complété les résultats précédents par une étude de l'impact du tabac dans un modèle d'inflammation de l'intestin grêle à l'indométacine. Bien qu'aucun modèle animal ne soit capable de reproduire l'inflammation observée chez les patients atteints de MC, l'indométacine provoque des ulcérations au niveau de l'intestin grêle qui sont macroscopiquement et histologiquement comparables à celles observées dans l'iléon terminal des patients atteints de MC (Anthony, A. *et al.*, 2000). Ce modèle semble donc adapté à l'étude la régulation de l'inflammation iléale par la fumée de cigarette.

La réponse obtenue dans ce modèle est moins évidente que celle obtenue dans le côlon. En effet, la fumée de cigarette ne provoque pas de modification mesurable des paramètres cliniques de l'inflammation, ni de la production des cytokines TNF, IL-1 β , KC et IL-10. Par ailleurs, l'exposition à la fumée semble limiter l'inflammation de l'intestin grêle chez les souris en l'absence de cellules iNKT, indiquant un rôle différent des cellules iNKT au niveau de l'iléon et du côlon. Cette observation pourrait indiquer que ces cellules sont activées différemment dans les différents compartiments du tractus intestinal, ou que les sous-populations de cellules localisées dans le côlon et dans le grêle ne sont pas les mêmes et réagissent différemment. Au niveau de l'intestin grêle, cette activation semble avoir pour

conséquence de bloquer et/ou de contrebalancer les effets positifs du tabac. Ces résultats expliqueraient au moins partiellement la différence de réponse à la fumée de cigarette observée entre le côlon et l'iléon. Par ailleurs, ils traduiraient de la nature versatile des cellules iNKT dans la réponse inflammatoire intestinale.

L'analyse des populations lymphocytaires de l'intestin grêle (iléon et jéjunum) a révélé que la fumée de cigarette provoque une augmentation du nombre de cellules T et en particulier des cellules T CD4+ (les cellules TCD4- ne sont pas affectées). Ces résultats corroborent ceux obtenus par Verschuere *et al.* qui ont montré que l'exposition chronique (24 semaines) de souris à la fumée de cigarette induit une augmentation le nombre de DC, de cellules T CD4+ (dont les Treg) et T CD8+ (Verschuere, S. *et al.*, 2011).

Par ailleurs, des études chez l'Homme ont montré que les fumeurs présentent un nombre total de cellules T circulantes augmenté (Tanigawa, T. *et al.*, 1998) et en particulier la sous-populations de cellules T CD4+ circulantes (Tollerud, D.J. *et al.*, 1989). Cette augmentation des cellules T pourrait être à l'origine de l'altération de la réponse inflammatoire dans l'intestin grêle des souris exposées à la fumée de cigarette et les prédisposer à l'inflammation iléale. La caractérisation des sous-populations de cellules T impliquées dans notre modèle d'exposition devrait apporter des éléments supplémentaires permettant de discerner des effets pro- ou anti- inflammatoires selon les populations cellulaires concernées (Treg, T CD8+, T CD4+) et leur évolution vers un profil Th1 ou Th2 (pour les cellules T CD4+ en particulier).

Les résultats obtenus dans notre modèle d'inflammation à l'indométacine chez des souris exposées à la fumée de cigarette ne permettent pas de conclure sur le rôle du tabac dans l'iléon. Ils apportent cependant des données nouvelles permettant d'une part d'incriminer les cellules iNKT stimulées par la fumée de cigarette dans la régulation de l'inflammation iléale, avec un rôle différent de celui observé dans le côlon. D'autre part, ils mettent en évidence un impact différent de la fumée de cigarette sur l'immunité adaptative dans le côlon et dans l'intestin grêle puisque les populations lymphocytaires affectées diffèrent entre les deux organes. En effet, dans le côlon la fumée de cigarette provoque une augmentation du nombre de cellules iNKT et une diminution des cellules B de la *lamina propria*, alors que dans l'intestin grêle, la fumée de cigarette provoque une augmentation du nombre de cellules T (CD4+) et une diminution du nombre de cellules NK.

V. Conclusion - perspectives

Le protocole d'exposition à la fumée de cigarette utilisé de façon originale dans ce travail, combiné à un modèle d'inflammation colique au DSS, a permis, dans un premier temps, la caractérisation de l'effet protecteur de la fumée de cigarette au niveau du côlon et l'identification des cellules iNKT comme indispensables à ce processus. Ce travail montre pour la première fois que les cellules iNKT intestinales sont sensibles à des facteurs environnementaux (autres que la flore) et semblent capables d'orienter leur réponse ainsi que l'inflammation globale suite à cette stimulation. Bien que l'extrapolation d'un modèle de colite chez la souris à la pathologie chez l'Homme reste hasardeuse, compte tenu du rôle déjà établi de ces cellules et des résultats obtenus dans cette étude, il n'est pas déraisonnable de penser que les cellules iNKT pourraient jouer un rôle majeur dans la régulation de l'inflammation intestinale chez les fumeurs atteints de MICI. La caractérisation des mécanismes aboutissant à la polarisation de la réponse des cellules iNKT suite à l'exposition à la fumée de cigarette ouvre une perspective particulièrement intéressante. Elle pourrait en effet permettre d'identifier de nouvelles voies ou de nouveaux ligands permettant d'orienter les cellules iNKT vers un phénotype protecteur ce qui pourrait, à terme, constituer une nouvelle voie thérapeutique dans le traitement des MICI, en particulier de la RCH (Simoni, Y. *et al.*, 2012).

L'application du protocole d'exposition à la fumée de cigarette dans d'autres modèles d'inflammation intestinal (*i.e.* colite induite au TNBS ou à l'oxazolone, colite chronique au DSS) ainsi que la caractérisation de la réponse des cellules iNKT dans ces modèles devrait permettre de comprendre davantage les phénomènes associés à la réponse de ces cellules à la fumée de cigarette (cytokines, chimiokines, populations cellulaires recrutées...). Aucun modèle n'est à l'heure actuelle capable de reproduire l'inflammation mise en jeu au cours des MICI (que ce soit la MC ou la RCH). La comparaison de plusieurs modèles semble donc appropriée pour la mise en évidence des différentes voies de signalisations possibles en réponse à la fumée de cigarette.

Dans la deuxième partie de ce travail, l'effet de la fumée de cigarette sur l'inflammation iléale a été analysé. Bien que les résultats de cette partie soient encore préliminaires et nécessitent d'être approfondis, il ne s'en dégage pas moins un message principal intéressant. En effet, la fumée de cigarette semble avoir un impact différent au niveau du côlon et de l'iléon dans nos expérimentations. Dans le modèle d'inflammation induite à l'indométacine, la fumée de cigarette ne permet pas d'obtenir d'effet protecteur. Par ailleurs, elle semble avoir un impact différent sur les cellules de l'immunité adaptative dans le côlon et dans l'intestin grêle puisque les populations cellulaires affectées diffèrent entre les deux organes. Pour finir, le rôle des cellules iNKT apparaît également différent puisque dans l'iléon, une tendance à la protection par la fumée de cigarette n'est observée qu'en absence de cellules iNKT (alors que ces cellules sont indispensables à la protection observée dans le colon). Outre l'impact de la fumée de cigarette, ces données mettent également en évidence la plasticité des cellules iNKT qui semblent répondre de façon différente au niveau du côlon et du grêle. Cette différence pourrait être due à un environnement inflammatoire différent (avec des signaux de co-stimulation différents) ou à l'implication de sous-populations de cellules iNKT différentes entre les deux organes. La caractérisation du profil des cellules iNKT dans le côlon et dans l'iléon et de leur réponse à la fumée de cigarette ainsi qu'aux signaux inflammatoires permettrait des avancées fondamentales majeures sur le rôle de ces cellules dans l'homéostasie intestinale.

VI. Références

A

- Abraham, N., Selby, W., Lazarus, R. and Solomon, M. (2003). *Is smoking an indirect risk factor for the development of ulcerative colitis? An age- and sex-matched case-control study.* **J Gastroenterol Hepatol** 18(2): 139-46.
- Aicher, A., Heeschen, C., Mohaupt, M., Cooke, J. P., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2003). *Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions.* **Circulation** 107(4): 604-11.
- Alex, P., Zachos, N. C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T. E., Conklin, L. S., Centola, M. and Li, X. (2009). *Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis.* **Inflamm Bowel Dis** 15(3): 341-52.
- Andoh, A., Zhang, Z., Inatomi, O., Fujino, S., Deguchi, Y., Araki, Y., Tsujikawa, T., Kitoh, K., Kim-Mitsuyama, S., Takayanagi, A., Shimizu, N. and Fujiyama, Y. (2005). *Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts.* **Gastroenterology** 129(3): 969-84.
- Anthony, A., Pounder, R. E., Dhillon, A. P. and Wakefield, A. J. (2000). *Similarities between ileal Crohn's disease and indomethacin experimental jejunal ulcers in the rat.* **Aliment Pharmacol Ther** 14(2): 241-5.
- Ardizzone, S. and Bianchi Porro, G. (2002). *Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment.* **J Intern Med** 252(6): 475-96.
- Arnsion, Y., Shoenfeld, Y. and Amital, H. (2010). *Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity.* **J Autoimmun** 34(3): J258-65.
- Arsenescu, R., Arsenescu, V., Zhong, J., Nasser, M., Melinte, R., Dingle, R. W., Swanson, H. and de Villiers, W. J. (2011). *Role of the xenobiotic receptor in inflammatory bowel disease.* **Inflamm Bowel Dis** 17(5): 1149-62.

B

- Baggiolini, M. and Clark-Lewis, I. (1992). *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine.* **FEBS Lett** 307(1): 97-101.
- Balato, A., Unutmaz, D. and Gaspari, A. A. (2009). *Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions.* **J Invest Dermatol** 129(7): 1628-42.
- Balk, S. P., Burke, S., Polischuk, J. E., Frantz, M. E., Yang, L., Porcelli, S., Colgan, S. P. and Blumberg, R. S. (1994). *Beta 2-microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium.* **Science** 265(5169): 259-62.
- Balk, S. P., Ebert, E. C., Blumenthal, R. L., McDermott, F. V., Wucherpfennig, K. W., Landau, S. B. and Blumberg, R. S. (1991). *Oligoclonal expansion and CD1 recognition by human intestinal intraepithelial lymphocytes.* **Science** 253(5026): 1411-5.
- Bamias, G., Sugawara, K., Pagnini, C. and Cominelli, F. (2003). *The Th1 immune pathway as a therapeutic target in Crohn's disease.* **Curr Opin Investig Drugs** 4(11): 1279-86.
- Bandeira, A., Mota-Santos, T., Itohara, S., Degermann, S., Heusser, C., Tonegawa, S. and Coutinho, A. (1990). *Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization.* **J Exp Med** 172(1): 239-44.
- Bannon, Y. B., Corish, J., Corrigan, O. I., Devane, J. G., Kavanagh, M. and Mulligan, S. (1989). *Transdermal delivery of nicotine in normal human volunteers: a single dose and multiple dose study.* **Eur J Clin Pharmacol** 37(3): 285-90.
- Barbour, S. E., Nakashima, K., Zhang, J. B., Tangada, S., Hahn, C. L., Schenkein, H. A. and Tew, J. G. (1997). *Tobacco and smoking: environmental factors that modify the host response (immune system) and have an impact on periodontal health.* **Crit Rev Oral Biol Med** 8(4): 437-60.
- Barreau, F., Madre, C., Meinzer, U., Berrebi, D., Dussailant, M., Merlin, F., Eckmann, L., Karin, M., Sterkers, G., Bonacorsi, S., Lesuffleur, T. and Hugot, J. P. (2010). *Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches.* **Gut** 59(2): 207-17.

- Baumgart, D. C. and Sandborn, W. J. (2007). *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies*. **Lancet** 369(9573): 1641-57.
- Beaugerie, L., Massot, N., Carbonnel, F., Cattan, S., Gendre, J. P. and Cosnes, J. (2001). *Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis*. **Am J Gastroenterol** 96(7): 2113-6.
- Bendelac, A., Savage, P. B. and Teyton, L. (2007). *The biology of NKT cells*. **Annu Rev Immunol** 25: 297-336.
- Benjamin, J. L., Hedin, C. R., Koutsoumpas, A., Ng, S. C., McCarthy, N. E., Prescott, N. J., Pessoa-Lopes, P., Mathew, C. G., Sanderson, J., Hart, A. L., Kamm, M. A., Knight, S. C., Forbes, A., Stagg, A. J., Lindsay, J. O. and Whelan, K. (2012). *Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota*. **Inflamm Bowel Dis** 18(6): 1092-100.
- Benlagha, K., Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L. and Bendelac, A. (2002). *A thymic precursor to the NK T cell lineage*. **Science** 296(5567): 553-5.
- Benoni, C. and Nilsson, A. (1984). *Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease*. **Scand J Gastroenterol** 19(6): 824-30.
- Benson, J. M. and Shepherd, D. M. (2011). *Aryl hydrocarbon receptor activation by TCDD reduces inflammation associated with Crohn's disease*. **Toxicol Sci** 120(1): 68-78.
- Bernstein, C. N. and Shanahan, F. (2008). *Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases*. **Gut** 57(9): 1185-91.
- Berntman, E., Rolf, J., Johansson, C., Anderson, P. and Cardell, S. L. (2005). *The role of CD1d-restricted NK T lymphocytes in the immune response to oral infection with Salmonella typhimurium*. **Eur J Immunol** 35(7): 2100-9.
- Berzins, S. P., Smyth, M. J. and Baxter, A. G. (2011). *Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease*. **Nat Rev Immunol** 11(2): 131-42.
- Biedermann, L., Zeitz, J., Sutter-Minder, E., Rehman, A., Mwinyi, J., Steurer-Stey, C., Frei, A., Scharl, M., Ott, S. J., Schreiber, S., Loessner, M., Fried, M., Vavricka, S. R., Schuppler, M. and Rogler, G. (2011). *Smoking Cessation Leads to Profound Changes in the Composition of the Intestinal Microbiota - A Controlled Prospective Interventional Study Using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Pyrosequencing*. **Gastroenterology** 140, Supplement 1(5): S-141
- Binder, V. (2004). *Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view*. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 18(3): 463-79.
- Birrenbach, T. and Bocker, U. (2004). *Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications*. **Inflamm Bowel Dis** 10(6): 848-59.
- Black, H., Mendoza, M. and Murin, S. (2007). *Thoracic manifestations of inflammatory bowel disease*. **Chest** 131(2): 524-32.
- Blair, S. A., Kane, S. V., Clayburgh, D. R. and Turner, J. R. (2006). *Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease*. **Lab Invest** 86(2): 191-201.
- Boirivant, M., Fuss, I. J., Chu, A. and Strober, W. (1998). *Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4*. **J Exp Med** 188(10): 1929-39.
- Borgerding, M. and Klus, H. (2005). *Analysis of complex mixtures--cigarette smoke*. **Exp Toxicol Pathol** 57 Suppl 1: 43-73.
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J. W. and Tracey, K. J. (2000). *Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin*. **Nature** 405(6785): 458-62.
- Boyko, E. J., Koepsell, T. D., Perera, D. R. and Inui, T. S. (1987). *Risk of ulcerative colitis among former and current cigarette smokers*. **N Engl J Med** 316(12): 707-10.
- Boyko, E. J., Perera, D. R., Koepsell, T. D., Keane, E. M. and Inui, T. S. (1988). *Effects of cigarette smoking on the clinical course of ulcerative colitis*. **Scand J Gastroenterol** 23(9): 1147-52.
- Brandwein, S. L., McCabe, R. P., Cong, Y., Waites, K. B., Ridwan, B. U., Dean, P. A., Ohkusa, T., Birkenmeier, E. H., Sundberg, J. P. and Elson, C. O. (1997). *Spontaneously colitic C3H/HeJBir mice demonstrate selective antibody reactivity to antigens of the enteric bacterial flora*. **J Immunol** 159(1): 44-52.
- Brant, S. R., Picco, M. F., Achkar, J. P., Bayless, T. M., Kane, S. V., Brzezinski, A., Nouvet, F. J., Bonen, D., Karban, A., Dassopoulos, T., Karaliukas, R., Beaty, T. H., Hanauer, S. B., Duerr, R. H. and Cho, J. H. (2003). *Defining complex contributions of NOD2/CARD15 gene mutations, age at onset, and tobacco use on Crohn's disease phenotypes*. **Inflamm Bowel Dis** 9(5): 281-9.

- Bratke, K., Klug, M., Bier, A., Julius, P., Kuepper, M., Virchow, J. C. and Lommatzsch, M. (2008). *Function-associated surface molecules on airway dendritic cells in cigarette smokers*. **Am J Respir Cell Mol Biol** 38(6): 655-60.
- Breuer-Katschinski, B. D., Hollander, N. and Goebell, H. (1996). *Effect of cigarette smoking on the course of Crohn's disease*. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 8(3): 225-8.
- Bridger, S., Lee, J. C., Bjarnason, I., Jones, J. E. and Macpherson, A. J. (2002). *In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis*. **Gut** 51(1): 21-5.
- Brigl, M., Bry, L., Kent, S. C., Gumperz, J. E. and Brenner, M. B. (2003). *Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection*. **Nat Immunol** 4(12): 1230-7.
- Brossay, L., Chioda, M., Burdin, N., Koezuka, Y., Casorati, G., Dellabona, P. and Kronenberg, M. (1998). *CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution*. **J Exp Med** 188(8): 1521-8.
- Brozovic, S., Nagaishi, T., Yoshida, M., Betz, S., Salas, A., Chen, D., Kaser, A., Glickman, J., Kuo, T., Little, A., Morrison, J., Corazza, N., Kim, J. Y., Colgan, S. P., Young, S. G., Exley, M. and Blumberg, R. S. (2004). *CD1d function is regulated by microsomal triglyceride transfer protein*. **Nat Med** 10(5): 535-9.
- Burdin, N., Brossay, L. and Kronenberg, M. (1999). *Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis*. **Eur J Immunol** 29(6): 2014-25.
- Burrows, B., Halonen, M., Lebowitz, M. D., Knudson, R. J. and Barbee, R. A. (1982). *The relationship of serum immunoglobulin E, allergy skin tests, and smoking to respiratory disorders*. **J Allergy Clin Immunol** 70(3): 199-204.
- Bustamante, M., Nos, P., Hoyos, M., Hinojosa, J., Moles, J. R., Garcia-Herola, A. and Berenguer, J. (1998). *Relationship between smoking and colonic involvement in inflammatory bowel disease*. **Rev Esp Enferm Dig** 90(12): 833-40.
- C**
- Calkins, B. M. (1989). *A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease*. **Dig Dis Sci** 34(12): 1841-54.
- Carrillo, T., Rodriguez de Castro, F., Cuevas, M., Diaz, F. and Cabrera, P. (1991). *Effect of cigarette smoking on the humoral immune response in pigeon fanciers*. **Allergy** 46(4): 241-4.
- Cashman, K. D. and Shanahan, F. (2003). *Is nutrition an aetiological factor for inflammatory bowel disease?* **Eur J Gastroenterol Hepatol** 15(6): 607-13.
- Cassatella, M. A. (1995). *The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils*. **Immunol Today** 16(1): 21-6.
- Chouraki, V., Savoye, G., Dauchet, L., Vernier-Massouille, G., Dupas, J. L., Merle, V., Laberrenne, J. E., Salomez, J. L., Lerebours, E., Turck, D., Cortot, A., Gower-Rousseau, C. and Colombel, J. F. (2011). *The changing pattern of Crohn's disease incidence in northern France: a continuing increase in the 10- to 19-year-old age bracket (1988-2007)*. **Aliment Pharmacol Ther** 33(10): 1133-42.
- Chun, T., Page, M. J., Gapin, L., Matsuda, J. L., Xu, H., Nguyen, H., Kang, H. S., Stanic, A. K., Joyce, S., Koltun, W. A., Chorney, M. J., Kronenberg, M. and Wang, C. R. (2003). *CD1d-expressing dendritic cells but not thymic epithelial cells can mediate negative selection of NKT cells*. **J Exp Med** 197(7): 907-18.
- Colgan, S. P., Hershberg, R. M., Furuta, G. T. and Blumberg, R. S. (1999). *Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96(24): 13938-43.
- Compton, R. F., Sandborn, W. J., Lawson, G. M., Sheets, A. J., Mays, D. C., Zins, B. J., Tremaine, W. J., Lipsky, J. J., Mahoney, D. W., Zinsmeister, A. R., Offord, K. P., Hurt, R. D., Evans, B. K. and Green, J. (1997). *A dose-ranging pharmacokinetic study of nicotine tartrate following single-dose delayed-release oral and intravenous administration*. **Aliment Pharmacol Ther** 11(5): 865-74.
- Cooney, R. and Jewell, D. (2009). *The genetic basis of inflammatory bowel disease*. **Dig Dis** 27(4): 428-42.
- Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S. and Sedergran, D. J. (1993). *Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis*. **Lab Invest** 69(2): 238-49.

- Coquet, J. M., Kyparissoudis, K., Pellicci, D. G., Besra, G., Berzins, S. P., Smyth, M. J. and Godfrey, D. I. (2007). *IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production*. **J Immunol** 178(5): 2827-34.
- Corberand, J., Nguyen, F., Do, A. H., Dutau, G., Laharrague, P., Fontanilles, A. M. and Gleizes, B. (1979). *Effect of tobacco smoking on the functions of polymorphonuclear leukocytes*. **Infect Immun** 23(3): 577-81.
- Corrao, G., Tragnone, A., Caprilli, R., Trallori, G., Papi, C., Andreoli, A., Di Paolo, M., Riegler, G., Rigo, G. P., Ferrau, O., Mansi, C., Ingrosso, M. and Valpiani, D. (1998). *Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study*. *Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC)*. **Int J Epidemiol** 27(3): 397-404.
- Cortot, A., Pineton de Chambrun, G., Vernier-Massouille, G., Vigneron, B. and Gower Rousseau, C. (2009). *[Inflammatory bowel disease: genetic or environmental diseases?]*. **Gastroenterol Clin Biol** 33(8-9): 681-91.
- Cosnes, J. (2004). *Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice*. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 18(3): 481-96.
- Cosnes, J. (2010). *Smoking, physical activity, nutrition and lifestyle: environmental factors and their impact on IBD*. **Dig Dis** 28(3): 411-7.
- Cosnes, J., Beaugerie, L., Carbonnel, F. and Gendre, J. P. (2001). *Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study*. **Gastroenterology** 120(5): 1093-9.
- Cosnes, J., Carbonnel, F., Beaugerie, L., Blain, A., Reijasse, D. and Gendre, J. P. (2002). *Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis*. **Gut** 51(6): 803-7.
- Cosnes, J., Carbonnel, F., Beaugerie, L., Le Quintrec, Y. and Gendre, J. P. (1996). *Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease*. **Gastroenterology** 110(2): 424-31.
- Cosnes, J., Carbonnel, F., Carrat, F., Beaugerie, L., Cattan, S. and Gendre, J. (1999). *Effects of current and former cigarette smoking on the clinical course of Crohn's disease*. **Aliment Pharmacol Ther** 13(11): 1403-11.
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P. and Cortot, A. (2011). *Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases*. **Gastroenterology** 140(6): 1785-94.
- Cosnes, J., Nion-Larmurier, I., Afchain, P., Beaugerie, L. and Gendre, J. P. (2004). *Gender differences in the response of colitis to smoking*. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2(1): 41-8.
- Cosnes, J., Seksik, P., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L. and Gendre, J. P. (2006). *Prior appendectomy and the phenotype and course of Crohn's disease*. **World J Gastroenterol** 12(8): 1235-42.
- Cottone, M., Rosselli, M., Orlando, A., Oliva, L., Puleo, A., Cappello, M., Traina, M., Tonelli, F. and Pagliaro, L. (1994). *Smoking habits and recurrence in Crohn's disease*. **Gastroenterology** 106(3): 643-8.
- Crowe, N. Y., Coquet, J. M., Berzins, S. P., Kyparissoudis, K., Keating, R., Pellicci, D. G., Hayakawa, Y., Godfrey, D. I. and Smyth, M. J. (2005). *Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo*. **J Exp Med** 202(9): 1279-88.
- Crowe, N. Y., Uldrich, A. P., Kyparissoudis, K., Hammond, K. J., Hayakawa, Y., Sidobre, S., Keating, R., Kronenberg, M., Smyth, M. J. and Godfrey, D. I. (2003). *Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells*. **J Immunol** 171(8): 4020-7.
- Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M. and Taniguchi, M. (1997). *Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors*. **Science** 278(5343): 1623-6.
- D'Andrea, A., Goux, D., De Lalla, C., Koezuka, Y., Montagna, D., Moretta, A., Dellabona, P., Casorati, G. and Abrignani, S. (2000). *Neonatal invariant Valpha24+ NKT lymphocytes are activated memory cells*. **Eur J Immunol** 30(6): 1544-50.

D

- Dalbey, W. E., Nettesheim, P., Griesemer, R., Caton, J. E. and Guerin, M. R. (1980). *Chronic inhalation of cigarette smoke by F344 rats*. **J Natl Cancer Inst** 64(2): 383-90.
- Danese, S., Semeraro, S., Papa, A., Roberto, I., Scaldaferrri, F., Fedeli, G., Gasbarrini, G. and Gasbarrini, A. (2005). *Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease*. **World J Gastroenterol** 11(46): 7227-36.

- De Santo, C., Arscott, R., Booth, S., Karydis, I., Jones, M., Asher, R., Salio, M., Middleton, M. and Cerundolo, V. (2010). *Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A*. **Nat Immunol** 11(11): 1039-46.
- De Smedt, T., Van Mechelen, M., De Becker, G., Urbain, J., Leo, O. and Moser, M. (1997). *Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function*. **Eur J Immunol** 27(5): 1229-35.
- Dieleman, L. A., Ridwan, B. U., Tennyson, G. S., Beagley, K. W., Bucy, R. P. and Elson, C. O. (1994). *Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice*. **Gastroenterology** 107(6): 1643-52.
- Duffy, L. C., Zielezny, M. A., Marshall, J. R., Weiser, M. M., Byers, T. E., Phillips, J. F., Ogra, P. L. and Graham, S. (1990). *Cigarette smoking and risk of clinical relapse in patients with Crohn's disease*. **Am J Prev Med** 6(3): 161-6.

E

- Eliakim, R., Fan, Q. X. and Babyatsky, M. W. (2002). *Chronic nicotine administration differentially alters jejunal and colonic inflammation in interleukin-10 deficient mice*. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 14(6): 607-14.
- Eliakim, R. and Karmeli, F. (2003). *Divergent effects of nicotine administration on cytokine levels in rat small bowel mucosa, colonic mucosa, and blood*. **Isr Med Assoc J** 5(3): 178-80.
- Eliakim, R., Karmeli, F., Cohen, P., Heyman, S. N. and Rachmilewitz, D. (2001). *Dual effect of chronic nicotine administration: augmentation of jejunitis and amelioration of colitis induced by iodoacetamide in rats*. **Int J Colorectal Dis** 16(1): 14-21.
- Eliakim, R., Karmeli, F., Rachmilewitz, D., Cohen, P. and Fich, A. (1998). *Effect of chronic nicotine administration on trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis*. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 10(12): 1013-9.
- Evans, P. E. and Pardi, D. S. (2007). *Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: focus on the musculoskeletal, dermatologic, and ocular manifestations*. **MedGenMed** 9(1): 55.

F

- Facciotti, F., Ramanjaneyulu, G. S., Lepore, M., Sansano, S., Cavallari, M., Kistowska, M., Forss-Petter, S., Ni, G., Colone, A., Singhal, A., Berger, J., Xia, C., Mori, L. and De Libero, G. (2012). *Peroxisome-derived lipids are self antigens that stimulate invariant natural killer T cells in the thymus*. **Nat Immunol** 13(5): 474-80.
- Fang, K., Bruce, M., Pattillo, C. B., Zhang, S., Stone, R., 2nd, Clifford, J. and Kevil, C. G. (2011). *Temporal genomewide expression profiling of DSS colitis reveals novel inflammatory and angiogenesis genes similar to ulcerative colitis*. **Physiol Genomics** 43(1): 43-56.
- Farrell, R. J. and LaMont, J. T. (2002). *Microbial factors in inflammatory bowel disease*. **Gastroenterol Clin North Am** 31(1): 41-62.
- Faux, S. P., Tai, T., Thorne, D., Xu, Y., Breheny, D. and Gaca, M. (2009). *The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke*. **Biomarkers** 14 Suppl 1: 90-6.
- Person, M., Edwards, A., Lind, A., Milton, G. W. and Hersey, P. (1979). *Low natural killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects*. **Int J Cancer** 23(5): 603-9.
- Finnie, I. A., Campbell, B. J., Taylor, B. A., Milton, J. D., Sadek, S. K., Yu, L. G. and Rhodes, J. M. (1996). *Stimulation of colonic mucin synthesis by corticosteroids and nicotine*. **Clin Sci (Lond)** 91(3): 359-64.
- Fischer, K., Scotet, E., Niemeyer, M., Koebernick, H., Zerrahn, J., Maillet, S., Hurwitz, R., Kursar, M., Bonneville, M., Kaufmann, S. H. and Schaible, U. E. (2004). *Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101(29): 10685-90.
- Fox, L. M., Cox, D. G., Lockridge, J. L., Wang, X., Chen, X., Scharf, L., Trott, D. L., Ndonge, R. M., Veerapen, N., Besra, G. S., Howell, A. R., Cook, M. E., Adams, E. J., Hildebrand, W. H. and Gumperz, J. E. (2009). *Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes*. **PLoS Biol** 7(10): e1000228.
- Fraga, X. F., Vergara, M., Medina, C., Casellas, F., Bermejo, B. and Malagelada, J. R. (1997). *Effects of smoking on the presentation and clinical course of inflammatory bowel disease*. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 9(7): 683-7.

- Franceschi, S., Panza, E., La Vecchia, C., Parazzini, F., Decarli, A. and Bianchi Porro, G. (1987). *Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking*. **Am J Epidemiol** 125(3): 445-52.
- Franchimont, D., Vermeire, S., El Housni, H., Pierik, M., Van Steen, K., Gustot, T., Quertinmont, E., Abramowicz, M., Van Gossum, A., Deviere, J. and Rutgeerts, P. (2004). *Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis*. **Gut** 53(7): 987-92.
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T. and Fujiyama, Y. (2003). *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease*. **Gut** 52(1): 65-70.
- Furumatsu, K., Nishiumi, S., Kawano, Y., Ooi, M., Yoshie, T., Shiomi, Y., Kutsumi, H., Ashida, H., Fujii-Kuriyama, Y., Azuma, T. and Yoshida, M. (2011). *A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis*. **Dig Dis Sci** 56(9): 2532-44.
- Fuss, I. J., Heller, F., Boirivant, M., Leon, F., Yoshida, M., Fichtner-Feigl, S., Yang, Z., Exley, M., Kitani, A., Blumberg, R. S., Mannon, P. and Strober, W. (2004). *Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis*. **J Clin Invest** 113(10): 1490-7.



- Galeazzi, F., Blennerhassett, P. A., Qiu, B., O'Byrne, P. M. and Collins, S. M. (1999). *Cigarette smoke aggravates experimental colitis in rats*. **Gastroenterology** 117(4): 877-83.
- Galitovskiy, V., Qian, J., Chernyavsky, A. I., Marchenko, S., Gindi, V., Edwards, R. A. and Grando, S. A. (2011). *Cytokine-induced alterations of alpha7 nicotinic receptor in colonic CD4 T cells mediate dichotomous response to nicotine in murine models of Th1/Th17- versus Th2-mediated colitis*. **J Immunol** 187(5): 2677-87.
- Gapin, L. (2010). *iNKT cell autoreactivity: what is 'self' and how is it recognized?* **Nat Rev Immunol** 10(4): 272-7.
- Ge, Y., Rampy, B. A., Wang, H. L. and Xiao, S. Y. (2006). *Reduced CD1d expression in colonic epithelium in microscopic colitis*. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 14(3): 309-13.
- Geng, Y., Savage, S. M., Razani-Boroujerdi, S. and Sopor, M. L. (1996). *Effects of nicotine on the immune response. II. Chronic nicotine treatment induces T cell anergy*. **J Immunol** 156(7): 2384-90.
- Ghia, J. E., Blennerhassett, P., Kumar-Ondiveeran, H., Verdu, E. F. and Collins, S. M. (2006). *The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model*. **Gastroenterology** 131(4): 1122-30.
- Ghosh, S., van Heel, D. and Playford, R. J. (2004). *Probiotics in inflammatory bowel disease: is it all gut flora modulation?* **Gut** 53(5): 620-2.
- Godfrey, D. I., MacDonald, H. R., Kronenberg, M., Smyth, M. J. and Van Kaer, L. (2004). *NKT cells: what's in a name?* **Nat Rev Immunol** 4(3): 231-7.
- Godfrey, D. I., Stankovic, S. and Baxter, A. G. (2010). *Raising the NKT cell family*. **Nat Immunol** 11(3): 197-206.
- Goyette, P., Labbe, C., Trinh, T. T., Xavier, R. J. and Rioux, J. D. (2007). *Molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease: genotypes, phenotypes and personalized medicine*. **Ann Med** 39(3): 177-99.
- Green, J. T., Rhodes, J., Ragunath, K., Thomas, G. A., Williams, G. T., Mani, V., Feyerabend, C. and Russell, M. A. (1998). *Clinical status of ulcerative colitis in patients who smoke*. **Am J Gastroenterol** 93(9): 1463-7.
- Green, J. T., Thomas, G. A., Rhodes, J., Williams, G. T., Evans, B. K., Russell, M. A., Feyerabend, C., Rhodes, P. and Sandborn, W. J. (1997). *Nicotine enemas for active ulcerative colitis—a pilot study*. **Aliment Pharmacol Ther** 11(5): 859-63.
- Grose, R. H., Cummins, A. G. and Thompson, F. M. (2007). *Deficiency of invariant natural killer T cells in coeliac disease*. **Gut** 56(6): 790-5.
- Grose, R. H., Thompson, F. M., Baxter, A. G., Pellicci, D. G. and Cummins, A. G. (2007). *Deficiency of invariant NK T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis*. **Dig Dis Sci** 52(6): 1415-22.
- Gumperz, J. E., Miyake, S., Yamamura, T. and Brenner, M. B. (2002). *Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining*. **J Exp Med** 195(5): 625-36.

- Gumperz, J. E., Roy, C., Makowska, A., Lum, D., Sugita, M., Podrebarac, T., Koezuka, Y., Porcelli, S. A., Cardell, S., Brenner, M. B. and Behar, S. M. (2000). *Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids*. **Immunity** 12(2): 211-21.
- Guo, X., Ko, J. K., Mei, Q. B. and Cho, C. H. (2001). *Aggravating effect of cigarette smoke exposure on experimental colitis is associated with leukotriene B(4) and reactive oxygen metabolites*. **Digestion** 63(3): 180-7.
- Guo, X., Liu, E. S., Ko, J. K., Wong, B. C., Ye, Y., Lam, S. and Cho, C. (2001). *Protective role of cyclooxygenase inhibitors in the adverse action of passive cigarette smoking on the initiation of experimental colitis in rats*. **Eur J Pharmacol** 411(1-2): 193-203.
- Guo, X., Wang, W. P., Ko, J. K. and Cho, C. H. (1999). *Involvement of neutrophils and free radicals in the potentiating effects of passive cigarette smoking on inflammatory bowel disease in rats*. **Gastroenterology** 117(4): 884-92.
- Guslandi, M. (1999). *Long-term effects of a single course of nicotine treatment in acute ulcerative colitis: remission maintenance in a 12-month follow-up study*. **Int J Colorectal Dis** 14(4-5): 261-2.
- Guslandi, M. and Tittobello, A. (1998). *Outcome of ulcerative colitis after treatment with transdermal nicotine*. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 10(6): 513-5.
- Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F., Nunez, G. and Fernandez-Luna, J. L. (2002). *Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation*. **J Biol Chem** 277(44): 41701-5.
- Gyde, S., Prior, P., Dew, M. J., Saunders, V., Waterhouse, J. A. and Allan, R. N. (1982). *Mortality in ulcerative colitis*. **Gastroenterology** 83(1 Pt 1): 36-43.

H

- Halfvarson, J., Bodin, L., Tysk, C., Lindberg, E. and Jarnerot, G. (2003). *Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics*. **Gastroenterology** 124(7): 1767-73.
- Halfvarson, J., Jess, T., Bodin, L., Jarnerot, G., Munkholm, P., Binder, V. and Tysk, C. (2007). *Longitudinal concordance for clinical characteristics in a Swedish-Danish twin population with inflammatory bowel disease*. **Inflamm Bowel Dis** 13(12): 1536-44.
- Hall, L. J., Faivre, E., Quinlan, A., Shanahan, F., Nally, K. and Melgar, S. (2010). *Induction and activation of adaptive immune populations during acute and chronic phases of a murine model of experimental colitis*. **Dig Dis Sci** 56(1): 79-89.
- Harries, A. D., Baird, A. and Rhodes, J. (1982). *Non-smoking: a feature of ulcerative colitis*. **Br Med J (Clin Res Ed)** 284(6317): 706.
- Hegde, S., Jankowska-Gan, E., Roenneburg, D. A., Torrealba, J., Burlingham, W. J. and Gumperz, J. E. (2009). *Human NKT cells promote monocyte differentiation into suppressive myeloid antigen-presenting cells*. **J Leukoc Biol** 86(4): 757-68.
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A. H., Burgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W. and Schulzke, J. D. (2005). *Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution*. **Gastroenterology** 129(2): 550-64.
- Heller, F., Fuss, I. J., Nieuwenhuis, E. E., Blumberg, R. S. and Strober, W. (2002). *Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells*. **Immunity** 17(5): 629-38.
- Hogan, A. E., Corrigan, M. A., O'Reilly, V., Gaoatswe, G., O'Connell, J., Doherty, D. G., Lynch, L. and O'Shea, D. (2011). *Cigarette smoke alters the invariant natural killer T cell function and may inhibit anti-tumor responses*. **Clin Immunol** 140(3): 229-35.
- Holdstock, G., Savage, D., Harman, M. and Wright, R. (1984). *Should patients with inflammatory bowel disease smoke?* **Br Med J (Clin Res Ed)** 288(6414): 362.
- Holmes, E. W., Yong, S. L., Eiznhamer, D. and Keshavarzian, A. (1998). *Glutathione content of colonic mucosa: evidence for oxidative damage in active ulcerative colitis*. **Dig Dis Sci** 43(5): 1088-95.
- Holt, P. G. and Keast, D. (1977). *Environmentally induced changes in immunological function: acute and chronic effects of inhalation of tobacco smoke and other atmospheric contaminants in man and experimental animals*. **Bacteriol Rev** 41(1): 205-16.
- Hong, S., Wilson, M. T., Serizawa, I., Wu, L., Singh, N., Naidenko, O. V., Miura, T., Haba, T., Scherer, D. C., Wei, J., Kronenberg, M., Koezuka, Y. and Van Kaer, L. (2001). *The natural killer T-cell ligand*

- alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice.* **Nat Med** 7(9): 1052-6.
- Hornung, M., Farkas, S. A., Sattler, C., Schlitt, H. J. and Geissler, E. K. (2006). *DX5+ NKT cells induce the death of colitis-associated cells: involvement of programmed death ligand-1.* **Eur J Immunol** 36(5): 1210-21.
- Horras, C. J., Lamb, C. L., King, A. L., Hanley, J. R. and Mitchell, K. A. (2012). *Consequences of TCDD treatment on intra-hepatic lymphocytes during liver regeneration.* **J Immunotoxicol.**
- Hoser, G., Domagala-Kulawik, J., Droszcz, P., Droszcz, W. and Kawiak, J. (2003). *Lymphocyte subsets differences in smokers and nonsmokers with primary lung cancer: a flow cytometry analysis of bronchoalveolar lavage fluid cells.* **Med Sci Monit** 9(8): BR310-5.
- Huang, Z., Jiang, Y., Yang, Y., Shao, J., Sun, X., Chen, J., Dong, L. and Zhang, J. (2012). *3,3'-Diindolylmethane alleviates oxazolone-induced colitis through Th2/Th17 suppression and Treg induction.* **Mol Immunol** 53(4): 335-344.
- Hueber, W., Patel, D. D., Dryja, T., Wright, A. M., Koroleva, I., Bruin, G., Antoni, C., Draelos, Z., Gold, M. H., Durez, P., Tak, P. P., Gomez-Reino, J. J., Foster, C. S., Kim, R. Y., Samson, C. M., Falk, N. S., Chu, D. S., Callanan, D., Nguyen, Q. D., Rose, K., Haider, A. and Di Padova, F. (2010). *Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis.* **Sci Transl Med** 2(52): 52ra72.
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M. and Thomas, G. (2001). *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease.* **Nature** 411(6837): 599-603.
- Hugot, J. P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Olson, J. M., Lee, J. C., Beaugerie, L., Naom, I., Dupas, J. L., Van Gossum, A., Orholm, M., Bonaiti-Pellie, C., Weissenbach, J., Mathew, C. G., Lennard-Jones, J. E., Cortot, A., Colombel, J. F. and Thomas, G. (1996). *Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16.* **Nature** 379(6568): 821-3.

I - J

- Ingram, J. R., Rhodes, J., Evans, B. K. and Thomas, G. A. (2008). *Nicotine enemas for active Crohn's colitis: an open pilot study.* **Gastroenterol Res Pract** 2008: 237185.
- Ingram, J. R., Routledge, P., Rhodes, J., Marshall, R. W., Buss, D. C., Evans, B. K., Feyerabend, C. and Thomas, G. A. (2004). *Nicotine enemas for treatment of ulcerative colitis: a study of the pharmacokinetics and adverse events associated with three doses of nicotine.* **Aliment Pharmacol Ther** 20(8): 859-65.
- Ivanov, A. I., Nusrat, A. and Parkos, C. A. (2004). *Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment.* **Mol Biol Cell** 15(1): 176-88.
- Johansson, M. E., Gustafsson, J. K., Sjoberg, K. E., Petersson, J., Holm, L., Sjovall, H. and Hansson, G. C. (2010). *Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model.* **PLoS One** 5(8): e12238.

K

- Kaneko, Y., Harada, M., Kawano, T., Yamashita, M., Shibata, Y., Gejyo, F., Nakayama, T. and Taniguchi, M. (2000). *Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis.* **J Exp Med** 191(1): 105-14.
- Kasai, A., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Yao, J., Maeda, S. and Kitamura, M. (2006). *High levels of dioxin-like potential in cigarette smoke evidenced by in vitro and in vivo biosensing.* **Cancer Res** 66(14): 7143-50.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H. and Taniguchi, M. (1997). *CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides.* **Science** 278(5343): 1626-9.
- Keshavarzian, A., Sedghi, S., Kanofsky, J., List, T., Robinson, C., Ibrahim, C. and Winship, D. (1992). *Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe.* **Gastroenterology** 103(1): 177-85.

- Kim, C. H., Butcher, E. C. and Johnston, B. (2002). *Distinct subsets of human Valpha24-invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression*. **Trends Immunol** 23(11): 516-9.
- Kim, H. J., Hwang, S. J., Kim, B. K., Jung, K. C. and Chung, D. H. (2006). *NKT cells play critical roles in the induction of oral tolerance by inducing regulatory T cells producing IL-10 and transforming growth factor beta, and by clonally deleting antigen-specific T cells*. **Immunology** 118(1): 101-11.
- Kim, H. P., Wang, X., Chen, Z. H., Lee, S. J., Huang, M. H., Wang, Y., Ryter, S. W. and Choi, A. M. (2008). *Autophagic proteins regulate cigarette smoke-induced apoptosis: protective role of heme oxygenase-1*. **Autophagy** 4(7): 887-95.
- Kim, H. S., Garcia, J., Exley, M., Johnson, K. W., Balk, S. P. and Blumberg, R. S. (1999). *Biochemical characterization of CD1d expression in the absence of beta2-microglobulin*. **J Biol Chem** 274(14): 9289-95.
- Kim, S., Lalani, S., Parekh, V. V., Vincent, T. L., Wu, L. and Van Kaer, L. (2008). *Impact of bacteria on the phenotype, functions, and therapeutic activities of invariant NKT cells in mice*. **J Clin Invest** 118(6): 2301-15.
- Kim, S. H., Henry, E. C., Kim, D. K., Kim, Y. H., Shin, K. J., Han, M. S., Lee, T. G., Kang, J. K., Gasiewicz, T. A., Ryu, S. H. and Suh, P. G. (2006). *Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor*. **Mol Pharmacol** 69(6): 1871-8.
- King, T. E., Jr., Savici, D. and Campbell, P. A. (1988). *Phagocytosis and killing of Listeria monocytogenes by alveolar macrophages: smokers versus nonsmokers*. **J Infect Dis** 158(6): 1309-16.
- Kinjo, Y., Tupin, E., Wu, D., Fujio, M., Garcia-Navarro, R., Benhnia, M. R., Zajonc, D. M., Ben-Menachem, G., Ainge, G. D., Painter, G. F., Khurana, A., Hoebe, K., Behar, S. M., Beutler, B., Wilson, I. A., Tsuji, M., Sellati, T. J., Wong, C. H. and Kronenberg, M. (2006). *Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria*. **Nat Immunol** 7(9): 978-86.
- Kinjo, Y., Wu, D., Kim, G., Xing, G. W., Poles, M. A., Ho, D. D., Tsuji, M., Kawahara, K., Wong, C. H. and Kronenberg, M. (2005). *Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells*. **Nature** 434(7032): 520-5.
- Kinross, J. M., von Roon, A. C., Holmes, E., Darzi, A. and Nicholson, J. K. (2008). *The human gut microbiome: implications for future health care*. **Curr Gastroenterol Rep** 10(4): 396-403.
- Kleessen, B., Kroesen, A. J., Buhr, H. J. and Blaut, M. (2002). *Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls*. **Scand J Gastroenterol** 37(9): 1034-41.
- Ko, J. K. and Cho, C. H. (2005). *The diverse actions of nicotine and different extracted fractions from tobacco smoke against haptén-induced colitis in rats*. **Toxicol Sci** 87(1): 285-95.
- Ko, J. K., Sham, N. F., Guo, X. and Cho, C. H. (2001). *Beneficial intervention of experimental colitis by passive cigarette smoking through the modulation of cytokines in rats*. **J Investig Med** 49(1): 21-9.
- Koutroubakis, I. E., Vlachonikolis, I. G. and Kouroumalis, E. A. (2002). *Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review*. **Inflamm Bowel Dis** 8(4): 277-86.
- Kronenberg, M. (2005). *Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes*. **Annu Rev Immunol** 23: 877-900.
- Kronman, M. P., Zaoutis, T. E., Haynes, K., Feng, R. and Coffin, S. E. (2012). *Antibiotic Exposure and IBD Development Among Children: A Population-Based Cohort Study*. **Pediatrics** 130(4): e794-803.
- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. and Muller, W. (1993). *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. **Cell** 75(2): 263-74.
- Kurata, J. H., Kantor-Fish, S., Frankl, H., Godby, P. and Vadheim, C. M. (1992). *Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization*. **Gastroenterology** 102(6): 1940-8.
- L**
- La Cava, A., Van Kaer, L. and Fu Dong, S. (2006). *CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators*. **Trends Immunol** 27(7): 322-7.
- Lacasse, J. and Martin, L. H. (1992). *Detection of CD1 mRNA in Paneth cells of the mouse intestine by in situ hybridization*. **J Histochem Cytochem** 40(10): 1527-34.

- Lashner, B. A., Hanauer, S. B. and Silverstein, M. D. (1990). *Testing nicotine gum for ulcerative colitis patients. Experience with single-patient trials.* **Dig Dis Sci** 35(7): 827-32.
- Lee, J. C. and Parkes, M. (2011). *Genome-wide association studies and Crohn's disease.* **Brief Funct Genomics** 10(2): 71-6.
- Lesage, S., Zouali, H., Cezard, J. P., Colombel, J. F., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Modigliani, R., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Merlin, F., Chamaillard, M., Jannot, A. S., Thomas, G. and Hugot, J. P. (2002). *CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease.* **Am J Hum Genet** 70(4): 845-57.
- Ley, R. E., Knight, R. and Gordon, J. I. (2007). *The human microbiome: eliminating the biomedical/environmental dichotomy in microbial ecology.* **Environ Microbiol** 9(1): 3-4.
- Lindberg, E., Jarnerot, G. and Huitfeldt, B. (1992). *Smoking in Crohn's disease: effect on localisation and clinical course.* **Gut** 33(6): 779-82.
- Lindberg, E., Tysk, C., Andersson, K. and Jarnerot, G. (1988). *Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study.* **Gut** 29(3): 352-7.
- Lisbonne, M., Diem, S., de Castro Keller, A., Lefort, J., Araujo, L. M., Hachem, P., Fourneau, J. M., Sidobre, S., Kronenberg, M., Taniguchi, M., Van Endert, P., Dy, M., Askenase, P., Russo, M., Vargaftig, B. B., Herbelin, A. and Leite-de-Moraes, M. C. (2003). *Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model.* **J Immunol** 171(4): 1637-41.
- Liu, E. S., Ye, Y. N., Shin, V. Y., Yuen, S. T., Leung, S. Y., Wong, B. C. and Cho, C. H. (2003). *Cigarette smoke exposure increases ulcerative colitis-associated colonic adenoma formation in mice.* **Carcinogenesis** 24(8): 1407-13.
- Lofroth, G. and Zebuhr, Y. (1992). *Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in mainstream and sidestream cigarette smoke.* **Bull Environ Contam Toxicol** 48(6): 789-94.
- Loftus, E. V., Jr. (2004). *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences.* **Gastroenterology** 126(6): 1504-17.
- Louvet, B., Buisine, M. P., Desreumaux, P., Tremaine, W. J., Aubert, J. P., Porchet, N., Capron, M., Cortot, A., Colombel, J. F. and Sandborn, W. J. (1999). *Transdermal nicotine decreases mucosal IL-8 expression but has no effect on mucin gene expression in ulcerative colitis.* **Inflamm Bowel Dis** 5(3): 174-81.

M

- Ma, T. Y., Boivin, M. A., Ye, D., Pedram, A. and Said, H. M. (2005). *Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression.* **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 288(3): G422-30.
- MacDonald, H. R. (2002). *Development and selection of NKT cells.* **Curr Opin Immunol** 14(2): 250-4.
- Madara, J. L. and Stafford, J. (1989). *Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers.* **J Clin Invest** 83(2): 724-7.
- Mahid, S. S., Minor, K. S., Stevens, P. L. and Galandiuk, S. (2007). *The role of smoking in Crohn's disease as defined by clinical variables.* **Dig Dis Sci** 52(11): 2897-903.
- Makita, S., Kanai, T., Oshima, S., Uraushihara, K., Totsuka, T., Sawada, T., Nakamura, T., Koganei, K., Fukushima, T. and Watanabe, M. (2004). *CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells.* **J Immunol** 173(5): 3119-30.
- Mallevaey, T. and Selvanantham, T. (2012). *Strategy of lipid recognition by invariant natural killer T cells: 'one for all and all for one'.* **Immunology** 136(3): 273-82.
- Mardini, H. E., Kip, K. E. and Wilson, J. W. (2004). *Crohn's disease: a two-year prospective study of the association between psychological distress and disease activity.* **Dig Dis Sci** 49(3): 492-7.
- Margalit, M. and Ilan, Y. (2005). *Induction of immune tolerance: a role for Natural killer T lymphocytes?* **Liver Int** 25(3): 501-4.
- Marin, M. L., Greenstein, A. J., Geller, S. A., Gordon, R. E. and Aufses, A. H., Jr. (1984). *Freeze-fracture analysis of epithelial cell lysosomal inclusions in Crohn's disease.* **Ultrastruct Pathol** 6(1): 39-44.
- Masdottir, B., Jonsson, T., Manfredsdottir, V., Vikingsson, A., Brekkan, A. and Valdimarsson, H. (2000). *Smoking, rheumatoid factor isotypes and severity of rheumatoid arthritis.* **Rheumatology (Oxford)** 39(11): 1202-5.

- Matsuda, J. L., Mallevey, T., Scott-Browne, J. and Gapin, L. (2008). *CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system*. **Curr Opin Immunol** 20(3): 358-68.
- Matsuda, J. L., Naidenko, O. V., Gapin, L., Nakayama, T., Taniguchi, M., Wang, C. R., Koezuka, Y. and Kronenberg, M. (2000). *Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers*. **J Exp Med** 192(5): 741-54.
- Mattner, J., Debord, K. L., Ismail, N., Goff, R. D., Cantu, C., 3rd, Zhou, D., Saint-Mezard, P., Wang, V., Gao, Y., Yin, N., Hoebe, K., Schneewind, O., Walker, D., Beutler, B., Teyton, L., Savage, P. B. and Bendelac, A. (2005). *Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections*. **Nature** 434(7032): 525-9.
- Maul, J., Loddenkemper, C., Mundt, P., Berg, E., Giese, T., Stallmach, A., Zeitz, M. and Duchmann, R. (2005). *Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease*. **Gastroenterology** 128(7): 1868-78.
- Mazmanian, S. K., Round, J. L. and Kasper, D. L. (2008). *A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease*. **Nature** 453(7195): 620-5.
- McCrea, K. A., Ensor, J. E., Nall, K., Bleecker, E. R. and Hasday, J. D. (1994). *Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers*. **Am J Respir Crit Care Med** 150(3): 696-703.
- McGrath, J., McDonald, J. W. and Macdonald, J. K. (2004). *Transdermal nicotine for induction of remission in ulcerative colitis*. **Cochrane Database Syst Rev**(4): CD004722.
- McKenzie, S. J., Baker, M. S., Buffinton, G. D. and Doe, W. F. (1996). *Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease*. **J Clin Invest** 98(1): 136-41.
- McNab, F. W., Pellicci, D. G., Field, K., Besra, G., Smyth, M. J., Godfrey, D. I. and Berzins, S. P. (2007). *Peripheral NK1.1 NKT cells are mature and functionally distinct from their thymic counterparts*. **J Immunol** 179(10): 6630-7.
- Medina, C., Vergara, M., Casellas, F., Lara, F., Naval, J. and Malagelada, J. R. (1998). *Influence of the smoking habit in the surgery of inflammatory bowel disease*. **Rev Esp Enferm Dig** 90(11): 771-8.
- Mehta, H., Nazzal, K. and Sadikot, R. T. (2008). *Cigarette smoking and innate immunity*. **Inflamm Res** 57(11): 497-503.
- Melgar, S., Karlsson, A. and Michaelsson, E. (2005). *Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation*. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 288(6): G1328-38.
- Menachem, Y., Trop, S., Kolker, O., Shibolet, O., Alper, R., Nagler, A. and Ilan, Y. (2005). *Adoptive transfer of NK 1.1+ lymphocytes in immune-mediated colitis: a pro-inflammatory or a tolerizing subgroup of cells?* **Microbes Infect** 7(5-6): 825-35.
- Meregnani, J., Clarencon, D., Vivier, M., Peinnequin, A., Mouret, C., Sinniger, V., Picq, C., Job, A., Canini, F., Jacquier-Sarlin, M. and Bonaz, B. (2011). *Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model of inflammatory bowel disease*. **Auton Neurosci** 160(1-2): 82-9.
- Metelitsa, L. S., Naidenko, O. V., Kant, A., Wu, H. W., Loza, M. J., Perussia, B., Kronenberg, M. and Seeger, R. C. (2001). *Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells*. **J Immunol** 167(6): 3114-22.
- Millar, A. D., Rampton, D. S., Chander, C. L., Claxson, A. W., Blades, S., Coumbe, A., Panetta, J., Morris, C. J. and Blake, D. R. (1996). *Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis*. **Gut** 39(3): 407-15.
- Mokbel, M., Carbonnel, F., Beaugerie, L., Gendre, J. P. and Cosnes, J. (1998). *[Effect of smoking on the long-term course of ulcerative colitis]*. **Gastroenterol Clin Biol** 22(11): 858-62.
- Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H. W. and Kaplan, G. G. (2012). *Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review*. **Gastroenterology** 142(1): 46-54 e42; quiz e30.
- Monteleone, I., MacDonald, T. T., Pallone, F. and Monteleone, G. (2012). *The aryl hydrocarbon receptor in inflammatory bowel disease: linking the environment to disease pathogenesis*. **Curr Opin Gastroenterol** 28(4): 310-3.
- Monteleone, I., Rizzo, A., Sarra, M., Sica, G., Sileri, P., Biancone, L., MacDonald, T. T., Pallone, F. and Monteleone, G. (2011). *Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract*. **Gastroenterology** 141(1): 237-48, 248 e1.

- Moody, D. B., Young, D. C., Cheng, T. Y., Rosat, J. P., Roura-Mir, C., O'Connor, P. B., Zajonc, D. M., Walz, A., Miller, M. J., Levery, S. B., Wilson, I. A., Costello, C. E. and Brenner, M. B. (2004). *T cell activation by lipopeptide antigens*. **Science** 303(5657): 527-31.
- Motley, R. J., Rhodes, J., Ford, G. A., Wilkinson, S. P., Chesner, I. M., Asquith, P., Hellier, M. D. and Mayberry, J. F. (1987). *Time relationships between cessation of smoking and onset of ulcerative colitis*. **Digestion** 37(2): 125-7.
- Motley, R. J., Rhodes, J., Kay, S. and Morris, T. J. (1988). *Late presentation of ulcerative colitis in ex-smokers*. **Int J Colorectal Dis** 3(3): 171-5.
- Moum, B., Ekbo, A., Vatn, M. H., Aadland, E., Sauar, J., Lygren, I., Schulz, T., Stray, N. and Fausa, O. (1997). *Clinical course during the 1st year after diagnosis in ulcerative colitis and Crohn's disease. Results of a large, prospective population-based study in southeastern Norway, 1990-93*. **Scand J Gastroenterol** 32(10): 1005-12.
- Muto, H. and Takizawa, Y. (1989). *Dioxins in cigarette smoke*. **Arch Environ Health** 44(3): 171-4.

N

- Nagarajan, N. A. and Kronenberg, M. (2007). *Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide*. **J Immunol** 178(5): 2706-13.
- Naito, Y., Takagi, T. and Yoshikawa, T. (2007). *Molecular fingerprints of neutrophil-dependent oxidative stress in inflammatory bowel disease*. **J Gastroenterol** 42(10): 787-98.
- Nakai, Y., Iwabuchi, K., Fujii, S., Ishimori, N., Dashtsoodol, N., Watano, K., Mishima, T., Iwabuchi, C., Tanaka, S., Bezbradica, J. S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Miyake, S., Yamamura, T., Kitabatake, A., Joyce, S., Van Kaer, L. and Onoe, K. (2004). *Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice*. **Blood** 104(7): 2051-9.
- Nakamura, Y. and Labarthe, D. R. (1994). *A case-control study of ulcerative colitis with relation to smoking habits and alcohol consumption in Japan*. **Am J Epidemiol** 140(10): 902-11.
- Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Presky, D. H., Waegell, W. and Strober, W. (1996). *Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance*. **J Exp Med** 183(6): 2605-16.
- Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stuber, E. and Strober, W. (1995). *Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice*. **J Exp Med** 182(5): 1281-90.
- Nicaise, P., Gleizes, A., Forestier, F., Quero, A. M. and Labarre, C. (1993). *Influence of intestinal bacterial flora on cytokine (IL-1, IL-6 and TNF-alpha) production by mouse peritoneal macrophages*. **Eur Cytokine Netw** 4(2): 133-8.
- Nicaise, P., Gleizes, A., Sandre, C., Kergot, R., Lebec, H., Forestier, F. and Labarre, C. (1999). *The intestinal microflora regulates cytokine production positively in spleen-derived macrophages but negatively in bone marrow-derived macrophages*. **Eur Cytokine Netw** 10(3): 365-72.
- Niess, J. H. (2008). *Role of mucosal dendritic cells in inflammatory bowel disease*. **World J Gastroenterol** 14(33): 5138-48.
- Nieuwenhuis, E. E., Matsumoto, T., Lindenbergh, D., Willemsen, R., Kaser, A., Simons-Oosterhuis, Y., Brugman, S., Yamaguchi, K., Ishikawa, H., Aiba, Y., Koga, Y., Samsom, J. N., Oshima, K., Kikuchi, M., Escher, J. C., Hattori, M., Onderdonk, A. B. and Blumberg, R. S. (2009). *Cd1d-dependent regulation of bacterial colonization in the intestine of mice*. **J Clin Invest** 119(5): 1241-50.
- Nizri, E., Irony-Tur-Sinai, M., Lory, O., Orr-Urtreger, A., Lavi, E. and Brenner, T. (2009). *Activation of the cholinergic anti-inflammatory system by nicotine attenuates neuroinflammation via suppression of Th1 and Th17 responses*. **J Immunol** 183(10): 6681-8.
- Nowak, M., Kopp, F., Roelofs-Haarhuis, K., Wu, X. and Gleichmann, E. (2006). *Oral nickel tolerance: Fas ligand-expressing invariant NK T cells promote tolerance induction by eliciting apoptotic death of antigen-carrying, effete B cells*. **J Immunol** 176(8): 4581-9.

O

- O'Keeffe, J., Doherty, D. G., Kenna, T., Sheahan, K., O'Donoghue, D. P., Hyland, J. M. and O'Farrelly, C. (2004). *Diverse populations of T cells with NK cell receptors accumulate in the human intestine in health and in colorectal cancer*. **Eur J Immunol** 34(8): 2110-9.

- Odes, H. S., Fich, A., Reif, S., Halak, A., Lavy, A., Keter, D., Eliakim, R., Paz, J., Broide, E., Niv, Y., Ron, Y., Villa, Y., Arber, N. and Gilat, T. (2001). *Effects of current cigarette smoking on clinical course of Crohn's disease and ulcerative colitis*. **Dig Dis Sci** 46(8): 1717-21.
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J. N., Siebert, R., Baron, R. M., Kasper, D. L. and Blumberg, R. S. (2012). *Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function*. **Science** 336(6080): 489-93.
- Orholm, M., Binder, V., Sorensen, T. I., Rasmussen, L. P. and Kyvik, K. O. (2000). *Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study*. **Scand J Gastroenterol** 35(10): 1075-81.

P

- Pabst, O., Herbrand, H., Worbs, T., Friedrichsen, M., Yan, S., Hoffmann, M. W., Korner, H., Bernhardt, G., Pabst, R. and Forster, R. (2005). *Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes*. **Eur J Immunol** 35(1): 98-107.
- Page, M. J., Poritz, L. S., Tilberg, A. F., Zhang, W. J., Chorney, M. J. and Koltun, W. A. (2000). *Cd1d-restricted cellular lysis by peripheral blood lymphocytes: relevance to the inflammatory bowel diseases*. **J Surg Res** 92(2): 214-21.
- Paget, C., Mallevaey, T., Speak, A. O., Torres, D., Fontaine, J., Sheehan, K. C., Capron, M., Ryffel, B., Faveeuw, C., Leite de Moraes, M., Platt, F. and Trottein, F. (2007). *Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids*. **Immunity** 27(4): 597-609.
- Panja, A., Blumberg, R. S., Balk, S. P. and Mayer, L. (1993). *CD1d is involved in T cell-intestinal epithelial cell interactions*. **J Exp Med** 178(3): 1115-9.
- Parekh, V. V., Lalani, S. and Van Kaer, L. (2007). *The in vivo response of invariant natural killer T cells to glycolipid antigens*. **Int Rev Immunol** 26(1-2): 31-48.
- Parekh, V. V., Wilson, M. T., Olivares-Villagomez, D., Singh, A. K., Wu, L., Wang, C. R., Joyce, S. and Van Kaer, L. (2005). *Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice*. **J Clin Invest** 115(9): 2572-83.
- Park, S. H., Benlagha, K., Lee, D., Balish, E. and Bendelac, A. (2000). *Unaltered phenotype, tissue distribution and function of Valpha14(+) NKT cells in germ-free mice*. **Eur J Immunol** 30(2): 620-5.
- Parkes, M. (2012). *The genetics universe of Crohn's disease and ulcerative colitis*. **Dig Dis** 30 Suppl 1: 78-81.
- Parkes, M. and Jewell, D. (2001). *Ulcerative colitis and Crohns disease: molecular genetics and clinical implications*. **Expert Rev Mol Med** 2001: 1-18.
- Parsi, M. A., Achkar, J. P., Richardson, S., Katz, J., Hammel, J. P., Lashner, B. A. and Brzezinski, A. (2002). *Predictors of response to infliximab in patients with Crohn's disease*. **Gastroenterology** 123(3): 707-13.
- Pellicci, D. G., Hammond, K. J., Coquet, J., Kyparissoudis, K., Brooks, A. G., Kedzierska, K., Keating, R., Turner, S., Berzins, S., Smyth, M. J. and Godfrey, D. I. (2005). *DX5/CD49b-positive T cells are not synonymous with CD1d-dependent NKT cells*. **J Immunol** 175(7): 4416-25.
- Pellicci, D. G., Hammond, K. J., Uldrich, A. P., Baxter, A. G., Smyth, M. J. and Godfrey, D. I. (2002). *A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage*. **J Exp Med** 195(7): 835-44.
- Pellicci, D. G., Uldrich, A. P., Kyparissoudis, K., Crowe, N. Y., Brooks, A. G., Hammond, K. J., Sidobre, S., Kronenberg, M., Smyth, M. J. and Godfrey, D. I. (2003). *Intrathymic NKT cell development is blocked by the presence of alpha-galactosylceramide*. **Eur J Immunol** 33(7): 1816-23.
- Perera, D. R., Janeway, C. M., Feld, A., Ylvisaker, J. T., Belic, L. and Jick, H. (1984). *Smoking and ulcerative colitis*. **Br Med J (Clin Res Ed)** 288(6429): 1533.
- Perera, L., Shao, L., Patel, A., Evans, K., Meresse, B., Blumberg, R., Geraghty, D., Groh, V., Spies, T., Jabri, B. and Mayer, L. (2007). *Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells*. **Inflamm Bowel Dis** 13(3): 298-307.
- Persson, P. G., Ahlbom, A. and Hellers, G. (1990). *Inflammatory bowel disease and tobacco smoke--a case-control study*. **Gut** 31(12): 1377-81.

- Phillips, B., Marshall, M. E., Brown, S. and Thompson, J. S. (1985). *Effect of smoking on human natural killer cell activity*. **Cancer** 56(12): 2789-92.
- Porubsky, S., Speak, A. O., Luckow, B., Cerundolo, V., Platt, F. M. and Grone, H. J. (2007). *Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104(14): 5977-82.
- Pullan, R. D. (1996). *Colonic mucus, smoking and ulcerative colitis*. **Ann R Coll Surg Engl** 78(2): 85-91.
- Pullan, R. D., Rhodes, J., Ganesh, S., Mani, V., Morris, J. S., Williams, G. T., Newcombe, R. G., Russell, M. A., Feyerabend, C., Thomas, G. A. and et al. (1994). *Transdermal nicotine for active ulcerative colitis*. **N Engl J Med** 330(12): 811-5.

R

- Ranson, T., Bregenholt, S., Lehuen, A., Gaillot, O., Leite-de-Moraes, M. C., Herbelin, A., Berche, P. and Di Santo, J. P. (2005). *Invariant V alpha 14+ NKT cells participate in the early response to enteric *Listeria monocytogenes* infection*. **J Immunol** 175(2): 1137-44.
- Reynolds, H. Y. (1987). *Bronchoalveolar lavage*. **Am Rev Respir Dis** 135(1): 250-63.
- Robbins, C. S., Franco, F., Mouded, M., Cernadas, M. and Shapiro, S. D. (2008). *Cigarette smoke exposure impairs dendritic cell maturation and T cell proliferation in thoracic lymph nodes of mice*. **J Immunol** 180(10): 6623-8.
- Roelofs-Haarhuis, K., Wu, X. and Gleichmann, E. (2004). *Oral tolerance to nickel requires CD4+ invariant NKT cells for the infectious spread of tolerance and the induction of specific regulatory T cells*. **J Immunol** 173(2): 1043-50.
- Ronet, C., Darche, S., Leite de Moraes, M., Miyake, S., Yamamura, T., Louis, J. A., Kasper, L. H. and Buzoni-Gatel, D. (2005). *NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii**. **J Immunol** 175(2): 899-908.
- Rudra, T., Motley, R. and Rhodes, J. (1989). *Does smoking improve colitis?* **Scand J Gastroenterol Suppl** 170: 61-3; discussion 66-8.
- Russel, M. G., Nieman, F. H., Bergers, J. M. and Stockbrugger, R. W. (1996). *Cigarette smoking and quality of life in patients with inflammatory bowel disease*. **South Limburg IBD Study Group**. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 8(11): 1075-81.
- Russel, M. G., Volovics, A., Schoon, E. J., van Wijlick, E. H., Logan, R. F., Shivananda, S. and Stockbrugger, R. W. (1998). *Inflammatory bowel disease: is there any relation between smoking status and disease presentation?* **European Collaborative IBD Study Group**. **Inflamm Bowel Dis** 4(3): 182-6.
- Ryan, W. R., Allan, R. N., Yamamoto, T. and Keighley, M. R. (2004). *Crohn's disease patients who quit smoking have a reduced risk of reoperation for recurrence*. **Am J Surg** 187(2): 219-25.

S

- Salim, S. Y. and Soderholm, J. D. (2011). *Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases*. **Inflamm Bowel Dis** 17(1): 362-81.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M. C., Roberfroid, M. and Rowland, I. (1998). *Functional food science and gastrointestinal physiology and function*. **Br J Nutr** 80 Suppl 1: S147-71.
- Samsonov, D., Trop, S., Alper, R., Diment, J. and Ilan, Y. (2000). *Enhancement of immune tolerance via induction of NK1.1 positive liver-associated-lymphocytes under immunosuppressive conditions*. **J Hepatol** 32(5): 812-20.
- Samuelsson, S. M., Ekbohm, A., Zack, M., Helmick, C. G. and Adami, H. O. (1991). *Risk factors for extensive ulcerative colitis and ulcerative proctitis: a population based case-control study*. **Gut** 32(12): 1526-30.
- Sandborn, W. J., Tremaine, W. J., Leighton, J. A., Lawson, G. M., Zins, B. J., Compton, R. F., Mays, D. C., Lipsky, J. J., Batts, K. P., Offord, K. P., Hurt, R. D. and Green, J. (1997). *Nicotine tartrate liquid enemas for mildly to moderately active left-sided ulcerative colitis unresponsive to first-line therapy: a pilot study*. **Aliment Pharmacol Ther** 11(4): 663-71.
- Sandborn, W. J., Tremaine, W. J., Offord, K. P., Lawson, G. M., Petersen, B. T., Batts, K. P., Croghan, I. T., Dale, L. C., Schroeder, D. R. and Hurt, R. D. (1997). *Transdermal nicotine for mildly to*

- moderately active ulcerative colitis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Ann Intern Med* 126(5): 364-71.
- Sano, H., Nakazawa, T., Ando, T., Hayashi, K., Naitoh, I., Okumura, F., Miyabe, K., Yoshida, M., Takahashi, S., Ohara, H. and Joh, T. (2011). *Clinical characteristics of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. J Hepatobiliary Pancreat Sci* 18(2): 154-61.
- Sartor, R. B. (1995). *Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. Gastroenterol Clin North Am* 24(3): 475-507.
- Sartor, R. B. (2004). *Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. Gastroenterology* 126(6): 1620-33.
- Saubermann, L. J., Beck, P., De Jong, Y. P., Pitman, R. S., Ryan, M. S., Kim, H. S., Exley, M., Snapper, S., Balk, S. P., Hagen, S. J., Kanauchi, O., Motoki, K., Sakai, T., Terhorst, C., Koezuka, Y., Podolsky, D. K. and Blumberg, R. S. (2000). *Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. Gastroenterology* 119(1): 119-28.
- Schmidt, C., Giese, T., Ludwig, B., Mueller-Molaian, I., Marth, T., Zeuzem, S., Meuer, S. C. and Stallmach, A. (2005). *Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis* 11(1): 16-23.
- Schofield, L., McConville, M. J., Hansen, D., Campbell, A. S., Fraser-Reid, B., Grusby, M. J. and Tachado, S. D. (1999). *CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. Science* 283(5399): 225-9.
- Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R. and Dore, J. (2003). *Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. Gut* 52(2): 237-42.
- Sher, M. E., Bank, S., Greenberg, R., Sardinha, T. C., Weissman, S., Bailey, B., Gilliland, R. and Wexner, S. D. (1999). *The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis* 5(2): 73-8.
- Shibolet, O., Kalish, Y., Klein, A., Alper, R., Zolotarov, L., Thalenfeld, B., Engelhardt, D., Rabbani, E. and Ilan, Y. (2004). *Adoptive transfer of ex vivo immune-programmed NKT lymphocytes alleviates immune-mediated colitis. J Leukoc Biol* 75(1): 76-86.
- Simmonds, N. J., Allen, R. E., Stevens, T. R., Van Someren, R. N., Blake, D. R. and Rampton, D. S. (1992). *Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. Gastroenterology* 103(1): 186-96.
- Simoni, Y., Diana, J., Ghazarian, L., Beaudoin, L. and Lehuen, A. (2012). *Therapeutic manipulation of NKT cells in autoimmunity: Are we close to reality? Clinical and Experimental Immunology* in press.
- Singh, N. P., Singh, U. P., Singh, B., Price, R. L., Nagarkatti, M. and Nagarkatti, P. S. (2011). *Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of FoxP3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis. PLoS One* 6(8): e23522.
- Skold, C. M., Lundahl, J., Hallden, G., Hallgren, M. and Eklund, A. (1996). *Chronic smoke exposure alters the phenotype pattern and the metabolic response in human alveolar macrophages. Clin Exp Immunol* 106(1): 108-13.
- Smith, M. R., Kinmonth, A. L., Luben, R. N., Bingham, S., Day, N. E., Wareham, N. J., Welch, A. and Khaw, K. T. (2003). *Smoking status and differential white cell count in men and women in the EPIC-Norfolk population. Atherosclerosis* 169(2): 331-7.
- Snoek, S. A., Verstege, M. I., van der Zanden, E. P., Deeks, N., Bulmer, D. C., Skynner, M., Lee, K., Te Velde, A. A., Boeckxstaens, G. E. and de Jonge, W. J. (2010). *Selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonists worsen disease in experimental colitis. Br J Pharmacol* 160(2): 322-33.
- Sokol, H., Lay, C., Seksik, P. and Tannock, G. W. (2008). *Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: what has it revealed? Inflamm Bowel Dis* 14(6): 858-67.
- Somerville, K. W., Logan, R. F., Edmond, M. and Langman, M. J. (1984). *Smoking and Crohn's disease. Br Med J (Clin Res Ed)* 289(6450): 954-6.
- Somnay-Wadgaonkar, K., Nusrat, A., Kim, H. S., Canchis, W. P., Balk, S. P., Colgan, S. P. and Blumberg, R. S. (1999). *Immunolocalization of CD1d in human intestinal epithelial cells and identification of a beta2-microglobulin-associated form. Int Immunol* 11(3): 383-92.
- Sopori, M. (2002). *Effects of cigarette smoke on the immune system. Nat Rev Immunol* 2(5): 372-7.

- Sopori, M. L., Kozak, W., Savage, S. M., Geng, Y., Soszynski, D., Kluger, M. J., Perryman, E. K. and Snow, G. E. (1998). *Effect of nicotine on the immune system: possible regulation of immune responses by central and peripheral mechanisms*. **Psychoneuroendocrinology** 23(2): 189-204.
- Spahn, T. W. and Kucharzik, T. (2004). *Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs*. **Gut** 53(3): 456-65.
- Speak, A. O., Salio, M., Neville, D. C., Fontaine, J., Priestman, D. A., Platt, N., Heare, T., Butters, T. D., Dwek, R. A., Trottein, F., Exley, M. A., Cerundolo, V. and Platt, F. M. (2007). *Implications for invariant natural killer T cell ligands due to the restricted presence of isoglobotrihexosylceramide in mammals*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104(14): 5971-6.
- Spencer, D. M., Veldman, G. M., Banerjee, S., Willis, J. and Levine, A. D. (2002). *Distinct inflammatory mechanisms mediate early versus late colitis in mice*. **Gastroenterology** 122(1): 94-105.
- Sriram, V., Du, W., Gervay-Hague, J. and Brutkiewicz, R. R. (2005). *Cell wall glycosphingolipids of Sphingomonas paucimobilis are CD1d-specific ligands for NKT cells*. **Eur J Immunol** 35(6): 1692-701.
- Stampfli, M. R. and Anderson, G. P. (2009). *How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer*. **Nat Rev Immunol** 9(5): 377-84.
- Stetson, D. B., Mohrs, M., Reinhardt, R. L., Baron, J. L., Wang, Z. E., Gapin, L., Kronenberg, M. and Locksley, R. M. (2003). *Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function*. **J Exp Med** 198(7): 1069-76.
- Strauch, U. G., Obermeier, F., Grunwald, N., Gurster, S., Dunger, N., Schultz, M., Griesse, D. P., Mahler, M., Scholmerich, J. and Rath, H. C. (2005). *Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis*. **Gut** 54(11): 1546-52.
- Strober, W. and Fuss, I. J. (2011). *Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases*. **Gastroenterology** 140(6): 1756-67.
- Strober, W., Fuss, I. J. and Blumberg, R. S. (2002). *The immunology of mucosal models of inflammation*. **Annu Rev Immunol** 20: 495-549.
- Suematsu, M., Suzuki, M., Kitahora, T., Miura, S., Suzuki, K., Hibi, T., Watanabe, M., Nagata, H., Asakura, H. and Tsuchiya, M. (1987). *Increased respiratory burst of leukocytes in inflammatory bowel diseases—the analysis of free radical generation by using chemiluminescence probe*. **J Clin Lab Immunol** 24(3): 125-8.
- Suenaert, P., Bulteel, V., Lemmens, L., Noman, M., Geypens, B., Van Assche, G., Geboes, K., Ceuppens, J. L. and Rutgeerts, P. (2002). *Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease*. **Am J Gastroenterol** 97(8): 2000-4.
- Sugawara, K., Olson, T. S., Moskaluk, C. A., Stevens, B. K., Hoang, S., Kozaiwa, K., Cominelli, F., Ley, K. F. and McDuffie, M. (2005). *Linkage to peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in SAMP1/YitFc mice and in human Crohn's disease*. **Gastroenterology** 128(2): 351-60.
- Sullivan, B. A., Nagarajan, N. A., Wingender, G., Wang, J., Scott, I., Tsuji, M., Franck, R. W., Porcelli, S. A., Zajonc, D. M. and Kronenberg, M. (2010). *Mechanisms for glycolipid antigen-driven cytokine polarization by Valpha14i NKT cells*. **J Immunol** 184(1): 141-53.
- Sun, Y. P., Wang, H. H., He, Q. and Cho, C. H. (2007). *Effect of passive cigarette smoking on colonic alpha7-nicotinic acetylcholine receptors in TNBS-induced colitis in rats*. **Digestion** 76(3-4): 181-7.
- Sutherland, L. R., Ramcharan, S., Bryant, H. and Fick, G. (1990). *Effect of cigarette smoking on recurrence of Crohn's disease*. **Gastroenterology** 98(5 Pt 1): 1123-8.
- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M. and Lochs, H. (2002). *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. **Gastroenterology** 122(1): 44-54.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Lochs, H. and Hale, L. P. (2005). *Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice*. **World J Gastroenterol** 11(8): 1131-40.
- Sykes, A. P., Brampton, C., Klee, S., Chander, C. L., Whelan, C. and Parsons, M. E. (2000). *An investigation into the effect and mechanisms of action of nicotine in inflammatory bowel disease*. **Inflamm Res** 49(7): 311-9.

T

- Takahashi, M., Nakamura, K., Honda, K., Kitamura, Y., Mizutani, T., Araki, Y., Kabemura, T., Chijiwa, Y., Harada, N. and Nawata, H. (2006). *An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis*. **Dig Dis Sci** 51(4): 677-86.
- Takahashi, T., Chiba, S., Nieda, M., Azuma, T., Ishihara, S., Shibata, Y., Juji, T. and Hirai, H. (2002). *Cutting edge: analysis of human V alpha 24+CD8+ NK T cells activated by alpha-galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells*. **J Immunol** 168(7): 3140-4.
- Takamura, T., Harama, D., Matsuoka, S., Shimokawa, N., Nakamura, Y., Okumura, K., Ogawa, H., Kitamura, M. and Nakao, A. (2010). *Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway may ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in mice*. **Immunol Cell Biol** 88(6): 685-9.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Atsuta, M., Hong, S., Van Kaer, L., Kobayashi, K., Ito, M., Yagita, H. and Okumura, K. (2000). *Relative contribution of NK and NKT cells to the anti-metastatic activities of IL-12*. **Int Immunol** 12(6): 909-14.
- Takeuchi, M., Nagai, S. and Izumi, T. (1988). *Effect of smoking on natural killer cell activity in the lung*. **Chest** 94(4): 688-93.
- Takeuchi, M., Nagai, S., Nakajima, A., Shinya, M., Tsukano, C., Asada, H., Yoshikawa, K., Yoshimura, M. and Izumi, T. (2001). *Inhibition of lung natural killer cell activity by smoking: the role of alveolar macrophages*. **Respiration** 68(3): 262-7.
- Tamboli, C. P., Neut, C., Desreumaux, P. and Colombel, J. F. (2004). *Dysbiosis as a prerequisite for IBD*. **Gut** 53(7): 1057.
- Tanigawa, T., Araki, S., Nakata, A., Kitamura, F., Yasumoto, M., Sakurai, S. and Kiuchi, T. (1998). *Increase in memory (CD4+CD29+ and CD4+CD45RO+) T and naive (CD4+CD45RA+) T-cell subpopulations in smokers*. **Arch Environ Health** 53(6): 378-83.
- Targan, S. R. and Karp, L. C. (2005). *Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis*. **Immunol Rev** 206: 296-305.
- te Velde, A. A., Verstege, M. I. and Hommes, D. W. (2006). *Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis*. **Inflamm Bowel Dis** 12(10): 995-9.
- Tell, G. S., Grimm, R. H., Jr., Vellar, O. D. and Theodorsen, L. (1985). *The relationship of white cell count, platelet count, and hematocrit to cigarette smoking in adolescents: the Oslo Youth Study*. **Circulation** 72(5): 971-4.
- Terabe, M. and Berzofsky, J. A. (2008). *The role of NKT cells in tumor immunity*. **Adv Cancer Res** 101: 277-348.
- Thomas, G. A., Rhodes, J., Mani, V., Williams, G. T., Newcombe, R. G., Russell, M. A. and Feyerabend, C. (1995). *Transdermal nicotine as maintenance therapy for ulcerative colitis*. **N Engl J Med** 332(15): 988-92.
- Thomas, G. A., Rhodes, J., Rangunath, K., Mani, V., Williams, G. T., Newcombe, R. G., Russell, M. A. and Feyerabend, C. (1996). *Transdermal nicotine compared with oral prednisolone therapy for active ulcerative colitis*. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 8(8): 769-76.
- Thompson-Chagoyan, O. C., Maldonado, J. and Gil, A. (2005). *Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response*. **Clin Nutr** 24(3): 339-52.
- Thompson, A. I. and Lees, C. W. (2011). *Genetics of ulcerative colitis*. **Inflamm Bowel Dis** 17(3): 831-48.
- Timmer, A., Sutherland, L. R. and Martin, F. (1998). *Oral contraceptive use and smoking are risk factors for relapse in Crohn's disease. The Canadian Mesalamine for Remission of Crohn's Disease Study Group*. **Gastroenterology** 114(6): 1143-50.
- Tobin, M. V., Logan, R. F., Langman, M. J., McConnell, R. B. and Gilmore, I. T. (1987). *Cigarette smoking and inflammatory bowel disease*. **Gastroenterology** 93(2): 316-21.
- Tollerud, D. J., Clark, J. W., Brown, L. M., Neuland, C. Y., Mann, D. L., Pankiw-Trost, L. K., Blattner, W. A. and Hoover, R. N. (1989). *The effects of cigarette smoking on T cell subsets. A population-based survey of healthy caucasians*. **Am Rev Respir Dis** 139(6): 1446-51.
- Tomoda, K., Kubo, K., Asahara, T., Andoh, A., Nomoto, K., Nishii, Y., Yamamoto, Y., Yoshikawa, M. and Kimura, H. (2011). *Cigarette smoke decreases organic acids levels and population of bifidobacterium in the caecum of rats*. **J Toxicol Sci** 36(3): 261-6.
- Traue, H. C. and Kosarz, P. (1999). *Everyday stress and Crohn's disease activity: a time series analysis of 20 single cases*. **Int J Behav Med** 6(2): 101-19.

- Treiner, E., Duban, L., Bahram, S., Radosavljevic, M., Wanner, V., Tilloy, F., Affaticati, P., Gilfillan, S. and Lantz, O. (2003). *Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1*. **Nature** 422(6928): 164-9.
- Treiner, E., Duban, L., Moura, I. C., Hansen, T., Gilfillan, S. and Lantz, O. (2005). *Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells: an evolutionarily conserved T cell subset*. **Microbes Infect** 7(3): 552-9.
- Trop, S. and Ilan, Y. (2002). *NK 1.1+ T cell: a two-faced lymphocyte in immune modulation of the IL-4/IFN-gamma paradigm*. **J Clin Immunol** 22(5): 270-80.
- Trop, S., Nagler, A. and Ilan, Y. (2003). *Role of NK1.1+ and AsGm-1+ cells in oral immunoregulation of experimental colitis*. **Inflamm Bowel Dis** 9(2): 75-86.
- Trop, S., Samsonov, D., Gotsman, I., Alper, R., Diment, J. and Ilan, Y. (1999). *Liver-associated lymphocytes expressing NK1.1 are essential for oral immune tolerance induction in a murine model*. **Hepatology** 29(3): 746-55.
- Tupin, E., Kinjo, Y. and Kronenberg, M. (2007). *The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms*. **Nat Rev Microbiol** 5(6): 405-17.
- Turner, J. R. (2009). *Intestinal mucosal barrier function in health and disease*. **Nat Rev Immunol** 9(11): 799-809.
- Turner, S. J., Doherty, P. C., McCluskey, J. and Rossjohn, J. (2006). *Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity*. **Nat Rev Immunol** 6(12): 883-94.
- Tysk, C. and Jarnerot, G. (1992). *Has smoking changed the epidemiology of ulcerative colitis?* **Scand J Gastroenterol** 27(6): 508-12.

U

- Ueno, Y., Tanaka, S., Sumii, M., Miyake, S., Tazuma, S., Taniguchi, M., Yamamura, T. and Chayama, K. (2005). *Single dose of OCH improves mucosal T helper type 1/T helper type 2 cytokine balance and prevents experimental colitis in the presence of valpha14 natural killer T cells in mice*. **Inflamm Bowel Dis** 11(1): 35-41.
- Uldrich, A. P., Patel, O., Cameron, G., Pellicci, D. G., Day, E. B., Sullivan, L. C., Kyparissoudis, K., Kjer-Nielsen, L., Vivian, J. P., Cao, B., Brooks, A. G., Williams, S. J., Illarionov, P., Besra, G. S., Turner, S. J., Porcelli, S. A., McCluskey, J., Smyth, M. J., Rossjohn, J. and Godfrey, D. I. (2011). *A semi-invariant Valpha10+ T cell antigen receptor defines a population of natural killer T cells with distinct glycolipid antigen-recognition properties*. **Nat Immunol** 12(7): 616-23.
- Umesaki, Y. and Setoyama, H. (2000). *Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model*. **Microbes Infect** 2(11): 1343-51.
- Utech, M., Ivanov, A. I., Samarin, S. N., Bruewer, M., Turner, J. R., Mrsny, R. J., Parkos, C. A. and Nusrat, A. (2005). *Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane*. **Mol Biol Cell** 16(10): 5040-52.

V

- van de Wal, Y., Corazza, N., Allez, M., Mayer, L. F., Iijima, H., Ryan, M., Cornwall, S., Kaiserlian, D., Hershberg, R., Koezuka, Y., Colgan, S. P. and Blumberg, R. S. (2003). *Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells*. **Gastroenterology** 124(5): 1420-31.
- van der Vliet, H. J., von Blomberg, B. M., Nishi, N., Reijm, M., Voskuyl, A. E., van Bodegraven, A. A., Polman, C. H., Rustemeyer, T., Lips, P., van den Eertwegh, A. J., Giaccone, G., Scheper, R. J. and Pinedo, H. M. (2001). *Circulating V(alpha24+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage*. **Clin Immunol** 100(2): 144-8.
- van Dieren, J. M., van der Woude, C. J., Kuipers, E. J., Escher, J. C., Samsom, J. N., Blumberg, R. S. and Nieuwenhuis, E. E. (2007). *Roles of CD1d-restricted NKT cells in the intestine*. **Inflamm Bowel Dis** 13(9): 1146-52.
- Van Dijk, J. P., Madretsma, G. S., Keuskamp, Z. J. and Zijlstra, F. J. (1995). *Nicotine inhibits cytokine synthesis by mouse colonic mucosa*. **Eur J Pharmacol** 278(1): R11-2.
- van Eeden, S. F. and Hogg, J. C. (2000). *The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking*. **Eur Respir J** 15(5): 915-21.

- Van Kaer, L., Parekh, V. V. and Wu, L. (2011). *Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity*. **Cell Tissue Res** 343(1): 43-55.
- Van Kruiningen, H. J., Joossens, M., Vermeire, S., Joossens, S., Debeugny, S., Gower-Rousseau, C., Cortot, A., Colombel, J. F., Rutgeerts, P. and Vlietinck, R. (2005). *Environmental factors in familial Crohn's disease in Belgium*. **Inflamm Bowel Dis** 11(4): 360-5.
- van Zyl-Smit, R. N., Brunet, L., Pai, M. and Yew, W. W. (2010). *The convergence of the global smoking, COPD, tuberculosis, HIV, and respiratory infection epidemics*. **Infect Dis Clin North Am** 24(3): 693-703.
- Varthaman, A., Khallou-Laschet, J., Clement, M., Fornasa, G., Kim, H. J., Gaston, A. T., Dussiot, M., Caligiuri, G., Herbelin, A., Kaveri, S., Cantor, H. and Nicoletti, A. (2010). *Control of T cell reactivation by regulatory Qa-1-restricted CD8+ T cells*. **J Immunol** 184(12): 6585-91.
- Vassallo, R., Tamada, K., Lau, J. S., Kroening, P. R. and Chen, L. (2005). *Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming*. **J Immunol** 175(4): 2684-91.
- Venkataswamy, M. M. and Porcelli, S. A. (2010). *Lipid and glycolipid antigens of CD1d-restricted natural killer T cells*. **Semin Immunol** 22(2): 68-78.
- Verschuere, S., Allais, L., Bracke, K. R., Lippens, S., De Smet, R., Vandenabeele, P., Brusselle, G. G. and Cuvelier, C. A. (2012). *Cigarette smoke and the terminal ileum: increased autophagy in murine follicle-associated epithelium and Peyer's patches*. **Histochem Cell Biol** 137(3): 293-301.
- Verschuere, S., Bracke, K. R., Demoor, T., Plantinga, M., Verbrugge, P., Ferdinande, L., Lambrecht, B. N., Brusselle, G. G. and Cuvelier, C. A. (2011). *Cigarette smoking alters epithelial apoptosis and immune composition in murine GALT*. **Lab Invest** 91(7): 1056-67.
- Verschuere, S., De Smet, R., Allais, L. and Cuvelier, C. A. (2012). *The effect of smoking on intestinal inflammation: what can be learned from animal models?* **J Crohns Colitis** 6(1): 1-12.
- Vessey, M., Jewell, D., Smith, A., Yeates, D. and McPherson, K. (1986). *Chronic inflammatory bowel disease, cigarette smoking, and use of oral contraceptives: findings in a large cohort study of women of childbearing age*. **Br Med J (Clin Res Ed)** 292(6528): 1101-3.

W

- Wallace, K. L., Marshall, M. A., Ramos, S. I., Lannigan, J. A., Field, J. J., Strieter, R. M. and Linden, J. (2009). *NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN-gamma and CXCR3 chemokines*. **Blood** 114(3): 667-76.
- Wang, F., Graham, W. V., Wang, Y., Witkowski, E. D., Schwarz, B. T. and Turner, J. R. (2005). *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression*. **Am J Pathol** 166(2): 409-19.
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J. H., Wang, H., Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C. J. and Tracey, K. J. (2003). *Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation*. **Nature** 421(6921): 384-8.
- Wang, H., Zhao, J. X., Hu, N., Ren, J., Du, M. and Zhu, M. J. (2012). *Side-stream smoking reduces intestinal inflammation and increases expression of tight junction proteins*. **World J Gastroenterol** 18(18): 2180-7.
- Watson, J. P. and Lewis, R. A. (1995). *Ulcerative colitis responsive to smoking and to nicotine chewing gum in a patient with alpha 1 anti-trypsin deficiency*. **Respir Med** 89(9): 635-6.
- Wei, D. G., Lee, H., Park, S. H., Beaudoin, L., Teyton, L., Lehuen, A. and Bendelac, A. (2005). *Expansion and long-range differentiation of the NKT cell lineage in mice expressing CD1d exclusively on cortical thymocytes*. **J Exp Med** 202(2): 239-48.
- Westbrook, A. M., Szakmary, A. and Schiestl, R. H. (2010). *Mechanisms of intestinal inflammation and development of associated cancers: lessons learned from mouse models*. **Mutat Res** 705(1): 40-59.
- Wilson, M. T., Johansson, C., Olivares-Villagomez, D., Singh, A. K., Stanic, A. K., Wang, C. R., Joyce, S., Wick, M. J. and Van Kaer, L. (2003). *The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100(19): 10913-8.
- Wingender, G., Krebs, P., Beutler, B. and Kronenberg, M. (2010). *Antigen-specific cytotoxicity by invariant NKT cells in vivo is CD95/CD178-dependent and is correlated with antigenic potency*. **J Immunol** 185(5): 2721-9.

- Wingender, G. and Kronenberg, M. (2008). *Role of NKT cells in the digestive system. IV. The role of canonical natural killer T cells in mucosal immunity and inflammation.* **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 294(1): G1-8.
- Wingender, G., Stepniak, D., Krebs, P., Lin, L., McBride, S., Wei, B., Braun, J., Mazmanian, S. K. and Kronenberg, M. (2012). *Intestinal Microbes Affect Phenotypes and Functions of Invariant Natural Killer T Cells in Mice.* **Gastroenterology**.
- Wong, C. H., Jenne, C. N., Lee, W. Y., Leger, C. and Kubes, P. (2011). *Functional innervation of hepatic iNKT cells is immunosuppressive following stroke.* **Science** 334(6052): 101-5.
- Wu, L., Gabriel, C. L., Parekh, V. V. and Van Kaer, L. (2009). *Invariant natural killer T cells: innate-like T cells with potent immunomodulatory activities.* **Tissue Antigens** 73(6): 535-45.
- Wu, L. and Van Kaer, L. (2009). *Natural killer T cells and autoimmune disease.* **Curr Mol Med** 9(1): 4-14.
- Wu, L. and Van Kaer, L. (2011). *Natural killer T cells in health and disease.* **Front Biosci (Schol Ed)** 3: 236-51.

X-Y-Z

- Xavier, R. J. and Podolsky, D. K. (2007). *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease.* **Nature** 448(7152): 427-34.
- Yan, Y., Kolachala, V., Dalmasso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, S. V. and Merlin, D. (2009). *Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis.* **PLoS One** 4(6): e6073.
- Yasukawa, K., Tokuda, H., Tun, X., Utsumi, H. and Yamada, K. I. (2012). *The detrimental effect of nitric oxide on tissue is associated with inflammatory events in the vascular endothelium and neutrophils in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis.* **Free Radic Res.**
- Yu, Q. T., Saruta, M., Avanesyan, A., Fleshner, P. R., Banham, A. H. and Papadakis, K. A. (2007). *Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis.* **Inflamm Bowel Dis** 13(2): 191-9.
- Zeissig, S., Kaser, A., Dougan, S. K., Nieuwenhuis, E. E. and Blumberg, R. S. (2007). *Role of NKT cells in the digestive system. III. Role of NKT cells in intestinal immunity.* **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 293(6): G1101-5.
- Zhou, D., Mattner, J., Cantu, C., 3rd, Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y., Hudspeth, K., Wu, Y. P., Yamashita, T., Teneberg, S., Wang, D., Proia, R. L., Lavery, S. B., Savage, P. B., Teyton, L. and Bendelac, A. (2004). *Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells.* **Science** 306(5702): 1786-9.
- Zigmond, E., Preston, S., Pappo, O., Lalazar, G., Margalit, M., Shalev, Z., Zolotarov, L., Friedman, D., Alper, R. and Ilan, Y. (2007). *Beta-glucosylceramide: a novel method for enhancement of natural killer T lymphocyte plasticity in murine models of immune-mediated disorders.* **Gut** 56(1): 82-9.

Abréviations

CARD15 : *Caspase-Activating Recruitment Domain 15*
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CO : monoxyde de carbone
CPA : cellules présentatrices d'antigènes
COX2 : cyclooxygénase-2
DC : cellules dendritiques
DNBS : 2,4- dinitrobenzène sulfonique
DSS : dextran sulfate sodium
FAE : *follicle associated epithelium*
GALT : *Gut-associated lymphoid tissues*
GFP : *Green Fluorescent Protein*
GM-CSF : *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
GNPAT : glyceronephosphate O-acyltransferase
IEL : *intraepithelial lymphocyte*
IFN- γ : Interféron γ
iGb3 : isoglobotrihexosylcéramide
IL : interleukine
KO : Knock Out
LPL : lymphocytes de la *lamina propria*
LTB4 : Leucotriène B4
MAIT : *mucosal-associated invariant T*
MC : maladie de Crohn
MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MPO : myéloperoxidase
nAchR : récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine
NK : *Natural Killer*
iNKT : *invariant Natural Killer T*
NKT : *Natural Killer T*
NO : monoxyde d'azote
NOD2 : *Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2*
OR : *odd ratio*
PRR : *Pattern Recognition Receptor*
RCH : rectocolite hémorragique
ROS : *Reactive oxygen species*
SCID : *Severe Combined Immunodeficiency*
SPF : *specific pathogen free*
TCR : *T Cell Receptor*
TGF- β : *Transforming growth factor β*
TLR : *toll-like receptor*
TNBS : acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique
TNF : *tumor necrosis factor*
Treg : cellules T régulatrices
 α 7-AchR : récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine α 7
 α GalCer : α -galactosylcéramide

Régulation de la réponse inflammatoire intestinale par la fumée de cigarette : caractérisation des mécanismes cellulaires et moléculaires chez la souris.

Contexte : L'étiologie et le développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), dont la maladie de Crohn (MC) et rectocolite hémorragique (RCH), restent encore très mal compris. Il s'agit de maladies complexes et multifactorielles caractérisées par une dérégulation de la réponse immunitaire des muqueuses dirigée contre des éléments de la flore intestinale chez des individus génétiquement prédisposés, et pouvant être aggravée par des facteurs environnementaux. À ce jour, parmi plusieurs facteurs potentiels, seuls le tabagisme et l'appendicectomie ont été décrits comme capables d'influencer le risque d'apparition des MICI ainsi que leur évolution. Le rôle du tabac est ambivalent : il protège de la RCH mais augmente le risque d'apparition de la MC. La RCH est 2,5 fois moins fréquente chez les fumeurs. Elle est également moins sévère : le tabac diminue la fréquence des poussées, réduit l'extension rétrograde des lésions coliques, diminue l'utilisation des corticoïdes, retarde le recours à la chirurgie et enfin réduit le risque de développement de carcinome colique.

Néanmoins, les mécanismes d'action à l'origine de l'effet ambivalent du tabac sont à ce jour très mal connus. La complexité de la composition de la fumée de cigarette qui peut contenir plusieurs centaines de substances différentes (nicotine, radicaux libres, monoxyde de carbone, etc...) ne facilite pas l'identification d'un processus en particulier. Malgré une littérature relativement abondante, il est à l'heure actuelle impossible d'assigner définitivement des propriétés immunomodulatrices particulières au tabac (pro- versus anti-inflammatoire) compte tenu de la variabilité des différentes études concernant les organes, cellules et composants de la fumée de cigarette étudiés. Par ailleurs, aucun des modes d'actions potentiels du tabac proposés à ce jour n'explique l'ambivalence observée entre la maladie de Crohn et la RCH. L'hypothèse la plus probable est celle d'un effet du tabac différent sur le côlon et l'intestin grêle. En effet, chez les patients fumeurs atteints de MC, la fréquence d'atteinte iléale serait augmentée alors que la fréquence d'atteinte colique serait diminuée.

But du travail : Partant de ces observations cliniques, ce travail de thèse a pour but de caractériser un (ou plusieurs) des mécanismes impliqués dans le rôle immunomodulateur du tabac. Cette étude se porte sur l'effet du tabac d'une part au niveau du côlon et d'autre part au niveau de l'iléon afin de mettre en évidence, par une analyse différentielle, les effets spécifiques du tabac sur le processus inflammatoire chez la souris.

Méthodes : Deux modèles d'inflammation intestinale ont été mis en place sur des souris C57Bl/6 exposées à la fumée de cigarette. Les souris sont pré-exposées pendant 2 semaines à la fumée de cigarette via un protocole standardisé (InExpose® exposure system-Scireq Inc). L'utilisation de ce système d'exposition permet de mimer au mieux le tabagisme humain. Lors de la troisième semaine, l'inflammation est provoquée soit au niveau du côlon (traitement au DSS (Dextran Sodium Sulfate)), soit au niveau du grêle (traitement à l'indométacine).

Résultats : Chez les souris sauvages, l'exposition à la fumée de cigarette réduit significativement l'expression clinique de la colite (perte de poids, score clinique et ratio poids-taille du côlon). Cet effet se traduit par une diminution significative de l'expression des cytokines pro-inflammatoires du type Th1/Th17 dans le côlon.

Cette protection par la fumée de cigarette est spécifique au côlon. En effet, aucune différence significative n'a pu être observée sur les paramètres cliniques de l'inflammation dans le modèle d'iléite (longueur du grêle, nombre et aires des lésions dans l'iléon).

Ces observations nous ont conduits à analyser les populations cellulaires pouvant être régulées par la fumée de cigarette au niveau intestinal. Les résultats obtenus montrent une augmentation de la proportion de lymphocytes iNKT au niveau du foie et du côlon (mais pas au niveau du grêle) des souris exposées. Cette population cellulaire pourrait être à l'origine de l'effet protecteur du tabac sur la colite expérimentale au DSS. En effet, les cellules iNKT sont reconnues pour avoir un rôle clé dans la balance immunitaire et dans le maintien de l'homéostasie intestinale et sont sensibles aux variations de l'environnement intestinal.

Pour tester l'implication de ces cellules iNKT dans la protection liée à la fumée de cigarette, des souris déficientes en cellules NKT fonctionnelles ($J\alpha 18^{-/-}$ et $CD1d^{-/-}$) ont été soumises au protocole DSS/cigarette. Chez ces souris, l'exposition tabagique n'aboutit pas à la régulation de l'inflammation colique. De plus, la diminution de l'expression des cytokines Th1/Th17 observée chez les souris WT exposées à la fumée n'est pas retrouvée chez les souris $J\alpha 18^{-/-}$. Ces résultats indiquent clairement un rôle important des cellules iNKT dans la protection du côlon liée à la fumée de cigarette.

Dans le modèle d'iléite à l'indométacine, les souris déficientes en NKT montrent une sensible diminution de l'inflammation iléale lorsqu'elles sont exposées à la fumée de cigarette. Ces résultats semblent indiquer que les cellules iNKT joueraient un rôle différent en fonction de leur localisation dans le tractus intestinale, ou que des sous-populations différentes de cellules iNKT seraient impliquées dans le contrôle immunitaire dans le côlon et l'intestin grêle.

Conclusion : Ce travail démontre clairement que, expérimentalement, la fumée de cigarette protège les souris de la colite mais pas de l'iléite. Pour la première fois, les cellules iNKT ont été identifiées comme ayant un rôle majeur dans la protection du côlon liée à la fumée de cigarette, tout en jouant potentiellement un rôle différent au niveau de l'iléon.

Cette thèse apporte des données nouvelles et originales dans le domaine de la régulation de l'inflammation intestinale notamment par la fumée de cigarette, un facteur environnemental largement répandu. En outre, cibler les cellules iNKT pourrait constituer un nouveau moyen de contrôle de l'inflammation intestinale. La conception de nouvelles molécules agissant sur la polarisation des cellules iNKT pourrait faire l'objet d'une nouvelle voie thérapeutique visant à diminuer l'inflammation colique, en particulier au cours de la RCH.

Regulation of intestinal inflammatory response by cigarette smoke: cellular and molecular characterization in mice.

Context: Current hypothesis on the pathogenesis of inflammatory Bowel disease suggests that the disease development implicates a deregulated dialogue between the intestinal flora and components of both the innate and adaptive immune systems in genetically susceptible individuals and under the influence of environmental factors. To date, among many potential factors, only cigarette smoking and appendectomy have been shown to play a significant role. The effect of smoking appears to be ambivalent: it protects from ulcerative colitis (UC) but worsens Crohn's disease (CD). UC is 2.5 less frequent in smokers and smoking exerts a protective effect on the disease course: flare-up episodes, hospitalization and colectomy rates, and the need for oral steroids are lower in smokers than in non-smokers. In contrast, cigarette smoking is associated with an increased incidence of CD by a factor of 2 and aggravates the clinical expression of the disease (more flare-up rates, more frequent intestinal complications, lower quality of life, and decreased efficacy of infliximab® treatment). Moreover, in CD it has been proposed that smoking might influence the disease location: CD patients who smoke were found to have a higher frequency of ileal disease and a lower frequency of colonic involvement.

However, the molecular basis of the opposite effect of smoking in CD and UC still remain unexplained. The complexity of tobacco smoke which is a mixture of hundreds of different molecules does not easily allow the identification of one particular mechanism. Tobacco smoke molecules seem to possess various immunomodulatory properties but currently no clear conclusion can be drawn from in vitro and in vivo studies which highly vary in term of cells, organs or smoke components. Moreover, very few studies have investigated the role of cigarette main stream exposure on the development of intestinal inflammation in animals and results stay controversial. To date, the influence of cigarette smoke on immune cells profile in the intestine remains unknown.

The **aim of this project** was to characterize the effect of CS in murine models of intestinal inflammation, and the underlying mechanism implied in impact of CS in the colon and in the ileum at the cellular and molecular levels.

Methods: To address this question, we developed a new model of exposition to CS using InExpose® exposure system (Scireq Inc) which allows us to accurately reproduce human smoking habits. We applied this protocol of exposure in two different animal models of intestinal inflammation: 1) the commonly used model of dextran sodium sulphate (DSS)-induced colitis and 2) the indomethacin-induced jejuno-ileitis model. C57BL/6 mice were pre-exposed to CS during two weeks before induction of one or another model of intestinal inflammation

Results: Firstly, we demonstrated in WT mice that CS exposure improved DSS-induced colitis but not indomethacin-induced ileitis. The colonic improvement was associated with a decrease in Th1/Th17 proinflammatory cytokines expression in the colon. This protection linked to CS exposure was specific to the colon since no modification of clinical and inflammatory parameters were observed in the jejuno-ileitis model.

Secondly, we analyzed leukocyte population under CS exposure condition compared to control un-exposed mice. We showed by flow cytometry analysis that, in particular, iNKT cells

were recruited by cigarette smoke in the colon and the liver (but not the small bowel) after CS exposure in non-inflammatory condition.

To access the role of iNKT cells in CS dependant colonic protection, mice deficient in NKT cells (CD1dKO and J18KO mice) were exposed to the same protocols than WT mice. In NKT cell-deficient mice, CS exposure failed to improve colitis and to decrease the expression of proinflammatory cytokines. This implies that iNKT cells may be a major actor in the CS-dependent protection against DSS colitis.

On the other hand, in NKT cell-deficient mice CS exposure seems to improve indomethacin-induced ileitis. This result indicates that iNKT cells could act differently according intestinal location or that the populations of iNKT in the different compartment of intestinal tracts may differ.

In **conclusion**, this study demonstrated that mainstream CS exposure protects mice from experimental colitis but not from experimental ileitis. For the first time, we have identified iNKT cells as major player of the CS-dependent protection in colonic inflammation, whereas they might have a different role in the ileum. Therefore, our study contributes to better elucidate the impact of smoking, as a widespread environmental factor in IBD. Targeting iNKT cells would represent a novel therapeutic way. Design of new molecules acting on iNKT cells polarization could reproduce the effects of CS and allow decreasing the inflammation in the colon.