

Rôle de NOD2 dans la récurrence post opératoire iléale au cours de la maladie de Crohn : étude mécanistique sur modèle murin

NOD2 Role in Post-Operative Ileal Recurrence during the Crohn's Disease: Study on Genetically Engineered Mice Model

M Couturier [1,2,3], Y Panis [1,3], X Treton [1,2,4], E Ogier-Denis [1,2]

1. Université Paris-Diderot - UMR 1149 and labex inflamex - 75018 Paris.
2. INSERM - UMR1149 - Centre de recherche sur l'inflammation - Paris Montmartre - 75018 Paris.
3. Service de chirurgie colorectale - Pôle des Maladies de l'Appareil Digestif (PMAD) - Hôpital Beaujon - Assistance publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) - Université Denis Diderot (Paris VII) - 100, boulevard du Général Leclerc - 92110 Clichy - France.
4. Service de gastroentérologie - Pôle des Maladies de l'Appareil Digestif (PMAD) - Hôpital Beaujon - Assistance publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) - Université Denis Diderot (Paris VII) - 100, boulevard du Général Leclerc - 92110 Clichy - France.

Mots clés

- ◆ Maladie de Crohn
- ◆ NOD2
- ◆ Modèle animal
- ◆ Inflammation
- ◆ Resection ileo-caecale
- ◆ Irradiation

Résumé

Objectif : La présence d'une mutation de NOD2 est associée à un recours plus fréquent au traitement chirurgical et à la diminution de l'intervalle sans récurrence dans la maladie de Crohn, suggérant un lien fort entre NOD2 et le développement d'une inflammation intestinale. L'objectif était de déterminer si une mutation de NOD2 pourrait entraîner l'aggravation de phénomènes inflammatoires en développant deux protocoles d'induction d'inflammation iléale sur un modèle murin porteur de la mutation 1007fs de NOD2 : un protocole chirurgical et une inflammation radio-induite.

Méthode : Dans le modèle chirurgical, un groupe de souris 1007fs et un groupe contrôle Wild Type (WT) ont subi une résection iléo-caecale. La zone d'anastomose iléo-colique était prélevée à 4 ou 6 semaines pour analyse histologique et analyse de l'expression des cytokines pro inflammatoires. Dans le modèle radique, une anse iléale a été irradiée dans deux groupes de souris : 1007fs et WT, à deux doses : 13Gy et 16Gy. Ces segments étaient prélevés à 7 et 21 jours pour analyse histologique.

Résultats : Dans le modèle chirurgical l'inflammation iléale apparaissaient plus importante chez les 1007fs mais aucune différence significative de l'expression des cytokines pro-inflammatoires n'était observée. Dans le modèle d'irradiation l'analyse histologique a révélé une inflammation significativement plus importante à 7 jours chez les 1007fs à 13Gy mais pas à 16Gy (respectivement $p=0.01$ et $p=0.68$). Cette différence n'était plus significative à 21 jours.

Conclusion : Nos résultats tendent à démontrer qu'une mutation invalidant la fonction de NOD2 augmente la sensibilité iléale à l'inflammation induite dans deux modèles expérimentaux complémentaires.

Keywords

- ◆ Crohn's disease
- ◆ NOD2
- ◆ animal modèle
- ◆ inflammation
- ◆ ileocecal resection
- ◆ irradiation

Abstract

The presence of NOD2 mutation is associated with an increased use of surgery and decreased recurrence-free interval in Crohn's disease, suggesting a strong link between NOD2 and development of intestinal inflammation. The aim of the study was to determine whether a NOD2 mutation could lead worsening inflammatory phenomena by developing two protocols inducing ileal inflammation on a mouse model with 1007fs NOD2 mutation: a surgical protocol and inflammation radio induced.

In the surgical model, a mouse 1007fs group and a control group Wild Type (WT) underwent ileocecal resection. The ileocolic anastomosis area was removed at 4 or 6 weeks for histologic analysis and analysis of the expression of proinflammatory cytokines. In the radiation model, an ileal loop was irradiated in two groups of mice: WT and 1007fs, with two doses: 13Gy and 16Gy. These segments were taken at 7 and 21 days for histological analysis.

In the surgical model, ileal inflammation appeared greater among 1007fs but no significant difference in the expression of pro-inflammatory cytokines was observed. In the radiation model, histological analysis revealed significantly greater inflammation at 7 days in 1007fs with 13Gy but not with 16 Gy ($p = 0.01$ and $p = 0.68$ respectively). This difference was no longer significant at 21 days.

Our results suggest that a mutation disabling the function of NOD2 increases the ileal sensitivity in two complementary experimental models of inflammation induced.

Correspondance :

Dr Eric Ogier-Denis, Centre de recherche sur l'inflammation - UMR 1149 Inserm - Université Paris Diderot -Labex Inflamex - « Inflammation Intestinale » - Faculté de médecine X - Hôpital Bichat - 16, rue Henri Huchard - 75018 Paris.
Tel : +33 (0) 1 57 27 73 07 / E-mail : eric.ogier-denis@inserm.fr

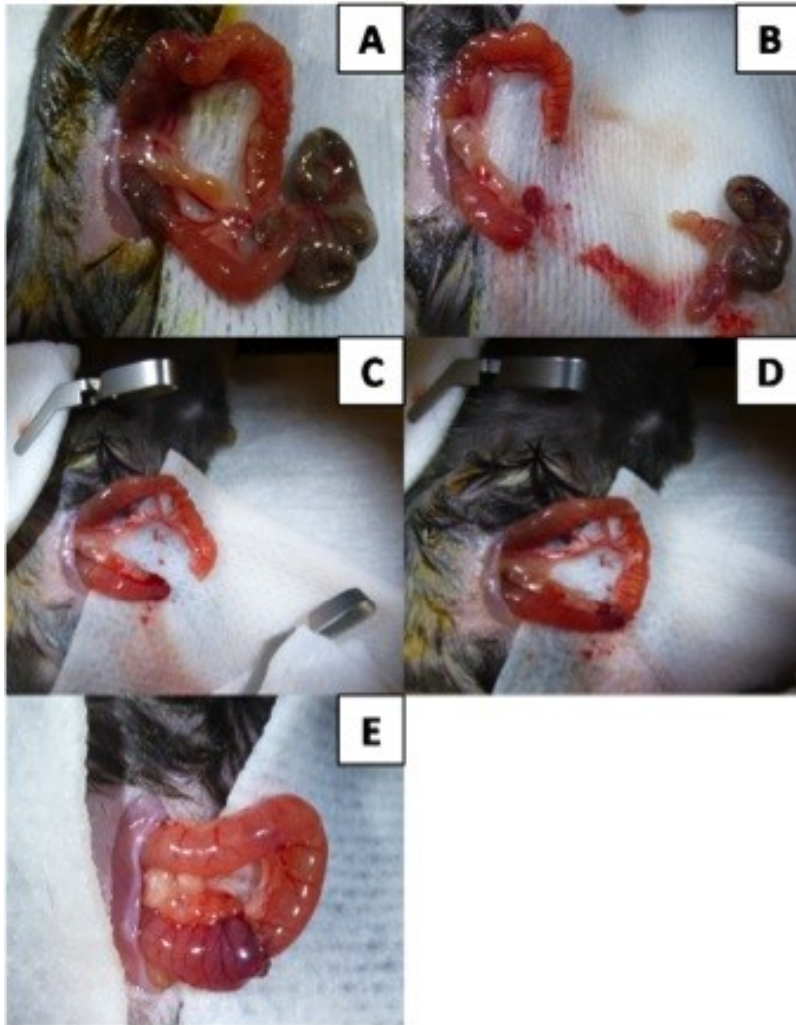


Figure 1. Résection iléo-caecale chez la souris, anastomose iléo-colique termino-terminale.

A : Aspect de la jonction iléo caecale de la souris. Fenestration du mésentère et du mésocolon de chaque côté du pédicule vasculaire iléo-colique.

B : Section entre deux ligatures du pédicule iléo-colique et section iléale et colique après avoir pris soin de lier l'arcade bordante. La pièce de résection emporte le caecum et un segment de 1cm d'iléon terminal et de 0,5cm de colon proximal.

C : Présentation sur fil tracteur des terminaisons iléales et coliques pour l'anastomose.

D : Réalisation de l'anastomose à points séparés.

E : Aspect final de l'anastomose iléo-colique termino-terminale.

La maladie de Crohn est caractérisée par l'existence d'une inflammation intestinale chronique dont l'étiologie est encore mal connue. Cette maladie réduit l'espérance de vie des patients atteints et en raison de sa survenue précoce et de sa chronicité, induit une morbidité élevée qui altère la qualité de vie des malades (1). Une meilleure connaissance de sa physiopathologie est indispensable de même que le développement de nouvelles voies thérapeutiques.

La maladie de Crohn est une maladie multifactorielle faisant intervenir des facteurs génétiques et environnementaux affectant les interactions du microbiote avec l'hôte et la production de médiateurs de l'inflammation.

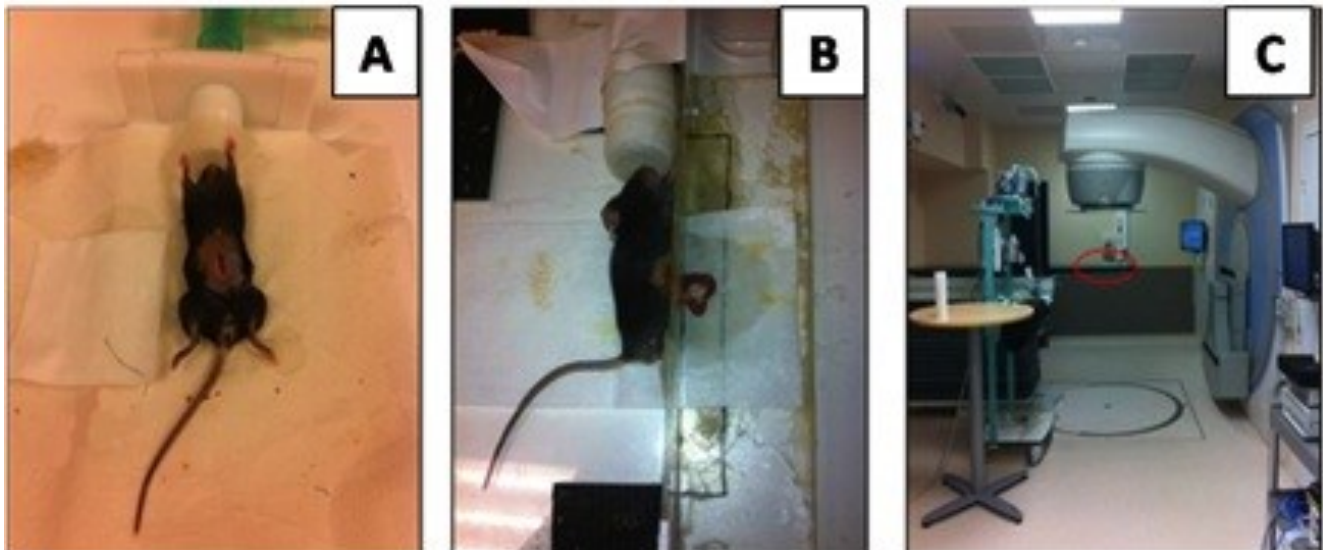
Le gène *NOD2/CARD15* a été identifié comme un gène de susceptibilité à la maladie de Crohn (2,3) fortement associé à sa forme iléale. Il code pour un récepteur de l'immunité innée reconnaissant le muramyl-dipeptide bactérien. Il existe trois mutations principales associées à la maladie de Crohn : R702W, G908R et 1007fs représentant ensemble près de 80 % des mutations observées (4). La mutation 1007fs est la plus fréquemment associée à la maladie, induisant l'expression d'une protéine tronquée avec une potentielle perte de fonction. Dans l'évolution de la maladie de Crohn la présence d'une mutation sur le gène *NOD2* est associée à un recours plus précoce au traitement chirurgical et à une diminution de l'intervalle sans récidence après une résection digestive (5). Tous ces éléments font suspecter un lien fort entre la pré-

Figure 2. Protocole d'irradiation d'une anse iléale isolée.

A : Souris anesthésiée, laparotomie médiane.

B : exposition de la dernière anse iléale dans la zone d'irradiation : rectangle noir.

C : Dispositif d'irradiation. L'animal est disposé sur la table sous le faisceau, l'ensemble de son corps protégé par un cache.



sence d'une mutation de *NOD2* et la survenue d'une inflammation intestinale.

Des modèles murins expérimentaux, reposant sur une délétion ou des mutations de *NOD2* ont été mis au point, cependant ces souris ne développent pas spontanément d'inflammation intestinale (6) suggérant qu'une combinaison de facteurs environnementaux et génétiques est indispensable à l'émergence de la maladie.

Actuellement aucun modèle murin ne reproduit spontanément l'histoire naturelle de la maladie de Crohn. Cependant, différents modèles murins d'inflammation intestinale existent (7), notamment des protocoles d'induction d'une inflammation intestinale que l'on peut appliquer à des lignées de souris porteuses d'une mutation sur un gène d'intérêt :

- des modèles de transfert d'une population de lymphocytes TCD4 « naïfs » à des lignées murines immunodéprimées ;
- des modèles chimiques (colite au DSS, au TNBS) ;
- des modèles de traitement avec un agent infectieux ou de transfert de flore ;
- des modèles chirurgicaux ;
- des modèles d'inflammation radio-induite.

Notre hypothèse de travail est la suivante : une mutation de *NOD2* pourrait être à l'origine de l'aggravation ou de la pérennisation anormale de phénomènes inflammatoires digestifs qui pourrait être responsable de la récurrence post opératoire précoce observée dans ce groupe de patients. Pour valider cette hypothèse nous avons utilisé une population de souris porteuse de la mutation 1007fs. Dans cette lignée nous avons appliqué deux protocoles différents d'induction d'inflammation iléale, pour étudier le développement des lésions et les mécanismes sous-jacents mis en jeu. Le premier modèle est un modèle d'inflammation post-chirurgicale après résection iléo-caecale. Le second est un modèle d'inflammation radio-induite qui permet de générer une inflammation contrôlée sur un segment iléal isolé et d'en étudier l'évolution.

Méthode

Modèles animaux

Deux groupes de souris ont été constitués pour chacun des deux protocoles expérimentaux : un groupe composé de souris contrôle wild-type (WT) et un groupe de souris porteuses de la mutation 1007fs du gène *NOD2*. Il s'agit d'une lignée porteuse d'une mutation équivalente à la mutation 1007fs humaine (allèle *3020insC*) codant pour une protéine tronquée non fonctionnelle. Elle présente une insertion d'une cytosine en position 2939 correspondant à la position 3020 sur le gène *NOD2* humain (8).

Modèle chirurgical

Bien que marginaux chez la souris, les modèles de résection iléo caecale (RIC) présentent l'avantage de reproduire fidèlement l'observation clinique puisque la RIC est l'opération la plus pratiquée dans le traitement chirurgical de la maladie de Crohn.

Procédure chirurgicale

Deux groupes de 16 souris mâles âgées de 10 semaines ont été constitués, un groupe muté 1007fs et un groupe WT. La même intervention a été pratiquée dans tous les groupes. Chaque groupe était divisé en deux sous-groupes de huit individus en fonction de la date de sacrifice par rapport à l'intervention : quatre ou six semaines après l'intervention. Ces dates ont été choisies pour étudier la survenue de lésions inflammatoires iléales à distance de l'intervention.

Tous les groupes étaient soumis à une diète liquide un jour avant et deux jours après l'intervention pour limiter les complications à type d'occlusion post opératoire (9,10). Toutes les interventions ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique (grossissement 10X), dans des conditions aseptiques. L'anesthésie était réalisée par inhalation d'isoflurane 2 % et d'oxygène dispensée par une station d'anesthésie mobile. On réalisait une résection iléo caecale par laparotomie médiane emportant 1 cm d'iléon, le cæcum et 0,5 cm de colon entre des ligatures sur les pédicules vasculaires au fil monobrin 8.0. Le rétablissement de la continuité était assuré par une anastomose termino-terminale à points séparés de fil monobrin 10.0. (Fig 1).

Protocole post opératoire

Les animaux de tous les groupes étaient gardés pendant 48h dans des cages métaboliques et alimentés exclusivement avec de l'eau sucrée. Les souris étaient transférées le troisième jour dans des cages classiques, avec une alimentation solide et de l'eau ad libitum jusqu'à la date prévue du sacrifice. La pesée et un examen de la cicatrice étaient réalisés quotidiennement pendant les cinq premiers jours puis tous les deux à trois jours.

Prélèvements tissulaires

L'ensemble de l'intestin était examiné macroscopiquement puis la zone d'anastomose était prélevée avec 1 cm d'iléon en amont de la zone de suture et 5 mm de côlon en aval et incluse en paraffine pour l'analyse histologique. Un prélèvement d'iléon terminal de 1 cm en amont de l'anastomose était réalisé et congelé à sec dans l'azote liquide puis conservé à -80°C en vue d'une étude biochimique.

Critères histologiques

L'analyse était réalisée en aveugle sur le versant iléal de la zone d'anastomose. Les critères histologiques d'inflammation pris en compte rejoignent les modifications inflammatoires utilisées dans les scores d'activité des MICI (11) : présence d'ulcérations, présence de cryptes régénératives, présence d'une inflammation chronique, présence de polynucléaires neutrophiles dans la lamina propria et disparition des cellules de Paneth.

Analyse Biochimique

L'étude comparative d'expression de trois principales cytokines pro inflammatoires : TNF α , IL1, MIP 2 dans l'iléon sus anastomotique était réalisée par ELISA (Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay). Après extraction protéique, tous les échantillons étant utilisés à concentration identique, le dosage des cytokines a été réalisé en utilisant les kits pour ELISA *Mouse TNF (Mono/Mono) ELISA set* et *Mouse IL-1B ELISA set* du laboratoire BD Bioscience et *Mouse CSCL2/MIP-2 Duo-Set* du laboratoire R&D Systems en suivant les recommandations et le protocole du fabricant.

Modèle d'iléite radique

Procédure d'irradiation

Deux groupes de 16 souris étaient soumis à l'irradiation : un groupe muté et un groupe WT, chacun réparti en deux sous-groupes en fonction de la dose reçue : pour chaque génotype cinq souris ont été irradiées à 13Gy et 11 souris à 16Gy. Les sacrifices et prélèvements histologiques étaient prévus à sept jours post irradiation pour les groupes irradiés à 13Gy et la moitié des individus des groupes irradiés à 16 Gy dans le but de comparer les lésions aiguës. Les prélèvements étaient prévus à 21 jours pour le reste des individus irradiés à 16Gy pour étudier les phénomènes de réparation de la muqueuse iléale.

Score histopathologique d'évaluation des lésions radiques précoces (J7)**Lésions épithéliales :****Villosités**

- 0 Pas d'atrophie villositaire
- 1 Atrophie minimale : avec taille des villosités / taille des cryptes > 1
- 2 Atrophie partielle : avec taille des villosités = taille des cryptes
- 3 Atrophie subtotale : avec taille des villosités < taille des cryptes
- 4 Atrophie villositaire totale

Cryptes

- 0 Pas d'atrophie glandulaire
- 1 Atrophie glandulaire focale non contiguë
- 2 Atrophie glandulaire contiguë et multifocale de > 1 glande
- 3 Atrophie glandulaire extensive sur > 6 glandes contiguës
- 4 Atrophie glandulaire subtotale ou totale

Inflammation :

Infiltrat à PNN

Pas de PNN nettement visible dans la lamina propria

PNN visibles dans la lamina propria

Score histopathologique d'évaluation des lésions radiques tardives (J21)**Lésions épithéliales :****Villosités**

- 0 Pas d'atrophie
- 1 Atrophie minimale : avec taille des villosités / taille des cryptes > 1
- 2 Atrophie partielle : avec taille des villosités = taille des cryptes
- 3 Atrophie subtotale : avec taille des villosités < taille des cryptes
- 4 Atrophie totale

Cryptes

- 0 Pas d'anomalie glandulaire
- 1 Régénération glandulaire focale non contiguë
- 2 Régénération glandulaire contiguë et multifocale de > 1 glande
- 3 Atrophie + dystrophie glandulaire associée à la régénération
- 4 Atrophie glandulaire subtotale ou totale

Fibrose :

Pas de différence avec la zone témoin irradiée

Présence de fibrose entre les cryptes

Tableau 1. Score d'évaluation des lésions d'entérite radique établi d'après le score de référence de M. Hauer-Jensen. Critères sur 8 points au temps précoce et tardif. (J7 : sacrifice au 7ème jour, J21 : sacrifice au 21ème jour).

Deux groupes contrôle de souris sham non irradiées, l'un muté et l'autre sauvage, ont été constitués pour évaluer les lésions potentiellement liées seulement à la chirurgie.

Le jour de l'intervention les animaux recevaient une alimentation normale et une hydratation orale *ad libitum*. Les souris étaient anesthésiées par inhalation d'isoflurane 2 % et d'oxygène. Un segment de 2,5 cm d'iléon distal, situé à 2,5 cm de l'abouchement du cæcum était extériorisé par une courte laparotomie et exposée à une dose unique d'irradiation en gray à travers un cache protégeant le corps de l'animal. L'irradiation durait entre 6 et 8 min selon la dose administrée (13 ou 16 Gy). Cette dose était délivrée par un accélérateur d'électrons délivrant des rayons X à un débit de dose de 2Gy/min (Fig 2). Aucun traitement antibiotique n'était donné aux souris irradiées. Après leur réveil, les souris avaient un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les souris du groupe de con-

trôle (SHAM) subissaient le même protocole expérimental sans l'étape d'irradiation.

Prélèvements tissulaires

L'ensemble de l'intestin était prélevé et la mesure de 2.5 cm à partir de l'abouchement du cæcum permettait de repérer la zone irradiée. Un cm d'anse irradiée était alors prélevé et fixé dans le formol. Les mêmes prélèvements iléaux étaient réalisés 7 cm en amont du cæcum, en zone saine. Pour faciliter l'analyse histologique des deux zones iléales, les prélèvements de grêle irradié/non irradié étaient regroupés sur la même lame pour chaque souris.

Score histologique

L'analyse histologique des prélèvements a été réalisée en aveugle selon un score établi d'après le score de M. Hauer-Jensen publié en 1992 (12), il prenait en compte les lésions épithéliales : l'atrophie villositaire cotée de 0 à 4 et l'atrophie des cryptes cotée également de 1 à 4. La composante inflammatoire des lésions au temps précoce était évaluée par la présence d'un infiltrat de polynucléaires neutrophiles dans la lamina propria et au temps tardif, l'apparition de fibrose était prise en compte (Tableau 1).

Statistiques

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne ± écart standard à la moyenne [SEM].

La comparaison des groupes et des sous-groupes a été effectuée en utilisant des tests non paramétriques à l'aide du logiciel GraphPadPrism 5.0 : Test de Mann-Whitney permettant de comparer deux groupes ou sous-groupes entre eux.

Résultats**Modèle chirurgical****Analyse histologique**

Au total 32 souris ont eu une résection iléo-caecale, 16 dans le groupe WT et 16 dans le groupe NOD2 1007fs, deux dates de sacrifices étaient prévues dans chaque sous-groupe : 4 semaines ou 6 semaines avec 8 souris pour chaque date. Aucune lésion macroscopique n'a été constatée lors des prélèvements. Les lésions inflammatoires apparaissaient plus importantes dans le groupe NOD2 1007fs avec notamment l'observation de plusieurs cas d'ulcérations sus anastomotiques : deux cas dans le groupe analysé au temps précoce (28,5 %) et un cas dans le groupe tardif (16,6 %) alors qu'aucune ulcération n'est apparue sur les contrôles WT. De même on ne notait pas de disparition des cellules de Paneth dans le groupe WT alors que cette absence était observée chez certaines souris NOD2 1007fs : trois souris à 4 semaines (42,8 %) et 2 à 6 semaines (33,3 %) (Tableau 2). Chez l'une des souris du groupe WT des lésions inflammatoires diffuses sont apparues

Groupe	Taux de survie	Présence d'ulcération	Présence de cryptes régénératives	Présence d'une inflammation chronique	Présence d'un infiltrat à PNN	Disparition des cellules de Paneth	
WT n = 16	4S n = 8	62,5%	0%	60%	50%	20%	0%
	6S n = 8	87,5%	0%	33,3%	33,3%	0%	0%
NOD2 1007fs n = 16	4S n = 8	87,5%	28,5%	85,7%	85,7%	42,8%	42,8%
	6S n = 8	75%	16,6%	83,3%	50%	50%	33,3%

Tableau 2. Résultat de l'analyse histologique du versant iléal de la zone d'anastomose iléocolique sur 32 souris. Analyse réalisée en aveugle sur 16 animaux wild-type (WT) et 16 porteurs de la mutation 1007fs de NOD2 en fonction de la date du sacrifice : 4 ou 6 semaines. (4S = 4

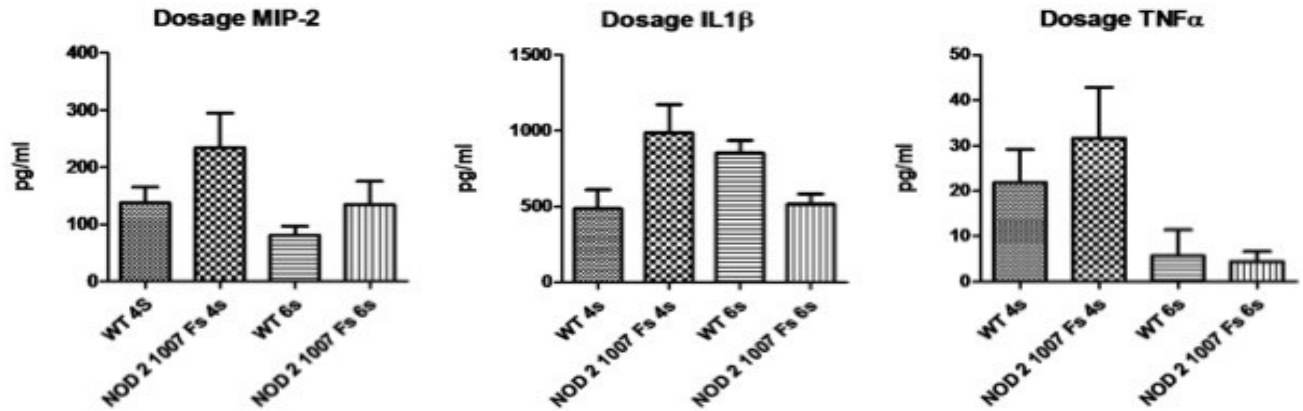


Figure 3. Dosage par ELISA des principales cytokines pro-inflammatoires : TNFα (c), IL1β (b) et MIP2 (a) (équivalent murin de l'IL8) dans l'iléon sus anastomotique des souris après résection iléo-caecale. Dosage comparatif réalisé entre les groupes de souris wild-type (WT) et porteuse de la mutation 1007fs en fonction de la date du sacrifice : 4 ou 6 semaines post opératoires. Il y avait 8 souris de chaque génotype pour chaque date de sacrifice. (ns = non significatif).

et semblaient plutôt en rapport avec une entérite d'origine infectieuse.

Variation du profil cytokinique dans l'iléon sus-anastomotique

Afin de détecter des phénomènes inflammatoires sus anastomotiques infra cliniques nous avons réalisé une étude de l'expression des principales cytokines pro inflammatoires en choisissant les plus représentatives en relation avec l'activité connue de *NOD2* : TNFα, IL1β et MIP2 (équivalent chez la souris de l'IL8 humaine). Concernant l'expression du TNFα dans l'iléon sus anastomotique à 4 semaines de l'intervention, aucune différence significative entre le groupe de souris *NOD2* mutées 1007fs et le groupe contrôle WT n'a été observée malgré une tendance à l'augmentation dans le groupe *NOD2* muté. A 6 semaines, l'expression du TNFα régressait dans les deux lignées sans différence significative. L'expression de l'IL1β semblait plus importante dans le groupe *NOD2* 1007fs à 4 semaines sans différence significative avec le groupe WT. En revanche à 6 semaines l'expression était significativement plus basse dans le groupe muté que dans le groupe WT (p=0,0476). L'expression de MIP2 montrait une tendance à l'augmentation dans le groupe muté par rapport au groupe WT et ceci aux deux périodes d'étude suivant l'intervention sans pour autant atteindre le seuil de significativité (Fig 3).

Modèle d'iléite radique

Analyse histologique

Au total 32 souris ont eu une irradiation iléale, la survie globale après irradiation était de 90,3 %, 10 souris ont été irradiées à 13 Gy (5 souris WT et 5 souris *NOD2* 1007fs) et 22 souris à 16Gy (11 souris WT et 11 1007fs) avec pour cette dose deux temps d'analyse différents : 7 et 21 jours. L'analyse à 7 jours des segments d'iléon irradiés à 13Gy montrait une atrophie villositaire et cryptique marquée en comparaison avec les segments contrôles indemnes de lésions. Dans le groupe muté pour *NOD2* plusieurs prélèvements révélaient une atrophie villositaire subtotale et une atrophie glandulaire extensive qui n'était pas observée sur l'iléon du groupe WT. La destruction épithéliale était significativement plus importante dans le groupe muté pour *NOD2* (score moyen : 4,75/8) que dans le groupe WT (score moyen : 2 ; 8/8), (p=0,0119) (Fig 4). Un infiltrat de polynucléaires neutrophiles reflétant une inflammation aigue était présent dans l'ensemble des prélèvements d'iléon irradiés des souris *NOD2* mutés et dans tous sauf un des échantillons issus de souris WT. L'analyse des segments irradiés à 16 Gy montrait globalement une destruction épithéliale majeure : atrophie villositaire et glandulaire totale. Le groupe *NOD2* 1007fs présentait de larges zones d'ulcération avec destruction complète de l'épi-

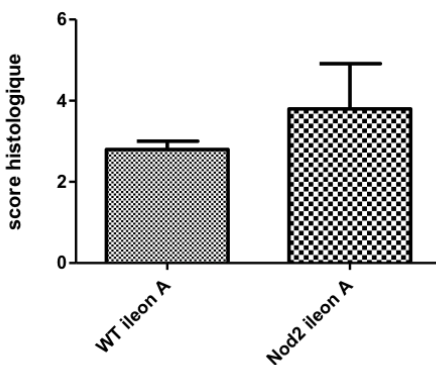


Figure 4. Score histologique de sévérité des lésions épithéliales après irradiation à 13Gy au temps précoce (J7), comparaison entre le groupe WT (n = 5) et le groupe *NOD2* 1007fs (n = 5) (p = 0,0119).

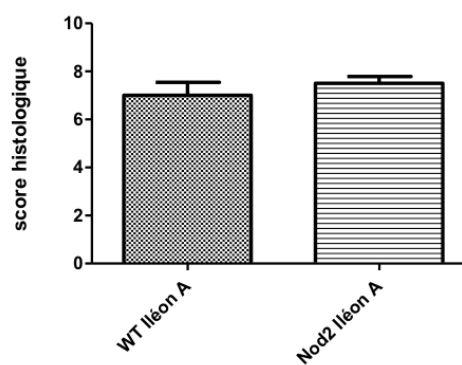


Figure 5. Score histologique de sévérité des lésions épithéliales après irradiation à 16Gy au temps précoce (J7), comparaison entre le groupe WT (n = 5) et le groupe *NOD2* 1007fs (n = 5) (p = 0,6873).

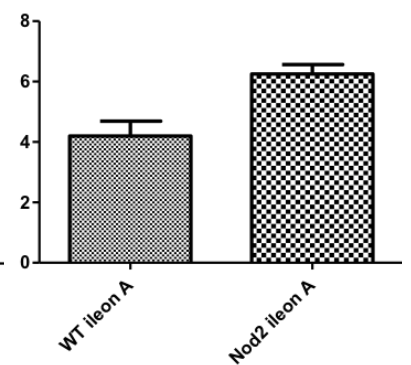


Figure 6. Score histologique de sévérité des lésions épithéliales après irradiation à 16Gy au temps tardif (J21), comparaison entre le groupe WT (n = 6) et le groupe *NOD2* 1007fs (n = 6) (p = 0,2652).

thélium et de nombreux abcès cryptiques non retrouvés dans le groupe contrôle. Le score de lésions épithéliales pour le groupe *NOD2* muté était en moyenne de 7,5/8 contre 7/8 dans le groupe WT sans différence significative ($p = 0,6873$) (Fig 5). La présence d'un infiltrat à polynucléaires neutrophiles était constatée sur l'ensemble des échantillons analysés. Au temps précoce les souris du groupe sham ne présentaient pas de lésions quel que soit le génotype considéré.

A 21 jours on pouvait observer une persistance de l'atrophie villositaire associée à des zones de régénération ou de dystrophie glandulaires. Il n'y avait pas de différence significative concernant le score lésionnel entre le groupe *NOD2* muté et le groupe WT ($p = 0,2652$) (Fig 6). On note cependant un dépôt de fibrose entre les cryptes intestinale dans la totalité des prélèvements en zone irradiée dans le groupe *NOD2* muté alors que ce type de lésion n'est présent que chez un individu du groupe WT.

Discussion

Dans cette étude l'objectif était de développer deux modèles d'induction d'inflammation iléale chez des souris porteuses de la mutation *NOD2* 1007fs.

Un nombre important de patients atteints de la MC a recours au traitement chirurgical au cours de leur vie. Ce nombre varie selon les études de 38 à 96 % dans les 15 années suivant le diagnostic (13). Après cette première intervention plus de 70 % des patients présentent une récurrence endoscopique (14) et le taux de réintervention varie entre 50 %-60 % et 28 %-45 % à 15 ans (15). Parmi ces patients, ceux qui présentent une mutation de *NOD2* ont plus précocement recours à la chirurgie et voient l'intervalle sans récurrence significativement réduit après la première intervention (5). Le développement de modèles animaux adaptés à cette population particulière permettrait d'étudier les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans le développement de lésions inflammatoires en présence d'une mutation de *NOD2*.

Nous avons développé en premier lieu un modèle de RIC chez la souris *NOD2* 1007fs. Ce modèle présentait l'avantage de mimer ce que l'on observe chez l'humain en reproduisant l'intervention la plus pratiquée chez les patients et est considéré comme particulièrement pertinent dans la littérature (16). Il a été développé avec succès chez la souris IL10 KO permettant notamment de mettre en évidence l'implication de la flore commensale dans la survenue d'une inflammation post opératoire dans cette lignée de souris (17-19). Compte tenu de l'implication de *NOD2* dans l'immunité innée (4), ce modèle reposant en partie sur l'altération de la flore iléale terminale suite à une anastomose iléo-colique, nous est apparu intéressant.

L'analyse histologique de la zone d'anastomose nous a permis d'observer, dans le groupe de souris *NOD2* 1007fs, l'apparition de lésions inflammatoires plus importantes que dans le groupe WT avec l'apparition d'ulcérations sus anastomotiques chez certaines souris mutées. Cependant ces différences n'atteignaient pas le seuil de significativité certainement en raison du petit effectif, tant dans le sous-groupe muté que dans le sous-groupe contrôle.

Nous avons réalisé le dosage de certaines cytokines pro inflammatoires dans l'iléon sus anastomotique pour apprécier globalement l'intensité de la réaction inflammatoire dans chacun des groupes. Pour les trois cytokines testées une tendance à l'augmentation à 4 semaines dans le groupe *NOD2* muté par rapport au groupe contrôle était observée sans être significative. Cette tendance disparaissait à 6 semaines pour le TNF α et l'IL1 β avec, pour cette dernière, une sécrétion significativement abaissée par rapport aux WT. Ces résultats ne permettent donc pas de conclure mais peuvent laisser supposer la présence d'une réaction inflammatoire aiguë post opératoire plus intense chez des sujets porteurs d'une muta-

tion de *NOD2*, hypothèse qu'il nous faudra confirmer par des études supplémentaires.

Nous avons choisi de réaliser les prélèvements à deux temps post opératoires différents car il était impossible de prévoir la chronologie de l'apparition d'éventuelles lésions inflammatoires post opératoire chez les souris mutées pour *NOD2*. Dans le modèle publié de résection iléo-caecale chez la souris IL10 KO les auteurs ont analysé l'effet de l'anastomose à 28 jours pour éviter la confusion avec l'inflammation post opératoire immédiate (17). Selon le même principe nous avons sacrifié les souris opérées à 4 semaines et 6 semaines post opératoire. Toutefois le choix de deux dates différentes complique l'analyse des résultats et ne semble pas apporter d'information supplémentaire. Le temps plus précoce semble plus discriminant. Pour aller plus loin, dans l'hypothèse de la validation d'une inflammation sus anastomotique chez les souris mutées pour *NOD2*, il serait intéressant d'identifier et de réaliser le génotypage de la flore iléale et colique adhérente avant et après la réalisation de l'anastomose.

Le second modèle que nous avons choisi de développer était un modèle radio-induit. Il est actuellement suggéré que la physiopathologie des lésions radio-induites est comparable chez l'Homme et dans les modèles animaux, facilitant ainsi l'interprétation des résultats obtenus dans ce type d'expérimentation (20). De plus les lésions observées se rapprochent particulièrement de celles retrouvées dans la maladie de Crohn de type sténosant (apparition d'une sclérose vasculaire, d'ulcérations épithéliales chroniques et d'une fibrose tardive). Un autre avantage de ce modèle est de générer une inflammation intestinale pour laquelle le site et l'intensité du stimulus pro inflammatoire sont précisément contrôlés. Cette technique d'irradiation d'anse iléale isolée a été développée à l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (21,22). De même que pour le modèle chirurgical, cette procédure n'avait jamais été appliquée à la lignée de souris *NOD2* 1007fs. Le choix d'appliquer deux doses différentes devait permettre une meilleure appréciation des lésions aiguës pour la dose faible et tardives pour la dose forte. En effet nous avons pu observer une différence significative d'intensité des dommages épithéliaux causés par l'irradiation à 13 Gy au temps précoce en faveur d'une plus grande susceptibilité des souris 1007fs par rapport aux WT. A 16Gy l'intensité des lésions occasionnées ne permettaient pas de discriminer entre les deux génotypes même si l'intensité de l'atrophie villositaire et cryptique et le nombre d'abcès cryptique apparaissent plus importants dans le groupe muté. Au temps tardif le grade histologique ne permettait pas de mettre en évidence de différence significative entre les deux lignées probablement par manque de puissance et une deuxième expérience avec un groupe plus important pourrait permettre de conclure dans ce sens. En revanche une fibrose plus importante était observée dans le groupe *NOD2* 1007fs comparativement aux WT.

Ces résultats laissent supposer une aggravation de la réaction inflammatoire aiguë en cas de mutation de *NOD2*.

Conclusion

Même si à l'heure actuelle les résultats obtenus avec ces deux modèles ne nous permettent pas d'apporter des réponses claires sur le rôle de *NOD2* dans l'apparition de lésions inflammatoires iléales, ils constituent des systèmes expérimentaux fiables et adaptés.

Ils permettent d'envisager la constitution de groupes plus importants de souris testées et l'extension de ces protocoles à d'autres modèles murins comme les souris invalidées pour *NOD2* et pourraient améliorer notre compréhension du rôle de ce gène dans les lésions iléales et la récurrence post opératoire au cours de la maladie de Crohn.

Références

1. Loftus Jr EV. Mortality in inflammatory bowel disease: peril and promise. *Gastroenterology* 2003;125:1881-3.
2. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
3. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.
4. Hugot JP. Role of NOD2 gene in Crohn's disease. *Gastroenterol Clin Biol*. 2002;26:13-5.
5. Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, et al. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann surg* 2005;242:693.
6. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005;307:731-4.
7. Nancey S, Hacini F, Durand PY, et al. Apport des modèles animaux d'inflammation intestinale dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Hépatogastro* 2008;15:33-41.
8. Maeda S, Hsu LC, Liu H, et al. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF- κ B activity and IL-1 β processing. *Science* 2005;307:734-8.
9. Dekaney CM, Fong JJ, Rigby RJ, et al. Expansion of intestinal stem cells associated with long-term adaptation following ileocecal resection in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G1013-22.
10. Helmrath MA, Shin CE, Erwin CR, et al. Epidermal growth factor upregulates the expression of its own intestinal receptor after small bowel resection. *J Pediatr Surg* 1998;33:229-34.
11. Geboes K, Desreumaux P, Jouret A, et al. Histopathologic diagnosis of the activity of chronic inflammatory bowel diseases. Evaluation of the effect of drug treatment. Use of histological scores. *Gastroenterol Clin Biol* 1999;23:1062-73.
12. Langberg CW, Sauer T, Reitan JB, et al. Tolerance of rat small intestine to localized single dose and fractionated irradiation. *Acta Oncol* 1992;31:781-7.
13. Wolters FL, Russel M, Stockbrügger R. Has disease outcome in Crohn's disease changed during the last four decades? *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:483-96.
14. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, et al. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990;99:956-63.
15. Golovics PA, Lakatos L, Nagy A, et al. Is early limited surgery associated with a more benign disease course in Crohn's disease? *World J Gastroenterol* 2013;19:7701.
16. Rieder F, Kessler S, Sans M, et al. Animal models of intestinal fibrosis: new tools for the understanding of pathogenesis and therapy of human disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;303:G786-G801.
17. Rigby RJ, Hunt MR, Scull BP, et al. A new animal model of postsurgical bowel inflammation and fibrosis: the effect of commensal microflora. *Gut* 2009;58:1104-12.
18. Borowiec AM, Sydora BC, Doyle J, et al. Small bowel fibrosis and systemic inflammatory response after ileocolonic anastomosis in IL-10 null mice. *J Surg Res* 2012;178:147-54.
19. Wu R, Li Y, Guo Z, et al. Triptolide ameliorates ileocolonic anastomosis inflammation in IL-10 deficient mice by mechanism involving suppression of miR-155/SHIP-1 signaling pathway. *Mol Immunol* 2013;56:340-6.
20. Hauer-Jensen M, Denham JW, Andreyev HJN. Radiation enteropathy pathogenesis, treatment and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:470-9.
21. Haydont V, Bourgier C, Pocard M, et al. Pravastatin Inhibits the Rho/CCN2/extracellular matrix cascade in human fibrosis explants and improves radiation-induced intestinal fibrosis in rats. *Clin Cancer Res* 2007;13:5331-40.
22. Haydont V, Gilliot O, Rivera S, et al. Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement or tumor protection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68:1471-82.
- 23.