

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Spécialité : Agroressources, Procédés, Aliments, Bioproduits  
Discipline : Sciences des aliments et nutrition

École doctorale GAIA

Unité mixte de recherche 204 Nutripass

Développement d'un modèle *in vitro* d'inflammation  
intestinale par l'utilisation de lignées cellulaires  
humaines en co-culture pour l'étude des interactions  
avec les micro-constituants alimentaires

Présentée par María del Carmen PONCE DE LEON RODRIGUEZ  
Le 21 février 2019

Sous la direction de Jean-Pierre GUYOT

Devant le jury composé de

M. Jean-François LANDRIER, Directeur de recherche, INRA

Mme. Muriel THOMAS, Directrice de recherche, INRA

Mme. Marie-Josèphe AMIOT-CARLIN, Directrice de recherche, INRA

M. Patrick POUCHERET, Maître de conférence, Université de Montpellier

Mme. Caroline LAURENT-BABOT, Maître de conférence, Université de Montpellier

M. Jean-Pierre GUYOT, Directeur de recherche, IRD

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Président

Membre invité

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

*A Papá Nel  
por transmitir siempre su amor  
por la lectura, la ciencia y la cultura;  
toda mi admiración y respeto.*

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes parents pour leur support, dévouement et compréhension inconditionnelle pendant toutes les années de ma formation ; pour leurs valeurs et leur motivation constante qui m'a permis de devenir une meilleure personne, je vous aime.

A mes chères sœurs, Mariana y Sarita pour être les meilleures et être toujours présentes. A toute ma famille pour tous les bons moments et les mots d'encouragement. Je vous aime tous.

A Sylvain pour ton support, tes mots de motivation et ta présence. Gracias amor, je t'aime.

A mes amies qui ont toujours eu un mot de soutien tout au long de ces années, de près ou à distance, spécialement à Ale, Pau, Paula, Mayela, Gaby, Mateo et Julieta.

A mes professeurs qui ont été présents tout au long de ma formation académique pour m'avoir orienté dans l'acquisition de connaissances et avoir renforcé ma formation, un mot spécial pour Lourdes Grijalva Padilla.

A Caroline Laurent-Babot pour ton encadrement, support et disponibilité à tout moment. Merci et encore merci, cette thèse voit le jour grâce à ton travail à mes côtés.

A Frédéric Boudard et Claudie Dhuique-Mayer de l'UMR Qualisud pour leur encadrement et conseils avisés, sans oublier Caroline Guzman pour son aide précieuse.

A Jean-Pierre Guyot pour accepter d'être le directeur de cette thèse, pour l'encadrement et la disponibilité.

A l'UMR Nutripass pour son accueil spécialement aux membres de l'équipe Nutrition et Aliments pour leurs mots d'encouragement. Un mot spécial pour Nicolas Leconte qui a énormément participé aux travaux de recherche de cette thèse, merci pour ton temps et expertise. Merci à Youna Hemery pour son aide dans l'analyse statistique. Merci à Catherine Philibert pour son précieuse aide. Merci aux doctorants, Fabien, Wichian et Fabrice et aux stagiaires qui ont fait partie de l'équipe spécialement à Théo Ribon qui a participé directement à cette thèse, j'ai partagé des bons moments au laboratoire avec vous tous.

A toutes les personnes qui ont participé à différents moments de ces travaux de recherche notamment aux plateformes spécialisées. Merci à Myriam Collin du laboratoire d'histologie de l'IRD pour son expertise en histologie, à Philippe Clair (IGERF) de la plateforme qPCR Haut Débit (qPHD) Université de Montpellier, pour son expertise en biologie moléculaire. Merci également à Baptiste Monterroso (MRI, UMS Biocampus, CNRS, INSERM, Univ Montpellier), Marc Lartaud (MRI-PHIV, AGAP, CIRAD, INRA, SupAgro) et Geneviève Conéjéro de la plateforme MRI, Biolmaging (MRI-PHIV, BPMP, Univ Montpellier, CNRS, INRA, SupAgro) pour leur expertise en microscopie de fluorescence.

A toute l'équipe de la DSI de l'IRD pour leur support informatique si précieux.

A toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin au sein de l'IRD et que je ne peux pas toutes citer.

Au CONACYT (Conseil National de Sciences et Technologie) du Mexique pour avoir financé mon séjour en France afin de réaliser cette thèse.

*« L'engagement profond envers un rêve ne vous enferme pas et ne vous limite pas: cela vous libère »*

Paulo Coelho

## RESUME

L'épithélium intestinal, siège de l'absorption des (micro)-nutriments est aussi le premier système de défense de l'organisme. Un déséquilibre dans l'homéostasie peut être à l'origine d'une réaction inflammatoire associée à des défauts de la barrière intestinale et de la fonction immunitaire, ainsi qu'une malabsorption des nutriments, comme rencontré dans les MICI (Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin), dans les stratégies de fortification en micronutriments et les pathologies non transmissibles (obésité). Il est donc important de trouver des moyens d'action, via l'alimentation par exemple, pour prévenir ou au minima réduire, les conséquences nutritionnelles et pathologiques de l'inflammation intestinale, et de comprendre les mécanismes impliqués. Parmi les modèles d'études de l'intestin, les modèles *in vitro* de culture cellulaire sont de plus en plus utilisés et permettent d'évaluer les mécanismes moléculaires d'une manière simple et reproductible et de réduire l'expérimentation animale.

Dans ce contexte et dans le but d'étudier l'interaction de composés bioactifs de l'alimentation avec l'intestin en état d'inflammation, le premier objectif de ce travail de thèse a été la mise au point d'un modèle *in vitro* d'intestin enflammé associant en co-culture deux lignées intestinales humaines : les Caco-2 TC7 (entérocytes) et HT29-MTX (cellules caliciformes) et une lignée immunitaire de macrophages (THP1). Plusieurs marqueurs d'inflammation ont été évalués et nous avons pu montrer que le modèle de tri-culture répondait à un stimulus inflammatoire (LPS/IFN $\gamma$ ), par une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL6 et IL8) et d'enzymes (INOS et COX2) ainsi que l'expression de leurs gènes. Par ailleurs, une augmentation de la perméabilité épithéliale *via* une altération des jonctions serrées (TJs) a également pu être mise en évidence ainsi qu'une surproduction de mucus, lesquels sont des caractéristiques reconnus d'inflammation.

Le deuxième objectif était d'étudier l'interaction de la  $\beta$ -cryptoxanthine (BCX), caroténoïde des agrumes, lipophile et anti-oxydant, avec le modèle enflammé. Nous avons utilisé pour solubiliser la BCX deux types de micelles (artificielles et physiologiques) et étudié les marqueurs d'inflammation. Bien qu'il semble d'après les résultats préliminaires que les micelles de BCX montrent une tendance à diminuer la production de certaines cytokines (IL6 et IL8), le rôle des constituants des micelles (Tween 40 ou sels biliaires/phospholipides) dans ce phénomène observé et dans la perméabilité épithéliale reste à clarifier par la suite.

**Mots clés : inflammation intestinale, co-culture cellulaire, cytokines, perméabilité intestinale, BCX**

## SUMMARY

The intestinal epithelium, main place of the absorption of (micro)-nutrients is also the first body's defense system. An imbalance in homeostasis can lead to an inflammatory reaction associated with defects in the intestinal barrier and immune function as well as malabsorption of nutrients, as seen in IBD (Inflammatory Bowel Diseases), in micronutrient fortification strategies and noncommunicable diseases (obesity). It is therefore important to find ways of action, for example through diet, to prevent or at least reduce the nutritional and pathological consequences of intestinal inflammation, and to understand the mechanisms involved. Among intestinal models, *in vitro* cell culture models are increasingly used and allow to evaluate the molecular mechanisms in a simple and reproducible way and to reduce animal experimentation.

In this context and in order to study the interaction of dietary bioactive compounds with the intestine in state of inflammation, the first objective of this work was the development of an *in vitro* model of inflamed intestine combining in co-culture two human intestinal cell lines: Caco-2 TC7 (enterocytes) and HT29-MTX (goblet cells) and an immune cell line of macrophages (THP1). Several inflammation markers were evaluated and we were able to show that the tri-culture model responded to an inflammatory stimulus (LPS / IFN $\gamma$ ), by increasing the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL6 and IL8) and enzymes (INOS and COX2) as well as the expression of their genes. In addition, an increase of epithelial permeability *via* tight junctions (TJs) alteration has also been demonstrated, as well as overproduction of mucus, which are recognized inflammation characteristics.

The second objective was to study the interaction of  $\beta$ -cryptoxanthin (BCX), a lipophilic and antioxidant carotenoid of citrus, with the inflamed model. To solubilize BCX, we used two types of micelles (artificial and physiological) and studied markers of inflammation. Although it appears from the preliminary results that BCX micelles show a tendency to decrease the production of some cytokines (IL6 and IL8), the role of micelle constituents (Tween 40 or bile salts / phospholipids) in the phenomenon observed and in the epithelial permeability remains to be therefore clarified.

**Keywords: gut inflammation, cell co-culture, cytokines, intestinal permeability, BCX**

# TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION</b>	<b>7</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>10</b>
<b>1. Caractéristiques de la barrière intestinale saine et enflammée</b>	<b>11</b>
<b>2. Modèles <i>in vitro</i> de culture cellulaire d'inflammation intestinale</b>	<b>13</b>
2.1. Principales lignées cellulaires intestinales	13
2.1.1. Lignée cellulaire Caco-2	13
2.1.2. Lignée cellulaire HT-29	14
2.1.3. Lignée cellulaire T84	15
2.2. Co-cultures de cellules intestinales et immunitaires comme modèle d'inflammation	16
2.2.1. Principales lignées cellulaires immunitaires utilisées en co-culture	16
2.2.1.1. PBMC	16
2.2.1.2. Lignée cellulaire THP1	16
2.2.1.3. Lignée cellulaire RAW 264.7	17
2.2.2. Modèles de co-culture 2D	17
2.2.3. Modèles de co-culture 3D	18
<b>3. Composés bioactifs de l'alimentation : transport et potentiel antioxydant / anti-inflammatoire dans les modèles de culture cellulaire intestinale</b>	<b>20</b>
3.1. Cas des polyphénols	20
3.2. Cas des caroténoïdes	21
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>23</b>
<b>1. Culture cellulaire</b>	<b>24</b>
1.1. Lignées cellulaires et conditions de culture	24
1.2. Essais préliminaires pour la mise au point des conditions du modèle de tri-culture cellulaire	24
1.3. Mise en place du modèle de tri-culture Caco-2 TC7 / HT29MTX / THP-1 en état d'inflammation	27
<b>2. Caractérisation de la couche de mucus</b>	<b>29</b>
2.1. Coloration du mucus au bleu Alcian	29
2.2. Coloration histochimique du mucus	29
<b>3. Cytotoxicité cellulaire par mesure de la LDH</b>	<b>30</b>
<b>4. Evaluation de la perméabilité intestinale</b>	<b>30</b>
4.1. Mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER)	30
4.2. Transport du rouge de phénol	31
<b>5. Marquage immunofluorescent du mucus et des jonctions serrées</b>	<b>31</b>
<b>6. Expression génique des marqueurs d'inflammation (RT-qPCR)</b>	<b>32</b>
<b>7. Quantification des cytokines pro-inflammatoires par ELISA</b>	<b>33</b>
<b>8. Interaction de la <math>\beta</math>-cryptoxanthine (BCX) avec le modèle <i>in vitro</i> d'inflammation intestinale</b>	<b>34</b>
8.1. Préparation des micelles-BCX (artificielles et physiologiques)	34
8.1.1. Préparation des micelles Tween	34
8.1.2. Préparation des micelles physiologiques	34
8.2. Interaction de la BCX avec le modèle d'inflammation en tri-culture	34
<b>9. Analyse statistique</b>	<b>35</b>

<b>RESULTATS</b>	<b>36</b>
<b>1. Modèle <i>in vitro</i> d'inflammation intestinale</b>	<b>37</b>
1.1. Détermination des conditions optimales du développement du modèle	37
1.2. Caractérisation de la production de mucus dans la biculture	40
1.3. Effets de la stimulation par le LPS et l'IFN $\gamma$ à faible dose sur le modèle cellulaire d'inflammation intestinale	43
1.3.1. Cytotoxicité et perméabilité épithéliale	43
1.3.2. Marquage immunofluorescent des jonctions serrées (microscopie confocale)	46
1.3.3. Marqueurs d'inflammation en condition de faible stimulation par le LPS et l'IFN $\gamma$	49
1.4. Effets de la stimulation par le LPS et l'IFN $\gamma$ à forte dose sur le modèle cellulaire d'inflammation intestinale	53
1.4.1. Cytotoxicité et perméabilité épithéliale	53
1.4.2. Marqueurs d'inflammation en condition de forte stimulation par le LPS et l'IFN $\gamma$	55
<b>2. Interaction de la <math>\beta</math>-cryptoxanthine (BCX) avec le modèle <i>in vitro</i> d'inflammation intestinale</b>	<b>59</b>
2.1. Utilisation de micelles artificielles contenant la BCX	59
2.1.1. Cytotoxicité	59
2.1.2. Influence des micelles artificielles de BCX sur la production de cytokines pro-inflammatoires	60
2.1.3. Transport de la BCX à travers la monocouche cellulaire	60
2.2. Utilisation des micelles physiologiques contenant la BCX	61
2.2.1. Cytotoxicité et perméabilité épithéliale	61
2.2.2. Influence des micelles physiologiques de BCX sur la production de cytokines pro-inflammatoires	62
2.2.3. Transport de la BCX à travers la monocouche cellulaire	65
2.3. Utilisation des micelles physiologiques contenant la BCX en prévention	66
2.3.1. Cytotoxicité et perméabilité épithéliale	66
2.3.2. Influence des micelles physiologiques de BCX sur la production de cytokines pro-inflammatoires	67
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>70</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>77</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>80</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>87</b>

## ABREVIATIONS ET ACRONYMES

AANE : Acides aminés non essentiels  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire  
AGCC : Acides gras à chaîne courte  
AJC : Complexe de jonction apical (de l'anglais « apical junction complex »)  
Ajs : Jonctions adhérentes (de l'anglais « adherens junctions AJs »)  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
ATCC : American Type Culture Collection  
βCX : β-cryptoxanthine  
ϕ : Cellules  
CO<sub>2</sub> : Dioxide de carbone  
Ca<sup>+2</sup> : ion calcium  
CU : Colite ulcéreuse  
COX-2 : Cyclo-oxygénase  
DMEM-GlutaMAX : Dulbecco's Modified Eagle Medium + Gluta-MAX™  
DMSO : Dyméthylsulfoxyde  
DO : Densité optique  
DPBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline  
EDTA : Ethylenediamine tetra-acetate  
ELISA : Méthode immuno-enzymatique (de l'anglais « enzyme-linked immunosorbent assay »)  
ESC : Cellules souches embryonnaires (de l'anglais « embryonic stem cells »)  
IFN<sub>γ</sub> : Interféron gamma  
iPSCs : Cellules souches pluripotentes induites (de l'anglais « induced pluripotent stem cells »)  
HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique, composé organique zwitterionique  
HIE : Entéroïde/colonoïde intestinal humain (de l'anglais « human intestinal enteroids/colonoids »)  
HIO : Organoïde intestinal humain (de l'anglais « human intestinal organoid »)  
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance (de l'anglais « high pressure liquid chromatography »)  
iNOS : Oxyde nitrique synthase  
LPS : Lipopolysaccharide  
MC : Maladie de Crohn  
MEC : Matrice extracellulaire  
MEFs, P0 : Fibroblastes embryonnaires primaires de souris  
Mg<sup>+2</sup>: ion magnésium  
MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin  
NF-κB : Nuclear factor kappa-B  
NO : Oxyde nitrique  
Papp : Perméabilité apparente  
PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique humain (de l'anglais « cellules mononuclées du sang périphérique humain »)  
qPCR : Réaction en chaîne de la polymérase quantitative (de l'anglais « quantitative polymerase chain reaction »)  
RT-qPCR : Réaction en chaîne de la polymérase quantitative en temps réel  
PEs : améliorant de la perméabilité (de l'anglais « permeation enhancers »)

PET : Polytéréphtalate d'éthylène  
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate  
ROS : espèces réactives de l'oxygène (de l'anglais « reactive oxygen species »)  
RPMI-1640 : Roswell Park Memorial Institute 1640  
SVF : Sérum de Veau Fœtal  
TEER : Résistance électrique transépithéliale  
TGF- $\beta$ 1 : Factor de croissance transformant  $\beta$ 1  
TJs : Jonctions serrées (de l'anglais « tight junctions : TJs »)  
TLR : Récepteur Toll-like  
Treg : Lymphocytes T régulateurs  
ZO : Zonula occludens

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

L'épithélium intestinal, siège de l'absorption des (micro)-nutriments est aussi le premier système de défense de l'organisme. Il est l'organe clé de l'immunité du système digestif mais aussi de notre défense immunitaire globale, en agissant comme une barrière avec un rôle essentiel dans la régulation de l'échange de molécules et de fluides. Cette barrière est formée par différents types des cellules et l'intestin abrite aussi une communauté dense et diversifiée de micro-organismes constituant le microbiote intestinal. Cette relation symbiotique hôte-micro-organismes joue un rôle crucial dans le maintien ou non de l'homéostasie intestinale. Un déséquilibre peut alors être à l'origine d'une réaction inflammatoire de l'intestin associée à des défauts de la barrière intestinale et de la fonction immunitaire, ainsi qu'une malabsorption des nutriments (Benjamin et al. 2008; Forbes et al. 2017; Massironi et al. 2013; Mijač et al. 2010).

L'étiologie de l'inflammation intestinale, dont l'incidence et la prévalence augmentent partout dans le monde, n'est toujours pas entièrement comprise, bien que l'on sache que plusieurs causes sont impliquées (Molodecky et al. 2012; Loftus Jr 2004). L'inflammation de bas ou haut niveau (« low or high grade inflammation ») est souvent associée à des conditions pathologiques (ex. maladies infectieuses, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin) mais aussi à des maladies chroniques non transmissibles (ex. obésité) (Ding et Lund 2011; Esser et al. 2014; Walters, Xu, et Knight 2014). De plus, il a été montré que les techniques de fortification ou supplémentation en minéraux comme le fer pouvaient entraîner également un état inflammatoire de l'intestin avec modification du microbiote (Zimmermann et al. 2010; Dostal et al. 2012; Jaeggi et al. 2015; Tolkien et al. 2015). Nous savons aussi que l'épithélium intestinal, de par sa fonction, est continuellement exposé aux composants alimentaires, y compris les composés bioactifs présentant des risques ou des bénéfices potentiels pour la santé. Parmi ces composés, des micro-constituants des végétaux tels que les polyphénols ou les caroténoïdes se sont avérés avoir des effets anti-inflammatoires et antioxydants sur les troubles chroniques (Ferguson 2014). Il est donc important aujourd'hui de trouver des moyens d'action, via l'alimentation par exemple, pour prévenir ou au minima réduire, les conséquences nutritionnelles et pathologiques de l'inflammation intestinale, et de comprendre les mécanismes impliqués.

Ainsi, au cours des dernières décennies, des modèles *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* ont été mis au point pour étudier les différentes fonctions de l'épithélium intestinal et son métabolisme, en particulier à l'état enflammé. Bien que les modèles animaux puissent simuler au mieux la physiologie d'un organisme entier, les principaux inconvénients des modèles *in vivo*, en plus des problèmes éthiques, sont la variation des réponses due aux différences entre les espèces et la difficulté d'extrapoler les résultats à l'Homme (Fitzgerald et al. 2015). L'utilisation de modèles *in vitro* de culture cellulaire a de ce fait considérablement augmenté, en particulier dans les études de biodisponibilité et de toxicologie dans les domaines alimentaire et pharmaceutique. Des modèles *in vitro* améliorés utilisant des cellules d'origine humaine ont l'avantage de réduire l'expérimentation animale et permettent d'étudier les mécanismes moléculaires d'une manière simple et reproductible. En outre, des modèles *in vitro* de co-culture cellulaire ont été également développés dans l'objectif de se rapprocher aux mieux de la complexité morphologique et fonctionnelle de la barrière intestinale.

## INTRODUCTION

Dans ce contexte, le travail de ma thèse a eu comme objectif la mise au point d'un modèle *in vitro* de tri-culture cellulaire dans le but de pouvoir étudier par la suite l'interaction de micro-constituants alimentaires avec l'intestin en état d'inflammation. Dans le cadre de mon travail, il a été décidé d'étudier en particulier le rôle de la  $\beta$ -cryptoxanthine, caroténoïde pro-vitaminique A le plus présent dans la mandarine et l'orange et connu pour ses effets antioxydants.

Dans ce manuscrit je présente d'abord une étude bibliographique résumant les connaissances dans la littérature sur les différents modèles *in vitro* d'inflammation intestinale existants et leur utilisation potentielle pour l'étude des composés alimentaires bioactifs. Cette étude bibliographique a été valorisée par la publication d'une revue dans le journal *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Ponce de León-Rodríguez, Guyot, et Laurent-Babot 2018). Les matériels et méthodes utilisés lors des travaux de recherche sont ensuite décrits. Les résultats des travaux sont présentés dans deux parties distinctes : la première est consacrée au développement et à la validation du modèle *in vitro* d'inflammation intestinale, par l'étude de différents paramètres liés à l'inflammation, alors que la seconde présente les résultats préliminaires obtenus lors de l'étude de l'interaction de la  $\beta$ -cryptoxanthine avec le modèle. Enfin, le dernier chapitre est consacré à la discussion générale des résultats mettant en avant les points forts mais aussi les limites de ce travail, ainsi que les différentes perspectives proposées.

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. Caractéristiques de la barrière intestinale saine et enflammée

Caractérisé par une monocouche cellulaire, l'épithélium intestinal est principalement composé de cellules absorbantes polarisées, les entérocytes. Cependant, d'autres cellules épithéliales spécialisées sont également présentes, notamment des cellules caliciformes, des cellules M (de l'anglais « Microfold cell » retrouvées dans les plaques de Peyer) et des cellules de Paneth, constituant l'ensemble de la paroi intestinale. Les cellules caliciformes sont responsables de la production de mucines qui forment une couche de mucus protectrice, les cellules M ont une activité de transport transépithélial d'antigènes et de bactéries provenant de la lumière intestinale et les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens (défensines) et des facteurs de croissance. L'épithélium intestinal est une barrière importante entre la lumière intestinale et la lamina propria et sert d'interface dynamique entre l'environnement externe et les tissus de l'intestin (Viladomiu et al. 2013; Wehkamp et al. 2005). Ces cellules coopèrent toutes pour empêcher l'entrée de micro-organismes et d'autres particules dans l'hôte et sont également impliquées dans la croissance et la réparation épithéliale en maintenant l'intégrité de la muqueuse. Sous la monocouche épithéliale de l'intestin, les cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes) sont répandues dans la lamina propria. Ces cellules de défense sont plus concentrées dans les plaques de Peyer (organe lymphoïde secondaire) et interagissent avec les cellules épithéliales *via* des facteurs solubles tels que des facteurs de croissance, des cytokines et des enzymes (Abraham et Cho 2009).

L'épithélium intestinal est une barrière perméable qui joue également un rôle majeur dans la régulation des échanges de solutés et de fluides, avec des conséquences directes sur l'absorption et le transport des nutriments. Cet échange nécessaire se produit *via* les jonctions intercellulaires présentes entre les cellules, ce qui permet le transport paracellulaire. En conséquence, les dommages cellulaires directs observés, par exemple dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), provoquent une perte de fonction de la barrière. Des preuves cliniques ont montré que la malnutrition est une caractéristique courante chez les patients atteints de MICI (Benjamin et al. 2008; Forbes et al. 2017; Massironi et al. 2013; Mijač et al. 2010). Diverses carences en micronutriments, par ex. des minéraux (Fe, Zn), des vitamines (D, A, B9, B12), ou des protéines ont été rapportés chez des patients souffrant de troubles intestinaux chroniques (Conklin et Oliva-Hemker 2010; Mallon et Suskind 2010; Vagianos et al. 2007). De plus, les changements de perméabilité peuvent entraîner une interaction plus étroite entre les cellules immunitaires de la lamina propria et le contenu de la lumière intestinale (Hering et Schulzke 2009). Par conséquent, les molécules alimentaires et divers micro-organismes, y compris le microbiote, favorisent l'activation prolongée du système immunitaire muqueux (Geremia et al. 2014; Shanahan et Quigley 2014; Vindigni et al. 2016).

Les jonctions intercellulaires épithéliales qui forment le complexe de jonction apical (de l'anglais « apical junction complex : AJC ») sont essentielles pour préserver la fonction de barrière intestinale. L'AJC formé par les protéines transmembranaires est représenté par les jonctions serrées (de l'anglais « tight junctions : TJs », par exemple occludine et claudines) et les jonctions adhérentes (de l'anglais « adherens junctions AJs », par exemple E-cadhérine) qui interagissent avec le cytosquelette *via* des protéines cytoplasmiques comme les protéines zonula occludens (ZO) ou la famille des catenins (Furuse 2010; Van Itallie et Anderson 2006; Yamazaki et al. 2011). Le transport paracellulaire est régulé par les TJs, qui scellent l'espace entre les cellules épithéliales adjacentes et contrôlent le passage des molécules avec une sélection en fonction de leur taille et charge. De plus, la voie de transport actif des nutriments (par exemple, les co-transporteurs de Na<sup>+</sup>) dépend du gradient de concentration transépithélial généré par le flux d'ions à travers les TJs (Liang et Weber 2014; Turner 2009). Les altérations de la perméabilité

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

entraînent une perte d'eau en plus de la malabsorption des nutriments. Par conséquent, l'homéostasie dépend considérablement d'un système de TJs parfaitement fonctionnel.

En plus de servir de barrière physique, l'épithélium intestinal joue également un rôle majeur dans le système de défense de l'hôte. Comme décrit ci-dessus, les cellules immunitaires sont présentes dans la lamina propria (plaques de Peyer), faisant de l'intestin le principal organe immunitaire du corps humain. Dans des conditions de bonne santé, la barrière intestinale est dans un état nécessaire et continu d'inflammation « contrebalancé » avec un équilibre fragile qui peut être altéré par plusieurs facteurs. L'homéostasie peut être perturbée par des processus aigus et chroniques. Par exemple, lors d'infections intestinales, des agents pathogènes tels que *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile* ou *Giardia* déstabilisent souvent le système des TJs de l'hôte et provoquent par la suite des épisodes de diarrhée (Nusrat et al. 2001; O'Hara et Buret 2008; Simonovic et al. 2000). L'étiologie des troubles chroniques intestinaux comme les MICI n'est toujours pas clair, bien qu'il soit certain que de multiples causes y sont associées. La colite ulcéreuse (CU) et la maladie de Crohn (MC) sont les principales maladies inflammatoires chroniques de l'intestin étudiées, car leur prévalence est la plus élevée au monde (Loftus Jr 2004; Molodecky et al. 2012).

De nombreuses études suggèrent que les altérations des TJs et les modifications subséquentes de la perméabilité exacerbent le processus inflammatoire des MICI en raison d'un déséquilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires produites par les cellules immunitaires (Neurath 2014; Pandolfi et al. 2010; T. Suzuki 2012). Il a été démontré que des cytokines telles que TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  et IL-13 induisent un dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale qui augmente l'infiltration paracellulaire des molécules luminales potentiellement antigéniques (Al-Sadi et al. 2011; Heller et al. 2005; Turner 2006; Utech et al. 2005; F. Wang et al. 2005; Watson et al. 2005). Cela suggère que la fonction de la barrière intestinale joue un rôle crucial dans la physiopathologie des MICI, mais il reste difficile de savoir si ces changements font partie de la cause ou de la conséquence de l'inflammation chronique. De même, différentes études ont montré les effets de l'alimentation sur l'intégrité des TJs (T. Suzuki 2012; Kosińska et Andlauer 2013). Selon des études *in vitro*, des composants alimentaires tels que les polyphénols ou les peptides de la caséine pourraient améliorer la fonction de la barrière intestinale, tandis que d'autres, comme l'éthanol et l'acétaldéhyde, son métabolite, auraient un impact négatif (Ferguson 2014; Samak, Aggarwal, et Rao 2011; Shimizu 2017; T. Suzuki, Tanabe, et Hara 2011; Yasumatsu et Tanabe 2010).

Des rapports récents suggèrent fortement que le microbiote intestinal joue un rôle important dans la préservation de la santé intestinale. Une perturbation de l'équilibre de la composition du microbiote peut représenter un risque d'infections (Khosravi et Mazmanian 2013). Ce déséquilibre peut également modifier la réponse du système immunitaire intestinal et la fonction de barrière épithéliale qui favorise le développement des MICI et pourrait même avoir des conséquences extra-intestinales (Brown, Sadarangani, et Finlay 2013; Cammarota et al. 2015; Fyderek 2009; Kamada et al. 2013; Kostic, Xavier, et Gevers 2014; Manichanh et al. 2012; Reiff et Kelly 2010).

Les modifications de la composition du microbiote ont également été associées à une réduction du métabolisme des acides gras à chaîne courte (AGCC) dont l'activité anti-inflammatoire et immunorégulatrice est connue (Arpaia et al. 2013; Maslowski et al. 2009; Smith et al. 2013; Vieira et al. 2012). Malgré les informations disponibles limitées, il existe des rapports concernant l'impact alimentaire sur le microbiote intestinal et le lien que ces changements pourraient avoir avec les MICI (Sheehan, Moran, et Shanahan 2015; G. D. Wu et al. 2011; Zimmer et al. 2012). Comme mentionné ci-dessus, l'épithélium intestinal joue un rôle important dans l'immunité. Les macrophages et les cellules dendritiques présentes dans la lamina propria sont responsables de la détection des antigènes dans la lumière intestinale tandis que les lymphocytes T régulateurs (Treg) maintiennent un équilibre en supprimant une réponse immunitaire anormale

contre le microbiote ou les antigènes alimentaires (Geremia et al. 2014; Strober, Ivan J. Fuss, et Blumberg 2002). Il est donc clair que les interactions altérées entre le microbiote intestinal et la réponse immunitaire jouent également un rôle important dans l'inflammation intestinale (Kamada et Núñez 2014). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour comprendre clairement cette relation.

D'après certaines études épidémiologiques, les changements dans la consommation alimentaire, avec une prise accrue de protéines animales, d'acides gras n-6 et de « fast-food » parmi d'autres éléments de l'alimentation, seraient liés aux modifications du microbiote et au risque de développement des MICI. En revanche, un régime de type méditerranéen, riche en légumes, en fruits, en céréales et en poisson, mais aussi en huile d'olive et en vin rouge, réduirait le risque de MICI. Cependant, aucun aliment n'a été identifié comme élément causal dans les études sur l'association entre l'alimentation et les MICI en raison de difficultés d'interprétation (Ng et al. 2013). En dehors des facteurs alimentaires, du dysfonctionnement des TJs et du système immunitaire et du déséquilibre potentiel du microbiote, d'après la littérature des facteurs génétiques, environnementaux et socio-économiques pourraient également influencer le développement des MICI (J. H. Cho 2008; Khor, Gardet, et Xavier 2011; Liu et Stappenbeck 2016; Ng et al. 2013).

## **2. Modèles *in vitro* de culture cellulaire d'inflammation intestinale**

Les progrès technologiques réalisés au cours des 40 dernières années dans le domaine de la culture cellulaire ont permis d'accroître la recherche sur les troubles intestinaux et les mécanismes physiologiques de la barrière intestinale dans le but de minimiser les expériences *in vivo* préalables aux essais cliniques. La culture cellulaire est devenue un outil essentiel en toxicologie et en nutrition depuis l'établissement de lignées cellulaires *in vitro* d'origine animale et humaine. L'utilisation de cultures de cellules primaires est limitée par leur disponibilité, leur répétabilité et leur utilisation dans des études à long terme en raison de leur courte durée de vie, mais les lignées de cellules transformées sont largement utilisées (Langerholm et al. 2011; Zucco et al. 2005). La mise au point de modèles *in vitro* pour imiter l'environnement *in vivo* a nécessité la caractérisation de lignées cellulaires en tant que modèles de monoculture ou de co-culture avant de pouvoir être utilisées avec succès. Dans ce contexte, les lignées cellulaires humaines ont été favorisées.

### **2.1. Principales lignées cellulaires intestinales**

#### **2.1.1. Lignée cellulaire Caco-2**

La lignée de cellules épithéliales humaines Caco-2 a été la lignée cellulaire la plus utilisée comme modèle intestinal pour les études d'absorption, de transport et de biodisponibilité au cours des dernières décennies (Cheng, Li, et Uss 2008; Hidalgo, Raub, et Borchardt 1989; Hillgren, Kato, et Borchardt 1995). Cette lignée cellulaire a été isolée d'un adénocarcinome colorectal humain et établie par Fogh & Trempe en 1974 (Fogh et Trempe 1975). Cette lignée est bien caractérisée en tant que modèle entérocytaire grâce à ses caractéristiques morphologiques et fonctionnelles exprimées après différenciation. Il faut environ cinq jours à ces cellules pour atteindre la confluence et commencer spontanément à se différencier pendant 30 jours de culture. Une fois différenciées, elles forment une monocouche cellulaire polarisée avec des membranes apicales et basolatérales, un complexe de jonction intercellulaires et une bordure en brosse avec des microvillosités du côté apical typiques des entérocytes humains (Isabelle Chantret et al. 1988; Hidalgo, Raub, et Borchardt 1989; Pinto et al. 1983). L'expression d'enzymes telles que les

hydrolases (saccharase-isomaltase, lactase, etc.) présentes dans les microvillosités intestinales (I. Chantret et al. 1994; Howell, Kenny, et Turner 1992; Vachon et Beaulieu 1992) et différents transporteurs membranaires sont également des traits de la lignée cellulaire Caco-2 (Lea 2015). Cependant, cette lignée cellulaire présente certaines limites, notamment la formation d'une monocouche hétérogène liée au temps de culture et au nombre de passages (Artursson, Palm, et Luthman 2001) et la présence de zones multicouches (Briske-Anderson, Finley, et Newman 1997). Les conditions de culture peuvent également sélectionner des sous-populations de cellules (Lea 2015). De plus, cette lignée cellulaire n'est pas capable de se différencier en cellules caliciformes, ainsi leur incapacité à produire du mucus est une limitation importante.

Divers clones de Caco-2 ont été établis pour réduire l'hétérogénéité (par exemple, Caco-2 TC7, Caco-2/15, Caco-2/AQ) (Sambuy et al. 2005). Le clone TC7 a été dérivé d'un passage tardif (198) de la lignée Caco-2 et se différencie plus rapidement que la lignée parentale (20 jours vs 30 jours) en conservant ses caractéristiques morphologiques et fonctionnelles et la monocouche formée est plus homogène et stable (Caro et al. 1995; I. Chantret et al. 1994; Ranaldi et al. 2003; Turco et al. 2011). De plus, le clone TC7 s'est avéré être un modèle approprié de la barrière de l'intestin grêle en termes de reproductibilité et de performance (Zucco et al. 2005).

Il a également été démontré que les cellules Caco-2 sont capables de produire des marqueurs inflammatoires (par exemple des cytokines) en réponse à d'autres cytokines telles que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et / ou l'IFN $\gamma$  (Hollebeeck et al. 2012; Rodríguez-Ramiro et al. 2013; Węglarz et al. 2006) et / ou dans certains cas, en réponse à des stimuli externes tels que les lipopolysaccharides (LPS) présents sur les membranes des micro-organismes (Barrera et Sánchez 2015; Maccaferri et al. 2012; Węglarz et al. 2006; Xu et al. 2012). Il est important de souligner que des rapports ont également montré que les cellules Caco-2 étaient hypo-réactives à la stimulation avec du LPS en raison de l'expression limitée du récepteur Toll-like impliqué dans la reconnaissance du LPS (TLR-4), même si ces cellules expriment le co-récepteur MD-2, essentiel à l'activation de NF- $\kappa$ B et à la sécrétion subséquente de cytokines pro-inflammatoires (M. Suzuki, Hisamatsu, et Podolsky 2003; Vamadevan et al. 2010).

### 2.1.2. Lignée cellulaire HT-29

La lignée cellulaire HT-29 est une autre lignée intestinale établie par Fogh & Trempe. Cette lignée cellulaire est également dérivée d'un adénocarcinome du côlon (Fogh et Trempe 1975) et a été utilisée comme modèle d'entérocytes dans des études de biodisponibilité et de mécanistique cellulaire (Andoh et al. 2001; Hagesaether 2011; Yi et al. 2016). La lignée HT-29 est considérée comme une lignée intestinale pluripotente car les changements dans le milieu de culture peuvent conduire à différentes voies de différenciation. Contrairement à la lignée cellulaire Caco-2, la différenciation des HT-29 n'est pas spontanée mais dépend plutôt des conditions nutritionnelles et de culture (Huet et al. 1987; Viallard et al. 1986; Zweibaum et al. 2011). Dans un milieu sans glucose, de manière similaire à la lignée Caco-2, les cellules HT-29 se différencient en cellules de type entérocyte exprimant des hydrolases telles que la saccharase-isomaltase, limitées à la bordure en brosse intestinale, alors qu'en présence de glucose, elles restent indifférenciées. De plus, la différenciation des cellules HT-29 peut être inhibée et inversée par l'addition de glucose au milieu (Zweibaum et al. 1985). Il existe d'autres différences entre les lignées Caco-2 et HT-29, comme par exemple une période de différenciation plus longue et l'absence d'expression de lactase dans la lignée HT-29. Néanmoins, la différence majeure entre les lignées cellulaires HT-29 et Caco-2 est que, dans certaines conditions de culture, les HT-29 peuvent se différencier en cellules caliciformes et avoir ainsi la capacité de produire du mucus (Zweibaum et al. 2011). Le mucus produit par les cellules caliciformes est un gel insoluble dans l'eau composé principalement d'oligomères de glycoprotéines et de monomères apparentés qui forment une couche protectrice dans l'intestin (Béduneau et al. 2014).

Les cellules HT29, lorsqu'elles sont traitées avec du butyrate de sodium, par exemple, se différencient en phénotypes distincts, comme l'ont démontré Augeron & Labois (1984), qui ont isolé différentes sous-populations de HT-29, dont certains clones sont des cellules sécrétrices de mucus et présentent des caractéristiques morphologiques analogues aux cellules caliciformes intestinales (Augeron et Labois 1984). Par la suite, lorsque l'accent a été mis sur la capacité des cellules HT-29 à s'adapter aux conditions métaboliques de stress, diverses populations de cellules sécrétant du mucus ont été isolées, dont HT29-FU, HT29-18N2 et HT29-MTX (Huet et al. 1987; T. Lesuffleur et al. 1993). Parmi ces populations, le clone stable HT29-MTX a été isolé sur le principe de la résistance des cellules HT-29 (irréversible) à de fortes concentrations de méthotrexate (MTX), après une adaptation progressive à ce médicament anticancéreux. Ce clone est ainsi capable de se différencier spontanément en cellules productrices de mucus de type caliciforme (Thécla Lesuffleur et al. 1990), lesquelles ont été utilisées par exemple comme modèle pour étudier l'adhésion cellulaire des bactéries lactiques (Turpin et al. 2012).

Les HT29-MTX ont également été largement utilisées dans les systèmes de co-culture avec la lignée cellulaire Caco-2 pour imiter la barrière intestinale humaine dans les études d'absorption et de perméabilité (Barnett et al. 2016; Béduneau et al. 2014; Behrens et al. 2001; Kaulmann, André, et al. 2016; Laparra, Glahn, et Miller 2009; Mahler, Shuler, et Glahn 2009; Nollevaux et al. 2006; Poquet, Clifford, et Williamson 2008; Selby-Pham et al. 2017). Par ailleurs, d'autres lignées cellulaires sécrétant du mucus ont été caractérisées y compris LS174T et LS180 (Tom et al. 1976) et des clones de ces lignées ont été isolés pour étudier les mucines (Kuan et al. 1987).

### 2.1.3. Lignée cellulaire T84

Une troisième lignée cellulaire fréquemment utilisée dans les études intestinales est la lignée T84, établie en 1980 par Murakami et Masui pour étudier le contrôle hormonal de la croissance cellulaire du carcinome du colon humain (Murakami et Masui 1980). Les cellules T84 se développent en monocouches de cellules polarisées qui montrent la présence de TJs et de microvillosités à la surface (Dharmasathaphorn et al. 1984). Contrairement à la différenciation spontanée des Caco-2, une particularité de la lignée cellulaire T84 est leur possible différenciation en cellules des cryptes intestinales (Madara et Dharmasathaphorn 1985) après induction par le facteur de croissance transformant humain recombinant (TGF- $\beta$ 1) ou d'autres facteurs solubles provenant des cellules mésenchymateuses. Cette caractéristique permet d'étudier le processus de différenciation (K. M. Juuti-Uusitalo et al. 2006).

Les cellules T84 ont également été utilisées pour étudier des mécanismes de transport des électrolytes (Alzamora et al. 2011; Beltrán et al. 2015; Nichols et al. 2015; Tang et al. 2010) et la perméabilité intestinale (Ewaschuk et al. 2008; H. Huang et al. 2016; Watson et al. 2005). En outre, cette lignée cellulaire a aussi été utilisée dans des études sur les voies de signalisation liées à la réponse inflammatoire de l'épithélium intestinal (Cario et al. 2000; J. A. Cho et Park 2015; de Kivit et al. 2011; K. Juuti-Uusitalo et al. 2011; Ou et al. 2009; Vamadevan et al. 2010) et l'interaction bactéries-entérocytes (Otte et Podolsky 2004).

Malgré l'utilisation très répandue des Caco-2, HT29 et T84, il est nécessaire de préciser qu'il existe d'autres lignées cellulaires intestinales humaines (par exemple, SW480, H4) ainsi que des modèles de cellules animales (Langerholc et al. 2011; Leibovitz et al. 1976). Dans ce contexte, un profil d'expression génique de certaines de ces lignées intestinales couramment utilisées a été publié en 2012 afin d'orienter le choix du modèle *in vitro* le plus approprié pour des études spécifiques (Bourgine et al. 2012).

Ainsi, ces modèles *in vitro* permettent l'étude simple et reproductible de mécanismes cellulaires au niveau moléculaire difficiles à réaliser *in vivo*. Actuellement, des inserts en

polycarbonate avec des membranes semi-perméables utilisés comme systèmes de culture facilitent l'observation des molécules se déplaçant à travers la monocouche cellulaire (systèmes compartimentés).

En conséquence, ces dernières années, de nombreuses études ont été réalisées pour caractériser l'absorption, le transport et la biodisponibilité de composants alimentaires ou de molécules d'intérêt thérapeutique. Même si l'on doit faire preuve de prudence lors de la comparaison des résultats *in vitro* et *in vivo*, ces travaux de recherche permettent toutefois de fournir des informations intéressantes.

### **2.2. Co-cultures de cellules intestinales et immunitaires comme modèle d'inflammation**

Dans l'objectif d'améliorer les modèles cellulaires simples, des systèmes de co-culture 2D ou 3D associant plusieurs types cellulaires ont été développés en tant que modèles d'inflammation intestinale et sont présentés dans les tableaux de synthèse en annexe. Depuis la fin des années 1990, un intérêt croissant est observé pour l'amélioration des modèles de barrière intestinale en incluant des cellules immunitaires dans les cultures (Kernéis et al. 2000) en présence ou non d'une matrice extracellulaire. Les principales cellules immunitaires utilisées pour établir ces systèmes de co-culture avec des lignées cellulaires intestinales comprennent des cellules primaires comme les cellules mononuclées du sang périphérique humain (PBMC) et des lignées cellulaires de type macrophage d'origine humaine (THP-1) ou murine (RAW 264.7).

#### *2.2.1. Principales lignées cellulaires immunitaires utilisées en co-culture*

##### 2.2.1.1. PBMC

Les PBMC sont obtenues à partir des couches leuco-plaquettaires de donneurs sains généralement par centrifugation en gradient de Ficoll et comprennent les lymphocytes, les monocytes et les cellules dendritiques. La présence de marqueurs cellulaires pour les macrophages et les cellules dendritiques a été décrite dans des co-cultures utilisant des PBMC (Leonard, Collnot, et Lehr 2010). Cependant, compte tenu de leurs différences de phénotype, les cellules isolées du sang pourraient présenter des réponses différentes de celles présentes dans la lamina propria intestinale (Kleiveland 2015).

##### 2.2.1.2. Lignée cellulaire THP1

La lignée cellulaire THP-1 a été isolée à partir du sang périphérique d'un patient de 1 an souffrant de leucémie monocyttaire aiguë et caractérisée en tant que lignée cellulaire monocyttaire (Tsuchiya et al. 1980). Ces cellules peuvent être cultivées *in vitro* pendant environ 3 mois (passage 25) sans modification de la sensibilité ou de l'activité cellulaire. Les cellules THP-1 peuvent se différencier en macrophages sous traitement au phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) ou en cellules dendritiques en les transférant dans un milieu sans sérum et en les traitant ensuite avec un mélange d'IL-4, GM-CSF, TNF- $\alpha$  et ionomycine (Chanput, Peters, et Wichers 2015). Cette lignée cellulaire a été caractérisée comme un modèle de modulation immunitaire (Chanput et al. 2013; Chanput, Mes, et Wichers 2014) et a également été largement utilisée pour étudier la production de ROS et l'inflammation. Par exemple, la lignée cellulaire THP-1 a été utilisée comme modèle pour analyser les effets anti-inflammatoires des polyphénols (Chanput et al. 2010; S.-M. Huang, Wu, et Yen 2006; C.-H. Wu et al. 2011) ou des acides gras (S. Huang et al. 2012). L'utilisation des THP-1 pourrait présenter certains avantages par rapport aux PBMC, en raison de son origine génétique homogène qui réduit la variabilité du phénotype cellulaire, améliorant ainsi la reproductibilité des expériences.

### 2.2.1.3. Lignée cellulaire RAW 264.7

Parmi les lignées immunitaires fréquemment utilisées on trouve aussi la lignée monocyttaire murine RAW 264.7. Cette lignée a été établie à partir d'une tumeur murine induite par le virus de la leucémie d'Abelson et présente des propriétés des macrophages (Raschke et al. 1978). Il a été démontré que ces cellules ressemblent aux macrophages dérivés de la moelle osseuse murine en termes de récepteurs de la surface cellulaire et de réponse aux ligands microbiens impliquant des récepteurs Toll-like (TLRs) (Berghaus et al. 2010). Cependant, ces mêmes auteurs ont conclu de rester prudent concernant l'interprétation et l'extrapolation des résultats en raison de possibles changements dans les cellules RAW en culture continue (Berghaus et al. 2010). De plus, des possibles réactions croisées inter-espèces devraient également être prises en compte dans les modèles de co-culture qui combinent des lignées cellulaires murines (par exemple, des cellules RAW) et humaines telle que les cellules Caco-2, pour étudier des effets anti-inflammatoires.

### 2.2.2. Modèles de co-culture 2D

L'établissement de co-cultures de différents types de cellules permet alors d'étudier la communication cellule-cellule (intercellulaire) et d'étudier l'influence de ces interactions sur la croissance, la différenciation et la réponse immunitaire. Cela permet également d'explorer l'effet des composants alimentaires et la réponse des cellules à l'exposition à ces composants dans des conditions de bonne santé ou pathologiques. Même si les modèles *in vitro* ne reproduisent pas complètement la complexité de la physiologie humaine, ces modèles facilitent l'étude des mécanismes de contact cellulaire et des réponses à des facteurs solubles tels que les cytokines. Un tableau de synthèse listant les différents modèles 2D d'inflammation intestinale est présenté en annexe A.

Actuellement, la plupart des modèles de co-culture impliquant des cellules intestinales et immunitaires utilisent des systèmes de culture sur insert dans lesquels les deux types cellulaires ne sont pas en contact direct. Ce système est constitué de deux compartiments distincts (apical et basal) séparés par une membrane poreuse. Cependant, il existe quelques études dans lesquelles des cellules à la fois intestinales et immunitaires ont étéensemencées dans le même compartiment (Susewind et al. 2016) ou en utilisant des modèles inversés (Araújo et al. 2016; des Rieux et al. 2007; Mori, Satsu, et Shimizu 2003; P. C. Tyrer et al. 2011). Cela permet un contact direct entre les deux types de cellules et donc l'étude de la migration des cellules immunitaires dans la monocouche intestinale.

Pourtant, les modèles de culture cellulaire 2D présentent certaines limites, notamment des interactions intercellulaires réduites, le manque d'interactions cellule-matrice et l'architecture des tissus n'est pas complètement recréée. Fitzgerald et al. (2015) ont examiné ces inconvénients en termes d'évaluation de nouvelles stratégies d'administration de médicaments (Fitzgerald et al. 2015). Malgré leurs limites, les modèles 2D *in vitro* sont un outil utile pour étudier les interactions entre les composants alimentaires et les cellules intestinales au cours d'une inflammation intestinale. À ce jour, seules quelques études ont associé les effets des composants alimentaires à l'inflammation intestinale en utilisant des modèles de co-culture 2D. Quelques exemples seront présentés ultérieurement, dans la partie 3 de cette révision bibliographique.

### 2.2.3. Modèles de co-culture 3D

Les modèles *in vitro* évoluent constamment, allant des monocultures simples aux cultures 3D dans lesquelles les cellules sont cultivées au sein d'une matrice extracellulaire (MEC), en passant par les co-cultures 2D utilisant des supports plastiques, comme observé précédemment. Un tableau de synthèse des différents modèles 3D existants est présenté en annexe B.

Kim et al. (2014) ont observé des différences dans la fonction de barrière (perméabilité) entre un modèle 2D et un modèle de villosités 3D utilisant des cellules Caco-2 (S. H. Kim et al. 2014). De même, Yu et al. (2012) ont signalé des variations au cours de la différenciation cellulaire entre les modèles 2D et 3D, avec une différenciation cellulaire plus réaliste dans le modèle 3D le rendant plus efficace (Yu et al. 2012). Une autre des limites des modèles 2D, en particulier dans la recherche sur les tumeurs, est l'absence d'une véritable MEC avec des modifications de la structure, du potentiel d'adhésion, de la mécano-transduction et des résultats d'exposition à des facteurs solubles (Ryan et al. 2016). En effet, la MEC confère aux tissus des propriétés mécaniques et favorise la communication cellulaire. L'ancrage des récepteurs membranaires à la MEC régule l'interprétation par les cellules des signaux de leur environnement (Abbott 2003).

Grâce aux progrès de la bio-ingénierie, des systèmes de co-culture 3D ont été conçus en utilisant différentes plates-formes : structures d'échafaudages, hydrogels (collagènes, laminines), des sphéroïdes ou encore dispositifs micro-fluidiques avec des canaux capables de contrôler la diffusion de nutriments (Fitzgerald et al. 2015). Par exemple, Juuti-Uusitalo et al. (2011) ont utilisé des modèles 3D (cellules T84 et Caco-2) pour étudier l'effet du TNF (TNFSF2) et de l'INF $\gamma$  sur la morphogenèse et la perméabilité de l'épithélium intestinal. Leur travail a révélé des différences dans la réponse aux stimuli en utilisant un modèle 3D, et a montré que l'apoptose est un mécanisme important dans l'augmentation de la perméabilité après la stimulation avec le TNF. Ils ont également montré que cette cytokine pro-inflammatoire inhibe la morphogenèse épithéliale intestinale normale entraînant la formation de monocouches «perméables» dans le cas du modèle 3D avec des cellules T84 (K. Juuti-Uusitalo et al. 2011).

Au vu de la littérature, la plupart de ces modèles 3D et dispositifs micro-fluidiques ont été appliqués dans le domaine pharmaceutique en mettant l'accent sur la toxicologie et le criblage des médicaments. Par exemple, Leonard et al. (2010, 2012) ont établi un modèle 3D d'intestin enflammé utilisant la lignée Caco-2 (C2Bbe1) et les PBMC en tant que cellules immunitaires enrobées par une couche de collagène. Le modèle a été utilisé pour évaluer l'efficacité de différentes formulations d'un médicament anti-inflammatoire (budésonide) utilisé dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Leurs résultats montrent la capacité du modèle à différencier l'efficacité thérapeutique entre différentes formulations tout en représentant de manière adéquate les modifications physiopathologiques complexes observées *in vivo* (Leonard, Collnot, et Lehr 2010; Leonard et al. 2012). Li et al. (2013) ont également développé un modèle intestinal 3D impliquant des cellules intestinales (Caco-2, HT29MTX), des cellules de type fibroblastes (MEFs, PO) et des cellules de type macrophages (THP-1) enrobées par une matrice de collagène, afin d'étudier l'absorption de médicaments. Les auteurs ont conclu que leur modèle imite plus étroitement la couche épithéliale intestinale native. Ils ont également démontré une corrélation améliorée entre la perméabilité à l'absorption à travers le modèle de co-culture 3D et la fraction absorbée dans l'intestin humain dans le cas de médicaments modérément et fortement perméables (Li et al. 2013).

Plus récemment, Wu et al. (2017) ont évalué la toxicité et les effets inflammatoires des nanoparticules de ZnO (NP ZnO) à l'aide de modèles de culture cellulaire 2D et 3D utilisant les cellules Caco-2. Leurs résultats ont montré que les NP ZnO induisaient une réponse inflammatoire chronique dans la culture cellulaire 2D et une réponse inflammatoire aiguë dans la culture cellulaire 3D, indiquant que l'organisation de l'espace cellulaire a un impact important sur

les réponses cellulaires (Z. Wu et al. 2017). Même si, actuellement, la plupart des recherches utilisant des modèles 3D ont des objectifs pharmaceutiques, de tels modèles pourraient être utilisés dans le domaine de l'alimentation pour étudier l'absorption et les propriétés antioxydants et / ou anti-inflammatoires de composés alimentaires bioactifs lors de l'inflammation intestinale.

Pour aller encore plus loin dans la modélisation, des modèles plus complexes ont été développés. Ces dispositifs micro-fluidiques souvent appelés « organ-on-chips » or « biochips » ont pour objectif de fournir un microenvironnement cellulaire qui rapproche les conditions *in vitro* à la réalité physiologique de l'organisation et des propriétés dynamiques des tissus. Le développement de ces « biochips », passant de cultures statiques à cultures fluidiques, ouvre de nouvelles opportunités pour comprendre les interactions au niveau des organes. Dans le domaine de l'alimentation, ils pourraient être utilisés pour étudier l'absorption des nutriments et l'impact des composants alimentaires sur la modulation de l'immunité. Par exemple, une nouvelle plateforme micro-fluidique intégrée, appelée « Nutrichip », a été développée pour étudier le potentiel de la fonction immunomodulatrice des produits laitiers (Ramadan et al. 2013; Vergères et al. 2012). Ce système consiste en une monocouche de cellules épithéliales interagissant avec des cellules immunitaires montées sur un dispositif porte-puce. Différents micro-canaux de perfusion permettent un flux de fluide radial uniforme du milieu de culture ou encore un stimulus inflammatoire ou un digestat. La production de cytokines est quantifiée à l'aide d'un dosage immunomagnétique sur puce. Plus récemment, un modèle de co-culture miniaturisé similaire Caco-2 / U937 a été utilisé pour caractériser la perturbation des TJs et la modulation de la réponse immunitaire au niveau intestinal (Ramadan et Jing 2016).

Des recherches supplémentaires sont encore nécessaires pour contrôler complètement toutes les fonctionnalités des modèles (Pampaloni, Reynaud, et Stelzer 2007; Ravi et al. 2015). Par exemple, la composition et la rigidité de la MEC (Langhans 2018; Wallace et Rosenblatt 2003), les échanges gazeux, le contrôle des signaux chimiques et mécaniques et les flux interstitiels ont un impact crucial sur le comportement et les réponses des cellules (Griffith et Swartz 2006). L'utilisation de ce type de modèles présente d'autres défis associés, notamment l'impact de la densité d'ensemencement sur la réponse et le développement des cellules, comme cela a été démontré pour d'autres types de tissus (Dvir-Ginzberg et al. 2003; Holy, Shoichet, et Davies 2000; Ohnuma, Arkin, et Holland 1986; Watt 1988). L'optimisation de ces modèles est donc nécessaire pour pouvoir mieux corrélérer les résultats des modèles 3D et ceux obtenus *in vivo*.

Enfin, il convient de souligner que les avancées récentes en matière de méthodes de culture de cellules souches épithéliales intestinales humaines, telles que la découverte des facteurs de croissance nécessaires à l'homéostasie des cellules souches, ont permis la création de systèmes de culture à long terme : les organoïdes intestinaux humains (HIO) et entéroïdes / colonoïdes (HIE). Ces modèles *ex vivo* et *in vitro* reproduisent les caractéristiques physiologiques de l'intestin humain *in vivo* (Zachos et al. 2015). Les HIOs sont établies *in vitro* à l'aide de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) ou de cellules souches embryonnaires (ESCs) (Spence et al. 2011; McCracken et al. 2011). Les HIEs sont développés à partir de cellules souches/cryptes dissociées de tissus intestinaux (Sato et al. 2011; Saxena et al. 2015). Contrairement à d'autres techniques de culture qui contiennent des cellules d'origine mésenchymateuse, les HIEs permettent l'étude de cellules épithéliales isolées (VanDussen et al. 2014). Les modèles d'HIEs sont cultivés en monocouches ou en formes 3D (sphéroïdes) en utilisant du « Matrigel® » comme MEC (VanDussen et al. 2014; Costantini et al. 2018). Ces modèles comprennent plusieurs types de cellules différenciées (entérocytes, cellules caliciformes, cellules entéroendocrines et cellules de Paneth) et pourraient être établis à partir de différents segments de l'intestin, ce qui pourrait aider à mieux comprendre les fonctions de régions spécifiques (Middendorp et al. 2014). Les modèles d'HIEs sont dérivés de tissus de

l'intestin grêle et du côlon non transformés, établis à partir de biopsies des sujets (VanDussen et al. 2014) ou de tissus intestinaux réséqués chirurgicalement (Sato et al. 2011). Cela pourrait être considéré comme un inconvénient en raison de problèmes éthiques, mais cela pourrait aussi être envisagé comme un avantage, car cela pourrait simplifier l'étude des variations individuelles de la fonction épithéliale humaine. Cependant, les inconvénients de ce type de systèmes de culture cellulaire incluent le coût élevé (facteurs de croissance) et le fait qu'ils nécessitent beaucoup de travail (Costantini et al. 2018).

Récemment, des chercheurs ont utilisé des modèles HIE pour étudier les norovirus et les rotavirus (propagation par des aliments / de l'eau) (Ettayebi et al. 2016; Saxena et al. 2015, 2017; Costantini et al. 2018). Ainsi, les organoïdes et les entéroïdes / colonoïdes pourraient être utiles dans d'autres secteurs de la recherche dans le domaine de l'alimentation et au-delà. Par exemple, la possibilité de les co-cultiver avec des cellules immunitaires ou des micro-organismes permettrait de générer des modèles intestinaux plus complexes afin d'étudier l'inflammation intestinale.

### **3. Composés bioactifs de l'alimentation : transport et potentiel antioxydant / anti-inflammatoire dans les modèles de culture cellulaire intestinale**

Les composés bioactifs présents dans l'alimentation présentent des avantages intéressants pour la santé, notamment en raison de leur potentiel anti-inflammatoire et antioxydant. Des modèles cellulaires intestinaux en mono- ou co-culture ont été alors utilisés dans le but d'étudier ces propriétés ainsi que leur effet sur la perméabilité intestinale, sans oublier leur absorption, transport et biodisponibilité.

Par exemple, des travaux ont été effectués en associant les cellules Caco-2 à la lignée cellulaire RAW 264.7 pour étudier les effets anti-inflammatoires d'extraits naturels des plantes. Une étude a mis en évidence les propriétés anti-inflammatoires d'un jus de fruit enrichi en extrait d'écorce de pin, lesquelles diminuent après la digestion (Frontela-Saseta et al. 2013). D'autres études ont montré que des extraits de fruits (par exemple de sureau) et de feuilles (par exemple de bambou) régulaient à la baisse l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) et d'enzymes liées à l'inflammation (iNOS, COX) (K.-M. Kim et al. 2015; Olejnik et al. 2015).

Récemment, Kaulmann et al. (2016) ont associé deux lignées cellulaires intestinales (Caco-2 / HT29 MTX) à des cellules THP-1 pour étudier la capacité anti-inflammatoire et anti-oxydante de digestats de prunes et de choux. Leurs résultats ont révélé une réduction de certains marqueurs d'inflammation (IL-6, IL-8 et NF- $\kappa$ B) et de stress oxydant (Nrf2), bien que les effets aient été modérés et ne puissent pas être attribués aux choux ou aux prunes ou encore aux polyphénols ou aux caroténoïdes présents dans ces aliments (Kaulmann, Legay, et al. 2016).

#### **3.1. Cas des polyphénols**

Ainsi, les effets santé possibles des polyphénols ont largement été étudiés dans des modèles cellulaires. Par exemple, Kosińska et Andlauer (2012) ont étudié les flavan-3-ols d'un extrait purifié de cacao en poudre et ont montré que ces flavonoïdes pourraient augmenter la perméabilité de la monocouche de Caco-2 sans effet nocif sur les cellules, augmentant ainsi la biodisponibilité des flavan-3-ols (Kosińska et Andlauer 2012). Denis et al. (2015) ont également démontré la capacité des fractions phénoliques issus de canneberge à réduire le stress oxydant intestinal et l'inflammation tout en améliorant le dysfonctionnement mitochondrial en utilisant le clone cellulaire Caco-2/15 comme modèle (Denis et al. 2015). De même, les résultats obtenus par Bitzer et al. (2015) dans une étude utilisant les lignées cellulaires Caco-2 et HT29 suggèrent

que les procyanidines polymériques de cacao de haut poids moléculaire sont très efficaces pour préserver l'intégrité de la membrane (dans les cellules Caco-2) et réduire les marqueurs inflammatoires tels que l'IL-8 (dans les cellules HT29) (Bitzer et al. 2015). Plus récemment, Martins et al. (2017) ont publié une étude sur les effets antioxydants et anti-inflammatoires du marc de raisin, lequel est riche en polyphénols polymériques et glycosidiques. Ces auteurs ont montré une réduction de la production de marqueurs inflammatoires (IL-8, PGE2) par les cellules Caco-2 stimulées par l'IL-1 $\beta$  après l'addition de tannase (tanin acyl hydrolase) aux cultures, suggérant une amélioration des activités antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits de polyphénols de marc de raisin (Martins et al. 2017).

De la même façon, l'effet positif du kaempférol sur l'intégrité des jonctions serrées de la barrière a été étudié en utilisant des cellules Caco-2/HTB-37 mettant en évidence une amélioration de l'assemblage des protéines des jonctions serrées après administration de flavonoïdes (T. Suzuki, Tanabe, et Hara 2011). Rodriguez-Ramiro et al. (2013) ont étudié le mécanisme moléculaire lié à l'activité anti-inflammatoire des polyphénols et ont conclu que les polyphénols de cacao régulent efficacement la diminution de taux de marqueurs inflammatoires *in vitro* (cellules Caco-2) et *in vivo* (modèle de rat) (Rodríguez-Ramiro et al. 2013). Un concentré riche en flavonoïdes provenant du jus d'une espèce de cactus (*Opuntia ficus indica*) a été évalué par Matias et al. (2014) et leurs résultats ont montré que la co-incubation du concentré avec un inducteur de stress atténuait considérablement la production de radicaux libres par rapport à la pré-incubation. Ceci suggère que certains des composés principaux présents dans le concentré, par exemple, les dérivés d'isorhamnétines qui présentent une faible biodisponibilité inhibent la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans l'environnement des cellules intestinales épithéliales. Une réponse positive similaire concernant l'activité inflammatoire a été aussi observée pendant la co-incubation (Matias et al. 2014). Toutes ces études *in vitro* démontrent le potentiel antioxydant et anti-inflammatoire des polyphénols habituellement présents dans les fruits et légumes.

### **3.2. Cas des caroténoïdes**

Le transport (During et al. 2002; Reboul et al. 2005; Ferruzzi et al. 2006; Dhuique-Mayer et al. 2007; During et Harrison 2007; Failla, Chitchumroonchokchai, et Ishida 2008; Reboul et Borel 2011; Reboul 2013; Failla et al. 2014) et l'effet anti-inflammatoire (Kaulmann et al. 2012) des caroténoïdes ont également été étudiés à l'aide de modèles de culture cellulaire. Kaulmann et al. (2012) ont étudié l'effet anti-inflammatoire de lycopène et du  $\beta$ -carotène à des concentrations observables dans l'alimentation (10–25 mg/ml) en utilisant la lignée Caco-2 comme modèle. Leurs résultats ont montré que ces deux caroténoïdes sous leur forme isolée n'avaient pas d'effet anti-inflammatoire sur les marqueurs mesurés (IL-8, COS-2, NF- $\kappa$ B). Par contre, ils ont observé grâce à des analyses protéomiques des changements dans la régulation de quinze protéines impliquées dans des mécanismes antioxydants (par exemple, glutathione S-transferase A1) lors que les cellules étaient exposées au  $\beta$ -carotène (Kaulmann et al. 2012). De la même façon, la lignée cellulaire Caco-2 a été associée aux cellules THP-1 pour étudier les effets du lycopène, un caroténoïde présent dans les fruits rouges et légumes, sur des cibles pro-inflammatoires. Les auteurs de cette étude ont constaté qu'une faible concentration (2  $\mu$ M) de lycopène renforçait l'expression génique pro-inflammatoire dans les cellules THP-1, alors que des concentrations plus élevées (5-20  $\mu$ M) avaient un effet anti-inflammatoire avec une diminution des ROS (Makon-Sébastien et al. 2014).

Toutefois, d'après la littérature, la  $\beta$ -cryptoxanthine (BCX), caroténoïde pro-vitaminique A le plus présent dans la mandarine et l'orange (Lin et Chen 1994; Dhuique-Mayer et al. 2005; Giuffrida et al. 2006) et présentant un effet antioxydant connu (Lorenzo et al. 2009; Navarro et al.

2011; Chisté et al. 2014) ainsi qu'un effet préventif du cancer de côlon (Narisawa et al. 1999; Tanaka et al. 2012; Cilla et al. 2015) a très peu été étudiée sur modèle *in vitro*. O'Sullivan et al. ont fait une comparaison de l'absorption et sécrétion de différents caroténoïdes, y compris la BCX sur des cellules Caco-2 montrant que la BCX présentait le plus faible pourcentage d'absorption et sécrétion parmi les xanthophylles étudiés (O'Sullivan, Ryan, et O'Brien 2007). Dhuique-Mayer et al. (2007) ont utilisé le clon TC7 de la lignée Caco-2 pour évaluer l'absorption de la BCX et ses formes estérifiées et leurs résultats montrent une meilleure absorption de la forme libre de la BCX par rapport aux formes estérifiées (Dhuique-Mayer et al. 2007). Des travaux pour étudier la capacité de la BCX à protéger des dommages causés par l'oxydation de l'ADN (Lorenzo et al. 2009) et l'effet de la BCX sur la prolifération cellulaire (Cilla et al. 2015) ont été aussi réalisés en utilisant le modèle Caco-2. Lorenzo et al. (2009) ont trouvé un effet protecteur de la BCX sur les dommages induits sur l'ADN par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou par la lumière visible en présence d'un photosensibilisateur dans les cellules en plus d'accélérer la réparation de l'ADN endommagé (Lorenzo et al. 2009). Dans une autre étude, Cilla et al. (2015) ont montré l'activité antiproliférative de la BCX par la voie mitochondriale de l'apoptose (Cilla et al. 2015). L'effet préventif de la BCX envers le cancer pourrait alors être liée aux effets de la BCX sur la réparation de l'ADN et à ses propriétés antioxydantes.

Ainsi, les monocultures cellulaires ont été largement utilisées pour évaluer la modulation de la réponse immunitaire, les effets antioxydants et anti-inflammatoires de différents composants des végétaux mais également d'autres produits naturels tels que les lipides du lait maternel ou l'acide phytique (Barrera et Sánchez 2015; Hollebeeck et al. 2012; Kang et al. 2009; Sergent et al. 2010; Węglarz et al. 2006; Wojtal et al. 2013; Xu et al. 2012). Shimizu et al (2010) ont décrit et examiné dans une revue générale les différentes études sur l'interaction des composants alimentaires avec l'épithélium intestinal en utilisant la lignée Caco-2 comme modèle cellulaire en particulier les voies de transport, la modulation des fonctions des transporteurs, la perméabilité des jonctions serrées et la régulation du système immunitaire (Shimizu 2010).

Il convient également de souligner que les additifs alimentaires, les adjuvants ou les matrices alimentaires peuvent influencer le transport intestinal et la biodisponibilité de ces composés bioactifs (Nerurkar, Burton, et Borchardt 1996) ou avoir une influence directe sur la fonction intestinale (Jiang 2013). Récemment, Lefebvre et al (2015) ont examiné les études sur l'interaction des nanomatériaux utilisés dans l'industrie alimentaire avec des modèles intestinaux, y compris les cultures cellulaires (Lefebvre et al. 2015). La migration des matériaux en contact avec les aliments tels que les nanoparticules d'argent (AgNPs) provenant des ustensiles et des récipients de stockage ainsi que de leur impact sur la perméabilité intestinale ont été étudiés, à l'aide de la lignée cellulaire T84. Ces auteurs ont conclu que les AgNPs de petite taille pouvaient augmenter la perméabilité intestinale, même en absence d'effets toxiques sur les cellules (Williams et al. 2016). Ces modèles en monoculture présentent des limites et restent éloignés de la complexité de l'intestin. Pour autant, il n'existe que très peu d'études à ce jour utilisant des modèles *in vitro* plus complexes, de co-culture cellulaire en 2D ou 3D pour évaluer le potentiel des composés bioactifs sur la santé.

## **MATERIEL ET METHODES**

## 1. Culture cellulaire

### 1.1. Lignées cellulaires et conditions de culture

Trois lignées cellulaires ont été utilisées lors des expériences, deux lignées intestinales adhérentes (Caco-2 TC7, HT29MTX) et une lignée de cellules immunitaires de type macrophage (THP-1). Les réactifs utilisés pour la culture cellulaire ont été achetés chez Thermo Scientific™ (Waltham, USA).

Le clone TC7 (ATCC-HTB-37) de la lignée parentale Caco-2 isolée par Fogh (Fogh et Trempe 1975) nous a été généreusement fourni par Monique Rousset (Université de Nancy, France). La lignée HT29MTX (HT29-MTX 10-6) provient du Biobank CelluloNet BB-0033-00072 qui appartient à l'UMS3444/US8/SFR Biosciences, Paris.

Les lignées adhérentes ont été maintenues en culture dans des flacons en plastique de 75 cm<sup>2</sup> (Falcon™) et incubées à 37 °C sous atmosphère régulée à 5% CO<sub>2</sub>/ 95% air. Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture DMEM-GlutaMAX™, enrichi avec 1% d'AANE, 10% de SVF décomplémenté par la chaleur (30 min, 65°C), 1% d'un mélange de pénicilline et streptomycine (10 000 U / mL-10mg / mL) et changé toutes les 48h. Lorsque les cellules ont atteint 80% de confluence, elles ont été trypsinées par traitement avec une solution à 0,05% de trypsine et 1mM EDTA après lavage avec du DPBS (Ca<sup>+2</sup> [-] Mg<sup>+2</sup> [-]) et réensemencées dans de nouveaux flacons, chaque trypsinisation définissant un passage. Pour les expériences, les Caco-2 TC7 ont été utilisées à des passages compris entre 45 et 71 et les HT29MTX entre 23 et 57.

La lignée des cellules immunitaires THP-1 (ATCC-TIB-202™) a été cultivée en suspension (état de monocytes) dans du milieu RPMI-1640 enrichi avec 10% de SVF et 1% de pénicilline et streptomycine (10 000 U / mL-10mg / mL) et maintenue à 37 °C sous atmosphère régulée à 5% CO<sub>2</sub>/ 95% air. Le milieu a été renouvelé 1-2 fois par semaine. Pour les expériences, les THP1 ont été utilisées après différenciation en macrophages, qui vont alors adhérer au support, après exposition à du PMA (conditions détaillées ultérieurement).

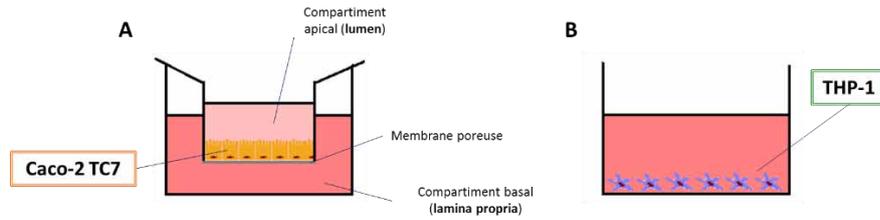
### 1.2. Essais préliminaires pour la mise au point des conditions du modèle de tri-culture cellulaire

L'objectif de ce travail a donc été de mettre au point un modèle de co-culture cellulaire en état d'inflammation. La mise au point des différentes conditions de co-culture a été faite en plusieurs étapes, de la monoculture en passant par la biculture jusqu'à arriver à la tri-culture. De la même façon, des expériences préliminaires ont été faites pour établir les conditions optimales de stimulation pro-inflammatoire. Dans les prochains paragraphes je présenterai le déroulement et les différentes conditions de ces expériences préliminaires pour terminer avec les conditions de stimulation retenues et utilisées par la suite dans le modèle de tri-culture.

Pour toutes les expériences, les cellules intestinales ont été ensemencées et cultivées dans du DMEM-GlutaMAX™ enrichi sur un système d'insert (ThinCert™) (12 ou 6 puits) permettant d'avoir deux compartiments (apical et basal) séparés par une membrane poreuse (Fig. 1A) sur laquelle les cellules adhèrent et se différencient spontanément en entérocytes. L'état de l'intégrité et l'étanchéité de la monocouche épithéliale ont été évalués par mesure de la TEER tout au long de la culture, à chaque changement de milieu (tous les 2-3 jours).

## MATERIEL ET METHODES

Dans le cas des THP-1, l'ensemencement a été réalisé dans des plaques de culture cellulaire (24 ou 6 puits) et cultivées dans du RPMI 1640 (Fig.1B).



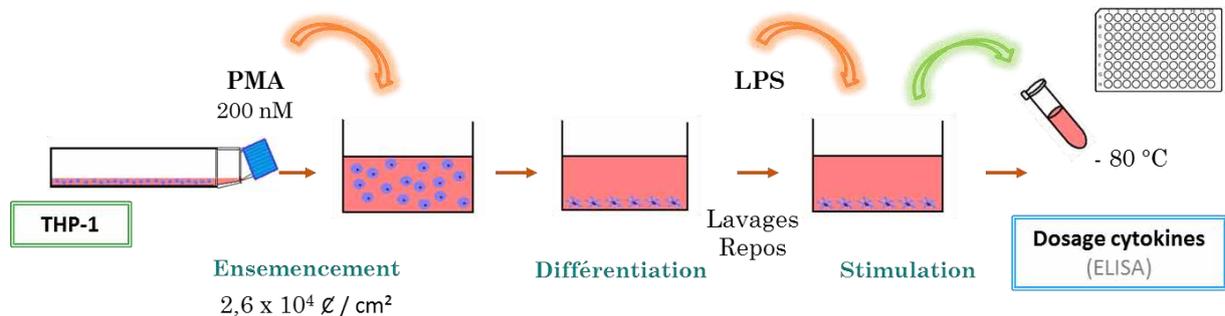
**Figure 1.** Systèmes de culture cellulaire. (A) Système de culture sur insert ThinCert™ utilisé pour les cellules intestinales. (B) Puits utilisés pour la culture de cellules type-macrophage.

### Monoculture THP-1

La première partie des expériences a été faite sur les monocultures de THP-1 afin de réaliser des tests de stimulation pro-inflammatoire avec du LPS issu de *E. coli* O55 B5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Brièvement, selon le protocole décrit sur la figure 2, les cellules ont été ensemencées à une densité de  $2,6 \times 10^4$   $\varnothing$ /cm<sup>2</sup> dans du milieu RPMI 1640 contenant 200nM de PMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) lequel induit leur différenciation en macrophages (Takashiba et al. 1999). Une fois différenciées et adhérentes et suite à deux lavages avec du DPBS (Ca<sup>+2</sup> [+] Mg<sup>+2</sup> [+]) et 1% de SVF, les cellules ont été soumises au LPS et les surnageants récupérés pour dosage de cytokines pro-inflammatoires produites. Plusieurs conditions expérimentales ont alors été testées (voir tableau 1), telles que la composition du milieu de culture, le temps de différenciation, de repos ainsi que la concentration de LPS et son temps d'exposition.

SVF	Différenciation PMA	Repos	Stimulation LPS	
Sans	24h	0h	10 ng/mL	4h
Avec	48h	24h	100 ng/mL	24h
			1 $\mu$ g/mL	

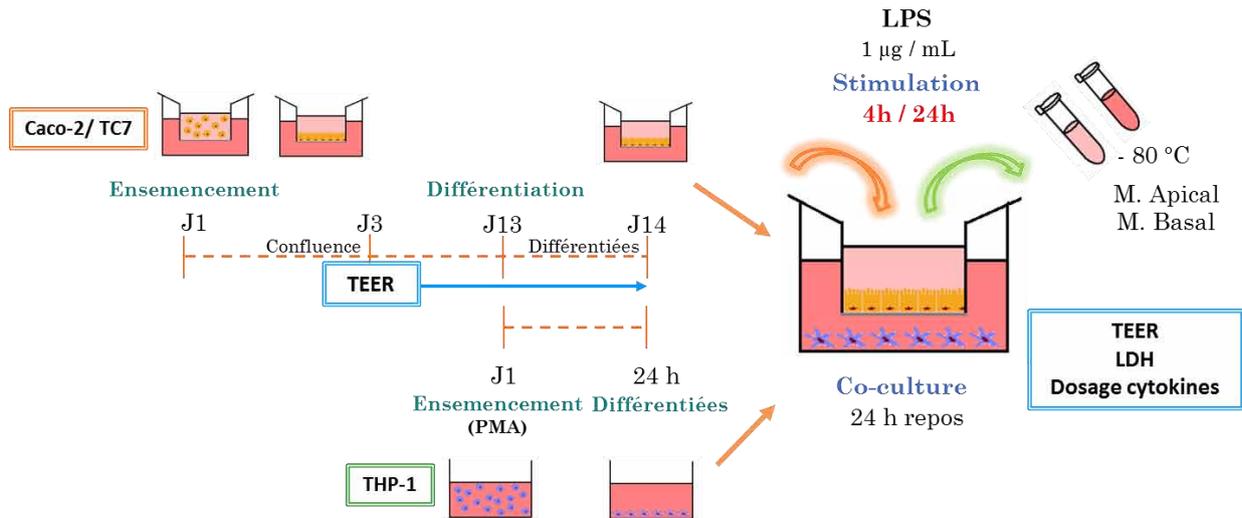
**Tableau 1.** Conditions de culture et de stimulation pour les essais préliminaires sur les THP-1.



**Figure 2.** Protocole expérimental de stimulation inflammatoire en monocultures de THP-1.

### Association en co-culture Caco-2 TC7 / THP-1

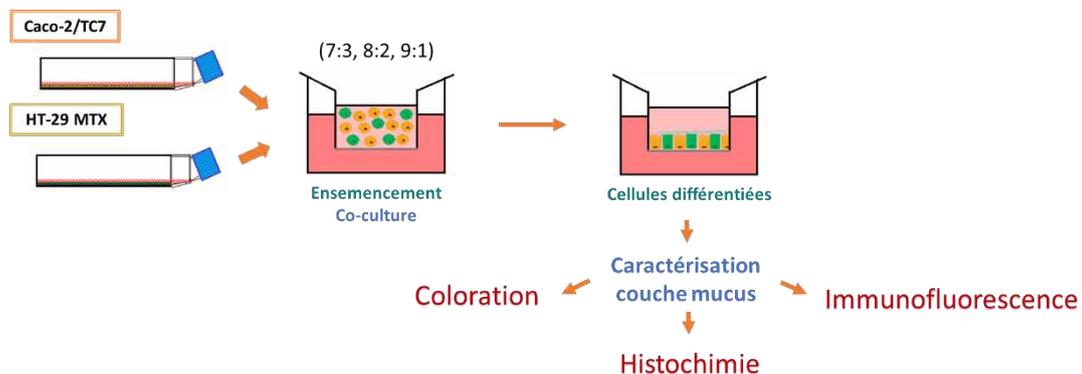
Ensuite, des expériences d'induction de l'inflammation de la co-culture des Caco-2 TC7 / THP-1 ont été réalisées, les THP1 dans le milieu basal représente le système immunitaire présent dans la lamina propria. Pour cela, les Caco-2 ont été cultivées jusqu'à différenciation sur des inserts. 14 jours après l'ensemencement, les inserts ont été transférés dans les puits contenant les THP-1 préalablement différenciées (Fig. 3) et rincées avec du DPBS ( $\text{Ca}^{+2}$  [+] $\text{Mg}^{+2}$  [+]) contenant 1% de SVF. Suite au transfert, les cellules en co-culture sont restées au repos 24h dans leur compartiment respectif séparés par la membrane poreuse pour ensuite être stimulées avec  $1\mu\text{g} / \text{mL}$  de LPS pendant 4 ou 24h avec une stimulation du côté apical et/ou basal. A l'issue de l'étape de stimulation, les surnageants ont été récupérés pour dosage des cytokines produites et évaluation de la cytotoxicité.



**Figure 3.** Protocole expérimental de stimulation inflammatoire en co-culture Caco-2 TC7 / THP-1.

### Association en co-culture Caco-2 TC7 / HT29 MTX

En parallèle et pour la caractérisation de la couche de mucus des expériences avec une biculture Caco-2 TC7/HT29MTX ont été réalisées. Pour ces bicultures, les deux lignées cellulaires ont été ensemencées sur des membranes à différents ratios (7 :3, 8 :2 et 9 :1) à une densité de  $10^5\phi/\text{cm}^2$  (Fig. 4) et différenciées. Pour les expériences avec stimulation (histochimie et immunofluorescence) les conditions utilisées ont été 18h d'incubation avec un cocktail de LPS/IFN $\gamma$  (50ng/mL – 5ng/mL). La présence de mucus a alors été caractérisée par différentes méthodes de coloration et d'immunofluorescence décrites ultérieurement.



**Figure 4.** Protocole expérimentale de biculture Caco-2 TC7 / HT29MTX.

### 1.3. Mise en place du modèle de tri-culture Caco-2 TC7 / HT29MTX / THP-1 en état d'inflammation

Suite à ces essais préliminaires et aux résultats obtenus, un modèle de tri-culture utilisant les trois lignées cellulaires, Caco-2 TC7, HT29MTX et THP1 a été mis en place pour déterminer les conditions finales de culture et de stimulation que l'on utilisera par la suite. L'ajout des HT29 MTX en co-culture avec les Caco-2 TC7 permet de se rapprocher des conditions physiologiques de l'épithélium intestinal par la présence d'entérocytes (Caco-2 TC7) et de cellules caliciformes (HT29MTX) productrices de mucus.

La mise au point du modèle de tri-culture s'est appuyé sur le choix des conditions expérimentales suivantes (préalablement définies) et résumées dans le tableau 2 :

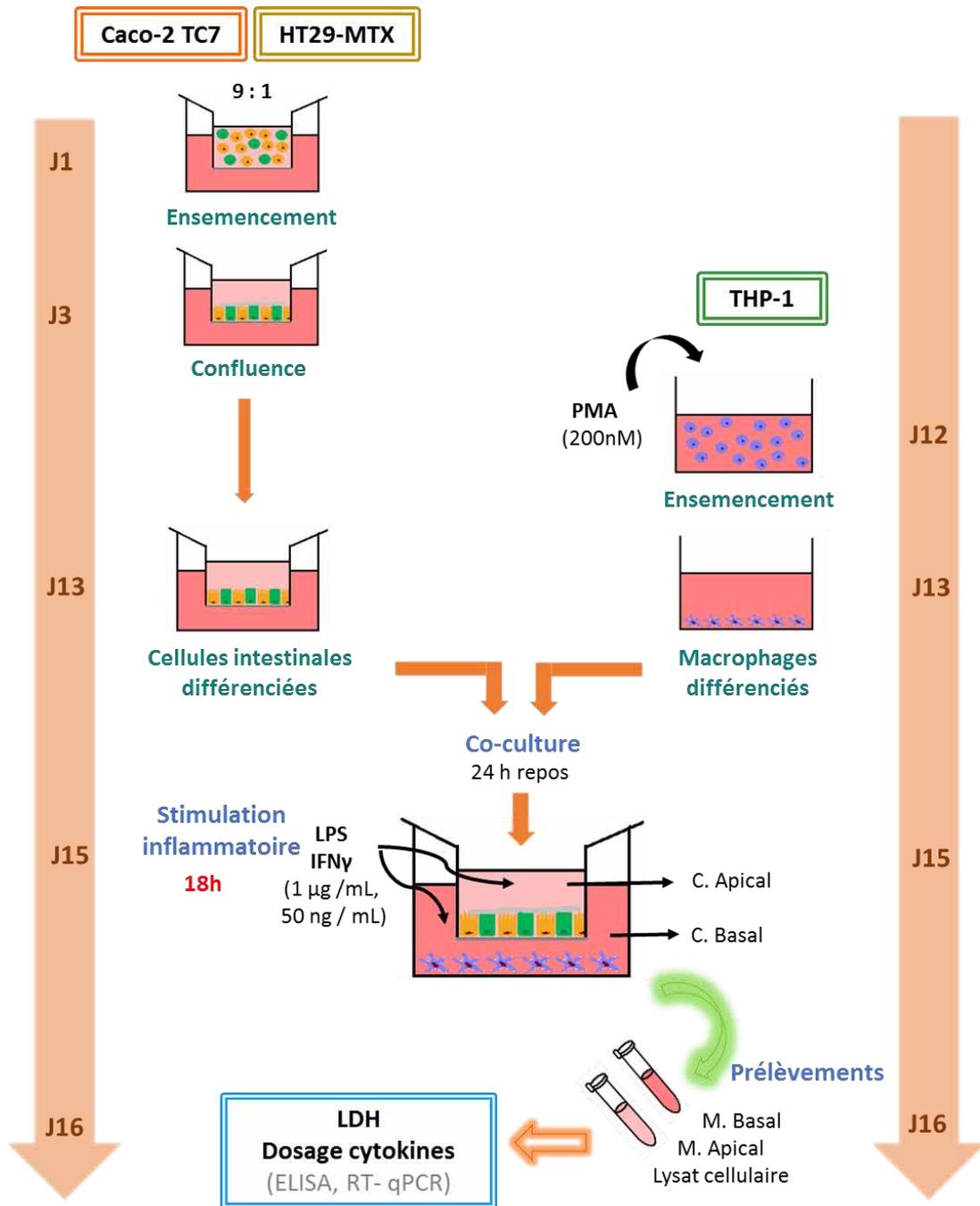
- Ensemencement de cellules intestinales en co-culture (DMEM GlutaMAX™ enrichi) avec un ratio 9:1 (Caco-2 TC7 : HT29MTX) à une densité de  $10^5$   $\varnothing$  / cm<sup>2</sup> sur des inserts 6 puits (ThinCert™) et différenciation pendant 16 jours.
- Ensemencement de THP-1 dans des plaques (6 puits) à une densité de  $2,6 \times 10^4$   $\varnothing$ /cm<sup>2</sup> dans du RPMI 1640 et incubation pendant 24h avec 200nM de PMA pour déclencher la différenciation en macrophages.
- Le stimulus utilisé pour l'induction de l'inflammation a été un mélange LPS-IFN $\gamma$  (Thermo Scientific™, Waltham, USA) à deux doses : 50ng/mL-5ng/mL et 1 $\mu$ g/mL-50ng/mL, respectivement, appliqué dans les deux compartiments simultanément pendant une période de 18h. Pour des raisons de commodité de langage et de compréhension nous avons choisi de nommer ces deux doses, respectivement stimulation faible et stimulation forte, dans le reste du manuscrit.
- La dexaméthasone, un corticostéroïde puissant fréquemment employé comme médicament anti-inflammatoire a été utilisé en tant que contrôle positif à une concentration de 10 $\mu$ M.

Incubation	Lignée cellulaire	Densité	Différenciation	Repos	Stimulation LPS-IFN $\gamma$
37° C 5% CO <sub>2</sub> 95% air	Caco-2 TC7 / HT29MTX	(9:1) $10^5$ $\varnothing$ /cm <sup>2</sup>	16 jours	24h	18h Apical et basal Faible : 50ng/mL-5ng/mL Forte : 1 $\mu$ g/mL-50ng/mL
	THP-1	$2,6 \times 10^4$ $\varnothing$ /cm <sup>2</sup>	24h PMA 200nM		

**Tableau 2.** Conditions de culture et de stimulation du modèle de tri-culture.

Le protocole expérimental est alors résumé dans la figure 5 et décrit ci-dessous :

Les cellules intestinales sont ensemencées à J1 sur des inserts 6 puits et maintenues en culture jusqu'à leur différenciation et l'étanchéité de la monocouche (J16) est contrôlée par mesure de la TEER à chaque changement de milieu. En parallèle, à J13, 24h avant la mise en co-culture des cellules, les THP-1 sont ensemencées dans des puits à part et différenciées en présence du PMA pendant 24h. A J14 les cellules différenciées en macrophages sont alors rincées avec du DPBS (Ca<sup>+2</sup> [+] Mg<sup>+2</sup> [+]) à 1% de SVF avant le transfert des inserts sur les puits contenant les macrophages. A partir de ce moment seul du DMEM GlutaMAX™ enrichi sera utilisé dans les deux compartiments pour le reste de l'expérience. Après 24h de repos (J15), le milieu est renouvelé, le stimulus pro-inflammatoire est ajouté et après 18h d'incubation, les surnageants apicaux et basaux ainsi que les cellules sont récupérées pour des dosages ultérieurs.



**Figure 5.** Protocole expérimental de stimulation inflammatoire du modèle de tri-culture.

## **2. Caractérisation de la couche de mucus**

### **2.1. Coloration du mucus au bleu Alcian**

Pour la coloration de la couche de mucus, une solution de bleu Alcian dans de l'acide acétique à 3% a été ajoutée sur les monocouches cellulaires différenciées. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, les cellules ont été rincées au DPBS ( $\text{Ca}^{+2}$  [-]  $\text{Mg}^{+2}$  [-]). Ensuite, l'activité de la phosphatase alcaline, enzyme produite uniquement par les Caco-2 TC7, a été mise en évidence par une coloration avec du Fast Red (SIGMAFAST™ Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tablets, St. Louis, USA) en suivant les instructions du fournisseur, à température ambiante et jusqu'à apparition de la couleur. La réaction a été stoppée avec de l'eau et les échantillons ont été regardés au microscope optique inversé (Nikon Eclipse TE 200, Minato, Tokyo, Japan).

### **2.2. Coloration histochimique du mucus**

Afin de mettre en évidence la couche de mucus apicale, nous avons testé plusieurs méthodes de coloration et retenu les trois colorations décrites ci-dessous.

#### **Coloration au bleu Alcian et coloration au rouge de ruthénium**

Après différenciation, les cellules ont été rincées délicatement avec une solution froide (4°C) de DPBS ( $\text{Ca}^{+2}$  [-]  $\text{Mg}^{+2}$  [-]) contenant 4% de saccharose et 3% d'acide acétique afin de préserver le mucus pendant les traitements. Ensuite, les cellules ont été fixées avec le fixateur Carnoy (60% méthanol anhydre, 30% chloroforme, 10% acide acétique) pendant 15 min. Après fixation, les cellules ont été rincées délicatement plusieurs fois, puis réhydratées pendant 1 h à température ambiante avec la solution froide de DPBS à 4% de saccharose et 3% d'acide acétique puis colorées au bleu Alcian ou réhydratées pendant 1 h à température ambiante avec une solution froide de DPBS à 4% de saccharose et colorées au rouge de ruthénium. Dans le cas du bleu Alcian, elles ont été incubées pendant 1 h avec une solution de DPBS à pH 2,5 contenant 3 % d'acide acétique et 1 % de bleu Alcian (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Pour la coloration au rouge de ruthénium, les cellules ont été incubées pendant 2 h dans une solution de DPBS contenant 1 % de rouge de ruthénium (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA).

Après plusieurs lavages avec une solution froide à 4% de saccharose et 3% d'acide acétique pour la coloration au bleu Alcian et avec une solution froide de DPBS à 4% de saccharose pour la coloration au rouge de ruthénium, les membranes de PET (ThinCert™) ont été dissociées du support plastique et découpées avant d'être intégrées dans du DPBS-Agarose 2,5%.

Postérieurement, les morceaux d'agarose contenant les membranes ont été déshydratés par des bains successifs avec de l'éthanol à concentration croissante et inclus dans une résine Technovit 7100 (HeraeusKulzerGmbH, Wehrheim, Germany) polymérisant à froid. Après 12 heures de durcissement, les blocs ainsi obtenus ont été montés sur des plots à l'aide d'une seconde résine Technovit 3040 (HeraeusKulzerGmbH, Wehrheim, Germany) à prise rapide assurant l'adhésion entre les deux éléments.

Finalement, des coupes d'échantillons, d'une épaisseur de 4  $\mu\text{m}$ , ont été obtenues à l'aide d'un microtome Microm HM355S (Thermo Scientific™, Waltham, USA). Ces dernières ont ensuite été déposées sur lame, séchées puis finalement montées avec du milieu Isomount 2000 Q Path® (VWR international, Radnor, USA) et recouvertes avec des lamelles de 0,15 mm d'épaisseur.

### **Coloration Periodic Acid Schiff / Nuclear Fast Red**

Après différenciation, les cellules ont été fixées avec le fixateur Carnoy (60% méthanol anhydre, 30% chloroforme, 10% acide acétique) pendant 15 min. Par la suite, les monocouches cellulaires ont été rincées délicatement avec une solution froide (4°C) de DPBS (Ca+2 [-] Mg+2 [-]) contenant 4% de saccharose et 3% d'acide acétique afin de préserver le mucus pendant les traitements. Après lavage avec la solution froide, les membranes de PET (ThinCert™) ont été dissociées du support plastique et découpées avant d'être enrobées dans du DPBS-Agarose 2,5%.

Postérieurement, les morceaux d'agarose contenant un morceau de membrane ont été déshydratés par des bains successifs d'éthanol à concentration croissante puis inclus à froid avec la résine Technovit 7100 (HeraeusKulzerGmbH, Wehrheim, Germany) polymérisant à froid. Après 12 heures de durcissement, les blocs ainsi obtenus ont été montés sur des plots à l'aide d'une seconde résine Technovit 3040 (HeraeusKulzerGmbH, Wehrheim, Germany) à prise rapide assurant l'adhésion entre les deux éléments.

Finalement, des coupes d'échantillons, d'une épaisseur de 4 µm, ont été obtenues à l'aide d'un microtome Microm HM355S (Thermo Scientific™, Waltham, USA). Ces dernières ont ensuite été déposées sur lame, séchées, puis oxydées 10 minutes à l'aide d'une solution prête à l'emploi d'acide périodique Q-Path® (VWR chemicals, Radnor, USA). Après plusieurs rinçages successifs à l'eau milliQ, les glucides, dont les mucopolysaccharides, ont été colorés par immersion de 30 min dans du réactif de schiff Q-Path® prêt à l'emploi (VWR chemicals, Radnor, USA). Par la suite deux bains de 5 min dans une solution de métabisulfite de sodium à 0,5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), suivis de plusieurs rinçages successifs à l'eau milliQ furent réalisés. Afin d'obtenir une meilleure visualisation des coupes, une contre coloration nucléaire réalisée pendant 1 h avec une solution de Nuclear Fast Red prête à l'emploi (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) fut effectuée.

Une fois les lames rincées à plusieurs reprises à l'eau milliQ, celles-ci furent séchées et montées avec du milieu Isomount 2000 Q Path® (VWR international, Radnor, USA) et recouvertes avec des lamelles de 0,15 mm d'épaisseur.

### **3. Cytotoxicité cellulaire par mesure de la LDH**

La viabilité cellulaire a été évaluée par la mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), enzyme normalement présente dans le cytoplasme cellulaire et libérée dans le milieu apical lors que la membrane cellulaire est endommagée. Un kit colorimétrique (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a été utilisé pour réaliser les mesures de l'activité de la LDH en suivant les instructions du fabricant.

### **4. Evaluation de la perméabilité intestinale**

#### ***4.1. Mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER)***

Pour vérifier la perméabilité et évaluer l'intégrité de la monocouche cellulaire dans les mono- et bicultures de cellules intestinales, la TEER a été mesurée tout au long des cultures, après chaque changement du milieu (2-3 fois par semaine), et à l'issue des expériences. Les mesures ont été faites à température ambiante pour éviter des variations de mesures d'après la littérature (Blume et al. 2010) et le guide d'utilisation du voltmètre/ohmmètre Millicell®-ERS-2 utilisé.

#### 4.2. Transport du rouge de phénol

Pour l'évaluation de l'intégrité des jonctions serrées qui régulent le transport paracellulaire, le passage du rouge de phénol a été mesuré. A la fin des expériences de stimulation pro-inflammatoire, les cellules ont été incubées pendant 1h ou 4h à 37°C avec 1 ml d'une solution de rouge de phénol 1mM dans du HEPES 20mM (pH 7,4) au niveau apical et 1mL de HEPES 20mM sans rouge de phénol dans le compartiment basal. La présence de rouge de phénol dans le surnageant basal a été alors mesurée par spectrophométrie colorimétrique à 560nm (TECAN Infinite 200 Pro, Grödig, Autriche).

La perméabilité apparente ( $P_{app}$ ) du rouge de phénol a été calculé selon la formule  $P_{app} = \frac{C}{C_0} \cdot \frac{V}{t} \cdot \frac{1}{A}$ , où  $C$  = concentration de rouge de phénol finale (mM),  $C_0$  = concentration de rouge de phénol initiale (mM),  $t$  = temps de diffusion (s),  $V$  = volume dans le compartiment basal (mL) et  $A$  = surface de la membrane (cm<sup>2</sup>).

### 5. Marquage immunofluorescent du mucus et des jonctions serrées

A la fin de la stimulation du modèle de tri-culture, les monocouches cellulaires ont été récupérées pour mettre en évidence par immunofluorescence la présence de mucus et d'éventuelles modifications structurelles des jonctions serrées. Pour ce faire, les cellules ont été délicatement rincées avec une solution froide (4°C) de DPBS contenant 4% de saccharose et 3% d'acide acétique afin de préserver le mucus pendant les traitements. Par la suite ces dernières ont été fixées à température ambiante avec une solution de DPBS contenant 4 % de saccharose et 4 % de para-formaldéhyde exempt de méthanol pendant 20 minutes puis perméabilisées avec une solution de PBS-Triton X-100 0,1% pendant 3 minutes à température ambiante.

Postérieurement, les cellules fixées ont été incubées 30 minutes à température ambiante avec une solution réduisant drastiquement l'autofluorescence endogène des cellules, l'Image-IT® Fx Signal Enhancer (CellSignaling Technology, Danvers, USA). Après trois nouveaux rinçages et saturation des sites aspécifiques à l'aide d'une solution DPBS/ Fish Gelatin Blocking Agent 1X (Biotium, Fremont, USA) pendant 60 minutes, les cellules ont été incubées à 4°C pendant la nuit dans un tampon spécifiquement conçu pour la dilution d'anticorps en immunofluorescence, BlockAid™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Ce tampon contenait les anticorps primaires spécifiques pour la mucine MUC5AC, une des protéines majoritaires constitutives de la couche de mucus de notre modèle et pour les protéines ZO-1, claudine et occludine qui font toutes les trois partie du complexe de jonction apical (tableau 3A). Par la suite, les cellules ont été rincées trois fois avec du DPBS contenant Fish Gelatin Blocking Agent 1X et incubées avec des anticorps couplés à des fluorophores Alexa, spécifiquement dirigés contre les anticorps primaires (IgG) (tableau 3B) à 37°C pendant 1h. Après trois rinçages (DPBS-saccharose) les échantillons ont été incubés à l'abri de la lumière pendant 15 minutes dans du DPBS-saccharose-DAPI 3 µg / mL, étant un intercalant de l'ADN, qui permet donc de mettre en évidence le noyau des cellules observées, puis rincées encore trois fois en PBS-saccharose. Le liquide résiduel a été retiré par capillarité à l'aide de papier absorbant.

Finalement les membranes ont été retirées de leur support puis coupées en 4 morceaux de taille équivalente pour être ensuite montées à l'aide du milieu de montage Prologold™ Gold antifade (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) entre lame et lamelle (épaisseur 0,17 mm). Ultérieurement, les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope confocal (laser scanning) 880 Multiphoton (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany).

A - Anticorps primaires					
Antigène	Nom	Fournisseur	Référence	Type	[ ] travail
Occludine	Anti-OCN	Atlas Antibodies	HPA005933	IgG polyclonale lapin	2 µg / mL
Claudine-1	Anti-Claudin 1	Abcam	ab15098	IgG polyclonale lapin	5 µg / mL
ZO-1	Anti-ZO1	Abcam	ab216880	IgG polyclonale lapin	2,5 µg / mL
Mucine 5AC	Anti-Mucin 5AC [CLH2]	Abcam	ab77576	IgG1 monoclonale souris	3 µg / mL
B - Anticorps secondaires					
IgG chaînes H&L lapin	Anti-lapin Alexa Fluor 488	ThermoFisher Scientific	A-11008	IgG polyclonale chèvre	4 µg / mL
IgG chaînes H&L lapin	Anti-lapin Alexa Fluor 568	ThermoFisher Scientific	A-11036	IgG polyclonale chèvre	4 µg / mL
IgG chaînes H&L souris	Anti-lapin Alexa Fluor 633	ThermoFisher Scientific	A-21052	IgG polyclonale chèvre	4 µg / mL

**Tableau 3.** Anticorps pour immunomarquage. Anticorps primaires (A) et anticorps secondaires (B) utilisés pour le marquage immunofluorescent des protéines du mucus et des jonctions serrées.

## 6. Expression génique des marqueurs d'inflammation (RT-qPCR)

Suite aux expériences de stimulation, les cellules ont été récupérées pour en extraire les ARN totaux dans le but de mesurer l'expression génique de plusieurs marqueurs d'inflammation. Ainsi nous avons retenu trois cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-8), une cytokine anti-inflammatoire (IL-10), et deux enzymes aussi considérées comme marqueurs d'inflammation, la cyclo-oxygénase (COX-2) et la forme inducible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS). COX-2 catalyse la réaction de production des prostanoïdes (prostaglandines et thromboxanes) en réponse à un stimulus inflammatoire et l'iNOS catalyse la réaction de production de l'oxyde nitrique par les macrophages lors de l'inflammation.

Les ARN totaux des cellules ainsi récupérées ont été extraits à l'aide du kit NucleoSpin® RNA/Protein (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Ces derniers ont été concentrés si besoin, à l'aide du kit NucleoSpin® RNA Clean-up XS (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Leur pureté a été contrôlée par spectrométrie (NanoDrop™ One/One<sup>C</sup> Thermo Scientific™, Waltham, USA) et pour une quantification plus fine, un dosage par fluorescence a été réalisé à l'aide du fluoromètre Qubit™ 4 (Invitrogen™, Carlsbas, USA) et du kit Qubit™ RNA BR Assay (Invitrogen™, Carlsbas, USA). Ensuite l'ADNc a été synthétisé par retro-transcription avec 1 µg d'ARN totaux à partir du kit LunaScript®RT SuperMix (New England Biolabs Inc., Ipswich, USA) en suivant la procédure du fabricant. Les analyses en RT-qPCR ont été réalisées à l'aide du thermocycleur LightCycler® 480 System en block 384 puits (Roche, Penzberg, Germany) sous les conditions détaillées dans le tableau 4 avec 0,5 µL de produit de la retro-transcription dilué préalablement (1/20) et 1 µL du master mix préparé avec le kit SensiFAST™ SYBR® No-ROX (Bioline Meridian Bioscience, Cincinnati, USA) et contenant les amorces dessinées *in silico* avec l'application Primer Blast NCBI à des concentrations évaluées au préalable (tableau 5). L'expression des ARN messagers (ARNm) a été quantifiée par rapport à deux gènes de ménage inclus dans chaque série d'analyses (RPLP0 et RPL37A pour Caco-2 TC7 et HT29MTX, RPLP0 et  $\beta$ -actine (ACTB) pour THP-1).

### Conditions RT-qPCR

45 cycles  
 Dissociation - 95°C 10 secondes  
 Hybridation - 64°C 10 secondes  
 Elongation - 72°C 10 secondes

**Tableau 4.** Conditions de la RT-qPCR pour la quantification d'ARN exprimé par les cellules.

Amorces qPCR			
Cible	Sequence (5'→3')	[ ] de travail	Efficacité de PCR estimée
iNOS/NOS2	F - CCGAGGCAAACAGCACATTC R - CTGAGGGCTTTGCTGAGGTC	0,6 µM	1,95
PTGS2/COX2	F - GCTGTTCCCACCCATGTCAA R - TTCCGGTGTGAGCAGTTTTCT	0,4 µM	2
TNF	F - TTCCCAGGGACCTCTCTCT R - AGGGTTTGCTACAACATGGGC	0,4 µM	1,97
IL6	F - CCAGAGCTGTGCAGATGAGTACA R - GGCATTTGTGGTTGGGTCAGG	0,6 µM	1,97
IL8	F - AGACAGCAGAGCACACAAGC R - CACAGTGAGATGGTTCCTCC	0,6 µM	2
IL10	F - GGCGCTGTCATCGATTTCTTC R - CACTCATGGCTTTGTAGATGCC	0,4 µM	1,96
RPLP0	F - TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT R - CAATCTGCAGACAGACTGG	0,4 µM	2
RPL37A	F - TCTGTGGCAAAACCAAGATGAAGA R - TTACCGTGACAGCGGAAGTG	0,4 µM	1,93
ACTB	F - GATCATTGCTCCTCCTGAGC R - CCGGACTCGTCATACTCCTG	0,4 µM	1,87

**Tableau 5.** Couples d'amorces utilisés pour mesurer l'expression génique des marqueurs de l'inflammation dans les cellules intestinales et immunitaires.

## 7. Quantification des cytokines pro-inflammatoires par ELISA

La production et libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules après stimulation ont été mesurées dans les surnageants apicaux et/ou basaux récupérés après les expériences de stimulation et stockés à -80°C. La production des cytokines TNF- $\alpha$  et IL-6 a été déterminée par la méthode immuno-enzymatique (ELISA) à l'aide des kits (ELISA-SET-Go) prêts à l'emploi (Invitrogen™, Carlsbas, USA) selon les instructions du fabricant. Pour l'IL-8, un kit ELISA (IL-8/CXCL8 DuoSet) de R&D Systems® (Minneapolis, USA) a été utilisé en suivant les instructions du fabricant.

## **8. Interaction de la $\beta$ -cryptoxanthine (BCX) avec le modèle *in vitro* d'inflammation intestinale**

La  $\beta$ -cryptoxanthine étant une molécule liposoluble, il est nécessaire de l'incorporer préalablement dans des micelles pour qu'elle puisse être absorbée par les cellules Caco-2 TC7. Lors des expériences de transport, deux types de micelles ont été utilisés : des micelles artificielles à base de Tween-40 et des micelles physiologiques. La concentration finale de BCX a été choisie en fonction des doses physiologiques trouvées dans le duodénum après ingestion, à savoir 20 $\mu$ M.

### **8.1. Préparation des micelles-BCX (artificielles et physiologiques)**

#### **8.1.1. Préparation des micelles Tween**

Les micelles synthétiques utilisées pour réaliser les expériences de transport de la BCX ont été synthétisées selon Doring, et al. 1998. Brièvement, un volume (nécessaire pour obtenir une concentration finale de 20 $\mu$ M) d'une solution de BCX préparée dans l'hexane a été déposé dans un tube en verre contenant 100  $\mu$ L d'une solution de Tween-40 solubilisé dans de l'acétone (20 %, p/v). Après évaporation des solvants sous azote, le résidu est solubilisé par sonication dans 15mL de DMEM GlutaMAX™ sans SVF. Ensuite, du SVF est ajouté (10%) et la solution est alors filtrée (filtre stérile 0,22 $\mu$ m, Millipore). La solution doit être translucide.

#### **8.1.2. Préparation des micelles physiologiques**

Les micelles physiologiques ont été préparées selon Dhuique-Mayer et al. 2013. Des solutions stock de phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, monooléine, cholestérol libre et acide oléique ont été préparées dans du chloroforme-méthanol (2 : 1; v/v). Un volume approprié de chacune des solutions est ajouté dans un tube en verre afin d'obtenir les concentrations finales suivantes : 0,04 mM phosphatidylcholine, 0,16 mM lysophosphatidylcholine, 0,3 mM monoolein, 0,1 mM cholestérol, 0,5 mM acide oléique, 20  $\mu$ M BCX. La quantité de BCX ajoutée correspond à une concentration théorique de 20 $\mu$ M. Les solvants sont évaporés sous azote et les résidus sont solubilisés dans 15mL de DMEM GlutaMAX™ sans SVF contenant 1,3 mM de taurocholate. Le tout est soniqué à l'aide d'une sonde à ultrasons pendant 2-3 minutes. Ensuite, 10% de SVF a été ajouté et la solution filtrée (filtre stérile 0,22 $\mu$ m, Millipore) afin d'obtenir une solution optiquement claire. Afin de vérifier la concentration réelle en BCX de cette micelle, 0,5 ml sont prélevés, extraits et injectés en HPLC.

### **8.2. Interaction de la BCX avec le modèle d'inflammation en tri-culture**

Pour les expériences concernant l'interaction de la BCX avec le modèle d'inflammation, les cellules ont étéensemencées comme décrit précédemment pour le modèle de tri-culture (Fig. 5). Après les 24h de repos de la tri-culture et 2h avant l'ajout du cocktail stimulant (LPS/IFN $\gamma$ ), le milieu apical a été remplacé par le milieu de culture contenant les micelles préparées (artificielles ou physiologiques). Deux scénarios étaient possibles :

- Après 2 heures de contact avec les micelles-BCX, ajouter le stimulus d'inflammation directement dans le milieu et incubé pendant 18h supplémentaires. Temps total de contact BCX-cellules : 20h.
- Après 2 heures de contact avec les micelles-BCX, enlever le milieu (avec BCX) et rajouter du milieu frais contenant uniquement le stimulus d'inflammation puis incubé pendant 18h. Temps total de contact BCX-cellules : 2h.

## MATERIEL ET METHODES

Dans les deux cas, les surnageants et les cellules ont été récupérés après 18h de stimulation inflammatoire pour les dosages ultérieurs des marqueurs d'inflammation (ELISA et RT-qPCR), l'évaluation de la cytotoxicité et le transport de la BCX (HPLC) à travers la monocouche épithéliale.

### **Dosage HPLC**

Pour évaluer le transport de la BCX dans le modèle en état d'inflammation, les surnageants apicaux et basaux ainsi que les cellules intestinales ont été récupérées et la BCX déterminée par HPLC.

Pour cela, des aliquotes (500 $\mu$ L) ont été extraites deux fois avec 2mL d'hexane en présence de 500  $\mu$ L d'éthanol contenant un standard interne (cantaxanthine 2mg / L. Après centrifugation (500g, 5 min, température ambiante) les phases extraites obtenues sont rassemblées et évaporées sous azote. Le résidu est dissous dans 100  $\mu$ L de dichlorométhane-méthanol (50 : 50 ; v/v). Les analyses de HPLC ont été réalisées selon Dhuique-Mayer et al (2013) avec un système Agilent 1100 (Massy, France). La colonne utilisée est une C30 (250 x 4.6 mm ; 5  $\mu$ m) YMC (EUROP GMBH, Germany)). Les phases mobiles étaient : l'eau ultrapure (éluant A), du méthanol (éluant B) et du méthyl-tert-butyl-éther (éluant C) selon un gradient d'élution. Le débit a été fixé à 1mL / min, la température de la colonne à 25°C et le volume d'injection à 60  $\mu$ L. Un détecteur à barrettes de diodes (DAD-Agilent 1100) a été utilisé pour la détection des caroténoïdes aux différentes longueurs d'ondes. La quantification de la BCX a été réalisée à 450nm grâce à des courbes de calibration préparées avec de la BCX étalon. Le taux d'absorption est calculé sur la base des quantités cellulaires et basales dosées par rapport à la quantité initiale, c'est-à-dire apicales.

### **9. Analyse statistique**

Pour la quantification des cytokines pro-inflammatoires et l'expression des ARNm, les expériences ont été réalisées sur trois puits et le dosage a été fait en triplicata (n=9). En ce qui concerne le passage du rouge de phénol et la mesure de l'activité de la LDH, les expériences ont été réalisées sur trois puits et le dosage a été fait en duplicata (n=6). Les moyennes de ces données ont été utilisées pour l'analyse de variance (ANOVA) effectué à l'aide du logiciel StatGraphics Centurion 18 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia.). Un niveau de significativité de  $P < 0,05$  a été adopté pour toutes les comparaisons.

# RESULTATS

## 1. Modèle *in vitro* d'inflammation intestinale

### 1.1. Détermination des conditions optimales du développement du modèle

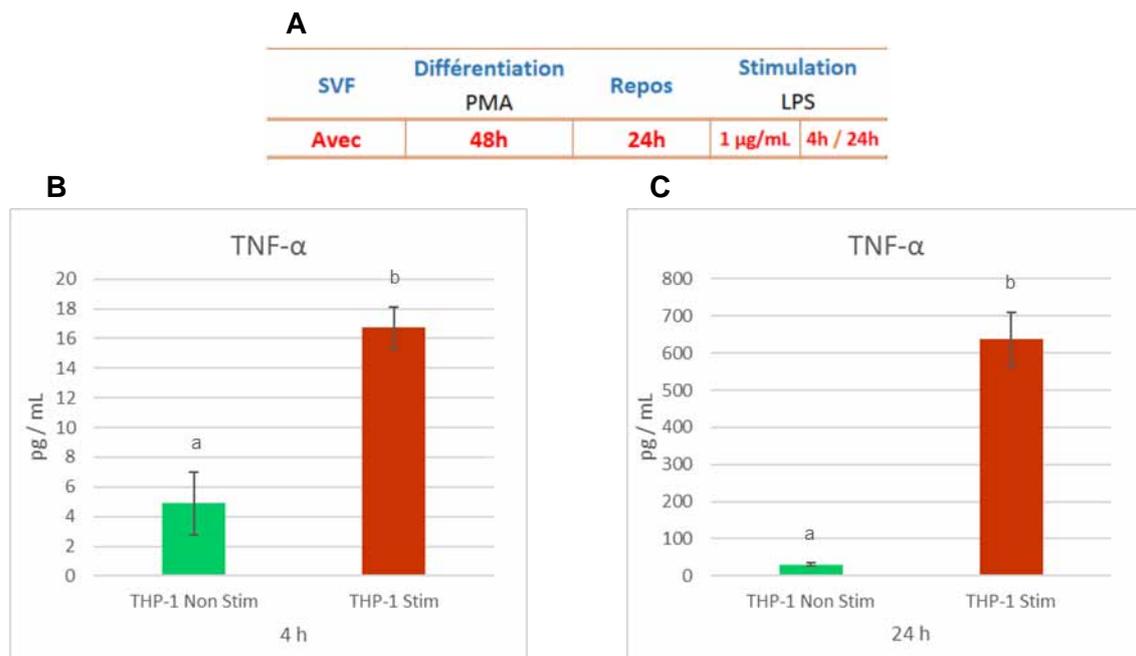
L'objectif de ce travail a été de mettre au point un modèle de co-culture cellulaire en état d'inflammation. La mise au point des différentes conditions de co-culture a été faite en plusieurs étapes. Dans les prochains paragraphes je présenterai des résultats représentatifs de ces expériences préliminaires qui ont permis de déterminer les différentes conditions utilisées par la suite dans le modèle de tri-culture.

#### Monoculture THP-1

Les premières expériences ont été faites sur des monocultures de THP-1. Pour rappel, il s'agit d'une lignée cellulaire monocyttaire capable de se différencier en cellules de type macrophage après stimulation chimique (PMA). Lors de ces expériences préliminaires, différentes conditions expérimentales ont été testées (voir Tableau 1 de Matériels et Méthodes).

En effet, la présence de sérum dans le milieu de culture peut avoir une influence dans le métabolisme des THP-1 et nous avons observé que les cellules réagissaient mieux à la stimulation avec une production plus importante de cytokines pro-inflammatoires lorsqu'elles étaient en présence de SVF (10%). Les deux temps de différenciation 24 ou 48h en présence de PMA testés sur les THP-1 en monoculture ont montré des résultats favorables à une réponse au LPS avec la production de TNF- $\alpha$ . D'après la littérature, les THP-1 auraient besoin d'une période de stabilisation du métabolisme après différenciation avant d'être utilisées. Des résultats d'expériences préliminaires ont montré qu'effectivement les cellules présentaient une meilleure réponse au stimulus pro-inflammatoire (LPS) après avoir suivi une période de repos de 24h suite à la différenciation.

La figure 6 présente les résultats représentatifs de ces expériences préliminaires montrant la production de TNF- $\alpha$  après 4 et 24h de stimulation avec du LPS. Sur le graphique, nous pouvons observer une forte production de cette cytokine pro-inflammatoire par rapport à des cellules témoins non stimulées dans les deux temps de stimulation testés.



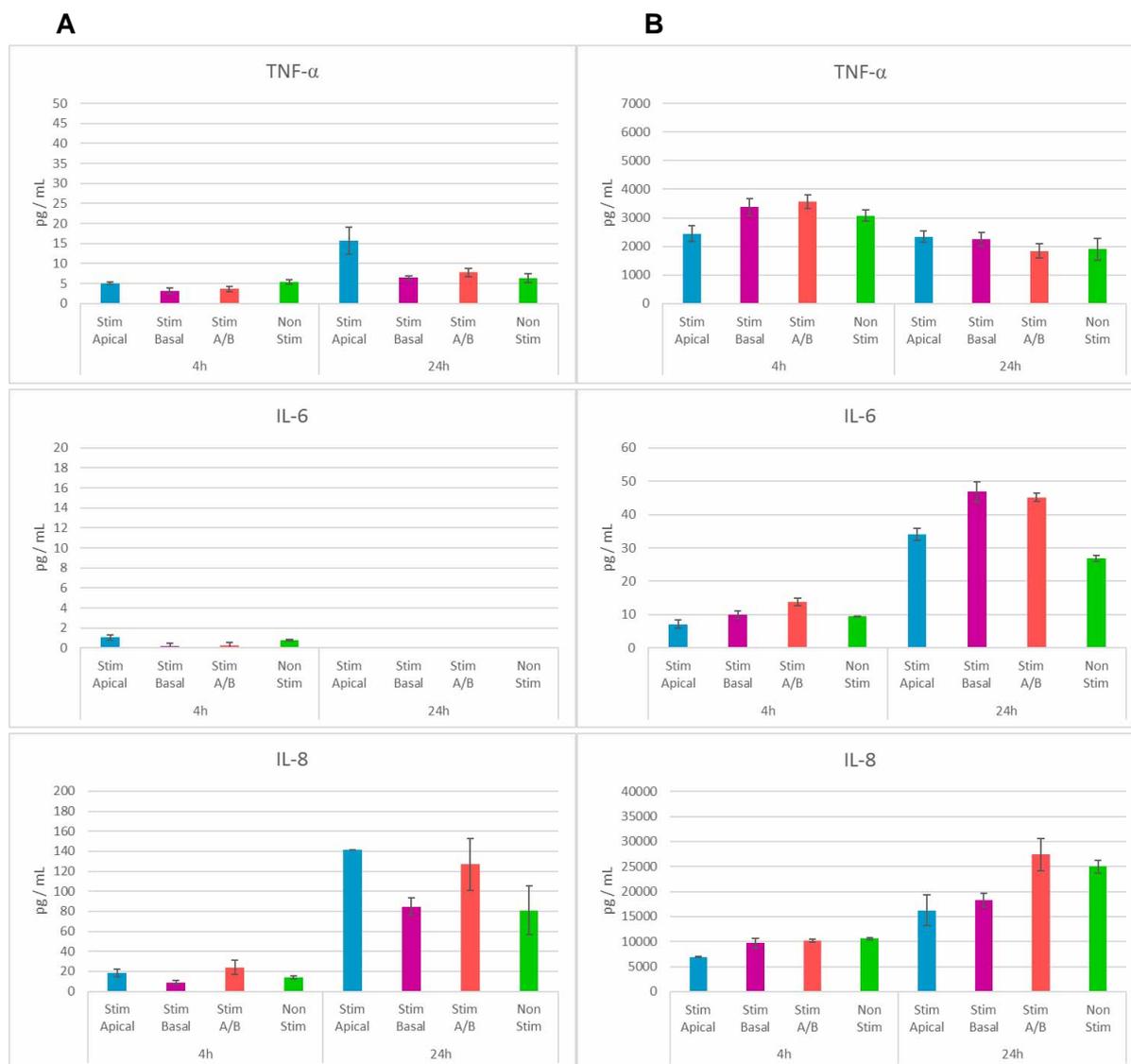
**Figure 6.** Production de TNF- $\alpha$  par les THP-1 mesurée dans le surnageant. (A) Conditions de culture, différenciation et stimulation des THP-1. Production de TNF- $\alpha$  après (B) 4h et (C) 24h de stimulation. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

### Association en co-culture Caco-2 TC7 / THP-1

Suite aux expériences en monoculture de THP-1, ces cellules de type immunitaire ont été associées en co-culture avec des Caco-2 TC7. Pour ces expériences d'induction de l'inflammation, les mêmes conditions de différenciation et stimulation utilisées pour les THP-1 ont été reproduites et des résultats représentatifs sont montrés dans la figure 7. Dans ces expériences de mise au point de la co-culture, nous avons testé plusieurs types de stimulation, à savoir soit dans le compartiment apical, soit dans le compartiment basal, soit dans les deux simultanément.

Les graphiques montrent dans la colonne de gauche (A), la production des cytokines pro-inflammatoires après 4 ou 24h par les cellules intestinales (Caco-2 TC7) et dans la colonne de droite (B) leur production par les THP-1. Nous observons une faible production des trois cytokines par les cellules intestinales à 4h quel que soit le type de stimulation. La production après 24h de stimulation augmente légèrement dans le cas de TNF- $\alpha$  et d'une façon plus importante pour IL-8. La stimulation apicale semblerait alors être plus efficace pour la production de TNF- $\alpha$  mais de la même magnitude que la stimulation simultanée apical/basal pour la production de l'IL-8. Concernant la production par les cellules immunitaires, nous observons un pic de production important à 4h pour TNF- $\alpha$  et à 24h dans le cas de l'IL-6 et l'IL-8. Nous constatons aussi que la stimulation simultanée en milieu apical/basal provoque une réponse similaire voire meilleure, dans le cas de la production de l'IL-8, que la stimulation uniquement faite du côté basal.

# RESULTATS



**Figure 7.** Production de cytokines pro-inflammatoires mesurée après 4 et 24h dans les surnageants du modèle de co-culture (Caco-2 TC7 / THP-1). (A) Compartiment apical (Caco-2 TC7). (B) Compartiment basal (THP-1).

## RESULTATS

Après analyse de l'ensemble des résultats préliminaires, nous avons décidé que la stimulation la plus efficace pour la production des cytokines pro-inflammatoires dans notre modèle est la stimulation simultanée dans les deux compartiments, apical et basal. Néanmoins, les résultats sur la production de cytokines par la co-culture Caco-2 TC7 / THP-1 n'étant pas assez prononcée en utilisant uniquement le LPS comme stimulant et en référence à la littérature nous avons décidé d'ajouter de l'IFN $\gamma$  en plus du LPS pour mieux déclencher l'inflammation.

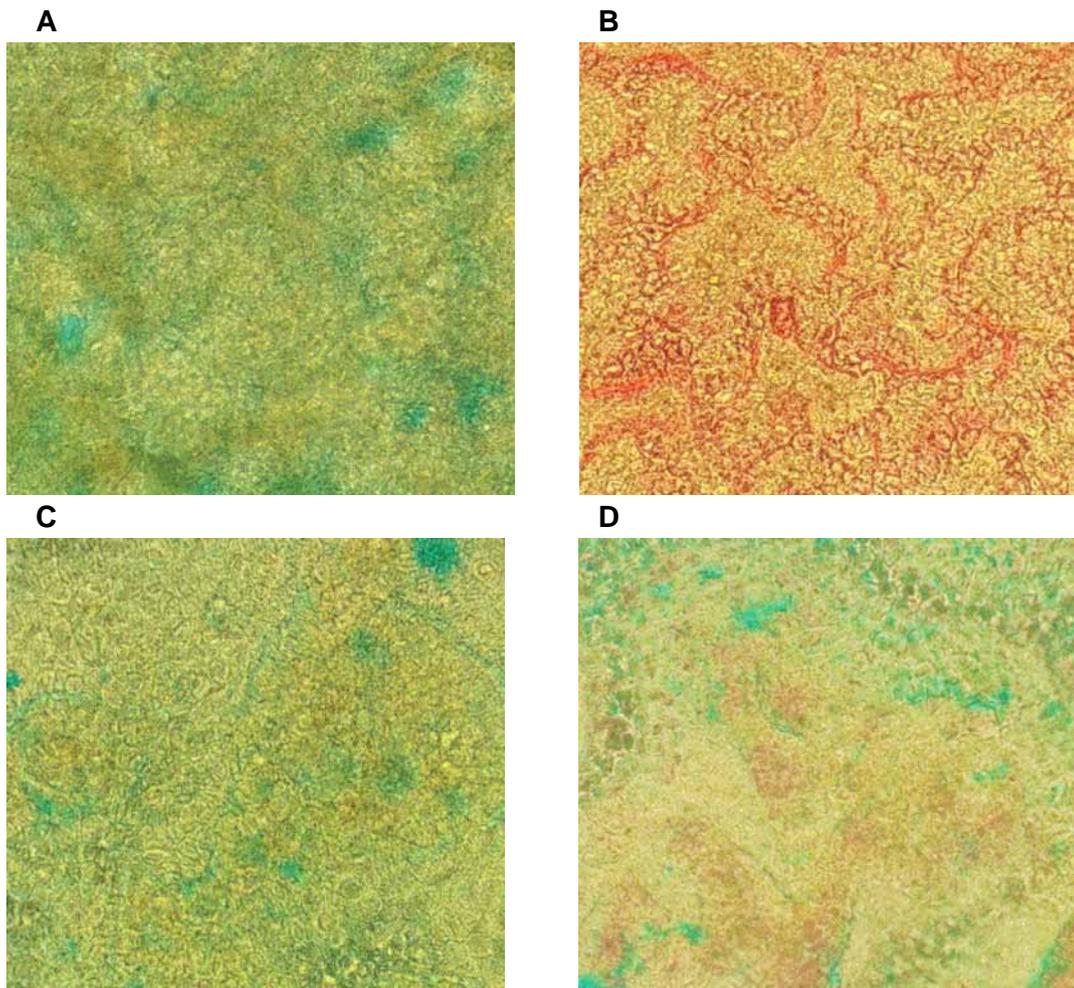
De la même façon et aussi pour des raisons de logistique en vue des expériences futures, nous avons estimé qu'une incubation de 18h avec le cocktail de stimulation était suffisante pour la production des trois cytokines pro-inflammatoires étudiées. A titre informatif, pour le temps de différenciation des THP-1, des expériences supplémentaires en tri-culture avec uniquement 24h d'incubation en contact avec le PMA à la place de 48h ont été réalisées. Nous avons considéré qu'il n'y avait pas de changements importants sur les résultats d'induction d'inflammation concernant les cytokines étudiées et nous avons gardé alors comme temps de différenciation 24h par des raisons pratiques d'organisation.

### ***1.2. Caractérisation de la production de mucus dans la biculture***

La présence de mucus sur la biculture Caco-2 / HT29-MTX a été évaluée par différentes techniques. Une coloration mixte bleu Alcian / Fast Red pour visualiser la répartition des cellules et le mucus produit par les HT29-MTX. Ensuite, des coupes histologiques ont été colorées pour observer l'épithélium intestinal et le mucus présent sur les cellules. En parallèle, la mucine MUC5AC, produite par les HT29-MTX a été mise en évidence par marquage immunofluorescent.

#### **Coloration du mucus au bleu alcian**

Dans la figure 8 nous observons les photos au microscope optique inversé des tapis cellulaires après coloration montrant une répartition homogène du mucus et des cellules. Le bleu Alcian colore les composés acides du mucus et le Fast Red met en évidence la présence de la phosphatase alcaline, enzyme exprimée par les Caco-2 uniquement. La couche de mucus, colorée en bleu est visible dans la monoculture de HT29 MTX (Fig. 8A) et en co-culture avec les Caco-2 TC7 (Fig. 8C). La figure 8B montre alors la coloration rouge avec le FastRed dans les Caco-2 seules et dans la figure 8D nous pouvons observer la répartition des deux types de cellules avec les deux colorations simultanées.



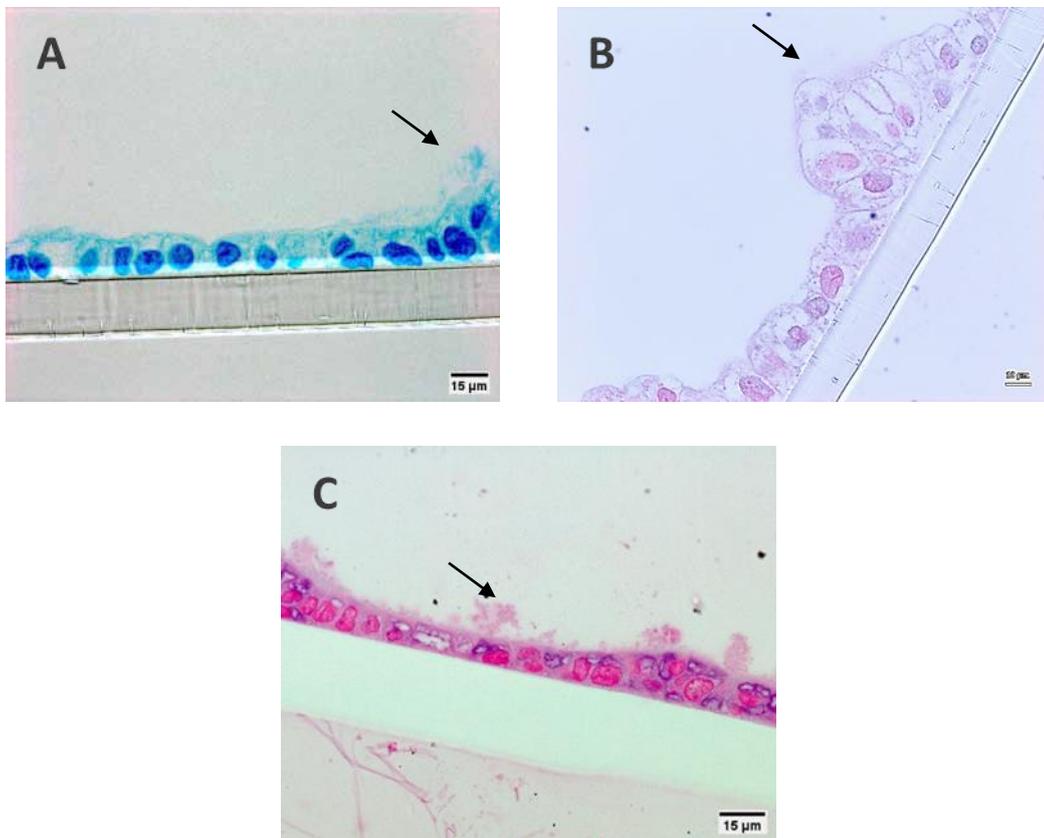
**Figure 8.** Observation au microscope optique inversé du mucus après coloration au bleu Alcian. (A) Monoculture HT29-MTX après 21 jours de culture colorée au bleu Alcian (20x). (B) Monoculture Caco-2 TC7 après 16 jours de culture colorée au FastRed (10x). (C) et (D) Co-culture Caco-2 TC7 / HT29-MTX (9:1) après 16 jours de culture colorée respectivement au bleu Alcian (20x) et au bleu Alcian / FastRed (X20).

## RESULTATS

### Coloration histochimique

Dans la figure 9 les photos des coupes histologiques colorées sont présentées. Trois colorations différentes ont été utilisées pour montrer la présence du mucus produit par les HT29-MTX dans le modèle de biculture. Nous observons alors dans un premier temps la monocouche cellulaire sur la membrane de polycarbonate avec une association de Caco-2 TC7 avec HT29 MTX, très bien représentée dans la figure 9B particulièrement. Les cellules HT29 forment des grappes caractéristiques, intégrées parmi les Caco-2.

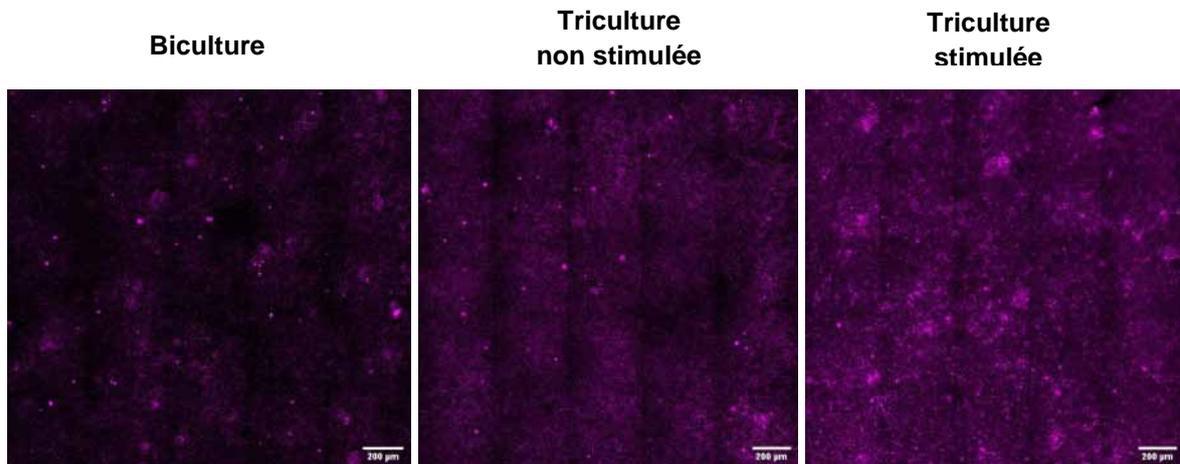
Les trois méthodes de coloration nous permettent alors de mettre en évidence la présence d'amas de mucus au niveau de la membrane apicale des cellules. Le mucus est coloré en bleu (bleu Alcian) dans la figure 9A, en rose/violet (rouge de ruthénium) dans la figure 9B et en rose (réactif de schiff) dans la figure 9C



**Figure 9.** Observations microscopiques (63x) de coupes histologiques de la biculture cellulaire. Coloration des mucines : (A) au bleu Alcian, (B) au rouge de ruthénium et (C) avec coloration PAS / Nuclear Fast Red. Les flèches montrent les amas de mucus.

### Marquage immunofluorescent de la mucine MUC5AC

La figure 10 montre les images acquises par microscopie confocale après immunomarquage fluorescent de la mucine MUC5AC produite par les HT29-MTX. Nous observons que la présence des THP-1 dans le modèle induit une augmentation de la présence du mucus par rapport à la biculture. Ce phénomène est renforcé par la stimulation avec du LPS / IFN $\gamma$ . Nous observons aussi que le mucus est présent de façon homogène sur le tapis cellulaire.



**Figure 10.** Marquage immunofluorescent de la mucine MUC5AC. (A) Biculture Caco-2 TC7 / HT29-MTX). (B) et (C) Triculture Caco-2 TC7 / HT29-MTX / THP-1 stimulée ou non, respectivement. Photos prises à l'aide du microscope confocal (laser scanning) 880 Multiphoton (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany).

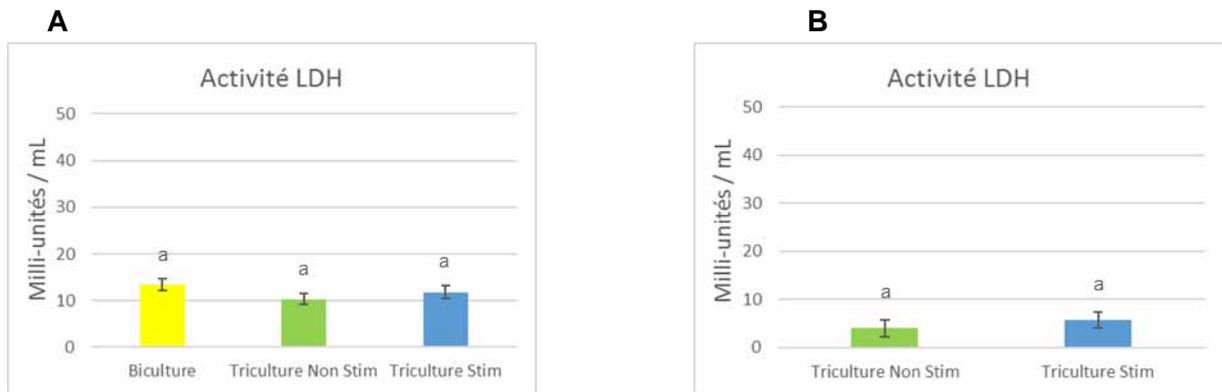
### 1.3. Effets de la stimulation par le LPS et l'IFN $\gamma$ à faible dose sur le modèle cellulaire d'inflammation intestinale

Il est rappelé que pour des raisons de commodité de langage et de compréhension nous avons choisi de nommer les deux doses de stimulation utilisées (LPS-50 ng/mL – IFN $\gamma$ -5 ng/mL et LPS-1  $\mu$ g/mL – IFN $\gamma$ -50 ng/mL), respectivement stimulation faible et stimulation forte, dans le reste du manuscrit.

#### 1.3.1. Cytotoxicité et perméabilité épithéliale

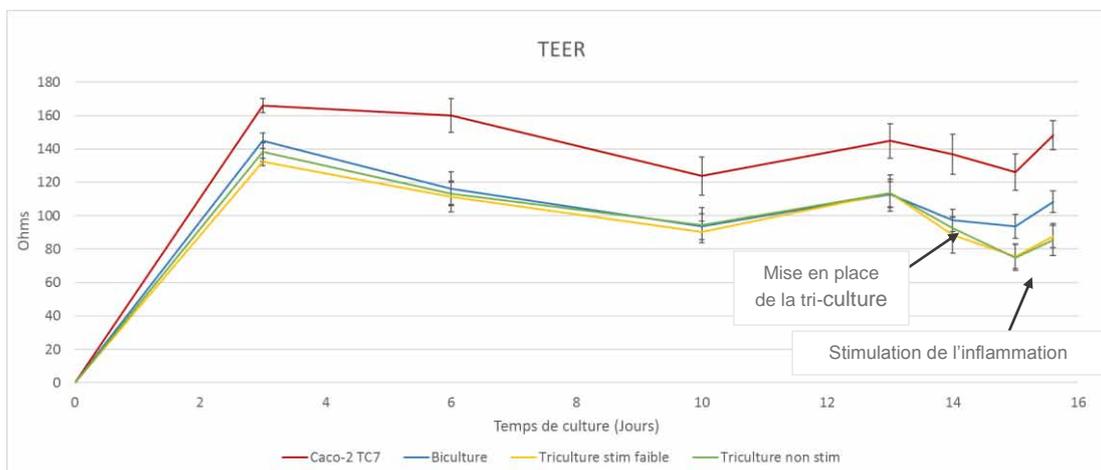
Différents tests ont été pratiqués sur les cultures cellulaires pour évaluer l'effet potentiellement cytotoxique du LPS/IFN $\gamma$  appliqué à faible dose sur la bi- et la tri-culture cellulaire ainsi que sur la perméabilité de la biculture. Il est rappelé que la « biculture » réfère à l'association Caco2-TC7 / HT29-MTX mimant l'épithélium intestinal et que la « tri-culture » réfère à la biculture (compartiment apical) associée aux cellules immunitaires THP1 (compartiment basal). Quelles que soient les associations cellulaires, la mesure de l'activité LDH ne révèle aucune cytotoxicité lors de la stimulation par le cocktail LPS/IFN $\gamma$  à faible dose (Fig. 11).

## RESULTATS



**Figure 11.** Activité de la lactate déshydrogénase dans les surnageants (compartiment apical ou basal) du modèle de tri-culture après faible stimulation. (A) Compartiment apical (cellules intestinales Caco2-TC7/HT29-MTX). (B) compartiment basal (cellules immunitaires THP1). La biculture correspond au modèle contenant uniquement des cellules intestinales. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

Concernant les mesures de TEER (Fig. 12) celle-ci augmente et se stabilise pendant la durée de la mono- ou de la biculture indiquant l'établissement de l'uniformité et de l'intégrité de la monocouche cellulaire intestinale. La TEER mesurée sur les Caco-2 seules montre une résistance transépithéliale plus forte (de l'ordre de 160  $\Omega$ ) par rapport à la biculture (de l'ordre de 130-140  $\Omega$ ). Cependant cette mesure en biculture reste relativement stable alors que l'addition de THP-1 dans le compartiment basal entraîne une diminution légère de la résistance transépithéliale, effet indépendant de l'ajout ou non de LPS/IFN $\gamma$ .

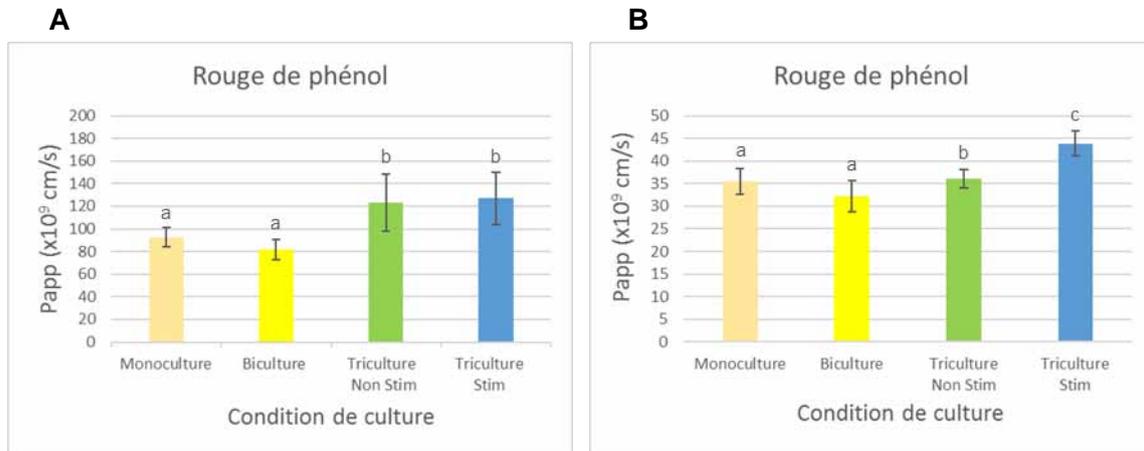


**Figure 12.** Suivi de la résistance électrique transépithéliale (TEER) tout au long de la différenciation et pendant les expériences de stimulation à faible dose.

Pour l'évaluation de l'intégrité des jonctions serrées qui régulent le transport paracellulaire, le test complémentaire de diffusion du rouge de phénol (Fig. 13 A) à travers la monocouche épithéliale montre qu'il n'y a pas de différence entre la mono- et la biculture ni entre les tri-cultures stimulées ou non après une heure de diffusion. Nous notons cependant une augmentation de la perméabilité des tri-cultures par rapport à la biculture, ce qui semble cohérent par rapport à l'observation de la diminution de la TEER après ajout des THP1.

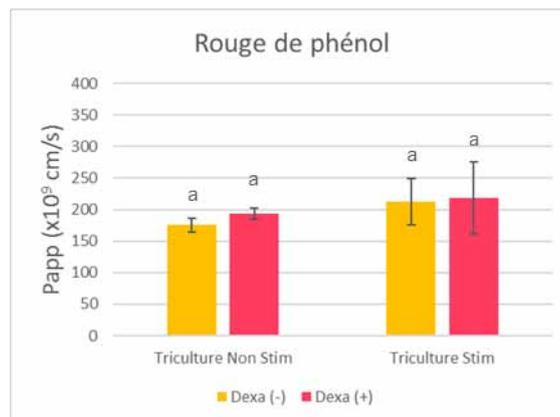
## RESULTATS

Les mesures réalisées après 4 heures de diffusion (Fig. 13 B) ne montrent pas de différence significative dans la perméabilité entre mono- et biculture. Ceci pourrait être dû au fait que selon la loi de Fick, au bout d'un certain temps un équilibre aurait été atteint. Pour la tri-culture non stimulée une différence statistiquement significative est observée par rapport à la biculture mais celle-ci reste très faible, voire insignifiante. Notons aussi qu'il y aurait un effet légèrement plus visible sur l'augmentation de la perméabilité épithéliale due à la stimulation.



**Figure 13.** Transport paracellulaire du rouge de phénol, exprimé en perméabilité apparente dans les différents types d'associations cellulaires à 2 temps de diffusion et à faible dose de stimulation. (A) 1h, (B) 4h de diffusion. Monoculture : Caco-2 TC7, biculture : Caco-2 TC7 / HT29MTX, tri-culture : Caco-2 TC7 / HT29MTX / THP-1. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

En marge de ces expériences, il a été aussi montré que la dexaméthasone, un corticostéroïde puissant fréquemment employé comme médicament anti-inflammatoire, et utilisé ici en tant que témoin positif, n'avait aucun effet sur la perméabilité épithéliale (Fig. 14).

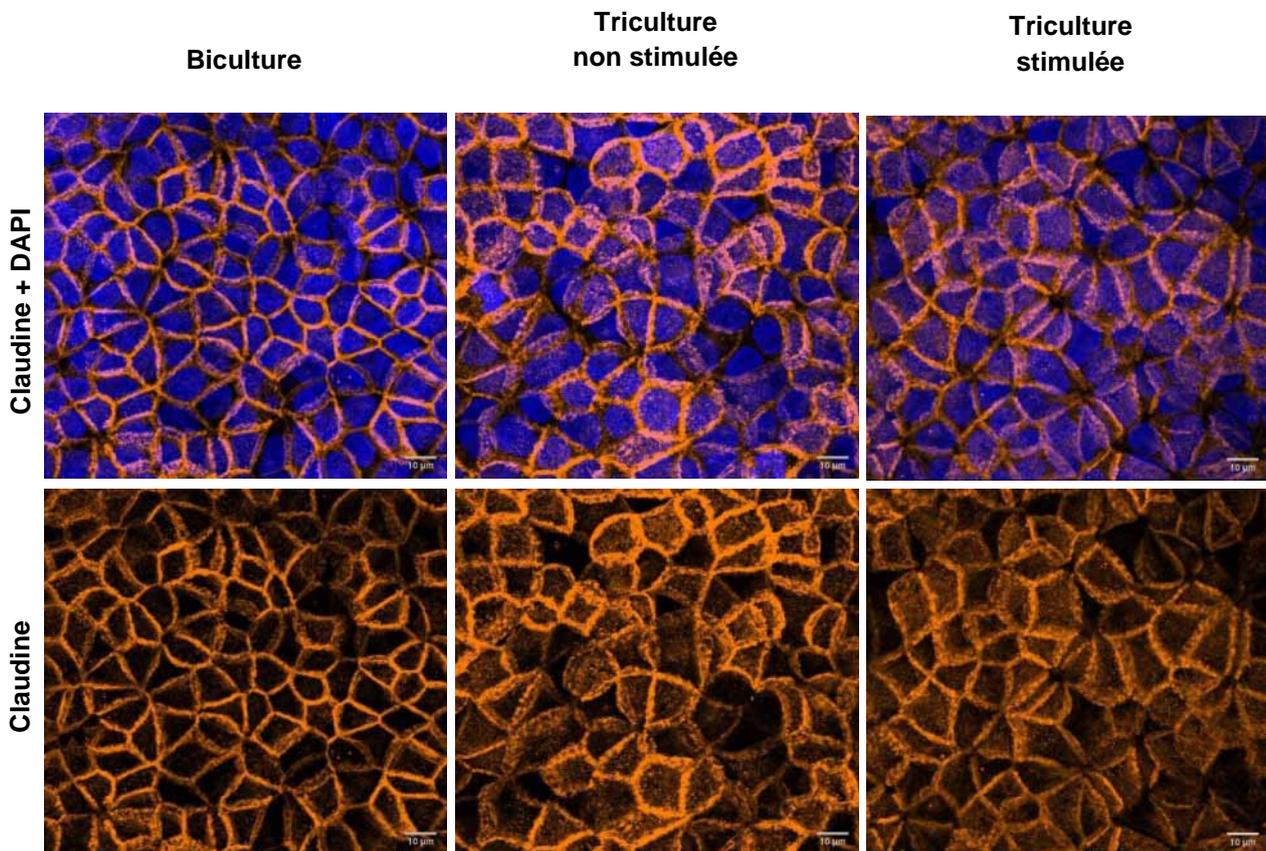


**Figure 14.** Transport paracellulaire du rouge de phénol, exprimé en perméabilité apparente dans la tri-culture (Caco-2 TC7 / HT29MTX / THP-1) à faible dose de stimulation et en présence de dexaméthasone. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

## RESULTATS

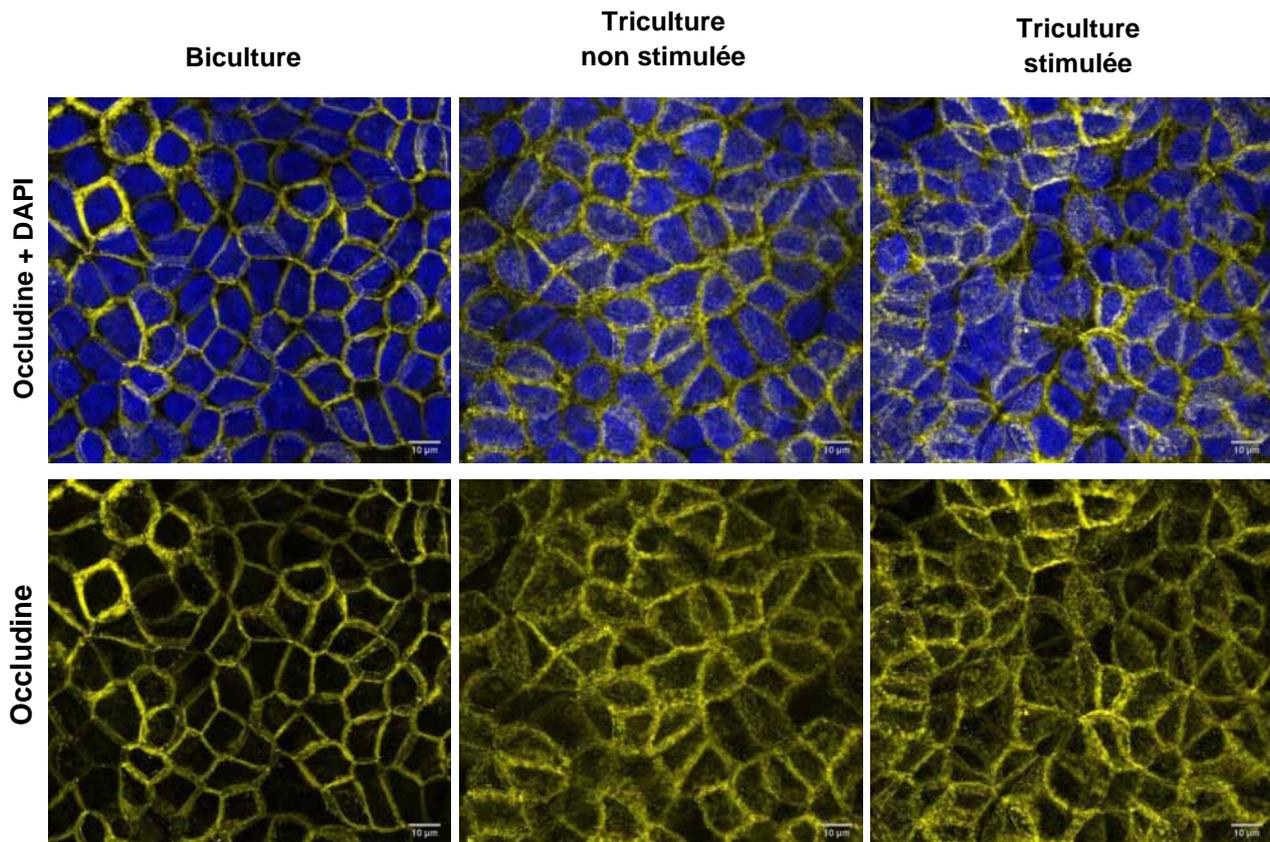
### 1.3.2. Marquage immunofluorescent des jonctions serrées (microscopie confocale)

Trois protéines constitutives du complexe AJC ont été immunomarquées et observées par fluorescence à l'aide d'un microscope confocal : claudine (Fig. 15), occludine (Fig. 16) et ZO-1 (Fig 17). Dans les trois cas, nous observons dans la biculture un marquage assez régulier, net et bien localisé des trois protéines définissant le périmètre de la cellule et permettant de bien identifier les membranes apicales. C'est particulièrement le cas pour ZO-1. Dans le cas de la triculture, l'association des cellules intestinales avec les THP1 induit une altération de la localisation de la claudine et de l'occludine. En effet, nous observons un marquage plus diffus et irrégulier avec une moins bonne définition du contour des membranes et l'apparition d'un signal ponctiforme cytoplasmique, encore plus prononcé dans le modèle stimulé. Ces observations mettent en évidence une délocalisation des protéines et un réarrangement de leur organisation cellulaire.

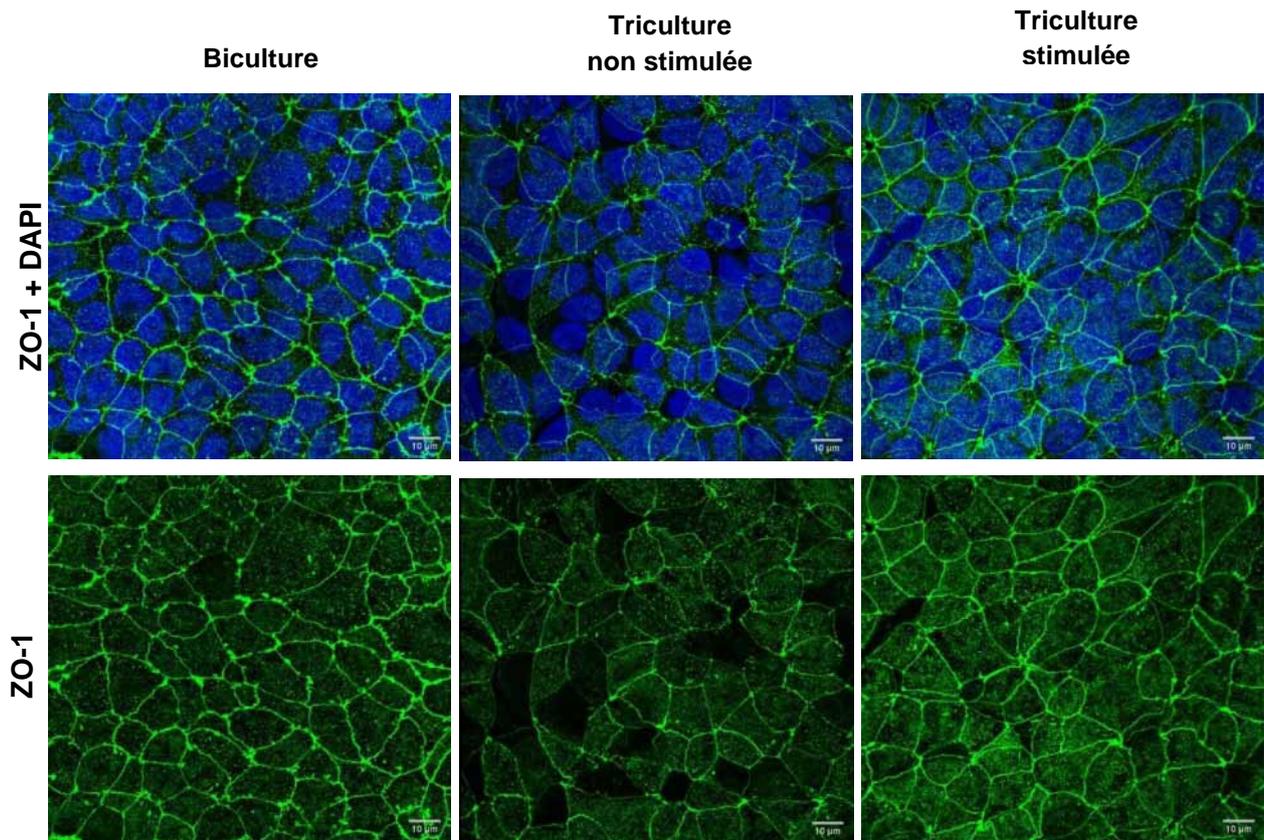


**Figure 15.** Marquage immunofluorescent de la claudine, protéine constitutive du complexe AJC. Les trois conditions de culture sont montrées : Biculture (Caco-2 TC7 / HT29-MTX), Triculture (Caco-2 TC7 / HT29-MTX / THP-1) stimulée et non stimulée. En orange, marquage de la claudine et en bleu (DAPI) les noyaux. Photos prises à l'aide du microscope confocal (laser scanning) 880 Multiphoton (Carl Zeiss MicroscopyGmbH, Jena, Germany).

## RESULTATS



**Figure 16.** Marquage immunofluorescent de l'occludine, protéine constitutive du complexe AJC. Les trois conditions de culture sont montrées : Biculture (Caco-2 TC7 / HT29-MTX), Triculture (Caco-2 TC7 / HT29-MTX / THP-1) stimulée et non stimulée. En jaune, marquage de l'occludine et en bleu (DAPI) les noyaux. Photos prises à l'aide du microscope confocal (laser scanning) 880 Multiphoton (Carl Zeiss MicroscopyGmbH, Jena, Germany).



**Figure 17.** Marquage immunofluorescent de ZO-1, protéine constitutive du complexe AJC. Les trois conditions de culture sont montrées : Biculture (Caco-2 TC7 / HT29-MTX), Triculture (Caco-2 TC7 / HT29-MTX / THP-1) stimulée et non stimulée. En vert, marquage de ZO-1 et en bleu (DAPI) les noyaux. Photos prises à l'aide du microscope confocal (laser scanning) 880 Multiphoton (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany).

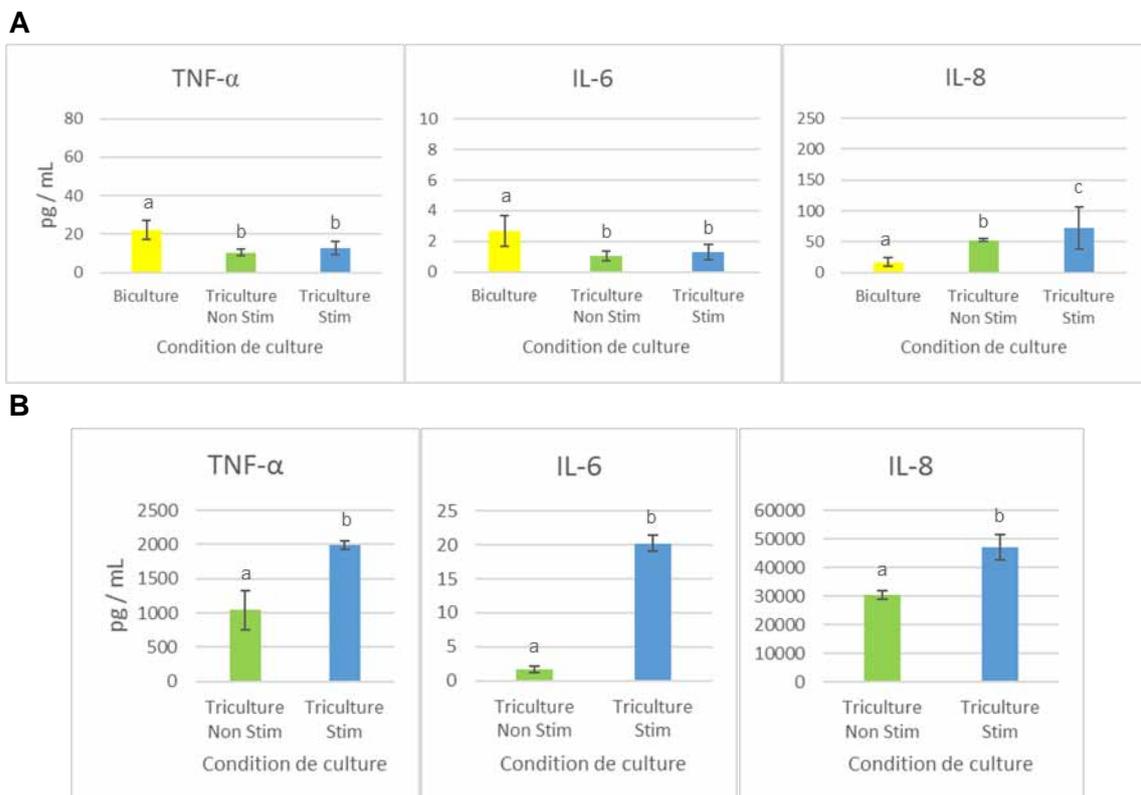
## RESULTATS

### 1.3.3. Marqueurs d'inflammation en condition de faible stimulation par le LPS et l'IFN $\gamma$

#### Production de cytokines pro-inflammatoires

La production et libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules après stimulation à faible dose ont été évaluées par la méthode ELISA dans les surnageants apicaux et/ou basaux récupérés après les expériences de stimulation.

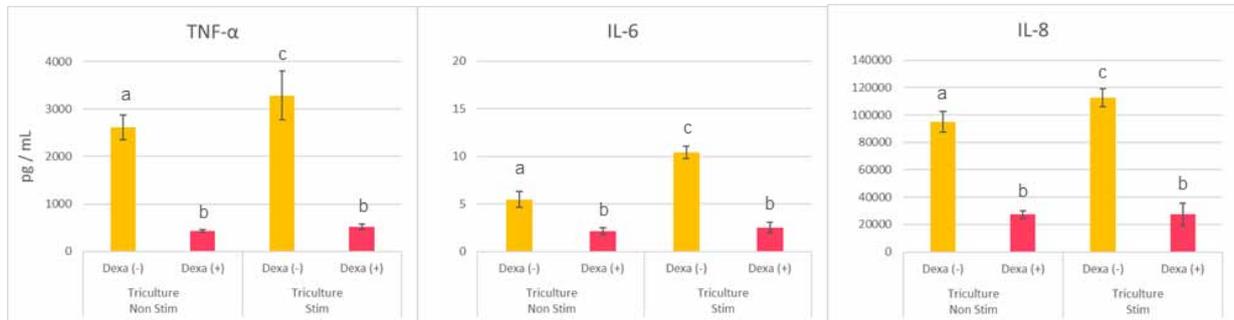
Au niveau des cellules intestinales, de façon similaire aux résultats préliminaires de la co-culture Caco-2 TC7 / THP-1, nous pouvons constater que la production de TNF- $\alpha$ , IL6, IL-8 est très faible dans le compartiment apical de la tri-culture (Fig. 18A). Il y a une augmentation significative de la production d'IL8 par les cellules intestinales du modèle tri-culture, indiquant que la présence des THP-1 différenciées en macrophages cause une légère inflammation. Pour les deux autres cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6), les légères différences observées ne sont pas interprétables du fait des quantités très faibles, proches de la limite de détection. Par contre, comme nous pouvons l'observer dans la figure 18B la production par les cellules THP-1 est très importante en réponse à la stimulation pour les trois cytokines pro-inflammatoires mesurées, avec une augmentation de 91,4% pour TNF- $\alpha$ , 1142,6% pour IL-6 et 55,4% pour IL-8.



**Figure 18.** Production de cytokines pro-inflammatoires dans le modèle de tri-culture stimulé à faible dose de LPS/IFN $\gamma$ . (A) Cellules intestinales dans compartiment apical (Caco-2 TC7 / HT29MTX). (B) Cellules immunitaires dans compartiment basal (THP-1). La biculture correspond au modèle contenant uniquement des cellules intestinales. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

## RESULTATS

En parallèle de ces expériences, nous avons testé l'effet de la dexaméthasone, puissant anti-inflammatoire, sur la production des cytokines pro-inflammatoires par les cellules THP-1 après faible stimulation dans le modèle de tri-culture (Fig. 19). Cela nous a servi de contrôle positif. Les résultats montrent une diminution nette de la production des trois cytokines dans le modèle stimulé ou non.



**Figure 19.** Effet de la dexaméthasone sur la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires (THP-1) dans le modèle non stimulé et stimulé à faible dose de LPS/IFN $\gamma$ . Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

### Expression génique de marqueurs d'inflammation

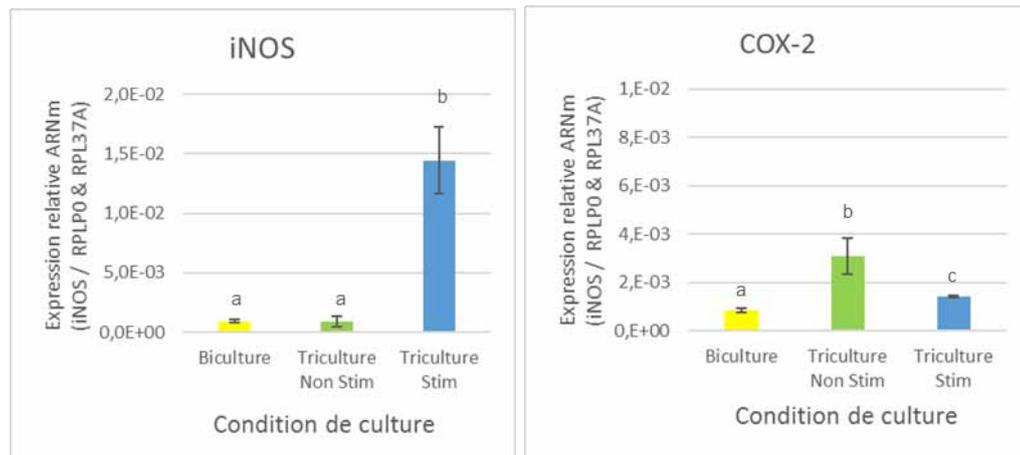
L'expression génique de deux enzymes considérées comme marqueurs d'inflammation (COX-2 et l'iNOS), trois cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-8) et une cytokine anti-inflammatoire (IL-10) a été mesurée sous les conditions de faible stimulation.

Au niveau des cellules intestinales, nous observons une forte expression du gène codant pour l'iNOS quand les cellules en tri-culture sont stimulées (Fig. 20A) par rapport à la biculture et la tri-culture non stimulée. En revanche, dans le cas du gène codant pour la COX-2 nous observons une expression dans la tri-culture non stimulée supérieure à celle dans la biculture et la tri-culture stimulée, ce qui rend difficile la compréhension des résultats.

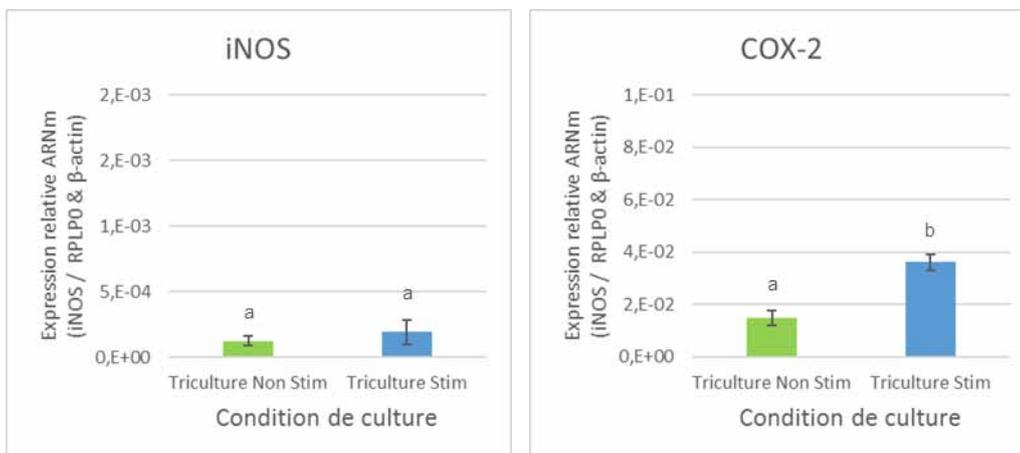
Au niveau des cellules immunitaires, il n'y a pas de différence significative dans l'expression du gène codant pour iNOS quelques soient les conditions. En revanche, l'expression du gène codant pour COX-2 chez les THP-1 est nettement plus importante en condition stimulée (Fig. 20B).

## RESULTATS

A



B



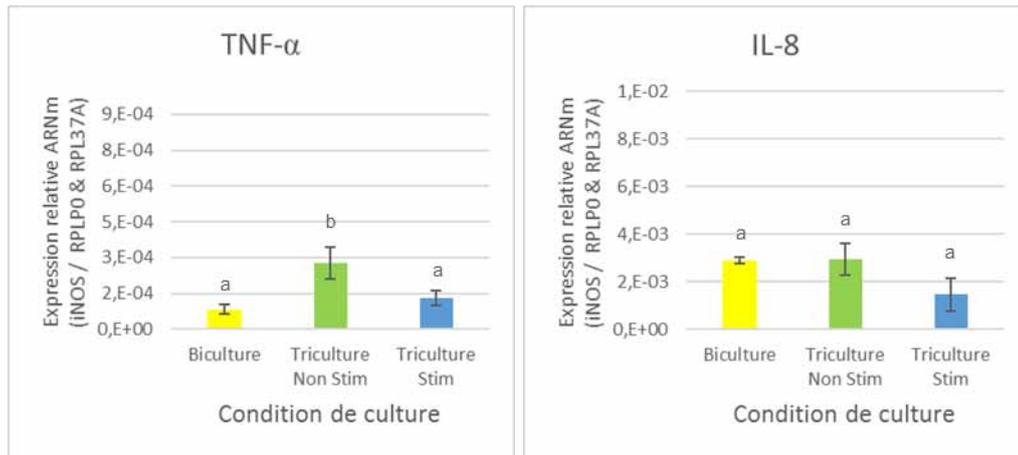
**Figure 20.** Expression des gènes codant pour l'iNOS et la COX-2 dans le modèle de tri-culture stimulé à faible dose de LPS/IFN $\gamma$ . (A) Cellules intestinales dans compartiment apical (Caco-2 TC7 / HT29MTX). (B) Cellules immunitaires dans compartiment basal (THP-1). La biculture correspond au modèle contenant uniquement des cellules intestinales. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

Concernant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires au niveau des cellules intestinales nous notons une expression légèrement supérieure du gène codant pour TNF- $\alpha$  dans la tri-culture non stimulée par rapport à la biculture (Fig. 21A) mais compte tenu des quantités détectées, cette différence reste insignifiante. En revanche, pour le gène codant pour IL-8 nous n'observons pas de différences significatives et aucune expression n'a été détectée pour les gènes codant pour les cytokines IL-6 et IL-10.

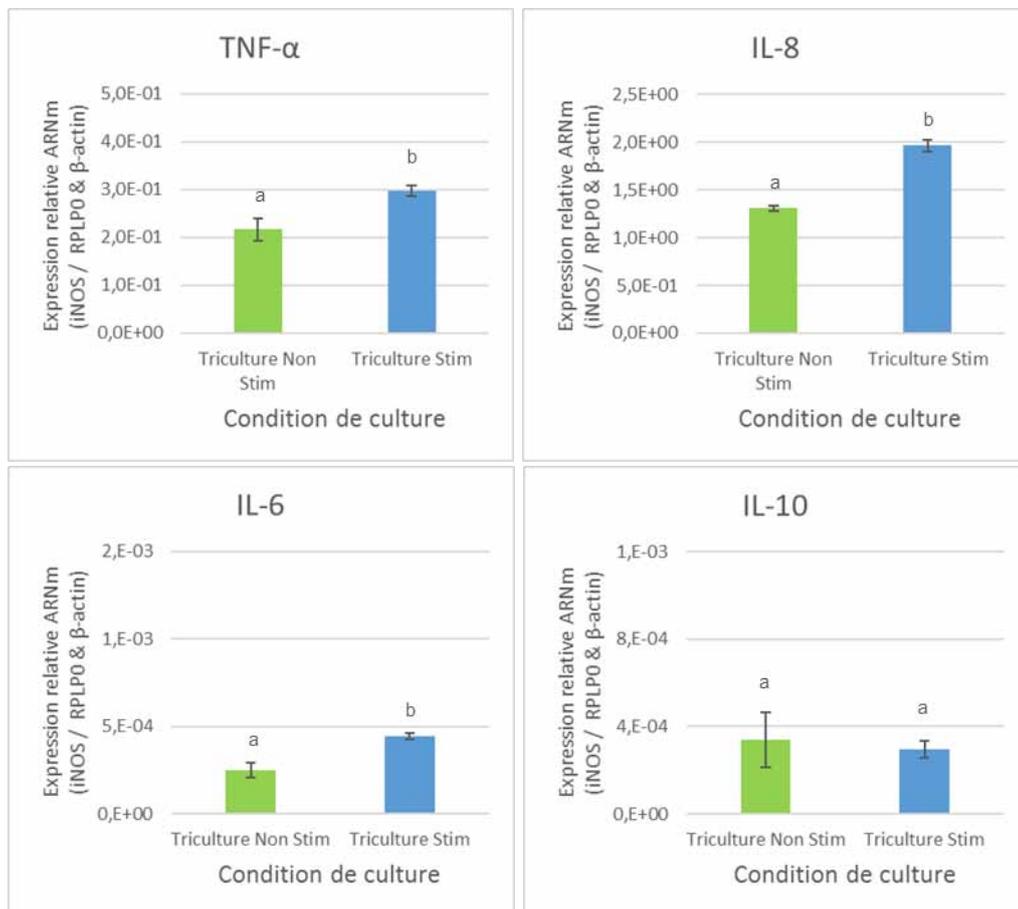
Au niveau des cellules immunitaires, comme attendu, nous notons une expression beaucoup plus importante pour l'ensemble des gènes des cytokines pro-inflammatoires étudiées par rapport à celle observée pour les cellules intestinales. Une augmentation significative de l'expression des gènes codant pour TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 entre la tri-culture stimulée et non stimulée (Fig. 21B) est observée alors qu'aucune différence significative d'expression n'est observée pour le gène codant pour IL-10.

## RESULTATS

A



B



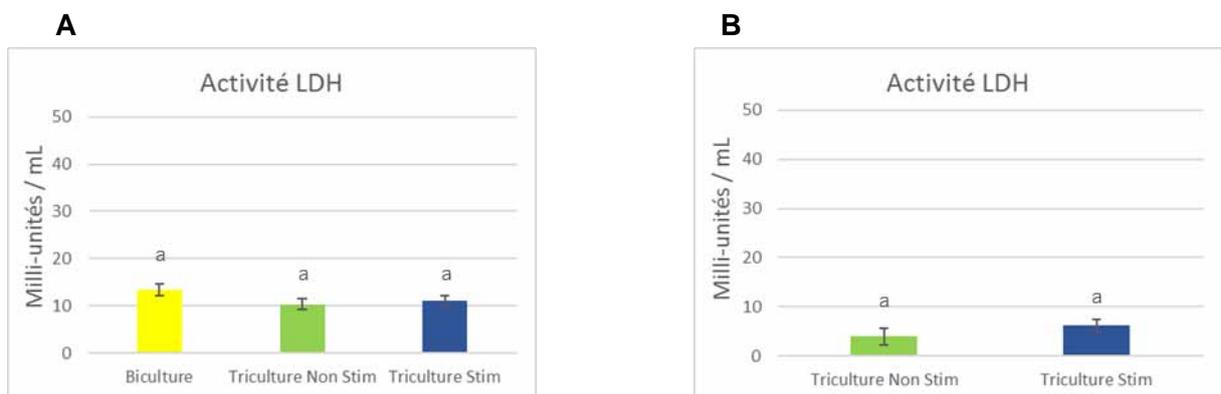
**Figure 21.** Expression des gènes codant pour les cytokines pro (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8) et anti-inflammatoires (IL-10) dans le modèle de tri-culture stimulé à faible dose de LPS/IFN $\gamma$ . (A) Cellules intestinales dans compartiment apical (Caco-2 TC7 / HT29MTX). (B) Cellules immunitaires dans compartiment basal (THP-1). La biculture correspond au modèle contenant uniquement des cellules intestinales. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

### 1.4. Effets de la stimulation par le LPS et l'IFN $\gamma$ à forte dose sur le modèle cellulaire d'inflammation intestinale

Après avoir testé l'utilisation de LPS et d'IFN $\gamma$  à faible dose une concentration plus importante de ces composés a été appliquée afin de s'approcher de conditions induisant une inflammation de plus haut niveau.

#### 1.4.1. Cytotoxicité et perméabilité épithéliale

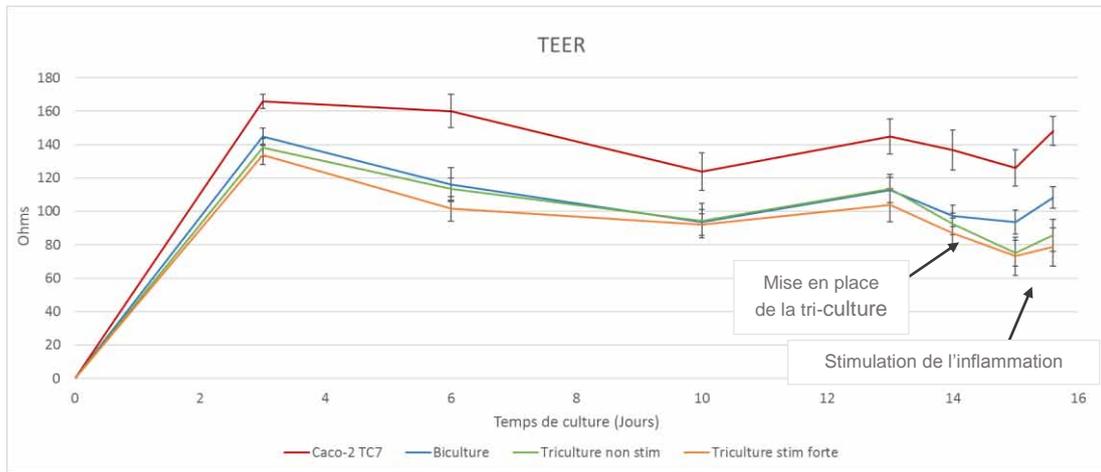
Aucune différence significative dans l'activité de la lactate déshydrogénase n'a été détectée dans les trois conditions de culture étudiées indiquant une absence de cytotoxicité par le cocktail LPS/IFN $\gamma$  à forte dose (Fig. 22).



**Figure 22.** Activité de la lactate déshydrogénase dans les surnageants (compartiment apical ou basal) du modèle de tri-culture après forte stimulation. (A) Compartiment apical (cellules intestinales Caco2-TC7/HT29-MTX). (B) Compartiment basal (cellules immunitaires THP1). La biculture correspond au modèle contenant uniquement des cellules intestinales. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

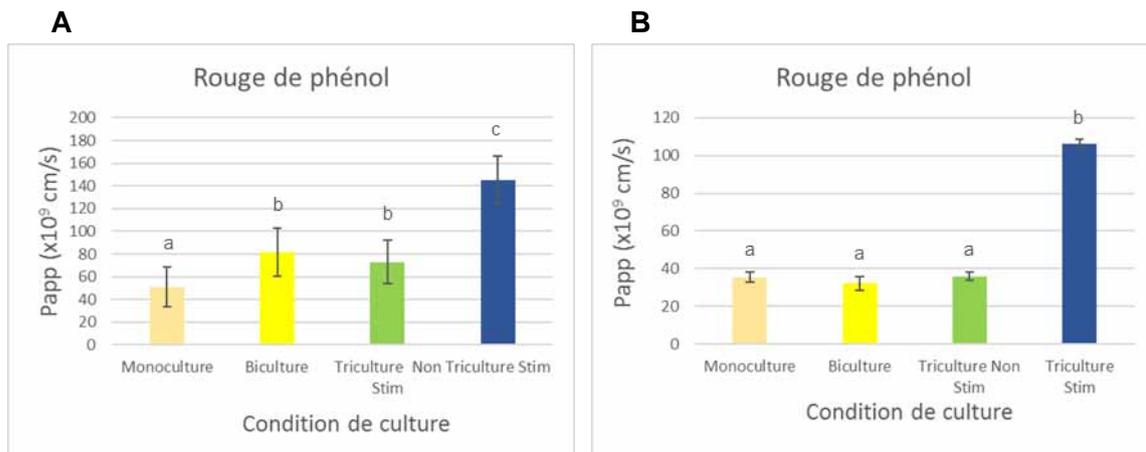
Concernant la mesure de la TEER, l'évolution de celle-ci est tout à fait comparable à celle observée dans les expériences précédentes réalisées à faible dose du cocktail LPS / IFN $\gamma$ , à savoir un accroissement, une stabilisation de la TEER suivie d'une diminution après addition des cellules THP-1 (Fig. 23). A noter qu'il n'y a pas de différence de profil entre les tri-cultures stimulées et non stimulées et que l'effet de la baisse de TEER lors de l'ajout de THP-1 est indépendante de l'ajout ou non de LPS / IFN $\gamma$ . Ceci indique que l'effet sur la perméabilité de la monocouche mesurée par la TEER n'est pas affecté par une augmentation de la dose des stimulants pro-inflammatoires.

## RESULTATS



**Figure 23.** Suivi de la résistance électrique transépithéliale (TEER) tout au long de la différenciation et pendant les expériences de stimulation à forte dose.

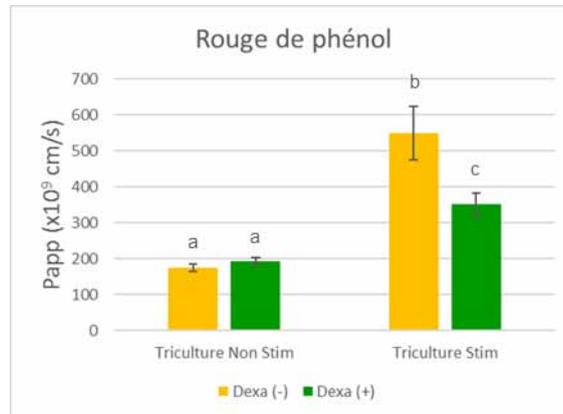
Contrairement à ce qu'il avait été observé lors des expériences de diffusion du rouge de phénol dans le modèle de tri-culture stimulé à faible dose, l'analyse après 1 heure et 4 heures de diffusion montre une très forte augmentation de la perméabilité épithéliale lorsque la tri-culture est stimulée par le LPS / IFN $\gamma$  à forte dose (Fig. 24).



**Figure 24.** Transport paracellulaire du rouge de phénol, exprimé en perméabilité apparente dans les différents types d'associations cellulaires à 2 temps de diffusion et à forte dose de stimulation. (A) 1h, (B) 4h de diffusion. Monoculture : Caco-2 TC7, biculture : Caco-2 TC7 / HT29MTX, tri-culture : Caco-2 TC7 / HT29MTX / THP-1. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

## RESULTATS

Par ailleurs, différemment de ce qu'il a été observé avec la faible dose, l'augmentation de perméabilité dans la tri-culture stimulée est réduite de manière importante par l'ajout de la dexaméthasone (Fig. 25).



**Figure 25.** Transport paracellulaire du rouge de phénol, exprimé en perméabilité apparente dans la tri-culture (Caco-2 TC7 / HT29MTX / THP-1) à forte dose de stimulation et en présence de dexaméthasone. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

### 1.4.2. Marqueurs d'inflammation en condition de forte stimulation par le LPS et l'IFN $\gamma$

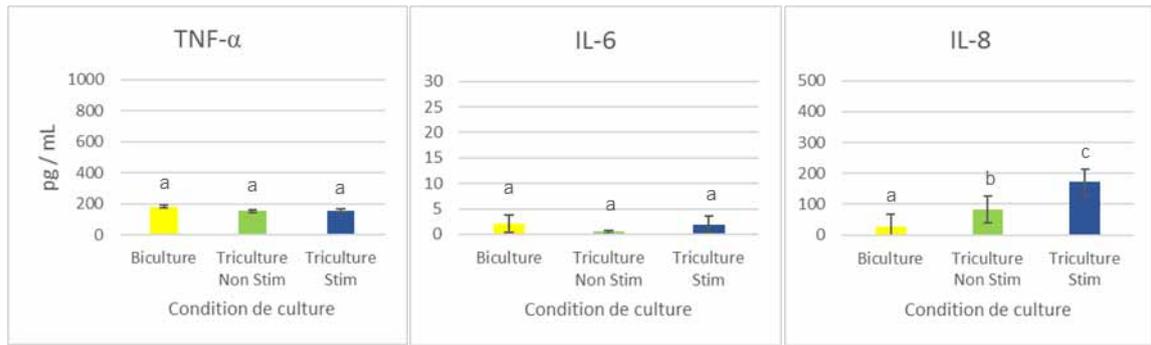
#### Production de cytokines pro-inflammatoires

La production et libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules après stimulation à forte dose ont été mesurées dans les surnageants apicaux et/ou basaux récupérés après les expériences de stimulation et dosées par la méthode ELISA.

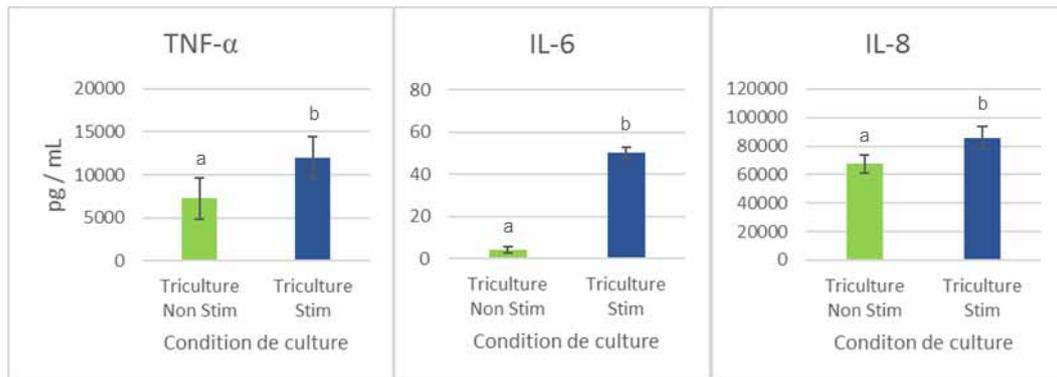
Au niveau des cellules intestinales (Fig. 26A) nous observons une faible production de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 sans différence significative entre les différentes conditions. En revanche nous observons une augmentation significative pour IL-8 dans le modèle stimulé. Concernant les cellulaires immunitaires (Fig. 26B), nous observons pour la tri-culture stimulée une nette augmentation de la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et IL-8 par rapport à la tri-culture non stimulée avec une augmentation de 65,7% pour TNF- $\alpha$ , 1113,7 pour IL-6 et 26,7% pour IL-8. Ces résultats montrent comme attendu, le même phénomène observé dans les expériences avec stimulation à faible dose.

## RESULTATS

**A**

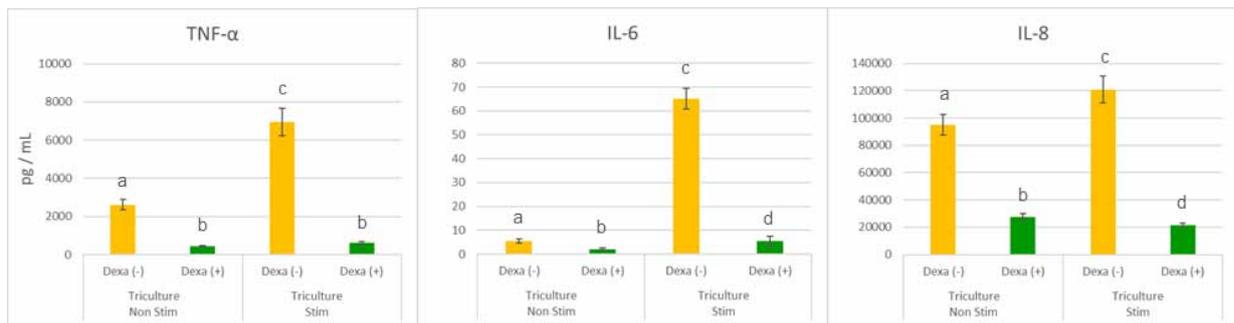


**B**



**Figure 26.** Production de cytokines pro-inflammatoires dans le modèle de tri-culture stimulé à forte dose de LPS/IFN $\gamma$ . (A) Cellules intestinales dans compartiment apical (Caco-2 TC7 / HT29MTX). (B) Cellules immunitaires dans compartiment basal (THP-1). La biculture correspond au modèle contenant uniquement des cellules intestinales. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

Concernant la production de ces cytokines pro-inflammatoires après forte stimulation en présence de dexaméthasone, de façon similaire qu'avec la faible stimulation, nous observons une diminution nette dans leur production par les cellules immunitaires (Fig. 27).

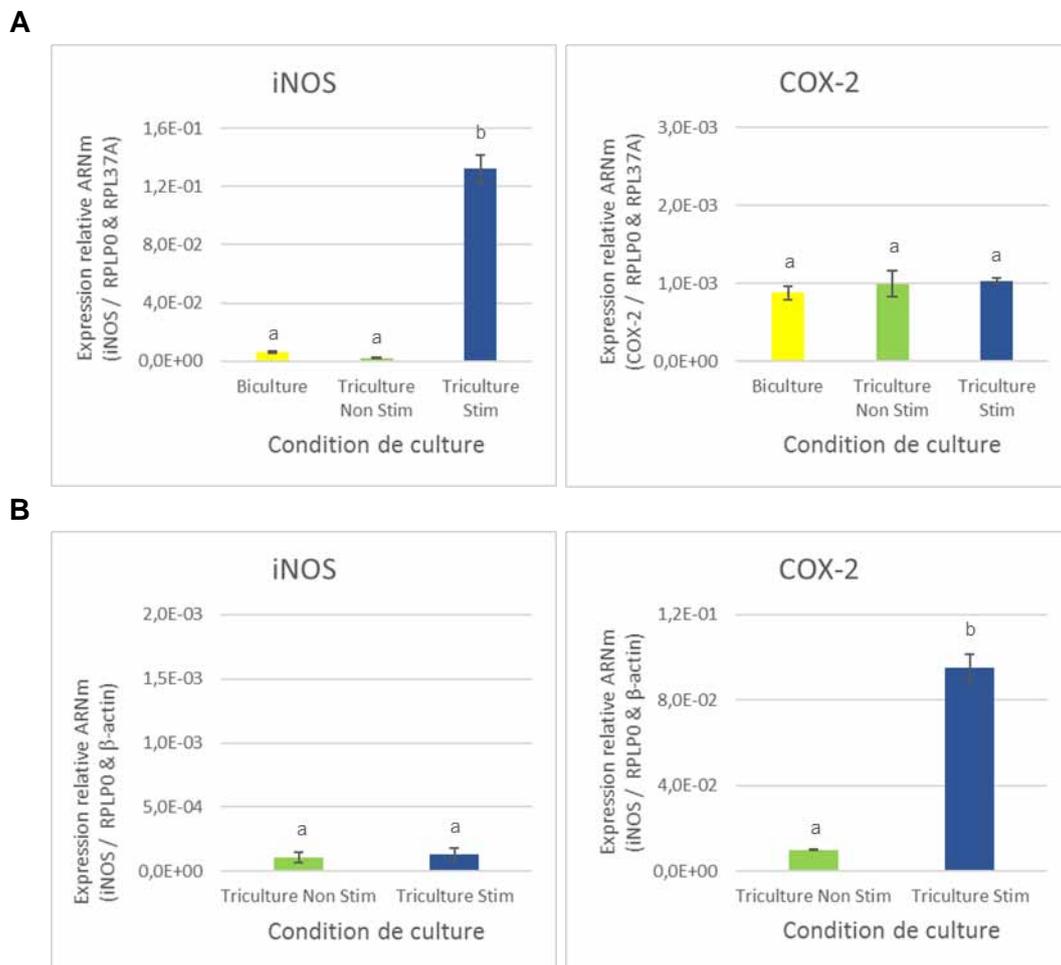


**Figure 27.** Effet de la dexaméthasone sur la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires (THP-1) dans le modèle non stimulé et stimulé à forte dose de LPS/IFN $\gamma$ . Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

**Expression génique de marqueurs d'inflammation**

L'expression génique de deux enzymes considérées comme marqueurs d'inflammation (COX-2 et l'iNOS), trois cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-8) et une cytokine anti-inflammatoire (IL-10) a été mesuré sous les conditions de forte stimulation.

Au niveau de l'expression dans les cellules intestinales des gènes codant pour l'iNOS et pour la COX-2 (Fig. 28A), nous notons que le gène codant pour iNOS est plus fortement exprimé dans la tri-culture stimulée par rapport à la tri-culture non stimulée et la biculture. Par contre aucune différence significative n'est observé sur l'expression du gène codant pour COX-2 entre les différentes conditions. Les phénomènes inverses sont observés pour l'expression de ces gènes dans les cellules THP1 (Fig. 28B), c'est-à-dire pas de différence d'expression du gène codant pour iNOS en absence ou présence de stimulation et une forte expression du gène codant pour COX-2 en présence de stimulus.



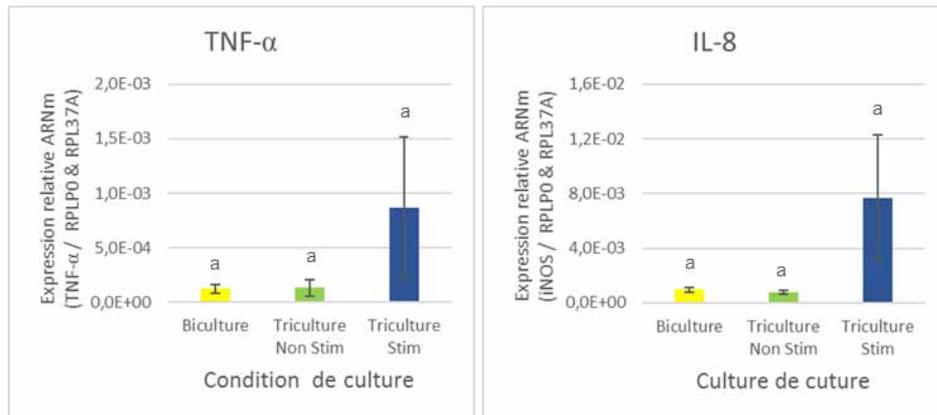
**Figure 28.** Expression des gènes codant pour l'iNOS et la COX-2 dans le modèle de tri-culture stimulé à forte dose de LPS/IFN $\gamma$ . (A) Cellules intestinales dans compartiment apical (Caco-2 TC7 / HT29MTX). (B) Cellules immunitaires dans compartiment basal (THP-1). La biculture correspond au modèle contenant uniquement des cellules intestinales. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

## RESULTATS

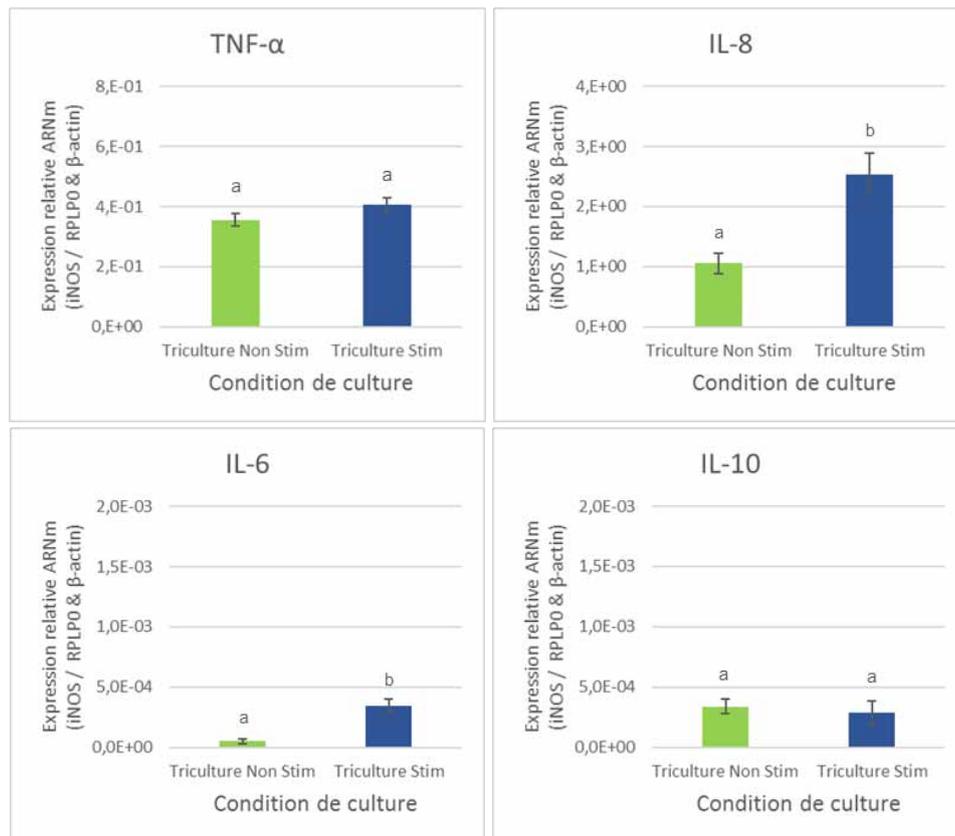
Concernant les gènes codant pour les cytokines au niveau des cellules intestinales, aucune différence significative dans l'expression des gènes codants pour TNF- $\alpha$  ou IL-8 n'est observée quelles que soient les conditions de culture (Fig. 29A). Aucun ARNm n'a été détecté pour les gènes codant pour IL-6 et 10.

Dans les cellules immunitaires, aucune différence d'expression n'a été détectée entre la tri-culture stimulée ou non pour les gènes codant pour TNF- $\alpha$  et IL-10 alors que l'expression des gènes codant pour IL-6 et IL-8 est supérieure en condition de stimulation (Fig.29B).

**A**



**B**



**Figure 29.** Expression des gènes codant pour les cytokines pro (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8) et anti-inflammatoires (IL-10) dans le modèle de tri-culture stimulé à forte dose de LPS/IFN $\gamma$ . (A) Cellules intestinales dans compartiment apical (Caco-2 TC7 / HT29MTX). (B) Cellules immunitaires dans compartiment basal (THP-1). La biculture correspond au modèle contenant uniquement des cellules intestinales. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

## 2. Interaction de la $\beta$ -cryptoxanthine (BCX) avec le modèle *in vitro* d'inflammation intestinale

Dans ce travail, nous avons voulu étudier l'impact éventuel de la BCX sur l'inflammation intestinale ainsi que son absorption à travers la monocouche intestinale à l'état enflammé. La BCX étant un micro-constituant liposoluble, il est nécessaire de l'intégrer au préalable dans des micelles pour rendre possible son absorption au niveau intestinal. Deux types de véhicules ont alors été utilisés : des micelles artificielles, préparées à base de tween-40 et des micelles physiologiques.

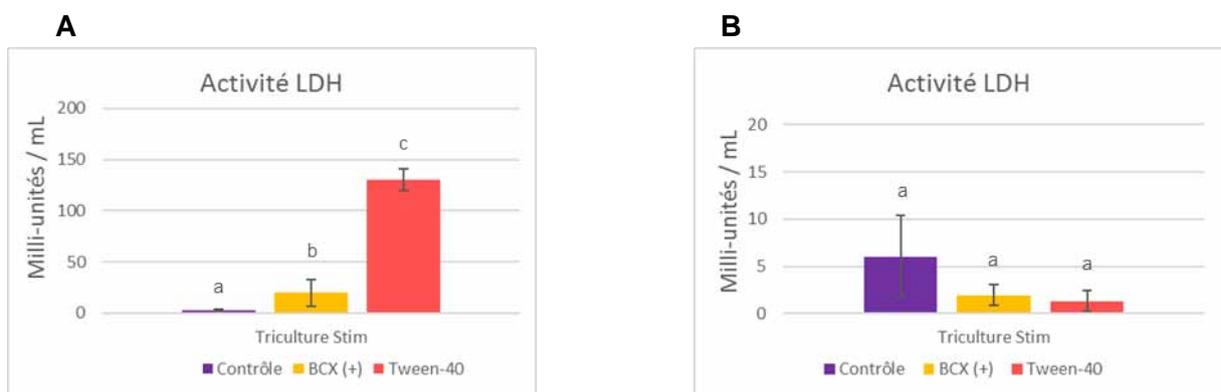
Cette série d'expériences a été réalisée en condition de stimulation à faible dose en considérant que la BCX présente en faible quantité dans les aliments et utilisée à dose nutritionnelle et non thérapeutique pourrait éventuellement avoir une action à titre préventif dans le cas d'une inflammation dite « non-sévère ». Il n'en demeure pas moins que ces expériences pourraient aussi être réalisées ultérieurement dans le cas d'une stimulation à forte dose pour évaluer l'impact de la BCX en condition inflammatoire plus sévère.

### 2.1. Utilisation de micelles artificielles contenant la BCX

Dans cette première série d'expériences, la BCX intégrée dans les micelles artificielles a été mise au contact des cellules 2 heures avant l'ajout du cocktail LPS / IFN $\gamma$  et laissée le temps de la stimulation (soit 20h d'exposition au total). Dans tous les résultats présentés, le modèle de tri-culture stimulé a servi de contrôle.

#### 2.1.1. Cytotoxicité

Des expériences ont été mises en place pour évaluer l'effet cytotoxique de la BCX dans les micelles artificielles sur le modèle. Au niveau des cellules intestinales (Fig. 30A), nous observons une légère cytotoxicité des micelles contenant la BCX par rapport au contrôle. Par contre, une très forte cytotoxicité est observée avec le Tween 40 seul, laissant présager un éventuel effet protecteur de la BCX. En revanche, aucun effet cytotoxique significatif n'a été observé sur les cellules immunitaires (Fig. 30B).



**Figure 30.** Activité de la lactate déshydrogénase dans les surnageants (compartiment apical ou basal) du modèle de tri-culture stimulé en présence des micelles contenant la BCX ou des micelles Tween-40. (A) Compartiment apical (cellules intestinales Caco2-TC7/HT29-MTX). (B) Compartiment basal (cellules immunitaires THP1). La tri-culture stimulé sans micelles a été utilisée en tant que contrôle. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

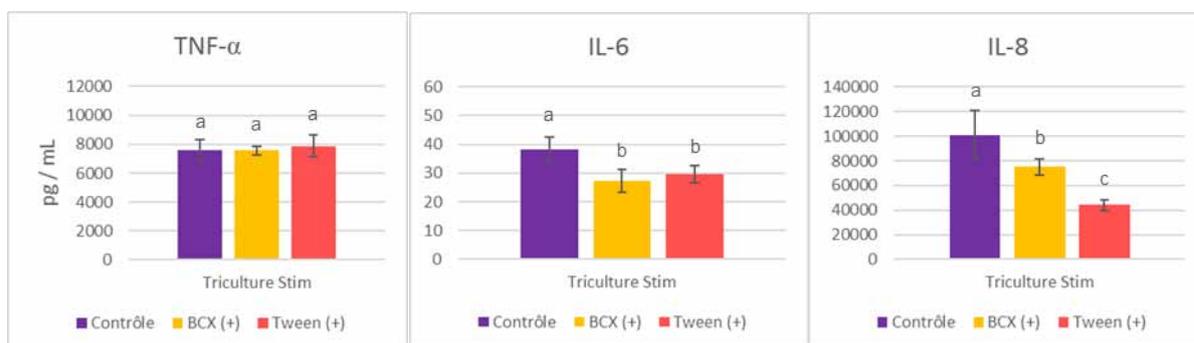
## RESULTATS

### 2.1.2. Influence des micelles artificielles de BCX sur la production de cytokines pro-inflammatoires

#### Production de cytokines pro-inflammatoires

La production et libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules exposées (temps total 20 heures) à la BCX dans les micelles artificielles, ont été mesurées dans les surnageants du compartiment basal récupérés après les expériences à faible stimulation et dosées par la méthode ELISA.

Aucun effet des micelles avec ou sans BCX n'a été observé sur la production de TNF- $\alpha$  alors qu'une diminution significative est observée pour l'IL-6 et l'IL-8 en présence de ces micelles (Fig. 31). Il est surprenant de noter que cette réduction est aussi observée en présence de Tween-40 seul.



**Figure 31.** Production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires (THP-1) dans le modèle de tri-culture stimulé en présence (20h) des micelles contenant la BCX ou des micelles Tween-40. La tri-culture stimulée sans micelles a été utilisée en tant que contrôle. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

### 2.1.3. Transport de la BCX à travers la monocouche cellulaire

Pour évaluer le transport des micelles artificielles contenant la BCX, les surnageants apicaux et basaux ainsi que les cellules intestinales ont été récupérées et la BCX déterminée par dosage HPLC. Dans le tableau 6 nous ne constatons aucune différence dans l'absorption de la BCX dans les modèles de tri-culture stimulé ou non par rapport à la biculture.

Absorption de la $\beta$ -cryptoxanthine	
	% BCX
Modèle de bi-culture	10,77 % $\pm$ 2
Modèle de tri-culture non stimulé	11,30 % $\pm$ 1.08
Modèle de tri-culture stimulé	10,78 % $\pm$ 1.31

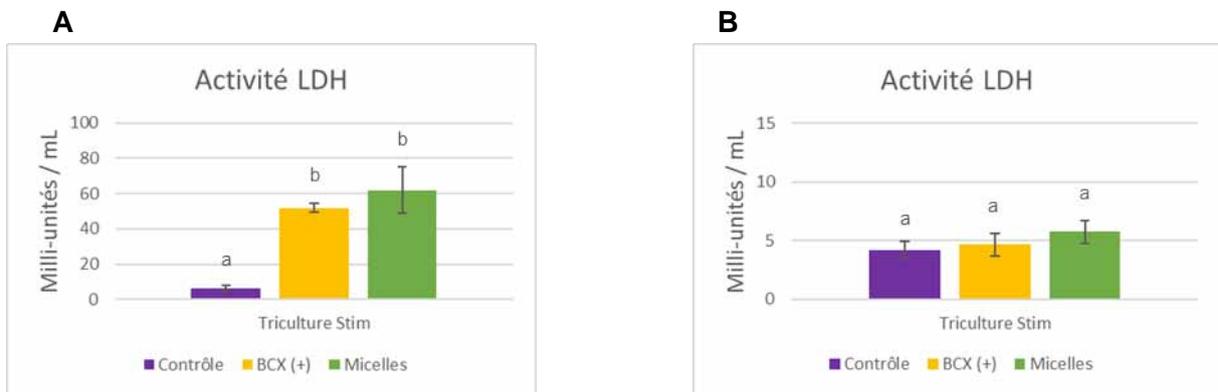
**Tableau 6.** Absorption des micelles artificielles contenant la BCX à travers la monocouche épithéliale dans les différents modèles. Biculture (Caco-2 TC7 / HT29-MTX) et tri-culture (Caco-2 TC7 / HT29-MTX / THP-1) stimulé ou non avec le cocktail de LPS/IFN $\gamma$ .

## 2.2. Utilisation des micelles physiologiques contenant la BCX

Suite aux effets potentiellement toxiques du tween 40 sur les cellules intestinales, nous avons choisi d'utiliser des micelles physiologiques. Dans ces expériences, les mêmes conditions que précédemment ont été utilisées, à savoir une faible dose de stimulation et un temps d'exposition de 20h.

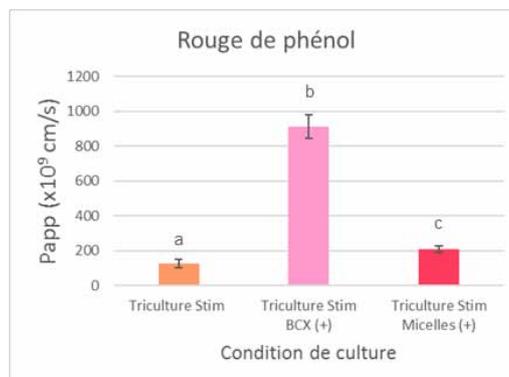
### 2.2.1. Cytotoxicité et perméabilité épithéliale

De manière similaire à ce qu'il a été observé avec les micelles artificielles, nous observons une toxicité des micelles physiologiques contenant la BCX sur les cellules intestinales (Fig. 32A). Concernant les cellules immunitaires, aucune toxicité n'est observée que ce soit par les micelles seules ou en présence de BCX (Fig. 32B).



**Figure 32.** Activité de la lactate déshydrogénase dans les surnageants (compartiment apical ou basal) du modèle de tri-culture stimulé en présence (20h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques. (A) Compartiment apical (cellules intestinales Caco2-TC7/HT29-MTX). (B) Compartiment basal (cellules immunitaires THP1). La tri-culture stimulée sans micelles a été utilisée en tant que contrôle. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

Pour évaluer la perméabilité de la monocouche épithéliale le test de diffusion du rouge de phénol a été réalisé. Les résultats (Fig. 33), montrent que la présence de BCX entraîne une augmentation très importante de la perméabilité, tandis que les micelles seules augmentent aussi la perméabilité mais d'une manière moins importante, ce qui est plutôt surprenant.



**Figure 33.** Transport paracellulaire du rouge de phénol, exprimé en perméabilité apparente dans la tri-culture stimulée (Caco-2 TC7 / HT29MTX / THP-1) en présence (20h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques. La tri-culture stimulée sans micelles a été utilisée en tant que contrôle. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

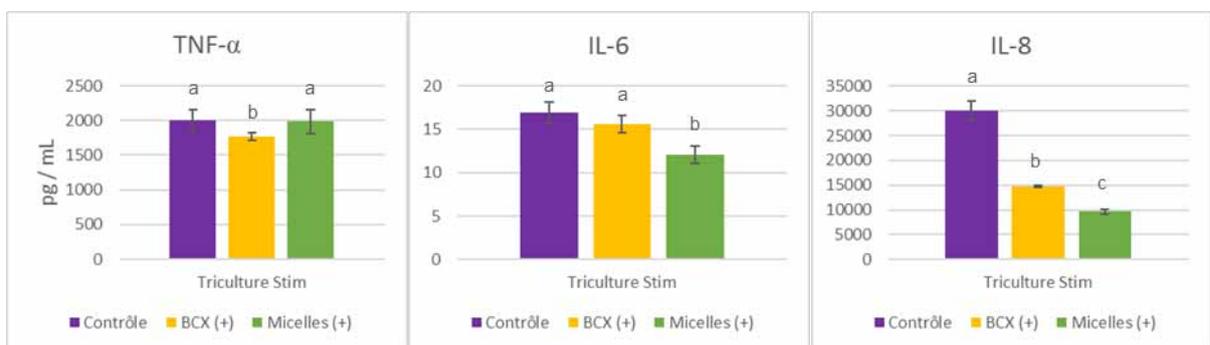
## RESULTATS

### 2.2.2. Influence des micelles physiologiques de BCX sur la production de cytokines pro-inflammatoires

#### Production de cytokines pro-inflammatoires

La production et libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules exposées (temps total 20 heures) à la BCX dans les micelles physiologiques ont été mesurées dans les surnageants du compartiment basal récupérés après les expériences à faible stimulation et dosées par la méthode ELISA.

Les résultats montrent une faible diminution de la production de TNF- $\alpha$  en présence des micelles contenant la BCX (Fig.34). Par contre, dans le cas de l'IL-6 on observe une diminution en présence du véhicule, mais pas des micelles BCX. Pour la production de l'IL-8, nous observons une diminution importante en présence des micelles avec la BCX mais également en présence des micelles physiologiques seules, laissant supposer le rôle du véhicule dans l'effet observé.



**Figure 34.** Production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires (THP-1) dans le modèle de tri-culture stimulé en présence (20h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques. La tri-culture stimulée sans micelles a été utilisée en tant que contrôle. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

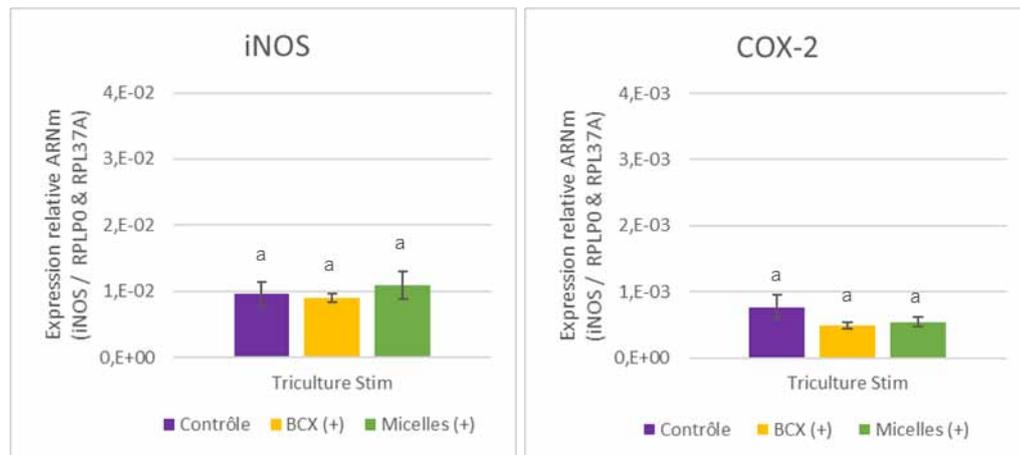
#### Expression génique de marqueurs d'inflammation

L'expression génique de deux enzymes (COX-2 et l'iNOS), trois cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-8) et une cytokine anti-inflammatoire (IL-10) a été mesurée dans les surnageants des compartiments apicaux et basaux après exposition (temps total 20 heures) aux micelles physiologiques contenant la BCX.

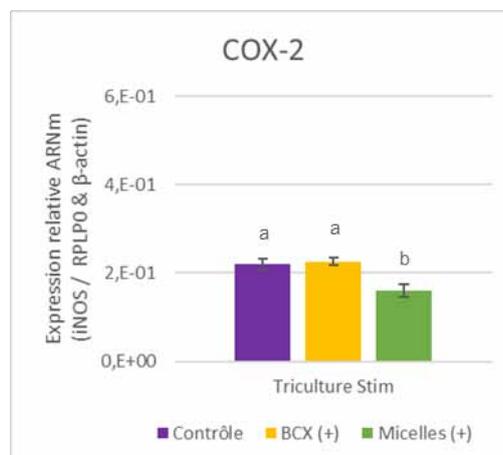
Au niveau de l'expression dans les cellules intestinales des gènes codant pour iNOS et COX-2 aucune différence significative n'est observée (Fig 35A). Concernant les cellules immunitaires une légère diminution est observée pour l'expression du gène codant pour la COX-2 seulement en présence du véhicule (Fig. 35B). Aucune expression n'a été détectée dans les THP-1 pour le gène codant pour l'iNOS.

## RESULTATS

A



B



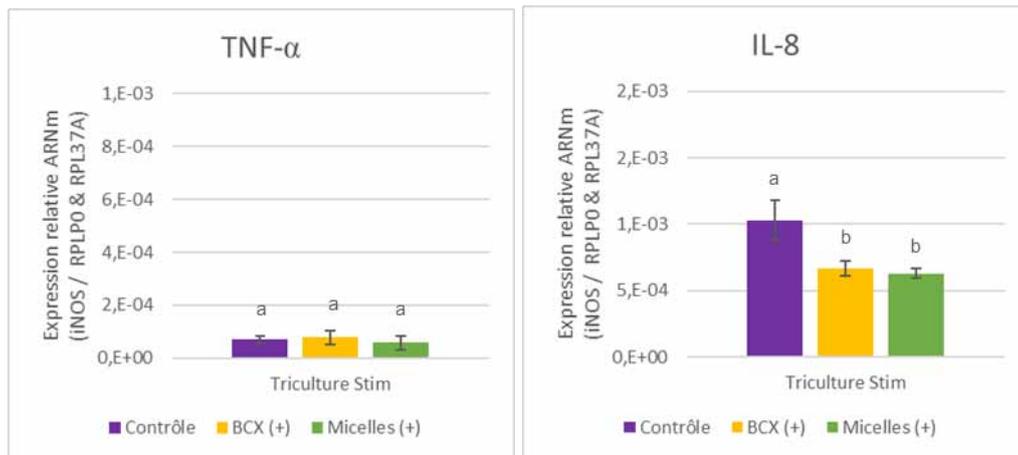
**Figure 35.** Expression des gènes codant pour l'iNOS et la COX-2 dans le modèle de tri-culture stimulé en présence (20h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques. (A) Cellules intestinales dans compartiment apical (Caco-2 TC7 / HT29MTX). (B) Cellules immunitaires dans compartiment basal (THP-1). La tri-culture stimulée sans micelles a été utilisée en tant que contrôle. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

Concernant les gènes codant pour les cytokines au niveau des cellules intestinales, aucune différence significative dans l'expression des gènes codants pour TNF- $\alpha$  n'est observée (Fig. 36A). Par contre une légère diminution est observée pour le gène codant pour l'IL-8 en présence des micelles indifféremment de la présence ou non de la BCX. L'expression de gènes codant pour l'IL-6 ou l'IL-10 n'a pas été détectée.

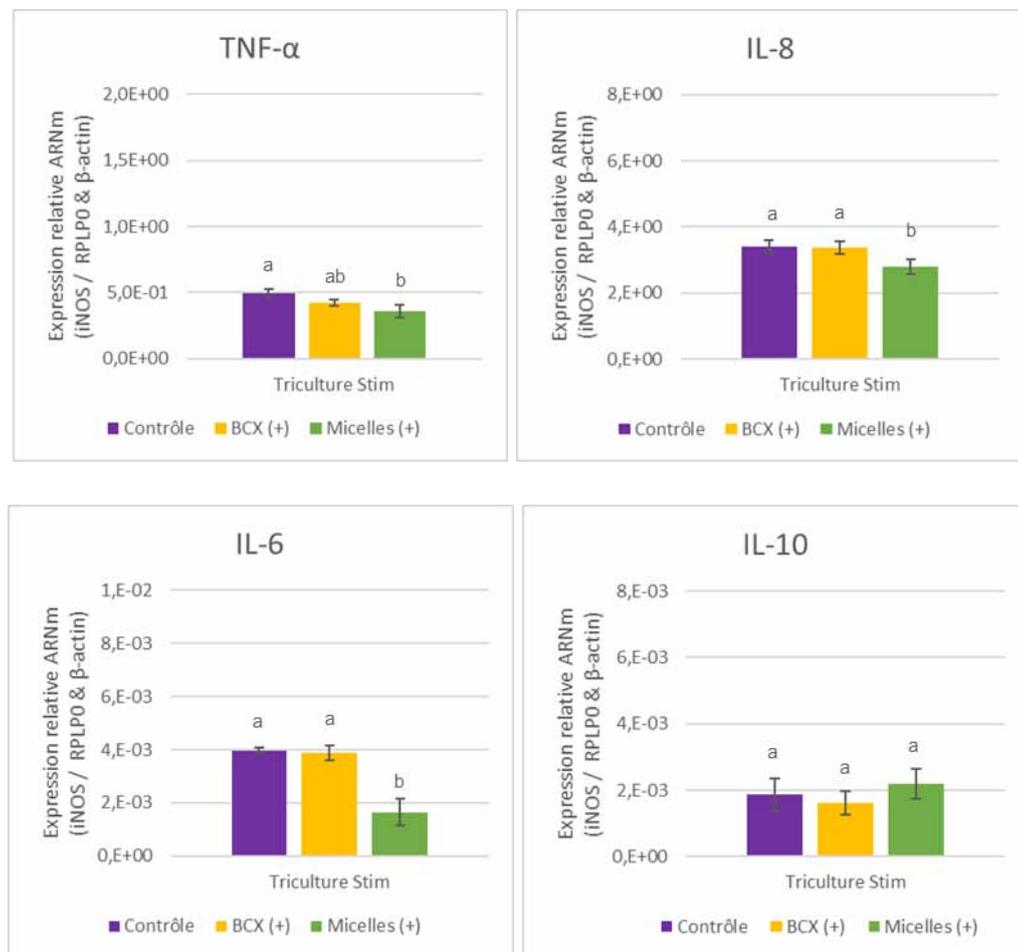
Dans le cas des cellules immunitaires, une légère diminution d'expression a été observée pour les gènes codant pour le TNF- $\alpha$  ou l'IL-8 sous exposition aux micelles seules, cette différence étant plus marquée dans le cas de l'IL-6. Pour l'IL-10 aucune différence n'a été détectée (Fig. 36B).

## RESULTATS

A



B



**Figure 36.** Expression des gènes codant pour cytokines pro (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8) et anti-inflammatoires (IL-10) dans le modèle de tri-culture stimulé en présence (20h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques. (A) Cellules intestinales dans compartiment apical (Caco-2 TC7 / HT29MTX). (B) Cellules immunitaires dans compartiment basal (THP-1). La tri-culture stimulée sans micelles a été utilisée en tant que contrôle. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

### 2.2.3. Transport de la BCX à travers la monocouche cellulaire

Pour évaluer le transport des micelles physiologiques contenant la BCX, les surnageants apicaux et basaux ainsi que les cellules intestinales ont été récupérés et la quantité de BCX déterminée par dosage HPLC. Dans le tableau 7 nous observons une différence dans l'absorption de la BCX dans la biculture par rapport aux modèles de tri-culture stimulé ou non avec une augmentation dans ces derniers.

Absorption de la $\beta$ -cryptoxanthine	
	% BCX
Modèle de bi-culture	12,82 % $\pm$ 0.26
Modèle de tri-culture non stimulé	14,69 % $\pm$ 0.48
Modèle de tri-culture stimulé	14,74 % $\pm$ 0.24

**Tableau 7.** Absorption des micelles physiologiques contenant la BCX à travers la monocouche épithéliale dans les différents modèles. Biculture (Caco-2 TC7 / HT29-MTX) et tri-culture (Caco-2 TC7 / HT29-MTX / THP-1) stimulé ou non avec le cocktail de LPS/IFN $\gamma$ .

Ces premières expériences réalisées dans les conditions d'une exposition prolongée aux micelles de BCX ont montré quelques résultats surprenants quant à l'effet des véhicules (tween 40 ou micelles physiologiques). Effet toxique d'un côté, mais aussi effet aléatoire sur la production des marqueurs d'inflammation.

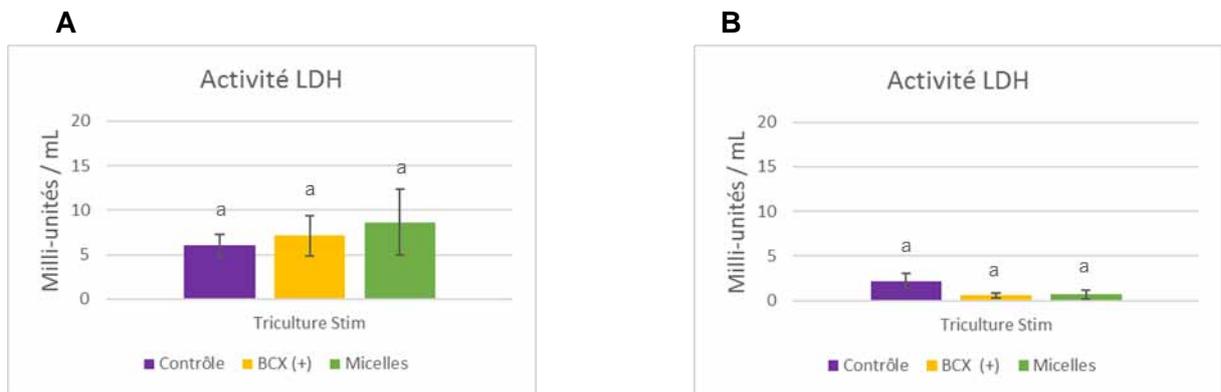
Pour ces raisons nous avons réalisé une deuxième série d'expériences dans des conditions dites "préventives" en exposant les cellules aux micelles physiologiques de BCX uniquement pendant 2h précédant la stimulation, soit 2h d'exposition totale à la BCX et toujours dans des conditions de faible stimulation pro-inflammatoire.

## RESULTATS

### 2.3. Utilisation des micelles physiologiques contenant la BCX en prévention

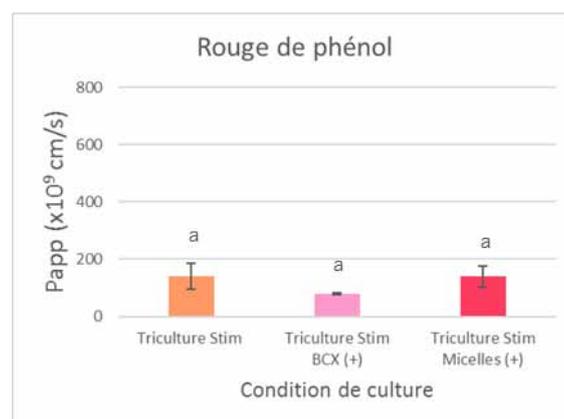
#### 2.3.1. Cytotoxicité et perméabilité épithéliale

Contrairement aux résultats obtenus pendant une longue exposition (20 heures) aux micelles physiologiques avec et sans BCX, une exposition de 2 heures n'entraîne pas de toxicité dans les cellules intestinales (Fig. 37A) ni dans les cellules immunitaires (Fig. 37B).



**Figure 37.** Activité de la lactate déshydrogénase dans les surnageants (compartiment apical ou basal) du modèle de tri-culture stimulé en présence (2h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques. (A) Compartiment apical (cellules intestinales Caco2-TC7/HT29-MTX). (B) Compartiment basal (cellules immunitaires THP1). La tri-culture stimulée sans micelles a été utilisée en tant que contrôle. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

Concernant le test de diffusion de rouge de phénol pour évaluer la perméabilité de la monocouche épithéliale, les résultats ne montrent aucune différence quelque soient les conditions (Fig. 38), laissant supposer qu'une courte exposition aux micelles de BCX ne modifie pas la perméabilité.



**Figure 38.** Transport paracellulaire du rouge de phénol, exprimé en perméabilité apparente dans la tri-culture stimulée (Caco-2 TC7 / HT29MTX / THP-1) en présence (2h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques. La tri-culture stimulée sans micelles a été utilisée en tant que contrôle. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

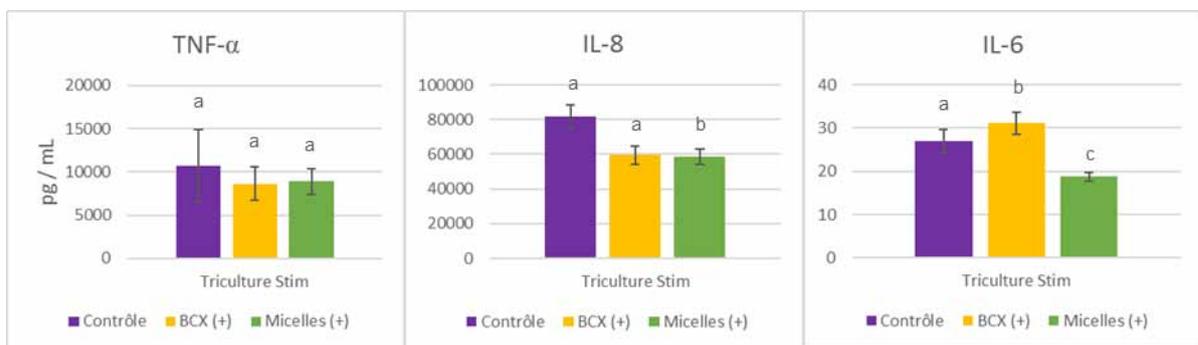
## RESULTATS

### 2.3.2. Influence des micelles physiologiques de BCX sur la production de cytokines pro-inflammatoires

#### Production de cytokines pro-inflammatoires

La production et libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules exposées (temps total 2 heures) à la BCX et les micelles physiologiques ont été mesurées dans les surnageants du compartiment basal récupérés après les expériences à faible stimulation et dosées par la méthode ELISA.

Pour la production de TNF- $\alpha$  aucune différence significative n'est observée entre les différentes conditions (Fig. 39). Concernant l'IL-6, les résultats montrent une diminution importante quand le modèle est exposé aux micelles seules mais pas en présence de la BCX. Par contre, dans le cas de l'IL-8 la diminution est observée indifféremment de la présence ou non de la BCX.



**Figure 39.** Production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires (THP-1) dans le modèle de tri-culture stimulé en présence (2h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques. La tri-culture stimulée sans micelles a été utilisée en tant que contrôle. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

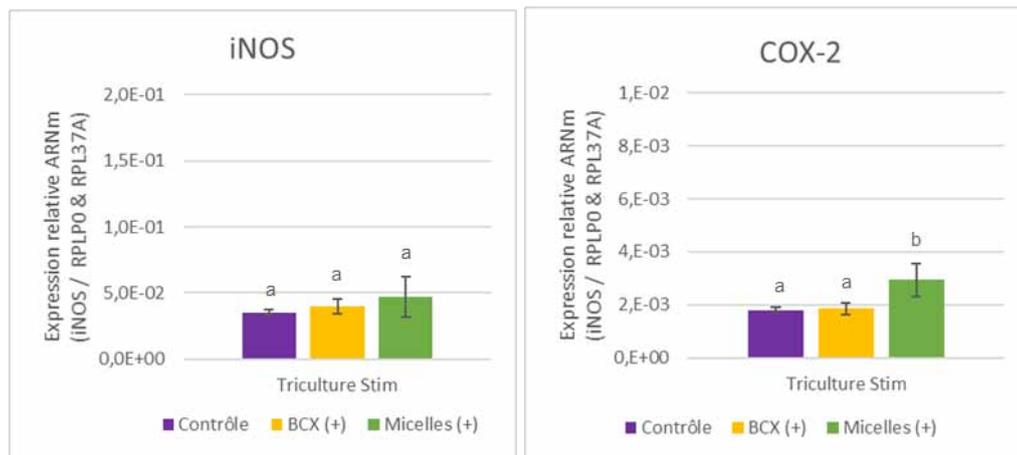
#### Expression génique de marqueurs d'inflammation

L'expression génique de deux enzymes (COX-2 et l'iNOS), trois cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-8) et une cytokine anti-inflammatoire (IL-10) a été mesurée dans les surnageants des compartiments apicaux et basaux après exposition aux micelles physiologiques contenant la BCX pendant 2h.

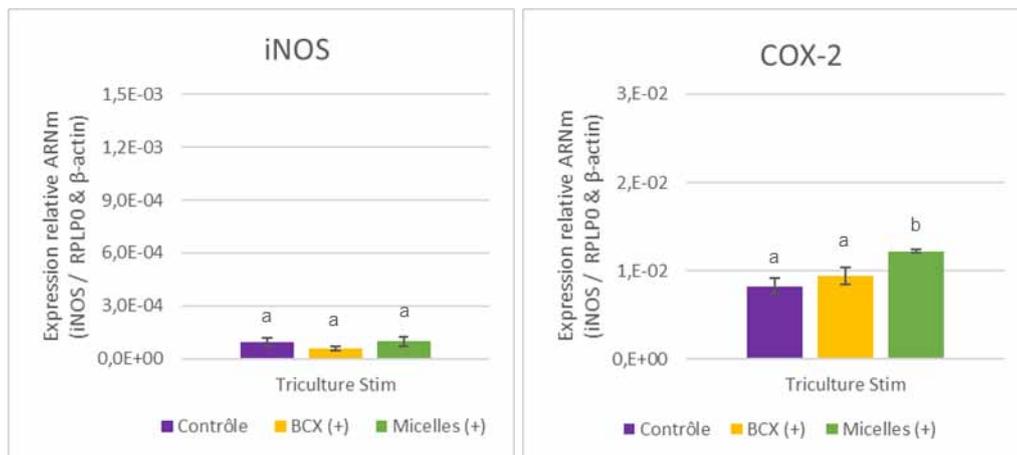
Concernant l'expression dans les cellules intestinales du gène codant pour l'iNOS aucune différence n'a été observée (Fig. 40A). Par contre, dans le cas du gène codant pour la COX-2 nous observons une légère augmentation en présence des micelles seules. Au niveau des cellules immunitaires nous n'observons pas de différence dans l'expression du gène codant pour l'iNOS quel que soit la condition (Fig. 40B). Au contraire, dans le cas du gène codant pour la COX-2, les résultats montrent une augmentation de l'expression en présence du véhicule.

## RESULTATS

A



B



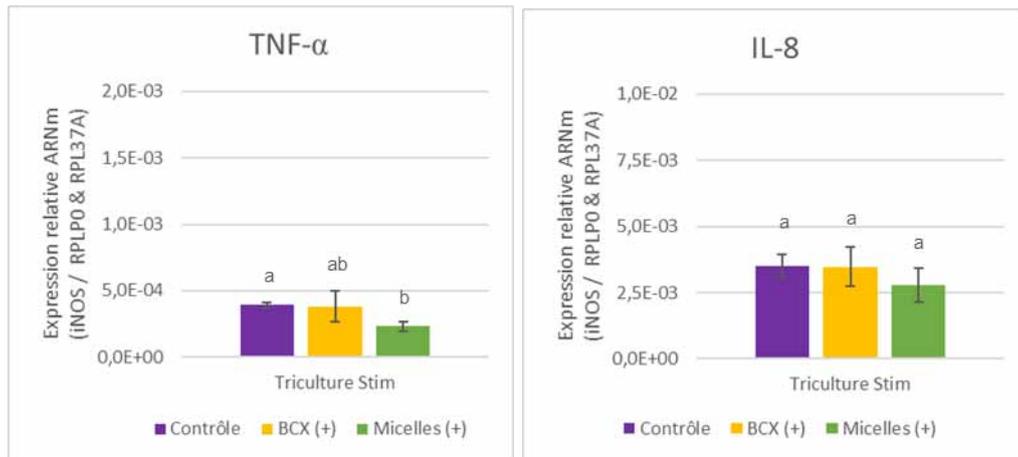
**Figure 40.** Expression des gènes codant pour l'iNOS et la COX-2 dans le modèle de tri-culture stimulé en présence (2h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques. (A) Cellules intestinales dans compartiment apical (Caco-2 TC7 / HT29MTX). (B) Cellules immunitaires dans compartiment basal (THP-1). La tri-culture stimulée sans micelles a été utilisée en tant que contrôle. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

Au niveau des gènes codant pour les cytokines dans les cellules intestinales, une diminution est observée dans l'expression du gène codant pour le TNF- $\alpha$  en présence des micelles seules mais compte tenu des très faibles quantités, on peut considérer que celle-ci reste peu significative (Fig.41A). Dans le cas de l'IL-8, aucune différence significative n'a été observée. Aucune expression des gènes codant pour l'IL-6 et l'IL-10 n'a été détectée.

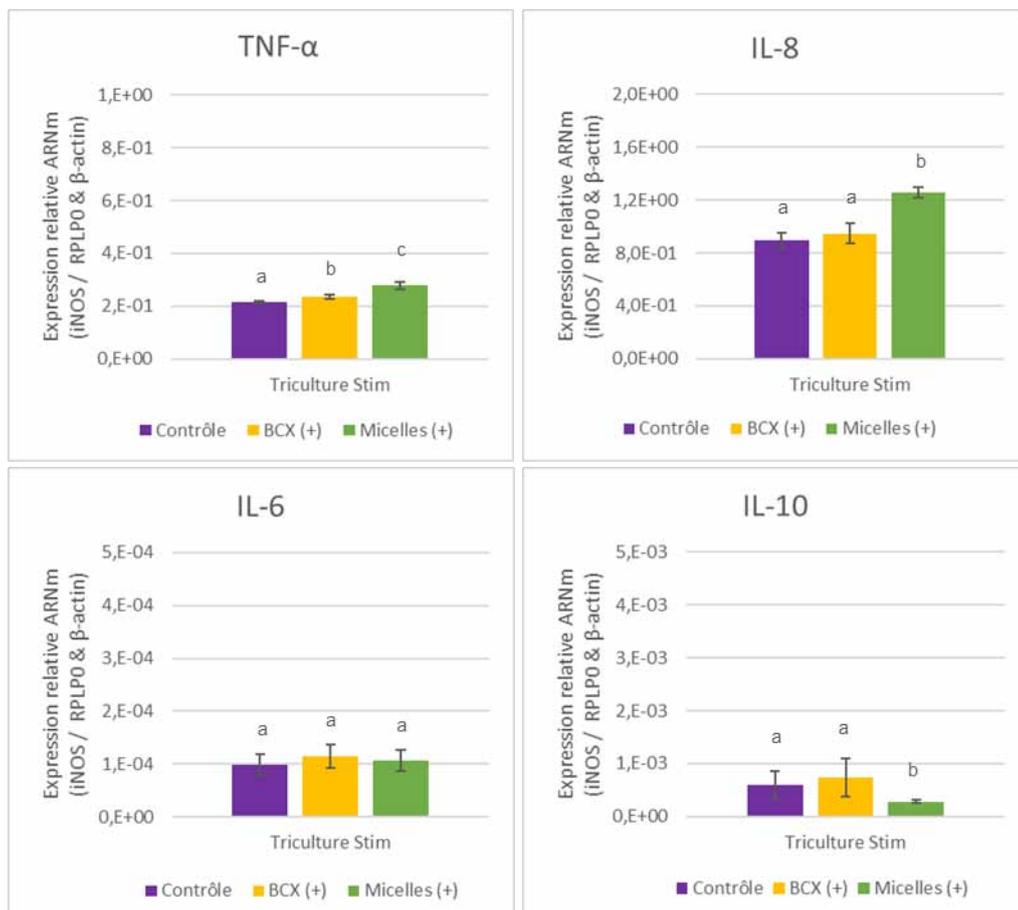
Concernant les cellules immunitaires, nous observons une légère augmentation de la production de TNF- $\alpha$  en présence de la BCX, laquelle est plus importante en présence des micelles seules (Fig. 41B). Dans le cas du gène codant pour l'IL-8 cette augmentation de l'expression est observée uniquement en présence des micelles seules. Par contre aucune différence n'a été observée dans le cas de l'IL-6. Regardant l'expression du gène codant pour l'IL-10 une légère diminution est observée en présence du véhicule mais celle-ci reste faible voire insignifiante compte tenu des quantités obtenues.

## RESULTATS

A



B



**Figure 41.** Expression des gènes codant pour cytokines pro (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8) et anti-inflammatoires (IL-10) dans le modèle de tri-culture stimulé en présence (2h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques. (A) Cellules intestinales dans compartiment apical (Caco-2 TC7 / HT29MTX). (B) Cellules immunitaires dans compartiment basal (THP-1). La tri-culture stimulée sans micelles a été utilisée en tant que contrôle. Les barres avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes.

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'épithélium intestinal, siège de l'absorption des (micro)-nutriments est aussi le premier système de défense de l'organisme avec un rôle essentiel dans la régulation de l'échange de molécules et de fluides présents dans la lumière intestinale. Un déséquilibre dans l'homéostasie peut être à l'origine d'une réaction inflammatoire associée à des défauts de la barrière intestinale et de la fonction immunitaire, ainsi qu'une malabsorption des nutriments (Benjamin et al. 2008; Forbes et al. 2017; Massironi et al. 2013; Mijač et al. 2010).

Pour étudier la physio(patho)logie de l'intestin, l'utilisation de modèles *in vitro* de culture cellulaire a considérablement augmenté, en particulier dans les études de biodisponibilité et de toxicologie dans les domaines alimentaire et pharmaceutique. Les modèles de co-culture cellulaire, utilisant des cellules d'origine humaine présentent l'avantage de pouvoir étudier les mécanismes moléculaires d'une manière simple et reproductible tout en réduisant l'expérimentation animale. De ce fait, et de manière à offrir une alternative aux modèles animaux pour de futures études sur l'effet de micro-constituants alimentaires sur l'inflammation cette thèse a eu comme objectif la mise au point d'un modèle de tri-culture cellulaire d'un intestin en état d'inflammation. Deux lignées cellulaires d'origine intestinale capables de se différencier en entérocytes et cellules caliciformes (Caco-2 TC7 et HT29-MTX, respectivement) ont été associées avec une lignée d'origine immunitaire (THP-1) laquelle se différencie en macrophages.

La lignée Caco-2 reste de nos jours, le modèle le plus utilisé dans les études de la barrière intestinale, néanmoins une de ces limitations majeures est le manque de production de mucus. Cette couche de gel insoluble dans l'eau composé principalement de glycoprotéines, présente dans l'épithélium intestinal, joue un rôle très important en tant que barrière physique et régulatrice pour des micro-organismes (microbiote ou pathogènes) évitant leur contact direct avec les cellules du système immunitaire de la lamina propria (Abraham et Cho 2009; Bischoff et al. 2014; Grootjans et al. 2013; McGuckin et al. 2009; Hering et Schulzke 2009). La lignée cellulaire HT29-MTX est capable de se différencier en cellules caliciformes, productrices de mucus (Thécla Lesuffleur et al. 1990), alors l'association de ces deux lignées cellulaires permet de rapprocher le modèle à la réalité physiologique de l'intestin (Hilgendorf et al. 2000).

La présence de mucus sur la biculture Caco-2 / HT29-MTX a pu être mise en évidence par différentes techniques. Tout d'abord, une coloration mixte bleu Alcian / Fast Red a permis de visualiser la répartition des cellules et le mucus produit par les HT29-MTX. Le bleu Alcian colore les composés acides du mucus, alors que le Fast Red met en évidence la présence de la phosphatase alcaline, enzyme exprimée par les Caco-2 uniquement. Par ailleurs, des coupes histologiques de la monocouche intestinale ont pu également montrer la présence des HT29-MTX au milieu des entérocytes, reconnaissables par leur poche à mucus, ainsi que la présence d'amas de mucus sur la membrane apicale des cellules. En concordance avec d'autres modèles de co-culture Caco-2 / HT29-MTX, notre modèle montre que les cellules HT29-MTX poussent en plusieurs couches formant des grappes intégrées entre les Caco-2 qui forment une seule monocouche (Hilgendorf et al. 2000; Béduneau et al. 2014). Enfin, le marquage fluorescent avec un anticorps spécifique pour MUC5AC, une des mucines produites par les HT29-MTX (Navabi, McGuckin, et Lindén 2013) a permis aussi de mettre en évidence la couche de mucus sur le tapis cellulaire.

Après une première période de mise au point, nous avons pu définir les conditions expérimentales du modèle de tri-culture enflammé et notamment les paramètres de stimulation de l'inflammation. Nous avons retenu un cocktail pro-inflammatoire à base de LPS / IFN $\gamma$ , à une première dose de 50ng/mL de LPS et 5ng/mL de IFN $\gamma$ , dite dose faible et pour un temps de stimulation de 18h, qui semble être le meilleur compromis entre une production optimisée de cytokines et la logistique des expériences de co-culture. La dose a été choisie en cohérence avec la littérature et dans un objectif de simuler initialement un faible état inflammatoire, de manière à

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

envisager un impact nutritionnel préventif des composés bioactifs et non thérapeutique, contrairement à beaucoup d'autres études utilisant des doses assez élevées (Hollebeeck et al. 2012; Kaulmann, Legay, et al. 2016). Pour autant, au vu des résultats, nous avons par la suite testé également une dose plus élevée (LPS-1  $\mu\text{g/mL}$  et IFN $\gamma$ -50  $\text{ng/mL}$ ), dite dose forte, pour obtenir une meilleure réponse inflammatoire. Ces deux doses n'ont par ailleurs présenté aucune toxicité sur les cellules, comme le montrent les résultats sur la libération de LDH.

Selon la littérature plusieurs paramètres seraient concernés lorsque l'intestin entre en état d'inflammation, notamment la production de cytokines, une augmentation de la perméabilité épithéliale et de la production de mucus. Afin d'évaluer l'inflammation dans le modèle après exposition au cocktail stimulant (LPS / IFN $\gamma$ ), l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) et leur production dans la tri-culture ont été mesurées. Globalement, comme attendu, l'expression génique et la production des cytokines par les cellules immunitaires (THP-1) ont été augmentées dans le modèle de tri-culture sous l'effet de la stimulation, aux deux doses utilisées. Néanmoins dans le cas des cellules intestinales, contrairement à d'autres études utilisant des Caco-2 uniquement et différents stimulants (Barrera et Sánchez 2015; Calatayud et al. 2014; Węglarz et al. 2006; Hollebeeck et al. 2012; Van De Walle et al. 2010; Ustunol et Wong 2010), l'expression génique ou la production dans notre modèle étaient très limitées voire inexistantes concernant TNF- $\alpha$  et IL6, consolidant ainsi l'intérêt d'y associer des cellules immunitaires. Cela pourrait s'expliquer par l'hypo-réactivité au LPS de la part des Caco-2 rapportée dans la littérature (M. Suzuki, Hisamatsu, et Podolsky 2003; Vamadevan et al. 2010). Seule la production d'IL8 a montré une augmentation significative dans le modèle de tri-culture stimulé et ce quelle que soit la dose, mais non corrélée toutefois à une augmentation de l'expression du gène codant pour cette cytokine. De façon surprenante aucune détection de l'expression du gène codant pour l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire qui fait partie de la cascade des marqueurs produits lors du déclenchement de l'inflammation, n'a été observée. Il existe des rapports concernant une augmentation de la production de cette cytokine lors de l'inflammation intestinale (Haller et al. 2002; D. Haller et al. 2004; Alexandr Parlesak et al. 2007) mais plus tardivement que les trois cytokines pro-inflammatoires que nous avons mesurées, avec un pic de production au-delà de 24h. Ceci pourrait donc expliquer nos observations (Malefyt et al. 1991) qui toutefois sont en cohérence avec celles de Moyes et al. (2010) ayant utilisé une co-culture Caco-2/THP-1 (Moyes, Morris, et Carr 2010).

Nous avons également évalué l'expression génique pour deux enzymes marqueurs d'inflammation, iNOS et COX-2. Nos résultats montrent une augmentation nette de l'expression du gène codant pour iNOS par les cellules intestinales pour les deux doses utilisées, ce qui semble cohérent avec d'autres études sur l'inflammation intestinale et le rôle de l'oxyde nitrique (NO) (Cavicchi et Whittle 1999; Kolios, Valatas, et Ward 2004; Somchit et al. 2014). L'iNOS est une enzyme inductible participant à la production de NO lequel est important dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse gastro-intestinale (Lundberg et Weitzberg 2013). Toutefois, en condition inflammatoire l'induction de l'iNOS entraîne une forte production de NO, pouvant être associée à des lésions coliques (Palatka et al. 2005). Il aurait été intéressant de pouvoir évaluer la production de NO dans notre modèle, mais malgré plusieurs essais, cela a été très difficile, compte-tenu d'une production réduite par les THP-1 (Daigneault et al. 2010) et de son instabilité et de sa courte durée de vie (Schroeder et Kuo 1995). Par ailleurs, aucune modification de l'expression du gène codant pour iNOS par les THP-1 n'a pu être observée dans notre modèle même s'il existe des rapports concernant l'expression du gène codant pour cette isoforme de l'enzyme après stimulation des THP-1 par du LPS et/ou de l'IFN $\gamma$  (Reiling et al. 1994; Juliet et al. 2004; Q. Wang et al. 2008; Saad et al. 2011). Concernant la COX-2, il s'agit d'une oxydoréductase responsable de la formation de prostanoïdes (prostaglandines et thromboxanes)

avec une surexpression lors des réactions inflammatoires ce qui permet de l'utiliser en tant que marqueur d'inflammation. Dans notre modèle, l'expression génique de cette isoforme de l'enzyme a été fortement augmentée dans les THP1 sous l'effet de la stimulation, en particulier avec la dose la plus forte, en cohérence avec d'autres études (X. Zhang, Cao, et Zhong 2009) mais aucune différence n'a été observée dans le cas des cellules intestinales.

Il est important de souligner par ailleurs que nous avons utilisé la dexaméthasone, puissant anti-inflammatoire thérapeutique, comme contrôle positif de notre modèle et nous avons pu montrer qu'en présence de dexaméthasone, la production des trois cytokines pro-inflammatoires était très fortement diminuée dans le modèle stimulé ou non aux deux doses utilisées. Ceci nous permet de mettre en évidence que notre modèle répond bien aux stimulus d'inflammation en produisant des cytokines et des enzymes impliquées dans la réponse inflammatoire ainsi qu'aux molécules anti-inflammatoires et peut-être envisagé pour tester l'action éventuelle de composés bioactifs.

Lors de l'inflammation, des changements dans la perméabilité de la barrière intestinale ont également été rapportés (Bischoff et al. 2014), cette dernière étant une fonction très complexe régulée principalement par les jonctions serrées (TJs). Deux paramètres sont alors fréquemment utilisés pour évaluer cette perméabilité ; la TEER, qui mesure le transfert ionique et la perméabilité apparente (Papp), qui indique le flux unidirectionnel (apical vers basal) d'eau et de composés non électrolytiques ainsi que la taille des pores formés par les TJs (Spring 1998). L'évaluation de la TEER dans notre modèle a été faite tout le long des cultures et à l'issue de la stimulation inflammatoire. Nous observons de façon cohérente une augmentation de la TEER dans les premiers jours de culture jusqu'à un plateau indiquant l'établissement de l'uniformité et de l'intégrité de la monocouche cellulaire intestinale. L'association des Caco-2 avec les cellules HT29-MTX induit tel qu'attendu une TEER inférieure à celle observée dans la monoculture de Caco-2. Cette observation est cohérente avec celle d'autres auteurs (Araújo et Sarmiento 2013; Béduneau et al. 2014). Cela serait dû à des différences de réarrangement du complexe de jonctions serrées (AJC) entre les deux types des cellules entraînant un accroissement plus important des espaces intercellulaires dans les cellules caliciformes les rendant plus perméables (Hilgendorf et al. 2000; Pontier et al. 2001; Béduneau et al. 2014). De plus, l'ajout des THP 1 au modèle a pour conséquence une légère diminution de la TEER, montrant que la seule présence des THP1 modifie l'intégrité de la monocouche *via* probablement des communications intercellulaires par des facteurs solubles tels que les cytokines (Satsu et al. 2006; Moyes, Morris, et Carr 2010).

Quant à l'effet de la stimulation nous n'avons pas observé de différences de TEER par rapport au modèle non stimulé et ce quelle que soit la dose utilisée. Ceci est en cohérence avec Van del Walle et al. (2010) qui ont étudié l'effet de plusieurs stimulants d'inflammation appliqués seuls ou en combinaison (LPS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) sur la TEER en utilisant des cellules Caco-2 qui ont montré un effet de diminution uniquement après traitement avec de l'IL-1 $\beta$  à une concentration de 25 ng/mL. (Van De Walle et al. 2010).

Nous avons en parallèle mesuré la perméabilité apparente du rouge de phénol. Nous aurions pu nous attendre à une augmentation de la perméabilité entre la mono et la biculture compte-tenu des observations faites lors de la mesure de la TEER, mais cela n'a pas été le cas, contrairement à ce qui a été observé dans d'autres études (Hilgendorf et al. 2000). Nous aurions donc deux mesures physiques (diffusion et résistance) qui rendraient compte de deux phénomènes différents. D'après les observations de Ranaldi et al (2003) ces deux paramètres (TEER et Papp) ne seraient pas toujours corrélés et ils devraient être utilisés de façon complémentaire (Ranaldi et al. 2003).

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Par contre, dans le modèle de tri-culture, nous avons observé une augmentation du passage du rouge de phénol plus importante sous l'effet des deux doses de stimulation. En effet, comme plusieurs études l'ont montré, la présence de cytokines pro-inflammatoires entraîne une augmentation de cette perméabilité due à l'altération des jonctions serrées (F. Wang et al. 2005; Utech et al. 2005; Al-Sadi et al. 2011; Watson et al. 2005). Pour confirmer ce phénomène nous avons réalisé l'immunomarquage fluorescent de trois protéines (claudine, occludine et ZO-1) lesquelles font partie du complexe AJC. Nous avons observé une différence entre les trois conditions expérimentales, à savoir le modèle de biculture et le modèle de tri-culture stimulé ou non par le cocktail pro-inflammatoire. Ces protéines sont habituellement bien localisées au niveau des membranes apicales, délimitant ainsi le périmètre de la cellule comme nous l'avons observé dans la biculture des cellules intestinales, avec un signal fluorescent net et régulier. Dans le cas de la tri-culture, l'association des cellules intestinales avec les THP1 modifie la localisation des protéines et leur organisation cellulaire, puisqu'on les trouve plus diffuses au niveau des membranes apicales. Cette délocalisation pourrait avoir pour conséquence une altération de la structure des jonctions serrées et donc de leur rôle d'étanchéité, qui pourrait être responsable de l'augmentation de la perméabilité membranaire, comme observée avec la TEER et le transport du rouge de phénol. Dans ce cas, il semble que la stimulation pro-inflammatoire du modèle accentue légèrement ce phénomène. Ces observations sont cohérentes avec d'autres études qui montrent que certaines cytokines comme le TNF- $\alpha$  ou l'IFN $\gamma$  entraînent une redistribution des protéines des TJs (F. Wang et al. 2005; Leonard, Collnot, et Lehr 2010; Li et al. 2013; Lee 2015). A l'issue de ces différentes expériences, nous avons donc pu montrer que notre modèle présentait bien une augmentation de la perméabilité membranaire, marqueur d'inflammation.

D'autre part, selon la littérature, l'inflammation modifie aussi l'état de la couche de mucus. Ainsi chez les patientes souffrant de MICI (McGuckin et al. 2009) la couche de mucus est altérée et, en réaction l'intestin augmente sa production pour d'une part piéger les bactéries qui ont pu rentrer en contact avec la barrière épithéliale, ce qui entretient l'inflammation (Vindigni et al. 2016; Johansson et al. 2008), et d'autre part reconstituer la couche de mucus endommagée (Van Seuningen et al. 2001). Nous avons effectivement observé par microscopie confocale une augmentation de la production de la mucine MUC5AC lors de la stimulation. De la même façon, Smirnova et al (2000) ont montré une hyperproduction de cette mucine par des HT29-MTX suite à la stimulation avec TNF- $\alpha$  (Smirnova, Birchall, et Pearson 2000). Il existe aussi des rapports concernant la surexpression du gène codant pour la mucine MUC5AC par d'autres types de cellules épithéliales par effet du LPS et TNF- $\alpha$  (Zen et al. 2002).

Une fois le modèle mis au point et validé, nous avons réalisé une première série d'expériences avec la BCX, un des principaux caroténoïdes pro-vitaminiques des agrumes, pour étudier son interaction avec un intestin en état d'inflammation. Il n'existe malheureusement que peu d'informations à ce sujet dans la littérature, bien qu'il existe des rapports concernant le potentiel antioxydant de la BCX (Lorenzo et al. 2009; Navarro et al. 2011; Chisté et al. 2014). La BCX étant une molécule lipophile, elle nécessite d'être solubilisée dans des micelles pour pouvoir être absorbée. Nous avons donc étudié le transport ainsi que l'effet de la BCX sur l'inflammation en utilisant deux types de micelles : artificielles à base de Tween 40 et physiologiques à base de sels biliaires et de phospholipides. Néanmoins, au vu des premiers résultats obtenus, l'étude d'une telle molécule sur le modèle semble compliquée car nous avons rencontré des effets imprévus liés aux substances composant les micelles. Ainsi les micelles artificielles ou physiologiques, bien que largement utilisées pour l'étude des caroténoïdes (O'Sullivan, Ryan, et O'Brien 2007; Dhuique-Mayer et al. 2007; During, Doraiswamy, et Harrison 2008) ont montré un effet cytotoxique important lors d'un temps de contact de 20h. Le pouvoir détergeant du Tween 40 et des sels biliaires pourrait expliquer ce phénomène. Il a été montré que les sels biliaires

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

peuvent avoir un effet délétère sur les membranes à une certaine concentration (Meaney et O'Driscoll 2000; Dial et al. 2008).

Il est intéressant de noter par ailleurs qu'en présence de BCX la toxicité des micelles Tween est fortement amoindrie, laissant présager un éventuel effet protecteur, ce qui n'est pas le cas par contre avec les micelles physiologiques. Par la suite, nous avons pu montrer qu'une diminution du temps de contact à 2h, permettait d'éviter la cytotoxicité des micelles physiologiques.

Nous avons aussi évalué le transport de la BCX dans les conditions d'exposition prolongée et nous avons observé un taux de transport stable (autour de 11%) dans le cas des micelles artificielles qu'elles que soient les conditions de culture (bi- ou tri-culture) ou de stimulation, ne montrant aucun effet de l'inflammation sur le transport et indépendamment de la toxicité du Tween. Par contre, dans le cas des micelles physiologiques, le taux de transport a été augmenté de 12 % (biculture) à 14,7 % dans le modèle de tri-culture stimulé ou non. Nous pourrions alors envisager l'hypothèse que dans ce cas, la présence des cellules immunitaires et les effets des cytokines produites associés à l'effet délétère des micelles aient pu augmenter le passage de la BCX à travers la monocouche épithéliale.

Concernant l'effet sur l'inflammation, les résultats sont dans l'ensemble difficilement interprétables. En effet, nous avons observé une tendance des micelles de BCX à diminuer la production de l'IL-6 et l'IL-8 (par les THP1) dans le modèle enflammé quel que soit le temps d'exposition (20h ou 2h). Cependant le véhicule seul semble avoir aussi un impact, que ce soit le Tween ou les micelles physiologiques. Nous nous sommes alors interrogés sur la cytotoxicité éventuelle du véhicule sur les THP1, qui aurait de ce fait diminué la quantité de cytokines produites, mais la mesure de la LDH libérée par les THP1 n'a montré aucune toxicité, réfutant cette hypothèse. Il y a donc bien un effet atténuant des véhicules sur la production de certaines cytokines, ce qui à ce jour reste inexplicable. Toutefois, ce sont des résultats préliminaires qui méritent d'être approfondis. Concernant l'expression des gènes codant pour iNOS et COX-2, les résultats sont difficiles à interpréter et manquent de cohérence, mais un effet véhicule est aussi observé. Ces résultats restent préliminaires et non concluants ce qui nous amènerait à proposer la poursuite de cette étude afin de mieux clarifier le rôle du véhicule *versus* celui de la BCX.

Ainsi, le modèle développé avait pour objectif de se rapprocher de la physiologie humaine de l'intestin en état d'inflammation avec l'ajout des HT29-MTX permettant la production de mucus au niveau apical et des cellules immunitaires THP-1, représentant les macrophages présents dans la lamina propria. Nous avons pu montrer que notre modèle répondait bien à un stimulus pro-inflammatoire par l'augmentation des marqueurs d'inflammation attendus, tels que la production de cytokines et d'enzymes, une altération de la perméabilité épithéliale et une surproduction de mucus. Nous pouvons alors considérer que ce modèle permettra par la suite d'étudier l'effet de micro-constituants alimentaires sur l'inflammation intestinale en mettant en évidence d'éventuels potentiels antioxydants et anti-inflammatoires ainsi que d'étudier les mécanismes au niveau cellulaire et moléculaire, ce qui n'est pas toujours facilement réalisable *in vivo*.

Néanmoins, comme pour tous les modèles *in vitro* nous pouvons noter des faiblesses inhérentes à la culture cellulaire elle-même et aux modèles 2D. Nous avons ainsi observé de faibles quantités des cytokines produites par les cellules intestinales après stimulation, ce qui n'est pas cohérent avec certains autres auteurs. Une autre limite du modèle réside dans le fait que la production de cytokines n'est jamais identique d'une expérience à une autre en terme de quantités, rendant parfois difficile l'interprétation, d'où la nécessité d'avoir plusieurs contrôles négatifs à chaque fois ce qui alourdit les expériences. De plus, nous aurions espéré également des résultats concernant la perméabilité et les mesures de TEER plus conformes à ceux

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

rapportés dans la littérature, c'est-à-dire une diminution plus importante. Ceci est probablement dû à la différence de cocktail de stimulation utilisé. En règle générale, une meilleure reproductibilité des effets serait à rechercher en essayant de mieux cerner et maîtriser les paramètres qui pourraient influencer sur les variations observées. Par ailleurs, dans le cas des composés liposolubles, une étude plus approfondie de l'effet des véhicules utilisés vs l'effet réel du composé étudié serait aussi une perspective à envisager.

Finalement, les derniers travaux de recherche réalisés grâce aux avancées technologiques et l'établissement des modèles 3D, montrent que le manque de matrice extracellulaire dans les modèles *in vitro* aurait un effet sur le comportement, distribution dans l'espace et les réponses des cellules dû aux interactions de ces dernières avec les protéines de la matrice (Griffith et Swartz 2006; Ravi et al. 2015; Langhans 2018). Ainsi, l'utilisation d'une matrice extracellulaire dans notre modèle pourrait aussi être envisagée afin d'améliorer la fiabilité et reproductibilité des réponses cellulaires, même si ceci nécessiterait encore des mises au points importantes.

## **CONCLUSION**

## CONCLUSION

L'objectif principal de ce travail de thèse était de mettre au point un modèle *in vitro* d'inflammation intestinale associant plusieurs lignées cellulaires en co-culture. L'objectif secondaire était alors d'étudier l'interaction d'un caroténoïde des agrumes, la BCX avec le modèle.

La première partie du travail de thèse a donc consisté en de nombreuses mises au point méthodologiques dans le but d'établir notamment les conditions de culture et de stimulation inflammatoire. Nous avons retenu un cocktail pro-inflammatoire à base de LPS / IFN $\gamma$ , à deux doses différentes : une dose dite faible (50ng/mL LPS - 5ng/mL IFN $\gamma$ ) et une dose dite forte (1  $\mu$ g/mL LPS - 50 ng/mL IFN $\gamma$ ). Le temps de stimulation par le cocktail a été fixé à 18h. Le modèle *in vitro* que nous avons développé au sein du laboratoire avait pour objectif de se rapprocher au mieux de la physiologie humaine de l'intestin en état d'inflammation. L'ajout des HT29 MTX aux Caco-2 TC7 (1 : 9) a alors permis la production de mucus au niveau apical, comme nous l'avons démontré par plusieurs méthodes de coloration ou d'immunomarquage. L'établissement des marqueurs d'inflammation, comme la production de cytokines pro-inflammatoires (IL6, IL8 et TNF) et d'enzymes (iNOS et COX2) montre l'intérêt de l'ajout des THP-1 au niveau basal en rapprochant le modèle des conditions physiologiques, à savoir la présence des macrophages dans la lamina propria sous la monocouche épithéliale. Nous avons pu voir que l'expression des gènes codant pour ces marqueurs était également augmentée dans le modèle enflammé. Par ailleurs, la présence des THP-1 a permis aussi d'établir une altération de l'intégrité de la monocouche épithéliale, *via* un réarrangement des jonctions serrées par délocalisation des protéines les constituant (observé par immunofluorescence), entraînant une augmentation de la perméabilité épithéliale, caractéristique majeure de l'inflammation de l'intestin. Enfin, une surproduction de la mucine MUC5AC présente dans le mucus a été montrée dans le modèle, ce qui est typique aussi d'un intestin en état d'inflammation.

Suite à cette première phase de développement, nous avons donc pu établir un modèle *in vitro* répondant à un stimulus pro-inflammatoire par l'établissement de plusieurs marqueurs d'inflammation, lequel est par ailleurs réduit en présence d'un puissant anti-inflammatoire pharmaceutique tel que la dexaméthasone. Ceci laisse envisager l'utilisation de ce modèle par la suite pour l'étude de composés bioactifs.

La deuxième partie de ce travail a concerné l'étude de la BCX et les premiers résultats obtenus ont révélé des difficultés liées à la nécessité de solubiliser préalablement la BCX, liposoluble, dans des micelles, permettant son absorption. Nous avons utilisé deux types de micelles, à base soit de Tween 40 (artificielles) soit de sels biliaires et phospholipides (physiologiques), lesquels se sont avérés toxiques dans un premier temps, lors d'une exposition prolongée sur les cellules. La réduction du temps d'exposition à 2h a permis d'éviter cette cytotoxicité. Concernant l'effet sur l'inflammation, les premiers résultats sont difficilement interprétables en particulier concernant la production des cytokines et l'expression de leur gène. En effet, bien que les micelles de BCX montrent une tendance à diminuer la production de certaines cytokines (IL6 et IL8), le rôle des constituants des micelles (Tween 40 ou sels biliaires/phospholipides) dans le phénomène observé reste à clarifier par la suite.

D'autre part, l'étude de composés bioactifs tels que les caroténoïdes ne s'arrête pas qu'à celle des molécules isolées. Ces molécules sont toujours intégrées dans les aliments à une matrice avec d'autres constituants, comme par exemple les polyphénols. Il serait alors intéressant par la suite d'étudier les possibles interactions (synergie ou antagonisme) entre les différents

## CONCLUSION

composés bioactifs, ainsi que le rôle de la matrice alimentaire. Ceci serait une perspective d'utilisation du modèle.

Par ailleurs, le modèle pourrait aussi être envisagé pour être utilisé dans des études sur la relation microbiote intestinal-inflammation-composés bioactifs telles que par exemple l'étude de l'interaction des bactéries lactiques avec le modèle en état d'inflammation et leur adhésion à la couche de mucus.

Pour conclure, les modèles de culture cellulaire les plus couramment utilisés sont établis dans des conditions bidimensionnelles (2D) comme cela a été notre cas. Néanmoins, ceci n'empêche pas d'envisager des améliorations que notre modèle pourrait avoir par la suite comme l'utilisation d'une matrice extracellulaire, avec les mises au point nécessaires mais toujours dans le but de se rapprocher *in vitro* des conditions physiologiques humaines ce qui permet de diminuer l'expérimentation animale. Les avancées technologiques dans le domaine de la culture cellulaire sont encore attendues et dans cet esprit le modèle ici mis en place permettra au laboratoire de Nutripass d'évoluer dans le sens d'une meilleure compréhension de la relation alimentation-inflammation intestinale tout en cherchant à minimiser l'expérimentation animale.

# **ANNEXES**

**Table 1. Gut inflammation 2D co-culture models**

Model	Cell type(s) & source	Objective(s)	Particular features	Reference
Caco-2/THP1	Human colon adenocarcinoma / Human peripheral blood (acute monocytic leukemia) cell lines	Effect of lycopene on pro-inflammatory targets of intestinal and immune cell lines	/	(Makon-Sébastien et al. 2014)
		Microparticle uptake	/	(Moyes, Morris, et Carr 2010)
		Effect of macrophages on intestinal epithelial cells	/	(Satsu et al. 2006)
		Evaluation of the cross talk between intestinal epithelium and macrophages	/	(Kanzato, Manabe, et Shimizu 2014)
		Migration of immune cells into intestinal epithelial cell monolayers	Caco-2 cells were cultured on inverted Millicell inserts (12 µm pore size) and then re-orientated before adding THP-1 to allow contact with the porous membrane at the basolateral side of the cells.	(Mori, Satsu, et Shimizu 2003)
		Effect of chickpea protein hydrolysates on cell proliferation	/	(Girón-Calle, Alaiz, et Vioque 2010)
		Bioaccessibility, bioavailability and anti-inflammatory effects of polyphenols	/	(H. Zhang et al. 2017)
Caco-2/Raw 264.7	Human colon adenocarcinoma / Murine macrophage cell lines	Anti-inflammatory effects of <i>hit</i> or <i>lead</i> drugs from the MicroSource Pure Natural Products Collection and Sigma-Aldrich database	Compounds were chosen according to a quantitative structure-activity relationship model based on molecular topology to predict the IL-6 mediated anti-UC activity.	(Galvez-Llompарт et al. 2013)
		Effect of fucoidan (from brown algae) on gut inflammation	/	(Tanoue et al. 2008)
		Anti-inflammatory effects of <i>Smabucus nigra</i> fruit extract on LPS-stimulated macrophage-type cells	/	(Olejnik et al. 2015)

## ANNEXE A

		Anti-inflammatory effects of <i>Sasa quelpaertensis</i> leaf extract (SQE) on LPS-stimulated co-culture	/	(K.-M. Kim et al. 2015)
		Anti-inflammatory capacity of fruit juices enriched with pine bark extract (PBE)	/	(Frontela-Saseta et al. 2013)
Caco-2/ PBMC	Human colon adenocarcinoma cell line / Human peripheral blood mononuclear cells	Effect of arsenical species on the release of cytokines	/	(Calatayud et al. 2014)
		<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> (Lcr35) anti-inflammatory effect on Caco-2 cells.	/	(Fang et al. 2010)
		Effect of bacterial products (LPS, MDP) on enterocyte-macrophage interaction	Caco-2 cells were cultured on inverted Transwells and then re-orientated before adding PBMC to allow cell-cell contact.	(P. C. Tyrer et al. 2011)
		Interaction between PBMC and enterocytes during challenge with bacteria (Nonpathogenic <i>E. coli</i> )	/	(A. Parlesak et al. 2004)
	Human colon adenocarcinoma cell line / Murine peripheral blood mononuclear cells	Validation of an <i>in vitro</i> M-cell model	Caco-2 cells were cultured on inverted Transwells (0.3 µm pore size) and then re-orientated before adding isolated Peyer's patch lymphocytes to allow cell-cell contact.	(P. Tyrer et al. 2002)
Caco-2/HT29-MTX/PBMC	Human colon adenocarcinoma cell lines / Human peripheral blood mononuclear cells	<i>Salmonella enterica</i> and intestinal cells interactions under different Fe concentrations using an <i>in vitro</i> colonic fermentation system inoculated with immobilized child microbiota	Intestinal cell lines were seeded on the apical side of the inserts to which <i>S. enterica</i> N-15 in DMEM or fermentation effluents, both with different Fe concentrations, was added. Freshly collected PBMC were added to the basolateral compartment with different concentrations of Fe.	(Dostal et al. 2014)
Caco-2/HT29-MTX/THP-1	Human colon adenocarcinoma / Human peripheral blood (acute monocytic leukemia) cell lines	Anti-inflammatory and antioxidant capability of carotenoids/polyphenols from plum and cabbage digesta on a stimulated model (LPS, TNF- $\alpha$ & IL-1 $\beta$ )	Intestinal cell lines were seeded on inserts apical side and immune cells on the basolateral compartment.	(Kaulmann, Legay, et al. 2016)

## ANNEXE A

Caco-2/Raji B	Human colon adenocarcinoma / Human Burkitt's lymphoma cell lines	Improvement of an <i>in vitro</i> model of human follicle-associated epithelium (FAE) to study nanoparticle transport mechanisms by M cells	Two models were set up, one with Raji B cells in the basolateral compartment of a standard compartmentalized model and the other where inserts containing Caco-2 cells were inverted in order to seed Raji B cells in contact with the porous membrane at the basolateral side of the intestinal cells.	(des Rieux et al. 2007)
Caco-2/HT29-MTX/Raji B	Human colon adenocarcinoma / Human Burkitt's lymphoma cell lines	Establishment of a tissue-engineered model for oral drug delivery studies	Two models were set up: one in which Intestinal cell lines were seeded on Transwell inserts and Raji-B cells were added to the basolateral compartment and an inverted model in which intestinal cells were seeded on the basal side of the membrane and then Raji B cells were seeded on the apical side of the insert.	(Antunes et al. 2013; Araújo et al. 2016; Araújo et Sarmento 2013)
		Development of a triple culture intestinal model to study nanoparticle mobility	Intestinal cell lines were seeded on the apical side of Transwell inserts and Raji-B cells were seeded on the basolateral compartment.	(Schimpel et al. 2014)
Caco-2/ISO-HAS-1	Human colon adenocarcinoma/ Human microvascular endothelial cell lines	Evaluation of co-culture interactions with nanosized drug vehicles or contrast agents during an inflammatory induced state	Transwell inserts were coated with collagen I and inverted, ISO-HAS-1 cells were seeded on the lower side and after 2 h of adhesion, the inserts were re-inverted and Caco-2 cells seeded in the upper compartment.	(Kasper et al. 2016)
SW480/THP-1	Human colorectal adenocarcinoma / Human peripheral blood (acute monocytic leukemia) cell lines	Investigation of the effects of HMGB1 inhibitors in a LPS stimulated model	SW480 cells were prepared in the lower chamber of Transwell inserts and THP-1 cells were loaded into the upper chamber.	(F.-C. Wang 2015)
m-IC <sub>d2</sub> / DCs	Murine intestinal epithelial cells/ dendritic cells / murine bone marrow-DCs cells	Probiotic bacteria strain-specific immunomodulatory capacities: impact on dendritic cells maturation	/	(Zoumpopoulou et al. 2009)

Table 2. Gut 3D culture models

	Model	Cell type(s) & source	Objective(s)	Particular features	Reference
<b>HEALTHY GUT</b>	3D human small intestinal villous	Caco-2 (human colon adenocarcinoma)	Development of a 3D hydrogel scaffold model to accurately replicate the shape and size of human small intestinal villi to test drug permeability	Cells cultured on a soft-hydrogel structure.	(Yu et al. 2012)
	Multicellular organotypic model of human intestinal mucosa	HCT-8 (human ileocecal adenocarcinoma), CCD-18Co (human colon fibroblast), HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)	Development of an organotypic model with close structural and functional resemblance to the human intestinal mucosa	Model includes fibroblasts, lymphocytes, epithelial and endothelial cells embedded in a protein enriched collagen I matrix. Cells can differentiate into several lineages (goblet cells, M cells and differentiated enterocytes).	(Salerno-Goncalves, Fasano, et Szein 2011)
	3D setup of intestinal mucosa	Caco-2 (human colon adenocarcinoma), THP-1 (human macrophages), MUTZ-3 (human dendritic cells)	Development of a 3D intestinal model for drug delivery studies and to assess nanomaterial toxicity in healthy or disease conditions	Immune cells were embedded in a collagen scaffold, seeded on the apical side of inserts and Caco-2 cells, on top of this layer.	(Collnot, Susewind, et Lehr 2013; Susewind et al. 2016)
	3D co-culture (intestinal epithelial cells-fibroblast model)	Caco-2 (human colon adenocarcinoma) / NHDF (normal human dermal fibroblasts)	To study TJ expression and cell differentiation in a 3D model	Co-cultures of intestinal and endothelial cells; 1L-Caco-2/1L-NHDF and 1L-Caco-2/8L-NHDF were constructed using a cell-coat (nano-ECM of fibronectin and gelatin) technology.	(Matsusaki et al. 2015)
	3D intestinal culture	T84 (human colon carcinoma, lung metastasis), Caco-2 (human colon adenocarcinoma)	Effect of TNF $\alpha$ and IFN $\gamma$ on paracellular permeability and morphogenesis in 3D T84 and Caco-2 luminal spheres	Cells were seeded in Matrigel <sup>TM</sup> in order to form spheres.	(K. Juuti-Uusitalo et al. 2011)
		Caco-2 (human colon adenocarcinoma)	Development of microporous, polymeric membranes that are either flat or contain controllable 3-dimensional shapes that can be integrated in microfluidic, multi-organ cell culture systems	Membranes can be integrated with microfluidic, multi-organ cell culture systems, providing access to both apical and basolateral sides.	(Esch et al. 2012)
		Caco-2 (human colon adenocarcinoma)	Study of epithelial morphogenesis	To produce cysts, Caco-2 cells were plated either on top of the ECM (Matrigel <sup>TM</sup> ), for time lapse or	(Jaffe et al. 2008)

## ANNEXE B

			embedded in the ECM (collagen I and Matrigel™), for immunofluorescence.	
	Caco-2 (human colon adenocarcinoma)	Toxicity and inflammatory effects of different-sized ZnO nanoparticles (NPs) at various concentrations seeded in 3D cultures	The cells were seeded and immobilized in agarose gel.	(Z. Wu et al. 2017)
Human gut-on-a-chip	Caco-2 (human colon adenocarcinoma)	Development of a biomimetic 'human gut-on-a-chip'	Micro-device composed of two microfluidic channels separated by a porous flexible membrane coated with ECM (collagen and Matrigel™) and lined with human intestinal epithelial (Caco-2) cells.	(H. J. Kim et al. 2012; H. J. Kim et Ingber 2013)
Intestinal microfluidic system	Caco-2 (human colon adenocarcinoma)	Development of a microchip-based system to mimic the intestine	Microchip composed of a glass slide, a permeable membrane, and polydimethylsiloxane sheets, containing microchannels and Caco-2 cells seeded on the membrane.	(Imura et al. 2009)
Intestinal microscale cell culture analog (μCCA)	Caco-2 and HT29-MTX (human adenocarcinoma), HepG2/C3A (human hepatocellular carcinoma)	Development of an <i>in vitro</i> microscale cell culture analog (μCCA) to the gastrointestinal tract	Intestinal cells seeded on polycarbonate (0.4 μm) membranes, μCCA coated with poly-D-lysine and plasma fibronectin and HepG2/C3A cells seeded into the liver chamber. A peristaltic pump was used to simulate medium re-circulation.	(Mahler et al. 2009)
Intestinal microfluidic device	Caco-2 (human colon adenocarcinoma)	Development of an integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of intestinal tissue models	The microfluidic structure is divided into two independent channels separated by a semipermeable membrane enabling the detection of polarized Caco-2 transport activity.	(Kimura et al. 2008)
Microfluidic gut-on-a-chip	Caco-2 (human colon adenocarcinoma)	Reproduce the 3D villi structure and the fluidic shear in a microfluidic chip	Cells were seeded on a collagen scaffold (villi) incorporated into a microfluidic device consisting of three layers of polydimethyl-siloxane (PDMS), a slide glass and a polyester (PET) membrane	(Shim et al. 2017)
Intestinal microfluidic chip	Caco-2 (human colon adenocarcinoma)	Evaluation of Ca <sup>2+</sup> transport	The chip was made of two PDMS layers, two polymethylmethacrylate (PMMA) layers, a PET membrane (0.4μm) and a glass slide. Ag/AgCl electrodes were included in the device.	(C. Huang et al. 2014)

## ANNEXE B

	Intestinal microfluidic device	Caco-2 (human colon adenocarcinoma)	Development of a microfluidic device that mimics human intestinal properties	Caco-2 cells were seeded on a porous membrane coated with fibronectin between two layers of polydimethylsiloxane (PDMS).	(Chi et al. 2015)
<b>INFLAMED GUT</b>	3D <i>in vitro</i> intestinal mucosa model	Caco-2 and HT29-MTX (human adenocarcinoma), THP-1 (human peripheral blood -acute monocytic leukemia), MEFs, P0 (primary mouse embryonic fibroblast)	Development of an improved 3D <i>in vitro</i> intestinal mucosa model to evaluate drug absorption.	MEFs were dispersed in a type rat tail collagen solution. Intestinal cells were seeded on the top of the formed collagen gel. The co-culture was then transferred to a receiver plate pre-seeded with THP-1 derived macrophages.	(Li et al. 2013)
	Intestinal inflamed 3D cell-culture model	Caco-2, HT29, T84 (human colon adenocarcinoma) / PBMC (human peripheral blood mononuclear cells)	Development of a 3D co-culture of human intestinal and immune cells stimulated model for anti-inflammatory drug screening and their formulations	Macrophages and dendritic cells derived from PBMC were embedded in a collagen layer on a Transwell insert and Caco-2 cells were seeded on top.	(Leonard et al. 2012; Leonard, Collnot, et Lehr 2010)
		Caco-2 (human adenocarcinoma), THP-1 (human peripheral blood - acute monocytic leukemia)	Evaluation of the delivery efficacy of nanoparticles	THP-1 and Caco-2 cells were embedded in a Matrigel™ solution.	(Z. Huang et al. 2014)
	3D co-culture (intestinal epithelial cell-macrophage) model	HT29 (human colon adenocarcinoma), U937 (human monocyte-histiocytic lymphoma)	Study of <i>Salmonella enterica</i> colonization patterns	U937 cells were activated upon collagen-coated scaffolds. HT-29 epithelial cells were then added and the 3D model was cultured in the NASA Rotating Wall Vessel bioreactor until optimal differentiation was reached.	(Barrila et al. 2017)
	NutriChip	Caco-2 (human colon adenocarcinoma), U937 (human monocyte-histiocytic lymphoma)	Development of an integrated microfluidic platform to investigate the potential immuno-modulatory function of dairy food	The core component of the NutriChip is a miniaturized artificial human gastrointestinal tract (GIT), which consists of a confluent layer of epithelial cells separated from a co-culture of immune cells by a permeable membrane.	(Ramadan et al. 2013; Vergères et al. 2012)
	Microfluidic chip	Caco-2 (human adenocarcinoma), U937 (human monocyte-histiocytic lymphoma)	Development of a microfluidic-based dynamic <i>in vitro</i> model of human intestinal barrier	Continuous perfusion of culture media from the apical and basolateral side of the porous membrane mimics physiological flow.	(Ramadan et Jing 2016)

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, Alison. 2003. « Biology's new dimension ». *Nature* 424 (août): 870. doi:10.1038/424870a.
- Abraham, Clara, et Judy H. Cho. 2009. « Inflammatory Bowel Disease ». *New England Journal of Medicine* 361 (21): 2066-78. doi:10.1056/NEJMra0804647.
- Al-Sadi, Rana, Dongmei Ye, Hamid M. Said, et Thomas Y. Ma. 2011. « Cellular and Molecular Mechanism of Interleukin-1 $\beta$  Modulation of Caco-2 Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15 (4): 970-82. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01065.x.
- Alzamora, Rodrigo, Fiona O'Mahony, Wing-Hung Ko, Tiffany Wai-Nga Yip, Derek Carter, Mustapha Imnaten, et Brian Joseph Harvey. 2011. « Berberine Reduces cAMP-Induced Chloride Secretion in T84 Human Colonic Carcinoma Cells through Inhibition of Basolateral KCNQ1 Channels ». *Frontiers in Physiology* 2 (juin). doi:10.3389/fphys.2011.00033.
- Andoh, Akira, Koichi Kinoshita, Ian Rosenberg, et Daniel K. Podolsky. 2001. « Intestinal Trefoil Factor Induces Decay-Accelerating Factor Expression and Enhances the Protective Activities Against Complement Activation in Intestinal Epithelial Cells ». *The Journal of Immunology* 167 (7): 3887-93. doi:10.4049/jimmunol.167.7.3887.
- Antunes, Filipa, Fernanda Andrade, Francisca Araújo, Domingos Ferreira, et Bruno Sarmento. 2013. « Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 83 (3): 427-35. doi:10.1016/j.ejpb.2012.10.003.
- Araújo, Francisca, Carla Pereira, Joana Costa, Cristina Barrias, Pedro L. Granja, et Bruno Sarmento. 2016. « In Vitro M-like Cells Genesis through a Tissue-Engineered Triple-Culture Intestinal Model ». *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 104 (4): 782-88. doi:10.1002/jbm.b.33508.
- Araújo, Francisca, et Bruno Sarmento. 2013. « Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies ». *International Journal of Pharmaceutics* 458 (1): 128-34. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.10.003.
- Arpaia, Nicholas, Clarissa Campbell, Xiyang Fan, Stanislav Dikiy, Joris van der Veecken, Paul deRoos, Hui Liu, et al. 2013. « Metabolites Produced by Commensal Bacteria Promote Peripheral Regulatory T-Cell Generation ». *Nature* 504 (7480): 451-55. doi:10.1038/nature12726.
- Artursson, Per, Katrin Palm, et Kristina Luthman. 2001. « Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport<sup>1</sup> ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Special issue dedicated to Dr. Eric Tomlinson, *Advanced Drug Delivery Reviews*, A Selection of the Most Highly Cited Articles, 1991-1998, 46 (1-3): 27-43. doi:10.1016/S0169-409X(00)00128-9.
- Augeron, Chantal, et Christian L. Laboisse. 1984. « Emergence of Permanently Differentiated Cell Clones in a Human Colonic Cancer Cell Line in Culture after Treatment with Sodium Butyrate ». *Cancer Research* 44 (9): 3961-69.
- Barnett, Alicia M., Nicole C. Roy, Warren C. McNabb, et Adrian L. Cookson. 2016. « Effect of a Semi-Purified Oligosaccharide-Enriched Fraction from Caprine Milk on Barrier Integrity and Mucin Production of Co-Culture Models of the Small and Large Intestinal Epithelium ». *Nutrients* 8 (5): 267. doi:10.3390/nu8050267.
- Barrera, Girolamo J., et Gabriela Sánchez. 2015. « Cytokine modulation (IL-6, IL-8, IL-10) by human breast milk lipids on intestinal epithelial cells (Caco-2) ». *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 0 (0): 1-8. doi:10.3109/14767058.2015.1091879.
- Barrila, Jennifer, Jiseon Yang, Aurélie Crabbé, Shameema F. Sarker, Yulong Liu, C. Mark Ott, Mayra A. Nelman-Gonzalez, et al. 2017. « Three-Dimensional Organotypic Co-Culture Model of Intestinal Epithelial Cells and Macrophages to Study Salmonella Enterica Colonization Patterns ». *Npj Microgravity* 3 (1): 10. doi:10.1038/s41526-017-0011-2.
- Béduneau, Arnaud, Camille Tempesta, Stéphane Fimbel, Yann Pellequer, Vincent Jannin, Frédéric Demarne, et Alf Lamprecht. 2014. « A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 87 (2): 290-98. doi:10.1016/j.ejpb.2014.03.017.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Behrens, Isabel, Patric Stenberg, Per Artursson, et Thomas Kissel. 2001. « Transport of Lipophilic Drug Molecules in a New Mucus-Secreting Cell Culture Model Based on HT29-MTX Cells ». *Pharmaceutical Research* 18 (8): 1138-45. doi:10.1023/A:1010974909998.
- Beltrán, Ana R., Luciene R. Carraro-Lacroix, Camila N. A. Bezerra, Marcelo Cornejo, Katrina Norambuena, Fernando Toledo, Joaquín Araos, et al. 2015. « Escherichia coli Heat-Stable Enterotoxin Mediates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger 4 Inhibition Involving cAMP in T84 Human Intestinal Epithelial Cells ». *PLoS ONE* 10 (12). doi:10.1371/journal.pone.0146042.
- Benjamin, Jaya, Govind K. Makharia, M. Kalaivani, et Yogendra K. Joshi. 2008. « Nutritional status of patients with Crohn's disease. » *Indian journal of gastroenterology: official journal of the Indian Society of Gastroenterology* 27 (5): 195-200.
- Berghaus, Londa J., James N. Moore, David J. Hurley, Michel L. Vandenplas, Barbara P. Fortes, Margreet A. Wolfert, et Geert-Jan Boons. 2010. « Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4 ». *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 33 (5): 443-54. doi:10.1016/j.cimid.2009.07.001.
- Bischoff, Stephan C., Giovanni Barbara, Wim Buurman, Theo Ockhuizen, Jörg-Dieter Schulzke, Matteo Serino, Herbert Tilg, Alastair Watson, et Jerry M. Wells. 2014. « Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy ». *BMC Gastroenterology* 14 (novembre): 189. doi:10.1186/s12876-014-0189-7.
- Bitzer, Zachary T., Shannon L. Glisan, Melanie R. Dorenkott, Katheryn M. Goodrich, Liyun Ye, Sean F. O'Keefe, Joshua D. Lambert, et Andrew P. Neilson. 2015. « Cocoa procyanidins with different degrees of polymerization possess distinct activities in models of colonic inflammation ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 26 (8): 827-31. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.02.007.
- Bourgine, Joanna, Ingrid Billaut-Laden, Mélanie Happillon, Jean-Marc Lo-Guidice, Vincent Maunoury, Michel Imbenotte, et Franck Broly. 2012. « Gene Expression Profiling of Systems Involved in the Metabolism and the Disposition of Xenobiotics: Comparison between Human Intestinal Biopsy Samples and Colon Cell Lines ». *Drug Metabolism and Disposition* 40 (4): 694-705. doi:10.1124/dmd.111.042465.
- Briske-Anderson, Mary J., John W. Finley, et Samuel M. Newman. 1997. « The Influence of Culture Time and Passage Number on the Morphological and Physiological Development of Caco-2 Cells ». *Experimental Biology and Medicine* 214 (3): 248-57. doi:10.3181/00379727-214-44093.
- Brown, Eric M., Manish Sadarangani, et B. Brett Finlay. 2013. « The Role of the Immune System in Governing Host-Microbe Interactions in the Intestine ». *Nature Immunology* 14 (7): 660-67. doi:10.1038/ni.2611.
- Calatayud, Marta, José V. Gimeno-Alcañiz, Vicenta Devesa, et Dinoraz Vélez. 2014. « Proinflammatory Effect of Trivalent Arsenical Species in a Co-Culture of Caco-2 Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells ». *Archives of Toxicology* 89 (4): 555-64. doi:10.1007/s00204-014-1271-1.
- Cammarota, Giovanni, Gianluca Ianiro, Rossella Cianci, Stefano Bibbò, Antonio Gasbarrini, et Diego Currò. 2015. « The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: Potential for therapy ». *Pharmacology & Therapeutics* 149 (mai): 191-212. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.12.006.
- Cario, Elke, Ian M. Rosenberg, Steven L. Brandwein, Paul L. Beck, Hans-Christian Reinecker, et Daniel K. Podolsky. 2000. « Lipopolysaccharide Activates Distinct Signaling Pathways in Intestinal Epithelial Cell Lines Expressing Toll-Like Receptors ». *The Journal of Immunology* 164 (2): 966-72. doi:10.4049/jimmunol.164.2.966.
- Caro, Isabelle, Xavier Boulenc, Monique Rousset, Viviane Meunier, Martine Bourrié, Bernard Julian, Henri Joyeux, et al. 1995. « Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs ». *International Journal of Pharmaceutics* 116 (2): 147-58. doi:10.1016/0378-5173(94)00280-I.
- Cavicchi, M., et B. J. R. Whittle. 1999. « Regulation of Induction of Nitric Oxide Synthase and the Inhibitory Actions of Dexamethasone in the Human Intestinal Epithelial Cell Line, Caco-2:

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Influence of Cell Differentiation ». *British Journal of Pharmacology* 128 (3): 705-15. doi:10.1038/sj.bjp.0702827.
- Chanput, Wasaporn, Jurriaan J. Mes, Huub F. J. Savelkoul, et Harry J. Wichers. 2013. « Characterization of Polarized THP-1 Macrophages and Polarizing Ability of LPS and Food Compounds ». *Food & Function* 4 (2): 266-76. doi:10.1039/C2FO30156C.
- Chanput, Wasaporn, Jurriaan J. Mes, et Harry J. Wichers. 2014. « THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach ». *International Immunopharmacology* 23 (1): 37-45. doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002.
- Chanput, Wasaporn, Jurriaan Mes, Robert A. M. Vreeburg, Huub F. J. Savelkoul, et Harry J. Wichers. 2010. « Transcription Profiles of LPS-Stimulated THP-1 Monocytes and Macrophages: A Tool to Study Inflammation Modulating Effects of Food-Derived Compounds ». *Food & Function* 1 (3): 254-61. doi:10.1039/C0FO00113A.
- Chanput, Wasaporn, Vera Peters, et Harry Wichers. 2015. « THP-1 and U937 Cells ». In *The Impact of Food Bioactives on Health*, édité par Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, et Harry Wichers, 147-59. Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-16104-4\_14.
- Chantret, I., A. Rodolosse, A. Barbat, E. Dussaulx, E. Brot-Laroche, A. Zweibaum, et M. Rousset. 1994. « Differential Expression of Sucrase-Isomaltase in Clones Isolated from Early and Late Passages of the Cell Line Caco-2: Evidence for Glucose-Dependent Negative Regulation ». *Journal of Cell Science* 107 (1): 213-25.
- Chantret, Isabelle, Alain Barbat, Elisabeth Dussaulx, Michael G. Brattain, et Alain Zweibaum. 1988. « Epithelial Polarity, Villin Expression, and Enterocytic Differentiation of Cultured Human Colon Carcinoma Cells: A Survey of Twenty Cell Lines ». *Cancer Research* 48 (7): 1936-42.
- Cheng, K.-C., Cheng Li, et Annette S. Uss. 2008. « Prediction of oral drug absorption in humans – from cultured cell lines and experimental animals ». *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 4 (5): 581-90. doi:10.1517/17425255.4.5.581.
- Chi, Meiyang, Banya Yi, Seunghan Oh, Dong-June Park, Jong Hwan Sung, et Sungsu Park. 2015. « A Microfluidic Cell Culture Device (MFCCD) to Culture Epithelial Cells with Physiological and Morphological Properties That Mimic Those of the Human Intestine ». *Biomedical Microdevices* 17 (3): 58. doi:10.1007/s10544-015-9966-5.
- Chisté, Renan Campos, Marisa Freitas, Adriana Zerlotti Mercadante, et Eduarda Fernandes. 2014. « Carotenoids inhibit lipid peroxidation and hemoglobin oxidation, but not the depletion of glutathione induced by ROS in human erythrocytes ». *Life Sciences* 99 (1): 52-60. doi:10.1016/j.lfs.2014.01.059.
- Cho, Jin Ah, et Eunmi Park. 2015. « Curcumin utilizes the anti-inflammatory response pathway to protect the intestine against bacterial invasion ». *Nutrition Research and Practice* 9 (2): 117-22. doi:10.4162/nrp.2015.9.2.117.
- Cho, Judy H. 2008. « The Genetics and Immunopathogenesis of Inflammatory Bowel Disease ». *Nature Reviews Immunology* 8 (6): 458-66. doi:10.1038/nri2340.
- Cilla, Antonio, Alessandro Attanzio, Reyes Barberá, Luisa Tesoriere, et Maria A. Livrea. 2015. « Anti-proliferative effect of main dietary phytosterols and  $\beta$ -cryptoxanthin alone or combined in human colon cancer Caco-2 cells through cytosolic Ca<sup>2+</sup> – and oxidative stress-induced apoptosis ». *Journal of Functional Foods* 12 (janvier): 282-93. doi:10.1016/j.jff.2014.12.001.
- Collnot, Eva-Maria, Julia Susewind, et Claus-Michael Lehr. 2013. « Advanced in Vitro Models of the Intestinal Mucosa for Drug Delivery Studies ». In *Cellular In Vitro Testing: Methods and Protocols*, édité par J. W. Haycock, A. Ahluwalia, et J. M. Wilkinson, 123-33. Boca Raton: Crc Press-Taylor & Francis Group.
- Conklin, Laurie S., et Maria Oliva-Hemker. 2010. « Nutritional considerations in pediatric inflammatory bowel disease ». *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 4 (3): 305-17. doi:10.1586/egh.10.23.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Costantini, V., E. K. Morantz, H. Browne, K. Ettayebi, X. L. Zeng, R. L. Atmar, M. K. Estes, et J. Vinjé. 2018. « Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. » *Emerging infectious diseases* 24 (8): 1453–1464.
- Daigneault, Marc, Julie A. Preston, Helen M. Marriott, Moira K. B. Whyte, et David H. Dockrell. 2010. « The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages ». *PLoS ONE* 5 (1): e8668. doi:10.1371/journal.pone.0008668.
- Denis, Marie-Claude, Yves Desjardins, Alexandra Furtos, Valérie Marcil, Stéphanie Dudonné, Alain Montoudis, Carole Garofalo, Edgard Delvin, André Marette, et Emile Levy. 2015. « Prevention of Oxidative Stress, Inflammation and Mitochondrial Dysfunction in the Intestine by Different Cranberry Phenolic Fractions ». *Clinical Science* 128 (3): 197-212. doi:10.1042/CS20140210.
- Dharmasathaphorn, KIERTISIN, J. A. McRoberts, K. G. Mandel, L. D. Tisdale, et H. Masui. 1984. « A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 246 (2): G204–G208. doi:10.1152/ajpgi.1984.246.2.G204.
- Dhuique-Mayer, Claudie, Patrick Borel, Emmanuelle Reboul, Bertrand Caporiccio, Pierre Besancon, et Marie-Josèphe Amiot. 2007. «  $\beta$ -Cryptoxanthin from citrus juices: assessment of bioaccessibility using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model ». *British Journal of Nutrition* 97 (05): 883–890. doi:10.1017/s0007114507670822.
- Dhuique-Mayer, Claudie, Catherine Caris-Veyrat, Patrick Ollitrault, Franck Curk, et Marie-Josèphe Amiot. 2005. « Varietal and Interspecific Influence on Micronutrient Contents in Citrus from the Mediterranean Area ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (6): 2140-45. doi:10.1021/jf0402983.
- Dhuique-Mayer, Claudie, Alexandrine During, Bertrand Caporiccio, Frank Tourniaire, et Marie-Josèphe Amiot. 2013. « Citrus Flavanones Enhance Carotenoid Uptake by Intestinal Caco-2 Cells ». *Food & Function* 4 (11): 1625-31. doi:10.1039/C3FO60212E.
- Dial, Elizabeth J., Suzan H. M. Rooijackers, Rebecca L. Darling, Jim J. Romero, et Lenard M. Lichtenberger. 2008. « Role of Phosphatidylcholine Saturation in Preventing Bile Salt Toxicity to Gastrointestinal Epithelia and Membranes ». *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23 (3): 430-36. doi:10.1111/j.1440-1746.2007.05153.x.
- Ding, Shengli, et Pauline K. Lund. 2011. « Role of intestinal inflammation as an early event in obesity and insulin resistance ». *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 14 (4): 328-33. doi:10.1097/MCO.0b013e3283478727.
- Dostal, Alexandra, Christophe Chassard, Florentine M. Hilty, Michael B. Zimmermann, Tanja Jaeggi, Samuela Rossi, et Christophe Lacroix. 2012. « Iron Depletion and Repletion with Ferrous Sulfate or Electrolytic Iron Modifies the Composition and Metabolic Activity of the Gut Microbiota in Rats ». *The Journal of Nutrition* 142 (2): 271-77. doi:10.3945/jn.111.148643.
- Dostal, Alexandra, Mélanie Gagnon, Christophe Chassard, Michael Bruce Zimmermann, Liam O'Mahony, et Christophe Lacroix. 2014. « Salmonella Adhesion, Invasion and Cellular Immune Responses Are Differentially Affected by Iron Concentrations in a Combined In Vitro Gut Fermentation-Cell Model ». *PLOS ONE* 9 (3): e93549. doi:10.1371/journal.pone.0093549.
- During, Alexandrine, George Albaugh, et J. Cecil Smith. 1998. « Characterization of  $\beta$ -Carotene 15,15'-Dioxygenase Activity in TC7 Clone of Human Intestinal Cell Line Caco-2 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 249 (2): 467-74. doi:10.1006/bbrc.1998.9160.
- During, Alexandrine, Sundari Doraiswamy, et Earl H. Harrison. 2008. « Xanthophylls Are Preferentially Taken up Compared with  $\beta$ -Carotene by Retinal Cells via a SRBI-Dependent Mechanism », *Journal of Lipid Research* 49 (8): 1715-24. doi:10.1194/jlr.M700580-JLR200.
- During, Alexandrine, et Earl H. Harrison. 2007. « Mechanisms of Provitamin A (Carotenoid) and Vitamin A (Retinol) Transport into and out of Intestinal Caco-2 Cells ». *Journal of Lipid Research* 48 (10): 2283-94. doi:10.1194/jlr.M700263-JLR200.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- During, Alexandrine, M. Mahmood Hussain, Diane W. Morel, et Earl H. Harrison. 2002. « Carotenoid Uptake and Secretion by CaCo-2 Cells  $\beta$ -Carotene Isomer Selectivity and Carotenoid Interactions ». *Journal of Lipid Research* 43 (7): 1086-95. doi:10.1194/jlr.M200068-JLR200.
- Dvir-Ginzberg, Mona, Iris Gamlieli-Bonshtein, Riad Agbaria, et Smadar Cohen. 2003. « Liver Tissue Engineering within Alginate Scaffolds: Effects of Cell-Seeding Density on Hepatocyte Viability, Morphology, and Function ». *Tissue Engineering* 9 (4): 757-66. doi:10.1089/107632703768247430.
- Esch, Mandy Brigitte, Jong Hwan Sung, Jennifer Yang, Changhao Yu, Jiajie Yu, John C. March, et Michael Louis Shuler. 2012. « On Chip Porous Polymer Membranes for Integration of Gastrointestinal Tract Epithelium with Microfluidic 'Body-on-a-Chip' Devices ». *Biomedical Microdevices* 14 (5): 895-906. doi:10.1007/s10544-012-9669-0.
- Esser, Nathalie, Sylvie Legrand-Poels, Jacques Piette, André J. Scheen, et Nicolas Paquot. 2014. « Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes ». *Diabetes Research and Clinical Practice* 105 (2): 141-50. doi:10.1016/j.diabres.2014.04.006.
- Ettayebi, Khalil, Sue E. Crawford, Kosuke Murakami, James R. Broughman, Umesh Karandikar, Victoria R. Tenge, Frederick H. Neill, et al. 2016. « Replication of Human Noroviruses in Stem Cell-Derived Human Enteroids ». *Science*, août, aaf5211. doi:10.1126/science.aaf5211.
- Ewaschuk, Julia B., Hugo Diaz, Liisa Meddings, Brendan Diederichs, Andrea Dmytrash, Jody Backer, Mirjam Looijer-van Langen, et Karen L. Madsen. 2008. « Secreted Bioactive Factors from Bifidobacterium Infantis Enhance Epithelial Cell Barrier Function ». *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 295 (5): G1025-34. doi:10.1152/ajpgi.90227.2008.
- Failla, Mark L., Chureeporn Chitchumronchokchai, Mario G. Ferruzzi, Shellen R. Goltz, et Wayne W. Campbell. 2014. « Unsaturated Fatty Acids Promote Bioaccessibility and Basolateral Secretion of Carotenoids and  $\alpha$ -Tocopherol by Caco-2 Cells ». *Food & Function* 5 (6): 1101-12. doi:10.1039/C3FO60599J.
- Failla, Mark L., Chureeporn Chitchumronchokchai, et Betty K. Ishida. 2008. « In Vitro Micellarization and Intestinal Cell Uptake of Cis Isomers of Lycopene Exceed Those of All-Trans Lycopene ». *The Journal of Nutrition* 138 (3): 482-86. doi:10.1093/jn/138.3.482.
- Fang, Hsu-Wei, Shih-Bin Fang, Jen-Shiu Chiang Chiau, Chun-Yan Yeung, Wai-Tao Chan, Chuen-Bin Jiang, Mei-Lien Cheng, et Hung-Chang Lee. 2010. « Inhibitory effects of Lactobacillus casei subsp. rhamnosus on Salmonella lipopolysaccharide-induced inflammation and epithelial barrier dysfunction in a co-culture model using Caco-2/peripheral blood mononuclear cells ». *Journal of Medical Microbiology* 59 (5): 573-79. doi:10.1099/jmm.0.009662-0.
- Ferguson, Lynnette Robin. 2014. « Dietary Interactions with the Bacterial Sensing Machinery in the Intestine: The Plant Polyphenol Case ». *Frontiers in Genetics* 5. doi:10.3389/fgene.2014.00064.
- Ferruzzi, Mario G., John L. Lumpkin, Steven J. Schwartz, et Mark Failla. 2006. « Digestive Stability, Micellarization, and Uptake of  $\beta$ -Carotene Isomers by Caco-2 Human Intestinal Cells ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (7): 2780-85. doi:10.1021/jf0530603.
- Fitzgerald, Kathleen A., Meenakshi Malhotra, Caroline M. Curtin, Fergal J. O' Brien, et Caitriona M. O' Driscoll. 2015. « Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery ». *Journal of Controlled Release* 215 (octobre): 39-54. doi:10.1016/j.jconrel.2015.07.020.
- Fogh, Jørgen, et Germain Trempe. 1975. « New Human Tumor Cell Lines ». In *Human Tumor Cells in Vitro*, édité par Jørgen Fogh, 115-59. Springer US. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-1647-4\\_5](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-1647-4_5).
- Forbes, Alastair, Johanna Escher, Xavier Hébuterne, Stanisław Kłęk, Zeljko Krznaric, Stéphane Schneider, Raanan Shamir, et al. 2017. « ESPEN Guideline: Clinical Nutrition in Inflammatory Bowel Disease ». *Clinical Nutrition* 36 (2): 321-47. doi:10.1016/j.clnu.2016.12.027.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Frontela-Saseta, Carmen, Rubén López-Nicolás, Carlos A. González-Bermúdez, Carmen Martínez-Graciá, et Gaspar Ros-Berruezo. 2013. « Anti-inflammatory properties of fruit juices enriched with pine bark extract in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium: The effect of gastrointestinal digestion ». *Food and Chemical Toxicology* 53 (mars): 94-99. doi:10.1016/j.fct.2012.11.024.
- Furuse, Mikio. 2010. « Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (1): a002907. doi:10.1101/cshperspect.a002907.
- Fyderek, Krzysztof. 2009. « Mucosal Bacterial Microflora and Mucus Layer Thickness in Adolescents with Inflammatory Bowel Disease ». *World Journal of Gastroenterology* 15 (42): 5287. doi:10.3748/wjg.15.5287.
- Galvez-Llompарт, María, María del Carmen Recio Iglesias, Jorge Gálvez, et Ramón García-Domenech. 2013. « Novel Potential Agents for Ulcerative Colitis by Molecular Topology: Suppression of IL-6 Production in Caco-2 and RAW 264.7 Cell Lines ». *Molecular Diversity* 17 (3): 573-93. doi:10.1007/s11030-013-9458-6.
- Geremia, Alessandra, Paolo Biancheri, Philip Allan, Gino R. Corazza, et Antonio Di Sabatino. 2014. « Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease ». *Autoimmunity Reviews* 13 (1): 3-10. doi:10.1016/j.autrev.2013.06.004.
- Girón-Calle, Julio, Manuel Alaiz, et Javier Vioque. 2010. « Effect of chickpea protein hydrolysates on cell proliferation and in vitro bioavailability ». *Food Research International* 43 (5): 1365-70. doi:10.1016/j.foodres.2010.03.020.
- Giuffrida, Daniele, Loredana La Torre, Stelitano Manuela, Teresa M. Pellicanò, et Giacomo Dugo. 2006. « Application of HPLC–APCI–MS with a C-30 Reversed Phase Column for the Characterization of Carotenoid Esters in Mandarin Essential Oil ». *Flavour and Fragrance Journal* 21 (2): 319-23. doi:10.1002/ffj.1601.
- Griffith, Linda G., et Melody A. Swartz. 2006. « Capturing Complex 3D Tissue Physiology in Vitro ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (3): 211-24. doi:10.1038/nrm1858.
- Grootjans, Joep, Inca H R Hundscheid, Kaatje Lenaerts, Bas Boonen, Ingrid B Renes, Fons K Verheyen, Cornelis H Dejong, Maarten F von Meyenfeldt, Geerard L Beets, et Wim A Buurman. 2013. « Ischaemia-Induced Mucus Barrier Loss and Bacterial Penetration Are Rapidly Counteracted by Increased Goblet Cell Secretory Activity in Human and Rat Colon ». *Gut* 62 (2): 250-58. doi:10.1136/gutjnl-2011-301956.
- Hagesaether, Ellen. 2011. « Permeation modulating properties of natural polymers – Effect of molecular weight and mucus ». *International Journal of Pharmaceutics* 409 (1): 150-55. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.02.046.
- Haller, D., L. Holt, A. Parlesak, J. Zanga, A. Bäuerlein, R. B. Sartor, et C. Jobin. 2004. « Differential Effect of Immune Cells on Non-Pathogenic Gram-Negative Bacteria-Induced Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation and pro-Inflammatory Gene Expression in Intestinal Epithelial Cells ». *Immunology* 112 (2): 310-20. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01874.x.
- Haller, Dirk, Patrik Serrant, Genneviève Peruisseau, Christiane Bode, Walter P. Hammes, Eduardo Schiffrin, et Stephanie Blum. 2002. « IL-10 Producing CD14<sup>low</sup> Monocytes Inhibit Lymphocyte-Dependent Activation of Intestinal Epithelial Cells by Commensal Bacteria ». *Microbiology and Immunology* 46 (3): 195-205. doi:10.1111/j.1348-0421.2002.tb02686.x.
- Heller, Frank, Peter Florian, Christian Bojarski, Jan Richter, Melanie Christ, Bernd Hillenbrand, Joachim Mankertz, et al. 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. doi:10.1053/j.gastro.2005.05.002.
- Hering, Nina A., et Jörg-Dieter Schulzke. 2009. « Therapeutic Options to Modulate Barrier Defects in Inflammatory Bowel Disease ». *Digestive Diseases* 27 (4): 450-54. doi:10.1159/000233283.
- Hidalgo, Ij, Tj Raub, et Rt Borchardt. 1989. « Characterization of the Human-Colon Carcinoma Cell-Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability ». *Gastroenterology* 96 (3): 736-49. doi:10.1016/0016-5085(89)90897-4.
- Hilgendorf, Constanze, Hildegard Spahn-Langguth, Carl G. Regårdh, Elke Lipka, Gordon L. Amidon, et Peter Langguth. 2000. « Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-Cultured Cell

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lines: Permeabilities via Diffusion, inside- and Outside-Directed Carrier-Mediated Transport ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 89 (1): 63-75. doi:10.1002/(SICI)1520-6017(200001)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-6.
- Hillgren, Kathleen M., Akira Kato, et Ronald T. Borchartd. 1995. « In Vitro Systems for Studying Intestinal Drug Absorption ». *Medicinal Research Reviews* 15 (2): 83-109. doi:10.1002/med.2610150202.
- Hollebeeck, Sylvie, Julie Winand, Marie-France Hérent, Alexandrine During, Joëlle Leclercq, Yvan Larondelle, et Yves-Jacques Schneider. 2012. « Anti-Inflammatory Effects of Pomegranate (*Punica Granatum* L.) Husk Ellagitannins in Caco-2 Cells, an in Vitro Model of Human Intestine ». *Food & Function* 3 (8): 875-85. doi:10.1039/C2FO10258G.
- Holy, Chantal E., Molly S. Shoichet, et John E. Davies. 2000. « Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period ». *Journal of biomedical materials research* 51 (3): 376-382. doi:10.1002/1097-4636(20000905)51:3<376::aid-jbm11>3.0.co;2-g.
- Howell, S., Aj Kenny, et Aj Turner. 1992. « A Survey of Membrane Peptidases in 2 Human Colonic Cell-Lines, Caco-2 and Ht-29 ». *Biochemical Journal* 284 (juin): 595-601. doi:10.1042/bj2840595.
- Huang, C., Q. Ramadan, J. B. Wacker, H. C. Tekin, C. Ruffert, G. Vergères, P. Silacci, et M. a. M. Gijis. 2014. « Microfluidic Chip for Monitoring Ca<sup>2+</sup> Transport through a Confluent Layer of Intestinal Cells ». *RSC Advances* 4 (95): 52887-91. doi:10.1039/C4RA09370D.
- Huang, Huang, Jiang-Qi Liu, Yong Yu, Li-Hua Mo, Rong-Ti Ge, Huan-Ping Zhang, Zhi-Gang Liu, Peng-Yuan Zheng, et Ping-Chang Yang. 2016. « Regulation of TWIK-related potassium channel-1 (Trek1) restitutes intestinal epithelial barrier function ». *Cellular and Molecular Immunology* 13 (1): 110-18. doi:10.1038/cmi.2014.137.
- Huang, Shang-Ming, Chi-Hao Wu, et Gow-Chin Yen. 2006. « Effects of Flavonoids on the Expression of the Pro-Inflammatory Response in Human Monocytes Induced by Ligation of the Receptor for AGEs ». *Molecular Nutrition & Food Research* 50 (12): 1129-39. doi:10.1002/mnfr.200600075.
- Huang, Shurong, Jennifer M. Rutkowsky, Ryan G. Snodgrass, Kikumi D. Ono-Moore, Dina A. Schneider, John W. Newman, Sean H. Adams, et Daniel H. Hwang. 2012. « Saturated Fatty Acids Activate TLR-Mediated Proinflammatory Signaling Pathways ». *Journal of Lipid Research* 53 (9): 2002-13. doi:10.1194/jlr.D029546.
- Huang, Zhen, Zhenzhen Wang, Shanshan Long, Haoyang Jiang, Jiangning Chen, Junfeng Zhang, et Lei Dong. 2014. « A 3-D Artificial Colon Tissue Mimic for the Evaluation of Nanoparticle-Based Drug Delivery System ». *Molecular Pharmaceutics* 11 (7): 2051-61. doi:10.1021/mp400723j.
- Huet, C., C. Sahuquillo-Merino, E. Coudrier, et D. Louvard. 1987. « Absorptive and Mucus-Secreting Subclones Isolated from a Multipotent Intestinal Cell Line (HT-29) Provide New Models for Cell Polarity and Terminal Differentiation. » *The Journal of Cell Biology* 105 (1): 345-57. doi:10.1083/jcb.105.1.345.
- Imura, Yuki, Yasuyuki Asano, Kiichi Sato, et Etsuro Yoshimura. 2009. « A Microfluidic System to Evaluate Intestinal Absorption ». *Analytical Sciences* 25 (12): 1403-7. doi:10.2116/analsci.25.1403.
- Jaeggi, Tanja, Guus A. M. Kortman, Diego Moretti, Christophe Chassard, Penny Holding, Alexandra Dostal, Jos Boekhorst, et al. 2015. « Iron Fortification Adversely Affects the Gut Microbiome, Increases Pathogen Abundance and Induces Intestinal Inflammation in Kenyan Infants ». *Gut* 64 (5): 731-42. doi:10.1136/gutjnl-2014-307720.
- Jaffe, Aron B., Noriko Kaji, Joanne Durgan, et Alan Hall. 2008. « Cdc42 Controls Spindle Orientation to Position the Apical Surface during Epithelial Morphogenesis ». *The Journal of Cell Biology* 183 (4): 625-33. doi:10.1083/jcb.200807121.
- Jiang, Hai-Yue. 2013. «  $\kappa$ -carrageenan induces the disruption of intestinal epithelial Caco-2 monolayers by promoting the interaction between intestinal epithelial cells and immune cells ». *Molecular Medicine Reports* 8 (6): 1635-42. doi:10.3892/mmr.2013.1726.
- Johansson, Malin E. V., Mia Phillipson, Joel Petersson, Anna Velcich, Lena Holm, et Gunnar C. Hansson. 2008. « The Inner of the Two Muc2 Mucin-Dependent Mucus Layers in Colon

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Is Devoid of Bacteria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (39): 15064-69. doi:10.1073/pnas.0803124105.
- Juliet, Packiasamy A. R., Toshio Hayashi, Sumi Daigo, Hisako Matsui-Hirai, Asaka Miyazaki, Akiko Fukatsu, Jun Funami, Akihisa Iguchi, et Louis J. Ignarro. 2004. « Combined effect of testosterone and apocynin on nitric oxide and superoxide production in PMA-differentiated THP-1 cells ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1693 (3): 185-91. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.08.002.
- Juuti-Uusitalo, Kati, Leon J. Klunder, Klaas A. Sjollem, Katarina Mackovicova, Ryuichi Ohgaki, Dick Hoekstra, Jan Dekker, et Sven C. D. van IJzendoorn. 2011. « Differential Effects of TNF (TNFSF2) and IFN- $\gamma$  on Intestinal Epithelial Cell Morphogenesis and Barrier Function in Three-Dimensional Culture ». *PLoS ONE* 6 (8): e22967. doi:10.1371/journal.pone.0022967.
- Juuti-Uusitalo, Kati M., Katri Kaukinen, Markku Mäki, Jarno Tuimala, et Heikki Kainulainen. 2006. « Gene expression in TGF $\beta$ -induced epithelial cell differentiation in a three-dimensional intestinal epithelial cell differentiation model ». *BMC Genomics* 7: 279. doi:10.1186/1471-2164-7-279.
- Kamada, Nobuhiko, et Gabriel Núñez. 2014. « Regulation of the Immune System by the Resident Intestinal Bacteria ». *Gastroenterology, The Gut Microbiome in Health and Disease*, 146 (6): 1477-88. doi:10.1053/j.gastro.2014.01.060.
- Kamada, Nobuhiko, Sang-Uk Seo, Grace Y. Chen, et Gabriel Núñez. 2013. « Role of the Gut Microbiota in Immunity and Inflammatory Disease ». *Nature Reviews Immunology* 13 (5): 321-35. doi:10.1038/nri3430.
- Kang, Kyong-Hwa, Chang-Suk Kong, Youngwan Seo, Moon-Moo Kim, et Se-Kwon Kim. 2009. « Anti-inflammatory effect of coumarins isolated from *Corydalis heterocarpa* in HT-29 human colon carcinoma cells ». *Food and Chemical Toxicology* 47 (8): 2129-34. doi:10.1016/j.fct.2009.05.036.
- Kanzato, Hiroki, Mariko Manabe, et Makoto Shimizu. 2014. « An In Vitro Approach to the Evaluation of the Cross Talk between Intestinal Epithelium and Macrophages ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65 (2): 449-51. doi:10.1271/bbb.65.449.
- Kasper, Jennifer Y, Maria Iris Hermanns, Christian Cavelius, Annette Kraegeloh, Thomas Jung, Rolf Danzebrink, Ronald E Unger, et Charles James Kirkpatrick. 2016. « The role of the intestinal microvasculature in inflammatory bowel disease: studies with a modified Caco-2 model including endothelial cells resembling the intestinal barrier in vitro ». *International Journal of Nanomedicine* 11 (décembre): 6353-64. doi:10.2147/IJN.S92608.
- Kaulmann, Anouk, Christelle M. André, Yves-Jacques Schneider, Lucien Hoffmann, et Torsten Bohn. 2016. « Carotenoid and polyphenol bioaccessibility and cellular uptake from plum and cabbage varieties ». *Food Chemistry* 197, Part A (avril): 325-32. doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.049.
- Kaulmann, Anouk, Sylvain Legay, Yves-Jacques Schneider, Lucien Hoffmann, et Torsten Bohn. 2016. « Inflammation Related Responses of Intestinal Cells to Plum and Cabbage Digesta with Differential Carotenoid and Polyphenol Profiles Following Simulated Gastrointestinal Digestion ». *Molecular Nutrition & Food Research* 60 (5): 992-1005. doi:10.1002/mnfr.201500947.
- Kaulmann, Anouk, Tommaso Serchi, Jenny Renaut, Lucien Hoffmann, et Torsten Bohn. 2012. « Carotenoid exposure of Caco-2 intestinal epithelial cells did not affect selected inflammatory markers but altered their proteomic response ». *British Journal of Nutrition* 108 (06): 963-973. doi:10.1017/S0007114511006349.
- Kernéis, Sophie, Elise Caliot, Hiltrud Stubbe, Anna Bogdanova, Jean-Pierre Kraehenbuhl, et Eric Pringault. 2000. « Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using cocultures of epithelial and immune cells: a technical update ». *Microbes and Infection* 2 (9): 1119-24. doi:10.1016/S1286-4579(00)01266-1.
- Khor, Bernard, Agnès Gardet, et Ramnik J. Xavier. 2011. « Genetics and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease ». *Nature* 474 (7351): 307-17. doi:10.1038/nature10209.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Khosravi, Arya, et Sarkis K Mazmanian. 2013. « Disruption of the gut microbiome as a risk factor for microbial infections ». *Current Opinion in Microbiology*, Cell regulation, 16 (2): 221-27. doi:10.1016/j.mib.2013.03.009.
- Kim, Hyun Jung, Dongeun Huh, Geraldine Hamilton, et Donald E. Ingber. 2012. « Human Gut-on-a-Chip Inhabited by Microbial Flora That Experiences Intestinal Peristalsis-like Motions and Flow » 12 (12): 2165-74. doi:10.1039/C2LC40074J.
- Kim, Hyun Jung, et Donald E. Ingber. 2013. « Gut-on-a-Chip Microenvironment Induces Human Intestinal Cells to Undergo Villus Differentiation » 5 (9): 1130-40. doi:10.1039/C3IB40126J.
- Kim, Kyung-Mi, Yoo-Sun Kim, Ji Ye Lim, Soo Jin Min, Hee-Chul Ko, Se-Jae Kim, et Yuri Kim. 2015. « Intestinal Anti-Inflammatory Activity of *Sasa Quelpaertensis* Leaf Extract by Suppressing Lipopolysaccharide-Stimulated Inflammatory Mediators in Intestinal Epithelial Caco-2 Cells Co-Cultured with RAW 264.7 Macrophage Cells ». *Nutrition Research and Practice* 9 (1): 3. doi:10.4162/nrp.2015.9.1.3.
- Kim, Si Hyun, Meiyong Chi, Banya Yi, So Hyun Kim, Seunghan Oh, Younghoon Kim, Sungsu Park, et Jong Hwan Sung. 2014. « Three-Dimensional Intestinal Villi Epithelium Enhances Protection of Human Intestinal Cells from Bacterial Infection by Inducing Mucin Expression ». *Integrative Biology* 6 (12): 1122-31. doi:10.1039/C4IB00157E.
- Kimura, Hiroshi, Takatoki Yamamoto, Hitomi Sakai, Yasuyuki Sakai, et Teruo Fujii. 2008. « An Integrated Microfluidic System for Long-Term Perfusion Culture and on-Line Monitoring of Intestinal Tissue Models ». *Lab on a Chip* 8 (5): 741-46. doi:10.1039/B717091B.
- Kivit, Sander de, Els van Hoffen, Nicoline Korthagen, Johan Garssen, et Linette E. M. Willemsen. 2011. « Apical TLR ligation of intestinal epithelial cells drives a Th1-polarized regulatory or inflammatory type effector response in vitro ». *Immunobiology* 216 (4): 518-27. doi:10.1016/j.imbio.2010.08.005.
- Kleiveland, Charlotte R. 2015. « Peripheral Blood Mononuclear Cells ». In *The Impact of Food Bioactives on Health*, édité par Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, et Harry Wichers, 161-67. Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-16104-4\_15.
- Kolios, George, Vassilis Valatas, et Stephen G. Ward. 2004. « Nitric Oxide in Inflammatory Bowel Disease: A Universal Messenger in an Unsolved Puzzle ». *Immunology* 113 (4): 427-37. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01984.x.
- Kosińska, Agnieszka, et Wilfried Andlauer. 2012. « Cocoa polyphenols are absorbed in Caco-2 cell model of intestinal epithelium ». *Food Chemistry* 135 (3): 999-1005. doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.101.
- . 2013. « Modulation of tight junction integrity by food components ». *Food Research International* 54 (1): 951-60. doi:10.1016/j.foodres.2012.12.038.
- Kostic, Aleksandar D., Ramnik J. Xavier, et Dirk Gevers. 2014. « The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead ». *Gastroenterology* 146 (6): 1489-99. doi:10.1053/j.gastro.2014.02.009.
- Kuan, Shih-Fan, James C. Byrd, Carol B. Basbaum, et Young S. Kim. 1987. « Characterization of Quantitative Mucin Variants from a Human Colon Cancer Cell Line ». *Cancer Research* 47 (21): 5715-24.
- Langerholc, Tomaz, Petros A. Maragkoudakis, Jan Wollgast, Lidija Gradisnik, et Avrelija Cencic. 2011. « Novel and established intestinal cell line models – An indispensable tool in food science and nutrition ». *Trends in Food Science & Technology*, PathogenCombat – Unique achievements in the fight against pathogens, 22, Supplement 1 (novembre): S11-20. doi:10.1016/j.tifs.2011.03.010.
- Langhans, Sigrid A. 2018. « Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning ». *Frontiers in Pharmacology* 9. doi:10.3389/fphar.2018.00006.
- Laparra, José Moisés, Raymond P. Glahn, et Dennis D. Miller. 2009. « Different Responses of Fe Transporters in Caco-2/HT29-MTX Cocultures than in Independent Caco-2 Cell Cultures ». *Cell Biology International* 33 (9): 971-77. doi:10.1016/j.cellbi.2009.06.001.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lea, Tor. 2015. « Caco-2 Cell Line ». In *The Impact of Food Bioactives on Health*, édité par Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, et Harry Wichers, 103-11. Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-16104-4\_10.
- Lee, Sung Hee. 2015. « Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases ». *Intestinal Research* 13 (1): 11. doi:10.5217/ir.2015.13.1.11.
- Lefebvre, David E., Koen Venema, Lourdes Gombau, Luis G. Valerio Jr, Jayadev Raju, Genevieve S. Bondy, Hans Bouwmeester, et al. 2015. « Utility of models of the gastrointestinal tract for assessment of the digestion and absorption of engineered nanomaterials released from food matrices ». *Nanotoxicology* 9 (4): 523-42. doi:10.3109/17435390.2014.948091.
- Leibovitz, Albert, James C. Stinson, William B. McCombs, Cameron E. McCoy, Kenneth C. Mazur, et Nancy D. Mabry. 1976. « Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines ». *Cancer Research* 36 (12): 4562-69.
- Leonard, Fransisca, Hussain Ali, Eva-Maria Collnot, Bart J. Crielaard, Twan Lammers, Gert Storm, et Claus-Michael Lehr. 2012. « Screening of Budesonide Nanoformulations for Treatment of Inflammatory Bowel Disease in an Inflamed 3D Cell-Culture Model ». *Altex-Alternatives to Animal Experimentation* 29 (3): 275-85. doi:10.14573/altex.2012.3.275.
- Leonard, Fransisca, Eva-Maria Collnot, et Claus-Michael Lehr. 2010. « A Three-Dimensional Coculture of Enterocytes, Monocytes and Dendritic Cells To Model Inflamed Intestinal Mucosa in Vitro ». *Molecular Pharmaceutics* 7 (6): 2103-19. doi:10.1021/mp1000795.
- Lesuffleur, T., N. Porchet, J. P. Aubert, D. Swallow, J. R. Gum, Y. S. Kim, F. X. Real, et A. Zweibaum. 1993. « Differential Expression of the Human Mucin Genes MUC1 to MUC5 in Relation to Growth and Differentiation of Different Mucus-Secreting HT-29 Cell Subpopulations ». *Journal of Cell Science* 106 (3): 771-83.
- Lesuffleur, Thécla, Alain Barbat, Elisabeth Dussaulx, et Alain Zweibaum. 1990. « Growth Adaptation to Methotrexate of HT-29 Human Colon Carcinoma Cells Is Associated with Their Ability to Differentiate into Columnar Absorptive and Mucus-Secreting Cells ». *Cancer Research* 50 (19): 6334-43.
- Li, Na, Dandan Wang, Zhigang Sui, Xiaoyi Qi, Liyun Ji, Xiuli Wang, et Ling Yang. 2013. « Development of an Improved Three-Dimensional In Vitro Intestinal Mucosa Model for Drug Absorption Evaluation ». *Tissue Engineering Part C: Methods* 19 (9): 708-19. doi:10.1089/ten.tec.2012.0463.
- Liang, Guo Hua, et Christopher R. Weber. 2014. « Molecular aspects of tight junction barrier function ». *Current Opinion in Pharmacology, Gastrointestinal • Endocrine and metabolic diseases*, 19 (décembre): 84-89. doi:10.1016/j.coph.2014.07.017.
- Lin, S.d., et A.o. Chen. 1994. « Major Carotenoids in Juices of Ponkan Mandarin and Liucheng Orange ». *Journal of Food Biochemistry* 18 (4): 273-83. doi:10.1111/j.1745-4514.1994.tb00502.x.
- Liu, Ta-Chiang, et Thaddeus S. Stappenbeck. 2016. « Genetics and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease ». *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 11 (1): 127-48. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044152.
- Loftus Jr, Edward V. 2004. « Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences ». *Gastroenterology* 126 (6): 1504-17. doi:10.1053/j.gastro.2004.01.063.
- Lorenzo, Yolanda, Amaia Azqueta, Luisa Luna, Félix Bonilla, Gemma Domínguez, et Andrew R. Collins. 2009. « The Carotenoid  $\beta$ -Cryptoxanthin Stimulates the Repair of DNA Oxidation Damage in Addition to Acting as an Antioxidant in Human Cells ». *Carcinogenesis* 30 (2): 308-14. doi:10.1093/carcin/bgn270.
- Lundberg, Jon O., et Eddie Weitzberg. 2013. « Biology of Nitrogen Oxides in the Gastrointestinal Tract ». *Gut* 62 (4): 616-29. doi:10.1136/gutjnl-2011-301649.
- Maccaferri, Simone, Annett Klinder, Patrizia Brigidi, Piero Cavina, et Adele Costabile. 2012. « Potential Probiotic *Kluyveromyces Marxianus* B0399 Modulates the Immune Response in Caco-2 Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells and Impacts the Human Gut

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Microbiota in an In Vitro Colonic Model System ». *Applied and Environmental Microbiology* 78 (4): 956-64. doi:10.1128/AEM.06385-11.
- Madara, J. L., et K. Dharmasathaphorn. 1985. « Occluding Junction Structure-Function Relationships in a Cultured Epithelial Monolayer. » *The Journal of Cell Biology* 101 (6): 2124-33. doi:10.1083/jcb.101.6.2124.
- Mahler, Gretchen J., Mandy Brigitte Esch, Raymond P. Glahn, et Michel L. Shuler. 2009. « Characterization of a gastrointestinal tract microscale cell culture analog used to predict drug toxicity (PDF Download Available) ». *Biotechnology and Bioengineering* 104 (1): 193-205. doi:10.1002/bit.22366.
- Mahler, Gretchen J., Michael L. Shuler, et Raymond P. Glahn. 2009. « Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (7): 494-502. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.05.006.
- Makon-Sébastien, Njock Bastien, Fouchier Francis, Seree Eric, Villard Pierre Henri, Fran&#xe7, Landrier Jean Ois, et al. 2014. « Lycopene Modulates THP1 and Caco2 Cells Inflammatory State through Transcriptional and Nontranscriptional Processes, Lycopene Modulates THP1 and Caco2 Cells Inflammatory State through Transcriptional and Nontranscriptional Processes ». *Mediators of Inflammation, Mediators of Inflammation* 2014, 2014 (mai): e507272. doi:10.1155/2014/507272, 10.1155/2014/507272.
- Malefyt, R. de Waal, J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor, et J. E. de Vries. 1991. « Interleukin 10(IL-10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. » *Journal of Experimental Medicine* 174 (5): 1209-20. doi:10.1084/jem.174.5.1209.
- Mallon, Daniel P., et David L. Suskind. 2010. « Nutrition in Pediatric Inflammatory Bowel Disease ». *Nutrition in Clinical Practice* 25 (4): 335-39. doi:10.1177/0884533610373773.
- Manichanh, Chaysavanh, Natalia Borrueal, Francesc Casellas, et Francisco Guarner. 2012. « The Gut Microbiota in IBD ». *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 9 (10): 599-608. doi:10.1038/nrgastro.2012.152.
- Martins, Isabela M., Gabriela A. Macedo, Juliana A. Macedo, Bruna S. Roberto, Qianru Chen, Jeffrey B. Blumberg, et Chung-Yen Oliver Chen. 2017. « Tannase enhances the anti-inflammatory effect of grape pomace in Caco-2 cells treated with IL-1 $\beta$  ». *Journal of Functional Foods* 29 (février): 69-76. doi:10.1016/j.jff.2016.12.011.
- Maslowski, Kendle M., Angelica T. Vieira, Aylwin Ng, Jan Kranich, Frederic Sierro, Di Yu, Heidi C. Schilter, et al. 2009. « Regulation of Inflammatory Responses by Gut Microbiota and Chemoattractant Receptor GPR43 ». *Nature* 461 (7268): 1282-86. doi:10.1038/nature08530.
- Massironi, Sara, Roberta Elisa Rossi, Federica Alessandra Cavalcoli, Serena Della Valle, Mirella Fraquelli, et Dario Conte. 2013. « Nutritional deficiencies in inflammatory bowel disease: Therapeutic approaches ». *Clinical Nutrition* 32 (6): 904-10. doi:10.1016/j.clnu.2013.03.020.
- Matias, A., S. L. Nunes, J. Poejo, E. Mecha, A. T. Serra, Paulo J. Amorim Madeira, M. R. Bronze, et C. M. M. Duarte. 2014. « Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of a Flavonoid-Rich Concentrate Recovered from Opuntia Ficus-Indica Juice ». *Food & Function* 5 (12): 3269-80. doi:10.1039/C4FO00071D.
- Matsusaki, Michiya, Daichi Hikimoto, Akihiro Nishiguchi, Koji Kadowaki, Kayoko Ohura, Teruko Imai, et Mitsuru Akashi. 2015. « 3D-fibroblast tissues constructed by a cell-coat technology enhance tight-junction formation of human colon epithelial cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 457 (3): 363-69. doi:10.1016/j.bbrc.2014.12.118.
- McCracken, Kyle W., Jonathan C. Howell, James M. Wells, et Jason R. Spence. 2011. « Generating Human Intestinal Tissue from Pluripotent Stem Cells *in Vitro* ». *Nature Protocols* 6 (12): 1920-28. doi:10.1038/nprot.2011.410.
- McGuckin, Michael A., Rajaraman Eri, Lisa A. Simms, Timothy H.J. Florin, et Graham Radford-Smith. 2009. « Intestinal Barrier Dysfunction in Inflammatory Bowel Diseases ». *Inflammatory Bowel Diseases* 15 (1): 100-113. doi:10.1002/ibd.20539.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Meaney, C. M, et C. M O'Driscoll. 2000. « A comparison of the permeation enhancement potential of simple bile salt and mixed bile salt:fatty acid micellar systems using the CaCo-2 cell culture model ». *International Journal of Pharmaceutics* 207 (1): 21-30. doi:10.1016/S0378-5173(00)00526-3.
- Middendorp, Sabine, Kerstin Schneeberger, Caroline L. Wiegerinck, Michal Mokry, Ronald D. L. Akkerman, Simone van Wijngaarden, Hans Clevers, et Edward E. S. Nieuwenhuis. 2014. « Adult Stem Cells in the Small Intestine Are Intrinsically Programmed with Their Location-Specific Function ». *STEM CELLS* 32 (5): 1083-91. doi:10.1002/stem.1655.
- Mijač, Dragana D., Goran L. J. Janković, Jagoda Jorga, et Miodrag N. Krstić. 2010. « Nutritional status in patients with active inflammatory bowel disease: Prevalence of malnutrition and methods for routine nutritional assessment ». *European Journal of Internal Medicine* 21 (4): 315-19. doi:10.1016/j.ejim.2010.04.012.
- Molodecky, Natalie A., Ing Shian Soon, Doreen M. Rabi, William A. Ghali, Mollie Ferris, Greg Chernoff, Eric I. Benchimol, et al. 2012. « Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review ». *Gastroenterology* 142 (1): 46-54.e42. doi:10.1053/j.gastro.2011.10.001.
- Mori, Akira, Hideo Satsu, et Makoto Shimizu. 2003. « New Model for Studying the Migration of Immune Cells into Intestinal Epithelial Cell Monolayers ». *Cytotechnology* 43 (1-3): 57-64. doi:10.1023/B: CYTO.0000039910.30540.8f.
- Moyes, Siobhan M., John F. Morris, et Katharine E. Carr. 2010. « Macrophages Increase Microparticle Uptake by Enterocyte-like Caco-2 Cell Monolayers ». *Journal of Anatomy* 217 (6): 740-54. doi:10.1111/j.1469-7580.2010.01304.x.
- Murakami, H., et H. Masui. 1980. « Hormonal Control of Human Colon Carcinoma Cell Growth in Serum-Free Medium ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77 (6): 3464-68. doi:10.1073/pnas.77.6.3464.
- Narisawa, Tomio, Yoko Fukaura, Shunji Oshima, Takahiro Inakuma, Masamichi Yano, et Hoyoku Nishino. 1999. « Chemoprevention by the Oxygenated Carotenoid  $\beta$ -Cryptoxanthin of N-Methylnitrosourea-Induced Colon Carcinogenesis in F344 Rats ». *Japanese Journal of Cancer Research* 90 (10): 1061-65. doi:10.1111/j.1349-7006.1999.tb00677.x.
- Navabi, Nazanin, Michael A. McGuckin, et Sara K. Lindén. 2013. « Gastrointestinal Cell Lines Form Polarized Epithelia with an Adherent Mucus Layer when Cultured in Semi-Wet Interfaces with Mechanical Stimulation ». *PLOS ONE* 8 (7): e68761. doi:10.1371/journal.pone.0068761.
- Navarro, P., A.J. Pérez-López, M.T. Mercader, A.A. Carbonell-Barrachina, et J.A. Gabaldon. 2011. « Antioxidant Activity, Color, Carotenoids Composition, Minerals, Vitamin C and Sensory Quality of Organic and Conventional Mandarin Juice, Cv. Orogrande ». *Food Science and Technology International* 17 (3): 241-48. doi:10.1177/1082013210382334.
- Nerurkar, Manoj M., Philip S. Burton, et Ronald T. Borchardt. 1996. « The Use of Surfactants to Enhance the Permeability of Peptides Through Caco-2 Cells by Inhibition of an Apically Polarized Efflux System ». *Pharmaceutical Research* 13 (4): 528-34. doi:10.1023/A:1016033702220.
- Neurath, Markus F. 2014. « Cytokines in Inflammatory Bowel Disease ». *Nature Reviews Immunology* 14 (5): 329-42. doi:10.1038/nri3661.
- Ng, Siew C., Charles N. Bernstein, Morten H. Vatn, Peter Laszlo Lakatos, Edward V. Loftus, Curt Tysk, Colm O'Morain, Bjorn Moum, Jean-Frédéric Colombel, et on behalf of the Epidemiology and Natural History Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel Disease (ioibd). 2013. « Geographical Variability and Environmental Risk Factors in Inflammatory Bowel Disease ». *Gut* 62 (4): 630-49. doi:10.1136/gutjnl-2012-303661.
- Nichols, Jonathan M., Isabella Maiellaro, Joanne Abi-Jaoude, Silvana Curci, et Aldebaran M. Hofer. 2015. « "Store-operated" cAMP signaling contributes to Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> secretion in T84 colonic cells ». *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 309 (8): G670-79. doi:10.1152/ajpgi.00214.2015.
- Nolleaux, Géraldine, Christelle Devillé, Benaïssa El Moulaj, Willy Zorzi, Patricia Deloyer, Yves-Jacques Schneider, Olivier Peulen, et Guy Dandrifosse. 2006. « Development of a serum-

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- free co-culture of human intestinal epithelium cell-lines (Caco-2/HT29-5M21) ». *BMC Cell Biology* 7: 20. doi:10.1186/1471-2121-7-20.
- Nusrat, A., C. von Eichel-Streiber, J. R. Turner, P. Verkade, J. L. Madara, et C. A. Parkos. 2001. « Clostridium Difficile Toxins Disrupt Epithelial Barrier Function by Altering Membrane Microdomain Localization of Tight Junction Proteins ». *Infection and Immunity* 69 (3): 1329-36. doi:10.1128/IAI.69.3.1329-1336.2001.
- O'Hara, Jennifer R., et Andre G. Buret. 2008. « Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection ». *Frontiers in Bioscience* 13 (mai): 7008-21. doi:10.2741/3206.
- Ohnuma, T., H. Arkin, et J. F. Holland. 1986. « Effects of Cell Density on Drug-Induced Cell Kill Kinetics *in Vitro* (Inoculum Effect) ». *British Journal of Cancer* 54 (3): 415-21. doi:10.1038/bjc.1986.192.
- Olejnik, Anna, Katarzyna Kowalska, Mariola Olkowicz, Joanna Rychlik, Wojciech Juzwa, Kamila Myszk, Radosław Dembczyński, et Wojciech Białas. 2015. « Anti-inflammatory effects of gastrointestinal digested Sambucus nigra L. fruit extract analysed in co-cultured intestinal epithelial cells and lipopolysaccharide-stimulated macrophages ». *Journal of Functional Foods* 19, Part A (décembre): 649-60. doi:10.1016/j.jff.2015.09.064.
- O'Sullivan, Laurie, Lisa Ryan, et Nora O'Brien. 2007. « Comparison of the Uptake and Secretion of Carotene and Xanthophyll Carotenoids by Caco-2 Intestinal Cells ». *British Journal of Nutrition* 98 (1): 38-44. doi:10.1017/S000711450769446X.
- Otte, Jan-Michel, et Daniel K. Podolsky. 2004. « Functional Modulation of Enterocytes by Gram-Positive and Gram-Negative Microorganisms ». *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 286 (4): G613-26. doi:10.1152/ajpgi.00341.2003.
- Ou, G., V. Baranov, E. Lundmark, S. Hammarström, et M.-L. Hammarström. 2009. « Contribution of Intestinal Epithelial Cells to Innate Immunity of the Human Gut – Studies on Polarized Monolayers of Colon Carcinoma Cells ». *Scandinavian Journal of Immunology* 69 (2): 150-61. doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02208.x.
- Palatka, Károly, Zoltán Serfözö, Zoltán Veréb, Zoltán Hargitay, Bea Lontay, Ferenc Erdödi, Gáspár Bánfalvi, Zoltán Nemes, Miklós Udvardy, et István Altorjay. 2005. « Changes in the expression and distribution of the inducible and endothelial nitric oxide synthase in mucosal biopsy specimens of inflammatory bowel disease ». *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 40 (6): 670-80. doi:10.1080/00365520510015539.
- Pampaloni, Francesco, Emmanuel G. Reynaud, et Ernst H. K. Stelzer. 2007. « The Third Dimension Bridges the Gap between Cell Culture and Live Tissue ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (10): 839-45. doi:10.1038/nrm2236.
- Pandolfi, Franco, Rossella Cianci, Danilo Pagliari, Raffaele Landolfi, et Giovanni Cammarota. 2010. « Cellular Mediators of Inflammation: Tregs and TH17 Cells in Gastrointestinal Diseases ». *Mediators of Inflammation* 2009 (février): e132028. doi:10.1155/2009/132028.
- Parlesak, A., D. Haller, S. Brinz, A. Baeuerlein, et C. Bode. 2004. « Modulation of Cytokine Release by Differentiated CACO-2 Cells in a Compartmentalized Coculture Model with Mononuclear Leucocytes and Nonpathogenic Bacteria ». *Scandinavian Journal of Immunology* 60 (5): 477-85. doi:10.1111/j.0300-9475.2004.01495.x.
- Parlesak, Alexandr, Isabelle Negrier, Nathalie Neveux, Christiane Bode, et Luc Cynober. 2007. « Arginine Does Not Exacerbate Markers of Inflammation in Cocultures of Human Enterocytes and Leukocytes ». *The Journal of Nutrition* 137 (1): 106-11.
- Pinto, M., S. Robineleon, Md Appay, M. Kedingler, N. Triadou, E. Dussaulx, B. Lacroix, et al. 1983. « Enterocyte-Like Differentiation and Polarization of the Human-Colon Carcinoma Cell-Line Caco-2 in Culture ». *Biology of the Cell* 47 (3): 323-30.
- Ponce de León-Rodríguez, Maria Del Carmen, Jean-Pierre Guyot, et Caroline Laurent-Babot. 2018. « Intestinal *in Vitro* Cell Culture Models and Their Potential to Study the Effect of Food Components on Intestinal Inflammation ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, octobre, 1-19. doi:10.1080/10408398.2018.1506734.
- Pontier, Catherine, Jean Pachot, Roger Botham, Bernard Lenfant, et Philippe Arnaud. 2001. « HT29-MTX and Caco-2/TC7 Monolayers as Predictive Models for Human Intestinal

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Absorption: Role of the Mucus Layer ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90 (10): 1608-19. doi:10.1002/jps.1111.
- Poquet, Laure, Michael N. Clifford, et Gary Williamson. 2008. « Transport and Metabolism of Ferulic Acid through the Colonic Epithelium ». *Drug Metabolism and Disposition* 36 (1): 190-97. doi:10.1124/dmd.107.017558.
- Ramadan, Qasem, Hamideh Jafarpoorchekab, Chaobo Huang, Paolo Silacci, Sandro Carrara, Gözen Koklü, Julien Ghaye, et al. 2013. « NutriChip: Nutrition Analysis Meets Microfluidics ». *Lab on a Chip* 13 (2): 196-203. doi:10.1039/C2LC40845G.
- Ramadan, Qasem, et Lin Jing. 2016. « Characterization of Tight Junction Disruption and Immune Response Modulation in a Miniaturized Caco-2/U937 Coculture-Based in Vitro Model of the Human Intestinal Barrier ». *Biomedical Microdevices* 18 (1): 11. doi:10.1007/s10544-016-0035-5.
- Ranaldi, Giulia, Rosa Consalvo, Yula Sambuy, et Maria Laura Scarino. 2003. « Permeability characteristics of parental and clonal human intestinal Caco-2 cell lines differentiated in serum-supplemented and serum-free media ». *Toxicology in Vitro*, Twelfth International Workshop on In vitro Toxicology, 17 (5-6): 761-67. doi:10.1016/S0887-2333(03)00095-X.
- Raschke, W. C., S. Baird, P. Ralph, et I. Nakoinz. 1978. « Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus ». *Cell* 15 (1): 261-67. doi:10.1016/0092-8674(78)90101-0.
- Ravi, Maddaly, V. Paramesh, S.r. Kaviya, E. Anuradha, et F.D. Paul Solomon. 2015. « 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications ». *Journal of Cellular Physiology* 230 (1): 16-26. doi:10.1002/jcp.24683.
- Reboul, Emmanuelle. 2013. « Absorption of Vitamin A and Carotenoids by the Enterocyte: Focus on Transport Proteins ». *Nutrients* 5 (9): 3563-81. doi:10.3390/nu5093563.
- Reboul, Emmanuelle, Lydia Abou, Céline Mikail, Odette Ghiringhelli, Marc André, Henri Portugal, Dominique Jourdeuil-Rahmani, Marie-Josèphe Amiot, Denis Lairon, et Patrick Borel. 2005. « Lutein Transport by Caco-2 TC-7 Cells Occurs Partly by a Facilitated Process Involving the Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) ». *Biochemical Journal* 387 (2): 455-61. doi:10.1042/BJ20040554.
- Reboul, Emmanuelle, et Patrick Borel. 2011. « Proteins involved in uptake, intracellular transport and basolateral secretion of fat-soluble vitamins and carotenoids by mammalian enterocytes ». *Progress in Lipid Research* 50 (4): 388-402. doi:10.1016/j.plipres.2011.07.001.
- Reiff, Caroline, et Denise Kelly. 2010. « Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy ». *International Journal of Medical Microbiology*, Microbe-host interaction in chronic diseases, 300 (1): 25-33. doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.004.
- Reiling, Norbert, Artur J. Ulmer, Michael Duchrow, Martin Ernst, Hans-Dieter Flad, et Sunna Hauschildt. 1994. « Nitric Oxide Synthase: mRNA Expression of Different Isoforms in Human Monocytes/Macrophages ». *European Journal of Immunology* 24 (8): 1941-44. doi:10.1002/eji.1830240836.
- Rieux, Anne des, Virginie Fievez, Ivan Théate, Jan Mast, Véronique Prétat, et Yves-Jacques Schneider. 2007. « An improved in vitro model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells ». *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 30 (5): 380-91. doi:10.1016/j.ejps.2006.12.006.
- Rodríguez-Ramiro, Ildefonso, Sonia Ramos, Elvira López-Oliva, Angel Agis-Torres, Laura Bravo, Luis Goya, et Maria Angeles Martín. 2013. « Cocoa polyphenols prevent inflammation in the colon of azoxymethane-treated rats and in TNF- $\alpha$ -stimulated Caco-2 cells ». *British Journal of Nutrition* 110 (02): 206-215. doi:10.1017/S0007114512004862.
- Ryan, Sarah-Louise, Anne-Marie Baird, Gisela Vaz, Aaron J. Urquhart, hias Senge, Derek J. Richard, Kenneth J. O'Byrne, et Anthony M. Davies. 2016. « Drug Discovery Approaches Utilizing Three-Dimensional Cell Culture ». *ASSAY and Drug Development Technologies* 14 (1): 19-28. doi:10.1089/adt.2015.670.
- Saad, Bashar, Bernadette Soudah AbouAtta, Walid Basha, Alaa Hmade, Abdalsalam Kmail, Said Khasib, et Omar Said. 2011. « Hypericum Triquetrifolium—Derived Factors Downregulate

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- the Production Levels of LPS-Induced Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in THP-1 Cells ». Research article. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1093/ecam/nen056.
- Salerno-Goncalves, Rosângela, Alessio Fasano, et Marcelo B. Sztein. 2011. « Engineering of a multi-cellular organotypic model of the human intestinal mucosa ». *Gastroenterology* 141 (2): e18-20. doi:10.1053/j.gastro.2011.04.062.
- Samak, G., S. Aggarwal, et R. K. Rao. 2011. « ERK Is Involved in EGF-Mediated Protection of Tight Junctions, but Not Adherens Junctions, in Acetaldehyde-Treated Caco-2 Cell Monolayers ». *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 301 (1): G50-59. doi:10.1152/ajpgi.00494.2010.
- Sambuy, Y., I. De Angelis, G. Ranaldi, M. L. Scarino, A. Stammati, et F. Zucco. 2005. « The Caco-2 Cell Line as a Model of the Intestinal Barrier: Influence of Cell and Culture-Related Factors on Caco-2 Cell Functional Characteristics ». *Cell Biology and Toxicology* 21 (1): 1-26. doi:10.1007/s10565-005-0085-6.
- Sato, Toshiro, Daniel E. Stange, Marc Ferrante, Robert G. J. Vries, Johan H. van Es, Stieneke van den Brink, Winan J. van Houdt, et al. 2011. « Long-Term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium ». *Gastroenterology* 141 (5): 1762-72. doi:10.1053/j.gastro.2011.07.050.
- Satsu, Hideo, Yoko Ishimoto, Tomoko Nakano, Tetsunosuke Mochizuki, Toshihiko Iwanaga, et Makoto Shimizu. 2006. « Induction by activated macrophage-like THP-1 cells of apoptotic and necrotic cell death in intestinal epithelial Caco-2 monolayers via tumor necrosis factor- $\alpha$  ». *Experimental Cell Research* 312 (19): 3909-19. doi:10.1016/j.yexcr.2006.08.018.
- Saxena, Kapil, Sarah E. Blutt, Khalil Ettayebi, Xi-Lei Zeng, James R. Broughman, Sue E. Crawford, Umesh Karandikar, et al. 2015. « Human Intestinal Enteroids: A New Model to Study Human Rotavirus Infection, Host Restriction and Pathophysiology ». *Journal of Virology*, octobre, JVI.01930-15. doi:10.1128/JVI.01930-15.
- Saxena, Kapil, Lukas M. Simon, Xi-Lei Zeng, Sarah E. Blutt, Sue E. Crawford, Narayan P. Sastri, Umesh C. Karandikar, et al. 2017. « A Paradox of Transcriptional and Functional Innate Interferon Responses of Human Intestinal Enteroids to Enteric Virus Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, janvier, 201615422. doi:10.1073/pnas.1615422114.
- Schimpel, Christa, Birgit Teubl, Markus Absenger, Claudia Meindl, Eleonore Fröhlich, Gerd Leitinger, Andreas Zimmer, et Eva Roblegg. 2014. « Development of an Advanced Intestinal in Vitro Triple Culture Permeability Model To Study Transport of Nanoparticles ». *Molecular Pharmaceutics* 11 (3): 808-18. doi:10.1021/mp400507g.
- Schroeder, Rebecca A., et Paul C. Kuo. 1995. « Nitric Oxide: Physiology and Pharmacology ». *Anesthesia & Analgesia* 81 (5): 1052.
- Selby-Pham, Sophie N. B., Simone A. Osborne, Kate S. Howell, Frank R. Dunshea, et Louise E. Bennett. 2017. « Transport rates of dietary phytochemicals in cell monolayers is inversely correlated with absorption kinetics in humans ». *Journal of Functional Foods* 39 (décembre): 206-14. doi:10.1016/j.jff.2017.10.016.
- Sergent, Thérèse, Neil Piront, Julie Meurice, Olivier Toussaint, et Yves-Jacques Schneider. 2010. « Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium ». *Chemico-Biological Interactions* 188 (3): 659-67. doi:10.1016/j.cbi.2010.08.007.
- Shanahan, Fergus, et Eamonn M. M. Quigley. 2014. « Manipulation of the Microbiota for Treatment of IBS and IBD—Challenges and Controversies ». *Gastroenterology, The Gut Microbiome in Health and Disease*, 146 (6): 1554-63. doi:10.1053/j.gastro.2014.01.050.
- Sheehan, Donal, Carthage Moran, et Fergus Shanahan. 2015. « The Microbiota in Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Gastroenterology* 50 (5): 495-507. doi:10.1007/s00535-015-1064-1.
- Shim, Kyu-Young, Dongwook Lee, Jeonghun Han, Nam-Trung Nguyen, Sungsu Park, et Jong Hwan Sung. 2017. « Microfluidic Gut-on-a-Chip with Three-Dimensional Villi Structure ». *Biomedical Microdevices* 19 (2): 37. doi:10.1007/s10544-017-0179-y.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Shimizu, Makoto. 2010. « Interaction between Food Substances and the Intestinal Epithelium ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74 (2): 232-41. doi:10.1271/bbb.90730.
- . 2017. « Multifunctions of dietary polyphenols in the regulation of intestinal inflammation ». *Journal of Food and Drug Analysis, Dietary Natural Compounds*, 25 (1): 93-99. doi:10.1016/j.jfda.2016.12.003.
- Simonovic, Ivana, Jonathan Rosenberg, Athanasia Koutsouris, et Gail Hecht. 2000. « Enteropathogenic Escherichia Coli Dephosphorylates and Dissociates Occludin from Intestinal Epithelial Tight Junctions ». *Cellular Microbiology* 2 (4): 305-15. doi:10.1046/j.1462-5822.2000.00055.x.
- Smirnova, Marina G, John P Birchall, et Jeffrey P Pearson. 2000. « TNF-ALPHA IN THE REGULATION OF MUC5AC SECRETION: SOME ASPECTS OF CYTOKINE-INDUCED MUCIN HYPERSECRETION ON THE IN VITRO MODEL ». *Cytokine* 12 (11): 1732-36. doi:10.1006/cyto.2000.0763.
- Smith, Patrick M., Michael R. Howitt, Nicolai Panikov, Monia Michaud, Carey Ann Gallini, Mohammad Bohlooly-Y, Jonathan N. Glickman, et Wendy S. Garrett. 2013. « The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis ». *Science* 341 (6145): 569-73. doi:10.1126/science.1241165.
- Somchit, Mayura, Chatchawan Changtam, Rungruedi Kimseng, Tanyarath Utaipan, Monthon Lertcanawanichakul, Apichart Suksamrarn, et Warangkana Chunglok. 2014. « Demethoxycurcumin from Curcuma longa rhizome suppresses iNOS induction in an in vitro inflamed human intestinal mucosa model ». *Asian Pac J Cancer Prev* 15 (4): 1807-1810.
- Spence, Jason R., Christopher N. Mayhew, Scott A. Rankin, Matthew F. Kuhar, Jefferson E. Vallance, Kathryn Tolle, Elizabeth E. Hoskins, et al. 2011. « Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Intestinal Tissue *in Vitro* ». *Nature* 470 (7332): 105-9. doi:10.1038/nature09691.
- Spring, Kenneth R. 1998. « Routes and Mechanism of Fluid Transport by Epithelia ». *Annual Review of Physiology* 60 (1): 105-19. doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.105.
- Strober, Warren, Ivan J. Fuss, et Richard S. Blumberg. 2002. « The Immunology of Mucosal Models of Inflammation ». *Annual Review of Immunology* 20 (1): 495-549. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064816.
- Susewind, Julia, Cristiane de Souza Carvalho-Wodarz, Urska Repnik, Eva-Maria Collnot, Nicole Schneider-Daum, Gareth Wyn Griffiths, et Claus-Michael Lehr. 2016. « A 3D co-culture of three human cell lines to model the inflamed intestinal mucosa for safety testing of nanomaterials ». *Nanotoxicology* 10 (1): 53-62. doi:10.3109/17435390.2015.1008065.
- Suzuki, Manabu, Tadakazu Hisamatsu, et Daniel K. Podolsky. 2003. « Gamma Interferon Augments the Intracellular Pathway for Lipopolysaccharide (LPS) Recognition in Human Intestinal Epithelial Cells through Coordinated Up-Regulation of LPS Uptake and Expression of the Intracellular Toll-Like Receptor 4-MD-2 Complex ». *Infection and Immunity* 71 (6): 3503-11. doi:10.1128/IAI.71.6.3503-3511.2003.
- Suzuki, Takuya. 2012. « Regulation of Intestinal Epithelial Permeability by Tight Junctions ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (4): 631-59. doi:10.1007/s00018-012-1070-x.
- Suzuki, Takuya, Soichi Tanabe, et Hiroshi Hara. 2011. « Kaempferol Enhances Intestinal Barrier Function through the Cytoskeletal Association and Expression of Tight Junction Proteins in Caco-2 Cells ». *The Journal of Nutrition* 141 (1): 87-94. doi:10.3945/jn.110.125633.
- Tanaka, Takuji, Takahiro Tanaka, Mayu Tanaka, et Toshiya Kuno. 2012. « Cancer Chemoprevention by Citrus Pulp and Juices Containing High Amounts of  $\beta$ -Cryptoxanthin and Hesperidin ». *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2012: 516981. doi:10.1155/2012/516981.
- Tang, Jun, Patrice Bouyer, Andreas Mykoniatis, Mary Buschmann, Karl S. Matlin, et Jeffrey B. Matthews. 2010. « Activated PKC $\delta$  and PKC $\epsilon$  Inhibit Epithelial Chloride Secretion Response to cAMP via Inducing Internalization of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> Cotransporter NKCC1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (44): 34072-85. doi:10.1074/jbc.M110.137380.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Tanoue, Takeshi, Yosuke Nishitani, Kazuki Kanazawa, Takashi Hashimoto, et Masashi Mizuno. 2008. « In vitro model to estimate gut inflammation using co-cultured Caco-2 and RAW264.7 cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 374 (3): 565-69. doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.063.
- Tolkien, Zoe, Lynne Stecher, Adrian P. Mander, Dora I. A. Pereira, et Jonathan J. Powell. 2015. « Ferrous Sulfate Supplementation Causes Significant Gastrointestinal Side-Effects in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *PLoS ONE* 10 (2): e0117383. doi:10.1371/journal.pone.0117383.
- Tom, Baldwin H., Lynne P. Rutzky, Milda M. Jakstys, Ryoichi Oyasu, Celia I. Kaye, et Barry D. Kahan. 1976. « Human Colonic Adenocarcinoma Cells ». *In Vitro* 12 (3): 180-91. doi:10.1007/BF02796440.
- Tsuchiya, Shigeru, Michiko Yamabe, Yoshiko Yamaguchi, Yasuko Kobayashi, Tasuke Konno, et Keiya Tada. 1980. « Establishment and Characterization of a Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1) ». *International Journal of Cancer* 26 (2): 171-76. doi:10.1002/ijc.2910260208.
- Turco, Laura, Tiziana Catone, Francesca Caloni, Emma Di Consiglio, Emanuela Testai, et Annalaura Stamatii. 2011. « Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: How reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? » *Toxicology in Vitro* 25 (1): 13-20. doi:10.1016/j.tiv.2010.08.009.
- Turner, Jerrold R. 2006. « Molecular Basis of Epithelial Barrier Regulation: From Basic Mechanisms to Clinical Application ». *The American Journal of Pathology* 169 (6): 1901-9. doi:10.2353/ajpath.2006.060681.
- . 2009. « Intestinal Mucosal Barrier Function in Health and Disease ». *Nature Reviews Immunology* 9 (11): 799-809. doi:10.1038/nri2653.
- Turpin, Williams, Christèle Humblot, Marie-Louise Noordine, Muriel Thomas, et Jean-Pierre Guyot. 2012. « Lactobacillaceae and Cell Adhesion: Genomic and Functional Screening ». *PLoS ONE* 7 (5): e38034. doi:10.1371/journal.pone.0038034.
- Tyrer, Peter C., Elaine G. Bean, A. Ruth Foxwell, et Paul Pavli. 2011. « Effects of bacterial products on enterocyte-macrophage interactions in vitro ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 413 (2): 336-41. doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.100.
- Tyrer, Peter, A Ruth Foxwell, Jennelle Kyd, Matthew Harvey, Phillip Sizer, et Allan Cripps. 2002. « Validation and quantitation of an in vitro M-cell model ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299 (3): 377-83. doi:10.1016/S0006-291X(02)02631-1.
- Ustunol, Z., et C. Wong. 2010. « Effect of nonfat dry milk and major whey components on interleukin-6 and interleukin-8 production in human intestinal epithelial-like Caco-2 cells ». *Journal of Dairy Science* 93 (6): 2311-14. doi:10.3168/jds.2009-2607.
- Utech, Markus, Andrei I. Ivanov, Stanislav N. Samarin, Matthias Bruewer, Jerrold R. Turner, Randall J. Mrsny, Charles A. Parkos, et Asma Nusrat. 2005. « Mechanism of IFN- $\gamma$ -Induced Endocytosis of Tight Junction Proteins: Myosin II-Dependent Vacuolarization of the Apical Plasma Membrane ». *Molecular Biology of the Cell* 16 (10): 5040-52. doi:10.1091/mbc.E05-03-0193.
- Vachon, Ph, et Jf Beaulieu. 1992. « Transient Mosaic Patterns of Morphological and Functional-Differentiation in the Caco-2 Cell-Line ». *Gastroenterology* 103 (2): 414-23. doi:10.1016/0016-5085(92)90829-n.
- Vagianos, Kathy, Savita Bector, Joseph McConnell, et Charles N. Bernstein. 2007. « Nutrition Assessment of Patients With Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 31 (4): 311-19. doi:10.1177/0148607107031004311.
- Vamadevan, Arunan S., Masayuki Fukata, Elizabeth T. Arnold, Lisa S. Thomas, David Hsu, et Maria T. Abreu. 2010. « Regulation of Toll-like Receptor 4-Associated MD-2 in Intestinal Epithelial Cells: A Comprehensive Analysis ». *Innate Immunity* 16 (2): 93-103. doi:10.1177/1753425909339231.
- Van De Walle, Jacqueline, Aurélie Hendrickx, Béatrice Romier, Yvan Larondelle, et Yves-Jacques Schneider. 2010. « Inflammatory parameters in Caco-2 cells: Effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation ». *Toxicology in Vitro* 24 (5): 1441-49. doi:10.1016/j.tiv.2010.04.002.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Van Itallie, Christina M., et James M. Anderson. 2006. « Claudins and Epithelial Paracellular Transport ». *Annual Review of Physiology* 68 (1): 403-29. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040104.131404.
- Van Seuningen, Isabelle, Pascal Pigny, Michaël Perrais, Nicole Porchet, et Jean-Pierre Aubert. 2001. « Transcriptional regulation of the 11p15 mucin genes. Towards new biological tools in human therapy, in inflammatory diseases and cancer ». *Front Biosci* 6: D1216–D1234.
- VanDussen, Kelli L., Jeffrey M. Marinshaw, Nurmohammad Shaikh, Hiroyuki Miyoshi, Clara Moon, Phillip I. Tarr, Matthew A. Ciorba, et Thaddeus S. Stappenbeck. 2014. « Development of an Enhanced Human Gastrointestinal Epithelial Culture System to Facilitate Patient-Based Assays ». *Gut*, juillet, gutjnl-2013-306651. doi:10.1136/gutjnl-2013-306651.
- Vergères, Guy, Biljana Bogicevic, Caroline Buri, Sandro Carrara, Magali Chollet, Linda Corbino-Giunta, Lotti Egger, et al. 2012. « The NutriChip project – translating technology into nutritional knowledge ». *British Journal of Nutrition* 108 (5): 762-68. doi:10.1017/S0007114512002693.
- Viallard, V., C. Denis, V. Trocheris, et J. C. Murat. 1986. « Effect of glutamine deprivation and glutamate or ammonium chloride addition on growth rate, metabolism and differentiation of human colon cancer cell-line HT29 ». *International Journal of Biochemistry* 18 (3): 263-69. doi:10.1016/0020-711X(86)90116-3.
- Vieira, Erica L. M., Alda J. Leonel, Alexandre P. Sad, Nathália R. M. Beltrão, Thaís F. Costa, Talita M. R. Ferreira, Ana C. Gomes-Santos, et al. 2012. « Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 23 (5): 430-36. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.01.007.
- Viladomiu, Monica, Raquel Hontecillas, Lijuan Yuan, Pinyi Lu, et Josep Bassaganya-Riera. 2013. « Nutritional protective mechanisms against gut inflammation ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24 (6): 929-39. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.01.006.
- Vindigni, Stephen M., Timothy L. Zisman, David L. Suskind, et Christopher J. Damman. 2016. « The Intestinal Microbiome, Barrier Function, and Immune System in Inflammatory Bowel Disease: A Tripartite Pathophysiological Circuit with Implications for New Therapeutic Directions ». *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 9 (4): 606-25. doi:10.1177/1756283X16644242.
- Wallace, Donald G, et Joel Rosenblatt. 2003. « Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Collagen in drug delivery and tissue engineering, 55 (12): 1631-49. doi:10.1016/j.addr.2003.08.004.
- Walters, William A., Zech Xu, et Rob Knight. 2014. « Meta-Analyses of Human Gut Microbes Associated with Obesity and IBD ». *FEBS Letters* 588 (22): 4223-33. doi:10.1016/j.febslet.2014.09.039.
- Wang, Fengjun, W. Vallen Graham, Yingmin Wang, Edwina D. Witkowski, Brad T. Schwarz, et Jerrold R. Turner. 2005. « Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Synergize to Induce Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Up-Regulating Myosin Light Chain Kinase Expression ». *The American Journal of Pathology* 166 (2): 409-19. doi:10.1016/s0002-9440(10)62264-x.
- Wang, Fu-Cai. 2015. « Overexpression of HMGB1 A-Box Reduced Lipopolysaccharide-Induced Intestinal Inflammation via HMGB1/TLR4 Signaling *in Vitro* ». *World Journal of Gastroenterology* 21 (25): 7764. doi:10.3748/wjg.v21.i25.7764.
- Wang, Qing, Min Xia, Chi Liu, Honghui Guo, Qingyuan Ye, Yan Hu, Yinghui Zhang, et al. 2008. « Cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside inhibits iNOS and COX-2 expression by inducing liver X receptor alpha activation in THP-1 macrophages ». *Life Sciences* 83 (5): 176-84. doi:10.1016/j.lfs.2008.05.017.
- Watson, Christopher J., Catherine J. Hoare, David R. Garrod, Gordon L. Carlson, et Geoffrey Warhurst. 2005. « Interferon- $\gamma$  Selectively Increases Epithelial Permeability to Large Molecules by Activating Different Populations of Paracellular Pores ». *Journal of Cell Science* 118 (22): 5221-30. doi:10.1242/jcs.02630.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Watt, F. M. 1988. « Effect of Seeding Density on Stability of the Differentiated Phenotype of Pig Articular Chondrocytes in Culture ». *Journal of Cell Science* 89 (3): 373-78.
- Węglarz, Ludmiła, Joanna Wawszczyk, Arkadiusz Orchel, Marzena Jaworska-Kik, et Zofia Dzierżewicz. 2006. « Phytic Acid Modulates In Vitro IL-8 and IL-6 Release from Colonic Epithelial Cells Stimulated with LPS and IL-1 $\beta$  ». *Digestive Diseases and Sciences* 52 (1): 93-102. doi:10.1007/s10620-006-9320-0.
- Wehkamp, Jan, Michael Schmid, Klaus Fellermann, et Eduard F. Stange. 2005. « Defensin Deficiency, Intestinal Microbes, and the Clinical Phenotypes of Crohn's Disease ». *Journal of Leukocyte Biology* 77 (4): 460-65. doi:10.1189/jlb.0904543.
- Williams, Katherine M., Kuppan Gokulan, Carl E. Cerniglia, et Sangeeta Khare. 2016. « Size and dose dependent effects of silver nanoparticle exposure on intestinal permeability in an in vitro model of the human gut epithelium ». *Journal of Nanobiotechnology* 14 (juillet). doi:10.1186/s12951-016-0214-9.
- Wojtal, Kacper A., Lutz Wolfram, Isabelle Frey-Wagner, Silvia Lang, Michael Scharl, Stephan R. Vavricka, et Gerhard Rogler. 2013. « The effects of vitamin A on cells of innate immunity in vitro ». *Toxicology in Vitro* 27 (5): 1525-32. doi:10.1016/j.tiv.2013.03.013.
- Wu, Chi-Hao, Hsiao-Wen Huang, Jer-An Lin, Shang-Ming Huang, et Gow-Chin Yen. 2011. « The proglycation effect of caffeic acid leads to the elevation of oxidative stress and inflammation in monocytes, macrophages and vascular endothelial cells ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 22 (6): 585-94. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.05.002.
- Wu, Gary D., Jun Chen, Christian Hoffmann, Kyle Bittinger, Ying-Yu Chen, Sue A. Keilbaugh, Meenakshi Bewtra, et al. 2011. « Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes ». *Science* 334 (6052): 105-8. doi:10.1126/science.1208344.
- Wu, Zhipan, Rongfa Guan, Miao Tao, Fei Lyu, Guozhou Cao, Mingqi Liu, et Jianguo Gao. 2017. « Assessment of the Toxicity and Inflammatory Effects of Different-Sized Zinc Oxide Nanoparticles in 2D and 3D Cell Cultures ». *RSC Advances* 7 (21): 12437-45. doi:10.1039/C6RA27334C.
- Xu, Caina, Chengbo Yang, Yongguang Yin, Jingbo Liu, et Yoshinori Mine. 2012. « Phosphopeptides (PPPs) from hen egg yolk phosvitin exert anti-inflammatory activity via modulation of cytokine expression ». *Journal of Functional Foods* 4 (4): 718-26. doi:10.1016/j.jff.2012.04.011.
- Yamazaki, Yuji, Reitaro Tokumasu, Hiroshi Kimura, Sachiko Tsukita, et Keith E. Mostov. 2011. « Role of claudin species-specific dynamics in reconstitution and remodeling of the zonula occludens ». *Molecular Biology of the Cell* 22 (9): 1495-1504. doi:10.1091/mbc.e10-12-1003.
- Yasumatsu, Hatsumi, et Soichi Tanabe. 2010. « The casein peptide Asn-Pro-Trp-Asp-Gln enforces the intestinal tight junction partly by increasing occludin expression in Caco-2 cells ». *British Journal of Nutrition* 104 (07): 951-956. doi:10.1017/S0007114510001698.
- Yi, Jinsoo, Tine A. Knudsen, Anne-Louise Nielsen, Lars Duelund, Morten Christensen, Pablo Hervella, David Needham, et Ole G. Mouritsen. 2016. « Inhibition of cholesterol transport in an intestine cell model by pine-derived phytosterols ». *Chemistry and Physics of Lipids* 200 (octobre): 62-73. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.06.008.
- Yu, Jiajie, Songming Peng, Dan Luo, et John C. March. 2012. « In Vitro 3D Human Small Intestinal Villous Model for Drug Permeability Determination ». *Biotechnology and Bioengineering* 109 (9): 2173-78. doi:10.1002/bit.24518.
- Zachos, Nicholas C., Olga Kovbasnjuk, Jennifer Foulke-Abel, Julie In, Sarah E. Blutt, Hugo R. De Jonge, Mary K. Estes, et Mark Donowitz. 2015. « Human Enteroids/Colonoids and Intestinal Organoids Functionally Recapitulate Normal Intestinal Physiology and Pathophysiology ». *Journal of Biological Chemistry*, décembre, jbc.R114.635995. doi:10.1074/jbc.R114.635995.
- Zen, Yoh, Kenichi Harada, Motoko Sasaki, Koichi Tsuneyama, Kazuyoshi Katayanagi, Yui Yamamoto, et Yasuni Nakanuma. 2002. « Lipopolysaccharide Induces Overexpression of MUC2 and MUC5AC in Cultured Biliary Epithelial Cells: Possible Key Phenomenon of Hepatolithiasis ». *The American Journal of Pathology* 161 (4): 1475-84. doi:10.1016/S0002-9440(10)64423-9.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Zhang, Hua, Yousef I. Hassan, Justin Renaud, Ronghua Liu, Cheng Yang, Yong Sun, et Rong Tsao. 2017. « Bioaccessibility, Bioavailability, and Anti-Inflammatory Effects of Anthocyanins from Purple Root Vegetables Using Mono- and Co-Culture Cell Models ». *Molecular Nutrition & Food Research* 61 (10): n/a-n/a. doi:10.1002/mnfr.201600928.
- Zhang, Xiaomei, Jun Cao, et Laifu Zhong. 2009. « Hydroxytyrosol Inhibits Pro-Inflammatory Cytokines, INOS, and COX-2 Expression in Human Monocytic Cells ». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 379 (6): 581. doi:10.1007/s00210-009-0399-7.
- Zimmer, J., B. Lange, J.-S. Frick, H. Sauer, K. Zimmermann, A. Schwiertz, K. Rusch, S. Klosterhalfen, et P. Enck. 2012. « A Vegan or Vegetarian Diet Substantially Alters the Human Colonic Faecal Microbiota ». *European Journal of Clinical Nutrition* 66 (1): 53-60. doi:10.1038/ejcn.2011.141.
- Zimmermann, Michael B., Christophe Chassard, Fabian Rohner, Eliézer K. N'Goran, Charlemagne Nindjin, Alexandra Dostal, Jürg Utzinger, Hala Ghattas, Christophe Lacroix, et Richard F. Hurrell. 2010. « The Effects of Iron Fortification on the Gut Microbiota in African Children: A Randomized Controlled Trial in Côte d'Ivoire ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 92 (6): 1406-15. doi:10.3945/ajcn.110.004564.
- Zoumpopoulou, Georgia, Effie Tsakalidou, Joelle Dewulf, Bruno Pot, et Corinne Grangette. 2009. « Differential crosstalk between epithelial cells, dendritic cells and bacteria in a co-culture model ». *International Journal of Food Microbiology*, 15th Meeting of the Club des Bactéries Lactiques, 131 (1): 40-51. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.037.
- Zucco, F., A. F. Batto, G. Bises, J. Chambaz, A. Chiusolo, R. Consalvo, H. Cross, et al. 2005. « An Inter-Laboratory Study to Evaluate the Effects of Medium Composition on the Differentiation and Barrier Function of Caco-2 Cell Lines ». *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* 33 (6): 603-18.
- Zweibaum, Alain, Marc Laburthe, Etienne Grasset, et Daniel Louvard. 2011. « Use of Cultured Cell Lines in Studies of Intestinal Cell Differentiation and Function ». In *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.cp060407/abstract>.
- Zweibaum, Alain, Moïse Pinto, Guillemette Chevalier, Elisabeth Dussaulx, Nicole Triadou, Brigitte Lacroix, Katy Haffen, Jean-Louis Brun, et Monique Rousset. 1985. « Enterocytic Differentiation of a Subpopulation of the Human Colon Tumor Cell Line HT-29 Selected for Growth in Sugar-Free Medium and Its Inhibition by Glucose ». *Journal of Cellular Physiology* 122 (1): 21-29. doi:10.1002/jcp.1041220105.

## LISTE DE FIGURES

<b>Figure 1.</b> Systèmes de culture cellulaire.	25
<b>Figure 2.</b> Protocole expérimental de stimulation inflammatoire en monocultures de THP-1.	25
<b>Figure 3.</b> Protocole expérimental de stimulation inflammatoire en co-culture Caco-2 TC7 / THP-1.	26
<b>Figure 4.</b> Protocole expérimentale de biculture Caco-2 TC7 / HT29MTX.	26
<b>Figure 5.</b> Protocole expérimental de stimulation inflammatoire du modèle de tri-culture.	28
<b>Figure 6.</b> Production de TNF- $\alpha$ par les THP-1 mesurée dans le surnageant.	38
<b>Figure 7.</b> Production de cytokines pro-inflammatoires mesurée après 4 et 24h dans les surnageants du modèle de co-culture (Caco-2 TC7 / THP-1).	39
<b>Figure 8.</b> Observation au microscope optique inversé du mucus après coloration au bleu Alcian.	41
<b>Figure 9.</b> Observations microscopiques (63x) de coupes histologiques de la biculture cellulaire.	42
<b>Figure 10.</b> Marquage immunofluorescent de la mucine MUC5AC.	43
<b>Figure 11.</b> Activité de la lactate déshydrogénase dans les surnageants (compartiment apical ou basal) du modèle de tri-culture après faible stimulation.	44
<b>Figure 12.</b> Suivi de la résistance électrique transépithéliale (TEER) tout au long de la différenciation et pendant les expériences de stimulation à faible dose.	44
<b>Figure 13.</b> Transport paracellulaire du rouge de phénol, exprimé en perméabilité apparente dans les différents types d'associations cellulaires à 2 temps de diffusion et à faible dose de stimulation.	45
<b>Figure 14.</b> Transport paracellulaire du rouge de phénol, exprimé en perméabilité apparente dans la tri-culture (Caco-2 TC7 / HT29MTX / THP-1) à faible dose de stimulation et en présence de dexaméthasone.	45
<b>Figure 15.</b> Marquage immunofluorescent de la claudine, protéine constitutive du complexe AJC.	46
<b>Figure 16.</b> Marquage immunofluorescent de l'occludine, protéine constitutive du complexe AJC.	47
<b>Figure 17.</b> Marquage immunofluorescent de ZO-1, protéine constitutive du complexe AJC.	48
<b>Figure 18.</b> Production de cytokines pro-inflammatoires dans le modèle de tri-culture stimulé à faible dose de LPS/IFN $\gamma$ .	49
<b>Figure 19.</b> Effet de la dexaméthasone sur la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires (THP-1) dans le modèle non stimulé et stimulé à faible dose de LPS/IFN $\gamma$ .	50
<b>Figure 20.</b> Expression des gènes codant pour l'iNOS et la COX-2 dans le modèle de tri-culture stimulé à faible dose de LPS/IFN $\gamma$ .	51
<b>Figure 21.</b> Expression des gènes codant pour les cytokines pro (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8) et anti-inflammatoires (IL-10) dans le modèle de tri-culture stimulé à faible dose de LPS/IFN $\gamma$ .	52
<b>Figure 22.</b> Activité de la lactate déshydrogénase dans les surnageants (compartiment apical ou basal) du modèle de tri-culture après forte stimulation.	53
<b>Figure 23.</b> Suivi de la résistance électrique transépithéliale (TEER) tout au long de la différenciation et pendant les expériences de stimulation à forte dose.	54
<b>Figure 24.</b> Transport paracellulaire du rouge de phénol, exprimé en perméabilité apparente dans les différents types d'associations cellulaires à 2 temps de diffusion et à forte dose de stimulation.	54
<b>Figure 25.</b> Transport paracellulaire du rouge de phénol, exprimé en perméabilité apparente dans la tri-culture (Caco-2 TC7 / HT29MTX / THP-1) à forte dose de stimulation et en présence de dexaméthasone.	55
<b>Figure 26.</b> Production de cytokines pro-inflammatoires dans le modèle de tri-culture stimulé à forte dose de LPS/IFN $\gamma$ .	56
<b>Figure 27.</b> Effet de la dexaméthasone sur la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires (THP-1) dans le modèle non stimulé et stimulé à forte dose de LPS/IFN $\gamma$ .	56
<b>Figure 28.</b> Expression des gènes codant pour l'iNOS et la COX-2 dans le modèle de tri-culture stimulé à forte dose de LPS/IFN $\gamma$ .	57
<b>Figure 29.</b> Expression des gènes codant pour les cytokines pro (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8) et anti-inflammatoires (IL-10) dans le modèle de tri-culture stimulé à forte dose de LPS/IFN $\gamma$ .	58
<b>Figure 30.</b> Activité de la lactate déshydrogénase dans les surnageants (compartiment apical ou basal) du modèle de tri-culture stimulé en présence des micelles contenant la BCX ou des micelles Tween-40.	59

<b>Figure 31.</b> Production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires (THP-1) dans le modèle de tri-culture stimulé en présence (20h) des micelles contenant la BCX ou des micelles Tween-40.	60
<b>Figure 32.</b> Activité de la lactate déshydrogénase dans les surnageants (compartiment apical ou basal) du modèle de tri-culture stimulé en présence (20h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques.	61
<b>Figure 33.</b> Transport paracellulaire du rouge de phénol, exprimé en perméabilité apparente dans la tri-culture stimulée (Caco-2 TC7 / HT29MTX / THP-1) en présence (20h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques.	61
<b>Figure 34.</b> Production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires (THP-1) dans le modèle de tri-culture stimulé en présence (20h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques.	62
<b>Figure 35.</b> Expression des gènes codant pour l'iNOS et la COX-2 dans le modèle de tri-culture stimulé en présence (20h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques.	63
<b>Figure 36.</b> Expression des gènes codant pour cytokines pro (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8) et anti-inflammatoires (IL-10) dans le modèle de tri-culture stimulé en présence (20h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques.	64
<b>Figure 37.</b> Activité de la lactate déshydrogénase dans les surnageants (compartiment apical ou basal) du modèle de tri-culture stimulé en présence (2h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques.	66
<b>Figure 38.</b> Transport paracellulaire du rouge de phénol, exprimé en perméabilité apparente dans la tri-culture stimulée (Caco-2 TC7 / HT29MTX / THP-1) en présence (2h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques.	66
<b>Figure 39.</b> Production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires (THP-1) dans le modèle de tri-culture stimulé en présence (2h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques.	67
<b>Figure 40.</b> Expression des gènes codant pour l'iNOS et la COX-2 dans le modèle de tri-culture stimulé en présence (2h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques.	68
<b>Figure 41.</b> Expression des gènes codant pour cytokines pro (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8) et anti-inflammatoires (IL-10) dans le modèle de tri-culture stimulé en présence (2h) des micelles contenant la BCX ou des micelles physiologiques.	69

## LISTE DE TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Conditions de culture et de stimulation pour les essais préliminaires sur les THP-1.	25
<b>Tableau 2.</b> Conditions de culture et de stimulation du modèle de tri-culture.	27
<b>Tableau 3.</b> Anticorps pour immunomarquage.	32
<b>Tableau 4.</b> Conditions de la RT-qPCR pour la quantification d'ARN exprimé par les cellules.	33
<b>Tableau 5.</b> Couples d'amorces utilisés pour mesurer l'expression génique des marqueurs de l'inflammation dans les cellules intestinales et immunitaires.	33
<b>Tableau 6.</b> Absorption des micelles artificielles contenant la BCX à travers la monocouche épithéliale dans les différents modèles.	60
<b>Tableau 7.</b> Absorption des micelles physiologiques contenant la BCX à travers la monocouche épithéliale dans les différents modèles.	65

