



Université de Sherbrooke

**Rôles de la protéine tyrosine phosphatase SHP-2 dans l'inflammation intestinale et le cancer colorectal associé à la colite**

Par  
Geneviève Coulombe  
Programme de Biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)  
en Biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada  
Janvier, 2015

Membres du jury d'évaluation  
Pre Nathalie Rivard, programme de Biologie cellulaire  
Pr Claude Asselin, programme de Biologie cellulaire  
Pr Marek Rola-Pleszczynski, programme d'Immunologie  
Pr Stephen Girardin, Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto

© Geneviève Coulombe, 2015

# Résumé

## Rôles de la protéine tyrosine phosphatase SHP-2 dans l'inflammation intestinale et le cancer colorectal associé à la colite

Par

Geneviève Coulombe

Programme de Biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en Biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

SHP-2 est une tyrosine phosphatase impliquée dans la signalisation intracellulaire déclenchée par des facteurs de croissance, des cytokines pro-inflammatoires et des produits bactériens. Bien que cette phosphatase soit exprimée de manière ubiquiste et donc dans l'épithélium intestinal, son rôle dans ce tissu n'était pas connu. Afin de mieux comprendre les rôles joués par cette phosphatase dans l'intestin, nous avons généré un modèle murin de délétion conditionnelle de *Shp-2* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales (SHP-2<sup>CEI-KO</sup>). Nos résultats montrent que dès l'âge de 1 mois, toutes les souris expérimentales ont développé spontanément de l'inflammation au niveau du côlon. En fait, dans les cellules épithéliales intestinales, SHP-2 contrôle le niveau d'activation d'effecteurs de signalisation importants tels que les kinases ERK1/2 de même que les facteurs de transcription NFκB, STAT3 et β-caténine. En modulant ces voies de signalisation, SHP-2 contrôle des processus cellulaires primordiaux pour le maintien de l'homéostasie intestinale: la détermination des cellules à mucus et des cellules de Paneth, la composition de la flore, la perméabilité paracellulaire et la restitution épithéliale. La dérégulation de ces processus cellulaires peut expliquer l'apparition rapide d'inflammation colique chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>. De plus, l'inflammation chronique observée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> entraîne avec l'âge le développement de cancer colorectal associé à la colite. Finalement, nos résultats chez l'humain montrent qu'il y a une diminution significative d'expression de SHP-2 chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales comparativement aux patients témoins. Également, deux polymorphismes de *PTPN11* sont retrouvés préférentiellement chez les patients atteints de colite ulcéreuse. En conclusion, nos résultats démontrent que la phosphatase SHP-2 protège l'épithélium intestinal contre l'inflammation et le cancer colorectal associé à la colite.

Mots clés: SHP-2, protéine tyrosine phosphatase, inflammation intestinale, cancer colorectal associé à la colite

## Table des matières

<b>Résumé.....</b>	<b>ii</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>iii</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>x</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>xi</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
1. Le système digestif .....	1
1.1. La structure du système digestif .....	1
1.2. La structure de l'épithélium intestinal.....	2
1.2.1. L'intestin grêle.....	2
1.2.2. Le côlon .....	5
1.3. L'épithélium intestinal et la microflore.....	6
1.3.1. La signalisation des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires.....	7
1.3.2. Les rôles de la signalisation des PRRs.....	10
1.3.3. La tolérance face aux bactéries commensales .....	10
1.3.4. Les mécanismes de régulation de l'activation des TLRs .....	11
1.4. Les rôles de l'épithélium intestinal.....	13
1.4.1. Un rôle dans la digestion et l'absorption .....	13
1.4.2. Un rôle de barrière physique.....	13
1.4.3. Un rôle dans la réparation de blessure .....	14
1.4.4. Un rôle de barrière chimique .....	16
1.4.5. Un rôle dans l'immunité innée et adaptative.....	16
1.5. Les voies de signalisation régulant la prolifération et la détermination cellulaires.....	18
1.5.1. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine.....	18
1.5.2. La voie MAP Kinase ERK1/2 .....	21
1.5.3. La voie Notch.....	23
1.5.4. Autres signalisations impliquées dans la détermination et la différenciation des cellules de l'intestin grêle.....	24
1.6. Les maladies inflammatoires intestinales .....	26
1.6.1. La maladie de Crohn et la colite ulcéreuse .....	26
1.6.2. Les causes de l'inflammation intestinale .....	27
1.6.2.1. Les facteurs génétiques .....	27
1.6.2.2. La réponse immunitaire.....	30
1.6.2.3. La microflore intestinale .....	32
1.6.2.4. La barrière intestinale.....	33
1.7. Le cancer colorectal .....	35
1.7.1. Le cancer colorectal sporadique .....	36
1.7.2. Le cancer colorectal associé à la colite .....	39
2. Les protéines tyrosines phosphatases .....	41
2.1. La classification des PTPs .....	42



2.2. Les phosphatases SHP-1 et SHP-2 .....	44
2.3. Les mécanismes de régulation de l'activité et de la localisation de SHP-2 .....	44
2.4. Les voies de signalisation régulées par SHP-2 .....	45
2.5. Les processus cellulaires régulés par SHP-2 .....	48
2.6. Les modèles murins .....	49
2.7. Les pathologies associées à une dérégulation de la phosphatase SHP-2 .....	50
<b>Hypothèse et Objectifs.....</b>	<b>52</b>
<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>53</b>
1. Matériel.....	53
1.1. Anticorps.....	53
1.2. Inhibiteurs .....	53
2. Méthodes.....	54
2.1. Souris .....	54
2.2. Immunobuvardage .....	55
2.3. Immunohistochimie .....	57
2.4. Colorations histologiques .....	58
2.5. Immunofluorescence sur tissus.....	58
2.6. Index de maladie.....	59
2.7. Dosage de cytokines et chimiokines.....	59
2.8. Extraction d'ARN, RT-PCR et PCR quantitatives.....	59
2.9. Traitement des souris aux antibiotiques.....	60
2.10. Culture cellulaire.....	61
2.11. Génération de shARN, production de lentivirus et infection virale .....	62
2.12. Traitement des cellules IEC-6 avec des produits bactériens ou des cytokines.....	62
2.13. SILAC ( <i>Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture</i> ) .....	63
2.14. Microscopie électronique.....	64
2.15. Micropuce à ADN ( <i>Affymetrix</i> ) .....	64
2.16. Analyse de la microflore par électrophorèse sur gel en gradient dénaturant.....	64
2.17. Analyse de la microflore par PCR quantitatives.....	65
2.18. Perméabilité <i>in vivo</i> .....	65
2.19. Résistance transépithéliale.....	65
2.20. Test de restitution épithéliale.....	66
2.21. Immunofluorescence sur cellules.....	67
2.22. Cinétique de multiblessures .....	67
2.23. Dosage de l'activité de RhoA.....	67
2.24. Détection des polymorphismes rs2301756 et rs3741983 .....	68
2.25. Analyses statistiques .....	68
<b>Résultats.....</b>	<b>69</b>
Chapitre 1: Contrôle de l'homéostasie intestinale par la protéine tyrosine phosphatase SHP-2.....	69
1.1. Les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> accusent un important retard de croissance comparativement aux souris témoins.....	69
1.2. Les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> développent spontanément de l'inflammation dans le côlon.....	70

1.3. Les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> nouveau-nées ne démontrent pas d'altérations morphologiques dans leur côlon .....	73
1.4. L'inflammation n'affecte pas l'intestin grêle des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	77
Chapitre 2: Rôles anti-inflammatoires de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales .....	80
2.1. SHP-2 contrôle plusieurs voies de signalisation impliquées dans le maintien de l'homéostasie intestinale et dans l'inflammation .....	80
2.1.1. Les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> présentent une dérégulation des effecteurs de signalisation ERK1/2, STAT3, NFκB et β-caténine.....	80
2.1.2. SHP-2 régule directement l'activation de STAT3 et des kinases ERK1/2 en réponse à l'IL-6 .....	83
2.1.3. Les bactéries participent à l'induction de l'inflammation chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	83
2.1.4. La délétion épithéliale concomitante de <i>Myd88</i> retarde l'apparition de l'inflammation chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	86
2.1.5. L'altération des effecteurs de signalisation STAT3, NFκB et β-caténine observée chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> est dépendante de Myd88 .....	88
2.1.6. SHP-2 ne régule pas significativement l'activation des voies NFκB et ERK1/2 en réponse à l'IL-1β .....	91
2.1.7. SHP-2 régule l'activation de NFκB et des kinases ERK1/2 en réponse au produit bactérien LPS .....	91
2.1.8. SHP-2 présente plusieurs substrats potentiels en réponse à la signalisation du LPS.....	94
2.1.9. La diminution d'activation des kinases ERK1/2 contribue grandement au phénotype inflammatoire des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	97
2.2. SHP-2 contrôle la détermination des cellules de l'épithélium intestinal .....	100
2.2.1. Les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> présentent une diminution du nombre de cellules à mucus dans leur côlon.....	100
2.2.2. Les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> expriment plusieurs peptides antimicrobiens dans leur côlon.....	103
2.2.3. Les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> présentent des cellules lysozymes positives dans leur côlon proximal .....	103
2.2.4. Les cellules de Paneth métaplasiques observées chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> présentent un phénotype de cellules intermédiaires .....	107
2.2.5. La réponse des cellules épithéliales intestinales aux bactéries contrôle la détermination cellulaire dans les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	111
2.2.6. La voie MAP Kinase ERK1/2 contribue aussi à la détermination cellulaire dans les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	114
2.2.7. Les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> présentent un changement dans la composition de leur microflore comparativement aux souris témoins.....	118
2.3. SHP-2 contrôle la perméabilité paracellulaire .....	118
2.3.1. Les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> présentent une hyperperméabilité paracellulaire ....	118
2.3.2. SHP-2 contrôle la perméabilité paracellulaire des cellules épithéliales intestinales en culture indépendamment de la voie ERK1/2 .....	121
2.4. SHP-2 contrôle la restitution épithéliale intestinale .....	123
2.4.1. L'expression de SHP-2 est importante pour la restitution des cellules IEC-6 et Caco-2/15 blessées.....	123

2.4.2. SHP-2 colocalise avec les filaments d'actine lors de la restitution des cellules IEC-6.....	126
2.4.3. SHP-2 contrôle la restitution épithéliale via les voies ERK1/2 et RhoA/ROCK.....	126
2.4.4. SHP-2 présente des substrats potentiels impliqués dans la restitution épithéliale intestinale .....	129
<b>Chapitre 3: Rôle de SHP-2 dans le cancer colorectal associé à la colite .....</b>	<b>133</b>
3.1. Les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> montrent une augmentation du nombre de cellules prolifératives dans leur côlon et leur intestin grêle.....	133
3.2. La prolifération est diminuée par la délétion épithéliale de <i>Myd88</i> chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	135
3.3. Les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> âgées développent des adénocarcinomes intramuqueux et des adénocarcinomes infiltrants.....	135
<b>Chapitre 4: Statut d'expression de SHP-2 chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales .....</b>	<b>142</b>
4.1. Les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales présentent une diminution d'expression de SHP-2.....	142
4.2. Les patients atteints de colite ulcéreuse et de la maladie de Crohn expriment différemment les polymorphismes rs2301756 et rs3741983 .....	142
<b>Discussion .....</b>	<b>145</b>
1. Contrôle de l'homéostasie intestinale par SHP-2.....	145
2. Rôles anti-inflammatoires de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales .....	148
2.1. SHP-2 contrôle plusieurs voies de signalisation qui régulent le maintien de l'homéostasie intestinale et la réponse inflammatoire.....	148
2.1.1. Régulation de NFκB par SHP-2.....	149
2.1.2. Régulation de STAT3 par SHP-2 .....	152
2.1.3. Régulation des kinases ERK1/2 par SHP-2 .....	154
2.1.4. Régulation de la β-caténine par SHP-2.....	156
2.2. SHP-2 contrôle la détermination des cellules de l'épithélium intestinal .....	157
2.3. SHP-2 contrôle la perméabilité paracellulaire .....	165
2.4. SHP-2 contrôle la restitution épithéliale intestinale .....	168
2.5. Modèle proposé expliquant l'initiation de l'inflammation chez les souris expérimentales .....	172
3. Rôle de SHP-2 dans le cancer colorectal associé à la colite.....	174
4. Statut d'expression de SHP-2 chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales .....	178
<b>Perspectives et Conclusion .....</b>	<b>180</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>184</b>
<b>Liste des références .....</b>	<b>186</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>224</b>

## Liste des figures

Schéma 1: La structure de l'épithélium intestinal.....	3
Schéma 2: La signalisation des PRRs.....	9
Schéma 3: Les rôles de l'épithélium intestinal.....	15
Schéma 4: Les voies de signalisation régulant la prolifération et la détermination cellulaires.....	20
Schéma 5: La détermination des cellules de l'épithélium intestinal.....	25
Schéma 6: Les maladies inflammatoires intestinales.....	28
Schéma 7: Le cancer colorectal sporadique et le cancer colorectal associé à la colite.....	37
Schéma 8: Les protéines tyrosines phosphatases.....	43
Schéma 9: Les croisements de souris.....	56
Figure 1: Validation de la perte d'expression de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales chez les souris expérimentales.....	71
Figure 2: Retard de croissance chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	72
Figure 3: Apparition spontanée d'une sévère colite chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 mois.....	74
Figure 4: Absence d'inflammation intestinale chez les jeunes souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	78
Figure 5: Absence d'inflammation intestinale au niveau de l'intestin grêle des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	79
Figure 6: Dérégulation des effecteurs de signalisation ERK1/2, NFκB et STAT3 chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	82
Figure 7: Activation de la voie Wnt/β-caténine dans le côlon des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines.....	84
Figure 8: SHP-2 contrôle l'activation de ERK1/2 et de STAT3 par l'IL-6 dans les cellules épithéliales intestinales.....	85
Figure 9: Diminution des signes d'inflammation chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> suite à un traitement aux antibiotiques.....	87
Figure 10: Diminution des signes d'inflammation chez les souris SHP-2;Myd88 <sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	89
Figure 11: Présence d'inflammation intestinale chez les vieilles souris SHP-2;Myd88 <sup>CEI-KO</sup> .....	90
Figure 12: Modulation de l'expression de la β-caténine et de l'activation de NFκB et STAT3 par la délétion épithéliale de <i>Myd88</i> dans le côlon des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	92
Figure 13: SHP-2 ne contrôle pas significativement l'activation de ERK1/2 et de NFκB par l'IL-1β dans les cellules épithéliales intestinales.....	93

Figure 14: SHP-2 contrôle l'activation de ERK1/2 et de NFκB par le LPS dans les cellules épithéliales intestinales. ....	95
Figure 15: Morphologie du tissu colique des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> ;B-Raf <sup>CEI-CA</sup> comparativement aux souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	98
Figure 16: Prévention de l'apparition d'inflammation intestinale chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> ;B-Raf <sup>CEI-CA</sup> comparativement aux souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	99
Figure 17: Diminution du marquage des mucines dans le côlon des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> ..	101
Figure 18: Diminution du nombre de cellules à mucus dans le côlon des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	102
Figure 19: Augmentation d'expression en ARNm des peptides antimicrobiens dans le côlon des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	105
Figure 20: Augmentation d'expression en ARNm des peptides antimicrobiens dans l'intestin grêle des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	106
Figure 21: Présence de cellules contenant des granules éosinophiles dans le côlon des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	108
Figure 22: Présence de cellules marquées au lysozyme dans le côlon proximal des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	109
Figure 23: Présence de cellules intermédiaires Paneth/gobelet dans le côlon proximal des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	110
Figure 24: Le nombre de cellules entéroendocrines n'est pas changé dans le côlon des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	112
Figure 25: L'expression des facteurs de transcription <i>Hes1</i> , <i>Math1</i> , <i>Sox9</i> , <i>Spdef</i> , <i>Klf4</i> et <i>Gfi1</i> n'est pas modulée dans le côlon des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	113
Figure 26: Préservation partielle du nombre de cellules à mucus et de cellules positives pour le lysozyme dans le côlon des souris SHP-2;Myd88 <sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	115
Figure 27: La délétion épithéliale de <i>Myd88</i> atténue l'expression des peptides antimicrobiens dans le côlon des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	116
Figure 28: L'expression épithéliale de <i>B-Raf</i> constitutif actif augmente le nombre de cellules à mucus et prévient l'apparition des cellules positives pour le lysozyme dans le côlon des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	117
Figure 29: Changement dans la composition de la microflore intestinale chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	119
Figure 30: La perméabilité paracellulaire intestinale est augmentée chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	122
Figure 31: SHP-2 contrôle la résistance transépithéliale dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2/15.....	124
Figure 32: SHP-2 contrôle la restitution des cellules épithéliales intestinales. ....	125

Figure 33: Relocalisation de SHP-2 aux filaments d'actine dans les cellules épithéliales intestinales qui migrent.....	127
Figure 34: SHP-2 contrôle l'activation des kinases ERK1/2 lors de la restitution épithéliale intestinale.....	128
Figure 35: SHP-2 contrôle l'activité de la voie RhoA/ROCK lors de la restitution épithéliale intestinale.....	130
Figure 36: Augmentation de la prolifération dans le côlon distal des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	134
Figure 37: Augmentation de la prolifération dans l'intestin grêle des souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> .....	136
Figure 38: Diminution de la prolifération dans les SHP-2;Myd88 <sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 mois.....	137
Figure 39: Les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> âgées souffrent d'inflammation colique.....	138
Figure 40: Les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> développent des adénocarcinomes intramuqueux et des adénocarcinomes infiltrants avec l'âge.....	140
Figure 41: Dérégulation de l'activation de STAT3, NFκB, ERK1/2 et β-caténine chez les souris expérimentales âgées.....	141
Figure 42: Diminution d'expression de SHP-2 dans la muqueuse colique des patients atteints de maladies inflammatoires intestinales.....	143

## Liste des tableaux

Tableau 1: Altération de la production de chimiokines et de cytokines chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris témoins. ....	75
Tableau 2: Chimiokines et cytokines qui ne sont pas significativement modulées chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris témoins. ....	76
Tableau 3: Substrats potentiels de SHP-2 suite à une stimulation par le produit bactérien LPS. ....	96
Tableau 4: Gènes dont l'expression est augmentée chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> . ....	104
Tableau 5: Altération de la composition de la microflore chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris témoins. ....	120
Tableau 6: Substrats potentiels de SHP-2 mobilisés lors de la restitution épithéliale. ....	131
Tableau 7: Distribution des allèles des polymorphismes de <i>PTPN11</i> chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales. ....	144

## Liste des abréviations

AOM:	Azoxymethane
AP-1:	Activator protein 1
APC:	Adenomatous polyposis coli
APRIL:	A proliferation inducing ligand
5-ASA:	Acide 5-aminosalicylique
ATG16L1:	Autophagy related 16-like 1
BAFF:	B cell-activating factor
BCA:	Bicinchoninic acid
BSA:	Bovine serum albumin
βTrCP	Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase
CagA:	Cytotoxin-associated gene A
CamKII:	Calcium/calmodulin-regulated kinase II
CARD:	Caspase activation and recruitment domain
CBCC:	Crypt base columnar cell
CCK:	Cholecystokinin
CCL:	Chemokine C-C motif ligand
Cdc42:	Cell division cycle 42
Cdx2:	Caudal type homeobox 2
CEI:	Cellule épithéliale intestinale
CIN:	Chromosomal instability
CIMP:	CpG island methylator phenotype
CKI:	Casein kinase I
CREB:	cAMP response element-binding protein
Ctnnb1:	Catenin beta-1
CXCL:	Chemokine C-X-C motif ligand
CX3CL:	Chemokine C-X3-C motif ligand
Dab2:	Disabled homolog 2
DEN:	Diethylnitrosamine
DII:	Delta-like ligand
Dmd:	Dystrophin
DMEM:	Dulbecco modified Eagle's medium
dNTP:	Desoxyribonucleotide triphosphate
DSP:	Dual specificity phosphatase
Dock8:	Dedicator of cytokinesis 8
DSS:	Dextran sulfate sodium
DTT:	Dithiothreitol
ECL:	Enhanced chemiluminescence
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF:	Epidermal growth factor
EPO:	Erythropoietin
ERK:	Extracellular signal-regulated kinase
ErbB2ip:	ErbB2-interacting protein
EYA:	Eyes absent
FAK:	Focal adhesion kinase
FBS:	Fetal bovin serum
FERM:	4.1, ezrin, radixin and moesin
FGF:	Fibroblast growth factor
FITC:	Fluorescein isothiocyanate
Gab:	Grb2-associated-binding protein
GALT:	Gut-associated lymphoid tissue
GAP:	GTPase-activating protein



GDP:	Guanosine diphosphate
GEF:	Guanine nucleotide exchange factor
Gfi1:	Growth factor independent 1 transcription repressor
GIP:	Gastric inhibitory polypeptide
GLUT:	Glucose transporter
GM-CSF:	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Gp130:	Glycoprotein 130
Grb2:	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3:	Glycogen synthetase kinase 3
Gsn:	Gelsolin
GTP:	Guanosine triphosphate
HDAC:	Histone deacetylase
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Hes1:	Hairy/enhancer of split
HGF:	Hepatocyte growth factor
HNPCC:	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
HRP:	Horseradish peroxidase
IAP:	Inhibitor of apoptosis protein
Ido1:	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1
iE-DAP:	gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid
Ig:	Immunoglobulin
IGF-1:	Insulin-like growth factor-1
IκB:	Nuclear factor kappa-B inhibitor
IKK:	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
IL:	Interleukine
IFN $\gamma$ :	Interferon $\gamma$
IRAK:	Interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF3:	Interferon regulatory factor 3
IRGM:	Immunity-related GTPase family M
Itch:	E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog
JAK:	Janus-associated kinase
JAM:	Junctional adhesion molecule
JMML:	Juvenile myelomonocytic leukemia
JNK:	c-Jun N-terminal kinase
Klf4:	Kruppel-like factor 4
KO:	Knockout
LC-MS:	Liquid chromatography-mass spectrometry
Leap2:	Liver-expressed antimicrobial peptide 2
Lect2:	Leukocyte cell-derived chemotaxin 2
Lgr5:	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
LMW-PTP:	Low molecular weight protein tyrosine phosphatase
LPS:	Lipopolysaccharide
LRP:	Low-density lipoprotein receptor-related protein
LTA:	Lipotechoic acid
Lyz1:	Lysozyme 1
Mal:	Myd88 adaptor-like
MAMP:	Microbe associated molecular pattern
MAP kinase:	Mitogen-activated protein kinase
Mark:	MAP/microtubule affinity-regulating kinase
Math1:	Protein atonal homolog 1
MDP:	Muramyl dipeptide
MEK:	Mitogen activated protein kinase kinase
MKP:	Mitogen activated protein kinase phosphatase
MMP:	Matrix MetalloProteinase
MPO:	Myeloperoxidase
MSI:	Microsatellite instability

Mtdh:	Metadherin
Mtm1:	Myotubularin
MUC:	Mucine
Myd88:	Myeloid differentiation primary response gene 88
Myh:	Myosin heavy chain
Myl:	Myosin light chain
MyRI:	Myosin regulatory light chain
NFκB:	Nuclear factor kappa-B kinase
Ngn3:	Neurogenin 3
NICD:	Notch intracellular domain
NLR:	NOD-like receptor
NLRC:	NLR subfamily CARD domain-containing protein
NLRP:	NLR subfamily PYD domain-containing protein
NLS:	Nuclear localization sequence
NOD:	Nucleotide-binding oligomerization domain receptor
NOG:	Octyl β-D-glucopyranoside
PAS:	Periodic Acid Schiff
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PCNA:	Proliferating cell nuclear antigen
PCR:	Polymerase chain reaction
PDGF:	Platelet-derived growth factor
PDZ:	PSD95, DLG1 and ZO-1
PI3K:	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PKC:	Protein kinase C
PPAR:	Peroxisome proliferator-activated receptor
PRR:	Pattern recognition receptor
PTEN:	Phosphatase and tensin homolog
PTK:	Protéine tyrosine kinase
PTP:	Protéine tyrosine phosphatase
PTPN:	Protein tyrosine phosphatase non-receptor
PTPN11:	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11
PTPR:	Protein tyrosine phosphatase receptor
PVDF:	Polyvinylidene fluoride
PYY:	Peptide YY
Rac:	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RAF:	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog
Rai14:	Retinoic acid-induced protein 14
RAS:	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
RBP-jκ:	Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
Reg:	Regenerating islet-derived protein
RelA:	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
Rho:	Rhodopsin
RIP:	Receptor-interacting protein
ROCK:	Rho-associated protein kinase
RNS:	Reactive nitrogen species
ROS:	Reactive oxygen species
RSK:	Ribosomal protein S6 kinase
RT-PCR:	Reverse transcription polymerase chain reaction
SARM:	Sterile alpha and TIR motif-containing protein
SGLT:	Sodium-glucose linked transporter
SH2:	Src homology 2
SHP-1:	Src homology 2 domain-containing phosphatase 1
SHP-2:	Src homology 2 domain-containing phosphatase 2
SIGGIR:	Single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain
SMAD:	Mothers against decapentaplegic homolog
Socs3:	Suppressor of cytokine signaling 3

Sos:	Son of sevenless
SOX9:	SRY (sex determining region Y)-box 9
Spdef:	SAM pointed domain containing ETS transcription factor
STAT:	Signal transducer and activator of transcription
ST2:	Suppression of tumorigenicity 2
TAB:	TAK1-binding protein
TAK:	TGF- $\beta$ -activated kinase
TAZ:	Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
TBK:	TANK-binding kinase
TCF/LEF:	T cell factor/lymphocyte enhancer factor
TFF3:	Trefoil factor 3
TGF:	Transforming growth factor
Th:	T helper cell
Tir:	Toll/Interleukin 1 receptor
TLR:	Toll-like receptor
TNF $\alpha$ :	Tumor necrosis factor $\alpha$
Tollip:	Toll-interacting protein
Traf:	TNF receptor-associated factor
Tram:	TRIF related adaptor molecule
Trif:	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
Trim24:	Tripartite motif-containing protein 24
TSLP:	Thymic stromal lymphopoietin
UPGMA:	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
XCL:	Chemokine X-C motif ligand
YAP:	Yes-associated protein
ZO-1:	Zona occludens

## Introduction

### 1. Le système digestif

#### *1.1. La structure du système digestif*

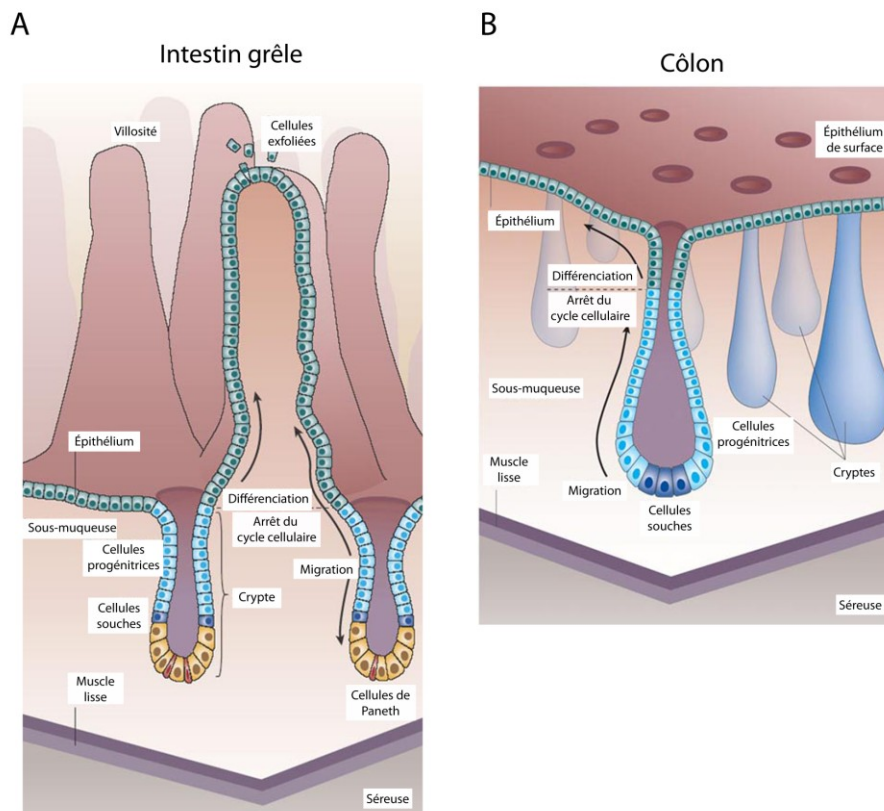
Le système digestif, appelé aussi appareil digestif, comprend l'ensemble des organes dont la principale fonction est la digestion des aliments afin d'en extraire les nutriments et de les assimiler. Le système digestif comprend le tube digestif qui s'étend de la bouche à l'anus et dont font partie la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac (fundus, cardia, pylore), l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et le gros intestin ou côlon (caecum, côlon ascendant, côlon transverse, côlon descendant, côlon sigmoïde, rectum, anus). Il inclut aussi des organes annexes comme le foie, le pancréas et la vésicule biliaire. Plus précisément, la digestion des aliments se fait selon les étapes suivantes. L'ingestion des aliments se fait par la bouche où ils sont mastiqués. Suite à la déglutition, le bol alimentaire est propulsé vers le pharynx jusque dans l'œsophage. Le mouvement péristaltique amène le bol alimentaire dans l'estomac où il est mélangé avec le suc gastrique, comprenant l'acide chlorhydrique et la pepsine, pour former le chyme. Cette bouillie alimentaire atteint ensuite l'intestin grêle où elle est digérée par les enzymes digestives (sucrase-isomaltase, lactase, etc.) exprimées dans la bordure en brosse des cellules épithéliales intestinales. La bile produite par le foie et les proenzymes pancréatiques, dont le trypsinogène, la chymotrypsine, la phospholipase et la prolipase, y participent aussi. Suite à la digestion, l'absorption des nutriments se fait majoritairement par l'épithélium de l'intestin grêle. Afin d'augmenter la surface de contact permettant l'absorption, l'intestin grêle est organisé en valvules conniventes, elles-mêmes hérissées de petites digitations nommées villosités. Sur ces villosités se retrouvent essentiellement deux types de cellules: les cellules à mucus et les entérocytes qui présentent sur leur face tournée vers la lumière intestinale, de très nombreuses microvillosités. Finalement, l'absorption de l'eau et des sels se fait au niveau du côlon puis les résidus de la digestion forment les fèces et sont évacués par l'anus (Tortora et Grabowski, 1994).

La paroi du tube digestif se compose de quatre couches fonctionnelles: la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. La muqueuse est la couche interne du tube digestif et elle comprend l'épithélium intestinal, la lamina propria et la muscularis mucosae. Plus en détail, l'épithélium intestinal repose sur la lamina propria, une couche de tissu conjonctif de soutien, contenant des cellules de soutien soit des fibroblastes, des cellules immunitaires ainsi que de petits vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les cellules du système immunitaire adaptatif forment le GALT (tissu lymphoïde associé à l'intestin) qui se regroupent en structures spécialisées comme les plaques de Peyer, les ganglions lymphoïdes intestinaux et les follicules isolés (Lotz *et al.*, 2006). La lamina propria repose sur la muscularis mucosae, une mince couche de muscle lisse. Sous la muqueuse se retrouve la sous-muqueuse. Elle se compose de tissu conjonctif fait de fibres de collagène lâche contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques de même que des nerfs formant le plexus de Meissner. Son rôle est de soutenir la muqueuse. Sous cette couche se retrouve la musculuse formée de deux couches de muscles: une couche interne circulaire responsable de la contraction de la lumière et une couche externe longitudinale responsable du péristaltisme. Le plexus d'Auerbach, appartenant au système nerveux entérique, se retrouve entre ces deux couches musculaires. Finalement, la séreuse, appelée aussi l'adventice, est la couche externe du tube digestif. Elle se compose d'un mésothélium, un épithélium pavimenteux simple, et de tissu conjonctif (Tortora et Grabowski, 1994).

## ***1.2. La structure de l'épithélium intestinal***

### *1.2.1. L'intestin grêle*

La structure et les fonctions de l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon ne sont pas les mêmes. Dans l'intestin grêle, l'épithélium forme des axes cryptes-villosités (Schéma 1A). La crypte contient les cellules souches, les cellules progénitrices, les cellules en voie de différenciation et les cellules de Paneth. Plus précisément, deux types de cellules souches ont été décrites dans l'intestin: les cellules CBCC ou Lgr5+ situées dans le fond des cryptes et les cellules +4 situées à la position 4 dans la crypte (Medema et Vermeulen, 2011). Suite à une division asymétrique, une cellule souche donne naissance à une nouvelle cellule souche et à une cellule progénitrice. Les cellules progénitrices migrent vers le haut



### Schéma 1: La structure de l'épithélium intestinal.

(A) Dans l'intestin grêle, l'épithélium est organisé en axes cryptes-villosités. La crypte contient les cellules souches, les cellules progénitrices, les cellules en voie de différenciation et les cellules de Paneth. Suite à une division asymétrique, une cellule souche donne naissance à une nouvelle cellule souche et à une cellule progénitrice. Les cellules progénitrices vont entamer un processus de différenciation et donner naissance principalement aux entérocytes, aux cellules à mucus, aux cellules entéroendocrines et aux cellules de Paneth. Il existe aussi les cellules M, les cellules «cup» et les cellules «tuft» qui sont plus minoritaires et moins bien caractérisées. (B) L'épithélium colique présente des cryptes plus profonds et est dépourvu de villosités. Les cellules souches pluripotentes vont se retrouver au fond de celles-ci et vont donner naissance aux types cellulaires différenciés soit les cellules absorbantes, les cellules à mucus et les cellules entéroendocrines. Tiré et adapté de Reya et Clevers (2005).

de la crypte tout en continuant à se diviser entre trois et quatre fois. Ces cellules sont sensibles à des signaux de détermination et cessent alors de proliférer pour entamer un processus de différenciation, c'est-à-dire acquérir leur forme et leur fonction spécialisée. Dans l'intestin grêle, les cellules souches intestinales donnent naissance à principalement quatre types de cellules épithéliales différenciées: les entérocytes ou cellules absorbantes, les cellules à mucus appelées aussi cellules caliciformes ou cellules à gobelet, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth (van der Flier et Clevers, 2009). Des cellules intermédiaires exprimant à la fois des marqueurs de cellules à Paneth et à gobelet sont aussi rarement retrouvées dans l'intestin grêle, ce qui suggère que ces types cellulaires proviennent d'un précurseur commun (Calvert *et al.*, 1988). Il existe aussi les cellules M (Miller *et al.*, 2007), les cellules «cup» (Madara et Carlson, 1985) et les cellules «tuft» (Gerbe *et al.*, 2012) qui sont plus minoritaires et moins bien caractérisées.

Les entérocytes sont des cellules hautement polarisées dont la face apicale contient des microvillosités formant une bordure en brosse impliquée dans la digestion et l'absorption des nutriments. Aussi, les entérocytes peuvent sécréter des  $\beta$ -défensines, un type de peptide antimicrobien. Ces cellules sont présentes dans les villosités et représentent 80% de toutes les cellules épithéliales de l'intestin (van der Flier et Clevers, 2009).

Les cellules à mucus ou cellules caliciformes ont une forme de calice. Ces cellules localisées dans les villosités sécrètent des mucines formant une couche de mucus lubrifiant la paroi intestinale, ce qui facilite le passage des selles et protège l'épithélium contre l'érosion. Le mucus empêche aussi les bactéries d'être directement en contact avec les cellules épithéliales intestinales et lie les peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules épithéliales. Les cellules à mucus sécrètent aussi le facteur trifolié 3 (TFF3) impliqué dans la restitution épithéliale (Kim et Ho, 2010). Le nombre de cellules à mucus augmente fortement du duodénum vers le côlon descendant (Karam, 1999).

Les cellules entéroendocrines coordonnent les fonctions du tube digestif en sécrétant diverses hormones. Il existe plus de quinze types de cellules entéroendocrines classées selon leur morphologie et le type d'hormone sécrété (Evans et Potten, 1988). Les principales hormones intestinales sont la cholécystokine (CCK), la sécrétine, la somatostatine et le peptide insulinothéropique dépendant du glucose (GIP) (Rindi *et al.*, 2004).

Les cellules entéroendocrines présentes dans les villosités intestinales représentent moins de 1% des cellules épithéliales de l'intestin (Schonhoff *et al.*, 2004).

Contrairement aux autres cellules épithéliales intestinales différenciées, les cellules de Paneth se localisent au fond des cryptes. Normalement, elles sont retrouvées uniquement dans l'intestin grêle; néanmoins, des cellules de Paneth métaplasiques peuvent être retrouvées dans l'estomac ou le côlon lors de différentes pathologies (Tanabe *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2001). Les cellules de Paneth possèdent un cytoplasme apical rempli de granules très denses. Ces cellules sécrètent plusieurs peptides antimicrobiens tels que le lysozyme et les  $\alpha$ -défensines qui protègent l'hôte des pathogènes entériques (Wilson *et al.*, 1999) et modulent la composition de la microflore intestinale (Salzman *et al.*, 2010). D'ailleurs, l'expression de certains peptides antimicrobiens est modulée par les bactéries (Vaishnava *et al.*, 2008). Finalement, les cellules de Paneth contribuent à la formation de la niche des cellules souches en exprimant et sécrétant des facteurs de croissance notamment du TGF $\alpha$ , de l'EGF, du Wnt3 et le ligand de Notch Dll4 (Sato *et al.*, 2011).

### *1.2.2. Le côlon*

L'épithélium colique présente des cryptes plus profondes et est dépourvu de villosités (Schéma 1B). Tout comme dans l'intestin grêle, les cellules souches pluripotentes vont se retrouver au fond de celles-ci et vont donner naissance aux types cellulaires différenciés soit les colonocytes ou cellules absorbantes, les cellules à mucus et les cellules entéroendocrines. Normalement, il n'y a pas de cellules de Paneth dans le côlon (van der Flier et Clevers, 2009).

Les colonocytes, contrairement aux entérocytes, ne possèdent pas d'enzymes digestives. Leur fonction est plutôt d'absorber l'eau et les sels. Les cellules à mucus sont présentes en grande quantité dans le côlon et sont responsables, tout comme dans l'intestin grêle, de la sécrétion de mucus. Pour leur part, les cellules entéroendocrines du côlon vont sécréter des hormones, principalement la sérotonine et le peptide YY (PYY) (Rindi *et al.*, 2004).



### 1.3. L'épithélium intestinal et la microflore

L'épithélium intestinal est en contact avec le contenu de la lumière intestinale composée notamment de la flore intestinale. Cette microflore comprend l'ensemble des microorganismes qui se trouvent dans le tube digestif dont près de 98% sont des bactéries commensales appartenant majoritairement aux groupes *Bacteroidetes* et *Firmicutes*. Des bactéries pathogènes, des levures, des protistes et des virus peuvent aussi y être retrouvés. Au niveau de l'intestin grêle, entre  $10^3$ - $10^5$  microorganismes par mL sont présents tandis que dans le côlon, le nombre de microorganismes est beaucoup plus élevé et atteint entre  $10^9$ - $10^{12}$  par mL (Artis, 2008). En fait, chez l'homme, la microflore intestinale renferme environ 100 000 milliards de bactéries appartenant à plus de 500 espèces différentes (Xu et Gordon, 2003).

L'épithélium intestinal fonctionne en symbiose avec les bactéries commensales de la flore intestinale. L'intestin procure un endroit propice à la survie de ces bactéries en lui fournissant des nutriments. En retour, les bactéries commensales exercent plusieurs effets bénéfiques pour l'hôte. En effet, via leur métabolisme, les bactéries produisent des acides gras à chaîne courte dont le butyrate qui représente la principale source d'énergie de la muqueuse colique (Donohoe *et al.*, 2011). La flore permet aussi la dégradation des hydrates de carbone non absorbés aboutissant à la production d'acides organiques assimilables (acétate, propionate, butyrate) et de gaz ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ). Les enzymes bactériennes hydrolysent aussi les lipides alimentaires non absorbés (Wolf, 2006) de même que certaines protéines et certains acides aminés tels que le tryptophane permettant la récupération de l'azote (Wikoff *et al.*, 2009). Finalement, les bactéries anaérobiques facultatives sont capables de synthétiser un large éventail de vitamines incluant la biotine, la riboflavine et la vitamine K tandis que les bactéries anaérobies strictes sont capables de produire de la vitamine B12.

Les bactéries commensales jouent un rôle primordial pour l'hôte. Des expériences effectuées chez des souris axéniques montrent que l'absence de la flore entraîne un ralentissement du transit intestinal et une dilatation du caecum dû à leur effet sur la motricité (Abrams et Bishop, 1967). De plus, la vitesse de renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal est aussi significativement réduite chez les souris axéniques (Abrams *et al.*, 1963). Finalement, la microflore intestinale est cruciale pour la maturation du

système immunitaire intestinal. En effet, les souris axéniques présentent des défauts dans le développement de leur système immunitaire; les plaques de Peyer, situées le long de l'intestin, de même que la rate et les ganglions lymphoïdes restent immatures quand ces animaux vieillissent. Cela s'accompagne dans l'organisme d'un déficit en lymphocytes matures (Cash et Hooper, 2005).

### *1.3.1. La signalisation des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires*

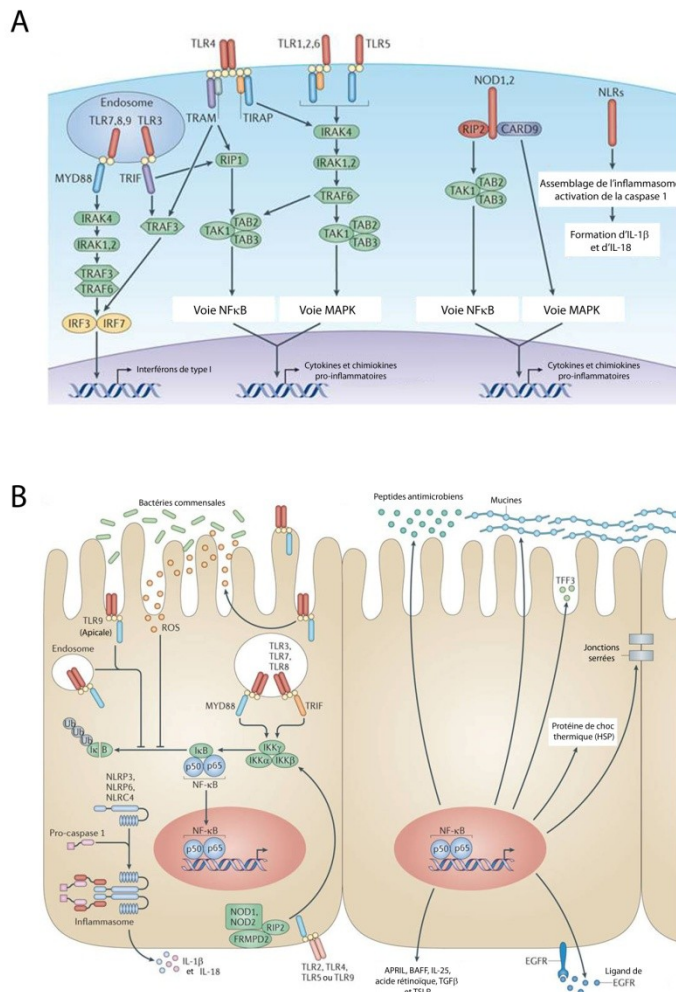
Les cellules épithéliales intestinales perçoivent le contenu de la lumière intestinale, dont les bactéries, par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs) incluant les récepteurs transmembranaires de type Toll (TLRs) ainsi que les récepteurs intracellulaires de type NOD (NLRs) (Fukata *et al.*, 2009). Il existe 9 types de TLR (TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9) ainsi que 6 types de NLR (NOD1, NOD2, NLRP3, 6, 12 et NLRC4) exprimés par les cellules de l'épithélium intestinal (Fukata et Ardit, 2013; Rubino *et al.*, 2012). Chaque récepteur détecte spécifiquement des MAMPs (microbe associated molecular pattern) présents sur les bactéries commensales et pathogènes, les levures et les virus. Notamment, le récepteur TLR4 reconnaît le LPS (lipopolysaccharide) présent sur les bactéries gram négatif tandis que le récepteur TLR5 détecte plutôt la flagelline, une protéine retrouvée dans les flagelles des bactéries.

L'activation des TLRs induit plusieurs cascades de signalisation. La signalisation s'initie par l'homo- ou l'hétérodimérisation de TLRs entraînant le recrutement de protéines adaptatrices comme Myd88, Mal, TRIF, TRAM et SARM via leur domaine de liaison Tir (Medzhitov, 2007). Ces adaptateurs activent d'autres molécules telles que les kinases IRAK1, IRAK4, TAK1, IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  résultant en l'activation des voies de signalisation NF $\kappa$ B et MAPKs (ERK1/2, JNK et p38) (Liew *et al.*, 2005). Au final, les facteurs de transcription NF $\kappa$ B, AP-1, Elk-1 et CREB vont être activés et entraînés l'expression de gènes codant pour des cytokines, des chimiokines et des produits antimicrobiens (Artis, 2008). En parallèle, la voie IRF3 peut aussi être activée par le récepteur TLR3 via la protéine adaptatrice TRIF. Il en résulte l'activation de TBK1 et IKK $\epsilon$  menant à la transcription des gènes cibles comme les interférons de type 1 (Fitzgerald *et al.*, 2003; Oshiumi *et al.*, 2003). L'expression de plusieurs gènes peut être modulée via la signalisation des TLRs. Ainsi, la

spécificité de la réponse immunitaire va dépendre du type de TLR activé mais aussi des protéines adaptatrices qui sont recrutées (Wells *et al.*, 2010). Par exemple, le récepteur TLR4 peut utiliser les protéines adaptatrices Myd88, Mal, TRIF et TRAM. Pour sa part, Myd88 peut être utilisé par l'ensemble des TLRs à l'exception du récepteur TLR3 (Schéma 2A).

La signalisation initiée par les récepteurs NOD1 et 2 débute suite à leur liaison avec, respectivement, l'acide D-glutamyl-meso-diamino-pimélique (iE-DAP) et le muramyl dipeptide (MDP), des composants du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Il en résulte une auto-oligomérisation des récepteurs NODs, le recrutement de RIP2 (receptor-interacting protein 2) via son domaine CARD et son activation par une polyubiquitination effectuée par une E3 ubiquitine ligase telle que XIAP, TRAF2, TRAF5, TRAF6, cIAP1 ou cIAP2 (Philpott *et al.*, 2014). À son tour, RIP2 recrute et active un complexe protéique composé de TAK1, TAB2 et TAB3 induisant l'activation de la voie NF $\kappa$ B et des voies MAPKs (ERK1/2, JNK et p38) (Lavelle *et al.*, 2010; Philpott *et al.*, 2014). L'expression de plusieurs gènes cibles est alors induite incluant des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF $\alpha$ ), des chimiokines (CCL2, CXCL2 et CXCL8) et des peptides antimicrobiens ( $\alpha$ -défensines) (Schéma 2A).

En ce qui concerne la signalisation des NLRs, ces récepteurs sont activés dans le cytosol ce qui entraîne leur oligomérisation. Selon le type de NLR, il y aura recrutement de pro-caspases 1 directement via leur domaine CARD ou de façon indirecte à l'aide des protéines adaptatrices ASC. Ce complexe multiprotéique forme alors l'inflammasome. L'agrégation de pro-caspase 1 induit son auto-clivage. Il y aura formation d'un fragment p10 et d'un fragment p35 qui sera de nouveau clivé en deux pour former un fragment p20 et un fragment contenant son domaine CARD. La forme active de la caspase 1 est formée par l'hétérodimérisation de 2 sous-unités p20 et 2 sous-unités p10 (Rathinam *et al.*, 2012). La caspase 1 est importante pour le clivage protéolytique des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-18 et IL-33 (Lavelle *et al.*, 2010; Rubino *et al.*, 2012) (Schéma 2A).



### Schéma 2: La signalisation des PRRs.

(A) La signalisation par les TLRs requiert le recrutement de protéines adaptatrices (Myd88, Mal, TRIF, TRAM et SARM) résultant en l'activation de kinases comme IRAK1, IRAK4, TAK1, IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  et ultimement en l'activation des voies NF $\kappa$ B et MAPKs (ERK1/2, JNK et p38). La signalisation par les NODs active également les voies NF $\kappa$ B et MAPKs (ERK1/2, JNK et p38) via la protéine RIP2 et le complexe formé de TAK1, TAB2 et TAB3. La signalisation par les NLRs entraîne l'assemblage de l'inflammasome, ce qui mène à la formation d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18. (B) La signalisation par les PRRs entraîne des effets bénéfiques pour l'hôte en régulant la sécrétion de peptides antimicrobiens, la réparation de blessure et l'intégrité des jonctions cellulaires. Tirés et adaptés de Hancock *et al.* (2012) et de Peterson et Artis (2014).

### 1.3.2. Les rôles de la signalisation des PRRs

La signalisation par les PRRs assure une protection à l'hôte contre les infections par des bactéries pathogènes. En effet, plusieurs modèles de souris n'exprimant par un récepteur PRR sont plus susceptibles à une infection par des bactéries pathogènes. Entre autres, les souris *Nod2*<sup>-/-</sup> sont plus susceptibles à une infection par *Helicobacter hepaticus* (Biswas *et al.*, 2010), tandis que les souris *Nod1*<sup>-/-</sup> sont plus susceptibles à *Clostridium difficile* (Hasegawa *et al.*, 2011). Aussi, la signalisation TLR5 assure une protection de l'hôte face aux bactéries commensales puisque la délétion de *Tlr5* chez la souris entraîne l'apparition spontanée d'une colite due à une présence accrue de bactéries (Vijay-Kumar *et al.*, 2007) (Schéma 2B).

La signalisation des PRRs participe également à la réparation de blessure dans l'intestin. En effet, le traitement des souris *Myd88*<sup>-/-</sup>, *Tlr2*<sup>-/-</sup> et *Tlr4*<sup>-/-</sup> avec un agent chimique induisant des dommages à l'épithélium intestinal, le DSS (dextran sulfate sodium), entraîne un plus haut taux de mortalité et une perte de poids plus importante chez ces souris comparativement aux souris témoins (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). D'ailleurs, une augmentation du nombre de cellules apoptotiques a été observée chez les souris *Myd88*<sup>-/-</sup> et *Tlr2*<sup>-/-</sup> suite à ce type de traitement (Cario *et al.*, 2007) (Schéma 2B).

Finalement, la signalisation TLR2 contrôle aussi l'intégrité des jonctions cellulaires via la voie PI3K/AKT. Plus précisément, une mauvaise localisation des protéines de jonction ZO-1 et E-cadhérine est observée chez les souris *Myd88*<sup>-/-</sup> et *Tlr2*<sup>-/-</sup> suite à des dommages à l'épithélium intestinal (Cario *et al.*, 2007) (Schéma 2B).

### 1.3.3. La tolérance face aux bactéries commensales

Le tube digestif des nouveau-nés est essentiellement stérile. Après l'accouchement, la lumière intestinale passe d'un environnement stérile à un environnement colonisé par une multitude de microorganismes et d'endotoxines, comme le LPS, provenant majoritairement de la mère, mais également de l'environnement (Schaedler *et al.*, 1965). Chez l'homme et la souris, des bactéries anaérobiques facultatives ou microaérophiles sont prédominantes suite à la naissance. Par après, les *Enterococcus*, les *Lactobacillus* et les *Staphylococcus*

apparaissent et consomment l'oxygène disponible ce qui génère un environnement anaérobie, favorable à la colonisation du tube digestif par les *Bifidobacteria*, les *Bacteroides* et les *Clostridium* (Scholtens *et al.*, 2012). Chez l'adulte, la microflore commensale se compose principalement de *Bacteroidetes* et de *Firmicutes*.

La colonisation du tube digestif par la microflore est cruciale à l'établissement de la tolérance envers celle-ci. L'épithélium intestinal doit apprendre à être tolérant face aux bactéries commensales, mais être capable d'induire une réponse inflammatoire en présence de bactéries pathogènes (Peterson et Artis, 2014). En fait, une réponse inflammatoire dirigée contre les bactéries commensales est néfaste et peut entraîner l'apparition d'inflammation intestinale chronique (Xavier et Podolsky, 2007).

Suite à la colonisation du tube digestif, l'épithélium intestinal subit des changements notables participant à l'établissement de la tolérance envers les bactéries commensales. Plus précisément, le premier contact des cellules épithéliales intestinales avec le produit bactérien LPS active la signalisation TLR4 ce qui induit l'expression de miR-146a. *In vivo*, ce micro-ARN réprime la traduction de l'ARNm d'*Irak1* et induit la dégradation protéique de cette kinase essentielle à la signalisation des TLRs. En d'autres mots, rapidement suite à la naissance, l'activation de la signalisation TLR4/Myd88/NFκB induit un mécanisme de rétrocontrôle négatif, via l'induction de miR-146a, dans les cellules épithéliales intestinales (Chassin *et al.*, 2010; Lotz *et al.*, 2006). En fait, le faible niveau d'expression d'IRAK1 protège les cellules épithéliales intestinales. En effet, le traitement de souris nouveau-nées avec un anti-miR-146a rétablit l'expression d'IRAK1 ce qui entraîne de l'inflammation et des dommages à l'épithélium chez ces souris (Chassin *et al.*, 2010). Finalement, suite au sevrage des souriceaux, miR-146a n'est plus exprimé suggérant que ce mécanisme d'action est présent seulement durant une courte période de temps suivant la naissance.

#### 1.3.4. Les mécanismes de régulation de l'activation des TLRs

À la naissance, des mécanismes de tolérance face aux bactéries commensales sont présents dans les cellules épithéliales intestinales. Par la suite, la signalisation des TLRs a besoin d'une régulation fine afin de continuer à discriminer les bactéries commensales des

bactéries pathogènes et d'empêcher une réponse excessive de l'épithélium face aux bactéries commensales.

L'une des différences qui existe entre les bactéries commensales et pathogènes réside dans leur localisation: les bactéries commensales sont principalement retrouvées dans la lumière intestinale à l'extérieur de la couche de mucus tandis que les bactéries pathogènes ont développé des stratégies pour envahir et coloniser les tissus (Magalhaes *et al.*, 2007). De ce fait, l'un des mécanismes par lesquels les cellules épithéliales intestinales discriminent les bactéries commensales des bactéries pathogènes implique la régulation de l'expression et de la localisation des TLRs. En effet, dans des conditions basales, les cellules épithéliales intestinales expriment peu de TLR2 et TLR4, ce qui minimise l'activation de ces récepteurs par les produits bactériens (Abreu *et al.*, 2001; Melmed *et al.*, 2003). De plus, l'expression de TLR5 est présente seulement du côté basolatéral des cellules épithéliales intestinales alors que d'autres TLRs sont exprimés seulement dans les endosomes; ceci fait en sorte que l'activation de ces récepteurs peut être faite seulement par des bactéries pathogènes (Gewirtz *et al.*, 2001; Medzhitov, 2007). L'importance de la localisation des TLRs dans la maintenance de l'homéostasie intestinale est aussi illustrée par la signalisation du TLR9. En fait, l'activation du récepteur TLR9 par le côté apical n'active pas NF $\kappa$ B alors que du côté basolatéral, le peptide bactérien va entraîner l'activation de ce facteur de transcription (Lee *et al.*, 2006).

Les études *in vitro* montrent aussi qu'une exposition prolongée aux produits bactériens LPS ou LTA (lipotechoic acid) induit une diminution d'expression de TLRs à la surface des cellules épithéliales intestinales et une augmentation d'expression de Tollip (Toll-interacting protein), un régulateur négatif de la signalisation des TLRs qui agit en inhibant l'activité des kinases IRAK (Otte *et al.*, 2004; Zhang et Ghosh, 2002).

D'ailleurs, il existe plusieurs autres mécanismes de régulation négative de la signalisation des TLRs impliquant SIGIRR, ST2, PPAR $\gamma$ , A20 et IRAK-M (Brint *et al.*, 2004; Shibolet et Podolsky, 2007). Plus précisément, SIGGIR est un récepteur qui inhibe la signalisation des TLRs et du récepteur de l'IL-1 en séquestrant les protéines IRAK1 et TRAF6 (O'Neill, 2003; Wald *et al.*, 2003). Pour sa part, la protéine ST2 séquestre les protéines adaptatrices Myd88 et Mal ce qui empêche leur recrutement aux récepteurs TLRs

et donc l'activation de cette signalisation (Brint *et al.*, 2004). Finalement, PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) est un récepteur nucléaire qui s'associe à la sous-unité p65 (RelA) de NF $\kappa$ B ce qui contrôle son export nucléaire (Kelly *et al.*, 2004).

#### ***1.4. Les rôles de l'épithélium intestinal***

##### *1.4.1. Un rôle dans la digestion et l'absorption*

Les cellules de l'épithélium de l'intestin assurent plusieurs fonctions distinctes. Le rôle principal de l'intestin est la digestion et l'absorption des nutriments. Les entérocytes situés dans l'intestin grêle expriment plusieurs enzymes digestives dans leur bordure en brosse telles que la sucrase-isomaltase, l'aminopeptidase N et la lactase, participant à la digestion des sucres et des protéines. Ces cellules expriment aussi plusieurs transporteurs tels que les transporteurs de monosaccharides SGLT et GLUT, permettant l'absorption des produits de la digestion. Les colonocytes quant à eux absorbent l'eau, quelques électrolytes dont le sodium et le chlorure ainsi que certaines vitamines comme la vitamine K (Tortora et Grabowski, 1994).

##### *1.4.2. Un rôle de barrière physique*

En plus de leur fonction dans la digestion et l'absorption, les cellules épithéliales intestinales forment une barrière physique entre le milieu interne de l'hôte et le contenu de la lumière intestinale constitué essentiellement de bactéries, de virus et d'aliments non digérés.

Les cellules épithéliales intestinales sont reliées entre elles par des jonctions serrées et des jonctions adhérentes formant le complexe apical de jonction. Les jonctions serrées sont situées à l'apex des cellules épithéliales intestinales et sont composées de protéines transmembranaires (claudines, occludine et JAM) et de protéines adaptatrices comme ZO-1. Les jonctions adhérentes se localisent sous les jonctions serrées et contiennent des protéines telles que la E-cadhérine, l' $\alpha$ -caténine et la  $\beta$ -caténine (Hartsock et Nelson, 2008). Finalement, le complexe apical de jonction est relié au cytosquelette d'actine riche en

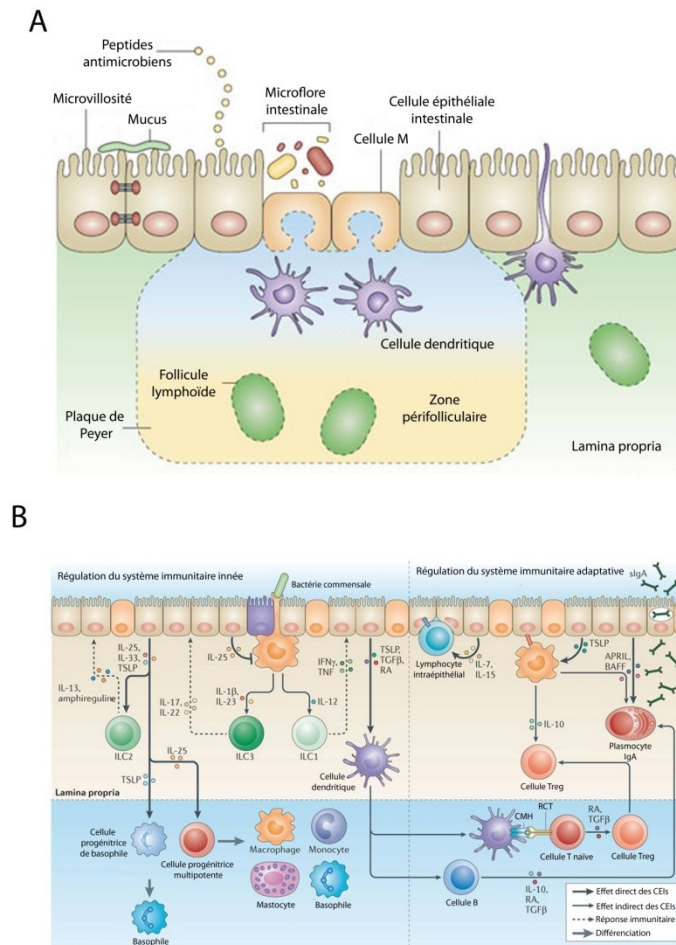


myosine de type II. Le rôle des jonctions serrées est d'assurer l'étanchéité entre les cellules en permettant seulement une perméabilité sélective et empêchant ainsi les bactéries de passer (Ivanov *et al.*, 2010) (Schéma 3A).

Les microvillosités de la bordure en brosse des cellules absorbantes constituent aussi une composante structurale importante de la barrière faite par l'épithélium intestinal. Elles sont présentes à l'apex des cellules absorbantes et empêchent les bactéries de s'y lier directement (Magalhaes *et al.*, 2007) (Schéma 3A).

#### *1.4.3. Un rôle dans la réparation de blessure*

Les cellules épithéliales intestinales forment une monocouche continue de cellules. Étant donné que l'épithélium intestinal subit régulièrement des petites blessures, il doit se réparer efficacement afin de ne pas perturber son intégrité et permettre l'entrée de bactéries. La réparation de blessure se fait via deux processus: la restitution et la régénération. La réparation de blessure débute par la restitution, un processus indépendant de la prolifération cellulaire. Lors d'une blessure, les cellules adjacentes à celle-ci vont perdre leur polarité, s'étaler et migrer afin de rétablir les contacts cellule-cellule et reformer une monocouche (Taupin et Podolsky, 2003). Plus en détail, la migration cellulaire se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, il y a formation à l'avant de la cellule de structures migratoires telles que des lamellipodes et des filopodes, c'est-à-dire des extensions membranaires faites de filaments d'actine. De nouveaux points d'adhésion se forment à l'avant de la cellule, ce qui permet l'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire. Les points d'adhésion sont formés de plusieurs protéines, dont les intégrines, des protéines transmembranaires, ainsi que de plusieurs protéines cytoplasmiques telles que la paxilline et la vinculine. Par la suite, il y a contraction des fibres de stress par la myosine de type II ce qui entraîne le désassemblage des points d'adhésion à l'arrière de la cellule. Celle-ci peut alors avancer (Parsons *et al.*, 2010). La régulation de la migration cellulaire est complexe et implique la coordination de plusieurs voies de signalisation impliquant les petites protéines G Rac, Rho et Cdc42 et leurs effecteurs comme ROCK ainsi que les voies de signalisation ERK1/2 et PI3K/AKT. L'expression de plusieurs facteurs de croissance est souvent induite dans les cellules adjacentes à la blessure dont l'EGF, le TGF $\alpha$  et le HGF (Taupin et Podolsky, 2003; Welf et



### Schéma 3: Les rôles de l'épithélium intestinal.

(A) Les cellules épithéliales intestinales forment une barrière entre le milieu interne de l'hôte et le contenu de la lumière intestinale constitué essentiellement de bactéries, de virus et d'aliments non digérés. L'épithélium intestinal joue un rôle de barrière physique via ses jonctions cellulaires et ses microvillosités. Aussi, il joue un rôle de barrière chimique via la sécrétion de mucus et de peptides antimicrobiens. (B) L'épithélium intestinal régule également la réponse immunitaire innée et adaptative en sécrétant diverses chimiokines et cytokines. Tirés et adaptés de Artis (2008) et de Peterson et Artis (2014).

Haugh, 2011). En cas de blessure importante, la restitution ne sera pas suffisante et il devra y avoir production de cellules (ou prolifération) pour remplacer celles qui ont été perdues: c'est la régénération (Taupin et Podolsky, 2003).

#### *1.4.4. Un rôle de barrière chimique*

L'épithélium intestinal agit aussi comme barrière chimique grâce aux cellules à mucus qui sécrètent des mucines qui vont former un gel servant à la fois de barrière aux bactéries et de réservoir de peptides antimicrobiens. En fait, le mucus forme deux couches: la couche interne normalement dépourvue de bactéries et la couche externe qui en contient (McGuckin *et al.*, 2009). De plus, les bactéries commensales et pathogènes trappées par le mucus sont évacuées par le mouvement péristaltique (Magalhaes *et al.*, 2007). Le mucus protège aussi les cellules épithéliales intestinales contre l'érosion produite par le passage des selles (Schéma 3A).

Les cellules de Paneth et les cellules absorbantes participent également au rôle de barrière chimique de l'épithélium intestinal via la sécrétion de peptides antimicrobiens. Plus précisément, les peptides antimicrobiens perméabilisent la paroi des bactéries ce qui limite la colonisation de l'intestin par des bactéries pathogènes et affecte la composition de la microflore commensale (Gallo et Hooper, 2012). De plus, le peptide antimicrobien Reg3 $\gamma$  maintient une distance d'environ 50 $\mu$ m entre les bactéries et l'épithélium intestinal, ce qui limite l'association des bactéries avec les cellules épithéliales intestinales (Vaishnava *et al.*, 2011) (Schéma 3A).

#### *1.4.5. Un rôle dans l'immunité innée et adaptative*

Les cellules épithéliales intestinales régulent la réponse immunitaire en sécrétant plusieurs types de chimiokines servant au recrutement des cellules immunitaires comme les neutrophiles (CXCL1, CXCL5, CXCL8), les monocytes (CCL2, CXCL9, CX3CL1), les éosinophiles (CCL5, CCL11, CCL28), les cellules dendritiques (CCL20) et les lymphocytes (CCL5, CCL22, CCL25, CCL27, CCL28, CXCL10, CXCL11). Aussi, les

cellules épithéliales intestinales peuvent sécréter plusieurs cytokines incluant l'IL-1, -6, -10, -15, -18 et le TGF $\alpha$  (Stadnyk, 2002).

La réponse immunitaire innée est notre première ligne de défense contre les pathogènes. Elle engendre une immunité non spécifique et ne confère pas de mémoire immunologique. Elle implique des cellules immunitaires comme les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les cellules lymphoïdes innées ainsi que les cellules épithéliales intestinales et les myofibroblastes. Parmi les réponses immunitaires innées, il y a la reconnaissance des produits bactériens par les PRRs présents notamment sur les cellules épithéliales intestinales, ce qui induit la synthèse de produits antimicrobiens, de cytokines et de chimiokines jouant un rôle crucial dans la défense de l'hôte contre une infection par des pathogènes (Kelly *et al.*, 2004; Vaishnava *et al.*, 2008). Les cellules épithéliales intestinales ont aussi la capacité de sécréter des cytokines comme IL-25 et TSLP (thymic stromal lymphopoietin) permettant l'expansion et la différenciation des cellules progénitrices multipotentes de type 2 et des cellules progénitrices de basophiles respectivement (Peterson et Artis, 2014) (Schéma 3B).

La réponse immunitaire adaptative est une réponse immunitaire spécifique qui induit une mémoire immunologique et qui implique principalement les lymphocytes T et B. Les cellules épithéliales intestinales participent aussi à l'immunité adaptative. Par exemple, les plaques de Peyers sont recouvertes de cellules épithéliales intestinales, les cellules M. Ces cellules capturent les antigènes présents dans la lumière intestinale et les présentent aux cellules dendritiques (Neutra *et al.*, 2001). Les cellules dendritiques vont à leur tour présenter l'antigène aux cellules T naïves ce qui va permettre leur différenciation. Les cellules épithéliales intestinales peuvent aussi réguler les fonctions des cellules dendritiques par la sécrétion de molécules immunorégulatrices comme le TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) et le TSLP (Artis, 2008). De plus, les cellules épithéliales intestinales peuvent affecter les lymphocytes B en sécrétant la cytokine APRIL (a proliferation inducing ligand), en réponse à la microflore, ce qui favorise la production d'IgA (Shang *et al.*, 2008). Les cellules épithéliales intestinales vont aussi permettre la transcytose des IgA au travers de l'épithélium à l'aide du récepteur pIgR (polymeric immunoglobulin receptor) (Johansen et Kaetzel, 2011). Dans la lumière intestinale, ces IgA serviront, par la suite, à protéger

l'épithélium intestinal contre les pathogènes (Macpherson *et al.*, 2008). Finalement, les cellules épithéliales intestinales sécrètent aussi la cytokine BAFF (B cell-activating factor) impliquée dans la prolifération et la différenciation des cellules B (Xu *et al.*, 2007) (Schéma 3B).

### ***1.5. Les voies de signalisation régulant la prolifération et la détermination cellulaires***

L'épithélium intestinal se renouvelle aux trois à cinq jours (Barker, 2014). Un équilibre entre la production des cellules différenciées, leur migration dans la villosité vers la lumière intestinale et leur élimination par apoptose maintient l'homéostasie intestinale (Bjerknes et Cheng, 2005). Ainsi, une fine régulation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération ainsi que dans la détermination et la différenciation des cellules épithéliales intestinales est primordiale.

#### *1.5.1. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine*

Les facteurs de croissance de la famille des Wnts sont des glycoprotéines surtout sécrétées par les cellules mésenchymateuses, mais aussi par les cellules épithéliales notamment les cellules de Paneth. Les Wnts sont capables d'activer plusieurs voies de signalisation intracellulaire dont la voie canonique (dépendante des facteurs TCF/LEF (T cell factor/lymphocyte enhancer factor)) et les voies non-canoniques (indépendantes des facteurs TCF/LEF et impliquant la mobilisation du calcium, l'activation de la PKC, de CamKII et des petites GTPases Rho et Rac) (Miller, 2002).

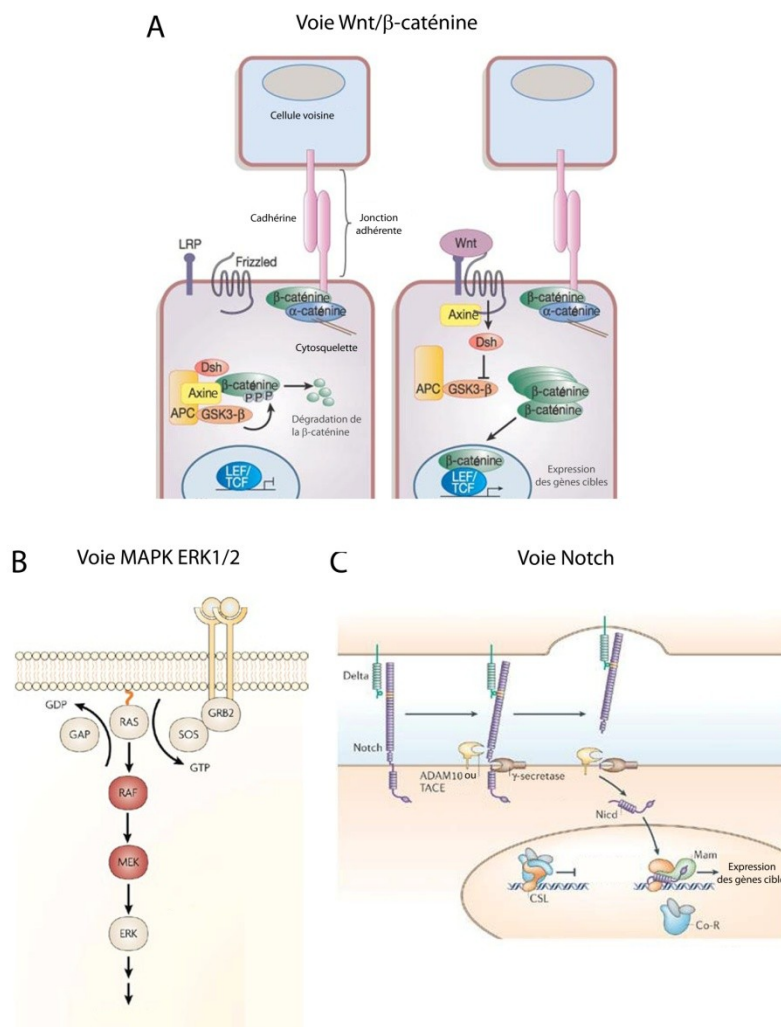
La voie Wnt/ $\beta$ -caténine, ou voie canonique, inactive en absence de facteurs Wnts (Wnt1, Wnt3a et Wnt8), entraîne la dégradation de la  $\beta$ -caténine non liée à la E-cadhérine grâce au complexe formé des protéines d'échafaudage APC (adenomatous polyposis coli) et AXINE1 ainsi que des kinases GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3  $\beta$ ) et CKI $\alpha$  (casein kinase I). La kinase CKI $\alpha$  phosphoryle en premier la  $\beta$ -caténine sur la S45 puis la kinase GSK3 $\beta$  phosphoryle les résidus T41, S37 et S33, permettant une reconnaissance par la  $\beta$ TrCP résultant en l'ubiquitination et en la dégradation de la  $\beta$ -caténine par le protéasome (Amit *et al.*, 2002; Hart *et al.*, 1999; Rubinfeld *et al.*, 1996). Dans le noyau, les facteurs

TCF/LEF sont liés au corépresseur Groucho inhibant l'expression des gènes cibles de cette voie de signalisation (Roose *et al.*, 1998). Toutefois, suite à la liaison de Wnt avec les récepteurs Frizzled et les corécepteurs LRP5/6 (low-density lipoprotein receptor-related protein), le complexe de dégradation est désassemblé et la  $\beta$ -caténine n'est donc plus phosphorylée et dégradée. Il y a alors une accumulation de  $\beta$ -caténine qui peut transloquer au noyau, lier les facteurs de transcription TCF/LEF (principalement TCF4 dans l'intestin) et permettre la transcription de ces gènes cibles tels que la *CCND1* (cycline D1) (Tetsu et McCormick, 1999) et *C-MYC* (He *et al.*, 1998) (Schéma 4A).

Dans l'intestin grêle, l'expression de Wnt3, Wnt6 et Wnt9b est présente dans le fond des cryptes, tandis que dans le côlon, seulement Wnt6 et Wnt9b sont détectés. Les récepteurs Frizzled 5, 6, et 7 ainsi que des corécepteurs LRP5 et 6 sont exprimés par les cellules épithéliales de la crypte (Gregorieff *et al.*, 2005). La voie Wnt/ $\beta$ -caténine joue ainsi un rôle essentiel dans l'intestin à plusieurs niveaux: dans la prolifération des cellules souches et progénitrices, dans la migration et la localisation des cellules épithéliales le long de l'axe crypte-villosité ainsi que dans la détermination et la différenciation des cellules de Paneth (Scoville *et al.*, 2008).

Plusieurs modèles murins démontrent que l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est indispensable au maintien du compartiment prolifératif de l'intestin. Par exemple, les souris n'exprimant pas le facteur de transcription *Tcf4* meurent rapidement après la naissance puisque l'espace intervillositaire, soit la région précurseure des cryptes contenant normalement les cellules prolifératives, est remplacé par des cellules non-prolifératives (Korinek *et al.*, 1998). Aussi, l'expression ectopique de *Dkk1* (Dickkopf-1), un antagoniste du corécepteur LRP6 (Ahn *et al.*, 2011), entraîne une diminution drastique de la prolifération cellulaire résultant en une perte des cryptes intestinales (Pinto *et al.*, 2003). À l'inverse, une suractivation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, par la perte d'expression d'*Apc* dans les cellules épithéliales intestinales, entraîne une hyperprolifération cryptale (Andreu *et al.*, 2005).

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine contrôle aussi l'expression des récepteurs EphB2 et EphB3 ainsi que des ligands éphrine B1 et éphrine B2. Chez la souris, la délétion de l'*EphB2* et de l'*EphB3* entraîne une mauvaise localisation, respectivement, des cellules progénitrices et



**Schéma 4: Les voies de signalisation régulant la prolifération et la détermination cellulaires.**

(A) La voie Wnt/ $\beta$ -caténine est inactive en absence de facteurs Wnts, ce qui entraîne la dégradation de la  $\beta$ -caténine via un complexe formé des protéines d'échafaudage APC et AXINE1 ainsi que des kinases GSK3 $\beta$  et CK1 $\alpha$ . En présence de Wnts, le complexe de dégradation est désassemblé, ce qui permet une accumulation de la  $\beta$ -caténine qui peut alors transloquer au noyau, se lier aux facteurs de transcription TCF/LEF pour permettre la transcription des gènes cibles. (B) La voie MAPK ERK1/2 est activée principalement par les facteurs de croissance classiques ainsi que par des hormones, des cytokines et des produits bactériens. Les facteurs de croissance lient des récepteurs à activité tyrosine kinase ce qui entraîne l'activation de la petite protéine G RAS. RAS va activer la kinase RAF qui va phosphoryler et activer MEK1 et MEK2 qui, à leur tour, vont phosphoryler et activer ERK1 et ERK2. (C) La voie Notch s'active suite à la liaison du récepteur Notch avec son ligand ce qui entraîne une série de clivages protéolytiques par des enzymes, comme la  $\gamma$ -sécrétase, générant un récepteur de Notch clivé appelé NICD. Suite à la translocation de NICD au noyau, ce dernier peut lier le facteur de transcription RBP-jk (CSL) et permettre l'expression de ses gènes cibles. Tirés et adaptés de Reya et Clevers (2005), Sharma *et al.* (2007) et Bray (2006).

des cellules de Paneth (Batlle *et al.*, 2002). Dans l'intestin grêle, l'EphB2 est exprimée par les cellules souches et son expression décroît jusqu'au haut de la crypte. L'EphB3 est exprimée à la fois par les cellules souches, mais aussi par les cellules de Paneth. Inversement, les ligands éphrine B1 et éphrine B2 ont une expression forte tout le long de la villosité et cette expression diminue à partir de la jonction crypte-villosité jusqu'au fond de la crypte. Les cellules de Paneth n'expriment pas de ligand éphrine. Par conséquent, des niveaux différents d'Eph et d'éphrine sont présents dépendamment de la position des cellules selon l'axe crypte-villosité. L'effet répulsif entre le récepteur et son ligand permet aux cellules de bien se positionner; plus une cellule monte dans la crypte, plus l'expression des Ephs diminue et plus l'expression des éphrines augmente ce qui prévient une migration descendante des cellules. Par contre, étant donné que les cellules de Paneth n'expriment pas de ligand éphrine, la migration ascendante est inhibée faisant en sorte que les cellules de Paneth restent au fond des cryptes (Scoville *et al.*, 2008).

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine joue aussi un rôle critique dans la détermination et la différenciation des cellules de Paneth dans l'intestin. En effet, l'activation constitutive de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par la perte d'expression d'*Apc* entraîne une augmentation du nombre de cellules de Paneth dans l'intestin grêle de même que l'apparition de cellules de Paneth *de novo* dans le côlon des souris. Une augmentation des marqueurs de différenciation associés aux cellules de Paneth a aussi été détectée (Andreu *et al.*, 2008). De plus, le facteur de transcription Sox9 est un gène cible de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. La délétion conditionnelle de *Sox9* dans les cellules épithéliales intestinales chez la souris entraîne une disparition des cellules de Paneth sans affecter les autres types cellulaires différenciés (Mori-Akiyama *et al.*, 2007) (Schéma 5).

### 1.5.2. La voie MAP Kinase ERK1/2

La voie ERK1/2 est principalement activée par des facteurs de croissance classiques tels que l'EGF et le TGF $\alpha$  ainsi que par des hormones, des cytokines et des produits bactériens. Les facteurs de croissance lient des récepteurs à activité tyrosine kinase pour enclencher la cascade de signalisation qui implique généralement la petite protéine G RAS. Sous sa forme active liée au GTP, RAS recrute à la membrane plasmique la kinase RAF, ce



qui l'active. À son tour, RAF active les kinases MEK1/2 par phosphorylation sur sérines (S217/S221). MEK1/2 phosphorylent alors sur thréonine et tyrosine les kinases ERK1/2 (T202/Y207). Les kinases ERK1/2 maintenant activées peuvent phosphoryler à leur tour une variété de substrats cytoplasmiques tels que la kinase RSK modulant la synthèse protéique ou bien transloquer au noyau pour phosphoryler plusieurs facteurs de transcription comme Elk-1 et c-Myc (Avruch, 2007; Ramos, 2008) (Schéma 4B).

Plusieurs travaux ont montré que l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 est importante pour la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Tout d'abord, dans l'épithélium intestinal humain, les formes actives de ERK1/2 sont détectées principalement dans le noyau des cellules de la zone proliférative (Aliaga *et al.*, 1999). De plus, le facteur de croissance EGF, un mitogène pour les cellules épithéliales intestinales (Baliga *et al.*, 1989), induit une activation soutenue de ERK1/2 qui corrèle avec l'entrée en phase S du cycle cellulaire des cellules épithéliales intestinales (Aliaga *et al.*, 1999; Rivard *et al.*, 1999). Plus spécifiquement, l'activation de ERK1/2 permet notamment l'induction de la cycline D1 (Boucher *et al.*, 2004) ainsi que l'expression de c-Myc (Lee *et al.*, 2010), deux facteurs clés impliqués dans la progression du cycle cellulaire. De plus, l'activation des kinases ERK1/2 dans les cellules épithéliales intestinales est requise pour diminuer les niveaux protéiques de p27 (Rivard *et al.*, 1999), un inhibiteur des complexes cycline/Cdks impliqué dans la quiescence cellulaire et l'arrêt du cycle cellulaire (Coats *et al.*, 1996; Rivard *et al.*, 1996). Finalement, chez les souris exprimant une forme constitutive active de RAS ( $KRas^{G12D}$ ) spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales, une forte augmentation de la prolifération cellulaire est observée (Feng *et al.*, 2011).

Certaines études suggèrent aussi que la voie ERK1/2 module la détermination cellulaire dans l'intestin grêle. En effet, Feng et collaborateurs ont observé une augmentation du nombre de cellules à mucus ainsi qu'une perte des cellules de Paneth dans l'intestin grêle des souris exprimant un  $KRas^{G12D}$  dans l'épithélium intestinal. Le traitement de ces souris avec un inhibiteur pharmacologique de MEK (CI-1040) restaure l'effet de  $KRas^{G12D}$  sur le nombre de cellules à mucus et de cellules de Paneth (Feng *et al.*, 2011). De plus, Heuberger et collaborateurs ont récemment démontré que la voie ERK1/2 contrôle la détermination cellulaire des cellules de Paneth et à mucus dans l'intestin grêle. Plus

précisément, une diminution de l'activation de la voie ERK1/2 dans le grêle résulte en une diminution du nombre de cellules à mucus au profit d'une augmentation du nombre de cellules de Paneth (Heuberger *et al.*, 2014).

Des études effectuées sur des cellules épithéliales intestinales *in vitro* suggèrent que la cascade de signalisation ERK1/2 régule également la différenciation des cellules absorbantes. D'ailleurs, une forte diminution d'activité de ERK1/2 est observée au cours de la différenciation des entérocytes (Aliaga *et al.*, 1999; Taupin et Podolsky, 1999). Si cette baisse d'activité ERK1/2 est contrecarrée par l'expression d'une forme constitutive active de MEK1, l'expression des marqueurs de différenciation morphologique (E-cadhérine) et fonctionnelle (sucrase-isomaltase, lactase) est bloquée. La phosphorylation du facteur de transcription Cdx2 par les kinases ERK1/2 serait responsable de l'inhibition de la différenciation induite par l'hyperactivation de MEK1 (Lemieux *et al.*, 2011).

### 1.5.3. La voie Notch

Les ligands transmembranaires Dll1 (delta-like), Dll4 et Jagged-1 de même que le récepteur Notch1 sont exprimés par les cellules épithéliales intestinales de la crypte (Schroder et Gossler, 2002). La liaison du récepteur Notch avec son ligand entraîne une série de clivage protéolytique par des enzymes, comme la  $\gamma$ -sécrétase, générant un récepteur de Notch clivé appelé NICD. Suite à la translocation de NICD au noyau, ce dernier peut lier le facteur de transcription RBP-j $\kappa$  (CSL) et permettre l'expression de ses gènes cibles dont *Hes1* (hairy/enhancer of split) (Scoville *et al.*, 2008) (Schéma 4C).

Dans l'épithélium intestinal, la voie de Notch joue un rôle crucial dans la détermination cellulaire entre les cellules absorbantes et les cellules de la lignée sécrétrice (cellule à mucus, cellule de Paneth et cellule entéroendocrine) ainsi que dans le maintien du compartiment prolifératif. Par exemple, le traitement de souris avec un inhibiteur pharmacologique de la  $\gamma$ -sécrétase inhibe l'activation de la voie de Notch dans l'épithélium intestinal et transforme les cellules prolifératives de la crypte en cellules à mucus (van Es *et al.*, 2005). À l'inverse, une suractivation de la voie de Notch par l'expression spécifique de *NICD* dans l'épithélium intestinal engendre une augmentation de la prolifération en plus

d'entraîner une perte de cellules à mucus ainsi qu'une réduction importante du nombre de cellules de Paneth et de cellules entéroendocrines (Fre *et al.*, 2005). L'invalidation du gène de *Hes1*, un des principaux gènes cibles de la voie de Notch (Stanger *et al.*, 2005), entraîne la mort des embryons de souris. Néanmoins, les animaux présentent une augmentation de cellules de Paneth, de cellules à mucus et de cellules entéroendocrines au détriment d'une diminution de cellules absorbantes (Jensen *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2005) (Schéma 5).

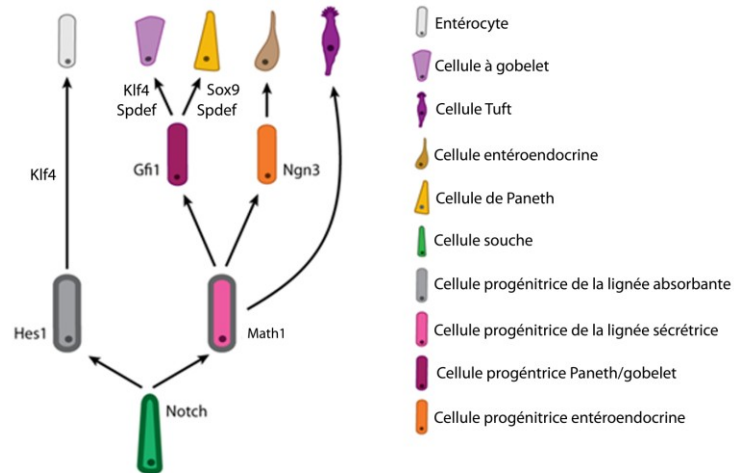
Finalement, il faut mentionner que l'expression du facteur de transcription *Math1* est réprimée par *Hes1* (Zheng *et al.*, 2011). Or, l'expression de *Math1* dans les cellules épithéliales intestinales est essentielle à la détermination vers les cellules de la lignée sécrétrice. En effet, les souris n'exprimant plus *Math1* ne possèdent que des cellules absorbantes dans leur intestin (Yang *et al.*, 2001) (Schéma 5).

#### *1.5.4. Autres signalisations impliquées dans la détermination et la différenciation des cellules de l'intestin grêle*

En plus de *Hes1* et *Math1*, d'autres facteurs de transcription régulent la détermination et la différenciation cellulaire tels que *Gfi1*, *Klf4*, *Spdef* et *Ngn3* (Noah et Shroyer, 2013) (Schéma 5).

*Gfi1* est un facteur de transcription impliqué dans la détermination des cellules de la lignée sécrétrice. En fait, l'invalidation de *Gfi1* chez la souris entraîne une perte des cellules de Paneth, une diminution marquée de cellules à mucus ainsi qu'une augmentation importante du nombre de cellules entéroendocrines (Shroyer *et al.*, 2005). Plus précisément, *Gfi1* fonctionne en aval de *Math1* dans la détermination cellulaire.

*Klf4* (Kruppel-like factor 4) promeut la différenciation des cellules à mucus. Les souris *Klf4*<sup>-/-</sup> présentent une diminution de 90% du nombre de cellules à mucus matures (Katz *et al.*, 2002). Aussi, la délétion de *Klf4* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales montre que *Klf4* contrôle la maturation des cellules à mucus, mais aussi des entérocytes et des colonocytes. Aucun effet sur les cellules entéroendocrines n'a été observé (Ghaleb *et al.*, 2011). Finalement, l'inhibition de l'activation de Notch par l'utilisation d'un



### Schéma 5: La détermination des cellules de l'épithélium intestinal.

Le facteur de transcription Hes1 est un gène cible de la voie Notch qui inhibe l'expression de Math1. Hes1 est essentiel à la détermination cellulaire vers les cellules absorbantes tandis que Math1 est essentiel à la détermination cellulaire de la lignée sécrétrice. D'autres facteurs de transcription participent aussi au contrôle de la détermination et de la différenciation des cellules de l'intestin. Le facteur Ngn3 contrôle la production des cellules entéroendocrines, les facteurs de transcription Gfi1, Spdef et Klf4 contrôlent la production des cellules à gobelet tandis que les facteurs de transcription Gfi1, Spdef et Sox9 contrôlent celle des cellules de Paneth. Tiré et adapté de Noah et Shroyer (2013).

inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase induit une augmentation d'expression de *Klf4* suggérant que *Klf4* est aussi régulé par la signalisation de Notch (Zheng *et al.*, 2009).

Le facteur de transcription *Spdef* est impliqué dans la différenciation terminale des cellules de Paneth et des cellules à mucus (Gregorieff *et al.*, 2009). De plus, une augmentation d'expression de *Spdef* dans les cellules épithéliales intestinales chez la souris entraîne une augmentation du nombre de cellules à mucus au détriment des autres types cellulaires différenciés (entérocytes, cellules de Paneth et cellules entéroendocrines) (Noah *et al.*, 2010).

Finalement, la neurogenine 3 (*Ngn3*) est essentielle à la détermination des cellules entéroendocrines. Les souris *Ngn3*<sup>-/-</sup> ne développent pas de cellules entéroendocrines faisant en sorte que les principales hormones intestinales (CCK, sécrétine, GIP, etc.) ne sont pas produites (Jenny *et al.*, 2002).

## ***1.6. Les maladies inflammatoires intestinales***

Il existe plusieurs pathologies affectant le tube digestif dont les maladies inflammatoires intestinales qui comprennent principalement deux maladies: la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn. Les patients atteints de ces maladies souffrent de façon fréquente et chronique de diarrhée, de douleurs abdominales, de saignements rectaux et de malnutrition (Cho, 2008; Cho et Brant, 2011). Au Canada, environ 233 000 personnes sont atteintes d'une maladie inflammatoire intestinale dont 129 000 personnes souffrent de la maladie de Crohn et 104 000 de la colite ulcéreuse. Aussi, chaque année, plus de 10 200 nouveaux cas sont diagnostiqués, ce qui fait que le Canada est l'un des pays le plus touché par ces maladies (selon la Fondation Crohn et Colite Canada).

### ***1.6.1. La maladie de Crohn et la colite ulcéreuse***

La maladie de Crohn est une maladie qui peut s'attaquer à toutes les parties du tube digestif, de la bouche à l'anus, mais qui touche principalement la fin de l'iléon et le côlon. L'inflammation est généralement transmurale, discontinue et les zones enflammées sont

entrecoupées de régions saines. Sur des coupes histologiques, des agrégations de macrophages formant des granulomes sont fréquemment observées (Xavier et Podolsky, 2007).

La colite ulcéreuse affecte plutôt une région localisée du tube digestif soit le côlon, l'anus et le rectum. L'inflammation est superficielle et n'affecte que la muqueuse et la sous-muqueuse. Au niveau histologique, la colite ulcéreuse se caractérise par une forte infiltration de neutrophiles dans la lamina propria et les cryptes où ils forment des abcès de cryptes (Xavier et Podolsky, 2007).

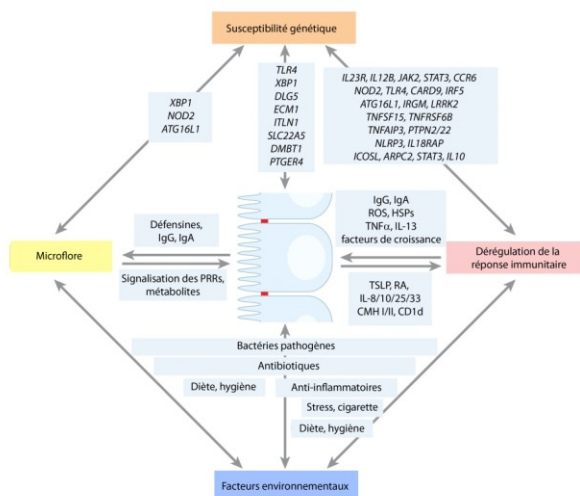
Plusieurs traitements sont utilisés pour traiter les maladies inflammatoires intestinales dont des médicaments anti-inflammatoires comme la sulfasalazine et l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA), les stéroïdes, les antibiotiques, les agents biologiques (anticorps bloquant le TNF $\alpha$ ) et les immunomodulateurs (selon la Fondation Crohn et Colite Canada). Dans certains cas très graves, il peut y avoir résection de la zone enflammée.

### *1.6.2. Les causes de l'inflammation intestinale*

La cause exacte des maladies inflammatoires intestinales est mal comprise. Toutefois, plusieurs facteurs influencent l'initiation et la progression de l'inflammation chez les patients dont la prédisposition génétique, la sensibilité de l'épithélium et la réponse immunitaire de l'hôte, la microflore intestinale ainsi que les facteurs environnementaux tels que la cigarette, la diète, le stress ainsi que la prise d'anti-inflammatoires et d'antibiotiques (Corridoni *et al.*, 2014). En fait, l'inflammation intestinale résulterait d'une réponse immunitaire anormale à la microflore intestinale chez une personne génétiquement susceptible (Kaser *et al.*, 2010) (Schéma 6).

#### *1.6.2.1. Les facteurs génétiques*

Les maladies inflammatoires intestinales sont considérées comme des maladies polygéniques, c'est-à-dire causées par l'altération de plusieurs gènes. Dans 5-10% des cas, la maladie est familiale tandis que dans le reste des cas, elle est sporadique (Halme *et al.*,



### Schéma 6: Les maladies inflammatoires intestinales.

Plusieurs facteurs influencent l'initiation et la progression de l'inflammation chez les patients dont la prédisposition génétique, la sensibilité de l'épithélium et la réponse immunitaire de l'hôte, la microflore intestinale ainsi que les facteurs environnementaux. Tiré et adapté de Kaser *et al.* (2010).

2006). La concordance phénotypique entre jumeaux monozygotes souffrants de la maladie de Crohn est de 50-75% et le risque relatif de développer cette maladie est 800 fois plus élevé par rapport à la population générale. Pour la colite ulcéreuse, la concordance phénotypique entre jumeaux monozygotes est moins fréquente, soit entre 10-20% (Halme *et al.*, 2006). Ces observations suggèrent que les maladies inflammatoires intestinales résultent de facteurs génétiques, mais aussi de facteurs non génétiques.

Dernièrement, des études ont mis en évidence 163 gènes de susceptibilité aux maladies inflammatoires intestinales dont 110 sont associés aux deux maladies, 30 sont spécifiques à la maladie de Crohn et 23 à la colite ulcéreuse (Barrett *et al.*, 2008; Corridoni *et al.*, 2014; Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007). Ces études indiquent que les deux pathologies partagent de nombreuses altérations génétiques communes et, par conséquent, des mécanismes d'action similaires. Les polymorphismes retrouvés chez les patients atteints de la maladie de Crohn touchent principalement des gènes impliqués dans le contrôle de l'immunité innée et de l'autophagie. Pour la colite ulcéreuse, les variantes génétiques sont principalement liées au contrôle de la fonction barrière de l'épithélium intestinal (Corridoni *et al.*, 2014; Khor *et al.*, 2011).

Le premier gène identifié et le plus spécifique de la maladie de Crohn est le gène *NOD2* situé sur le chromosome 16q12 (Hugot *et al.*, 2001). Un variant de ce gène est présent chez un malade sur deux de même que chez 15% des sujets sains. *NOD2* est impliqué dans la défense de l'hôte et plus particulièrement, dans la réponse antimicrobienne des cellules de Paneth (Kobayashi *et al.*, 2005). Depuis la découverte de *NOD2*, des polymorphismes sur d'autres récepteurs PRRs tels que *TLR1*, *TLR2*, *TLR4* et *TLR9* ont aussi été associés aux maladies inflammatoires intestinales (Brand *et al.*, 2005; Pierik *et al.*, 2006; Torok *et al.*, 2009).

Un autre gène de susceptibilité à la maladie de Crohn est *ATG16L1* impliqué dans l'autophagie, un processus responsable de la dégradation de composantes cellulaires et de certains microorganismes intracellulaires (Amano *et al.*, 2006). D'ailleurs, l'expression d'*ATG16L1* par les cellules épithéliales intestinales est essentielle pour combattre une infection bactérienne par la *Salmonelle* (Conway *et al.*, 2013). Des variations génétiques



dans le gène *IRGM*, également impliqué dans l'autophagie, ont été associées à la maladie de Crohn.

Une autre voie qui a été associée aux maladies inflammatoires intestinales est la voie IL-23/Th17. Plus en détail, l'IL-23 est impliquée dans le développement des cellules Th17 (Hue *et al.*, 2006). Des polymorphismes dans les gènes *IL23R* (interleukin-23 receptor), *IL12B* (interleukin-12B) et *STAT3* (signal transducer activator of transcription 3) ont été détectés tant dans la maladie de Crohn que dans la colite ulcéreuse (Abraham et Cho, 2009).

Finalement, dans la colite ulcéreuse, plusieurs gènes de susceptibilité régulant le rôle de barrière de l'épithélium intestinal ont été répertoriés dont certains contrôlent les jonctions (*GNAI2*, *HNF4A* et *CDH1*), la polarité (*HNF4A*) et la restitution (*ERRF1* et *HNF4A*) (Khor *et al.*, 2011).

#### 1.6.2.2. La réponse immunitaire

Des dérégulations de la réponse immunitaire innée et adaptative participent à l'inflammation intestinale (Geremia *et al.*, 2014). L'immunité innée est notre première ligne de défense et fait intervenir plusieurs types cellulaires dont les cellules épithéliales intestinales et des cellules immunitaires comme les neutrophiles, les macrophages et les cellules lymphoïdes innées.

Dans les cellules épithéliales intestinales, la signalisation des TLRs doit être finement contrôlée. Toutefois, dans les maladies inflammatoires intestinales, une dérégulation de la signalisation des TLRs est souvent observée. Tout d'abord, la signalisation des TLRs est régulée négativement par plusieurs mécanismes dont la protéine SIGIRR. En fait, une diminution d'expression de cette protéine est visualisée dans les cellules épithéliales intestinales chez les patients ayant une maladie inflammatoire intestinale (Kadota *et al.*, 2010). Une augmentation des cytokines TNF $\alpha$ , IL-6 et IFN $\gamma$  de même que des chimiokines CXCL1, CXCL2 et CCL2 est aussi observée chez les souris *Sigirr*<sup>-/-</sup>, sans que ces souris développent spontanément une colite (Xiao *et al.*, 2007). Une

augmentation d'expression de TLR2 et TLR4 est également observée dans les cellules épithéliales intestinales des patients atteints de maladies inflammatoires intestinales suggérant que ces cellules ont une capacité plus grande à répondre à la microflore (Cario et Podolsky, 2000; Frolova *et al.*, 2008). *In vitro*, le traitement de cellules épithéliales intestinales aux cytokines pro-inflammatoires IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$  induit une augmentation d'expression de TLR4 (Abreu *et al.*, 2002). Finalement, plusieurs polymorphismes sont retrouvés dans les PRRs chez les patients ayant une maladie inflammatoire intestinale, tel que décrit précédemment.

Dans les maladies inflammatoires intestinales, une plus grande expression de plusieurs chimiokines est détectée (Atreya et Neurath, 2010). Par exemple, une augmentation de CXCL8, une chimiokine servant au recrutement des neutrophiles, est observée chez les patients atteints de colite ulcéreuse comparativement aux patients sains. Plusieurs types cellulaires peuvent sécréter du CXCL8 dont les macrophages, les neutrophiles, les fibroblastes et les cellules épithéliales intestinales (Atreya et Neurath, 2010). D'ailleurs, dans la colite ulcéreuse, un recrutement massif de neutrophiles est observé (Naito *et al.*, 2007). Toutefois, le rôle de ces cellules immunitaires lors de la colite reste controversé à savoir si la présence de neutrophiles est bénéfique ou néfaste (Fournier et Parkos, 2012). Les macrophages sont des phagocytes qui sont aussi capables de présenter des antigènes aux cellules T. Dans la maladie de Crohn, il y a une accumulation de macrophages pro-inflammatoires capables de sécréter de grande quantité d'IL-1, IL-6 et TNF $\alpha$  ainsi que des ROS (espèces réactives oxygénées) et des RNS (espèces réactives azotées) et ce, contrairement aux macrophages résidents normaux (Bain et Mowat, 2014). Finalement, chez les patients atteints de la maladie de Crohn, il y a une accumulation de cellules lymphoïdes innées de type 1, sécrétant des cytokines comme l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  (Bernink *et al.*, 2013), de même que des cellules lymphoïdes innées de type 3, sécrétant de l'IL-17, IL-22 et de l'IFN $\gamma$  en réponse à l'IL-23 (Geremia *et al.*, 2011).

La réponse immunitaire adaptative est spécifique et induit une mémoire immunologique. Les cellules T sont les principales cellules du système immunitaire adaptatif. Les cellules T naïves sont activées et se différencient soit en cellules Th1, Th2 ou Th17. Une réponse anormale des cellules T est observée dans les maladies inflammatoires

intestinales. Dans la maladie de Crohn, une réponse Th1 excessive est observée; en effet, les cellules T des patients ayant cette maladie produisent une plus grande quantité d'IL-2 et IFN $\gamma$  que les cellules T des patients témoins ou atteints de la colite ulcéreuse (Breese *et al.*, 1993). Chez les patients ayant la colite ulcéreuse, une plus grande quantité d'IL-5 et d'IL-13 est produite comparativement aux patients atteints de la maladie de Crohn (Fuss *et al.*, 1996). Ainsi, la maladie de Crohn est décrite comme ayant une réponse Th1 excessive tandis que la colite ulcéreuse a plutôt une réponse Th2 excessive. Les cellules Th17 produisent plusieurs cytokines, dont l'IL-17A. Une augmentation de production d'IL-17A de même que du nombre de cellules Th17 est détectée tant dans la maladie de Crohn que dans la colite ulcéreuse (Rovedatti *et al.*, 2009). Finalement, les cellules T régulatrices suppriment la prolifération des cellules T naïves et maintiennent l'homéostasie de l'intestin en supprimant une réponse immunitaire anormale face aux bactéries commensales. Ces cellules sécrètent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF $\beta$ . Une diminution du nombre de cellules T régulatrices est présente chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales, néanmoins les cellules restantes sont fonctionnelles lors d'essai *in vitro* (Boden et Snapper, 2008).

#### 1.6.2.3. La microflore intestinale

Jusqu'à présent, il n'a pas été démontré si l'inflammation intestinale peut être causée par des bactéries pathogènes (Nell *et al.*, 2010). Néanmoins, la microflore intestinale joue un grand rôle dans le développement de ces maladies puisque le traitement des patients avec des antibiotiques ou des bactéries probiotiques entraîne des effets très bénéfiques et soulage les patients (Gionchetti *et al.*, 2003; Sutherland *et al.*, 1991). Aussi, la majorité des modèles murins développant spontanément une colite dans une animalerie conventionnelle n'en développent pas dans un environnement stérile (Kim *et al.*, 2005). Des études récentes ont montré une composition anormale de la microflore intestinale, soit une dysbiose, chez les patients souffrant de maladies inflammatoires intestinales (Manichanh *et al.*, 2012). L'inflammation est généralement associée à une diminution des *Bacteroides* et des *Firmicutes* de même qu'à une augmentation des *Enterobacteriaceae* (Lupp *et al.*, 2007). Récemment, une étude a démontré que le transfert d'une flore anormale provenant d'une

souris *Nod2*<sup>-/-</sup> vers une souris de type sauvage rend cette dernière plus sensible à une colite chimique (Couturier-Maillard *et al.*, 2013). Toutefois, ce n'est pas clair si un changement dans la composition de la microflore peut à lui seul initier de l'inflammation intestinale.

#### 1.6.2.4. La barrière intestinale

Un dysfonctionnement de la barrière intestinale permet aux bactéries commensales de pénétrer la muqueuse, augmentant ainsi le risque de déclencher une réponse inflammatoire dans la lamina propria (Turner, 2009). Chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales, une augmentation de la perméabilité paracellulaire est observée (Mankertz et Schulzke, 2007). Plus précisément, cette hausse de perméabilité est souvent associée à un changement du niveau d'expression des protéines formant les jonctions serrées. Par exemple, une augmentation d'expression de la claudine-2 et une diminution d'expression des claudines -3, -4, -5 et -8 sont souvent observées (Prasad *et al.*, 2005). Un changement dans la localisation des protéines de jonctions est aussi souvent noté suite à de l'endocytose ou à un désassemblage des jonctions (Utech *et al.*, 2010). Les études *in vitro* montrent que plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  peuvent induire une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Bruewer *et al.*, 2006).

L'apparition de brèches dans l'épithélium peut aussi être attribuable à une augmentation de la mort des cellules épithéliales intestinales. D'ailleurs, chez les patients ayant une maladie inflammatoire intestinale, le nombre de cellules épithéliales intestinales en apoptose, un processus de mort cellulaire programmée, est augmenté (Schulzke *et al.*, 2009). En fait, un nombre excessif de cellules apoptotiques chez la souris est suffisant pour induire l'apparition d'inflammation intestinale (Nenci *et al.*, 2007). Également, la présence de cellules nécrotiques est notée chez des patients atteints de la maladie de Crohn, ce qui n'est pas le cas chez les patients témoins ou atteints de colite ulcéreuse (Dourmashkin *et al.*, 1983). Finalement, des études ont récemment décrit une nouvelle forme de mort cellulaire, soit la nécroptose aussi appelée nécrose programmée (Christofferson et Yuan, 2010). En fait, chez la souris, une présence accrue de cellules en nécroptose entraîne l'apparition spontanée d'inflammation au niveau de l'intestin grêle et du côlon. Les cellules de Paneth

sont particulièrement sensibles à ce type de mort cellulaire (Gunther *et al.*, 2011; Welz *et al.*, 2011).

Plusieurs défauts au niveau des cellules à gobelet, responsables de la barrière chimique, sont souvent détectés chez les patients ayant une maladie inflammatoire intestinale. Par exemple, dans la colite ulcéreuse, une diminution du nombre de cellules à gobelet, de l'expression de MUC2 (mucine2) de même qu'une diminution de la couche protectrice de mucus sont observées (Einerhand *et al.*, 2002; Sheng *et al.*, 2012). Dans la maladie de Crohn, c'est plutôt une diminution d'expression en ARNm de *MUC1*, *-3*, *-4* et *-5B* qui est présente (Einerhand *et al.*, 2002; Sheng *et al.*, 2012). De plus, les souris invalidées pour *Muc2* développent spontanément de l'inflammation colique (diarrhée, sang dans les fèces) illustrant l'importance de la couche de mucus dans la protection de l'épithélium intestinal (Van der Sluis *et al.*, 2006). Les cellules à mucus sécrètent aussi le facteur TFF3. Les souris invalidées pour le gène *Tff3* ne développent pas de façon spontanée de l'inflammation intestinale. Toutefois, suite à un traitement au DSS, un agent chimique qui induit des dommages à l'épithélium, les souris *Tff3*<sup>-/-</sup> présentent des défauts importants dans la réparation de blessure, ce qui aggrave l'inflammation (Mashimo *et al.*, 1996).

Les cellules de Paneth, qui sécrètent des peptides antimicrobiens, peuvent également être impliquées dans l'inflammation intestinale. La maladie de Crohn, affectant souvent l'iléon, se caractérise par une adhérence anormale de bactéries à la surface de l'épithélium ainsi que par une composition anormale de la microflore intestinale; ces défauts résulteraient possiblement d'un dysfonctionnement des cellules de Paneth (Clevers et Bevins, 2013). D'ailleurs, une diminution d'expression des  $\alpha$ -défensines est rapportée chez les patients dont l'inflammation touche l'iléon (Wehkamp *et al.*, 2004). Aussi, plusieurs polymorphismes spécifiques à la maladie de Crohn ont été détectés notamment dans les gènes *NOD2*, *ATG16L1* et *TCF4* (Barrett *et al.*, 2008; Koslowski *et al.*, 2009). *NOD2* est fortement exprimé par les cellules de Paneth (Ogura *et al.*, 2003). Certaines études ont démontré que les souris déficientes pour le gène *Nod2* expriment moins de  $\alpha$ -défensines et ont une composition de leur microflore altérée (Kobayashi *et al.*, 2005; Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2009). Un autre gène de susceptibilité à la maladie de Crohn est

*ATG16L1* impliqué dans l'autophagie. Étonnamment, les souris invalidées pour ce gène présentent des anomalies au niveau de leurs cellules de Paneth, plus particulièrement dans l'exocytose des granules de sécrétion contenant les peptides antimicrobiens (Cadwell *et al.*, 2008). Finalement, TCF4 est un facteur de transcription de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine qui régule la différenciation des cellules de Paneth et qui est fortement diminué chez les patients atteints de la maladie de Crohn. Cette diminution d'expression de *TCF4* est associée avec une diminution d'expression de l' $\alpha$ -défensine *HD5* (Wehkamp *et al.*, 2007). Ainsi, dans la maladie de Crohn, l'altération des fonctions des cellules de Paneth pourrait être responsable de l'apparition de l'inflammation. Quant au côlon, celui-ci est normalement dépourvu de cellules de Paneth. Toutefois, lors la colite ulcéreuse des cellules de Paneth métaplasiques sont observées (Paterson et Watson, 1961) de même qu'une augmentation d'expression de plusieurs peptides antimicrobiens (*HD-5*, *HD-6*, *sPLA2* et *LYZI*) (Shi, 2007). La présence des cellules de Paneth métaplasiques dans le côlon est généralement vue comme un mécanisme de protection de l'épithélium contre l'inflammation chronique.

### ***1.7. Le cancer colorectal***

Plus d'un million de nouveaux cas de cancers colorectaux sont diagnostiqués chaque année dans le monde (Tenesa et Dunlop, 2009). Le cancer colorectal résulte d'une prolifération anormale importante des cellules de l'épithélium intestinal et proviendrait des cellules souches (Barker *et al.*, 2009). La plupart des cancers colorectaux se manifestent de façon sporadique (80%). Par contre, environ 20% des personnes atteintes d'un cancer colorectal ont des antécédents familiaux. Ceci inclut la polypose adénomateuse familiale (FAP) dont les mutations dans le gène suppresseur de tumeur *APC* sont fréquentes ce qui résulte en une stabilisation de la  $\beta$ -caténine et en la formation de multiples adénomes (Wallis *et al.*, 1999). D'ailleurs les souris *Apc*<sup>Min/+</sup> ont une mutation dans le gène *Apc* et développent plusieurs adénomes principalement au niveau de l'intestin grêle. Ces souris servent donc fréquemment de modèle d'étude pour ce type de cancer (Moser *et al.*, 1990; Su *et al.*, 1992). Le syndrome de Lynch, aussi appelé cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC), est le type de cancer colorectal héréditaire le plus fréquent (2 à 5%) et est habituellement causé par des mutations dans les gènes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*

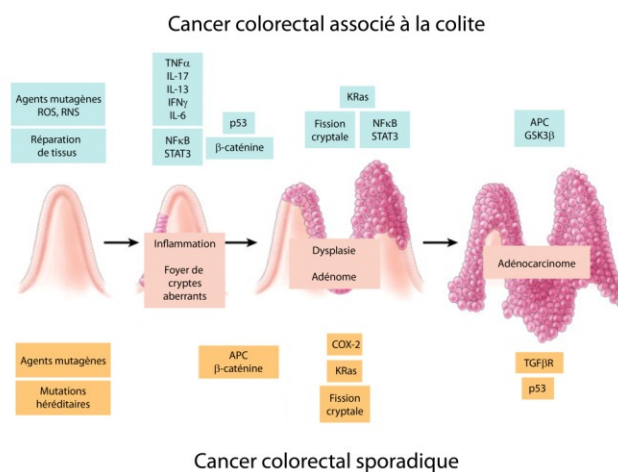
impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN (Fishel *et al.*, 1993). Finalement, les personnes atteintes de maladie de Crohn et de colite ulcéreuse courent plus de risques de développer une forme particulière de cancer colorectal, soit le cancer colorectal associé à la colite (Munkholm, 2003). Les risques augmentent selon la durée, l'étendue et la sévérité de l'inflammation. Plus précisément, les probabilités qu'un individu développe un cancer colorectal après dix ans aux prises avec une maladie inflammatoire intestinale sont de l'ordre de 2%. Par la suite, le risque s'accroît pour atteindre jusqu'à 18% après 30 ans (Eaden, 2004).

### *1.7.1. Le cancer colorectal sporadique*

Dans le cancer colorectal sporadique, l'épithélium intestinal normal se transforme en adénomes, en adénocarcinomes, en adénocarcinomes invasifs puis forme des métastases (Schéma 7, panneau du bas). Il y a trois voies majeures conduisant à l'établissement de la carcinogenèse colorectale: l'instabilité chromosomique (CIN), la méthylation des îlots CpG (CIMP) et l'instabilité des microsatellites (MSI).

La voie d'instabilité chromosomique (CIN) inclut jusqu'à 85% des cas de cancers colorectaux sporadiques et est causée par des altérations dans la structure ou dans le nombre de chromosomes, aussi appelé aneuploïdie (Grady, 2004). Ces anomalies entraînent des mutations dans des oncogènes (*KRAS*) ou des gènes suppresseurs de tumeurs (*APC*, *TP53*) suivant le modèle décrit par Fearon et Vogelstein (Fearon et Vogelstein, 1990). La voie CIMP ou méthylation des îlots CpG concerne approximativement 15% des cancers sporadiques (Issa, 2008). La méthylation de l'ADN s'effectue au niveau des résidus cytosines des îlots CpG qui se trouvent essentiellement dans la région promotrice des gènes, ce qui les rend silencieux. Les microsatellites sont des séquences d'ADN particulières qui se caractérisent par la répétition de dinucléotides ou de trinucléotides. L'instabilité des microsatellites est impliquée dans 15% des cancers sporadiques et peut toucher plusieurs gènes dont *APC*, *E2F4*, *MSH3* et *MSH6* (Thibodeau *et al.*, 1993).

Plusieurs altérations génétiques sont présentes dans le cancer colorectal sporadique et affectent principalement la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, la voie KRAS/ERK1/2, la voie



**Schéma 7: Le cancer colorectal sporadique et le cancer colorectal associé à la colite.**

Dans le cancer colorectal sporadique, l'épithélium intestinal normal se transforme en adénomes, en adénocarcinomes, en adénocarcinomes invasifs puis forme des métastases. Plusieurs altérations génétiques sont associées au développement du cancer colorectal sporadique. Elles affectent principalement les gènes *APC*, *KRAS*, *PI3KCA* et *TP53*. Dans le cancer colorectal associé à la colite, l'épithélium enflammé et hyperplasique se transforme en épithélium dysplasique jusqu'à l'adénocarcinome. L'accumulation de ROS cause des dommages oxydatifs à l'ADN ce qui entraîne des mutations dans les gènes tels que *CTNBB1* ( $\beta$ -caténine), *KRAS* et possiblement *TP53*. Plusieurs cytokines pro-inflammatoires participent à la tumorigénèse, comme le TNF $\alpha$  et l'IL-6, en régulant l'activation des voies de signalisation NF $\kappa$ B et Jak/STAT3. Tiré et adapté de Terzic *et al.* (2010).



PI3K/AKT, la voie du TGF $\beta$  et la protéine p53. La plupart des cas de cancers colorectaux ont des mutations sporadiques dans le gène *APC* engendrant une protéine APC tronquée inactive (Segditsas et Tomlinson, 2006). Dans environ 80% des cas, les deux allèles d'*APC* sont inactivés, ce qui mène à la stabilisation de la  $\beta$ -caténine, à la hausse de l'activité transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF et à l'expression de plusieurs gènes cibles dont *C-MYC* et *CCND1* (cycline D1) (van de Wetering *et al.*, 2002). Des mutations dans la *CTNNB* ( $\beta$ -caténine), l'*AXINI* (axine1) et l'*AXIN2* (axine2) peuvent être aussi retrouvées, mais de façon mutuellement exclusives avec celles d'*APC* (Segditsas et Tomlinson, 2006).

RAS est une petite protéine G incluant trois membres (KRAS, HRAS et NRAS) qui active principalement les voies de signalisation ERK1/2 et PI3K/AKT. Des mutations somatiques dans *KRAS* ou *NRAS* sont trouvées dans 40-45% des cancers colorectaux et affectent principalement le codon 12, mais aussi les codons 13 et 61 (Fearon et Vogelstein, 1990). Des mutations activatrices dans le gène encodant *BRAF*, le principal effecteur de RAS, sont également retrouvées dans 5 à 10% des cancers colorectaux (Rajagopalan *et al.*, 2002). Finalement, des mutations somatiques activatrices dans le gène *PIK3CA*, codant pour la sous-unité p100 $\alpha$  de la PI3K, sont aussi trouvées dans 15 à 25% des cancers colorectaux (Wood *et al.*, 2007).

Dans 70% des cancers colorectaux, la perte du locus 18q est observée (Fearon et Vogelstein, 1990). Cette région chromosomique comprend les gènes *SMAD2* et *SMAD4* codant pour des protéines impliquées dans la signalisation du TGF $\beta$ . De plus, des mutations qui inactivent *SMAD2*, *SMAD3* et *SMAD4* ainsi que le récepteur du TGF $\beta$ II sont aussi possibles (Leary *et al.*, 2008).

Aux mutations déjà citées, il faut ajouter p53. Dans les tumeurs HNPCC, la voie p53 est inactivée par des mutations en aval (microsatellite de Bax, un homologue pro-apoptotique (Miquel *et al.*, 2005)); toutefois dans la plupart des tumeurs colorectales, les mutations se trouvent dans le gène *TP53* (Baker *et al.*, 1990). Ces mutations surviennent souvent tard dans le développement des tumeurs permettant ainsi la croissance incontrôlée de cellules très anormales.

### 1.7.2. Le cancer colorectal associé à la colite

L'inflammation chronique prédispose au développement de plusieurs types de cancer et c'est le cas des patients atteints de maladies inflammatoires intestinales (Balkwill et Mantovani, 2001). La pathogénie de la carcinogenèse colorectale chez les patients atteints de maladie inflammatoire intestinale est cependant différente de celle des cancers sporadiques et fait intervenir une progression par étapes à partir de l'épithélium enflammé et hyperplasique vers de la dysplasie jusqu'à l'adénocarcinome (Itzkowitz et Yio, 2004) (Schéma 7, panneau du haut).

Un des effets de l'inflammation chronique est l'accumulation de ROS causant des dommages oxydatifs à l'ADN, ce qui entraîne des mutations dans les gènes tels que *CTNBB1* ( $\beta$ -caténine), *KRAS* (Meira *et al.*, 2008; Roessner *et al.*, 2008) et possiblement *TP53* (Ullman et Itzkowitz, 2011). D'ailleurs, des mutations dans *TP53* sont fréquemment retrouvées dans des tissus coliques en inflammation chronique ainsi que dans des régions dysplasiques (Leedham *et al.*, 2009). De plus, un stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène inactive les enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN, plus précisément dans la réparation des mésappariements, entraînant de l'instabilité dans les microsatellites (Chang *et al.*, 2002). D'ailleurs, de l'instabilité dans les microsatellites a été détectée chez des patients atteints de colite ulcéreuse sans lésions néoplasiques (Brentnall *et al.*, 1996), cela suggère que l'inactivation du système de réparation de l'ADN est un événement précoce dans le développement du cancer colorectal associé à la colite.

Dans le cancer colorectal sporadique, la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *APC* est un événement fréquent qui arrive tôt dans la tumorigénèse. Dans le cancer colorectal associé à la colite, une délétion allélique d'*APC* est présente dans seulement 33% des cas (Umetani *et al.*, 1999). Néanmoins, une augmentation de la localisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine a été rapportée dans des tumeurs de cancer colorectal associé à la colite (Aust *et al.*, 2001).

Plusieurs cytokines pro-inflammatoires participent à la carcinogenèse colorectale, dont le TNF $\alpha$  et l'IL-6. Une augmentation de TNF $\alpha$  est présente chez les patients atteints de la maladie de Crohn. Cette cytokine, suite à la liaison à son récepteur, active la voie de

signalisation NF $\kappa$ B. Dans un modèle murin de cancer colorectal associé à la colite où les souris ont été traitées avec de l'AOM (azoxymethane), un agent carcinogène qui cause des mutations dans le gène de la  $\beta$ -caténine (Takahashi *et al.*, 2000), suivi par un traitement au DSS qui induit une colite chimique, l'utilisation d'un antagoniste du TNF $\alpha$  diminue grandement le nombre et la taille des tumeurs (Popivanova *et al.*, 2008). Plusieurs études montrent l'implication du facteur de transcription NF $\kappa$ B dans le développement du cancer colorectal associé à la colite. Notamment, des souris invalidées spécifiquement pour l'expression de la kinase *IKK $\beta$*  dans les cellules épithéliales intestinales développent beaucoup moins de tumeurs suite à un traitement à l'AOM/DSS. En fait, l'activation de NF $\kappa$ B serait importante pour la prolifération et la survie des cellules épithéliales intestinales (Greten *et al.*, 2004; Shaked *et al.*, 2012).

Une cytokine qui semble également participer la pathogénie de ce type de cancer est l'IL-6. Cette cytokine pro-inflammatoire active la voie de signalisation Jak/STAT3. Dans leur modèle de souris traitées à l'AOM/DSS, Becker et collaborateurs ont montré que l'utilisation d'un anticorps bloquant le récepteur à l'IL-6 prévient la croissance des tumeurs (Becker *et al.*, 2004). Le rôle de STAT3 dans le cancer colorectal associé à la colite a été aussi caractérisé via l'utilisation de souris présentant une délétion conditionnelle de ce facteur de transcription dans les cellules épithéliales intestinales. Suite à un traitement à l'AOM/DSS, ces souris développent significativement moins de tumeurs qui sont aussi de plus petite taille. Dans ce contexte, la voie Jak/STAT3 contrôle la prolifération et la survie des cellules épithéliales intestinales (Bollrath *et al.*, 2009).

D'autres cytokines, notamment la cytokine anti-inflammatoire IL-10, régulent négativement la formation du cancer colorectal associé à la colite. En effet, les souris *Il10<sup>-/-</sup>* développent spontanément de l'inflammation intestinale lorsqu'elles sont hébergées dans une animalerie conventionnelle. Dès l'âge de 6 mois, 60% de ces souris développent des adénocarcinomes colorectaux (Berg *et al.*, 1996). De plus, le croisement de ces souris avec une souris invalidée pour la protéine adaptatrice *Myd88* empêche la formation de tumeurs, suggérant la participation de la microflore dans ce modèle (Uronis *et al.*, 2009).

La microflore participe effectivement au développement du cancer colorectal associé à la colite. En fait, plusieurs modèles murins ne développent pas de dysplasie ou de

cancer colorectal associé à la colite dans un environnement stérile (Fukata et Abreu, 2008; Uronis *et al.*, 2009). Tout comme dans l'inflammation intestinale, un changement dans la composition de la microflore (dysbiose) est observé lors de la tumorigénèse colorectale. D'ailleurs, la susceptibilité de développer un cancer colorectal est transmissible d'une souris possédant une dysbiose vers une souris de type sauvage (Couturier-Maillard *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent que la microflore peut, dans certains cas, être suffisante à promouvoir la formation de tumeurs colorectales.

La signalisation des PRRs participe aussi au cancer associé à la colite. Dans les cellules épithéliales intestinales, l'expression de TLR4 est grandement augmentée dans les tumeurs par rapport aux régions saines et dysplasiques. Les souris invalidées pour *Tlr4* développent d'ailleurs moins de tumeurs et ces dernières sont de taille plus petite suite à un traitement à l'AOM/DSS (Fukata *et al.*, 2007). Inversement, l'expression d'une forme constitutive active de *Tlr4* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales favorise la tumorigénèse (Fukata *et al.*, 2011). Par contre, les souris *Tlr2*<sup>-/-</sup> développent plus de tumeurs que les souris témoins suite à un traitement à l'AOM/DSS (Lowe *et al.*, 2010). Des résultats similaires ont aussi été observés chez les souris *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (Zaki *et al.*, 2010), *Nlrp6*<sup>-/-</sup> (Chen *et al.*, 2011) et *Nlrp12*<sup>-/-</sup> (Allen *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent que la signalisation TLR4 contribue au développement du cancer colorectal associé à la colite tandis que la signalisation initiée par TLR2, NLRP3, NLRP6 et NLRP12 engendre plutôt une protection.

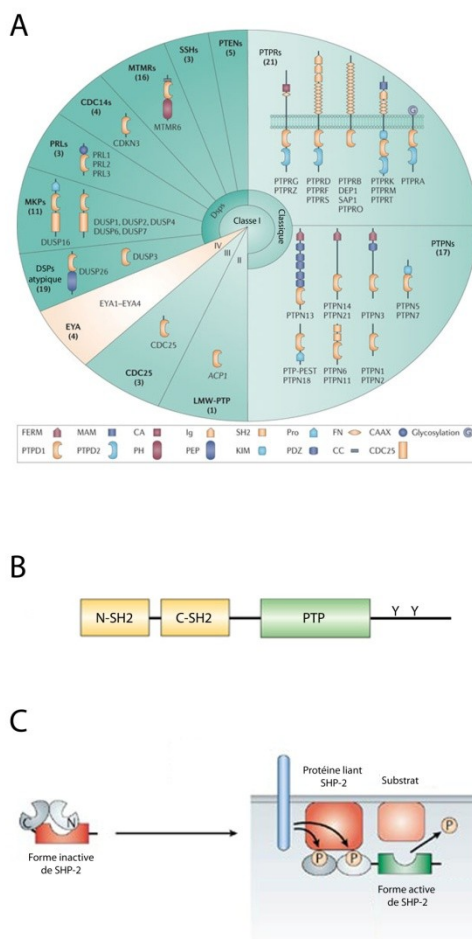
## **2. Les protéines tyrosines phosphatases**

Les voies d'activation dépendantes des protéines tyrosine kinases (PTKs) et des protéines tyrosine phosphatases (PTPs) ont été identifiées comme des éléments précoces très largement utilisés par de nombreux systèmes cellulaires pour contrôler des phénomènes aussi divers que la différenciation, la prolifération, la réponse inflammatoire ou la migration cellulaire (Sun et Tonks, 1994).

## 2.1. La classification des PTPs

La découverte des premières protéines tyrosines kinases a été faite en 1979 par le groupe du Pr Tony Hunter (Eckhart *et al.*, 1979). Par contre, il a fallu attendre à la fin des années 80 pour découvrir les premières protéines tyrosines phosphatases (Tonks *et al.*, 1988). Depuis, 107 PTPs ont été répertoriées chez l'humain et sont classées en quatre classes selon la séquence en acides aminés de leur domaine catalytique (Julien *et al.*, 2011) (Schéma 8A). Pour la classe I, II et III, une séquence consensus (H/V)C(X)5R(S/T) est présente dans leur domaine catalytique et contient une cystéine ainsi qu'une arginine essentielles à leur activité enzymatique. La classe IV pour sa part utilise plutôt un mécanisme catalytique dépendant d'un acide aspartique (Alonso *et al.*, 2004).

La classe I inclut la majorité des PTPs, soit 99 membres. Cette classe se subdivise en 2 groupes: les PTPs classiques comprenant les PTPs transmembranaires (PTPRs) et les PTPs non transmembranaires (PTPNs) ainsi que les PTPs à double spécificité (DSPs), c'est-à-dire ayant la capacité de déphosphoryler leurs substrats à la fois sur des résidus tyrosines, mais aussi sur sérines et thréonines. La famille des PTPs à double spécificité se subdivise ensuite en sept. Les MKPs (MAPK phosphatases) ainsi que PTEN (phosphatase and tensin homolog) sont des membres connus des PTPs à double spécificité. Les PTPs transmembranaires incluent 21 PTPs. Au niveau de leur structure, ces phosphatases possèdent un domaine transmembranaire, une région extracellulaire et une région intracellulaire qui, dans la majorité des cas, contient deux domaines catalytiques (D1 et D2) dont seulement un seul est actif (D1) (Tonks, 2006). Les PTPs non transmembranaires comptent 17 membres. Les PTPNs, à l'exception de PTP1B (PTPN1) et TCPTP (PTPN2), possèdent, en plus de leur domaine catalytique, d'autres domaines de liaison (PDZ, FERM, SH2 et riches en prolines). La classe II comprend seulement un membre, la protéine LMW-PTP, tandis que la classe III en comprend trois appartenant à la famille de Cdc25. Finalement, la classe IV comprend quatre protéines, soit les phosphatases EYA1 à 4 (Julien *et al.*, 2011).



### Schéma 8: Les protéines tyrosines phosphatases.

(A) Les protéines tyrosines phosphatases sont séparées en 4 classes. La classe I inclut la majorité des PTPs et inclut les PTPs classiques (PTPs transmembranaires (PTPRs) et PTPs non transmembranaires (PTPNs)) ainsi que les PTPs à double spécificité (DSPs) qui se subdivisent en sept sous-classes. La classe II comprend seulement un membre, la protéine LMW-PTP, tandis que la classe III en comprend trois appartenant à la famille de Cdc25. La classe IV comprend les phosphatases EYA1 à 4. (B) SHP-2 est une protéine tyrosine phosphatase non transmembranaire qui possède un domaine catalytique PTP, deux domaines SH2 (Src homology 2) en tandem, le domaine N-SH2 et le domaine C-SH2, et une queue C-terminale. Une région riche en prolines ainsi que deux tyrosines (Y542 et Y580) pouvant être phosphorylées sont aussi présentes dans la queue C-terminale. (C) L'activité enzymatique de SHP-2 est régulée par un mécanisme d'auto-inhibition. À l'état basal, SHP-2 se retrouve dans une conformation inactive, c'est-à-dire qu'il y a une interaction entre le domaine N-SH2 et le domaine catalytique bloquant ainsi l'accès des substrats au site actif. La liaison de protéines phosphorylées sur tyrosine avec le domaine N-SH2 entraîne un changement de conformation levant l'interaction intramoléculaire entre le domaine N-SH2 et le domaine catalytique. La phosphatase se retrouve donc sous une forme active. Tirés et adaptés de Julien *et al.* (2011), Reth et Brummer (2004) et Ostman *et al.* (2006).

## **2.2. Les phosphatases SHP-1 et SHP-2**

SHP-1 ou PTPN6 (SH-PTP1, PTP1C, HCP et SHP) et SHP-2 ou PTPN11 (SH-PTP2, PTP1D, Syp, PTP2C et SHPTP-3) sont des protéines tyrosines phosphatases non transmembranaires possédant une homologie de près de 60% (Stein-Gerlach *et al.*, 1998). Ces phosphatases possèdent un domaine catalytique PTP, deux domaines SH2 (Src homology 2) en tandem, le domaine N-SH2 et le domaine C-SH2, et une queue C-terminale. Les domaines SH2 sont importants pour la localisation de ces phosphatases ainsi que pour la régulation de leur activité enzymatique (Neel *et al.*, 2003). Les différences entre SHP-1 et SHP-2 se retrouvent principalement au niveau de la queue C-terminale: SHP-1 possède un domaine NLS (séquence de localisation nucléaire) tandis que SHP-2 possède plutôt une région riche en proline (Poole et Jones, 2005). Ces phosphatases détiennent aussi deux sites principaux de phosphorylation sur tyrosine (Y536 et Y564 pour SHP-1, Y542 et Y580 pour SHP-2) dans leur queue C-terminale (Schéma 8B). Finalement, la phosphatase SHP-1 est exprimée principalement dans les cellules hématopoïétiques, dans les cellules musculaires et plus faiblement dans les cellules épithéliales (Matthews *et al.*, 1992; Yi *et al.*, 1992). Au contraire, la phosphatase SHP-2 présente une expression ubiquiste (Feng *et al.*, 1993).

## **2.3. Les mécanismes de régulation de l'activité et de la localisation de SHP-2**

Plusieurs mécanismes régulent l'activité enzymatique de SHP-2. Tout d'abord, l'activation de cette phosphatase est principalement régulée par un mécanisme d'auto-inhibition. À l'état basal, SHP-2 se retrouve dans une conformation inactive, c'est-à-dire qu'il y a une interaction entre le domaine N-SH2, dont les résidus D61 et E76, et le domaine catalytique bloquant ainsi l'accès des substrats au site actif. La liaison de protéines phosphorylées sur tyrosine avec le domaine N-SH2 entraîne un changement de conformation levant l'interaction intramoléculaire entre le domaine N-SH2 et le domaine catalytique. La phosphatase se retrouve donc sous une forme active (Neel *et al.*, 2003) (Schéma 8C).

Suite à plusieurs stimuli, la phosphorylation des tyrosines 542 et 580 situées dans la queue C-terminale est généralement observée. Lu et collaborateurs ont remplacé ces deux tyrosines par des analogues phosphomimétiques non hydrolysables et ont démontré que cela augmente l'activité enzymatique de SHP-2 (Lu *et al.*, 2001). De plus, la phosphorylation des tyrosines 542 et 580 semble aussi requise pour la fonction de protéine adaptatrice de SHP-2 en permettant notamment le recrutement du complexe Grb2/Sos (Bennett *et al.*, 1994).

SHP-2 possède une cystéine à la position 459 essentielle à l'activité de son site catalytique. L'oxydation de cette cystéine par, entre autres, des dérivés réactifs de l'oxygène inactive complètement cette phosphatase (Meng *et al.*, 2002).

Au niveau de sa localisation, SHP-2 se retrouve principalement dans le cytoplasme des cellules (Neel *et al.*, 2003). Quelques études ont rapporté néanmoins une localisation nucléaire de SHP-2 (Chughtai *et al.*, 2002; Jakob *et al.*, 2008). Contrairement à SHP-1, la protéine tyrosine phosphatase SHP-2 ne possède pas de séquence de localisation nucléaire ainsi, sa translocation au noyau nécessite son association avec d'autres protéines (Poole et Jones, 2005). Par exemple, les protéines YAP/TAZ de la voie de signalisation Hippo régule la localisation cytoplasmique versus nucléaire de SHP-2 et ce, en fonction de la confluence cellulaire (Tsutsumi *et al.*, 2013). SHP-2 est aussi présente dans les mitochondries; toutefois son rôle dans cette organelle n'est pas bien caractérisé (Salvi *et al.*, 2004). Finalement, SHP-2 peut se retrouver aux points d'adhésion (Yo *et al.*, 2009), associée aux fibres d'actine (Xu *et al.*, 2001) ou à la membrane plasmique (Hartman *et al.*, 2013).

#### **2.4. Les voies de signalisation régulées par SHP-2**

SHP-2 est une protéine tyrosine phosphatase qui a été décrite pour réguler tant positivement que négativement plusieurs voies de signalisation intracellulaires. De nombreuses études ont en effet montré que SHP-2 participe à la signalisation cellulaire initiée par des facteurs de croissance (EGF, PDGF, FGF), des cytokines (IL-3, EPO, GM-CSF), des hormones (insuline) et des produits bactériens (LPS) (Bard-Chapeau *et al.*, 2011; Neel *et al.*, 2003). SHP-2 participe aussi à la signalisation initiée par les intégrines



suite à leur liaison avec la matrice extracellulaire. Cette phosphatase peut d'ailleurs réguler la signalisation cellulaire de deux façons soit en agissant comme protéine adaptatrice via l'utilisation de ses domaines SH2 ou bien en déphosphorylant sur tyrosine ses effecteurs (Neel *et al.*, 2003).

Une des principales voies de signalisation régulées par SHP-2 est la voie RAS/MAPK ERK1/2. Par exemple, Bennett et collaborateurs ont démontré que suite à une stimulation au PDGF, SHP-2 forme un complexe avec Grb2/Sos facilitant l'activation de RAS et donc de la cascade en aval des MAPK dans des fibroblastes murins et dans des cellules épithéliales canines (Bennett *et al.*, 1994). Dans ce contexte, SHP-2 régule cette voie de signalisation indépendamment de son activité PTP. Cependant, plusieurs études ont par la suite rapporté que SHP-2 contrôle la signalisation ERK1/2 en déphosphorylant divers substrats. Par exemple, dans les cellules de rein COS-1, SHP-2 déphosphoryle la tyrosine 992 sur le récepteur à l'EGF. Cette tyrosine sert de site de liaison pour la protéine RasGAP dont le rôle est d'activer l'hydrolyse du GTP en GDP de la petite protéine G RAS ce qui l'inactive (Agazie et Hayman, 2003). Ainsi, SHP-2 empêche le recrutement d'un régulateur négatif de la signalisation RAS/MAPK. Dans des fibroblastes murins, SHP-2 peut aussi déphosphoryler le site de liaison de RasGAP présent sur la protéine adaptatrice Gab1 (Montagner *et al.*, 2005). Finalement, SHP-2 peut également réguler la voie ERK1/2 via la protéine Sprouty. En fait, sous sa forme phosphorylée sur tyrosine, Sprouty lie le complexe Grb2/Sos de sorte qu'il n'y a pas d'activation de la voie MAP kinase ERK1/2. Toutefois, SHP-2 est en mesure de déphosphoryler Sprouty ce qui libère le complexe Grb2/Sos et active la voie ERK1/2 (Hanafusa *et al.*, 2002; Hanafusa *et al.*, 2004).

SHP-2 peut aussi moduler l'activation de la signalisation PI3K/AKT. En effet, suite à un traitement à l'IGF-1 dans des cellules de muscles lisses, la voie PI3K/AKT est activée et nécessite l'activité enzymatique de SHP-2. Dans ce contexte, SHP-2 est nécessaire à l'association entre les sous-unités p85 et p110 de la PI3K (Kwon *et al.*, 2006). Cependant, SHP-2 peut aussi contrôler négativement la voie PI3K/AKT. Dans des fibroblastes murins NIH/3T3, SHP-2 déphosphoryle le site de liaison de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K sur la protéine adaptatrice Gab1 ce qui empêche l'activation de cette voie de signalisation (Zhang *et al.*, 2002).

Dans certains contextes, la phosphatase SHP-2 inhibe la signalisation Jak/STAT. Suite à une stimulation par des cytokines comme l'IL-6, SHP-2 est recrutée à la glycoprotéine 130 (gp130), une protéine transmembranaire composant le récepteur à l'IL-6. La mutation du site de liaison de SHP-2 sur gp130, soit la tyrosine 759, entraîne une hyperactivation de la voie de signalisation Jak/STAT3 dans les cellules COS-7 (Lehmann *et al.*, 2003) et les cellules de carcinome du foie H-35 (Kim *et al.*, 1998). En fait, SHP-2 peut directement déphosphoryler certains facteurs de transcription STAT (Wu *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2000). Par exemple, Yu et collaborateurs ont clairement démontré que SHP-2 interagit directement avec STAT5 dans la lignée cellulaire CTLL-20 et que cette phosphatase est en mesure de le déphosphoryler *in vitro* (Yu *et al.*, 2000). Finalement, SHP-2 semble aussi réguler positivement cette voie signalisation. En effet, chez les souris déficientes pour l'expression de *Shp-2* dans la glande mammaire, une diminution de l'activation de STAT5 est observée (Ke *et al.*, 2006).

Certaines études ont également démontré que SHP-2 peut moduler l'activation de NF $\kappa$ B en réponse à des cytokines et à des produits bactériens. Dans les fibroblastes murins, SHP-2 régule positivement la signalisation de NF $\kappa$ B en réponse à l'IL-1 $\alpha$  et au TNF $\alpha$ . Dans ces cellules, SHP-2 interagit de façon constitutive avec la kinase IKK $\alpha$  et est nécessaire à la phosphorylation de I $\kappa$ B résultant en l'activation de la voie de signalisation (You *et al.*, 2001). SHP-2 inhibe aussi la signalisation NF $\kappa$ B initiée par le produit bactérien LPS. Plus précisément, dans les macrophages, Xu et collaborateurs ont démontré que SHP-2 interagit avec la protéine TRAF6 et contrôle son activité en régulant son niveau d'ubiquitination (Xu *et al.*, 2012).

SHP-2 régule aussi négativement la voie IRF3 activée par les récepteurs TLR3 et TLR4 dans les macrophages. Plus en détail, SHP-2 interagit avec la kinase TBK1 ce qui l'inactive. Ce mécanisme est indépendant de l'activité enzymatique de SHP-2 (An *et al.*, 2006).

Dans les cellules d'adénocarcinomes gastriques, SHP-2 régule positivement l'activation transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine de façon indirecte via son effet sur la parafibromine. En fait, lorsque la voie de signalisation Hippo n'est pas activée, les protéines YAP/TAZ permettent la translocation nucléaire de SHP-2. Dans le noyau, SHP-2 est en

mesure de déphosphoryler sur tyrosine la parafibromine ce qui favorise son interaction avec la  $\beta$ -caténine et permet la transcription de ses gènes cibles (Takahashi *et al.*, 2011; Tsutsumi *et al.*, 2013). Toutefois, lorsque la signalisation Hippo est activée, le complexe YAP/TAZ est phosphorylé et dégradé par le protéasome (Zhao *et al.*, 2010). SHP-2 est alors confinée au cytoplasme. Il n'y a donc pas de transcription des gènes cibles de la  $\beta$ -caténine.

Finalement, SHP-2 contrôle aussi la voie RhoA/ROCK. RhoA est une petite protéine G dont l'activité est régulée par les RhoGAP qui augmentent l'hydrolyse du GTP en GDP et les RhoGEF qui stimulent la relâche de GDP pour permettre la liaison du GTP. Sous sa forme liée au GTP, RhoA active la kinase ROCK ce qui va entraîner une cascade de signalisation affectant principalement le cytosquelette d'actine. SHP-2 peut réguler positivement l'activité de RhoA en déphosphorylant p190RhoGAP dans les myoblastes C2C12 (Kontaridis *et al.*, 2004) ou la kinase ROCKII dans les cellules myéloïdes D2 (Lee et Chang, 2008). Ainsi, SHP-2 peut être impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Dans les fibroblastes murins, SHP-2 régule négativement la voie RhoA/ROCK (Schoenwaelder *et al.*, 2000). Les auteurs proposent que SHP-2 contrôle l'activité de RhoA via la déphosphorylation de protéines RhoGEF. Dans les cellules MDCK, l'expression d'une forme constitutive active de SHP-2 entraîne une forte diminution de l'activité de RhoA ce qui entraîne une réduction de l'acétylation des microtubules dépendante de HDAC6 (Tien et Chang, 2014).

### ***2.5. Les processus cellulaires régulés par SHP-2***

Étant donné que SHP-2 régule plusieurs voies de signalisation importantes, cela implique qu'elle participe au contrôle de plusieurs processus cellulaires dont la prolifération, la survie, la différenciation et la migration.

Tout d'abord, plusieurs études montrent que SHP-2 contrôle de façon positive la prolifération de plusieurs types cellulaires dont les cellules souches embryonnaires (Qu et Feng, 1998), les cellules neuronales (Ke *et al.*, 2007), les cellules hématopoïétiques (Li *et al.*, 2011) et les fibroblastes (Rivard *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2001). La phosphatase SHP-2

contrôle aussi la prolifération de plusieurs types de cellules cancéreuses notamment du cancer du sein (Aceto *et al.*, 2012), du cancer de prostate (Ren *et al.*, 2011), du cancer du poumon (Ren *et al.*, 2010) et du cancer cervical (Meng *et al.*, 2013). Ce contrôle positif sur la prolifération cellulaire serait attribuable à son effet activateur sur la voie ERK1/2.

SHP-2 contrôle aussi la survie cellulaire des cardiomyocytes (Wang *et al.*, 2012), des fibroblastes et des myoblastes (Ivins Zito *et al.*, 2004). Par exemple, l'inhibition pharmacologique de SHP-2 (NSC-87877) entraîne une augmentation de l'apoptose dans les cardiomyocytes associée à une diminution de l'activation de la voie ERK1/2 (Wang *et al.*, 2012).

L'adhésion, l'étalement et la migration cellulaire sont aussi des processus cellulaires régulés par la phosphatase SHP-2. En 1998, Yu et collaborateurs ont démontré que SHP-2 contrôle ces processus dans les fibroblastes murins. La signalisation initiée par les intégrines, dont l'activation de la kinase FAK (focal adhesion kinase), est fortement altérée en absence de SHP-2 (Yu *et al.*, 1998). SHP-2 contrôle aussi la migration d'autres types cellulaires tels que les cellules de cancer du sein (Hartman *et al.*, 2013), les fibroblastes de rat et les cellules d'ovaire de hamster (Inagaki *et al.*, 2000).

Le rôle de SHP-2 dans la différenciation a été étudié via notamment, l'utilisation des cellules C2C12 qui, lorsque placées dans un milieu de différenciation, vont former des myotubes multinuclées. Une diminution d'expression de SHP-2 par l'utilisation de siARN diminue fortement la différenciation de ces cellules (Kontaridis *et al.*, 2004). SHP-2 est aussi important pour la différenciation des chondrocytes (Bowen *et al.*, 2014), des adipocytes (He *et al.*, 2013) et des neurones (Hadari *et al.*, 1998).

## **2.6. Les modèles murins**

En 1997, le groupe de Saxton et collaborateurs a généré une souris dans laquelle l'exon 3 de SHP-2, soit des résidus 46 à 110, a été remplacé par une cassette néomycine (*Shp-2*<sup>Δ46-110</sup>). Avant le jour E10.5, tous les embryons *Shp-2*<sup>Δ46-110</sup> sont morts suite à de sévères anomalies développementales (Saxton *et al.*, 1997). Par la suite, en 2004, un

modèle murin permettant la délétion conditionnelle de *Shp-2* via l'utilisation du système Cre/loxP a été généré. En fait, le groupe de Feng a créé une souris contenant des insertions loxP au pourtour de l'exon 4 de *Shp-2* (*Shp-2*<sup>lox/lox</sup>). Suite à l'action d'une enzyme Cre recombinase, il y a recombinaison au niveau des séquences loxP, excision de l'exon 4 entraînant l'apparition d'un codon stop (Zhang *et al.*, 2004). Le croisement des souris *Shp-2*<sup>lox/lox</sup> avec diverses souris transgéniques comportant la Cre recombinase sous le contrôle d'un promoteur spécifique à un tissu ou à un type cellulaire a apporté des informations cruciales quant aux multiples rôles joués par cette phosphatase *in vivo*. Par exemple, la délétion conditionnelle de *Shp-2* dans les neurones a démontré le rôle de SHP-2 dans le contrôle de la balance énergétique et dans le métabolisme; en fait, les auteurs ont montré que SHP-2 interférait dans la signalisation de la leptine (Zhang *et al.*, 2004). La délétion conditionnelle de *Shp-2* dans les cellules progénitrices neurales chez la souris montre que cette phosphatase contrôle la détermination des neurones et des astrocytes. Cet effet sur la détermination cellulaire a été attribué à une signalisation inadéquate des voies ERK1/2 et STAT3 (Ke *et al.*, 2007). Les souris déficientes pour l'expression de *Shp-2* dans les cellules musculaires du coeur développent des cardiomyopathies et meurent prématurément. Chez ces souris, plusieurs voies de signalisation sont dérégulées notamment les voies PI3K/AKT, Jak/STAT3 et MAPK ERK1/2 (Princen *et al.*, 2009). Aussi, la délétion de *Shp-2* dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II entraîne une diminution de la production de surfactant menant à l'apparition de fibrose (Zhang *et al.*, 2012). Finalement, la délétion de *Shp-2* dans les hépatocytes mène au développement d'inflammation et de nécrose qui avec le temps, entraîne de l'hyperplasie et le développement d'adénomes (Bard-Chapeau *et al.*, 2011). Ces études démontrent que selon les tissus et les types cellulaires SHP-2 contrôle différentes fonctions importantes de la cellule.

### ***2.7. Les pathologies associées à une dérégulation de la phosphatase SHP-2***

SHP-2 a été associée au développement de certaines maladies humaines dont le syndrome de Noonan. Ce syndrome d'origine génétique a une transmission autosomale dominante et se manifeste par un aspect particulier des traits du visage, des malformations

du cœur et une petite taille. Dans près de 50% des cas, des mutations faux sens sont retrouvées dans le gène *PTPN11* codant pour SHP-2. Toutes les mutations se retrouvent dans la partie N-SH2 et dans le domaine phosphatase de sorte que l'activité de SHP-2 n'est plus régulée par son mécanisme d'auto-inhibition; ce sont donc des mutations de type gain-de-fonction (Tartaglia *et al.*, 2001; Tartaglia *et al.*, 2002). Des mutations dans les gènes *SOS1*, *KRAS*, *NRAS*, *RAF1*, *BRAF*, *SHOC2*, *MEK1* et *CBL* ont aussi été découvertes chez ces patients; le syndrome de Noonan est d'ailleurs attribuable à l'hyperactivation de la voie Ras/MAPK ERK1/2 (Tartaglia *et al.*, 2011). De plus, les gens atteints du syndrome de Noonan sont plus à risque de développer une leucémie myélomonocytaire chronique juvénile (JMML) (Tartaglia *et al.*, 2004).

Plusieurs mutations de type gain-de-fonction de *PTPN11* ont été aussi répertoriées dans différentes formes de leucémie, mais aussi dans certaines tumeurs solides telles que le mélanome, le neuroblastome, le cancer gastrique, le cancer du poumon et le cancer colorectal. Encore une fois, les mutations se localisent préférentiellement dans le domaine N-SH2 et le domaine phosphatase faisant en sorte que SHP-2 se retrouve dans une conformation active. De plus, des polymorphismes dans l'exon 3 ainsi que les introns 4, 7 et 9 du gène *PTPN11* ont été rapportés chez les patients atteints de leucémies, de cancer du sein, de cancer de la prostate et de cancer gastrique; toutefois l'impact de ces variantes génétiques n'est pas connu (Bentires-Alj *et al.*, 2004).

SHP-2 est également capable d'interagir avec le facteur de virulence CagA de *Helicobacter pylori*, qui favorise le développement de sévères gastrites et de cancer gastrique. L'interaction de CagA avec SHP-2 rend la phosphatase sous une conformation active, entraînant l'hyperactivation du sentier RAS-RAF-MEK-ERK, impliqué dans la transformation néoplasique des cellules gastriques (Hatakeyama, 2004).

Récemment, une étude japonaise a identifié deux polymorphismes présents dans les introns du gène *PTPN11* chez des patients souffrant de colite ulcéreuse. Bien que l'impact de ces polymorphismes ne soit pas identifié, les auteurs spéculent qu'ils pourraient affecter l'expression, l'activité ou l'affinité de SHP-2 pour ses substrats (Narumi *et al.*, 2009).

## Hypothèse et Objectifs

SHP-2 est une protéine tyrosine phosphatase qui contrôle de nombreuses voies de signalisation dont les voies ERK1/2 (Dance *et al.*, 2008), Jak/STAT (Xu et Qu, 2008) et NFκB (Xu *et al.*, 2012; You *et al.*, 2001). SHP-2 régule également plusieurs processus cellulaires incluant la prolifération (Agazie et Hayman, 2003), la migration (Yu *et al.*, 1998) et la différenciation (Kontaridis *et al.*, 2004). Les études effectuées à l'aide de différents modèles murins de délétion conditionnelle montrent l'importance de SHP-2 dans le maintien de l'homéostasie de plusieurs tissus et organes, dont le foie (Bard-Chapeau *et al.*, 2011), les poumons (Zhang *et al.*, 2012) et le coeur (Princen *et al.*, 2009). Finalement, SHP-2 est impliquée dans diverses maladies humaines telles que le syndrome de Noonan et différents types de cancers (Bentires-Alj *et al.*, 2004). Cependant, bien que cette protéine tyrosine phosphatase soit exprimée de façon ubiquiste et donc dans l'épithélium intestinal (Feng *et al.*, 1993), son rôle dans ce tissu n'était pas connu avant nos travaux.

L'objectif principal de mes travaux de doctorat était donc de **déterminer les rôles de la protéine tyrosine phosphatase SHP-2 dans les cellules de l'épithélium intestinal**. Notre hypothèse était que *SHP-2 exprimée dans les cellules épithéliales intestinales contrôlait l'homéostasie de l'intestin en régulant des processus clés comme la prolifération, la migration et la différenciation cellulaires*.

Pour répondre à cette hypothèse, deux approches expérimentales ont été principalement utilisées soit la génération d'un modèle murin de délétion conditionnelle de *Shp-2* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales et la génération d'un shARN ciblant spécifiquement l'expression de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales en culture.

Le premier objectif de mes travaux était donc de caractériser l'impact d'une perte d'expression de *Shp-2* dans les cellules épithéliales intestinales sur l'homéostasie intestinale et ce, chez la souris.

Le deuxième objectif était de déterminer les processus cellulaires et effecteurs de signalisation contrôlés par SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales.

## Matériel et Méthodes

### 1. Matériel

#### 1.1. Anticorps

Les anticorps dirigés contre SHP-2 (C-18), ERK2 (D-2), chromogranine A (C-20) et les tyrosines phosphorylées (p-Tyr) (PY99) proviennent de Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). Les anticorps ciblant la  $\beta$ -caténine (610154), la E-cadhérine (610181) et la paxilline (610051) ont été achetés chez BD Transduction Laboratories (Mississauga, ON, Canada). Les anticorps contre la claudine-1 (51-9000), claudine-2 (51-6100), claudine-3 (34-1700), claudine-4 (36-4800), claudine-8 (40-0700Z) et claudine-15 (38-9200) proviennent de la compagnie Life Technologies (Burlington, ON, Canada). Les anticorps reconnaissant les formes phosphorylées de ERK1/2 (T202/Y204, 9101), RelA (S536, 3033) et STAT3 (Y705, 9145) de même que les formes totales de RelA (4764) et STAT3 (4904) proviennent de chez Cell Signaling (Denvers, MA, USA). L'anticorps anti-actine (Clone 4) est de la compagnie EMD Millipore (Billerica, MA, USA). Les anticorps anti-tubuline (ab6161) et anti-PCNA (ab18197) viennent d'Abcam (Cambridge, MA, USA). L'anticorps ciblant le lysozyme (A0099) a été acheté de la compagnie Dako (Copenhagen, Danemark). L'anticorps phalloïdine couplé au FITC (P5282) provient de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Les anticorps secondaires anti-lapin HRP (NA931V) et anti-souris HRP (NA934V) viennent de la compagnie GE Healthcare Life Sciences (Pittsburg, MA, USA). Finalement, les anticorps secondaires d'âne AlexaFluor568 conjugué à la rhodamine (anti-lapin A10042) ou AlexaFluor488 conjugué à la FITC (anti-rat A21208, anti-souris A21202, anti-lapin A21206, anti-chèvre A11055) proviennent de Molecular Probes (Life Technologies, Burlington, ON, Canada).

#### 1.2. Inhibiteurs

Les inhibiteurs pharmacologiques NSC-87877 (565851) et Y-27632 (688001) ont été achetés de la compagnie EMD Millipore tandis que le U0126 provient de L.C. Laboratories (Woburn, MA, USA).



## 2. Méthodes

### 2.1. Souris

Les souris *Shp-2*<sup>flox/flox</sup> (F3) nous ont été généreusement offertes par le Pr Gen-Sheng Feng (University of California, San Diego, CA, USA) (Zhang *et al.*, 2004). Celles-ci ont été dérivées pendant 9 générations avec des souris C57BL/6 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Les souris transgéniques C57BL/6 12.4KbVilCre (*Villine-Cre*) générées par la Pre Deborah Gumucio (University of Michigan, MI, USA) nous ont été gracieusement fournies par la Pre Nathalie Perreault (Université de Sherbrooke, QC, Canada) (Madison *et al.*, 2002). Les souris *Myd88*<sup>flox/flox</sup> (B6.129P2-*Myd88*<sup>tm1Defr/J</sup>, 008888) ont été achetées de la compagnie Jackson Laboratory. Finalement, les souris transgéniques contenant une mutation V600E dans un des allèles de *BRaf* et des insertions de séquences loxP au pourtour (*BRaf*<sup>CA/+</sup>) nous ont été généreusement offertes par le Pr Martin McMahon (University of California, San Francisco, CA, USA) (Dankort *et al.*, 2007). Les souris ont été génotypées selon les protocoles déjà publiés (Dankort *et al.*, 2007; Madison *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004) ou selon les instructions de la compagnie Jackson Laboratory.

Pour obtenir des souris présentant une délétion conditionnelle de *Shp-2* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales (*SHP-2*<sup>CEI-KO</sup>), les souris *Shp-2*<sup>flox/flox</sup> ont été croisées avec les souris *Villine-Cre* afin d'obtenir des souris *Shp-2*<sup>flox/wt</sup> *Villine-Cre*. Ces souris ont ensuite été recroisées avec des souris *Shp-2*<sup>flox/flox</sup> afin d'obtenir des souris *SHP-2*<sup>CEI-KO</sup> (*Shp-2*<sup>flox/flox</sup> *Villine-Cre*), des souris hétérozygotes (*Shp-2*<sup>flox/wt</sup> *Villine-Cre*) ou des souris témoins (*Shp-2*<sup>flox/wt</sup>) (Schéma 9A).

Afin de générer des souris présentant la délétion des gènes *Shp-2* et *Myd88* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales (*SHP-2*; *Myd88*<sup>CEI-KO</sup>), les croisements de souris suivants ont été effectués. Tout d'abord, les souris *Shp-2*<sup>flox/flox</sup> ont été croisées avec les souris *Myd88*<sup>flox/flox</sup> afin d'obtenir des souris *Shp-2*<sup>flox/wt</sup>; *Myd88*<sup>flox/wt</sup> puis ces souris ont été recroisées entre elles afin d'obtenir des souris *Shp-2*<sup>flox/flox</sup>; *Myd88*<sup>flox/flox</sup>. Les souris *Shp-2*<sup>flox/flox</sup>; *Myd88*<sup>flox/flox</sup> ont été croisées avec les *Villine-Cre* dans le but d'obtenir des souris *Shp-2*<sup>flox/wt</sup>; *Myd88*<sup>flox/wt</sup> *Villine-Cre*. Finalement, les souris *Shp-2*<sup>flox/wt</sup>; *Myd88*<sup>flox/wt</sup> *Villine-Cre* ont été croisées avec les souris *Shp-2*<sup>flox/wt</sup>; *Myd88*<sup>flox/wt</sup>

ou  $Shp-2^{\text{flox/flox}};Myd88^{\text{flox/flox}}$  afin d'obtenir des souris témoins ( $Shp-2^{\text{flox/wt}};Myd88^{\text{flox/wt}}$ ), des souris  $Myd88^{\text{CEI-KO}}$  ( $Shp-2^{\text{wt/wt}};Myd88^{\text{flox/flox}}$  *Villine-Cre*), des souris  $SHP-2^{\text{CEI-KO}}$  ( $Shp-2^{\text{flox/flox}};Myd88^{\text{wt/wt}}$  *Villine-Cre*) et des souris  $SHP-2;Myd88^{\text{CEI-KO}}$  ( $Shp-2^{\text{flox/flox}};Myd88^{\text{flox/flox}}$  *Villine-Cre*) (Schéma 9B).

Afin d'obtenir des souris présentant la délétion de *Shp-2* et exprimant une forme constitutive active de *B-Raf* dans les cellules épithéliales intestinales ( $SHP-2^{\text{CEI-KO}};B-Raf^{\text{CEI-CA}}$ ), plusieurs croisements de souris ont été faits. Premièrement, les souris  $Shp-2^{\text{flox/flox}}$  ont été croisées avec les souris *Villine-Cre* afin d'obtenir des souris  $Shp-2^{\text{flox/wt}}$  *Villine-Cre*. Deuxièmement, les souris  $Shp-2^{\text{flox/flox}}$  ont été croisées avec des souris  $B-Raf^{\text{CA/CA}}$  afin d'obtenir des souris  $Shp-2^{\text{flox/wt}};B-Raf^{\text{CA/+}}$ . Finalement, les souris  $Shp-2^{\text{flox/wt}};Villine-Cre$  ont été croisées avec les souris  $Shp-2^{\text{flox/wt}};B-Raf^{\text{CA/+}}$  afin de générer des souris témoins ( $Shp-2^{\text{flox/wt}};B-Raf^{\text{+/+}}$ ), des souris  $B-Raf^{\text{CEI-CA}}$  ( $Shp-2^{\text{wt/wt}};B-Raf^{\text{CA/+}}$  *Villine-Cre*), des souris  $SHP-2^{\text{CEI-KO}}$  ( $Shp-2^{\text{flox/flox}};B-Raf^{\text{+/+}}$  *Villine-Cre*) et des souris  $SHP-2^{\text{CEI-KO}};B-Raf^{\text{CEI-CA}}$  ( $Shp-2^{\text{flox/flox}};B-Raf^{\text{CA/+}}$  *Villine-Cre*) (Schéma 9C).

Tous ces croisements et les expériences associées ont été approuvés par le comité éthique de protection des animaux de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke.

## 2.2. Immunobuvardage

Des extraits totaux de souris nouveau-nées et des enrichissements de muqueuse de souris âgées de 2 semaines ou plus, obtenus par le grattage de la muqueuse avec une lamelle, ont été lysés dans du tampon RIPA froid (50mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 0,5mM EDTA, 1% NP-40, 0,5% Na Deoxycholate, 0,1% SDS, 1mM DTT, 40mM  $\beta$ -glycérophosphate, 200 $\mu$ M orthovanadate, 1mM fluorure phénylméthylsulfonyl, 1 $\mu$ g/mL leupeptine, 1,4 $\mu$ g/mL pepstatine et 1 $\mu$ g/mL aprotinine). Les cellules IEC-6 et Caco-2/15 ont aussi été lysées dans du tampon RIPA, mais contenant la moitié de la quantité des inhibiteurs (orthovanadate, leupeptine, pepstatine et aprotinine). Les échantillons ont ensuite été centrifugés afin d'enlever les débris cellulaires et dosés par la méthode BCA



(Smith *et al.*, 1985) en se référant à une courbe standard de BSA. Une quantité de 20µg d'extraits protéiques a été solubilisée dans du tampon Laemmli, séparée sur gel SDS-PAGE avant d'être transférée sur une membrane de PVDF (NEF1002001PK, PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada). Les protéines ont été visualisées à l'aide du rouge de Ponceau. Par la suite, la membrane a été bloquée pendant 1h à la température de la pièce dans la solution de blocage (PBS/0,05% Tween contenant 5% de lait en poudre), incubée toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage puis suite à des lavages dans du PBS, incubée pendant 1h à la température de la pièce avec les anticorps secondaires dilués dans la solution de blocage. Les protéines d'intérêt ont été révélées par chimiluminescence avec un ECL maison (90mM d'acide coomarique (C9008, Sigma-Aldrich) et 250mM de luminol (A8511, Sigma-Aldrich) sur des films autoradiographiques (Denville Scientific Inc., Saint-Laurent, QC, Canada).

### **2.3. Immunohistochimie**

Les tissus de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> ainsi que les biopsies de patients témoins et atteints de maladies inflammatoires intestinales (collaboration avec le Dr Corentin Babakissa) ont été fixés toute la nuit à 4°C dans 4% de paraformaldéhyde (P6148, Sigma-Aldrich) puis déshydratés et inclus dans de la paraffine. Des coupes de 5µm ont été déposées sur des lames Probe-On Plus (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Les tissus ont été déparaffinés dans le xylène et réhydratés avant d'être placés dans une solution 10mM d'acide citrique pH6 ou une solution 1mM EDTA pH8, 0,05% Tween20 avant d'être chauffés au four micro-ondes. La suite du protocole a été faite selon les procédures recommandées par la compagnie Dako (K4011, Dako) puis les lames ont été montées avec du Vectamount (H-5000, Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada). Les photos des immunohistochimies ont été prises avec un Leica DFC300X (Leica, Buffalo Grove, IL, USA) ou un Nanozoomer 2.0 RS (Hamamatsu Photonics, Bridgewater, NJ, USA).

Pour le comarquage à l'Alcian bleu et au lysozyme, l'immunohistochimie a été effectuée en premier selon les procédures du fabricant (Dako) sans toutefois procéder à la contre coloration à l'hématoxyline. Puis, la coloration à l'Alcian bleu a été faite. Les lames

ont été montées avec du Vectamount (Vector Laboratories). Les photos des lames ont été prises avec un Leica DFC300X (Leica).

#### ***2.4. Colorations histologiques***

Les côlons et intestins grêles de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> ont été fixés toute la nuit à 4°C dans 4% de paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich), déshydratés et inclus dans la paraffine. Des coupes de 5µm ont été déposées sur des lames Probe-On Plus (Fisher Scientific).

Pour les colorations à l'hématoxyline et à l'éosine, elles ont été effectuées par la plateforme d'histologie et de microscopie électronique de l'Université de Sherbrooke. Les photos des colorations ont été prises avec un Leica DFC300X (Leica) ou un Nanozoomer 2.0 RS (Hamamatsu Photonics). Les lames des souris témoins et expérimentales âgées entre 12 à 15 mois ont été envoyées à notre collaboratrice Pre Marilène Paquet, une pathologiste, afin d'être analysées (Université de Montréal, QC, Canada).

Pour les colorations à l'Alcian bleu, les tissus ont été déparaffinés dans le xylène, réhydratés, mis dans 3% d'acide acétique pendant 3min avant d'être incubés pendant 30min dans de l'acide acétique contenant 1% d'Alcian bleu (pH2,5, K066-802, Poly Scientific, Bay Shore, NY, USA). Les lames ont par la suite été rincées dans de l'eau courante avant d'être contre colorées pendant 1min avec 0,1% nuclear fast red. Suite à des lavages dans l'eau, les lames ont été déshydratées et montées avec du Vectamount (Vector Laboratories). Les photos des colorations à l'Alcian bleu ont été prises avec un Leica DFC300X (Leica).

#### ***2.5. Immunofluorescence sur tissus***

Les tissus de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> ont été fixés toute la nuit à 4°C dans 4% de paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich), déshydratés et inclus dans de la paraffine. Des coupes de 5µm ont été déposées sur des lames Probe-On Plus (Fisher Scientific). Les tissus ont été déparaffinés dans le xylène, réhydratés avant d'être placés dans une solution 10mM

d'acide citrique pH6 ou une solution 1mM EDTA pH8, 0,05% Tween20 avant d'être chauffés au four micro-ondes. Les lames ont ensuite été lavées à l'eau courante et bloquées pendant 30min à la température de la pièce dans du PBS contenant 2% de BSA. Elles ont ensuite été mises en contact avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage à 4°C pendant toute une nuit suivi de lavage au PBS et d'une incubation avec les anticorps secondaires pendant 30min à la température de la pièce. Les lames ont été montées avec du Immu-Mount (9990402, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). Les photos des immunofluorescences ont été prises avec un Leica DFC300X (Leica).

## **2.6. Index de maladie**

L'index de maladie des souris a été évalué en prenant en compte 4 critères évalués sur une échelle de 0 à 4 soit la dureté du côlon, les saignements rectaux, le sang dans les fèces ainsi que leur consistance. Puis, la note obtenue pour chacun des critères a été additionnée (Cooper *et al.*, 1993).

## **2.7. Dosage de cytokines et chimiokines**

La production de cytokines et de chimiokines a été mesurée à l'aide de puces à anticorps (AAM-INF-G1-8, RayBiotech, Norcross, GA, USA). Les puces ont été scannées avec un filtre Cy3 à l'aide d'un ScanArray Express dual-color confocal laser scanner (PerkinElmer). Pour chaque cytokine ou chimiokine dosée, la moyenne de 6 souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> a été obtenue par rapport à la moyenne de 6 souris témoins, qui elle a été fixée à 1.

## **2.8. Extraction d'ARN, RT-PCR et PCR quantitatives**

Les ARNs provenant des extraits totaux de souris nouveau-nées, des enrichissements de muqueuse de souris âgées de 2 semaines ou des extraits de cellules IEC-6 ont été isolés à l'aide du Qiagen RNeasy Mini Kit (74104, Qiagen, Toronto, ON,

Canada) selon les instructions du fabricant. Ils ont ensuite été traités à la DNase (Roche, Laval, QC, Canada) pendant 20min à 37°C. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 4,5µL de EDTA (50mM pH8) suivie d'une incubation de 10min à 75°C. La quantité d'ARN a été dosée au Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). Pour la RT-PCR, 2µg d'ARN et 1µL oligodT (1µg/µL) ont été dilués dans un volume final de 20 µL d'eau, chauffés à 75°C pendant 5min et remis sur glace pour 5min. Par la suite, 8µL de tampon AMV RT 5X (Roche), 1,6µL de dNTP (25mM, Life Technologies), 1,2µL de Protector RNase inhibitor (Roche), 0,5µL de RT AMV (Roche) et 8,7µL d'eau ont été ajoutés puis incubés à 42°C pendant 1h. Finalement, 40µL d'eau a été ajouté. Les ADN complémentaires ont été apportés à la plateforme d'analyse du transcriptome (RNomique) de l'Université de Sherbrooke afin d'analyser l'expression quantitative des gènes d'intérêt.

L'analyse de l'expression en ARNm de *PTPN11* chez des patients témoins ou atteints de maladies inflammatoires intestinales a été faite à partir de TissueScan Real-Time arrays (Crohn's/Colitis cDNA Array I et II) achetés chez OriGene Technologies (Rockville, MD, USA). Brièvement, les ADN complémentaires ont été resuspendus dans de l'eau et séparés en deux. Une partie a servi à l'analyse de l'expression en ARNm de *PTPN11* en utilisant les amorces suivantes: 5' agagccaccctggagatttt 3' et 5' ctctccaccaacgctgcat 3' et l'autre partie a servi à l'analyse du gène de référence *β-ACTINE*, dont les amorces étaient fournies par la compagnie. Les PCR quantitatives ont été faites et analysées à l'aide du LightCycler software 4.0 (Roche), selon les recommandations de la compagnie. La synthèse de l'ADN double-brins a été suivie à l'aide du SYBR Green I (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen). L'expression en ARNm de *PTPN11* a été normalisée par rapport à l'expression du gène de référence.

## ***2.9. Traitement des souris aux antibiotiques***

Les souris témoins et expérimentales ont été séparées en trois groupes. Dans un premier groupe, les souris n'ont pas reçu de traitement aux antibiotiques, mais seulement de l'eau contenant 1% de saccharine (S10002, Sigma-Aldrich). Dans un second groupe, les mères ont été traitées aux antibiotiques pendant leur grossesse, soit dès le début du

croisement, faisant en sorte que les souriceaux sont traités dès leur naissance. Finalement, dans un troisième groupe, le début du traitement avec les antibiotiques s'est fait lors du sevrage, soit à la troisième semaine de vie. Le traitement aux antibiotiques consistait en un mélange d'ampicilline (1g/L, A9518, Sigma-Aldrich), de vancomycine (500mg/L, V2002, Sigma-Aldrich), de streptomycine (450mg/L, S6501, Sigma-Aldrich) et de métronidazole (1g/L, M376, Sigma-Aldrich), le tout dilué dans l'eau de boisson. De la saccharine (1%, Sigma-Aldrich) a aussi été ajoutée afin d'améliorer le goût de l'eau. Les souris ont été euthanasiées à la neuvième semaine de vie.

### **2.10. Culture cellulaire**

La lignée cellulaire Caco-2/15 a été obtenue du Pr Andrea Quaroni (Cornell University, NY, USA) et provient d'un clone isolé à partir de la lignée parentale Caco-2, issue d'un adénocarcinome de côlon humain, disponible chez ATCC (HTB 37, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) (Beaulieu et Quaroni, 1991). Les cellules Caco-2/15 ont été cultivées dans du milieu DMEM (319-005-CL, Wisent, St-Bruno, QC, Canada) contenant 10% de FBS (090-15, Wisent), 5mL de glutamax (35050-061, Life Technologies), 5mL d'HEPES 1M (330-050-EL, Wisent) et 2,5mL de pénicilline/streptomycine (450-201-EL, Wisent).

Les cellules IEC-6 ont été isolées à partir d'épithélium d'intestin grêle de rat nouveau-né (Quaroni *et al.*, 1979) et sont disponibles commercialement chez ATCC (CRL-1592). Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Wisent) contenant 5% de FBS (Wisent), 5mL de glutamax (Life Technologies), 5mL d'HEPES 1M (Wisent) et 2,5mL de pénicilline/streptomycine (Wisent).

Pour les productions virales, les cellules 293T (CRL-11268, ATCC) issues de reins embryonnaires ont été cultivées dans du milieu DMEM (Wisent) contenant 10% de FBS (Wisent), 5mL de glutamax (Life Technologies), 5mL d'HEPES 1M (Wisent) et 2,5mL de pénicilline/streptomycine (Wisent).



### **2.11. Génération de shARN, production de lentivirus et infection virale**

Le vecteur d'expression plenti6-U6 a été construit tel que décrit précédemment (Garneau H., 2009). Les oligonucléotides ciblant la protéine SHP-2 de forme humaine (5' gggccagagcagtcagtaa 3') ou de rat (5' gcgaagtttgaaccatttga 3') (shSHP-2) ont été déterminés par bio-informatique en utilisant le programme Block-iT RNAi Designer de Invitrogen. La séquence 5' ttcaagaga 3' a servi de boucle. Les oligonucléotides ont été hybridés avant d'être sous-clonés entre les sites de restriction *Bam*HI et *Xho*I. Un shARN ciblant la protéine GFP ou bien contenant une séquence mélangée du shSHP-2 humain ont servi de témoin négatif (shTémoin), respectivement dans les cellules IEC-6 et Caco-2/15. Les lentivirus ont été produits dans les cellules 293T par la transfection à la Lipofectamine 2000 (11668-019, Life Technologies) des constructions de shARN (shTémoin ou shSHP-2) et des plasmides exprimant les protéines d'encapsidation plp1, plp2 et plpvsvg. Après 2 jours, le milieu de culture contenant les lentivirus a été récolté et filtré (0,45µM). Les cellules IEC-6 ou Caco-2/15 ont étéensemencées dans des pétris 60mm. À 60% de confluence, elles ont été mises en présence de milieu de culture contenant les virus et 4µg/mL de polybrène (H9268, Sigma-Aldrich) pendant 1h avant de rajouter 4mL de milieu de culture. Les cellules ont été incubées pendant 2 jours à 37°C. Par la suite, les cellules ont été sélectionnées par l'ajout de 5µg/mL de blasticidine (46-1120, Life Technologies).

### **2.12. Traitement des cellules IEC-6 avec des produits bactériens ou des cytokines**

Les cellules IEC-6 shTémoin et shSHP-2 ont été amenées à confluence cellulaire et ont été privées en sérum pendant 24h. Les cellules ont par la suite été traitées avec 12,5µg/mL de lipopolysaccharide (LPS *E.Coli* O111:B4, 437627, EMD Millipore) ou 10ng/mL de flagelline (*S. typhimurium* 14028, ALX-522-058-C010, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) ou 10ng/mL d'interleukine-1β (A074.10, BioShop, Burlington, ON, Canada) ou finalement avec 10ng/mL d'interleukine-6 (B099.20, BioShop) pendant 5min, 30min, 1h, 2h ou 4h. Les cellules ont été lysées dans un tampon RIPA afin d'en extraire les protéines ou dans du tampon RLT (Qiagen) pour en extraire les ARNm.

### ***2.13. SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture)***

Les cellules IEC-6 ont été cultivées pendant cinq passages dans trois milieux de culture différents soit contenant des acides aminés légers (R0, K0), des acides aminés moyens (R6, K4) ou des acides aminés lourds (R10, K8). Par la suite, les cellules ont été infectées avec des lentivirus shTémoin ou shSHP-2 puis sélectionnées avec de la blasticidine (Life Technologies). Ces cellules ont été utilisées pour effectuer deux expériences: soit elles ont été amenées à confluence, privées en sérum pendant 24h et ensuite traitées pendant 15min ou 30min avec du LPS (EMD Millipore) ou soit elles ont été amenées à confluence, mises pendant 24h dans du milieu contenant 0,1% sérum avant d'effectuer des multiblessures à l'aide d'un grattoir pendant 5min ou 24h. Les pétris ont été lysés dans du tampon Triton (1% Triton X-100, 50mM Tris-HCl pH7,5, 100mM NaCl, 5mM EDTA pH8, 40mM  $\beta$ -glycérophosphate, 50mM NaF, 5% glycérol, 5% fluorure phénylméthylsulfonyle, 200 $\mu$ M orthovanadate, 0,5 $\mu$ g/mL leupeptine, 0,7 $\mu$ g/mL pepstatine et 0,5 $\mu$ g/mL aprotinine) supplémenté en 2% de NOG (Octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside, O8001, Sigma-Aldrich). Une immunoprécipitation avec un anticorps ciblant les tyrosines phosphorylées pré-couplé à des billes d'agarose (PY99, Santa Cruz Biotechnologies) a été faite à 4°C pendant 2h. Les immunoprécipitations ont été lavées dans du tampon Triton et ensuite avec 20mM de bicarbonate d'ammonium avant d'être digérées pendant 5h avec de la trypsine. La digestion a été arrêtée par l'ajout d'acide formique (1%). Les billes ont ensuite été resuspendues dans une solution contenant 60% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube puis séché par un SpeedVac avant d'être resuspendu dans 0,1% d'acide trifluoroacétique. Les échantillons ont été purifiés et concentrés via l'utilisation de ZipTip (EMD Millipore) avant d'être finalement resuspendus dans 1% d'acide formique. Les échantillons ont été apportés à la plateforme de protéomique de l'Université de Sherbrooke puis ont été analysés à l'aide d'un appareil de spectrométrie de masse Q Exactive orbitrap LC-MS (Thermo Fisher Scientific).

#### **2.14. Microscopie électronique**

Les tissus de souris ont été fixés toute la nuit à 4°C dans 2,8% de glutaraldéhyde diluée dans du tampon 0,1M cacodylate. Les tissus ont par la suite été apportés à la plateforme d'histologie et de microscopie électronique de l'Université de Sherbrooke pour la suite du protocole. Les photos ont été prises avec un Hitachi H-7500 (Hitachi, Schaumburg, IL, USA).

#### **2.15. Micropuce à ADN (Affymetrix)**

Des extraits totaux de trois souris témoins et trois souris expérimentales nouveau-nées ont été isolés à l'aide du Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen). Les ARNs ont été envoyés au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill puis un GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix, Cleveland, OH, USA) a été effectué. Le programme Flexarray 1.6.1. créé par l'Université McGill a été utilisé pour l'analyse statistique et la visualisation de données.

#### **2.16. Analyse de la microflore par électrophorèse sur gel en gradient dénaturant**

Les côlons de souris nouveau-nées ou les caecums de souris âgées de 2 semaines et 1 mois ont été congelés à -80°C avant d'être envoyés à la Pre Elena Verdu, notre collaboratrice de McMaster University (Hamilton, ON, Canada). Par la suite, les tissus ont été homogénéisés par une lyse mécanique à l'aide de billes (BioSpec, Bartlesville, OK, USA) suivi d'une lyse enzymatique. Puis, l'ADN bactérien a été précipité au phénol-chloroforme. La région V2-V3 de la sous-unité 16S de l'ADN ribosomique des bactéries a été amplifiée avec des amorces HDA1-GC et HDA2 (Walter *et al.*, 2000). Un gel en gradient dénaturant a été fait en utilisant un DCode universal mutation detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) tel que décrit précédemment (Bercik *et al.*, 2011). Le gel a été migré à 130 volts, à 60°C pendant 4,5h avant d'être coloré au SYBR green I (Sigma-Aldrich) et visualisé par transillumination aux ultraviolets. Le programme GelCompar II

(version 6.0; Applied Maths Inc. Austin, Texas, USA) a été utilisé pour l'analyse du gel. La parenté des communautés bactériennes a été exprimée en groupe, en utilisant le coefficient Dice et la UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

### **2.17. Analyse de la microflore par PCR quantitatives**

Les côlons de souris nouveau-nées ou les caecums de souris âgées de 2 semaines et 1 mois ont été congelés à -80°C avant d'être envoyés à la Pre Elena Verdu (McMaster University, ON, Canada). Les tissus ont été homogénéisés, puis l'ADN bactérien a été extrait. Des PCRs quantitatives ont été effectuées avec des amorces spécifiques à certains genres, espèces ou familles de bactéries comme décrites précédemment (Malinen *et al.*, 2003; Matsuki *et al.*, 2002). Brièvement, les produits de PCR ont été amplifiés et détectés en utilisant du SsoFast™ Evagreen supermix et un iCycler iQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La moyenne des cycles de seuil a été obtenue. Les valeurs de cycle de seuil indiquent le nombre de cycles nécessaires à la fluorescence pour franchir la ligne de base et sont inversement proportionnelles à la quantité d'acide nucléique présent dans l'échantillon.

### **2.18. Perméabilité *in vivo***

La perméabilité paracellulaire a été déterminée à l'aide de la technique du FITC-dextran. Les souris ont été gavées avec du FITC-dextran (FD4, Sigma-Aldrich); une quantité de 6mg était administrée pour une souris de 10g. Après 4h d'attente, une ponction cardiaque a été effectuée, le sérum a été extrait puis la quantité de FITC présent dans celui-ci a été dosé en utilisant un lecteur de plaque BioTek Synergy HT (480/520 nm, Winooski, VT, USA).

### **2.19. Résistance transépithéliale**

Dans une première expérience, les cellules Caco-2/15 shTémoin et shSHP-2 ont été ensemencées sur des inserts Transwell 0,4µm (Corning, Cambridge, MA, USA) et la résistance transépithéliale a été mesurée à l'aide d'un voltmètre (EVOM2, World Precision

Instruments, Sarato, FL, USA) à tous les 6 jours à partir de l'atteinte de la confluence. Dans une seconde expérience, les cellules Caco-2/15 ont étéensemencées sur des inserts Transwell 0,4 $\mu$ M, au dixième jour de confluence, elles ont été traitées, ou non, pendant 24h avec 5 $\mu$ M ou 20 $\mu$ M de U0126 (L.C. Laboratories), puis la résistance transépithéliale a été mesurée. La résistance transépithéliale a été calculée en ohm multiplié par la surface en cm<sup>2</sup> après avoir soustrait la résistance transépithéliale obtenue d'un insert seul.

### ***2.20. Test de restitution épithéliale***

Les cellules Caco-2/15 shTémoin et shSHP-2 ont étéensemencées dans des pétris 100mM et amenées à confluence. À l'aide d'une lame de rasoir, la monocouche a été blessée, rincée deux fois au PBS puis du milieu DMEM 10% sérum contenant 2mM d'hydroxyurée (H8627, Sigma-Aldrich) a été ajouté. Après 48h, des photos ont été prises avec un microscope Zeiss AxioVert 200 (Zeiss, Toronto, ON, Canada). À l'aide du programme ImageJ, l'aire recouverte par les cellules dans la blessure a été mesurée.

Les cellules IEC-6 shTémoin et shSHP-2 ont étéensemencées et amenées à confluence. Avec une lame de rasoir, la monocouche a été blessée, rincée deux fois au PBS avant d'y ajouter du milieu DMEM 0,1% sérum. Après 24h, des photos ont été prises. À l'aide du programme ImageJ, l'aire recouverte par les cellules dans la blessure a été obtenue.

Les cellules Caco-2/15 et IEC-6 ont étéensemencées dans des pétris 100mM et amenées à confluence. La monocouche a été blessée avec une lame de rasoir et rincée deux fois au PBS. Pour les Caco-2/15, du milieu DMEM 10% sérum contenant 2mM d'hydroxyurée (H8627, Sigma-Aldrich) ainsi que l'inhibiteur pharmacologique de SHP-1/SHP-2 (100 $\mu$ M NSC-87877, EMD Millipore) ou l'inhibiteur de la kinase ROCK (5 $\mu$ M ou 10 $\mu$ M Y-27632, EMD Millipore) a été ajouté. Pour les cellules IEC-6, du milieu DMEM 0,1% sérum contenant l'inhibiteur de SHP-1/SHP-2 (100 $\mu$ M NSC-87877, EMD Millipore) a été ajouté. Après 24h, des photos des blessures ont été prises avec un microscope Zeiss et l'aire recouverte par les cellules dans la blessure a été mesurée à l'aide du programme ImageJ.

### ***2.21. Immunofluorescence sur cellules***

Les cellules IEC-6 ont étéensemencées sur des lamelles et amenées à confluence. À l'aide d'une lame de rasoir, la monocouche de cellules a été blessée puis les cellules ont été mises dans du milieu 0,1% sérum. Après 24h, les cellules ont été fixées pendant 20min dans 3% de paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich) à la température de la pièce. Les cellules ont par la suite été perméabilisées pendant 10min avec 0,1% de Triton puis elles ont été incubées pendant 30min à la température de la pièce dans la solution de blocage (PBS, 2% BSA). Elles ont ensuite été mises en contact avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage à 4°C pendant toute une nuit suivi de lavages au PBS et d'une incubation avec les anticorps secondaires pendant 30min à la température de la pièce. Les lames ont été montées avec du Immu-Mount (9990402, Thermo Fisher Scientific). Les photos des immunofluorescences ont été prises avec un microscope Leica DM2500 (Leica).

### ***2.22. Cinétique de multiblessures***

Les cellules Caco-2/15 ainsi que les cellules IEC-6 shTémoin et shSHP-2 ont étéensemencées dans des pétris 100mM. Lors de l'atteinte de la confluence, les cellules ont été rincées au PBS et placées dans du milieu DMEM contenant 0,1% sérum. Après 24h d'attente, la monocouche a été blessée à l'aide d'un grattoir de façon à former un quadrillé. Une cinétique de blessure avec des temps courts (non blessé, 1min, 5min, 30min et 1h) et l'une avec des temps longs (non blessé, 2h, 4h, 6h, 8h, 16h et 24h) ont été faites. Les cellules ont été lysées, les échantillons dosés et puis des immunobuvardages ont été réalisés.

### ***2.23. Dosage de l'activité de RhoA***

Les cellules Caco-2/15 shTémoin et shSHP-2 ont étéensemencées dans des pétris 100mM et amenées à confluence. La monocouche a été blessée avec un grattoir puis les cellules ont été mises dans du milieu DMEM 10% sérum contenant 2mM d'hydroxyurée

pendant 24h. L'activité de RhoA a été mesurée par G-LISA RhoA Activation Assay Biochem Kit (BK124, Cytoskeleton, Denver, CO, USA) selon les instructions du fabricant.

#### ***2.24. Détection des polymorphismes rs2301756 et rs3741983***

Le sang de patients témoins ou atteints de maladies inflammatoires intestinales a été prélevé puis à partir de 100µL de celui-ci, l'ADN a été extrait avec un DNeasy blood and tissue kit de Qiagen (69504). Des PCR ont été effectuées avec les amorces 5' ctggtcttgaactctggc 3' et 5' gacttgccgctcattgctctc 3' pour détecter le polymorphisme rs2301756 ainsi que les amorces 5'ggtgccagagtctttccag 3' et 5' gctctgatctccactcgtc 3' pour le polymorphisme rs3741983. Les produits de PCR ont été séquencés par la plateforme de séquençage et de génotypage de génome de l'Université Laval (Québec, QC, Canada). Suite à des alignements de séquence via l'utilisation du programme clustalW2, les polymorphismes rs2301756 (A/G) et rs3741983 (C/T) ont été détectés. Toutes les expériences ont été approuvées par le comité éthique de la recherche en santé chez l'humain du CHUS.

#### ***2.25. Analyses statistiques***

Les analyses statistiques ont été faites en utilisant un test de Student à l'aide de GraphPad (Irvine, CA, USA) à l'exception des analyses faites sur les patients où le test de Mann-Whitney a été employé. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque les valeurs de p étaient: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  ou \*\*\*  $p \leq 0,001$ . La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.

## Résultats

### Chapitre 1: Contrôle de l'homéostasie intestinale par la protéine tyrosine phosphatase SHP-2

Plusieurs études ont rapporté que SHP-2 est une protéine exprimée de façon ubiquiste, notamment dans l'intestin (Feng *et al.*, 1993). Par contre, les rôles joués par cette phosphatase dans l'épithélium intestinal n'avaient jamais été caractérisés.

#### ***1.1. Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> accusent un important retard de croissance comparativement aux souris témoins***

Nous avons tout d'abord confirmé l'expression de SHP-2 dans l'épithélium intestinal et ce, selon l'axe rostral-caudal de l'intestin chez la souris. Comme observé par immunobuvardage à la Figure 1A, SHP-2 est exprimée de façon similaire dans les différents segments de l'intestin (duodénum, jéjunum, iléon et côlon).

Dans le but de vérifier l'impact de la perte d'expression de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales, nous avons généré un modèle murin de délétion conditionnelle de *Shp-2* spécifiquement dans ces cellules. Pour ce faire, nous avons croisé des souris contenant une insertion loxP de part et d'autre de l'exon 4 du gène codant pour *Shp-2* (*Shp-2<sup>flox/flox</sup>*) (Zhang *et al.*, 2004) avec des souris transgéniques *Villine-Cre* exprimant la Cre spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales au jour embryonnaire 15.5 (E15.5) (Gao et Kaestner, 2010; Madison *et al.*, 2002). Tout d'abord, nous avons validé la perte d'expression de SHP-2 dans notre modèle murin par immunobuvardage dans des extraits de muqueuse. Nous observons que les souris témoins expriment fortement SHP-2 tant dans les extraits épithéliaux de jéjunum que de côlon tandis que les extraits épithéliaux des souris expérimentales (SHP-2<sup>CEI-KO</sup>) montrent très peu d'expression de la phosphatase (Figure 1B). Par immunohistochimie, nous observons l'expression de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales des souris témoins ainsi que dans les cellules du stroma. Par contre, une baisse très importante de l'expression de SHP-2 est observée dans l'épithélium des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> alors que le marquage détecté dans le stroma demeure

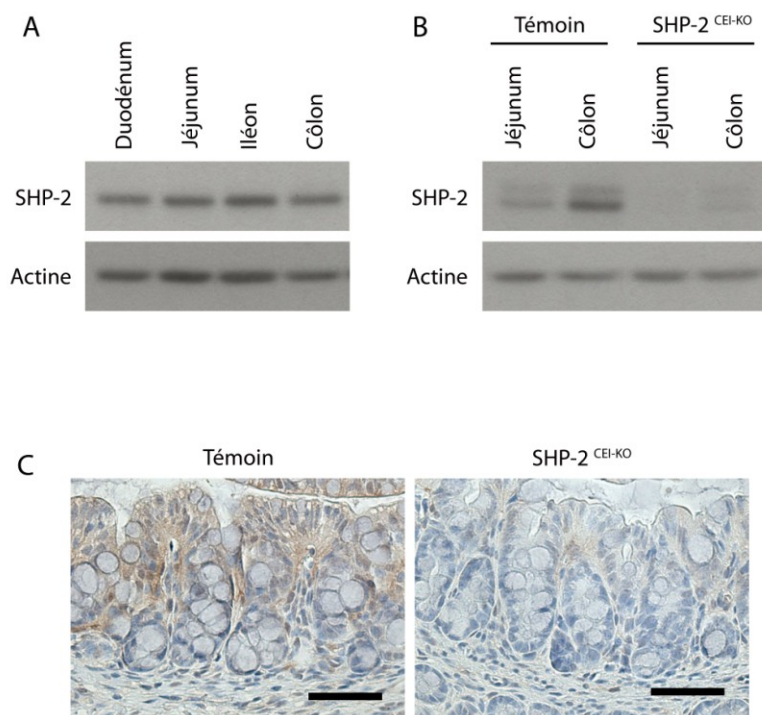


similaire à celui observé chez les souris témoins (Figure 1C). Ces résultats valident ainsi la perte épithéliale de l'expression de SHP-2 dans notre modèle murin.

Lors du croisement des souris, aucune différence dans les ratios mendéliens entre les souris témoins et expérimentales n'a été observée. À la naissance, les souriceaux avaient tous un poids équivalent. Toutefois, nous avons rapidement constaté un retard de croissance des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> par rapport aux souris témoins. En effet, dès l'âge de 3 semaines et de façon plus marquée à 1 mois, les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> démontrent un poids significativement plus petit que celui des souris témoins (Figure 2A). D'ailleurs, à la Figure 2B, nous observons que la souris expérimentale est plus petite et plus maigre que la souris témoin à l'âge de 1 mois. Effectivement, l'indice de masse corporel des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 mois est réduit de 30,8% (n=15) en comparaison à celui des souris témoins. Toutefois, aucune différence entre le poids de souris hétérozygotes et témoins n'a été observée (résultats non montrés).

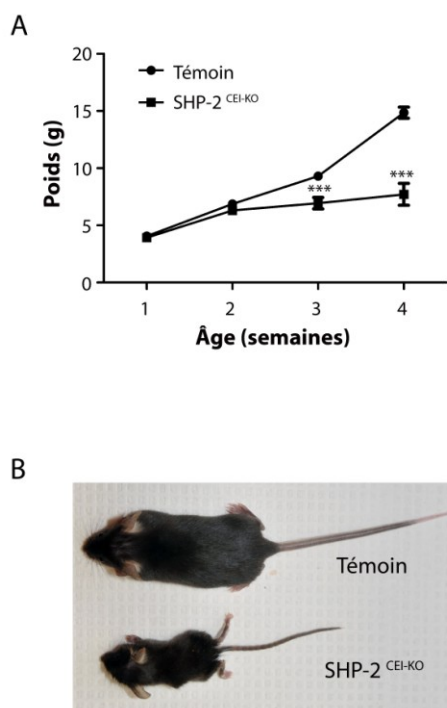
### ***1.2. Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> développent spontanément de l'inflammation dans le côlon***

Le suivi régulier des souris montre que dès l'âge de 1 mois, les souris expérimentales présentent de la diarrhée ainsi que, dans certains cas, des saignements rectaux. De plus, la mort de certains individus a rapidement été observée (Figure 3A). Nous avons donc évalué l'index de maladie de nos souris en nous basant sur la grille proposée par Cooper (Cooper *et al.*, 1993). Nous observons que toutes les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 mois présentent un index de maladie significativement plus élevé que les souris témoins (Figure 3B). Macroscopiquement, nous avons observé une inflammation sévère affectant l'ensemble du côlon sans toutefois affecter l'intestin grêle (Figure 3C). Nous avons confirmé ces observations en effectuant des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine sur des coupes de côlon proximal et distal. Dans les souris témoins, l'organisation du tissu colique est normale. Nous y retrouvons de multiples cryptes coliques contenant des cellules à mucus. Par contre, chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 mois, une sévère désorganisation du tissu colique, principalement au niveau du côlon distal, est observée et est caractérisée par un allongement des cryptes coliques (voir accolade), une infiltration de



**Figure 1: Validation de la perte d'expression de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales chez les souris expérimentales.**

(A) L'expression de SHP-2 selon l'axe rostral caudal (duodénum, jéjunum, iléon et côlon) a été analysée par immunobuvardage à partir d'enrichissements de muqueuse de souris de 3 mois. L'actine a servi de contrôle de charge. (B) L'expression de SHP-2 a été analysée par immunobuvardage sur des enrichissements de muqueuse de jéjunum et de côlon de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 4 mois. L'actine a servi de contrôle de charge. (C) L'expression de SHP-2 a été analysée par immunohistochimie sur des coupes de côlon de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines. Barre de calibration, 50 μm.



**Figure 2: Retard de croissance chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

(A) Le poids des souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> a été noté à toutes les semaines pendant 1 mois ( $n \geq 12$  par groupe, \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (B) Une photo représentative d'une souris témoin et d'une souris expérimentale âgées de 1 mois a été prise.

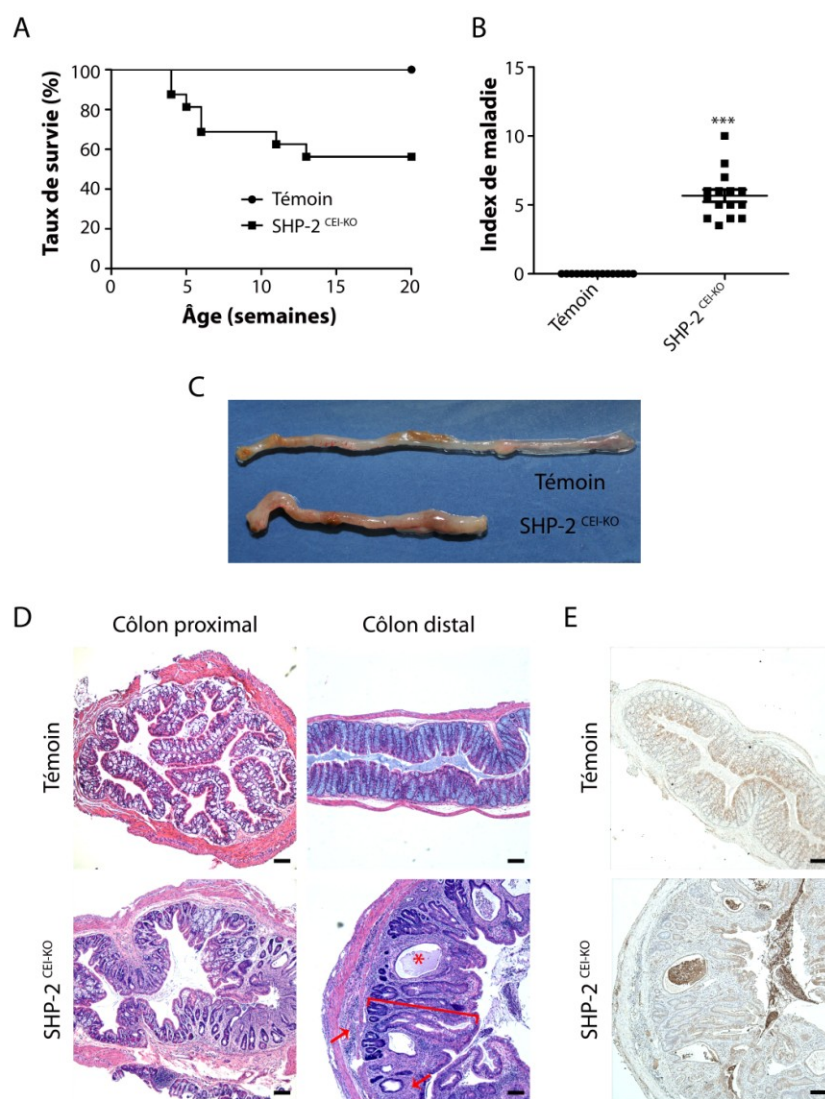
cellules immunitaires (voir flèche), une perte de cellules à mucus ainsi que la présence d'abcès de cryptes (voir astérisque) (Figure 3D).

Nous avons par la suite vérifié le type de cellules immunitaires recrutées dans le côlon des souris mutantes. Nous avons donc effectué une immunohistochimie dirigée contre la myeloperoxydase (MPO), une enzyme lysosomale présente dans les cellules de la série myéloïde (Pinkus et Pinkus, 1991). Tel qu'illustré à la Figure 3E, nous avons observé un fort marquage au niveau des abcès de cryptes, mais aussi dans la lamina propria des souris expérimentales.

Plusieurs cytokines et chimiokines participent à l'initiation et à la progression de l'inflammation intestinale (Atreya et Neurath, 2010; Neurath, 2014). Nous avons donc voulu identifier quelles cytokines et chimiokines avaient une expression modulée chez nos souris expérimentales. Pour ce faire, nous avons effectué une quantification par un essai de type *Antibody array* sur des extraits totaux de côlon de souris témoins et expérimentales âgées de 2 et 3 semaines. Nous avons noté une hausse de plusieurs cytokines et chimiokines (Tableau 1) tandis que d'autres n'étaient pas affectées (Tableau 2). Par exemple, les chimiokines CXCL1 et CXCL5 sont fortement induites dans le côlon des souris mutantes et servent, entre autres, à l'attraction des neutrophiles au site d'inflammation (Fournier et Parkos, 2012). À 3 semaines, plusieurs cytokines pro-inflammatoires présentent une augmentation d'expression dont l'IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-12. De plus, une diminution significative d'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 est également observée chez les souris expérimentales par rapport aux souris témoins.

### ***1.3. Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> nouveau-nées ne démontrent pas d'altérations morphologiques dans leur côlon***

Afin de déterminer à quel moment l'inflammation intestinale apparaît dans notre modèle murin, nous avons analysé l'architecture du tissu colique chez des souris beaucoup plus jeunes, soit âgées de 1 jour et de 2 semaines. Il est intéressant de noter que chez les souris nouveau-nées, aucune différence histologique notable n'est observée entre les côlons



**Figure 3: Apparition spontanée d'une sévère colite chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 mois.**

(A) Le pourcentage de survie de 16 souris témoins et de 16 souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> a été évalué jusqu'à 20 semaines de vie. (B) L'index de maladie des souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 mois a été évalué en prenant en compte la dureté du côlon, les saignements rectaux, le sang dans les fèces ainsi que leur consistance ( $n \geq 15$  par groupe, \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (C) Une photo représentative d'un côlon de souris témoin et de souris expérimentale âgées de 4 mois a été prise. (D) Des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine ont été effectuées sur des coupes de côlon proximal et distal de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 mois. Astérisque: abcès de crypte, Accolade: allongement des cryptes, Flèche: infiltration de cellules immunitaires. Barre de calibration, 100 $\mu$ m. (E) Une immunohistochimie dirigée contre le marqueur de neutrophiles MPO a été effectuée sur des coupes de côlon distal de souris témoins et expérimentales âgées de 1 mois. Barre de calibration, 100 $\mu$ m.

**Tableau 1: Altération de la production de chimiokines et de cytokines chez les souris SHP-2<sup>CEL-KO</sup> comparativement aux souris témoins.**

Cytokines, Chimiokines et autres	2 semaines	3 semaines
IL-1 $\alpha$	0,98	4,43 **
IL-1 $\beta$	0,97	1,36 **
IL-2	0,84 *	0,80 *
IL-4	0,91 *	0,95
IL-6	0,92 *	3,43 *
IL-10	0,87 **	0,84 *
IL-12	1,07	1,32 *
IL-17	0,87 *	1,07
TNF $\alpha$	0,88 *	0,89 **
CCL1 (TCA-3)	0,81 **	0,71 **
CCL2 (MCP-1)	0,98	9,11 **
CCL3 (MIP- $\alpha$ )	0,89 **	1,23
CCL5 (RANTES)	1,76 *	2,75 **
CCL9 (MIP- $\gamma$ )	1,31 *	1,26 *
CCL11 (Eotaxine-1)	1,18 *	5,10 ***
CCL25 (TECK)	0,90 *	0,87 *
CXCL1 (KC)	2,28	14,1 **
CXCL5 (LIX)	3,39 *	8,94 ***
CXCL9 (MIG)	0,92 *	1,24 *
CXCL13 (BLC)	1,13	3,25 ***
CX3CL1 (Fractalkine)	0,86 **	0,73 **
XCL1 (Lymphotactine)	0,92 *	0,92 **
GCSF	0,96	3,29 *
TIMP-1	1,70 **	3,51 ***
sTNFR II	1,45	2,05 *

Les cytokines et chimiokines ont été quantifiées par un essai de type *Antibody array* sur des extraits totaux de côlon de souris témoins et expérimentales âgées de 2 et 3 semaines. Pour chaque cytokine ou chimiokine dosée, la moyenne de 6 souris SHP-2<sup>CEL-KO</sup> a été obtenue par rapport à la moyenne de 6 souris témoins, qui elle a été fixée à 1 (n=6 par groupe, \* p $\leq$ 0,05, \*\* p $\leq$ 0,01, \*\*\* p $\leq$ 0,001).

**Tableau 2: Chimiokines et cytokines qui ne sont pas significativement modulées chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris témoins.**

Cytokines, Chimiokines et autres	2 semaines	3 semaines
IFN $\gamma$	0,96	0,98
IL-3	0,96	0,98
IL-9	0,94	0,85
IL-13	1,00	1,04
CCL24 (Eotaxine-2)	1,00	1,05
CXCL11 (I-TAC)	0,98	1,08
CXCL12 (SDF-1)	1,05	1,13
CD30L	0,95	0,97
Fas Ligand	0,91	0,99
GM-CSF	0,92	0,93
Leptine	0,98	1,13
MCSF	0,91	0,98
TIMP-2	0,96	1,01
sTNFR1	1,14	1,23

Les cytokines et chimiokines ont été quantifiées par un essai de type *Antibody array* sur des extraits totaux de côlon de souris témoins et expérimentales âgées de 2 et 3 semaines. Pour chaque cytokine ou chimiokine dosée, la moyenne de 6 souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> a été obtenue par rapport à la moyenne de 6 souris témoins, qui elle a été fixée à 1 (n=6 par groupe).

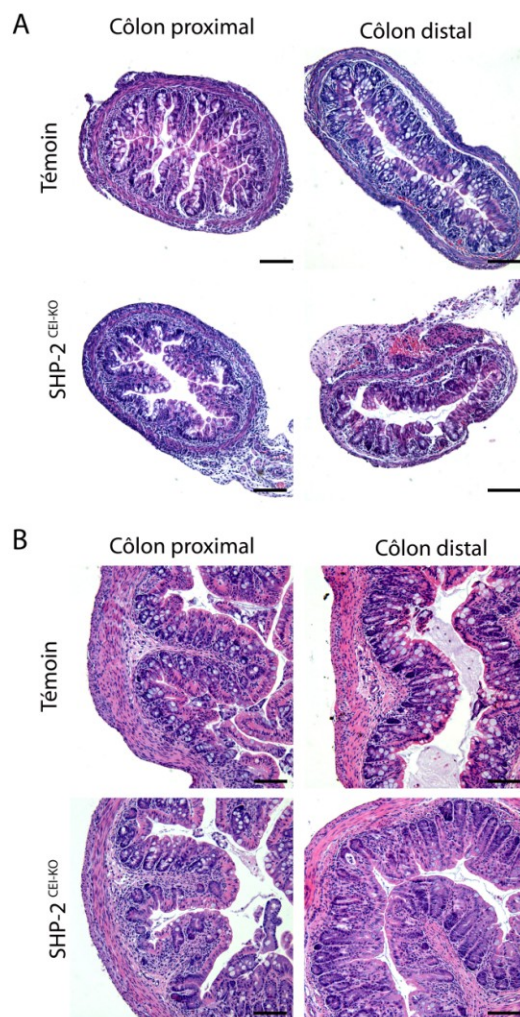
des souris témoins et expérimentales (Figure 4A). À 2 semaines, certaines différences sont visibles dans les côlons des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> dont un léger allongement des cryptes coliques ainsi qu'une diminution apparente du nombre des cellules à mucus (Figure 4B). Ces observations sont, encore une fois, plus perceptibles au niveau du côlon distal par rapport au côlon proximal. Ces résultats suggèrent donc qu'il n'y a pas de problème de développement du côlon chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et que celles-ci naissent en santé.

#### ***1.4. L'inflammation n'affecte pas l'intestin grêle des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>***

Nos observations macroscopiques suggéraient que l'inflammation affectait spécifiquement le côlon des souris expérimentales. Afin de confirmer ce résultat, nous avons effectué des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine sur des coupes d'intestin grêle de souris âgées de 1 jour, 2 semaines et 1 mois. Tel que présenté à la Figure 5, aucun signe d'inflammation n'est observé au niveau de l'intestin grêle et ce, même chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 mois, soit le moment où une sévère inflammation colique est observée.

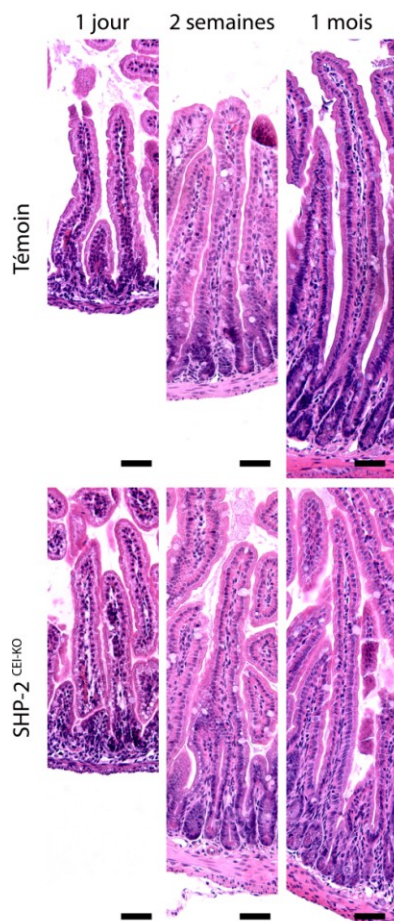
En résumé, nos résultats démontrent que l'absence d'expression de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales entraîne rapidement, dès 1 mois après la naissance, l'apparition d'inflammation et ce, spécifiquement au niveau du côlon.





**Figure 4: Absence d'inflammation intestinale chez les jeunes souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

Des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine ont été effectuées sur des coupes de côlon proximal et distal de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 jour (A) et de 2 semaines (B). Barre de calibration, 100 $\mu$ m. Figures représentatives de  $n \geq 4$  souris par groupe.



**Figure 5: Absence d'inflammation intestinale au niveau de l'intestin grêle des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.** Des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine ont été effectuées sur des coupes d'intestin grêle de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 jour, 2 semaines et 1 mois. Barre de calibration, 50 $\mu$ m. Figures représentatives de  $n \geq 4$  souris par groupe.

## **Chapitre 2: Rôles anti-inflammatoires de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales**

En plus de leur fonction dans la digestion et l'absorption des nutriments, les cellules épithéliales intestinales forment une barrière entre le contenu de la lumière intestinale et le milieu interne (Turner, 2009). Plusieurs modèles murins ont mis en évidence l'importance des cellules épithéliales intestinales dans le maintien de l'homéostasie intestinale notamment dans le maintien de la fonction barrière (par des jonctions serrées formées entre les cellules et la sécrétion de mucus), dans la restitution, dans la défense antimicrobienne et dans la régulation de l'immunité innée et adaptative (Mizoguchi, 2012; Peterson et Artis, 2014; Wirtz et Neurath, 2007). Nous avons donc voulu comprendre les mécanismes responsables du déclenchement de l'inflammation colique chez nos souris déficientes pour l'expression de *Shp-2*.

### ***2.1. SHP-2 contrôle plusieurs voies de signalisation impliquées dans le maintien de l'homéostasie intestinale et dans l'inflammation***

#### *2.1.1. Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> présentent une dérégulation des effecteurs de signalisation ERK1/2, STAT3, NFκB et β-caténine*

SHP-2 est une protéine tyrosine phosphatase rapportée pour contrôler la voie ERK1/2 (Dance *et al.*, 2008), la voie Jak/STAT3 (Xu et Qu, 2008), la voie NFκB (You *et al.*, 2001) et la voie Wnt/β-caténine (Takahashi *et al.*, 2011). Plusieurs études ont rapporté que ces voies de signalisation sont essentielles au maintien de l'homéostasie intestinale (Andreu *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2011; Nenci *et al.*, 2007; Pickert *et al.*, 2009). Par des immunobuvardages et/ou des PCR quantitatives, nous avons analysé le niveau d'activation de ces voies de signalisation dans le côlon des souris nouveau-nées et âgées de 2 semaines, donc avant l'apparition de l'inflammation.

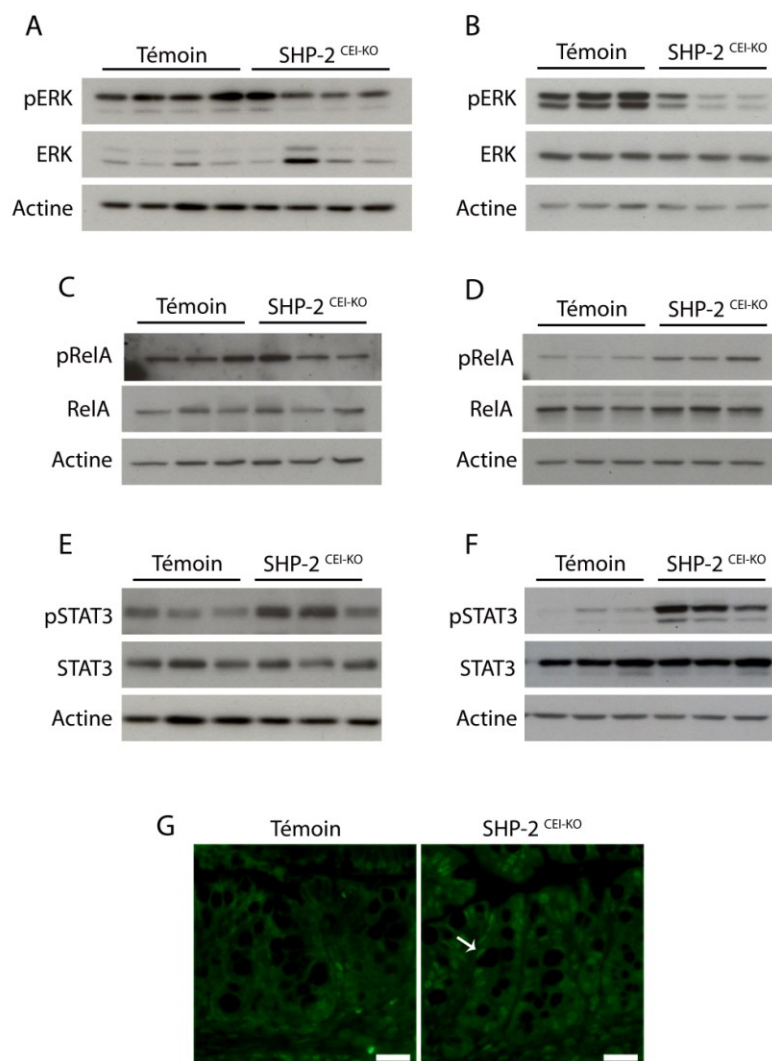
Dans un premier temps, nous avons analysé le niveau d'activation des kinases ERK1 et ERK2 en utilisant un anticorps reconnaissant les formes phosphorylées et actives de ces kinases. Tel que visualisé à la Figure 6A, le niveau de phosphorylation des ERK1/2 semble diminué dans le côlon de la plupart des souris mutantes nouveau-nées comparativement aux souris témoins. À 2 semaines après la naissance, une diminution

significative de la phosphorylation de ERK1/2 (T202/Y204) est observée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris témoins (4,46 fois  $\pm$ 1,28 fois, n=3) (Figure 6B). Par contre, le niveau d'activation des kinases JNK1/2 et p38 $\alpha$ / $\beta$  ne semble pas modulé dans l'épithélium des souris mutantes (résultats non montrés).

Nous avons par la suite analysé le niveau d'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B en suivant la phosphorylation de la sous-unité p65 (RelA) sur la sérine 536. Chez les souris SHP2<sup>CEI-KO</sup> nouveau-nées, aucune modulation significative de la phosphorylation de RelA n'est observée (Figure 6C); toutefois, 2 semaines après la naissance, une augmentation significative de 1,70 fois ( $\pm$ 0,32 fois, n=3) de la phosphorylation de RelA est notée dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> par rapport aux souris témoins (Figure 6D).

Nous avons aussi vérifié le niveau de phosphorylation du facteur de transcription STAT3 sur la sérine 705, un site de déphosphorylation connu pour SHP-2 (Zhang *et al.*, 2009). Tel qu'illustré à la Figure 6E, nous avons observé une hyperphosphorylation de STAT3 tant dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> nouveau-nées (Figure 6E) que des souris âgées de 2 semaines (4,72 fois  $\pm$ 1,08, n=3, Figure 6F). Afin de confirmer que cette augmentation de la phosphorylation de STAT3 était attribuable à une activation dans les cellules épithéliales intestinales, une immunofluorescence avec l'anticorps reconnaissant la forme phosphorylée et activée de STAT3 a été effectuée sur des coupes de tissus coliques de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup>. Nous observons à la Figure 6G, un marquage du phospho-STAT3 nettement plus élevé dans le noyau des cellules épithéliales intestinales chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> (voir flèche).

Finalement, le niveau d'expression de la  $\beta$ -caténine a été analysé. À la naissance, l'expression de la  $\beta$ -caténine semble similaire dans le côlon des souris témoins versus expérimentales (Figure 7A). Au contraire, 2 semaines après la naissance, les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> expriment un niveau plus élevé de  $\beta$ -caténine comparativement aux souris témoins (1,45 fois  $\pm$ 0,13, n=3, Figure 7B). Afin de vérifier si cette hausse d'expression de la  $\beta$ -caténine est associée à une hausse de son activité transcriptionnelle, nous avons mesuré l'expression de deux gènes cibles de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, soit l'*Axin2* (axine2) et la *Ccnd1* (cycline D1) (He *et al.*, 1998; Tetsu et McCormick, 1999). Tel que montré à la



**Figure 6: Dérégulation des effecteurs de signalisation ERK1/2, NFκB et STAT3 chez les souris SHP-2<sup>CEL-KO</sup>.**

Des extraits totaux de côlon de souris nouveau-nées (A, C et E) et des enrichissements de muqueuse de souris de 2 semaines (B, D et F) ont été obtenus de souris témoins et SHP-2<sup>CEL-KO</sup> afin d'analyser par immunobuvardage les effecteurs de signalisation ERK1/2 (ERK1/2 total et phospho-ERK1/2 (T202/Y204)) (A-B), NFκB (RelA total et phospho-RelA (S536)) (C-D) et STAT3 (STAT3 total et phospho-STAT3 (Y705)) (E-F). L'actine a servi de contrôle de charge. (G) Une immunofluorescence dirigée contre phospho-STAT3 (Y705) a été réalisée sur du tissu colique de souris témoins et SHP-2<sup>CEL-KO</sup> âgées de 2 semaines. Flèche: marquage nucléaire. Barre de calibration, 100μm.

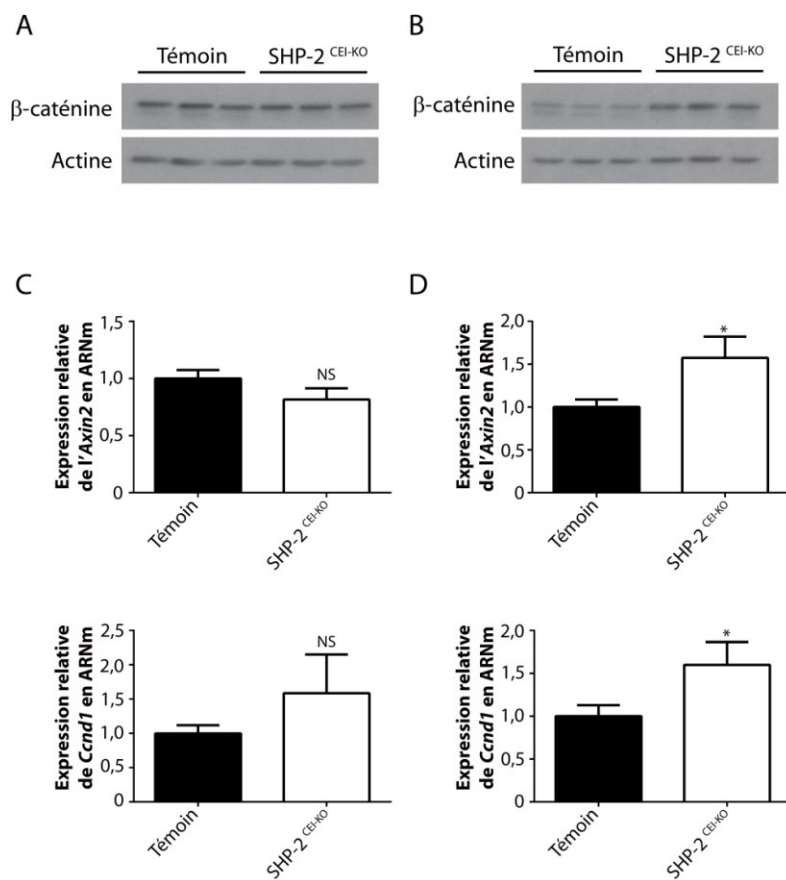
Figure 7C, nous détectons des niveaux équivalents des transcrits de l'*Axin2* et la *Ccnd1*, à la naissance. Cependant, après 2 semaines, leur expression est significativement plus élevée dans le côlon des souris expérimentales en comparaison aux souris témoins (Figure 7D).

### *2.1.2. SHP-2 régule directement l'activation de STAT3 et des kinases ERK1/2 en réponse à l'IL-6*

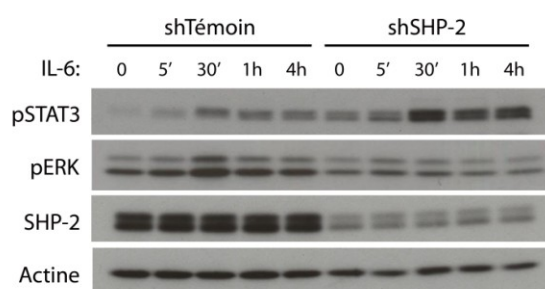
Dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, l'expression de plusieurs cytokines est augmentée, dont l'IL-6 qui active la voie Jak/STAT3 ainsi que la voie ERK1/2. Dans l'optique de vérifier si SHP-2 peut directement contrôler l'activation de ces voies de signalisation dans les cellules épithéliales intestinales, nous avons infecté des IEC-6 avec des lentivirus codant pour un shARN témoin (shTémoin) ou un shARN ciblant SHP-2 (shSHP-2). L'infection virale a permis de diminuer de façon marquée et stable le niveau d'expression protéique de SHP-2 dans les cellules shSHP-2 comparativement aux cellules shTémoin (Figure 8). Par la suite, ces cellules ont été traitées avec l'IL-6 pendant différents temps. Nous remarquons que l'activation de la voie Jak/STAT3, visualisée par la phosphorylation de STAT3 (Y705), est plus soutenue et forte dans les cellules déficientes pour l'expression de SHP-2 comparativement aux cellules témoins. De plus, un niveau basal plus élevé de STAT3 phosphorylée est présent au temps 0 dans les cellules shSHP-2. Pour sa part, l'activation des kinases ERK1/2, visualisée par la phosphorylation de ERK1/2 (T202/Y204), est bloquée dans les cellules shSHP-2 par rapport aux cellules témoins (Figure 8).

### *2.1.3. Les bactéries participent à l'induction de l'inflammation chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>*

La flore intestinale joue un rôle important, mais mal connu, dans l'apparition de l'inflammation intestinale (Kim *et al.*, 2005). Afin de déterminer si les bactéries sont nécessaires au déclenchement de l'inflammation intestinale observée dans notre modèle murin, nous avons traité les souris avec un mélange d'antibiotiques comprenant de l'ampicilline, de la vancomycine, de la streptomycine et du métronidazole de même que du sucre. Les souris témoins et expérimentales ont été séparées en trois groupes. Dans un premier groupe, les souris n'ont pas été traitées avec les antibiotiques, mais seulement avec



**Figure 7: Activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines.** Des extraits totaux de côlon de souris nouveau-nées (A) et des enrichissements de muqueuse de souris de 2 semaines (B) ont été obtenus de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> afin d'analyser par immunobuvardage l'expression de la  $\beta$ -caténine. L'actine a servi de contrôle de charge. Des extraits totaux de côlon de souris nouveau-nées (C) et des enrichissements de muqueuse de souris de 2 semaines (C) ont été obtenus de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> afin d'analyser par PCR quantitatives l'expression de gènes cibles de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (*Axin2* (axine2) et *Ccnd1* (cycline D1)). L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur les gènes de référence *Pum1*, *Sdha* et *Txn14b*. (n $\geq$ 6 par groupe, \* p $\leq$ 0,05, NS: non-significatif). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.



**Figure 8: SHP-2 contrôle l'activation de ERK1/2 et de STAT3 par l'IL-6 dans les cellules épithéliales intestinales.**

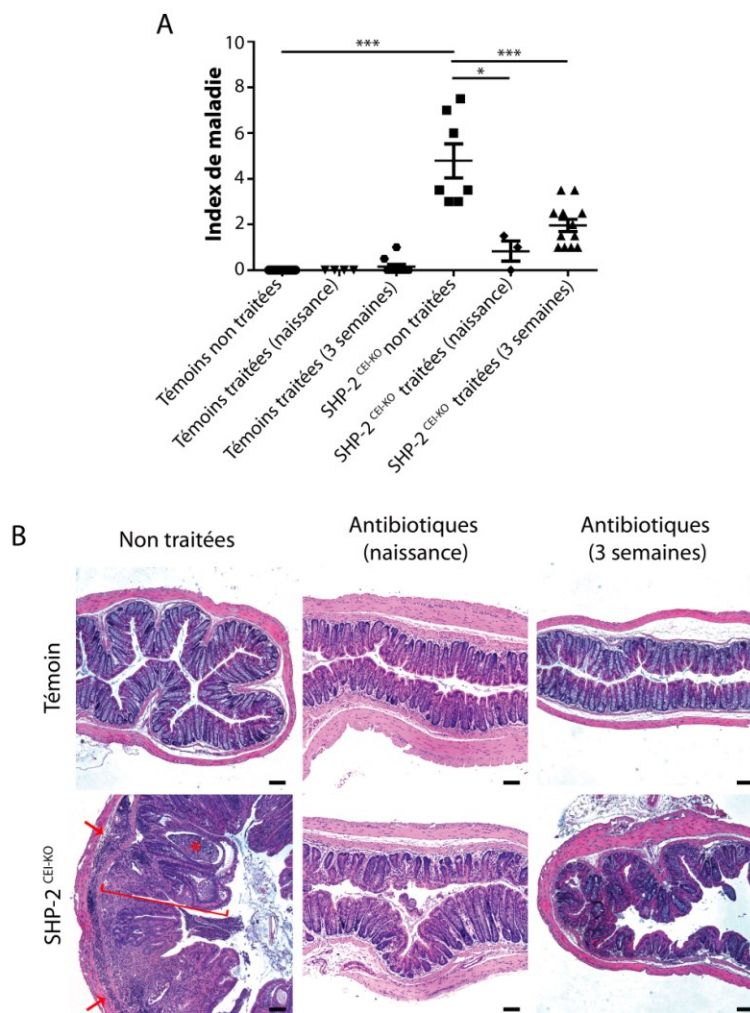
Les cellules IEC-6 ont été infectées avec des lentivirus codant soit pour un shARN dirigé contre SHP-2 (shSHP-2) ou une séquence non ciblante (shTémoin). Après la sélection des cellules, les populations de IEC-6 ont été privées en sérum pendant 24h puis traitées avec 10ng/mL d'IL-6 pendant 5min, 30min, 1h et 4h. Les cellules ont été lysées afin d'analyser l'expression de phospho-ERK1/2 (T202/Y204), de phospho-STAT3 (Y705) et de SHP-2 par immunobuvardage. L'actine a servi de contrôle de charge. Expérience représentative de trois expériences indépendantes.



de l'eau sucrée. Dans un second groupe, les mères ont été traitées aux antibiotiques lors de leur grossesse de sorte que le traitement aux antibiotiques des souriceaux commence dès leur naissance. Finalement, dans un troisième groupe, le début du traitement avec les antibiotiques s'est fait lors du sevrage, soit à la troisième semaine de vie. Lors de l'euthanasie des souris à la neuvième semaine de vie, l'index de maladie a été calculé. Nos résultats démontrent que le traitement aux antibiotiques des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> entraîne une diminution significative de l'index de maladie comparativement aux souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> non traitées (Figure 9A). Par des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine sur des coupes de tissu colique, une diminution des signes d'inflammation (voir flèches: infiltration des cellules immunitaires; voir astérisque: présence d'abcès de crypte; voir accolade: allongement des cryptes coliques) suite au traitement aux antibiotiques est également notée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> (Figure 9B). Ces résultats démontrent l'implication de la microflore dans l'initiation de l'inflammation chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.

#### *2.1.4. La délétion épithéliale concomitante de Myd88 retarde l'apparition de l'inflammation chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>*

Les cellules épithéliales intestinales perçoivent les bactéries de la flore par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires comme les récepteurs TLRs. Myd88 est une protéine adaptatrice utilisée par la majorité des récepteurs TLRs de la membrane cytoplasmique ainsi que par le récepteur de l'IL-1 (Warner et Nunez, 2013). Une fois activés, ces récepteurs activent plusieurs voies de signalisation incluant principalement les voies des MAP Kinases et de NFκB induisant l'expression de plusieurs gènes pro-inflammatoires (Artis, 2008). Afin de vérifier l'implication de cette signalisation dans l'inflammation des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, nous avons effectué des croisements entre les souris *Myd88*<sup>flox/flox</sup> contenant des insertions loxP au pourtour de l'exon 3 du gène codant pour *Myd88*, avec les souris *Shp-2*<sup>flox/flox</sup> et les souris *Villine-Cre*. Ces croisements ont permis d'obtenir des souris n'exprimant plus à la fois *Shp-2* et *Myd88* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales. Pour valider notre modèle murin, nous avons effectué des PCR quantitatives sur des enrichissements de muqueuse de souris témoins, *Myd88*<sup>CEI-KO</sup>, *SHP-2*<sup>CEI-KO</sup> et *SHP-2;Myd88*<sup>CEI-KO</sup>. Nous observons que les souris *Myd88*<sup>CEI-KO</sup> et



**Figure 9: Diminution des signes d'inflammation chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> suite à un traitement aux antibiotiques.**

Les souris témoins et expérimentales ont été séparées en trois groupes. Dans un premier groupe, les souris n'ont pas été traitées avec les antibiotiques. Dans un second groupe, les mères ont été traitées pendant la grossesse faisant en sorte que les souriceaux étaient traités dès leur naissance. Finalement, dans un troisième groupe, le début du traitement avec les antibiotiques s'est fait lors du sevrage, soit à la troisième semaine de vie. Le traitement aux antibiotiques consiste en un mélange d'ampicilline, de vancomycine, de streptomycine et de métronidazole. (A) L'index de maladie des souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> a été évalué en prenant en compte la dureté du côlon, les saignements rectaux, le sang dans les fèces ainsi que leur consistance lors du sacrifice des souris à la neuvième semaine de vie ( $n \geq 3$  par groupe, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (B) Des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine ont été effectuées sur des coupes de côlon distal de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 9 semaines ayant été traitées ou non avec des antibiotiques. Astérisque: abcès de crypte, Accolade: allongement des cryptes, Flèches: infiltration de cellules immunitaires. Barre de calibration, 100 $\mu$ m.

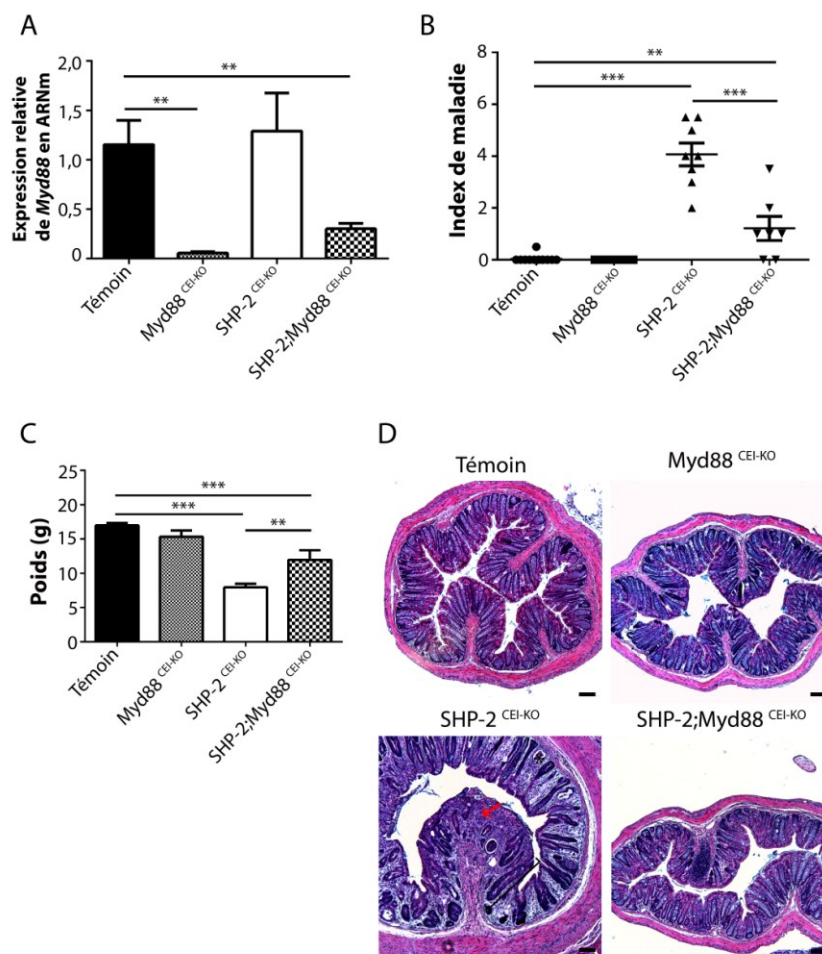
SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> n'expriment presque plus de *Myd88* comparativement aux souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> (Figure 10A).

Nos analyses histologiques et biochimiques n'ont pas révélé de différences entre les souris Myd88<sup>CEI-KO</sup> et les souris témoins âgées de 1 mois (Figure 10B-D). Cependant, la délétion épithéliale de *Myd88* chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> diminue la sévérité de la colite à l'âge de 1 mois tel que visualisé par la baisse significative de l'index de maladie (Figure 10B) et l'augmentation significative du poids corporel (Figure 10C) par rapport aux souris déficientes pour *Shp-2* seulement. De plus, suite à des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine sur des coupes de côlon distal, une diminution des signes d'inflammation (voir flèche: infiltration des cellules immunitaires, présence d'abcès de crypte, nombre de cellules à mucus) est observée chez les souris SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> en comparaison aux souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> (Figure 10D).

Toutefois, en vieillissant, les souris SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> développent elles aussi de l'inflammation intestinale et présentent un index de maladie de 3,33 ce qui est comparable à celui obtenu chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 12 à 15 mois qui est de 2,86 (n≥3). Sur des coupes histologiques de côlon distal de souris SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> âgées de 12 à 15 mois, plusieurs signes d'inflammation comme de l'infiltration de cellules immunitaires (voir flèche), un allongement des cryptes coliques (voir accolade) et une perte de cellules à mucus sont visibles (Figure 11). D'ailleurs, les signes d'inflammation observés chez ces souris semblent aussi sévères que ceux présents chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>. Ces résultats suggèrent donc que la signalisation dépendante de *Myd88* retarde, mais n'empêche pas ultimement l'apparition de l'inflammation observée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.

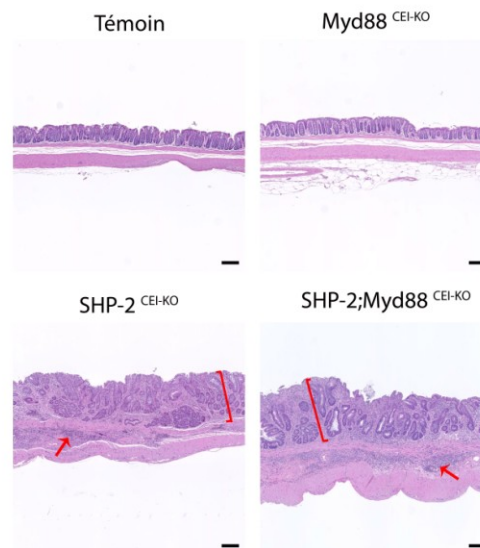
#### *2.1.5. L'altération des effecteurs de signalisation STAT3, NFκB et β-caténine observée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> est dépendante de Myd88*

Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> présentent des altérations dans l'activation des voies NFκB, STAT3, Wnt/β-caténine et ERK1/2 (Figure 6 et Figure 7). Nous avons donc voulu vérifier l'implication de *Myd88* dans les changements de signalisation observés chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>. Pour ce faire, nous avons effectué des immunobuvardages sur des



**Figure 10: Diminution des signes d'inflammation chez les souris SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

(A) L'expression de *Myd88* a été analysée par PCR quantitatives sur des enrichissements de muqueuse de côlon de souris témoins, Myd88<sup>CEI-KO</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup>. L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur les gènes de référence *Pum1*, *Sdha* et *Txn14b* (n≥4 par groupe, \*\* p≤0,01). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (B) L'index de maladie des souris témoins, Myd88<sup>CEI-KO</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 mois a été évalué en prenant en compte la dureté du côlon, les saignements rectaux, le sang dans les fèces ainsi que leur consistance (n≥7 par groupe, \*\* p≤0,01, \*\*\* p≤0,001). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (C) Le poids des souris témoins, Myd88<sup>CEI-KO</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 mois a été mesuré (n≥7 par groupe, \*\* p≤0,01, \*\*\* p≤0,001). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (D) Des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine ont été effectuées sur des coupes de côlon distal de souris témoins, Myd88<sup>CEI-KO</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 mois. Flèche: infiltration de cellules immunitaires. Barre de calibration, 100µm.



**Figure 11: Présence d'inflammation intestinale chez les vieilles souris SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup>.**  
 Des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine ont été effectuées sur des coupes de côlon distal de souris témoins, Myd88<sup>CEI-KO</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> âgées de 12 à 15 mois. Accolade: allongement des cryptes, Flèche: infiltration de cellules immunitaires Barre de calibration, 200µm.

enrichissements de muqueuse de souris témoins, Myd88<sup>CEI-KO</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines et de 1 mois.

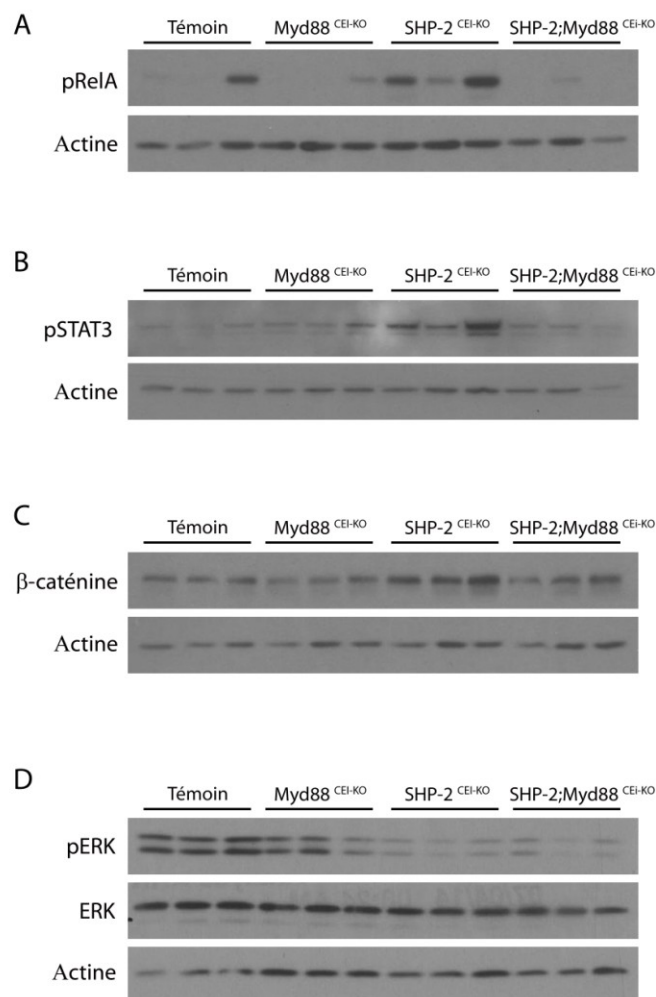
Tel qu'illustré à la Figure 12A-D, il y a peu de différence dans l'activation de ces voies de signalisation entre les souris témoins et Myd88<sup>CEI-KO</sup>. Par contre, la délétion épithéliale de *Myd88* chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> ramène à un niveau contrôle le niveau d'activation de STAT3 et de RelA de même que le niveau d'expression de la  $\beta$ -caténine. Par contre, le niveau de phosphorylation des kinases ERK1/2 demeure faible chez les souris SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup>.

#### *2.1.6. SHP-2 ne régule pas significativement l'activation des voies NF $\kappa$ B et ERK1/2 en réponse à l'IL-1 $\beta$*

Puisque la protéine Myd88 est aussi nécessaire à la signalisation initiée par le récepteur de l'IL-1, nous avons voulu vérifier si SHP-2 pouvait participer à la signalisation de ce récepteur. Toujours en utilisant les cellules IEC-6 sous-exprimant ou non SHP-2, nous avons effectué des traitements avec de l'IL-1 $\beta$  pour différents temps. À la Figure 13, nous n'observons pas de différence majeure dans l'activation de NF $\kappa$ B (phosphorylation de RelA, S536) et des kinases ERK1/2 (phosphorylation de ERK1/2, T202/Y204) entre les cellules shTémoin et les cellules shSHP-2.

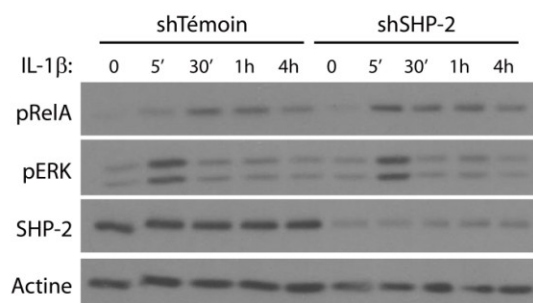
#### *2.1.7. SHP-2 régule l'activation de NF $\kappa$ B et des kinases ERK1/2 en réponse au produit bactérien LPS*

Dans l'optique de vérifier si SHP-2 est impliquée directement dans la signalisation des produits bactériens, nous avons traité les cellules IEC-6 déficientes ou non pour l'expression de SHP-2 avec le LPS et la flagelline activant respectivement TLR4 et TLR5. Tel qu'observé à la Figure 14A, SHP-2 ne régule pas l'activation de ces effecteurs de signalisation en réponse à la flagelline puisqu'aucune différence n'est observée entre les cellules témoins et les cellules sous-exprimant SHP-2. En réponse au LPS, par contre, nous avons observé une activation plus rapide et plus soutenue de la phosphorylation de RelA (S536) dans les cellules shSHP-2 comparativement aux cellules shTémoin. L'activation de la phosphorylation des kinases ERK1/2 par le LPS est bien détectable dans les cellules



**Figure 12: Modulation de l'expression de la  $\beta$ -caténine et de l'activation de NF $\kappa$ B et STAT3 par la délétion épithéliale de *Myd88* dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

Des enrichissements de muqueuse de souris de 1 mois (A et B) et de 2 semaines (C et D) ont été obtenus de souris témoins, Myd88<sup>CEI-KO</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> afin d'analyser par immunobuvardage les effecteurs de signalisation NF $\kappa$ B (phospho-RelA (S536)) (A), STAT3 (phospho-STAT3 (Y705)) (B),  $\beta$ -caténine ( $\beta$ -caténine totale) (C) et ERK1/2 (ERK1/2 total et phospho-ERK1/2 (T202/Y204)) (D). L'actine a servi de contrôle de charge.



**Figure 13: SHP-2 ne contrôle pas significativement l'activation de ERK1/2 et de NFκB par l'IL-1β dans les cellules épithéliales intestinales.**

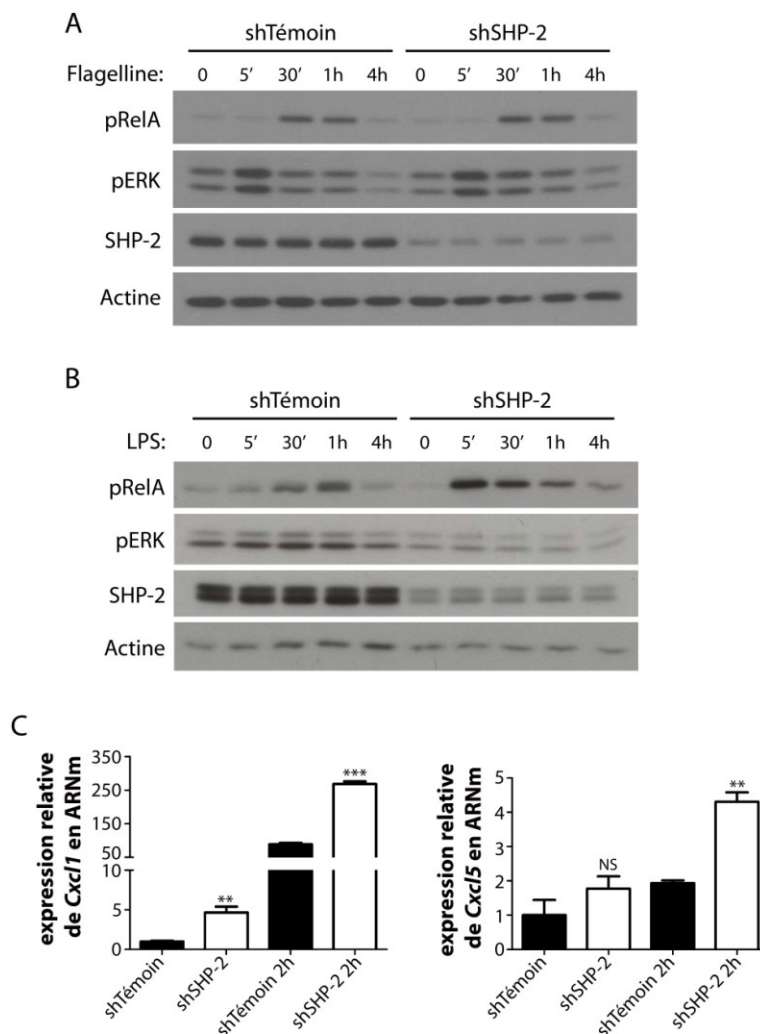
Les cellules IEC-6 ont été infectées avec des lentivirus codant soit pour un shARN dirigé contre SHP-2 (shSHP-2) ou une séquence non ciblante (shTémoin). Après la sélection des cellules, les populations de IEC-6 ont été privées en sérum pendant 24h puis traitées avec 10ng/mL de IL-1β pendant 5min, 30min, 1h et 4h. Les cellules ont été lysées afin d'analyser l'expression de phospho-ERK1/2 (T202/Y204), de phospho-RelA (S536) et de SHP-2 par immunobuvardage. L'actine a servi de contrôle de charge. Expérience représentative de trois expériences indépendantes.



shTémoin mais l'est très peu dans les cellules shSHP-2 (Figure 14B). Finalement, nous avons aussi évalué le niveau des transcrits de deux chimiokines fortement induites chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, soit CXCL1 et CXCL5 (Tableau 1). Le traitement au LPS des cellules shSHP-2 entraîne une plus forte augmentation de l'expression de *Cxcl1* et de *Cxcl5* comparativement aux cellules shTémoin. À noter qu'en absence de LPS, l'expression de *Cxcl1* est déjà significativement plus élevée dans les cellules shSHP-2 comparativement aux cellules témoins (Figure 14C). Ces résultats suggèrent donc l'implication de SHP-2 dans la signalisation induite par TLR4, mais pas par TLR5 et le récepteur de l'IL-1 $\beta$ .

#### *2.1.8. SHP-2 présente plusieurs substrats potentiels en réponse à la signalisation du LPS*

Nous avons donc voulu par la suite déterminer les substrats potentiels de SHP-2 associés à la signalisation de TLR4. Pour ce faire, nous avons procédé à une approche protéomique quantitative basée sur la spectrométrie de masse (méthode SILAC). Brièvement, nous avons cultivé pendant cinq passages des cellules IEC-6 dans trois milieux de culture différents contenant des acides aminés légers (R0, K0), des acides aminés moyens (R6, K4) ou des acides aminés lourds (R10, K8). Par la suite, nous avons infecté les cellules avec des lentivirus codant pour un shARN témoin (shTémoin) ou un shARN ciblant SHP-2 (shSHP-2). Suite à la sélection, nous avons traité les cellules pendant 15min ou 30min avec le LPS avant d'effectuer une immunoprécipitation avec un anticorps ciblant les tyrosines phosphorylées (PY99). Les immunoprécipitations ont ensuite été digérées par de la trypsine et analysées par spectrométrie de masse. Plusieurs cibles intéressantes ont été obtenues comme présentant un niveau de phosphorylation sur tyrosine plus élevé dans les cellules shSHP-2 comparativement aux cellules shTémoin en réponse au LPS; c'est le cas notamment de Grb2, de Itch et de la  $\beta$ -caténine (Tableau 3 et Annexe 1). Toutefois, ces résultats devront être confirmés par des analyses d'immunoprécipitation couplées à des immunobuvardages.



**Figure 14: SHP-2 contrôle l'activation de ERK1/2 et de NFκB par le LPS dans les cellules épithéliales intestinales.**

Les cellules IEC-6 ont été infectées avec des lentivirus codant soit pour un shARN dirigé contre SHP-2 (shSHP-2) ou une séquence non ciblante (shTémoin). Après la sélection des cellules, les populations de IEC-6 ont été privées en sérum pendant 24h puis traitées avec 10ng/mL de flagelline (A) ou 12,5μg/mL de LPS (B) pendant 5min, 30min, 1h et 4h. Les cellules ont été lysées afin d'analyser l'expression de phospho-ERK1/2 (T202/Y204), de phospho-RelA (S536) et de SHP-2 par immunobuvardage. L'actine a servi de contrôle de charge. Expérience représentative de trois expériences indépendantes. (C) Les cellules IEC-6 shTémoin et shSHP-2 ont été traitées pendant 2h avec 12,5μg/mL de LPS puis les cellules ont été lysées afin d'en extraire les ARNs. L'expression relative des chimiokines *Cxcl1* et *Cxcl5* a été déterminée par PCR quantitatives par rapport au gène rapporteur *Tubb5*. Expérience représentative de trois expériences indépendantes (\*\* p≤0,01, \*\*\* p≤0,001, NS: non-significatif). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.

**Tableau 3: Substrats potentiels de SHP-2 suite à une stimulation par le produit bactérien LPS.**

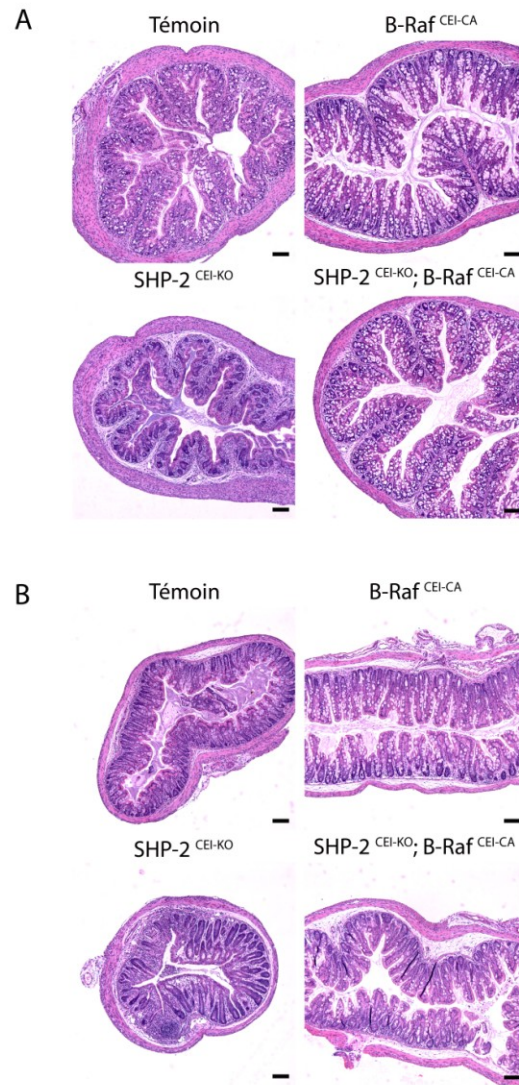
Protéines	Identification	Non traitées	15min LPS	30min LPS
Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)	P62994		3,08	
Itch (E3 ubiquitin-protein ligase)	Q5YB86; G3V8C2		2,36	
Dock8 (Dedicator of cytokinesis 8)	F1LPG2		2,28	
ErbB2ip (ErbB2-interacting protein)	M0R9X2; M0R6K2; M0R9T2; M0R5K2		2,06	
Mtdh (Protein LYRIC, Metadherin)	D3ZGX7; Q9Z1W6		1,74	
Dab2 (Disabled homolog 2)	F1LMP9; O88797		1,67	
Ctnnb1 (Catenin beta-1)	Q9WU82; Q6P0K8; P70565		1,51	
Trim24 (Tripartite motif- containing protein 24)	Q7TP39; F7ESX8		1,48	

Les cellules IEC-6 ont été cultivées pendant cinq passages dans trois milieux de culture différents contenant des acides aminés légers (R0, K0), des acides aminés moyens (R6, K4) ou des acides aminés lourds (R10, K8). Les cellules ont été infectées avec des lentivirus shTémoin ou shSHP-2 puis sélectionnées. Ensuite, elles ont été amenées à confluence, privées en sérum pendant 24h et traitées pendant 15min ou 30min avec du LPS. Les cellules ont été lysées et une immunoprécipitation dirigée contre les tyrosines phosphorylées a été effectuée. Les protéines immunoprécipitées ont été identifiées par spectrométrie de masse. Les valeurs représentent le ratio du nombre de peptides identifiés correspondant à une protéine donnée dans le milieu lourd (shSHP-2) par rapport au milieu moyen (shTémoin). (voir Annexe 1 pour la liste complète des cibles obtenues)

2.1.9. La diminution d'activation des kinases ERK1/2 contribue grandement au phénotype inflammatoire des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>

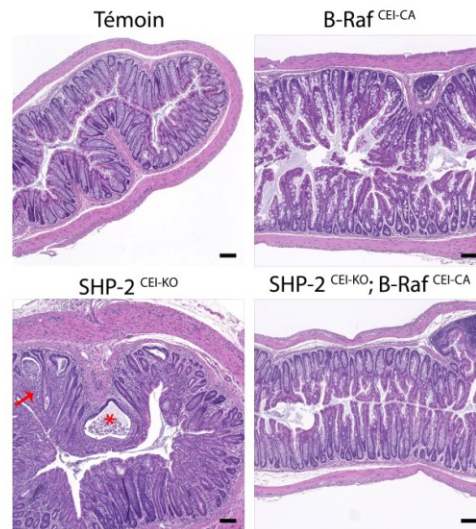
Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> présentent une faible activation des kinases ERK1/2 (Figure 6B). Nous avons donc voulu vérifier si la baisse d'activation de ces kinases pouvait être impliquée dans le déclenchement de l'inflammation observée chez nos souris expérimentales. Dans cette optique, nous avons utilisé une souris transgénique contenant une mutation V600E dans un des allèles de *B-Raf* et contenant également des insertions de séquences loxP au pourtour de cet allèle (Dankort *et al.*, 2007). Suite à plusieurs croisements, nous avons obtenu des souris qui expriment spécifiquement dans l'épithélium intestinal la forme constitutive active de *B-Raf* et conséquemment l'activation soutenue des kinases en aval, MEK1/2 et ERK1/2 (Dankort *et al.*, 2007).

Nous avons tout d'abord effectué des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine sur des coupes de côlon proximal et distal chez les souris âgées de 2 semaines. Tel que déjà observé chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, nous observons un léger allongement des cryptes coliques ainsi qu'une diminution des cellules à mucus comparativement aux souris témoins (Figure 15A-B). Chez les souris B-Raf<sup>CEI-CA</sup>, nous remarquons aussi un allongement des cryptes, mais beaucoup plus marqué ainsi qu'une augmentation importante du nombre de cellules à mucus. Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>;B-Raf<sup>CEI-CA</sup>, elles, présentent une architecture du tissu colique similaire à celle observée chez les souris B-Raf<sup>CEI-CA</sup> (Figure 15A-B). Également, l'analyse des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>;B-Raf<sup>CEI-CA</sup> à l'âge de 1 mois montre une préservation de l'architecture du tissu colique en comparaison aux souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> (voir flèche: infiltration de cellules immunitaires, voir astérisque: abcès de crypte) (Figure 16). En fait, aucun signe d'inflammation n'est observé chez ces souris. Ces résultats suggèrent donc que l'activation de la signalisation dépendante de B-Raf protège l'épithélium intestinal de l'inflammation chez la souris déficiente pour l'expression de *Shp-2*.



**Figure 15: Morphologie du tissu colique des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>;B-Raf<sup>CEI-CA</sup> comparativement aux souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

Des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine ont été effectuées sur des coupes de côlon proximal (A) et distal (B) de souris témoins, B-Raf<sup>CEI-CA</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2<sup>CEI-KO</sup>;B-Raf<sup>CEI-CA</sup> âgées de 2 semaines. Barre de calibration, 100μm.



**Figure 16: Prévention de l'apparition d'inflammation intestinale chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>;B-Raf<sup>CEI-CA</sup> comparativement aux souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

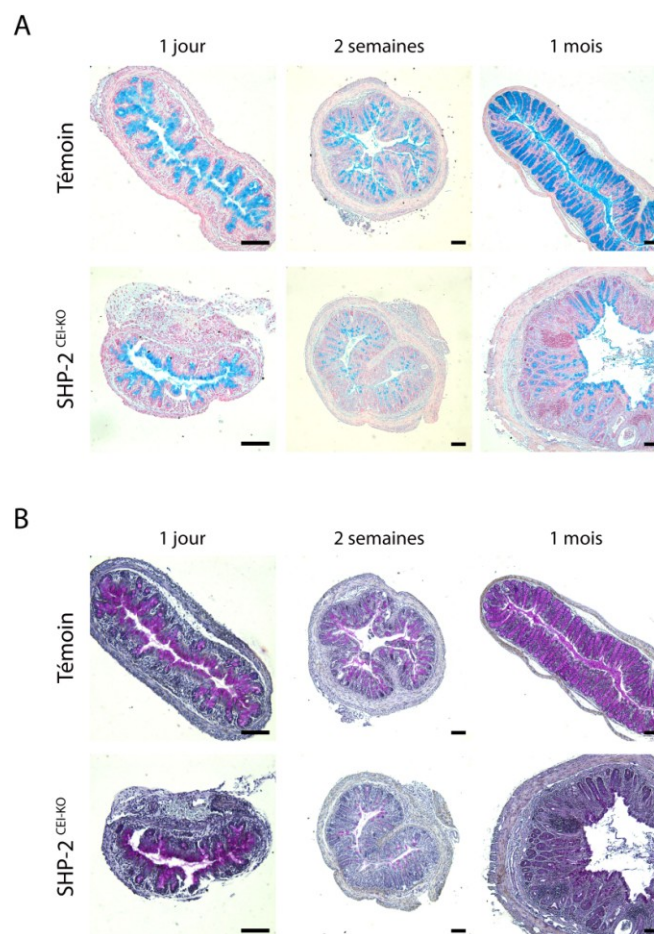
Des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine ont été effectuées sur des coupes de côlon distal de souris témoins, B-Raf<sup>CEI-CA</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2<sup>CEI-KO</sup>;B-Raf<sup>CEI-CA</sup> âgées de 1 mois. Astérisque: abcès de crypte, Flèche: infiltration de cellules immunitaires. Barre de calibration, 100µm.

## 2.2. SHP-2 contrôle la détermination des cellules de l'épithélium intestinal

### 2.2.1. Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> présentent une diminution du nombre de cellules à mucus dans leur côlon

Lors de l'analyse des coupes de côlon par des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine, une diminution du nombre de cellules à mucus a été notée dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> par rapport aux souris témoins (Figure 3D). Afin de confirmer cette observation, nous avons effectué des colorations à l'Alcian bleu, marquant les mucines acides et au PAS (*Periodic Acid Schiff*), marquant les mucines acides et neutres. La Figure 17A montre une diminution du marquage à l'Alcian bleu chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines et de 1 mois en comparaison aux souris témoins; par contre, il semble y avoir peu de différence chez les souris nouveau-nées. Des résultats similaires ont été obtenus avec les colorations au PAS (Figure 17B). Des décomptes du nombre de cellules marquées positivement à l'Alcian bleu par crypte montrent que les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> présentent une diminution de 48,8% du nombre de cellules à mucus par rapport aux souris témoins et ce, dès 2 semaines après la naissance (Figure 18A).

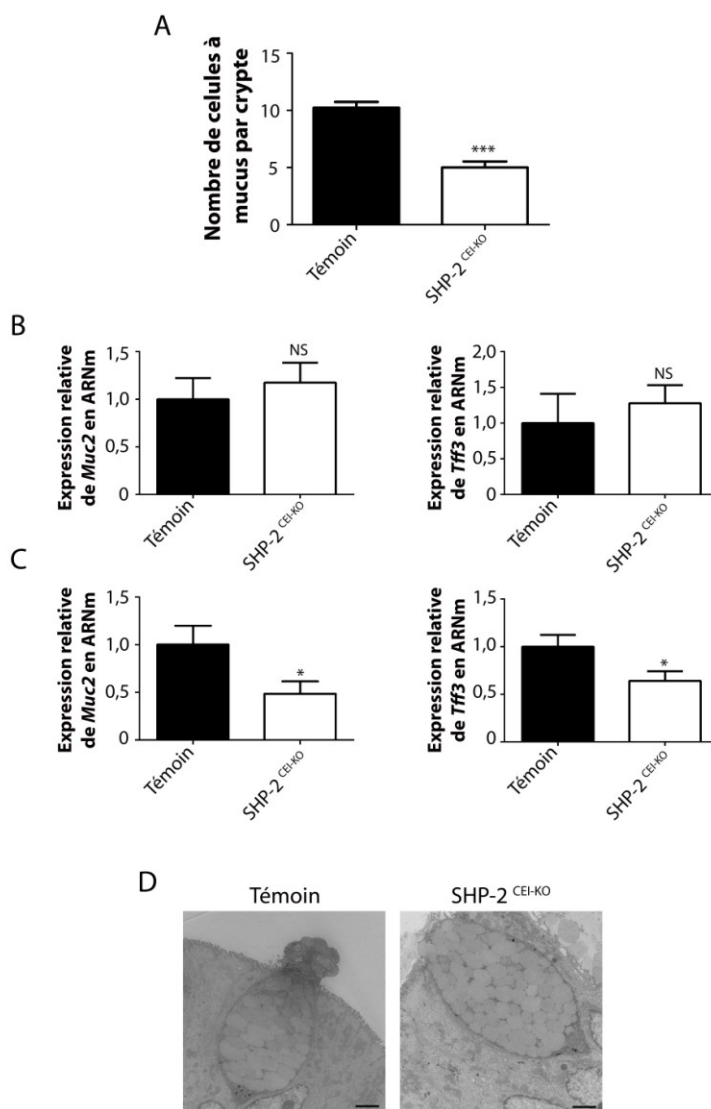
Les cellules à mucus du côlon expriment la mucine2 et le peptide trifolié TFF3. Par des analyses de PCR quantitatives, aucune modulation significative dans l'expression de ces marqueurs n'a été observée dans les extraits de souris nouveau-nées (Figure 18B); par contre, 2 semaines après la naissance, une diminution significative est observée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris témoins (Figure 18C). Afin de vérifier si la diminution de ces marqueurs est attribuable à un défaut dans la maturation des cellules à mucus, nous avons vérifié la morphologie de ces cellules par microscopie électronique. Tant dans les souris témoins que dans les souris expérimentales, les cellules à mucus présentent de grosses vacuoles remplies de mucus suggérant donc que leur différenciation terminale n'est pas affectée par l'absence d'expression de *Shp-2* (Figure 18D).



**Figure 17: Diminution du marquage des mucines dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

Des colorations à l'Alcian bleu (A) ou au PAS (B) ont été effectuées sur des coupes de côlon distal de souris témoins et expérimentales âgées de 1 jour, 2 semaines et 1 mois. Barre de calibration, 100 $\mu$ m. Figures représentatives de  $n \geq 3$  souris par groupe.





**Figure 18: Diminution du nombre de cellules à mucus dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

(A) Le nombre de cellules marquées à l'Alcian bleu a été compté dans 15 cryptes de côlon distal de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines (n=3 par groupe, \*\*\* p<0,001). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. Des extraits totaux de côlon de souris nouveau-nées (B) et des enrichissements de muqueuse de souris de 2 semaines (C) ont été obtenus de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> afin d'analyser par PCR quantitatives l'expression des marqueurs de cellules à mucus *Muc2* et *Tff3*. L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur le gène de référence *Gapdh* (n≥4 par groupe, \* p<0,05, NS: non-significatif). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (D) Les cellules à mucus de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines ont été observées par microscopie électronique. Barre de calibration, 2µm.

### 2.2.2. Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> expriment plusieurs peptides antimicrobiens dans leur côlon

Afin d'essayer de comprendre les événements initiateurs de l'inflammation intestinale chez nos souris expérimentales, une puce à ADN (*Affymetrix*) a été effectuée sur des extraits de côlons de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> nouveau-nées. Étonnamment, l'expression de plusieurs peptides antimicrobiens, notamment des marqueurs de cellules de Paneth qui ne sont généralement exprimés que dans l'intestin grêle, a été observée dans le côlon de nos souris expérimentales. Parmi les gènes induits, il y avait les *Defa* ( $\alpha$ -défensines), *Reg3 $\beta$* , *Reg3 $\gamma$*  et *Leap-2* (Tableau 4 et Annexe 2). L'expression colique de plusieurs de ces gènes a donc été vérifiée par des PCR quantitatives sur des extraits coliques de souris nouveau-nées. Une augmentation importante et significative de l'expression des gènes tels que *Defa*, *Lyz1* (lysozyme 1), *Reg3 $\beta$*  et *Mmp7* (matrix metalloprotéinase 7) a été confirmée dans le côlon des souris expérimentales par rapport aux souris témoins (Figure 19A). À 2 semaines, l'augmentation de l'expression de ces gènes est encore plus marquée et spectaculaire. Une augmentation de l'expression de *Reg3 $\gamma$*  est aussi présente (Figure 19B). Nous avons aussi vérifié l'expression de ces gènes dans l'intestin grêle. Encore une fois, par PCR quantitatives, nos résultats montrent une augmentation significative de l'expression des gènes *Defa*, *Lyz1*, *Reg3 $\beta$* , *Reg3 $\gamma$*  et *Mmp7* dans l'intestin grêle des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> nouveau-nées et âgées de 2 semaines comparativement aux souris témoins (Figure 20A-B).

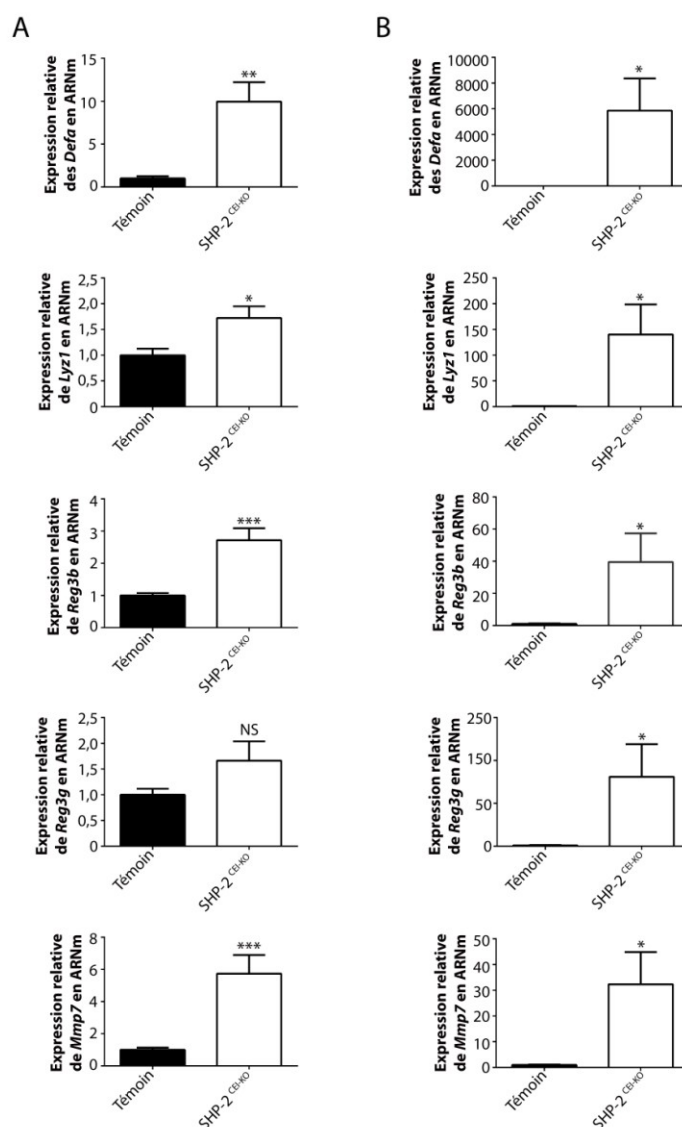
### 2.2.3. Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> présentent des cellules lysozymes positives dans leur côlon proximal

Plusieurs des peptides antimicrobiens détectés dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> sont normalement exprimés par les cellules de Paneth, un type cellulaire retrouvé exclusivement dans l'épithélium de l'intestin grêle (van der Flier LG., 2009). Lorsqu'elles sont visualisées par des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine, les cellules de Paneth présentent une forme pyramidale, contiennent des granules éosinophiles et se situent au fond des cryptes de l'intestin grêle. D'ailleurs, dans l'intestin grêle des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, des cellules de Paneth ont été visualisées dès l'âge de 1 semaine tandis que chez les souris témoins, ce type cellulaire est détecté seulement à 2 semaines (Figure 21A, voir flèche).

**Tableau 4: Gènes dont l'expression est augmentée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

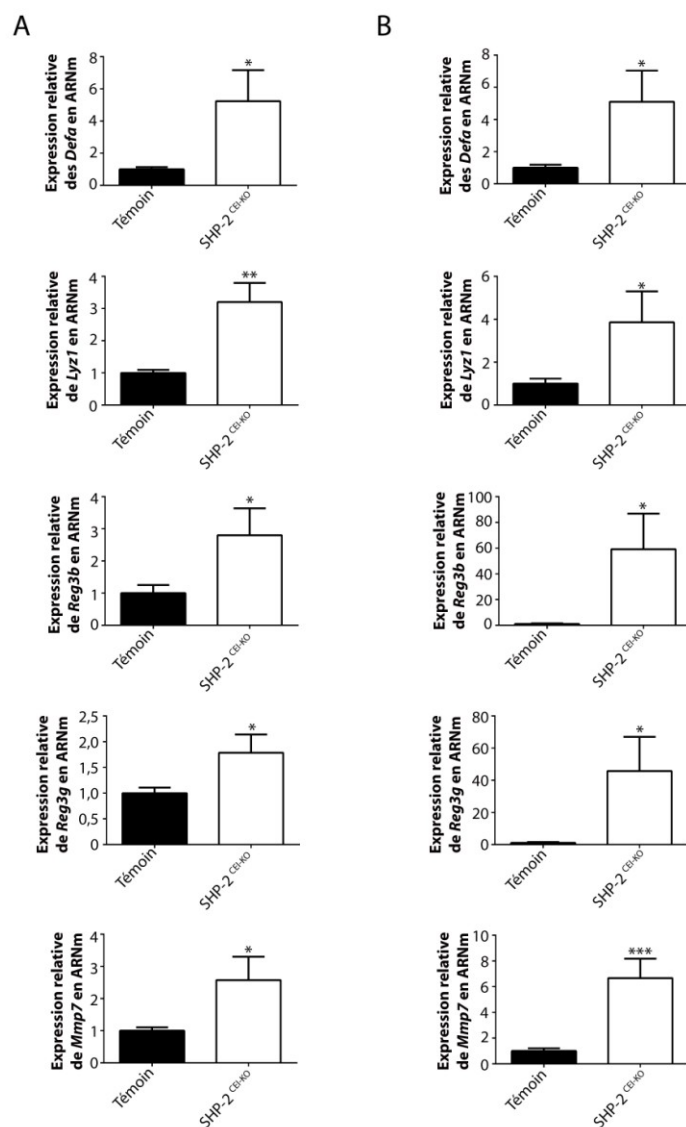
Gènes	Identification	Expression relative	p
matrix metalloproteinase 7 ( <i>Mmp7</i> )	1449478_at	4,23	2,46 <sup>-4</sup>
defensin. alpha. 24 ( <i>Defa24</i> )	1450631_x_at	4,15	2,80 <sup>-6</sup>
indoleamine 2.3-dioxygenase 1 ( <i>Ido1</i> )	1420437_at	2,80	0,014
chemokine (C-X-C motif) ligand 5 ( <i>Cxcl5</i> )	1419728_at	2,39	0,047
liver-expressed antimicrobial peptide 2 ( <i>Leap2</i> )	1427480_at	2,34	2,75 <sup>-4</sup>
regenerating islet-derived 3 beta ( <i>Reg3β</i> )	1416297_s_at	2,12	3,50 <sup>-5</sup>
leukocyte cell-derived chemotaxin 2 ( <i>Lect2</i> )	1449492_a_at	2,04	9,81 <sup>-5</sup>
chemokine (C-C motif) ligand 20 ( <i>Ccl20</i> )	1422029_at	1,93	3,53 <sup>-3</sup>
suppressor of cytokine signaling 3 ( <i>Socs3</i> )	1416576_at	1,73	0,019
chemokine (C-C motif) ligand 25 ( <i>Ccl25</i> )	1418777_at	1,65	3,10 <sup>-4</sup>
regenerating islet-derived 3 gamma ( <i>Reg3γ</i> )	1448872_at	1,63	0,014
regenerating islet-derived family. member 4 ( <i>Reg4</i> )	1418931_at	1,47	1,59 <sup>-3</sup>
defensin. alpha. 15 ( <i>Defa15</i> )	1427873_at	1,41	3,01 <sup>-3</sup>
chemokine (C-X-C motif) ligand 1 ( <i>Cxcl1</i> )	1441855_x_at	1,37	0,011
defensin alpha related sequence 1 ( <i>Defa-rs1</i> )	1418550_x_at	1,31	1,13 <sup>-3</sup>
lysozyme 1 ( <i>Lyz1</i> )	1439426_x_at	1,24	0,066 (NS)

Les ARNs d'extraits totaux de côlon de souris témoins et expérimentales nouveau-nées ont été isolés puis un GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (*Affymetrix*) a été effectué (n=3 par groupe). (voir Annexe 2 pour la liste complète des gènes dont l'expression est significativement modulée dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> par rapport aux souris témoins)



**Figure 19: Augmentation d'expression en ARNm des peptides antimicrobiens dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

Des extraits totaux de côlon de souris nouveau-nées (A) et des enrichissements de muqueuse de souris de 2 semaines (B) ont été obtenus de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> afin d'analyser par PCR quantitatives l'expression de peptides antimicrobiens (*Defa*, *Lyz1*, *Reg3β* et *Reg3γ*) ainsi que de *Mmp7*. L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur les gènes de référence *Pum1*, *Sdha* et *Txn14b* (n≥6 par groupe, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, NS: non-significatif). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.



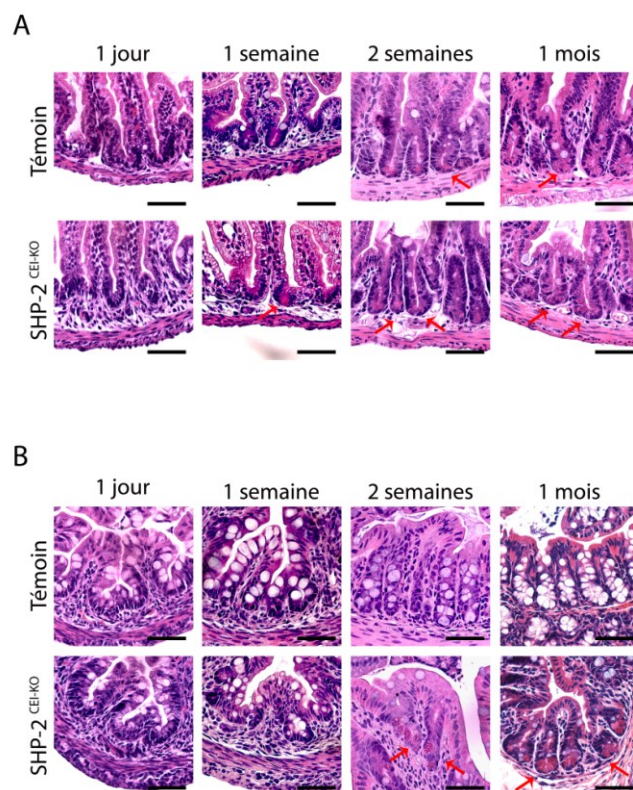
**Figure 20: Augmentation d'expression en ARNm des peptides antimicrobiens dans l'intestin grêle des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

Des extraits totaux d'intestin grêle de souris nouveau-nées (A) et des enrichissements de muqueuse de souris de 2 semaines (B) ont été obtenus de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> afin d'analyser par PCR quantitatives l'expression de peptides antimicrobiens (*Defa*, *Lyz1*, *Reg3β* et *Reg3γ*) ainsi que de *Mmp7*. L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur les gènes de référence *Pum1*, *Sdha* et *Txn14b* ( $n \geq 7$  par groupe, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.

Des cellules de Paneth métaplasiques ont également été visualisées dans le côlon proximal des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et ce, dès l'âge de 2 semaines (Figure 21A, voir flèche). Un nombre plus important de ces cellules a été observé dans le fond des cryptes des souris expérimentales âgées de 1 mois (Figure 21B, voir flèches). Des analyses par immunohistochimie confirment la présence du marquage au lysozyme dans des cellules présentes au fond des cryptes coliques et ce, seulement dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines et de 1 mois (Figure 22, voir flèches).

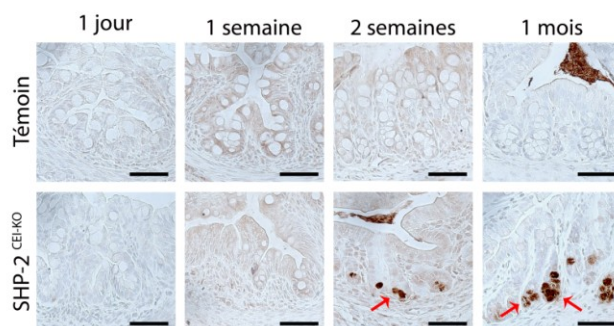
#### *2.2.4. Les cellules de Paneth métaplasiques observées chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> présentent un phénotype de cellules intermédiaires*

Afin de vérifier l'état de différenciation des cellules marquant pour le lysozyme dans le côlon proximal de nos souris expérimentales, nous avons effectué de la microscopie électronique. Nous avons tout d'abord voulu vérifier l'aspect des cellules de Paneth localisées au fond des cryptes de l'intestin grêle. Tel qu'illustré à la Figure 23A (panneau de gauche et du centre), nous avons observé des cellules contenant de gros granules très denses et noirs, typiques des cellules de Paneth et ce, tant dans nos souris témoins que dans nos souris expérimentales. Au niveau du côlon proximal de nos souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, l'analyse par microscopie électronique révèle la présence de certaines cellules présentant aussi des granules dont le centre est très dense et noir, mais dont le pourtour est moins dense et plus clair (Figure 23A, panneau de droite, voir flèches), rappelant les granules des cellules à gobelet (Figure 18D). Cette observation nous a amenés à effectuer un comarquage à l'Alcian bleu et au lysozyme chez nos souris témoins et expérimentales. Tel que montré à la Figure 23B, peu ou pas de comarquage est observé dans l'intestin grêle tant des souris témoins qu'expérimentales. Par contre, dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, toutes les cellules marquant pour le lysozyme marquent aussi à l'Alcian bleu (Figure 23C, voir flèches). Ce type de cellules exprimant tant des caractéristiques de cellules de Paneth et que de cellules à gobelet avait déjà été décrit dans la littérature (Calvert *et al.*, 1988). Le phénotype semble typique des cellules intermédiaires, des cellules qui sont rarement retrouvées dans l'intestin grêle et qui semblent représenter un précurseur commun des cellules à gobelet et de Paneth. Ces résultats suggèrent donc que SHP-2 pourrait contrôler la détermination cellulaire dans le côlon.



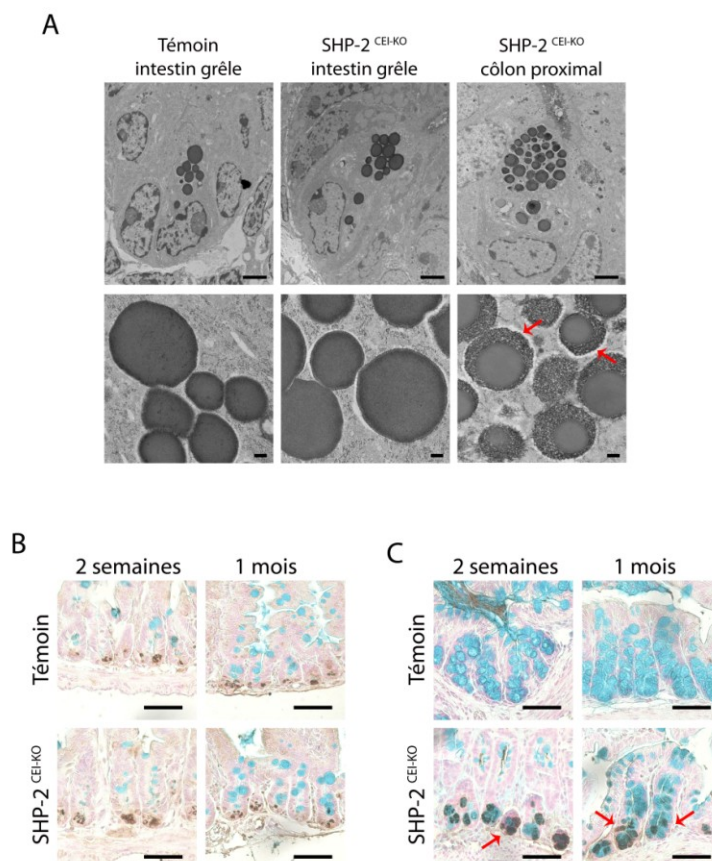
**Figure 21: Présence de cellules contenant des granules éosinophiles dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

Des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine ont été effectuées sur des coupes d'intestin grêle (A) et de côlon proximal (B) de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 jour, 1 semaine, 2 semaines et 1 mois. Flèches: cellules avec des granules éosinophiles. Barre de calibration, 50 $\mu$ m.



**Figure 22: Présence de cellules marquées au lysozyme dans le côlon proximal des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.** Des immunohistochimies dirigées contre le lysozyme ont été effectuées sur des coupes de côlon proximal de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 jour, 1 semaine, 2 semaines et 1 mois. Flèches: cellules positives pour le lysozyme. Barre de calibration, 50µm.





**Figure 23: Présence de cellules intermédiaires Paneth/gobelet dans le côlon proximal des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

(A) Les cellules de Paneth de l'intestin grêle des souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> ainsi que les cellules présentes au fond des cryptes coliques des SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines ont été observées par microscopie électronique. Barre de calibration, 2 $\mu$ m (panneaux du haut) ou 200 $\eta$ m (panneaux du bas). Des immunohistochimies dirigées contre le lysozyme suivies d'une coloration à l'Alcian bleu ont été effectuées sur des coupes d'intestin grêle (B) et de côlon proximal (C) de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines et 1 mois. Flèches: cellules comarquées à l'Alcian bleu et au lysozyme. Barre de calibration, 50 $\mu$ m.

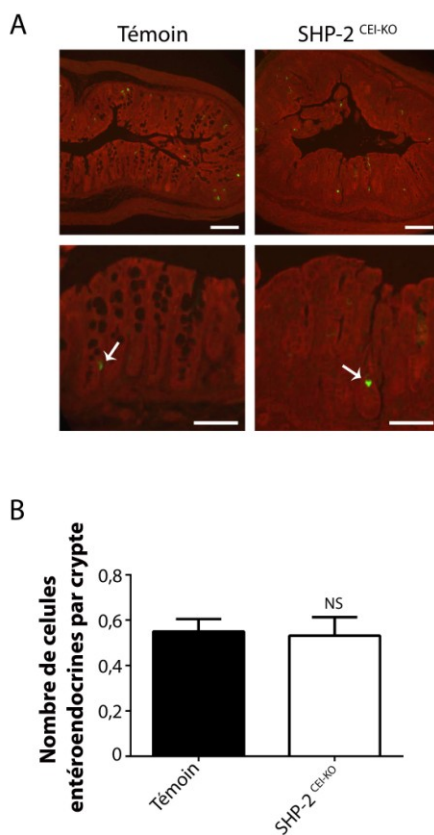
Afin de situer à quel niveau SHP-2 régule la détermination cellulaire, nous avons vérifié par immunofluorescence l'expression de la chromogranine A, un marqueur de cellules entéroendocrines, un autre type cellulaire de la lignée sécrétoire présent dans l'épithélium intestinal. Aucune différence dans le nombre de cellules marquées à la chromogranine A n'a été notée entre les souris témoins et expérimentales (Figure 24A-B).

Au niveau de l'intestin grêle, plusieurs facteurs de transcription ont été décrits comme régulant la détermination et la différenciation des cellules de l'épithélium (Noah et Shroyer, 2013). Par PCR quantitatives, nous avons évalué l'expression colique des transcrits de plusieurs de ces facteurs incluant *Hes1*, *Math1*, *Sox9*, *Spdef*, *Klf4* et *Gfi1*. Peu de modulation d'expression de ces gènes a été observée (Figure 25).

L'ensemble de ces résultats suggère que l'expression de SHP-2 dans l'épithélium de côlon est très importante pour la production des cellules à gobelet et la répression des cellules de Paneth.

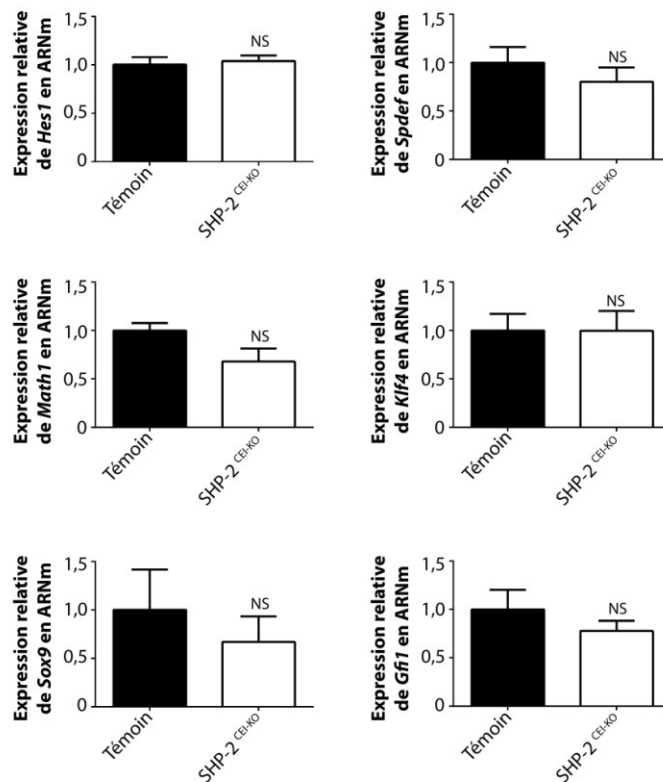
#### *2.2.5. La réponse des cellules épithéliales intestinales aux bactéries contrôle la détermination cellulaire dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>*

Nos résultats présentés précédemment aux Figures 9 et 10 ont démontré que la présence de bactéries et l'expression de *Myd88* dans les cellules épithéliales intestinales sont importantes pour le déclenchement de l'inflammation chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>. Nous avons donc voulu voir si la signalisation initiée par les bactéries et dépendante de *Myd88* pouvait aussi contribuer à la perte des cellules à gobelet et l'apparition des cellules intermédiaires dans le côlon de nos souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>. Sur des coupes de côlon proximal de souris témoins, *Myd88*<sup>CEI-KO</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2;*Myd88*<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines, nous avons effectué une immunohistochimie dirigée contre le lysozyme suivi d'une coloration à l'Alcian bleu. Tel qu'attendu, les souris témoins et *Myd88*<sup>CEI-KO</sup> présentent un fort marquage à l'Alcian bleu ainsi qu'aucun marquage pour le lysozyme dans le côlon. Par contre, dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, une diminution du marquage à l'Alcian bleu est présente de même qu'un fort marquage pour le lysozyme au fond des cryptes. Il est intéressant de noter que la perte épithéliale de *Myd88* chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> préserve



**Figure 24: Le nombre de cellules entéroendocrines n'est pas changé dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

(A) Des immunofluorescences dirigées contre la chromogranine A ont été effectuées sur des coupes de côlon distal de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines. Barre de calibration, 100µm et 50µm (panneaux du bas). Flèches: cellules chromogranine A positives. (B) Le nombre de cellules marquées à la chromogranine A a été compté dans 15 cryptes de côlon distal de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines (n≥2 par groupe, NS: non-significatif). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.



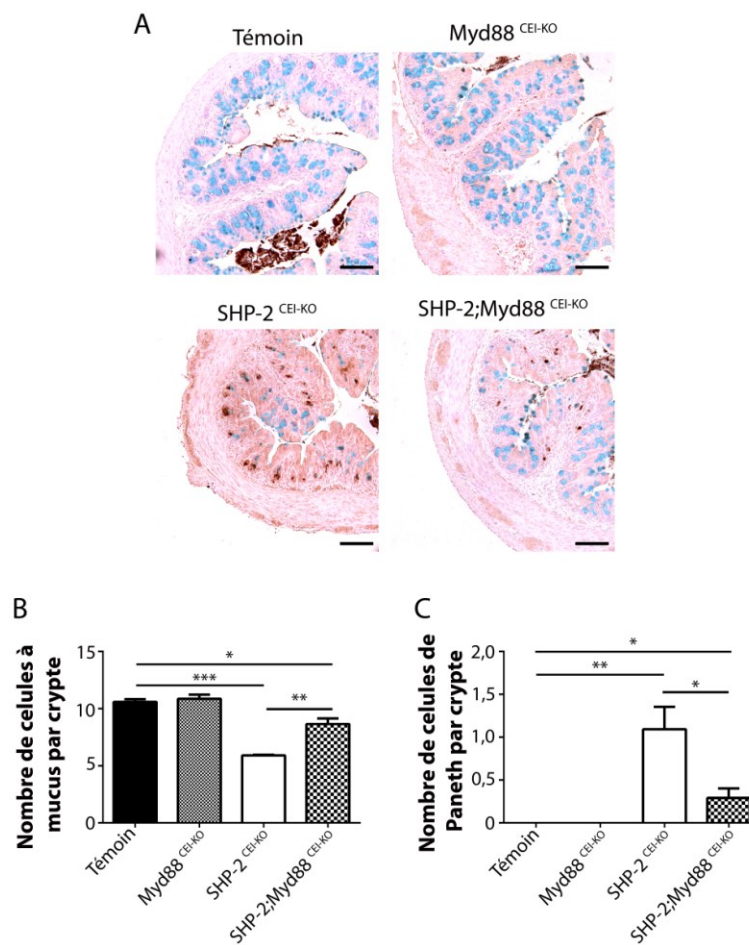
**Figure 25:** L'expression des facteurs de transcription *Hes1*, *Math1*, *Sox9*, *Spdef*, *Klf4* et *Gfi1* n'est pas modulée dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.

Des enrichissements de muqueuse de souris de 2 semaines ont été obtenus de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines afin d'analyser par PCR quantitatives l'expression de *Hes1*, *Math1*, *Sox9*, *Spdef*, *Klf4* et *Gfi1*. L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur les gènes de référence *Pum1*, *Sdha* et *Txn14b* (n=5 par groupe, NS: non-significatif).

en partie le nombre de cellules à gobelet au détriment du nombre de cellules marquées au lysozyme (Figure 26A-C). Des analyses par PCR quantitatives de l'expression des peptides antimicrobiens (*Defa*, *Lyz1*, *Reg3β* et *Reg3γ*) ainsi que de *Mmp7* montrent de forts niveaux d'expression des transcrits chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et une diminution significative dans les souris SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> (Figure 27).

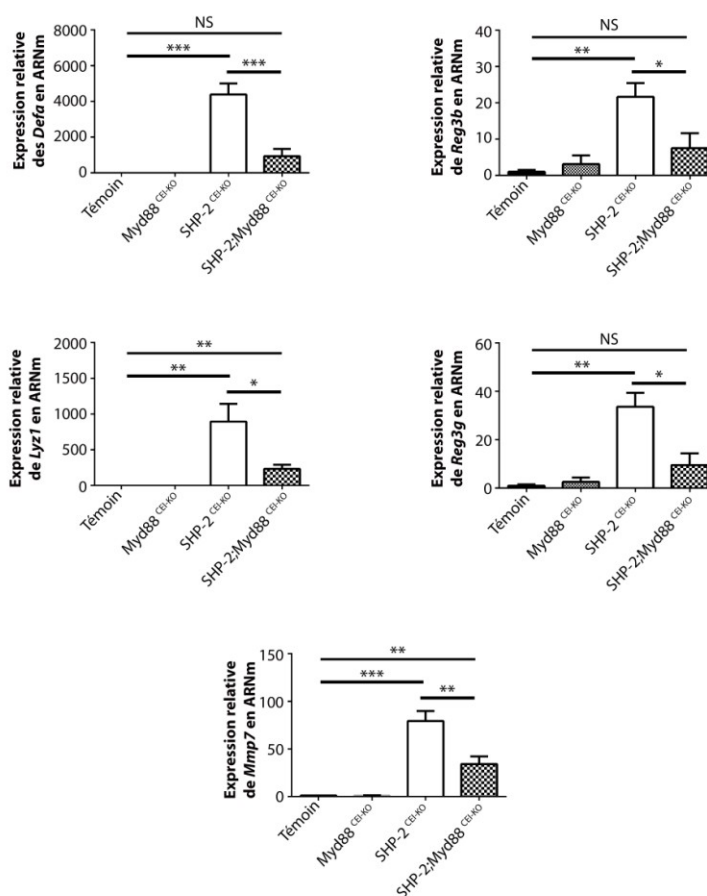
*2.2.6. La voie MAP Kinase ERK1/2 contribue aussi à la détermination cellulaire dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>*

Nous avons aussi précédemment montré que l'expression d'une forme active de *B-Raf* atténuait fortement l'inflammation chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> (Figure 16). Nous avons donc analysé par une coloration à l'Alcian bleu, les cellules à gobelet, et par immunohistochimie dirigée contre le lysozyme, les cellules intermédiaires, dans le côlon des souris témoins, B-Raf<sup>CEI-CA</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2<sup>CEI-KO</sup>;B-Raf<sup>CEI-CA</sup> âgées de 2 semaines. L'expression de la forme oncogénique de *B-Raf* augmente fortement le marquage à l'Alcian bleu dans le côlon alors qu'aucun marquage au lysozyme n'est présent (Figure 28A-B). Tel que déjà observé, les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> présentent une diminution significative du marquage à l'Alcian bleu de même qu'un fort marquage pour le lysozyme dans leur côlon. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>;B-Raf<sup>CEI-CA</sup> présentent un fort marquage pour l'Alcian bleu et aucun marquage pour le lysozyme, un phénotype tout à fait similaire à celui observé chez les souris B-Raf<sup>CEI-CA</sup>. Nos résultats préliminaires obtenus par PCR quantitatives sur des extraits de tissus coliques de souris nouveau-nées confirment ces résultats. En effet, les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> expriment de forts niveaux de *Defa* et *Mmp7* comparativement aux souris témoins. De plus, les niveaux d'expression de ces deux gènes sont fortement diminués dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>;B-Raf<sup>CEI-CA</sup> comparativement aux souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> (Figure 28C).



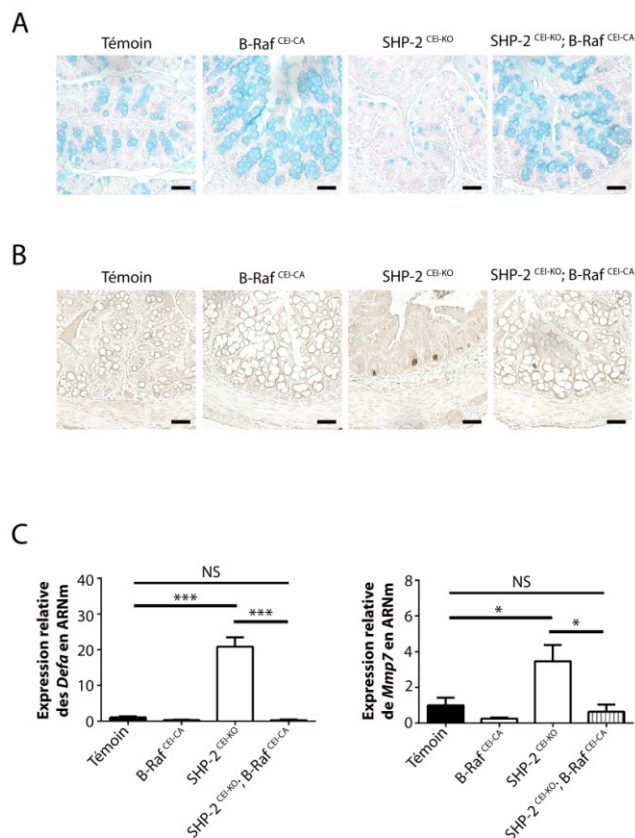
**Figure 26: Préservation partielle du nombre de cellules à mucus et de cellules positives pour le lysozyme dans le côlon des souris SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

(A) Des immunohistochimies dirigées contre le lysozyme suivies d'une coloration à l'Alcian bleu ont été effectuées sur des coupes de côlon proximal de souris témoins, Myd88<sup>CEI-KO</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines. Barre de calibration, 100µm. (B) Le nombre de cellules marquées à l'Alcian bleu a été compté dans 15 cryptes de côlon proximal de souris témoins, Myd88<sup>CEI-KO</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines (n≥3 par groupe, \* p≤0,05, \*\* p≤0,01, \*\*\* p≤0,001). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (C) Le nombre de cellules marquées au lysozyme a été compté dans 15 cryptes de côlon proximal de souris témoins, Myd88<sup>CEI-KO</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines (n≥3 par groupe, \* p≤0,05, \*\* p≤0,01). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.



**Figure 27: La délétion épithéliale de *Myd88* atténue l'expression des peptides antimicrobiens dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

L'expression des peptides antimicrobiens *Defa*, *Lyz1*, *Reg3β* et *Reg3γ* ainsi que de *Mmp7* a été analysée par PCR quantitatives sur des enrichissements de muqueuse de côlon de souris témoins, *Myd88*<sup>CEI-KO</sup>, *SHP-2*<sup>CEI-KO</sup> et *SHP-2;Myd88*<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines. L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur les gènes de référence *Pum1*, *Sdha* et *Txn14b* (n≥6 par groupe, \* p≤0,05, \*\* p≤0,01, \*\*\* p≤0,001, NS: non-significatif). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.



**Figure 28: L'expression épithéliale de *B-Raf* constitutif actif augmente le nombre de cellules à mucus et prévient l'apparition des cellules positives pour le lysozyme dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

(A) Des colorations Alcian bleu ont été effectuées sur des coupes de côlon proximal de souris témoins, B-Raf<sup>CEI-CA</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2<sup>CEI-KO</sup>; B-Raf<sup>CEI-CA</sup> âgées de 2 semaines. Barre de calibration, 50 μm. (B) Des immunohistochimies dirigées contre le lysozyme ont été effectuées sur des coupes de côlon proximal de souris témoins, B-Raf<sup>CEI-CA</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2<sup>CEI-KO</sup>; B-Raf<sup>CEI-CA</sup> âgées de 2 semaines. Barre de calibration, 50 μm. (C) L'expression de *Defa* et de *Mmp7* a été analysée par PCR quantitatives sur des extraits totaux de côlon de souris témoins, B-Raf<sup>CEI-CA</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2<sup>CEI-KO</sup>; B-Raf<sup>CEI-CA</sup> nouveau-nées. L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur les gènes de référence *Pum1*, *Sdha* et *Txn14b* (n ≥ 4 par groupe, \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001, NS: non-significatif). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.



### 2.2.7. Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> présentent un changement dans la composition de leur microflore comparativement aux souris témoins

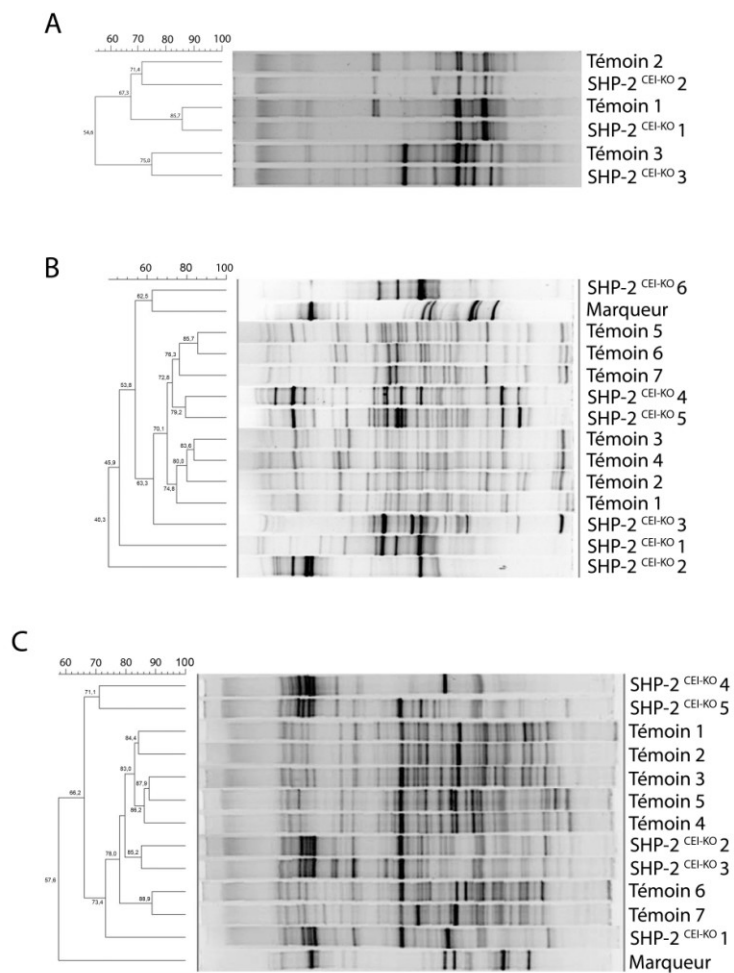
Un grand nombre de bactéries est retrouvé dans la lumière du côlon dont la composition peut être modulée par des peptides antimicrobiens (Salzman *et al.*, 2010). De plus, un changement dans la composition de la microflore est observé chez les patients souffrant d'inflammation intestinale (Manichanh *et al.*, 2012). C'est pourquoi nous avons évalué la composition de la flore intestinale de nos souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup>. L'ADN ribosomique de la sous-unité 16S des bactéries a été amplifié par PCR et soumis à une migration sur un gel en gradient dénaturant. Tel qu'illustré à la Figure 29A, à la naissance, la composition de la microflore est similaire entre les souris témoins et expérimentales. Par contre, à l'âge de 2 semaines et de façon plus marquée à 1 mois, un changement dans la composition de la microflore est observé chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> par rapport aux souris témoins (Figure 29B-C).

Dans le but de caractériser plus en détail les groupes de bactéries différenciellement modulés, des PCR quantitatives ont été effectuées à partir d'ADN de bactéries isolés de souris témoins et expérimentales. Nos résultats du Tableau 5 montrent qu'à 2 semaines, une augmentation significative des *Enterobacteriaceae* est observée tandis qu'à 1 mois, une réduction significative des *Firmicutes* (*Clostridium leptum* et *Clostridium coccoides*) est notée chez les souris expérimentales et ce, comparativement aux souris témoins.

## 2.3. SHP-2 contrôle la perméabilité paracellulaire

### 2.3.1. Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> présentent une hyperperméabilité paracellulaire

Les cellules épithéliales intestinales sont maintenues entre elles via les jonctions serrées. Une trop grande perméabilité paracellulaire peut être néfaste et participer à l'initiation de l'inflammation intestinale (Mankertz et Schulzke, 2007). À l'aide de la technique du dextran-FITC, nous avons mesuré la perméabilité paracellulaire chez nos souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup>. Brièvement, les souris ont été gavées avec du dextran-FITC puis 4h après, une ponction cardiaque a été effectuée afin de prélever le sérum. Finalement, la quantité de FITC sérique a été dosée. Nos résultats montrent qu'à 2 semaines et 1 mois, la perméabilité paracellulaire est significativement plus élevée chez les souris



**Figure 29: Changement dans la composition de la microflore intestinale chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

L'ADN bactérien a été isolé de côlons de souris témoins et expérimentales nouveau-nées (A) ou de caecums de souris témoins et expérimentales âgées de 2 semaines (B) ou de 1 mois (C). La région V2-V3 de la sous-unité 16S de l'ADN ribosomique des bactéries a été amplifiée par PCR avec des amorces HDA1-GC et HDA2 puis migré sur un gel en gradient dénaturant. Le programme GelCompar II a été utilisé pour l'analyse du gel. La parenté des communautés bactériennes a été exprimée en groupe, en utilisant le coefficient Dice et la UPGMA ( $n \geq 3$  par groupe).

**Tableau 5: Altération de la composition de la microflore chez les souris SHP-2<sup>CEL-KO</sup> comparativement aux souris témoins.**

Groupe de bactéries		2 semaines		1 mois	
		Moyenne	p	Moyenne	p
Bactéries totales	Témoin	15,32	0,132	13,09	0,257
	SHP-2 <sup>CEL-KO</sup>	16,57		15,04	
Genre des <i>Lactobacillus</i>	Témoin	21,22	0,063	21,13	0,063
	SHP-2 <sup>CEL-KO</sup>	23,70		25,82	
Espèce des <i>Bacteroides fragilis</i>	Témoin	20,70	0,762	18,50	0,999
	SHP-2 <sup>CEL-KO</sup>	23,01		18,75	
Espèce des <i>Clostridium leptum</i>	Témoin	17,41	0,065	16,18	0,006
	SHP-2 <sup>CEL-KO</sup>	20,73		19,72	
Espèce des <i>Clostridium coccoïdes</i>	Témoin	16,80	0,24	13,09	0,006
	SHP-2 <sup>CEL-KO</sup>	21,57		18,67	
Famille des <i>Enterobacteriaceae</i>	Témoin	22,85	0,029	29,02	0,012
	SHP-2 <sup>CEL-KO</sup>	18,21		20,84	

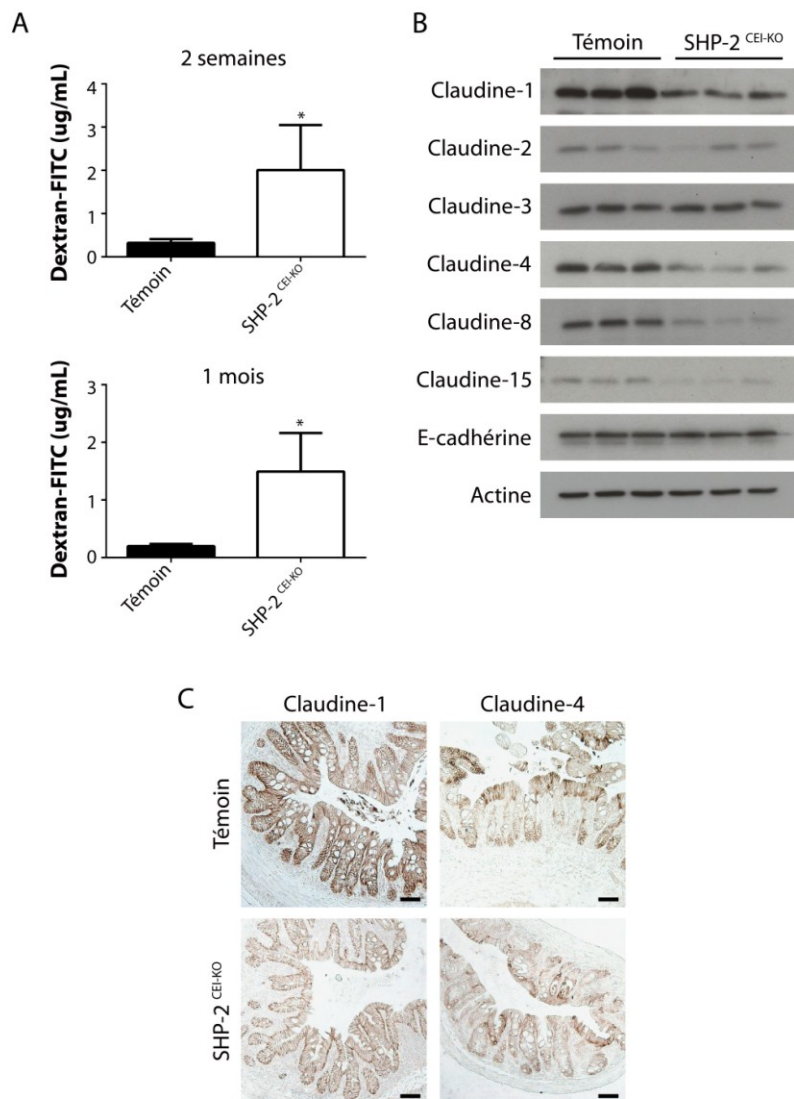
Les côlons de souris nouveau-nées ou les caecums de souris âgées de 2 semaines et 1 mois ont été prélevés de souris témoins et expérimentales. Les tissus ont été homogénéisés puis l'ADN bactérien a été extrait. Des PCRs quantitatives ont été effectuées avec des amorces spécifiques à certains genres, espèces ou familles de bactéries. La moyenne des cycles de seuil a été obtenue. Les valeurs de cycle de seuil indiquent le nombre de cycles nécessaires à la fluorescence pour franchir la ligne de base et sont inversement proportionnelles à la quantité d'acide nucléique présent dans l'échantillon ( $n \geq 5$  par groupe).

expérimentales par rapport aux souris témoins (Figure 30A). Par immunobuvardage sur des enrichissements de muqueuse de côlon, une diminution d'expression de plusieurs protéines des jonctions serrées est observée, dont les claudines-1, -4, -8 et -15, dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris témoins (Figure 30B). Les analyses par immunohistochimie montrent une diminution d'expression de claudine-1 et de claudine-4 chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris témoins et montrent également qu'il n'y a pas d'altération dans la localisation de ces protéines de jonction chez les souris expérimentales (Figure 30C).

### *2.3.2. SHP-2 contrôle la perméabilité paracellulaire des cellules épithéliales intestinales en culture indépendamment de la voie ERK1/2*

Dans l'optique de vérifier si SHP-2 peut directement contrôler la perméabilité paracellulaire, nous avons infecté des cellules Caco-2/15 avec un shARN témoin (shTémoin) et un shARN ciblant l'expression de SHP-2 (shSHP-2). Ce type cellulaire a été choisi puisque ces cellules se polarisent et se différencient suite à l'atteinte de la confluence et forment des jonctions serrées (Beaulieu et Quaroni, 1991; Vachon et Beaulieu, 1992) résultant en une augmentation de la résistance transépithéliale. Tel que visualisé par immunobuvardage, l'utilisation du shARN entraîne une forte diminution d'expression de SHP-2 dans les Caco-2/15 (Figure 31A). Nous avons alors mesuré la résistance transépithéliale de nos populations cellulaires confluentes. Tel qu'observé à la Figure 31B, la baisse d'expression de SHP-2 diminue significativement la résistance transépithéliale développée dans les Caco-2/15 confluentes.

Puisque l'inhibition des kinases ERK1/2 est associée à l'inflammation observée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> (Figure 16), nous avons voulu vérifier si l'inhibition pharmacologique de ces kinases affectait la résistance transépithéliale dans les Caco-2/15. Nous avons donc traité des Caco-2/15 avec le U0126, un inhibiteur pharmacologique de MEK1/2 et mesuré la résistance transépithéliale. Par immunobuvardage, nous confirmons que la dose de 5µM et de façon plus marquante la dose de 20µM de U0126 entraînent une diminution de la phosphorylation de ERK1/2 (T202/Y204) (Figure 31C). Cependant, l'inhibition de la voie ERK1/2 entraîne non pas une baisse, mais une augmentation



**Figure 30: La perméabilité paracellulaire intestinale est augmentée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

(A) La perméabilité paracellulaire a été mesurée chez des souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines et de 1 mois. Les souris ont été gavées avec du dextran-FITC et après un temps d'attente de 4h, la quantité de FITC retrouvé dans le sérum a été quantifiée ( $n \geq 10$  par groupe, \*  $p \leq 0,05$ ). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (B) L'expression de plusieurs protéines de jonction a été analysée par immunobuvardage dans des enrichissements de muqueuse colique de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines. L'actine a servi de contrôle de charge. (C) La localisation de la claudine-1 et de la claudine-4 a été analysée par immunohistochimie sur des coupes de côlon de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines. Barre de calibration, 50 $\mu$ m.

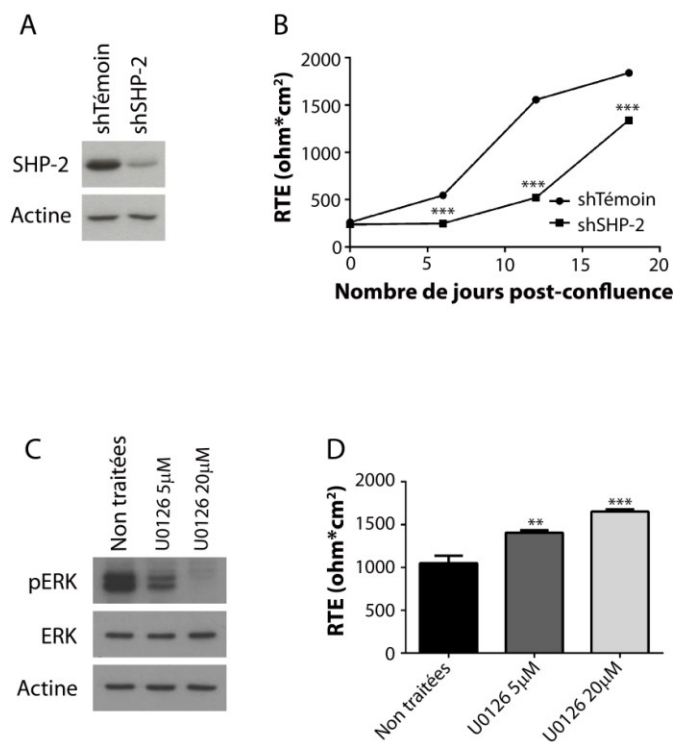
dépendante de la dose de la résistance transépithéliale (Figure 31D). Cela suggère que la baisse d'activité des kinases ERK1/2 n'est pas responsable de l'augmentation de la perméabilité paracellulaire observée dans les cellules en culture sous-exprimant SHP-2.

#### **2.4. SHP-2 contrôle la restitution épithéliale intestinale**

##### *2.4.1. L'expression de SHP-2 est importante pour la restitution des cellules IEC-6 et Caco-2/15 blessées*

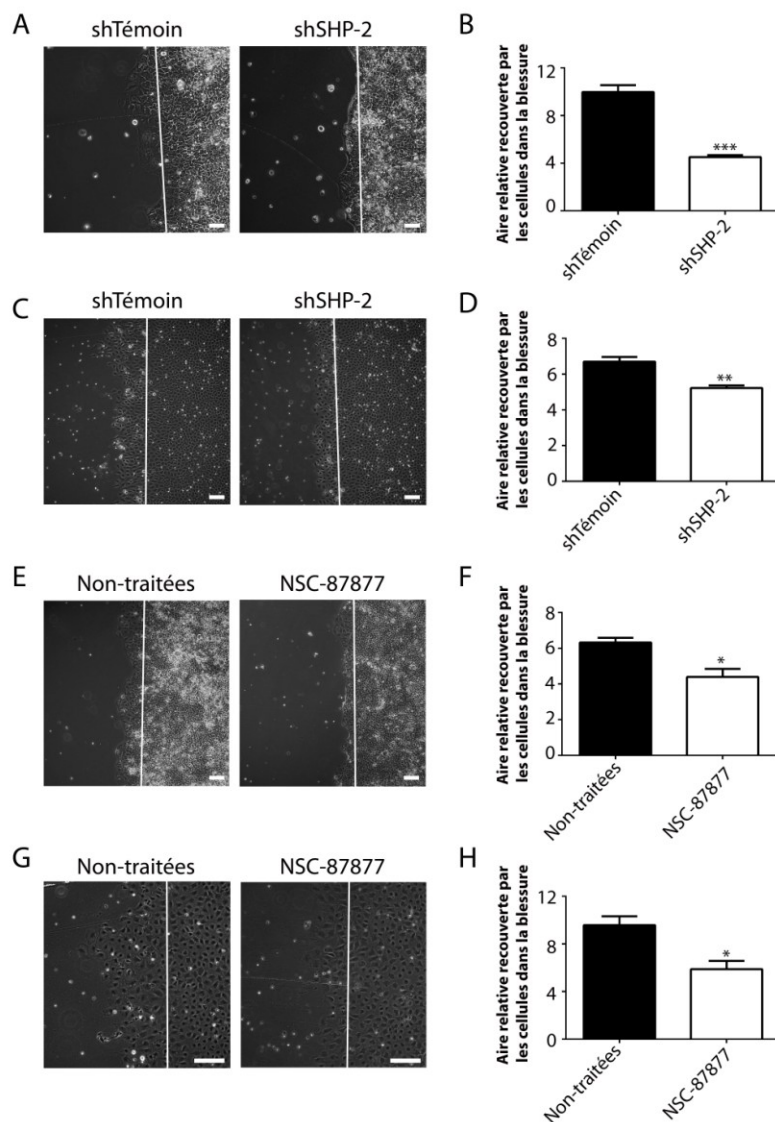
L'épithélium intestinal subit régulièrement des blessures qui doivent se réparer afin de maintenir l'intégrité de la barrière (Turner, 2009). Des défauts dans la réparation de blessure sont observés notamment lors de maladies inflammatoires intestinales (Dignass, 2001). Nous avons donc testé si SHP-2 pouvait aussi être impliquée dans la réparation de blessures de monocouches cellulaires. Les Caco-2/15 et les IEC-6 ont été infectées avec des lentivirus codant pour un shARN témoin (shTémoin) ou un shARN ciblant SHP-2 (shSHP-2). Suite à la sélection des cellules, celles-ci ont été amenées à confluence puis à l'aide d'une lame de rasoir, la monocouche a été blessée. Des photos ont été prises après 24h ou 48h de migration puis l'aire recouverte par les cellules dans la blessure a été obtenue. Afin d'inhiber la prolifération, les cellules Caco-2/15 ont été traitées à l'hydroxyurée et les cellules IEC-6 ont été mises dans un milieu contenant seulement 0,1% de sérum. Les Figures 32A-D montrent que la baisse d'expression de SHP-2 tant dans les IEC-6 que dans les Caco-2/15 diminue significativement la migration cellulaire.

SHP-2 est une protéine tyrosine phosphatase qui peut agir sur ses cibles soit en les déphosphorylant sur tyrosine, soit en agissant comme protéine adaptatrice via ses domaines SH2 (Neel *et al.*, 2003). À l'aide d'un inhibiteur pharmacologique ciblant l'activité phosphatasique de SHP-1 et SHP-2, le NSC-87877, nous avons effectué des tests de restitution sur les cellules Caco-2/15 et les IEC-6. Nos résultats démontrent que l'utilisation de cet inhibiteur pharmacologique réduit significativement la restitution épithéliale des Caco-2/15 (Figure 32E-F) et des IEC-6 (Figure 32G-H) suggérant donc que SHP-2 régule la restitution épithéliale via son activité enzymatique. Néanmoins, l'implication de la phosphatase SHP-1 dans les effets observés ne peut pas être exclue.



**Figure 31: SHP-2 contrôle la résistance transépithéliale dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2/15.**

(A) Les cellules Caco-2/15 ont été infectées avec des lentivirus codant soit pour un shARN dirigé contre SHP-2 (shSHP-2) ou une séquence non ciblante (shTémoin). Après la sélection des cellules, les populations de Caco-2/15 ont été lysées afin d'analyser l'expression de SHP-2 par immunobuvardage. L'actine a servi de contrôle de charge. (B) Les cellules Caco-2/15 shTémoin et shSHP-2 ont été ensemencées sur des membranes poreuses et la résistance transépithéliale (RTE) a été mesurée en triplicata aux jours 0, 6, 12 et 18 post-confluence (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (C) Les cellules Caco-2/15 10 jours post-confluence ont été traitées pendant 24h avec l'inhibiteur de MEK, le U0126, aux doses de 5µM et 20µM. Les cellules ont été lysées et les niveaux de phospho-ERK (T202/Y204) et ERK total ont été déterminés par immunobuvardage. L'actine a servi de contrôle de charge. (D) Des Caco-2/15 10 jours post-confluence ont été traitées pendant 24h avec le U0126 (5µM et 20µM) puis la résistance transépithéliale a été mesurée en quadruplicata (\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.



### Figure 32: SHP-2 contrôle la restitution des cellules épithéliales intestinales.

(A) Les cellules Caco-2/15 shTémoin et shSHP-2 ont été amenées à confluence, blessées à l'aide d'une lame de rasoir et mises dans du milieu 10% sérum contenant 2mM d'hydroxyurée. Les photos ont été prises après 48h. Barre de calibration, 50 $\mu$ m. (B) À l'aide du programme ImageJ, l'aire recouverte par les cellules dans la blessure a été mesurée (n=3, 15 photos comptées par condition, \*\*\* p<0,001). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (C) Les cellules IEC-6 shTémoin et shSHP-2 ont été amenées à confluence, blessées à l'aide d'une lame de rasoir et mises dans du milieu contenant 0,1% sérum. Les photos ont été prises après 24h. Barre de calibration, 50 $\mu$ m. (D) À l'aide du programme ImageJ, l'aire recouverte par les cellules dans la blessure a été mesurée (n=5, 15 photos comptées par condition, \*\* p<0,01). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (E) Les cellules Caco-2/15 ont été amenées à confluence, blessées à l'aide d'une lame de rasoir et mises dans du milieu contenant 10% sérum, 100 $\mu$ M de NSC-87877 et 2mM d'hydroxyurée. Les photos ont été prises après 24h. Barre de calibration, 50 $\mu$ m. (F) À l'aide du programme ImageJ, l'aire recouverte par les cellules dans la blessure a été mesurée (n=3, 15 photos comptées par condition, \* p<0,05). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (G) Les cellules IEC-6 ont été amenées à confluence, blessées à l'aide d'une lame de rasoir et mises dans du milieu contenant 0,1% sérum contenant 100 $\mu$ M de NSC-87877. Les photos ont été prises après 24h. Barre de calibration, 50 $\mu$ m. (H) À l'aide du programme ImageJ, l'aire recouverte par les cellules dans la blessure a été mesurée (n=4, 15 photos comptées par condition, \* p<0,05). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.



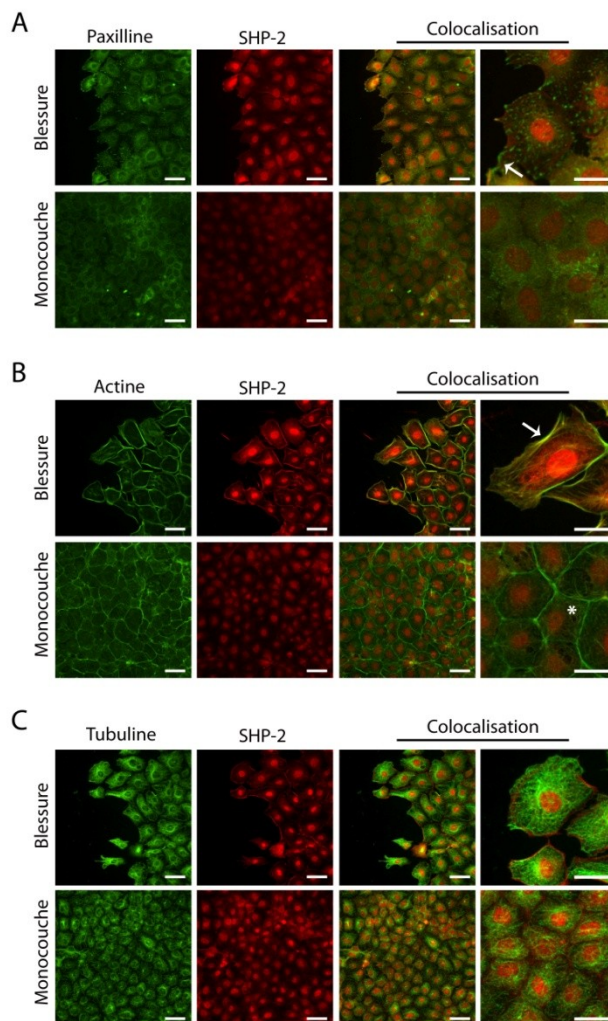
#### 2.4.2. SHP-2 colocalise avec les filaments d'actine lors de la restitution des cellules IEC-6

Des études ont montré précédemment que SHP-2 colocalise avec les points d'adhésion lors de la migration cellulaire (Yo *et al.*, 2009). Par immunofluorescence, nous avons analysé la localisation de SHP-2 par rapport aux points d'adhésion dans les cellules IEC-6 qui migrent ainsi que dans la monocouche de IEC-6. Tel qu'observé à la Figure 33A, très peu de colocalisation a été observée entre SHP-2 et la paxilline, une protéine intégrante des points d'adhésion. Toutefois, nous avons remarqué une accumulation de SHP-2 dans les cellules du front de migration sous forme, à certains endroits, de filaments (voir flèche). Nous avons donc voulu vérifier si SHP-2 peut s'associer à l'une des composantes du cytosquelette. Le cytosquelette d'actine a été marqué par la phalloïdine et nous remarquons une forte colocalisation avec SHP-2 dans les cellules du front de migration (voir flèche) tandis qu'il y a peu de colocalisation dans la monocouche de cellules (voir astérisque) (Figure 33B). Finalement, nous avons vérifié la localisation de SHP-2 par rapport aux microtubules. Nos résultats démontrent peu de colocalisation entre la tubuline et SHP-2 (Figure 33C). Ces résultats devront toutefois être confirmés par de la microscopie confocale.

#### 2.4.3. SHP-2 contrôle la restitution épithéliale via les voies ERK1/2 et RhoA/ROCK

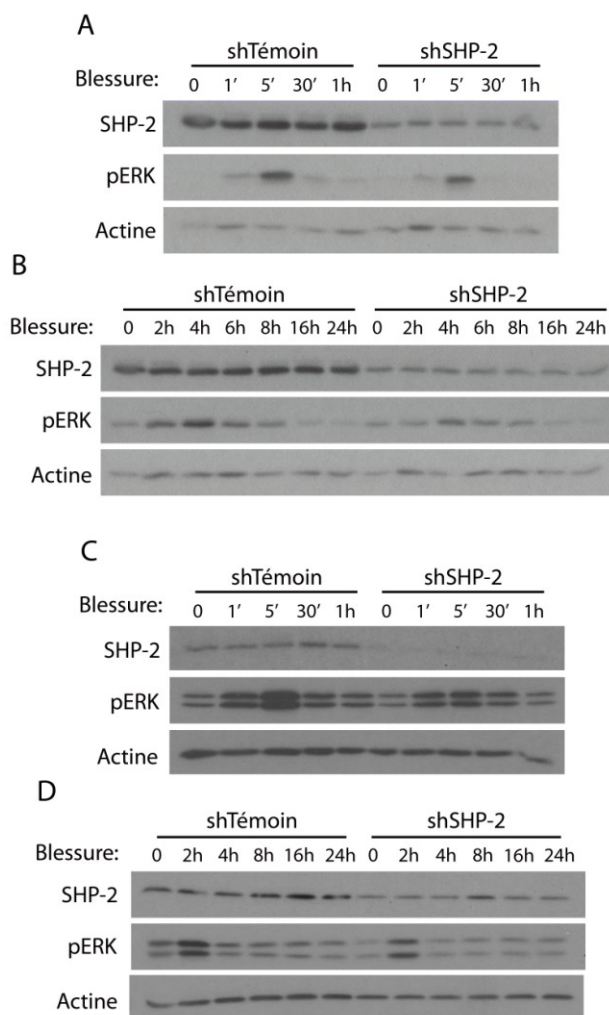
SHP-2 contrôle plusieurs voies de signalisation qui sont souvent impliquées dans la migration cellulaire. L'une de ces voies de signalisation est la voie ERK1/2 (Dance *et al.*, 2008). En utilisant les Caco-2/15 et les IEC-6 déficientes ou non pour l'expression de SHP-2, nous avons évalué l'activation de ces kinases suite à des blessures. Tel qu'illustré à la Figure 34A-D, une diminution du niveau d'activation/phosphorylation des kinases ERK1/2 est observée dans les cellules sous-exprimant SHP-2 comparativement aux cellules shTémoin et ce, tant dans des temps courts que dans des temps plus longs suivant la blessure.

Une autre voie de signalisation régulée par SHP-2 et jouant un rôle important dans la migration cellulaire est la voie RhoA/ROCK (Lee et Chang, 2008; Schoenwaelder *et al.*, 2000). Via l'utilisation d'un kit de la compagnie Cytoskeleton, nous avons dosé l'activité de RhoA dans les Caco-2/15 shTémoin et shSHP-2. Nos résultats montrent que dans une monocouche non blessée, il n'y a aucune différence dans l'activité de RhoA dans les



**Figure 33: Relocalisation de SHP-2 aux filaments d'actine dans les cellules épithéliales intestinales qui migrent.**

Les cellules IEC-6 ont été amenées à confluence, blessées à l'aide d'une lame de rasoir, mises dans du milieu 0,1% sérum puis fixées après 24h. Une immunofluorescence a été effectuée contre la paxilline (vert) (A), l'actine (vert) (B) et la tubuline (vert) (C) ainsi que SHP-2 (rouge). Une colocalisation a été effectuée. Barre de calibration, 50 $\mu$ m et 25 $\mu$ m (panneaux de droite).



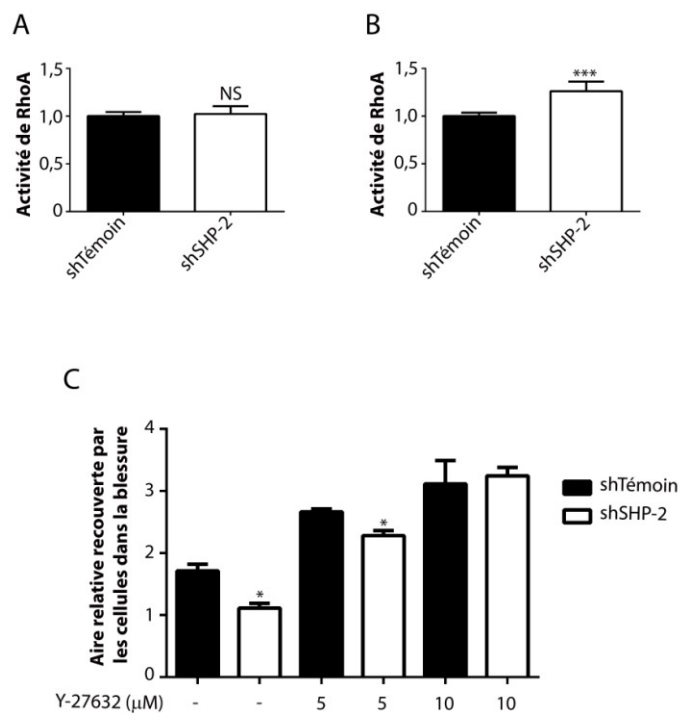
**Figure 34: SHP-2 contrôle l'activation des kinases ERK1/2 lors de la restitution épithéliale intestinale.**

Les cellules Caco-2/15 shTémoin et shSHP-2 ont été amenées à confluence, blessées à l'aide d'un grattoir pendant 1min, 5min, 30min et 1h (A) ou bien pendant 2h, 4h, 6h, 8h, 16h et 24h (B) puis lysées afin d'analyser par immunobuvardage SHP-2 et phospho-ERK1/2 (T202/Y204). L'actine a servi de contrôle de charge. Expérience représentative de trois expériences indépendantes. Les cellules IEC-6 shTémoin et shSHP-2 ont été amenées à confluence, blessées à l'aide d'un grattoir pendant 1min, 5min, 30min et 1h (C) ou bien pendant 2h, 4h, 8h, 16h et 24h (D) puis lysées afin d'analyser par immunobuvardage SHP-2 et phospho-ERK1/2 (T202/Y204). L'actine a servi de contrôle de charge. Expérience représentative de trois expériences indépendantes.

cellules shSHP-2 en comparaison aux cellules shTémoin (Figure 35A). Par contre, 24h après une blessure de la monocouche de cellules, une augmentation significative de l'activité de RhoA est observée dans les cellules déficientes pour SHP-2 par rapport aux cellules témoins (Figure 35B). Afin de vérifier l'implication de l'hyperactivation de RhoA dans l'inhibition de la migration des cellules shSHP-2, nous avons par la suite traité nos populations de Caco-2/15 avec différentes concentrations d'un inhibiteur pharmacologique de l'effecteur de RhoA soit ROCK (Y-27632). En absence de l'inhibiteur, nous observons une diminution significative de la restitution des cellules shSHP-2 par rapport aux cellules shTémoin. Le traitement avec 5 $\mu$ M et de façon plus importante avec 10 $\mu$ M de Y-27632 restaure la capacité de migration des cellules déficientes pour l'expression de SHP-2 (Figure 35C).

#### *2.4.4. SHP-2 présente des substrats potentiels impliqués dans la restitution épithéliale intestinale*

Nous avons voulu par la suite identifier des substrats de SHP-2 susceptibles d'être mobilisés dans nos cellules IEC-6 suite à une blessure. Pour ce faire, nous avons procédé à une expérience de protéomique quantitative de type SILAC. Plusieurs cibles ont été obtenues comme présentant un niveau de phosphorylation sur tyrosine plus élevé dans les cellules shSHP-2 comparativement aux cellules shTémoin et ce, suite à une blessure. Notamment, une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine des protéines Mark 1 à 4 ainsi que de plusieurs sous-unités de la myosine (Myh9, Myh14, Myl9;12b;Rlc-a, Myl6) a été détectée (Tableau 6 et Annexe 3). Toutefois, des expériences d'immunoprécipitations et d'immunobuvardages devront être effectuées pour confirmer si ces cibles sont de réels substrats de SHP-2 lors de la restitution épithéliale intestinale.



**Figure 35: SHP-2 contrôle l'activité de la voie RhoA/ROCK lors de la restitution épithéliale intestinale.** Les cellules Caco-2/15 shTémoin et shSHP-2 ont été amenées à confluence et l'activité de RhoA a été mesurée en absence de blessure (A) ou 24h suite à des blessures faites avec un grattoir (B) (n=3, \* p<0,05, NS: non-significatif). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (C) Les cellules Caco-2/15 shTémoin et shSHP-2 ont été amenées à confluence et blessées à l'aide d'une lame de rasoir. Les cellules ont été mises dans du milieu 10% sérum contenant 2mM contenant ou non du Y-27632 (5μM ou 10μM), un inhibiteur de ROCK. Des photos ont été prises après 24h et à l'aide du programme ImageJ, l'aire recouverte par les cellules dans la blessure a été mesurée (n=3, 15 photos comptées par condition, \* p<0,05). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.

**Tableau 6: Substrats potentiels de SHP-2 mobilisés lors de la restitution épithéliale.**

Protéines	Identification	Non blessées	5min post-blessure	24h post-blessure
Mark1; Mark2; Mark3; Mark4 (MAP/microtubule affinity-regulating kinase)	O08679; D4A6T9; F1LNE7; O08678; Q8VHF0; F1M836		9,19	
Myh9 (Myosin-9)	G3V6P7; Q62812; Q63862; Q62704		2,86	1,76
Gsn (Gelsolin)	Q3SX14; Q68FP1		1,69	3,53
Myh14 (Myosin-14)	F1LNF0			1,86
Myl9;12b;Rlc-a (Myosin regulatory light chain 9; 12B; RLC-A)	Q63781; P18666; P13832; B0BMS8; Q64122		1,81	1,60
Rai14 (Ankycorbin, Retinoic acid- induced protein 14 )	R9PXZ3; F1LM75; Q5U312		1,77	1,64
Mtm1 (Myotubularin)	Q6AXQ4			1,69
Myl6 (Myosin light polypeptide 6)	Q64119; B2GV99; M0RC91; M0RCG4; D3ZHA7		1,47	1,27
Dmd (Dystrophin)	F5CC78; F1LN35; T2F9K4; Q05485; Q7TPH2; Q7TPH4; Q7TPH3; Q9Z147; Q63031		1,45	1,35

Les cellules IEC-6 ont été cultivées pendant cinq passages dans trois milieux de culture différents contenant des acides aminés légers (R0, K0), des acides aminés moyens (R6, K4) ou des acides aminés lourds (R10, K8). Les cellules ont été infectées avec des lentivirus shTémoin ou shSHP-2 puis sélectionnées. Ensuite, elles ont été amenées à confluence, mises pendant 24h dans du milieu contenant 0,1% sérum avant d'effectuer des multiblessures à l'aide d'un grattoir pendant 5min ou 24h. Les cellules ont été lysées et une immunoprécipitation dirigée contre les tyrosines phosphorylées a été effectuée. Les protéines immunoprécipitées ont été identifiées par spectrométrie de masse. Les valeurs représentent le ratio du nombre de peptides identifiés correspondant à une protéine donnée dans le milieu lourd (shSHP-2) par rapport au milieu moyen (shTémoin). (voir Annexe 3 pour la liste complète des cibles obtenues)

En résumé, les résultats du chapitre 2 suggèrent que SHP-2 contrôle le niveau d'activation d'effecteurs de signalisation importants tels que les kinases ERK1/2 de même que les facteurs de transcription NF $\kappa$ B, STAT3 et  $\beta$ -caténine. En modulant ces différentes signalisations, SHP-2 contrôle des processus cellulaires très importants pour le maintien de l'homéostasie intestinale: la détermination des cellules à mucus et des cellules de Paneth, la composition de la flore, la perméabilité paracellulaire et la restitution épithéliale. La dérégulation de ces processus cellulaires peut expliquer l'apparition d'inflammation colique chez les souris déficientes pour l'expression épithéliale de cette phosphatase dans l'intestin.

### **Chapitre 3: Rôle de SHP-2 dans le cancer colorectal associé à la colite**

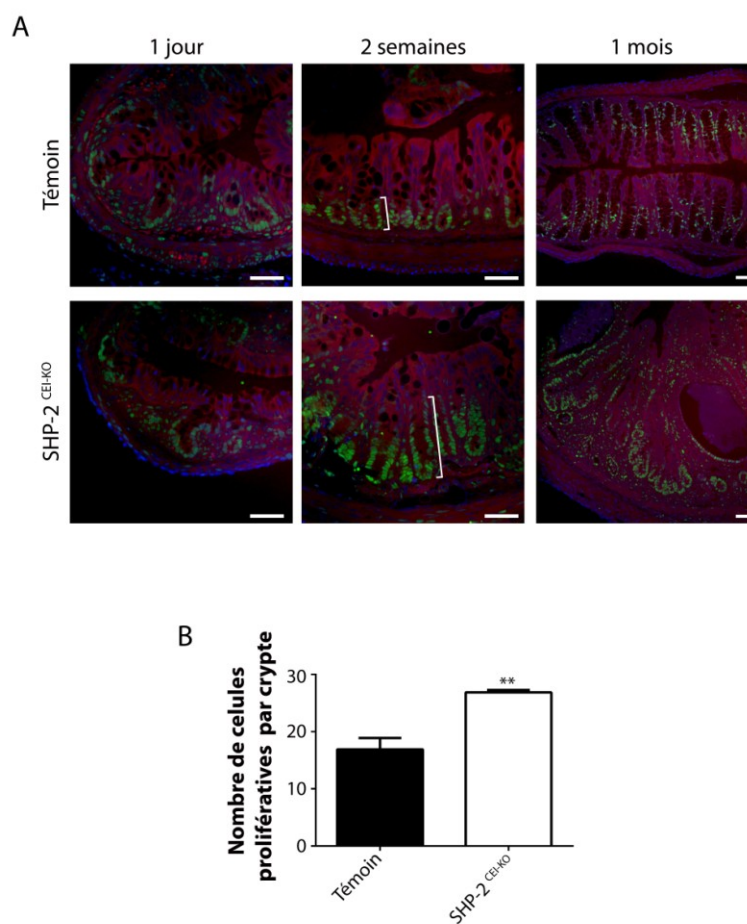
Plusieurs maladies inflammatoires sont associées à un plus grand risque de développer un cancer (Balkwill et Mantovani, 2001). C'est le cas pour les maladies inflammatoires intestinales qui augmentent significativement le risque de développer un cancer colorectal et ce, en parallèle avec la durée et l'étendue de la maladie (Eaden, 2004). De plus, plusieurs modèles murins souffrant d'inflammation intestinale chronique développent avec l'âge des dysplasies et des carcinomes (Itzkowitz et Yio, 2004). Nous avons donc testé si l'inflammation chronique engendrée par la perte d'expression de *Shp-2* dans l'épithélium intestinal menait à une plus grande susceptibilité de développer un cancer colorectal.

#### ***3.1. Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> montrent une augmentation du nombre de cellules prolifératives dans leur côlon et leur intestin grêle***

Nous avons, dans un premier temps, évalué le nombre de cellules prolifératives par une immunofluorescence dirigée contre l'antigène de prolifération PCNA chez les souris témoins et expérimentales. Dans le côlon des souris nouveau-nées, des cellules marquées sont présentes dans le fond des cryptes en formation sans différence notable entre les souris témoins et expérimentales (Figure 36A, panneaux de gauche). Toutefois, 2 semaines après la naissance, une augmentation du nombre de cellules marquées est observée dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> par rapport aux souris témoins (voir accolades). Finalement, à 1 mois, une délocalisation des cellules PCNA positives est présente en plus d'un plus grand nombre de cellules marquées chez les souris expérimentales comparativement aux souris témoins (Figure 36A, panneaux de droite). Rappelons qu'à cet âge, les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> démontrent beaucoup d'inflammation dans leur côlon (Figure 3). Des décomptes de cellules PCNA positives par crypte chez les souris âgées de 2 semaines démontrent une augmentation de 1,71 fois du nombre de cellules marquées chez les souris expérimentales en comparaison aux souris témoins (Figure 36B).

Afin de vérifier si cette augmentation de prolifération est présente seulement au niveau du côlon de nos souris expérimentales, une immunofluorescence dirigée contre





**Figure 36: Augmentation de la prolifération dans le côlon distal des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

(A) Une immunofluorescence dirigée contre le marqueur de prolifération PCNA a été effectuée sur des coupes de côlon distal de souris témoins et expérimentales âgées de 1 jour, 2 semaines et 1 mois. Accolade: zone proliférative. Barre de calibration, 50 $\mu$ m. (B) Le nombre de cellules marquées au PCNA a été compté dans 15 cryptes de côlon distal de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines (n=3 par groupe, \*\* p $\leq$ 0,01). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.

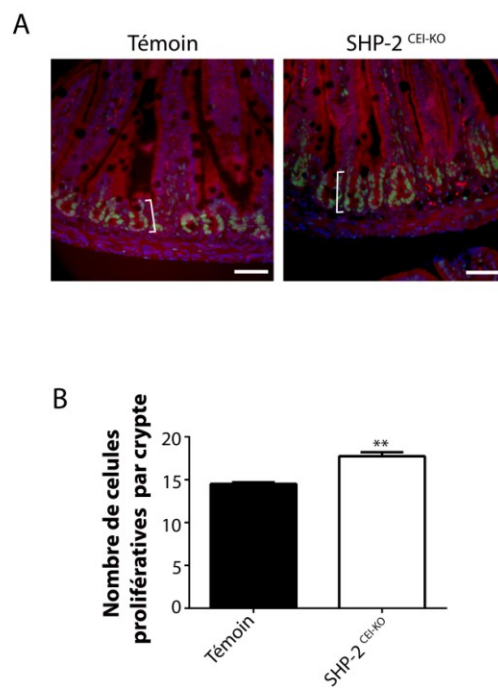
PCNA a été faite sur des coupes d'intestin grêle de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines (Figure 37A, voir accolades). Tel que visualisé à la Figure 37B, une augmentation significative du nombre de cellules PCNA positives est aussi notée dans l'intestin grêle des souris expérimentales par rapport aux souris témoins. Toutefois, cette augmentation est moins importante que celle observée dans le côlon.

### ***3.2. La prolifération est diminuée par la délétion épithéliale de Myd88 chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>***

Un nombre plus élevé de bactéries est présent dans le côlon en comparaison à l'intestin grêle (Artis, 2008). Chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, l'augmentation de la prolifération cellulaire est également surtout observée au niveau du côlon (Figure 36). Nous avons voulu vérifier si la réponse des cellules épithéliales intestinales à la microflore, via la protéine adaptatrice Myd88, était impliquée. Pour ce faire, une immunofluorescence dirigée contre le marqueur PCNA a donc été effectuée sur des coupes de côlon distal de souris témoins, Myd88<sup>CEI-KO</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 mois. Aucune différence n'a été observée entre les souris témoins et les souris Myd88<sup>CEI-KO</sup>. Encore une fois, un plus grand nombre de cellules PCNA positives est présent chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris témoins. Finalement, la délétion épithéliale de *Myd88* chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> diminue de façon importante le nombre de cellules marquées (voir accolades, Figure 38).

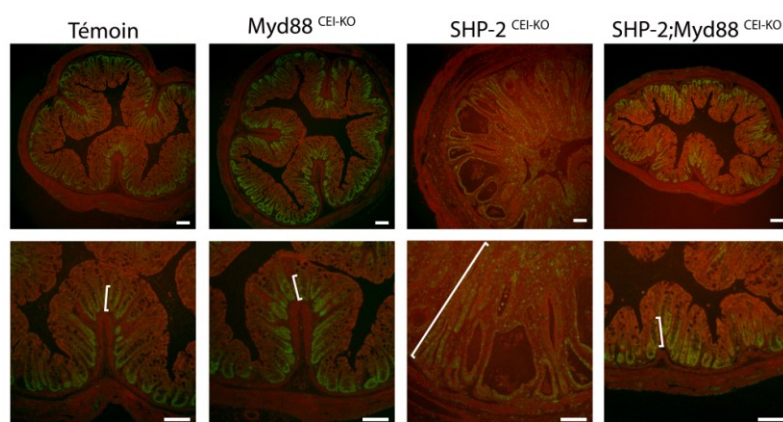
### ***3.3. Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées développent des adénocarcinomes intramuqueux et des adénocarcinomes infiltrants***

Finalement, nous avons laissé vieillir des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> afin de vérifier si elles développaient des tumeurs colorectales. À l'âge de 12 à 15 mois, les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 12 à 15 mois ont un poids significativement plus petit que celui des souris témoins ainsi qu'un index de maladie significativement plus élevé (Figure 39A-B). Ces observations suggèrent que les souris expérimentales ont souffert d'inflammation colique de façon chronique.



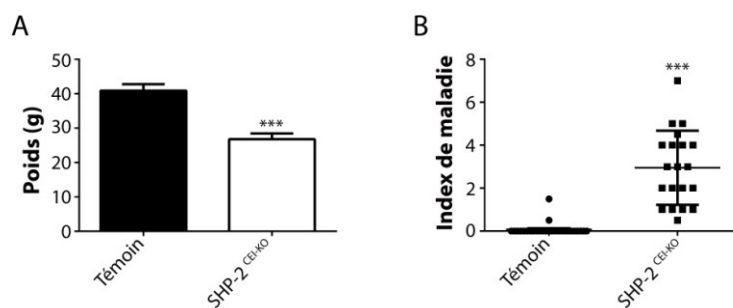
**Figure 37: Augmentation de la prolifération dans l'intestin grêle des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.**

(A) Une immunofluorescence dirigée contre le marqueur de prolifération PCNA a été effectuée sur des coupes d'intestin grêle de souris témoins et expérimentales âgées de 2 semaines. Accolade: zone proliférative. Barre de calibration, 50 $\mu$ m. (B) Le nombre de cellules marquées au PCNA a été compté dans 15 cryptes de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines (n=3 par groupe, \*\* p $\leq$ 0,01). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.



**Figure 38: Diminution de la prolifération dans les SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 mois.**

Une immunofluorescence dirigée contre le marqueur de prolifération PCNA a été effectuée sur des coupes de côlon distal de souris témoins, Myd88<sup>CEI-KO</sup>, SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> âgées 1 mois. Accolade: zone proliférative. Barre de calibration, 100µm.



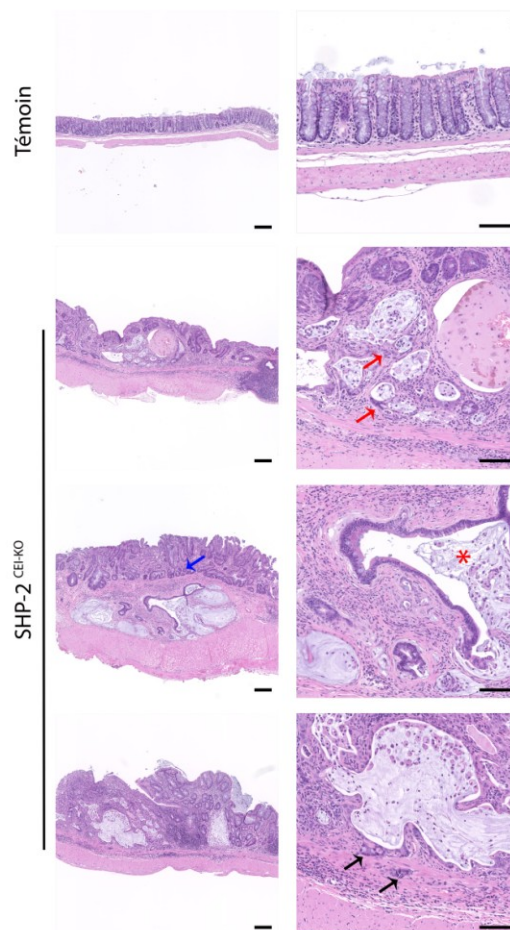
**Figure 39: Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées souffrent d'inflammation colique.**

(A) Le poids des souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées entre 12 et 15 mois a été noté ( $n \geq 20$  par groupe, \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (B) L'index de maladie des souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> a été évalué en prenant en compte la dureté du côlon, les saignements rectaux, le sang dans les fèces ainsi que leur consistance ( $n \geq 20$  par groupe, \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.

Avec l'aide de la pathologiste, Pre Marilène Paquet, des coupes de côlon distal de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 12 à 15 mois ont été analysées. Chez les souris témoins, aucune anomalie n'a été décelée. Par contre, toutes les souris expérimentales analysées ont développé une colite modérée à sévère avec de multiples lésions épithéliales de degré variable. Les changements histopathologiques vont de l'hyperplasie épithéliale à la dysplasie, à l'adénocarcinome intramuqueux (voir flèches rouges) et à l'adénocarcinome infiltrant (voir flèches noires) (Figure 40). Plus précisément, sur les 9 souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> analysées, 6 d'entre elles ont clairement développé au moins un adénocarcinome intramuqueux et 3 ont développé au moins un adénocarcinome infiltrant.

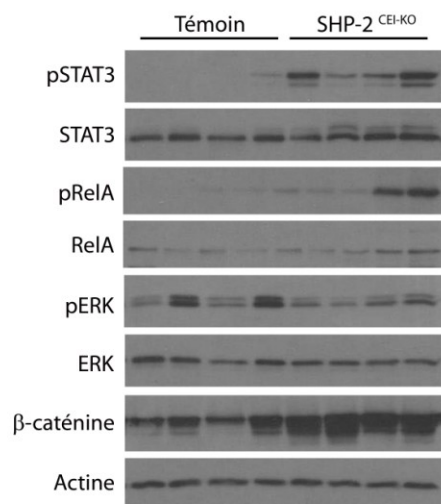
En dernier lieu, les voies de signalisation régulées par SHP-2 ont été analysées par immunobuvardage chez ces souris âgées. Tel que visualisé chez les souris plus jeunes (Figure 6), le niveau de phosphorylation des kinases ERK1/2, quoique variable, semble aussi diminué chez les vieilles souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> alors que le niveau de phosphorylation de STAT3 et de RelA est augmenté et ce, comparativement aux souris témoins (Figure 41). De plus, une augmentation d'expression de la  $\beta$ -caténine est toujours notée dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées par rapport aux souris témoins.

En résumé, nos résultats démontrent que l'absence d'expression épithéliale de *Shp-2* dans le côlon des souris mène à une inflammation chronique et subséquemment au développement de cancer colorectal associé à la colite.



**Figure 40: Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> développent des adénocarcinomes intramuqueux et des adénocarcinomes infiltrants avec l'âge.**

Des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine ont été effectuées sur des coupes de côlon distal de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 12 à 15 mois. Flèches rouges: invasion des cellules tumorales à travers la lamina propria mais n'atteignant pas la tunique musculaire (adénocarcinome intramuqueux). Flèche bleue: glandes désorganisées, ramifiées, irrégulières et anguleuses. Astérisque: glande néoplasique dilatée remplie de mucus et de débris cellulaires. Flèches noires: invasion des cellules tumorales à travers la tunique musculaire (adénocarcinome infiltrant). Barre de calibration, 100µm.



**Figure 41: Dérégulation de l'activation de STAT3, NFκB, ERK1/2 et β-caténine chez les souris expérimentales âgées.**

Des enrichissements de muqueuse de souris âgées de 12 à 15 mois ont été obtenus de souris témoins et SHP-2<sup>Cei-KO</sup> afin d'analyser par immunobuvardage les voies de signalisation STAT3 (STAT3 total et phospho-STAT3 (Y705)), NFκB (RelA total et phospho-RelA (S536)), ERK1/2 (ERK1/2 total et phospho-ERK1/2 (T202/Y204)) et Wnt/β-caténine (β-caténine total). L'actine a servi de contrôle de charge.



## **Chapitre 4: Statut d'expression de SHP-2 chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales**

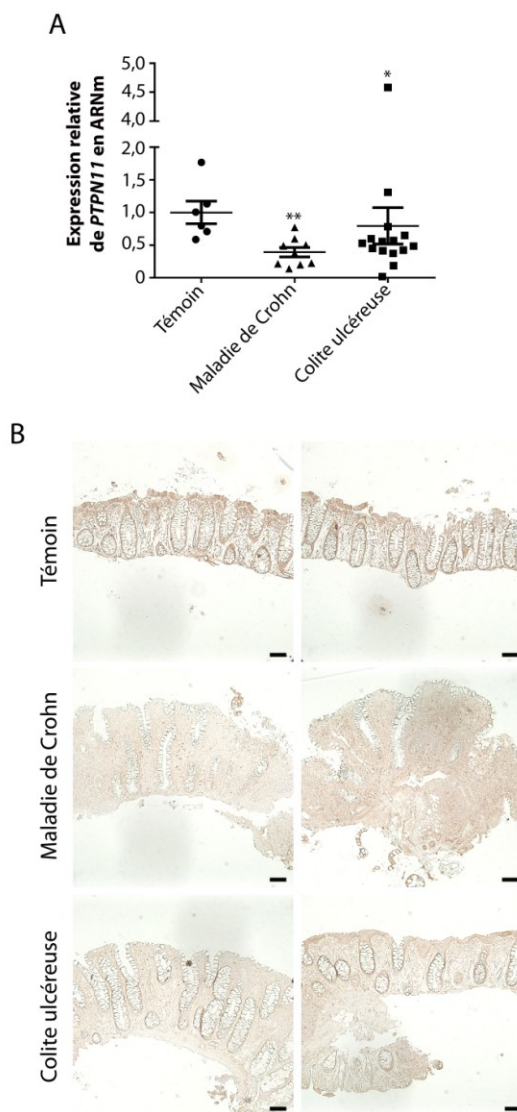
Nos résultats chez la souris démontrent clairement qu'une diminution d'expression de *Shp-2* dans l'épithélium intestinal mène spontanément à l'apparition d'une colite. Nous avons donc voulu, par la suite, vérifier le statut d'expression de SHP-2 chez des patients atteints de maladies inflammatoires intestinales, soit souffrants de la maladie de Crohn ou de la colite ulcéreuse.

### ***4.1. Les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales présentent une diminution d'expression de SHP-2***

L'expression de *SHP-2* en ARNm a été d'abord évaluée par PCR quantitatives dans des échantillons de muqueuses de patients témoins ainsi que de patients atteints de maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse. Seulement les spécimens comportant au moins 40% d'épithélium ont été analysés. Nos résultats montrent une diminution significative de l'expression en ARNm de *SHP-2* tant dans les spécimens de muqueuses de patients souffrant de la maladie de Crohn que de la colite ulcéreuse et ce, par rapport aux spécimens témoins (Figure 42A). Par immunohistochimie sur des biopsies de patients témoins, le marquage de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales est bien détecté tandis que ce marquage semble plus faible chez les patients atteints de maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse (Figure 42B). Ces résultats devront toutefois être confirmés sur un plus grand échantillonnage de patients.

### ***4.2. Les patients atteints de colite ulcéreuse et de la maladie de Crohn expriment différemment les polymorphismes rs2301756 et rs3741983***

En 2009, un groupe japonais a découvert deux polymorphismes (rs2301756 et rs3741983) dans les introns du gène *PTPN11* codant pour SHP-2 chez les patients atteints de colite ulcéreuse (Narumi *et al.*, 2009). Par PCR suivie d'un séquençage, nous avons testé la présence de ces deux polymorphismes dans notre banque d'échantillons de patients. Nos résultats préliminaires suggèrent que les patients atteints de colite ulcéreuse présentent une



**Figure 42: Diminution d'expression de SHP-2 dans la muqueuse colique des patients atteints de maladies inflammatoires intestinales.**

(A) L'expression de *PTPN11* a été analysée dans des échantillons de patients témoins ou atteints de maladies inflammatoires intestinales (maladie de Crohn et colite ulcéreuse). L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur le gène de référence  $\beta$ -*ACTINE* ( $n \geq 6$  par groupe, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne. (B) Des immunohistochimies dirigées contre SHP-2 ont été effectuées sur des biopsies de patients témoins ou atteints de la maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse. L'immunohistochimie de deux patients pour chacune des maladies est montrée. Barre de calibration, 100 $\mu$ m.

augmentation de l'allèle G par rapport à l'allèle A (rs2301756) et une augmentation de l'allèle T par rapport à l'allèle C (rs3741983) et ce, comparativement aux patients atteints de la maladie de Crohn et aux patients témoins (Tableau 7). Les patients témoins de cette cohorte ne présentaient pas, au moment de la prise de tissus, de signe d'inflammation intestinale; toutefois leur condition physique a tout de même nécessité des examens approfondis (prise de sang, colonoscopie, etc.). Toutefois, il est fort possible que certains de ces patients classés initialement parmi les patients témoins développent éventuellement une maladie inflammatoire intestinale. Si c'est le cas, il sera important de révéifier l'association avec les polymorphismes.

**Tableau 7: Distribution des allèles des polymorphismes de *PTPN11* chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales.**

Polymorphismes	Allèles	Témoin	Maladie de Crohn	Colite ulcéreuse
rs2301756	A	35/40 (85%)	22/22 (100%)	19/24 (79,2%)
	G	5/40 (15%)	0/22 (0%)	5/24 (20,8%)
rs3741983	C	31/40 (77,5%)	20/22 (90,9%)	17/24 (70,8%)
	T	9/40 (22,5%)	2/22 (9,1%)	7/24 (29,2%)

Le sang de patients témoins (n=20), atteints de la maladie de Crohn (n=11) ou atteints de la colite ulcéreuse (n=12) a été prélevé puis l'ADN a été extrait. Des PCR ont été effectuées puis les produits de PCR ont été séquencés. Suite à des alignements de séquence, les polymorphismes rs2301756 (A/G) et rs3741983 (C/T) ont été détectés.

Nos résultats chez l'humain démontrent qu'il y a une diminution d'expression de SHP-2 chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales comparativement aux patients témoins. De plus, deux polymorphismes de *PTPN11* sont retrouvés préférentiellement chez les patients atteints de colite ulcéreuse.

## Discussion

SHP-2 est une protéine tyrosine phosphatase qui contrôle de nombreuses voies de signalisation dont les voies ERK1/2 (Dance *et al.*, 2008), Jak/STAT (Xu et Qu, 2008) et NFκB (Xu *et al.*, 2012; You *et al.*, 2001). Cette phosphatase régule également plusieurs processus cellulaires incluant la prolifération (Agazie et Hayman, 2003), la migration (Yu *et al.*, 1998) et la différenciation cellulaire (Konaridis *et al.*, 2004). À l'aide de différents modèles murins de délétion conditionnelle, les études effectuées soulignent l'importance de SHP-2 dans le maintien de l'homéostasie de plusieurs tissus et organes, dont le foie (Bard-Chapeau *et al.*, 2011), les poumons (Zhang *et al.*, 2012) et le coeur (Princen *et al.*, 2009). Finalement, SHP-2 est aussi impliquée dans le développement de diverses maladies humaines telles que le syndrome de Noonan et différents types de cancers (Bentires-Alj *et al.*, 2004). Bien que la protéine tyrosine phosphatase SHP-2 soit exprimée de façon ubiquiste (Feng *et al.*, 1993), son rôle dans l'épithélium intestinal n'était pas connu.

Notre objectif principal était donc de déterminer les rôles de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales en proposant comme hypothèse qu'elle y contrôlait l'homéostasie de l'intestin en régulant des processus clés comme la prolifération, la migration et la différenciation cellulaires.

### 1. Contrôle de l'homéostasie intestinale par SHP-2

Bien que SHP-2 soit rapportée pour avoir une expression ubiquiste (Feng *et al.*, 1993), nous avons tout d'abord confirmé son expression dans l'épithélium intestinal selon l'axe rostral-caudal (Figure 1A). Puis, afin de répondre à notre objectif, nous avons généré un modèle murin de délétion conditionnelle de SHP-2 via le croisement des souris *Shp-2*<sup>flox/flox</sup> (Zhang *et al.*, 2004) avec des souris transgéniques *Villine-Cre* exprimant la Cre spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales (Madison *et al.*, 2002). Notons que la perte d'expression de SHP-2 dans notre modèle murin a été autant efficace dans l'intestin

grêle que dans le côlon (Figure 1B), et ce même si la Cre s'exprime moins fortement dans le côlon que dans l'intestin grêle (Madison *et al.*, 2002).

À la naissance, les souriceaux témoins et expérimentaux présentaient tous un poids similaire. Cependant, à partir de trois semaines, les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> ont rapidement démontré un retard de croissance important par rapport aux souris témoins (Figure 2A). Ce retard de croissance corrèle avec le développement d'une inflammation sévère dans le côlon de nos souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>; d'ailleurs celles-ci présentaient un index de maladie élevé contrairement aux souris témoins (Figure 3B). Macroscopiquement et histologiquement, les signes d'inflammation affectaient tout le côlon (Figure 3C) sans toucher l'intestin grêle. Le phénotype inflammatoire dans le côlon de souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 1 mois a été confirmé par l'observation d'une sévère désorganisation de l'architecture, principalement au niveau du côlon distal, qui se caractérise par un allongement des cryptes, par plusieurs zones d'infiltrations de cellules immunitaires, par une diminution du nombre de cellules à mucus ainsi que par la présence d'abcès de cryptes remplis de neutrophiles (Figure 3D-E). La quantification de chimiokines dans le côlon des souris expérimentales a montré une augmentation d'expression de CCL2, CCL5, CXCL1 et CXCL5 par rapport aux souris témoins (Tableau 1). Ces chimiokines servent au recrutement de cellules immunitaires comme les monocytes, les lymphocytes, les éosinophiles et les neutrophiles et ont été décrites comme pouvant être sécrétées par les cellules épithéliales intestinales (Stadnyk, 2002). Nos résultats obtenus à l'aide de cellules en culture montrent une plus forte augmentation de l'expression de *Cxcl1* et de *Cxcl5* dans les cellules shSHP-2 comparativement aux cellules shTémoin suite à un traitement avec le produit bactérien LPS (Figure 14C). Ainsi, le recrutement massif de neutrophiles observé chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> (Figure 3E) pourrait être la résultante d'une hypersécrétion de CXCL1 et CXCL5 par les cellules épithéliales intestinales. D'autres expériences seront requises afin de vérifier si l'augmentation d'expression de CCL2 et CCL5 provient des cellules épithéliales intestinales et permet le recrutement d'autres types de cellules immunitaires (monocytes, lymphocytes et éosinophiles). De plus, une augmentation d'expression des interleukines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-12 ainsi qu'une diminution d'expression d'IL-10 a également observé chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> comparativement aux souris témoins (Tableau 1). Ces interleukines, à l'exception de l'IL-12, peuvent être produites par les

cellules épithéliales intestinales (Stadnyk, 2002). De plus, une réduction d'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 pourrait participer à l'apparition de la colite chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> étant donné que les souris *Il10*<sup>-/-</sup> développent spontanément de l'inflammation intestinale lorsqu'elles sont hébergées dans une animalerie conventionnelle (Berg *et al.*, 1996). Ces résultats ont donc révélé un rôle jusque-là insoupçonné de SHP-2 dans la protection de l'épithélium colique contre l'inflammation.

Chez l'homme, il existe principalement deux types de maladies inflammatoires intestinales: la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. La maladie de Crohn est une maladie qui peut toucher toutes les parties du tube digestif, de la bouche à l'anus; l'inflammation est généralement transmurale et discontinue. Sur des coupes histologiques, des agrégations de macrophages formant des granulomes sont fréquemment observées (Xavier et Podolsky, 2007). Une réponse immunitaire excessive de type Th1 (IL-2 et IFN $\gamma$ ) est également présente (Breese *et al.*, 1993). La colite ulcéreuse affecte plutôt une région localisée du tube digestif soit le côlon, l'anus et le rectum. L'inflammation est superficielle et n'affecte que la muqueuse et la sous-muqueuse. Au niveau histologique, la colite ulcéreuse se caractérise par une forte infiltration de neutrophiles dans la lamina propria de même que dans les cryptes où ils forment des abcès de cryptes (Xavier et Podolsky, 2007). Ainsi, les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> ont développé une inflammation qui s'apparente plus à la colite ulcéreuse qu'à la maladie de Crohn (Figure 3).

Suite à la publication de notre article en 2013 (Coulombe *et al.*, 2013), deux autres groupes de recherche ont aussi généré des souris n'exprimant pas *Shp-2* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales. Dans leur étude, Heuberger et collaborateurs ont croisé des souris *Shp-2*<sup>flox/flox</sup> ciblant les exons 3 et 4 de *Shp-2* (Grossmann *et al.*, 2009) avec une souris *Villine-Cre* développée par le groupe du Pr Sylvie Robine (el Marjou *et al.*, 2004). Tout comme nous, ils rapportent que leurs souris expérimentales ont un poids significativement plus petit que leurs souris témoins et développent une colite caractérisée par de la diarrhée et des saignements rectaux. Ils ont également observé une diminution du nombre de cellules à gobelet chez leurs souris mutantes (Heuberger *et al.*, 2014). Pour leur part, le groupe de Yamashita et collaborateurs a croisé des souris *Shp-2*<sup>flox/flox</sup> ciblant l'exon 11 de *Shp-2* contenant le domaine PTP (Fornaro *et al.*, 2006) avec la même souris

*Villine-Cre* que nous avons utilisée (Madison *et al.*, 2002). Ils ont d'ailleurs obtenu des résultats similaires aux nôtres quant aux poids, à l'index de maladie et à l'histologie du côlon des souris expérimentales par rapport aux souris témoins. Toutefois, ils ont aussi observé dans quelques zones de l'intestin grêle des souris expérimentales âgées de 3 semaines un peu l'inflammation (Yamashita *et al.*, 2014). Ainsi, trois groupes indépendants, dont le nôtre, ont obtenu des résultats similaires en utilisant différents modèles murins de délétion conditionnelle de *Shp-2* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales. Cela confirme le rôle essentiel de cette tyrosine phosphatase dans le maintien de l'homéostasie intestinale.

## **2. Rôles anti-inflammatoires de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales**

L'épithélium intestinal remplit plusieurs fonctions. Il forme une barrière physique et chimique entre le contenu de la lumière intestinale et les cellules sous-jacentes en plus de réguler la réponse immunitaire (Peterson et Artis, 2014). Il n'est donc pas étonnant que de multiples défauts dans les cellules épithéliales intestinales aient été rapportés chez des personnes souffrant d'une maladie inflammatoire intestinale (Roda *et al.*, 2010). Nous avons donc voulu comprendre par quels mécanismes cellulaires et moléculaires la perte d'expression de *Shp-2* dans les cellules épithéliales menait à l'apparition d'inflammation dans le côlon.

### ***2.1. SHP-2 contrôle plusieurs voies de signalisation qui régulent le maintien de l'homéostasie intestinale et la réponse inflammatoire***

La microflore intestinale joue un grand rôle dans le développement de l'inflammation. En effet, la majorité des modèles murins développant spontanément une colite dans une animalerie conventionnelle n'en développent pas dans un environnement stérile (Kim *et al.*, 2005). Aussi, le traitement des patients avec des antibiotiques entraîne des effets bénéfiques pour ceux-ci (Khan *et al.*, 2011; Sutherland *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2012). Plusieurs de nos résultats suggèrent fortement que la présence des bactéries dans la

lumière intestinale est nécessaire au développement de l'inflammation colique observée chez nos souris expérimentales. Premièrement, à la naissance, alors que la lumière intestinale est un environnement stérile (Artis, 2008), aucun signe d'inflammation n'est observé chez nos souris expérimentales (Figure 4A). L'inflammation apparaît après le sevrage, lors de la colonisation massive du côlon par la microflore. Deuxièmement, l'inflammation observée dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> affecte seulement le côlon sans toucher l'intestin grêle. D'ailleurs, le nombre de microorganismes par mL passe de  $10^3$ - $10^5$  dans l'intestin grêle à  $10^9$ - $10^{12}$  dans le côlon (Artis, 2008); cela pourrait ainsi expliquer la présence d'inflammation seulement dans le côlon de nos souris expérimentales. Troisièmement, des traitements aux antibiotiques des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> atténuent grandement l'inflammation (Figure 9A-B). Finalement, la délétion conditionnelle de la protéine adaptatrice *Myd88* dans les cellules épithéliales intestinales chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> diminue les signes d'inflammation comparativement aux souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> à l'âge de 1 mois (Figure 10B-D). Néanmoins, avec le temps, les souris SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> finissent par développer une colite; ainsi la délétion de *Myd88* dans les cellules épithéliales intestinales entraîne seulement un retard dans l'apparition de l'inflammation (Figure 11). Ceci peut s'expliquer du fait que d'autres protéines adaptatrices utilisées par les TLRs comme Mal, TRIF, TRAM et SARM peuvent compenser pour la perte d'expression de *Myd88* dans les cellules épithéliales intestinales.

Plusieurs études rapportent que SHP-2 contrôle des voies de signalisation importantes pour la cellule. Nous avons donc évalué l'activation de plusieurs de ces voies de signalisation effectrices avant le début de la colite. Nos résultats montrent que dans l'épithélium des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines, une hyperactivation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et des facteurs de transcription STAT3 et NF $\kappa$ B est présente (Figures 6-7). À l'inverse, une diminution d'activation des kinases ERK1/2 est observée chez les souris expérimentales à cet âge (Figure 6B).

### 2.1.1. Régulation de NF $\kappa$ B par SHP-2

La voie de signalisation NF $\kappa$ B est activée par plusieurs cytokines (par exemple: IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) et produits bactériens (par exemple: LPS, flagelline) (Karrasch et Jobin,



2008). Plusieurs évidences suggèrent que NFκB joue un rôle central dans le développement de l'inflammation dans l'intestin. Tout d'abord, ce facteur de transcription est activé et nucléaire dans des biopsies de côlon provenant de patients atteints de maladie inflammatoire intestinale (Andresen *et al.*, 2005; Rogler *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1998). L'inhibition de la voie NFκB via l'utilisation d'oligonucléotides antisens ciblant p65 (RelA) ou d'un peptide bloquant NEMO (IKKγ) diminue les signes d'inflammation chez les souris ayant été traitées avec un agent induisant une colite chimique ainsi que chez les souris déficientes pour la cytokine anti-inflammatoire *Il-10* (Dave *et al.*, 2007; Neurath *et al.*, 1996; Shibata *et al.*, 2007). Toutefois, certains travaux ont aussi montré que l'activation de NFκB pouvait exercer un rôle protecteur dans l'épithélium intestinal. Par exemple, les souris déficientes pour l'expression épithéliale de NEMO (IKKγ), une composante importante de la voie NFκB, développent spontanément une colite due, entre autres, à une augmentation de cellules en apoptose (Nenci *et al.*, 2007). NFκB est en effet connu pour être capable d'induire l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la survie cellulaire incluant *Bcl-X<sub>L</sub>* (Chen *et al.*, 2000; Greten *et al.*, 2004), *FLIP* (Kreuz *et al.*, 2001) et des membres de la famille *IAP* (inhibitor of apoptosis) (Stehlik *et al.*, 1998a; Stehlik *et al.*, 1998b). Ces études ainsi que d'autres (Karrasch et Jobin, 2008; Pasparakis, 2009) suggèrent donc que tant la perte d'activité de NFκB que son hyperactivation soutenue sont délétères pour l'épithélium colique. Ce facteur doit donc être finement et strictement contrôlé pour le bon maintien de l'homéostasie de l'intestin. Des études précédentes ont déjà rapporté que SHP-2 pouvait moduler la signalisation menant à l'activation de NFκB. Par exemple, dans les fibroblastes murins, SHP-2 régule positivement l'activation de NFκB en réponse à l'IL-1α et au TNFα (You *et al.*, 2001). À l'inverse, dans les macrophages, une stimulation par le produit bactérien LPS montre plutôt que SHP-2 régule négativement l'activation de NFκB (Xu *et al.*, 2012). Chez nos souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines, une hyperactivation de NFκB a été observée (Figure 6D). Également, dans les cellules épithéliales intestinales en culture, les IEC-6, l'activation de NFκB en réponse au LPS est plus forte lorsque l'expression de SHP-2 est réduite (Figure 14B). Ces résultats suggèrent donc que SHP-2 contrôle l'activation de ce facteur de transcription dans les cellules épithéliales intestinales en présence d'une stimulation soit par les bactéries ou soit par des cytokines. Or, à l'âge de 2 semaines, aucune cytokine quantifiée dans notre essai et connue

pour activer ce sentier de signalisation n'a montré d'augmentation significative d'expression (Tableau 1). Ceci suggère donc que l'hyperactivation de NFκB présente dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> pourrait être le résultat d'une stimulation par les bactéries. En effet, la délétion épithéliale de *Myd88* dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> ramène au niveau contrôle le niveau d'activation de NFκB chez les souris âgées de 1 mois (Figure 12A). La protéine adaptatrice Myd88 participe à la signalisation de tous les récepteurs TLRs, à l'exception de TLR3, ainsi qu'à la signalisation du récepteur de l'IL-1 (Janssens et Beyaert, 2002). Afin de vérifier si SHP-2 régule l'ensemble des voies de signalisation dépendantes de Myd88, les cellules IEC-6 déficientes ou non pour l'expression de SHP-2 ont été traitées avec de l'IL-1β (Figure 13), de la flagelline activant TLR5 (Figure 14A) et du LPS activant TLR4 (Figure 14B). Nos résultats démontrent que seul le traitement au LPS entraîne l'hyperactivation de NFκB en absence de SHP-2. Ainsi, SHP-2 semble agir de façon ciblée dans la signalisation dépendante de Myd88, soit ici sur la signalisation TLR4. Également, dans les hépatocytes murins, une diminution d'expression de *Shp-2* entraîne l'hyperactivation de NFκB et une diminution d'activation de ERK1/2 en réponse au LPS (Bard-Chapeau *et al.*, 2011). Par contre, le mécanisme d'action de SHP-2 dans la signalisation TLR4/Myd88 reste encore à élucider. Néanmoins, nos analyses par spectrométrie de masse dans les cellules IEC-6 (Tableau 3) suggèrent que la protéine ITCH pourrait être un substrat de SHP-2 impliqué dans la voie NFκB. D'ailleurs, dans les fibroblastes, ITCH est connu pour être un régulateur négatif de cette voie de signalisation en réponse au TNFα, à l'IL-1 et au LPS (Shembade *et al.*, 2008). Plus précisément, ITCH forme un complexe protéique avec A20 (Shembade *et al.*, 2008), une enzyme qui déubiquitine TRAF6 sur K63 (Boone *et al.*, 2004). Ainsi, en régulant le niveau d'ubiquitination de TRAF6, A20 régule le niveau d'activation de la voie NFκB. De plus, dans les macrophages, SHP-2 interagit avec la protéine TRAF6. En fait, en absence de SHP-2 dans ces cellules, une hyperactivation de NFκB de même qu'une forte ubiquitination de TRAF6 sont présentes (Xu *et al.*, 2012). Il est donc possible que SHP-2 contrôle l'activité de la voie NFκB en contrôlant la phosphorylation sur tyrosine de la protéine ITCH et donc régule indirectement l'ubiquitination de TRAF6 nécessaire à l'activation de ce sentier de signalisation.

Nos résultats avec NFκB suggèrent ainsi que l'absence de *Shp-2* sensibilise les colonocytes à l'établissement du microbiote après la naissance. En effet, il est bien connu que l'épithélium intestinal développe plusieurs stratégies suivant les deux premières semaines de vie pour tolérer cette microflore qui s'installe. Plusieurs mécanismes inhibiteurs de la signalisation des TLRs ont été d'ailleurs identifiés. À titre d'exemple, mentionnons les protéines Tollip (Otte *et al.*, 2004; Zhang et Ghosh, 2002), PPARγ, A20 et SIGIRR (Shibolet et Podolsky, 2007) qui ultimement freinent l'activation de NFκB. Nos résultats suggèrent donc que SHP-2 pourrait aussi participer au développement de cette tolérance pour protéger l'épithélium contre une signalisation TLR aberrante ou trop forte qui conduirait à de l'inflammation.

### 2.1.2. Régulation de STAT3 par SHP-2

La voie Jak/STAT3 est activée par diverses cytokines incluant les membres de la famille de l'IL-6. Chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales ainsi que dans des modèles expérimentaux de colite, une augmentation d'IL-6 et de la phosphorylation de STAT3 est observée (Pickert *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2010). L'hyperphosphorylation de STAT3 est présente à la fois dans les cellules épithéliales intestinales et les cellules immunitaires (Mudter *et al.*, 2005). Ces études suggèrent donc que l'hyperactivation de STAT3 participe au développement de l'inflammation dans l'intestin. Paradoxalement, la délétion conditionnelle de *Stat3* dans les cellules épithéliales intestinales chez la souris révèle plutôt un rôle protecteur de ce facteur de transcription. En effet, ces souris développent beaucoup plus d'inflammation en réponse au DSS. Cette réponse exacerbée à cet agent chimique serait due à des défauts dans la réparation de blessures (Pickert *et al.*, 2009). De plus, STAT3 régule l'expression de plusieurs gènes associés à la survie cellulaire notamment *Bcl-X<sub>L</sub>*, *Survivin* et *Hsp70* (Bollrath *et al.*, 2009; Gritsko *et al.*, 2006; Yu et Jove, 2004). Toutefois, dans notre modèle murin, une hyperactivation de STAT3 a été observée au niveau des cellules épithéliales coliques et ce, très rapidement après la naissance (Figure 6E-G). Il serait pertinent de vérifier la contribution de cette hyperactivation dans l'apparition de la colite en traitant, par exemple, les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> avec un inhibiteur pharmacologique de STAT3

ou bien en effectuant des croisements de souris avec les souris *Stat3*<sup>flox/flox</sup>. Ainsi comme pour NFκB, on pourrait spéculer que tant l'absence de STAT3 que son hyperactivation sont néfastes pour l'épithélium intestinal. L'hyperphosphorylation de STAT3 chez nos souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> ne nous a pas surpris. En effet, plusieurs études ont démontré que SHP-2 régule l'activation des voies Jak/STAT (Lehmann *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2000). Par exemple, via sa liaison à la sous-unité gp130 du récepteur de l'IL-6, SHP-2 régule négativement la signalisation Jak/STAT3 (Lehmann *et al.*, 2003; Tebbutt *et al.*, 2002). D'ailleurs, la mutation du site de liaison de SHP-2/SOCS3 entraîne une hyperactivation de la signalisation Jak/STAT3, mais bloque également l'activation de la signalisation ERK1/2. Il est intéressant de noter que le traitement à l'IL-6 de cellules épithéliales intestinales sous-exprimant SHP-2 engendre une hyperphosphorylation de STAT3 (Figure 8). De plus, même en absence de traitement à l'IL-6, une hyperphosphorylation basale de STAT3 est observée dans les cellules IEC-6 shSHP-2 (Figure 8) et cette hyperphosphorylation est également présente dans les extraits totaux de côlon de souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> nouveau-nées (Figure 6E). À cet âge, l'activation de STAT3 n'est vraisemblablement pas attribuable à l'augmentation de sécrétion d'IL-6 puisque nous n'avons pas détecté de hausse d'expression d'IL-6 dans la muqueuse de nos souris mutantes avant 3 semaines (Tableau 1). Cette augmentation de sécrétion d'IL-6 présente à 3 semaines chez les souris expérimentales surgit ainsi après l'hyperactivation de la voie NFκB détectée 2 semaines après la naissance (Figure 6D). Ainsi, nos résultats suggèrent que SHP-2 pourrait réguler directement l'activation de STAT3, soit en déphosphorylant directement Jak2 (Ali *et al.*, 2003) ou STAT3 (Zhang *et al.*, 2009). Néanmoins, la forte augmentation d'IL-6 observée à l'âge de 3 semaines suggère que cette cytokine contribue par la suite à maintenir l'hyperactivation de STAT3 chez nos souris mutantes.

Les études *in vitro* démontrent que le traitement des cellules épithéliales intestinales IEC-6 au LPS induit aussi une augmentation d'expression du gène *Il-6* (Meyer *et al.*, 1994). Également, des études chez la souris montrent que la protéine adaptatrice Myd88 est nécessaire à l'induction d'IL-6 par la microflore (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Cette régulation d'expression d'IL-6 par la microflore via la voie NFκB pourrait donc expliquer la diminution de phosphorylation de STAT3 notée chez les souris SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> par rapport aux souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> (Figure 12B). Il est ainsi possible qu'en absence de *Shp-2*,

une hyperactivation de la voie NF $\kappa$ B par la microflore entraîne une plus grande production d'IL-6 et donc une plus grande activation de la voie Jak/STAT3. D'ailleurs, nos résultats préliminaires de PCR quantitatives vont en ce sens; dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, une induction d'*Il-6* est présente tandis que les souris SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> en expriment moins (résultats non montrés).

### 2.1.3. Régulation des kinases ERK1/2 par SHP-2

L'épithélium des souris déficientes pour *Shp-2* démontre, rapidement après la naissance, une baisse du niveau de phosphorylation des kinases ERK1/2 (Figure 6A-B). Ce résultat ne nous a pas surpris car SHP-2 est un régulateur positif connu de l'activation de la voie RAS/ERK MAPK en réponse aux facteurs de croissance et ce, dans plusieurs types cellulaires différents (Agazie et Hayman, 2003; Bennett *et al.*, 1994; Montagner *et al.*, 2005). SHP-2 régule l'activation de cette voie via plusieurs mécanismes d'action dont l'un en formant un complexe avec les protéines de Grb2 et Sos, un mécanisme indépendant de son activité enzymatique (Bennett *et al.*, 1994). SHP-2 peut également déphosphoryler Grb2 (Ahmed *et al.*, 2013). D'ailleurs, la phosphorylation sur la tyrosine 209 de Grb2 module son interaction avec Sos, ce qui régule l'activation de la voie ERK1/2 (Li *et al.*, 2001). Nos analyses de spectrométrie de masse suggèrent que Grb2 pourrait être un substrat potentiel de SHP-2 en réponse au LPS dans les cellules épithéliales intestinales (Tableau 3). Bien que la protéine Grb2 n'ait pas été associée à la signalisation des TLRs jusqu'à présent, il est possible qu'en réponse au LPS, SHP-2 contrôle l'activation des ERK1/2 via la déphosphorylation de Grb2. Cette hypothèse devra donc être vérifiée dans le futur.

La voie ERK1/2 est principalement activée par des facteurs de croissance tels que l'EGF et le PDGF mais également par des hormones, des cytokines et des produits bactériens. Cette voie de signalisation est surtout connue pour son implication dans la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Aliaga *et al.*, 1999; Rivard *et al.*, 1999) alors que son rôle dans l'inflammation intestinale est beaucoup moins connu. Néanmoins, la voie ERK1/2 peut participer à la production de cytokines et chimiokines. En effet, cette voie de signalisation induit la production de CCL20 en réponse à l'IL-21 dans les cellules épithéliales intestinales (Caruso *et al.*, 2007). Aussi, Yan et collaborateurs ont démontré

que la voie ERK1/2 est hyperactivée dans des extraits de côlon de souris *Il-10*<sup>-/-</sup> ayant une colite active telle que visualisée par une augmentation de la phosphorylation de Raf-1 ainsi que de ERK1/2 (Yan *et al.*, 2004). De plus, l'inhibition de Ras, via l'utilisation de Salirasib, diminue les signes de colite induite par le DSS (Oron *et al.*, 2012). Par contre, la petite protéine G Ras n'active pas seulement la voie ERK1/2 et de ce fait, l'effet du Salirasib ne peut pas être attribué spécifiquement à son effet activateur sur ces kinases. À l'inverse, des souris n'exprimant pas l'isoforme Raf-1 dans les cellules épithéliales intestinales sont plus susceptibles à une colite induite chimiquement et ce, dû à l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques. Dans ces souris, une diminution d'activation de ERK1/2 corrèle aussi avec une diminution de la prolifération pendant la phase de récupération suite cette colite (Edelblum *et al.*, 2008).

Chez nos souris expérimentales, nous avons effectivement observé une diminution importante de la phosphorylation de ERK1/2 précédant l'apparition de la colite (Figure 6B). Dans l'optique de vérifier quelle est la contribution de l'inhibition des ERK1/2 dans le développement de l'inflammation chez nos souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, un croisement a été effectué avec une souris transgénique exprimant la mutation activatrice V600E dans *B-Raf* (Dankort *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter que l'inflammation colique est fortement diminuée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>;B-Raf<sup>CEI-CA</sup> comparativement aux souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> (Figure 16). Deux groupes, ceux de Yamashita et de Heuberger, ont aussi récemment démontré que la baisse d'activation des ERK1/2 en absence de *Shp-2* contribue grandement au développement de la colite (Heuberger *et al.*, 2014; Yamashita *et al.*, 2014). En effet, le groupe de Yamashita et collaborateurs (Yamashita *et al.*, 2014) a exprimé une forme oncogénique de KRAS (*KRas*<sup>G12D</sup>) dans l'épithélium intestinal des souris déficientes pour *Shp-2* alors que le groupe de Heuberger (Heuberger *et al.*, 2014) a exprimé une forme constitutive active de MEK1 (*Mek1DD*). Dans les deux cas, la résultante était une inhibition importante de l'inflammation colique. Ces résultats confirment donc que la voie ERK1/2 joue un rôle critique dans le maintien de l'homéostasie dans le côlon.

Comme démontré précédemment, l'inflammation présente dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> dépend de la présence des bactéries (Figure 9) et en partie, de la signalisation Myd88 (Figure 10). Toutefois, même si la délétion épithéliale de *Myd88* atténue

l'inflammation, elle ne restaure pas le niveau d'activation des ERK1/2 (Figure 12D). Ces résultats suggèrent que contrairement à la phosphorylation de NFκB et STAT3, l'inhibition des ERK1/2 observée chez nos souris mutantes n'est pas attribuable à une signalisation dépendante de Myd88 dans les cellules épithéliales intestinales.

#### 2.1.4. Régulation de la $\beta$ -caténine par SHP-2

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine joue un rôle essentiel dans la prolifération des cellules épithéliales intestinales ainsi que la détermination et la différenciation des cellules de Paneth (Scoville *et al.*, 2008). Lorsque la maladie de Crohn touche l'intestin grêle, plusieurs défauts au niveau des cellules de Paneth ont été répertoriés dont une diminution d'expression des  $\alpha$ -défensines *HD5* et *HD6* (Wehkamp *et al.*, 2007). Cette diminution d'expression de peptides antimicrobiens corrèle avec une diminution d'expression de protéines clés de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine soit le corécepteur LRP6 et le facteur de transcription TCF4 (Koslowski *et al.*, 2012; Wehkamp *et al.*, 2007). À l'inverse, dans des biopsies de côlon de patients ayant une colite ulcéreuse, une augmentation d'expression de plusieurs Wnts est présente dont une induction de presque 50 fois du facteur Wnt3a activant la voie canonique (Wnt/ $\beta$ -caténine). Une augmentation d'expression des récepteurs Frizzled 3 et 4 ainsi qu'une diminution d'expression de Frizzled 1 et 5 sont également détectées (You *et al.*, 2008). Shenoy et collaborateurs ont aussi remarqué la présence accrue de  $\beta$ -caténine nucléaire dans les cryptes coliques provenant de patients atteints de maladies inflammatoires intestinales par rapport aux patients sains (Shenoy *et al.*, 2012). Ces résultats montrent que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine peut être activée dans le côlon lors d'inflammation intestinale. Chez nos souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines, une augmentation d'expression de la  $\beta$ -caténine (Figure 7B) ainsi que de ses gènes cibles (*Axin2*, *Ccnd1*, *Lyz1* et *Mmp7*) (Figure 7D et 19B) est observée dans des extraits de muqueuse colique. Notons qu'à la naissance, l'expression de la  $\beta$ -caténine n'est pas significativement modulée (Figure 7A) de même que l'expression des gènes cibles *Axin2* et *Ccnd1* (Figure 7C). Cette observation suggère donc que la microflore pourrait participer au mécanisme de régulation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par la phosphatase SHP-2. En effet, la délétion de la protéine *Myd88* dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> entraîne une diminution

d'expression de la  $\beta$ -caténine par rapport aux souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> (Figure 12C). De plus, une diminution d'expression de l'*Axin2*, un gène cible de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, est aussi détectée dans le côlon de souris axéniques par rapport à des souris hébergées dans une animalerie conventionnelle (Neumann *et al.*, 2014). Dans les cellules épithéliales intestinales et les macrophages, le traitement au LPS induit également une augmentation d'expression de la  $\beta$ -caténine via la voie de signalisation PI3K/AKT (Gong *et al.*, 2012; Santaolalla *et al.*, 2013). Bien que dans certains types cellulaires SHP-2 ait été montré comme régulant la voie PI3K/AKT (Kwon *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2002), nos résultats montrent peu de modulation dans l'activation de la kinase AKT chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> (résultats non montrés). Il est donc peu probable que l'augmentation d'expression de la  $\beta$ -caténine observée dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> provienne d'un effet de cette phosphatase sur la voie PI3K/AKT. Toutefois, nos analyses de spectrométrie de masse montrent que la  $\beta$ -caténine est hyperphosphorylée sur tyrosine dans les cellules IEC-6 sous-exprimant SHP-2 et stimulées au LPS (Tableau 3). Ceci est d'ailleurs en accord avec l'étude de Grinnell et collaborateurs qui a montré que l'activation du TLR4 dans des cellules endothéliales de poumon augmente la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine (Grinnell *et al.*, 2012). Plusieurs sites de phosphorylation sur la  $\beta$ -caténine ont déjà été identifiés (tyrosines 86, 142 et 654) (Piedra *et al.*, 2001; Roura *et al.*, 1999). Entre autres, la phosphorylation de la tyrosine 654 régule l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine en diminuant son interaction avec la E-cadhérine tout en augmentant son interaction avec TBP (Piedra *et al.*, 2001). D'ailleurs, notre équipe a déjà rapporté que la tyrosine phosphatase SHP-1 déphosphoryle les tyrosines 86 et 654 de la  $\beta$ -caténine. Nos résultats antérieurs démontrent aussi que la phosphorylation de ces tyrosines augmente l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine (Simoneau *et al.*, 2011).

## **2.2. SHP-2 contrôle la détermination des cellules de l'épithélium intestinal**

L'épithélium intestinal joue un rôle de barrière entre le contenu de la lumière intestinale et les tissus sous-jacents. Le rôle de barrière chimique est assuré par principalement deux types cellulaires différenciés: les cellules à gobelet qui sécrètent du



mucus (McGuckin *et al.*, 2009) et les cellules de Paneth qui sécrètent une multitude de peptides antimicrobiens (Gallo et Hooper, 2012).

Les cellules à mucus sécrètent donc des mucines formant une couche protectrice pour les cellules épithéliales intestinales contre l'érosion produite par le passage des selles ainsi que contre les bactéries commensales et pathogènes (Magalhaes *et al.*, 2007; McGuckin *et al.*, 2009). Plusieurs défauts au niveau des cellules à gobelet ont été détectés chez les patients atteints d'une maladie inflammatoire intestinale. Par exemple, dans la colite ulcéreuse, une diminution du nombre de cellules à gobelet, de l'expression de MUC2 ainsi que de la couche protectrice de mucus est observée (Einerhand *et al.*, 2002; Sheng *et al.*, 2012). Des défauts similaires à ceux-ci ont été observés chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>. À la naissance, un marquage des mucines similaire entre les souris témoins et expérimentales a été visualisé (Figure 17A-B). Par contre, dès 2 semaines, une forte diminution du marquage des mucines acides et neutres a été observée (Figure 17A-B). En fait, une diminution de près de 50% du nombre de cellules à mucus a été notée (Figure 18A) et ce, avant l'apparition de la colite. Cette réduction du marquage des mucines corrèle aussi avec la diminution des marqueurs de cellules à mucus *Muc2* et *Tff3* (Figure 18C). Il est intéressant de noter que les souris invalidées pour le gène *Muc2* développent spontanément de l'inflammation colique (Van der Sluis *et al.*, 2006) tandis que les souris *Tff3*<sup>-/-</sup> ne développent pas de façon spontanée de l'inflammation intestinale mais sont plus susceptibles à une colite induite chimiquement (Mashimo *et al.*, 1996). Ainsi, la diminution d'expression de *Muc2* et *Tff3* contribue certainement à l'apparition de l'inflammation chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>. En fait, une réduction de la couche de mucus est dangereuse pour l'épithélium puisque cela permet aux bactéries présentes dans la lumière intestinale d'entrer en contact avec les cellules épithéliales intestinales de façon plus directe et d'induire une réponse pro-inflammatoire localement (Chen *et al.*, 2014; Johansson, 2014). En accord avec cela, le traitement aux antibiotiques des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> atténue grandement la sévérité de la colite (Figure 9).

La phosphatase SHP-2 régule la différenciation de plusieurs types cellulaires incluant les chondrocytes (Bowen *et al.*, 2014), les adipocytes (He *et al.*, 2013), les neurones (Hadari *et al.*, 1998) et les myoblastes (Kontaridis *et al.*, 2004). Nos résultats

montrent cependant que même si le nombre de cellules à mucus est diminué, leur maturation ne semble pas affectée chez les souris mutantes. En effet, tant dans les souris témoins que dans les souris expérimentales, les cellules à mucus présentent de grosses vacuoles remplies de mucus et sont bien polarisées (Figure 18D).

Afin de mieux comprendre les événements initiateurs de l'inflammation intestinale chez nos souris expérimentales, une puce à ADN a été effectuée sur des extraits de côlons de souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> nouveau-nées. Étonnamment, une hausse d'expression de plusieurs peptides antimicrobiens a été détectée chez les souris expérimentales (Tableau 4 et Annxe 2). À la naissance et de façon plus soutenue à 2 semaines, l'augmentation significative des transcrits de *Defa*, de *Reg3β* et de *Lyz1* a été confirmée (Figure 19A-B). L'augmentation d'expression de *Defa* ( $\alpha$ -défensines) et de *Lyz1* (lysozyme 1) est particulièrement surprenante puisque ces peptides antimicrobiens sont produits exclusivement par les cellules de Paneth localisées dans l'intestin grêle (Bevins et Salzman, 2011). Par une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, les cellules de Paneth présentent une forme pyramidale, contiennent des granules éosinophiles et se situent au fond des cryptes de l'intestin grêle (Figure 21A). D'ailleurs, des cellules contenant des granules éosinophiles et se situant dans le bas de crypte colique ont été remarquées chez les souris expérimentales dès l'âge de 2 semaines (Figure 21B). Ces cellules expriment le peptide antimicrobien lysozyme (Figure 22). Ces observations suggèrent que la perte d'expression de *Shp-2* dans le côlon des souris entraîne l'apparition de cellules exprimant le lysozyme et ce, de façon concomitante à la diminution du nombre de cellules à mucus. Nos analyses par comarquage ont montré que les cellules exprimant le lysozyme coexpriment les mucines (Figure 23C). Un tel comarquage a été antérieurement rapporté par différents groupes et a été associé à des cellules intermédiaires, des cellules présentant le double phénotype gobelet/Paneth (Calvert *et al.*, 1988; Kamal *et al.*, 2001; Troughton et Trier, 1969). Ces cellules rares seraient un progéniteur commun des cellules à gobelet et Paneth dans l'intestin grêle. Par microscopie électronique, ces cellules intermédiaires sont aussi facilement repérées par leurs granules de sécrétion d'apparence intermédiaire entre ceux des cellules de Paneth et à gobelet comme observé dans le côlon de nos souris expérimentales (Figure 23A).

Lors de la colite ulcéreuse, une augmentation d'expression de plusieurs peptides antimicrobiens (*HD-5*, *HD-6*, *sPLA2* et *LYZI*) est souvent détectée dans le côlon des patients (Shi, 2007). De plus, la présence de cellules de Paneth métaplasiques a également été rapportée dans les zones enflammées (Paterson et Watson, 1961). Il est possible que ces cellules observées chez les patients ayant une maladie inflammatoire intestinale soient en fait des cellules intermédiaires, des cellules dont le phénotype se situe entre celui des cellules de Paneth et celui des cellules à gobelet. La présence des cellules de Paneth métaplasiques dans le côlon est généralement vue comme un mécanisme de protection de l'épithélium contre l'inflammation chronique. Or, il est également possible que ces cellules participent à l'apparition de l'inflammation intestinale soit en entraînant une diminution du nombre de cellules à mucus (Johansson, 2014; Van der Sluis *et al.*, 2006) ou soit en modulant la composition de la microflore via la sécrétion de peptides antimicrobiens (Lupp *et al.*, 2007; Salzman *et al.*, 2010).

L'absence de *Shp-2* dans l'épithélium colique semble altérer la détermination en cellules à gobelet au profit d'une population de cellules intermédiaires exprimant des marqueurs de cellules de Paneth. Au niveau du grêle, nous n'avons pas observé de hausse de cellules intermédiaires. Par contre, une augmentation d'expression de plusieurs peptides antimicrobiens (*Defa*, *Lyz1*, *Reg3 $\beta$*  et *Reg3 $\gamma$* ) a été observée dans l'intestin grêle de nos souris expérimentales (Figure 20A-B) (Wilson *et al.*, 1999). Ces résultats sont en accord avec ceux de Heuberger et collaborateurs qui ont récemment démontré que la délétion épithéliale de *Shp-2* dans l'intestin grêle diminue le nombre de cellules à gobelet au profit d'une augmentation des cellules de Paneth (Heuberger *et al.*, 2014). L'ensemble de ces résultats suggère qu'en absence de *Shp-2*, la détermination gobelet/Paneth est altérée. Ce défaut dans la détermination cellulaire serait attribuable à l'absence de la signalisation SHP-2/ERK MAP Kinases. En effet, l'expression d'une forme constitutive active de KRAS (Yamashita *et al.*, 2014), de B-Raf (Figure 28A) ou de MEK1 (Heuberger *et al.*, 2014) dans les cellules épithéliales intestinales entraîne une augmentation du nombre de cellules à mucus. Ainsi, l'activation de la voie ERK1/2 promeut la génération de cellules à gobelet tant dans l'intestin grêle que dans le côlon. D'ailleurs, dans l'intestin grêle, les cellules à gobelet présentent une forte activation de la voie ERK1/2 (Heuberger *et al.*, 2014) et à

l'inverse, les cellules de Paneth présentent une activation faible, voire absente, de ce sentier de signalisation (Feng *et al.*, 2011).

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine joue également un rôle crucial dans la détermination et la différenciation des cellules de Paneth. En effet, la perte d'expression d'*Apc* entraîne une augmentation du nombre de cellules de Paneth dans l'intestin grêle de même que l'apparition de cellules de Paneth *de novo* dans le côlon des souris (Andreu *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2013). L'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine engendre aussi une diminution du marquage à l'Alcian bleu (Feng *et al.*, 2013) ainsi qu'une réduction d'expression de marqueurs de cellules à gobelet (Andreu *et al.*, 2008). De plus, dans l'intestin grêle et le côlon des souris présentant une perte d'expression d'*Apc*, certaines cellules marquant pour l'Alcian bleu marquent aussi pour le lysozyme (Feng *et al.*, 2013). Cela suggère que l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine favorise la détermination en cellules de Paneth. Ainsi, l'augmentation d'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine observée dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> (Figure 7B et D) pourrait favoriser la génération de cellules intermédiaires exprimant des marqueurs de cellules de Paneth au détriment de la production de cellules à mucus. Plusieurs marqueurs de cellules de Paneth sont des gènes cibles de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine comme les *Defa*, *Mmp7*, *Lyz1* et *EphB3* (Andreu *et al.*, 2008). Tant dans l'intestin grêle que dans le côlon, une augmentation de *Defa*, *Mmp7* et *Lyz1* a été quantifiée dans nos souris expérimentales comparativement aux souris témoins (Figure 19 et 20). De plus, par une analyse bio-informatique, Heuberger et collaborateurs ont identifié plusieurs gènes cibles de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine comme ayant une expression plus élevée dans leurs extraits d'intestin grêle de souris mutantes pour *Shp-2* par rapport à leurs souris témoins (Heuberger *et al.*, 2014).

Lors de la colite ulcéreuse, plusieurs évidences suggèrent que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est hyperactivée (Shenoy *et al.*, 2012; You *et al.*, 2008). Ceci suggère donc qu'elle pourrait contribuer à l'apparition de cellules de Paneth métaplasiques dans le côlon des patients (Paterson et Watson, 1961) de même qu'à l'augmentation d'expression de nombreux peptides antimicrobiens (*HD-5*, *HD-6*, *sPLA2* et *LYZI*) (Shi, 2007). À l'inverse, dans la maladie de Crohn, une diminution d'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine entraîne une diminution d'expression des  $\alpha$ -défensines *HD5* et *HD6* (Koslowski *et al.*, 2012;

Wehkamp *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent qu'une fine régulation de l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est nécessaire pour le maintien de l'homéostasie de l'intestin et qu'une dérégulation, tant à la hausse qu'à la baisse de cette voie de signalisation, altère la détermination cellulaire et donc l'homéostasie intestinale.

Le récepteur EphB3 est responsable de la bonne localisation des cellules de Paneth (Batlle *et al.*, 2002). Dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, les cellules exprimant le lysozyme sont bien localisées au fond des cryptes (Figure 22). D'ailleurs, par immunofluorescence, nos résultats montrent l'expression d'EphB3 au fond des cryptes coliques tant dans les souris témoins que les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> (résultats non montrés). Ces résultats sont différents de ceux obtenus avec les souris n'exprimant pas *Apc* dans l'épithélium intestinal; en effet, ces souris ont des cellules positives pour le lysozyme dans leur côlon mais elles sont mal localisées (Andreu *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2013). D'ailleurs, Andreu et collaborateurs ont montré une forte augmentation d'expression d'*EphB3* chez ces souris (Andreu *et al.*, 2008).

Contrairement à l'intestin grêle, les mécanismes moléculaires régulant la détermination cellulaire ont été très peu étudiés dans le côlon. Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de divers facteurs de transcription dans la détermination cellulaire au niveau de l'intestin grêle. Mentionnons *Math1* (Yang *et al.*, 2001) et *Hes1* (Jensen *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2005) qui sont respectivement nécessaires à la détermination de la lignée sécrétrice et de la lignée absorbante. Une augmentation d'expression de *Hes1* a été associée à une diminution d'expression de *Hath1* (homologue humain de *Math1*) ainsi qu'à une perte de cellules à mucus sur un petit échantillonnage de patients atteints de colite ulcéreuse (Zheng *et al.*, 2011). Or, nous n'avons observé aucune modulation significative dans l'expression de ces facteurs de transcription chez nos souris mutantes (Figure 25). D'autres facteurs de transcription régulant la détermination et la différenciation des cellules de Paneth et des cellules à mucus ont été évalués par PCR quantitatives. Encore une fois, aucune différence n'a été détectée dans l'expression de *Gfi1*, impliqué dans la détermination des cellules de la lignée sécrétrice (Shroyer *et al.*, 2005), de *Klf4*, impliqué dans la différenciation des cellules à mucus (Ghaleb *et al.*, 2011; Katz *et al.*, 2002), de *Spdef*, impliqué dans la différenciation terminale des cellules de Paneth et des cellules à mucus

(Gregorieff *et al.*, 2009; Noah *et al.*, 2010) ainsi que de *Sox9*, impliqué dans la différenciation des cellules de Paneth (Mori-Akiyama *et al.*, 2007). Par contre, le groupe d'Heuberger a rapporté la diminution d'expression de *Spdef* ainsi qu'une augmentation de *Sox9* chez les souris déficientes pour l'expression épithéliale de *Shp-2* et ce, dans l'intestin grêle (Heuberger *et al.*, 2014). Une telle différence peut suggérer que SHP-2 contrôle la détermination cellulaire par un autre mécanisme d'action dans le côlon par rapport à l'intestin grêle.

Des études antérieures ont montré que la microflore pouvait contrôler l'expression de certains peptides antimicrobiens. Par exemple, une réduction de *Reg3 $\beta$*  et *Reg3 $\gamma$*  est présente chez les souris axéniques comparativement aux souris provenant d'une animalerie conventionnelle (Vaishnava *et al.*, 2008). Également, l'expression d'un dominant négatif de *Myd88* dans les cellules épithéliales intestinales entraîne une réduction d'expression des peptides antimicrobiens *Defa* et de *Reg3 $\gamma$*  dans l'intestin grêle (Gong *et al.*, 2010). De plus, dans le côlon, la délétion d'expression de *Myd88* dans les cellules épithéliales intestinales engendre une réduction d'expression de *Reg3 $\gamma$*  (Frantz *et al.*, 2012; Vaishnava *et al.*, 2011). Sodhi et collaborateurs ont aussi démontré que la délétion du récepteur *Tlr4* dans les cellules épithéliales intestinales engendre une augmentation importante du nombre de cellules à mucus dans l'intestin grêle due à l'inhibition de la voie Notch (Sodhi *et al.*, 2012). De plus, la délétion épithéliale de *Myd88* chez nos souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> préserve partiellement le nombre de cellules à mucus (Figure 26B) et de cellules positives pour le lysozyme (Figure 26C) et entraîne également une diminution d'expression des peptides antimicrobiens (Figure 27). Nos résultats suggèrent donc que la signalisation épithéliale dépendante de *Myd88* participe à l'altération de la détermination cellulaire observée chez nos souris mutantes. D'ailleurs, chez les souris SHP-2;*Myd88*<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines, le niveau d'expression de la  $\beta$ -caténine est ramené à un niveau comparable aux souris témoins (Figure 12C) mais pas le niveau de phosphorylation des kinases ERK1/2 (Figure 12D). Ceci suggère que l'altération de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine contribue grandement à la dérégulation de la détermination cellulaire chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>. Ces résultats sont quelque peu en contradiction avec ceux de Heuberger qui ont montré que l'hyperactivation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine observée dans l'intestin grêle de leurs souris déficientes pour *Shp-2* était attribuable à l'inactivation des ERK1/2. En fait, il existe deux isoformes de

TCF4, soit une isoforme de 70KDa ayant la capacité d'induire la transcription des gènes cibles de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et une isoforme de 50KDa incapable de l'induire. En absence d'activation de la voie ERK1/2, une diminution de l'isoforme de 50KDa est observée tandis qu'aucune modulation de l'isoforme de 70KDa est présente. Ainsi, une inactivation de la voie ERK1/2 entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF4 via une régulation du niveau d'expression de l'isoforme de 50KDa de TCF4 (Heuberger *et al.*, 2014).

La forte expression des peptides antimicrobiens dans le côlon de nos souris mutantes n'est certainement pas sans conséquence. En effet, plusieurs études suggèrent que les peptides antimicrobiens modulent la composition de la microflore intestinale (Salzman *et al.*, 2010). En effet, l'inactivation de l'enzyme *Mmp7* chez la souris empêche la maturation des  $\alpha$ -défensines, ce qui résulte en une diminution des *Bacteroidetes* et une augmentation des *Firmicutes*. À l'opposé, la microflore d'une souris surexprimant *HD5* (forme humaine de  $\alpha$ -défensine) est composée de plus de *Bacteroidetes* et de moins de *Firmicutes* (Salzman *et al.*, 2010). Dans ces deux modèles de souris, le nombre total de bactéries n'est pas modifié, ce qui indique que les  $\alpha$ -défensines régulent seulement la composition de la microflore dans l'intestin grêle. Nous avons donc analysé la composition de la microflore en amplifiant par PCR l'ADN ribosomique de la sous-unité 16S des bactéries et en les migrant sur un gel en gradient dénaturant. À la naissance, la microflore des souris témoins et SHP-2<sup>CEI-KO</sup> est similaire (Figure 29A). Cela n'est pas étonnant étant donné que les souriceaux nés par voie vaginale sont tout d'abord colonisés par des bactéries provenant de la muqueuse vaginale de leur mère (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Or, dans nos croisements, les souris témoins et expérimentales proviennent de la même mère. Par la suite, un changement marquant dans la composition de la flore des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> par rapport aux souris témoins a été noté (Figure 29B-C). Plus précisément, une diminution de certains groupes des *Firmicutes* ainsi qu'une augmentation des *Enterobacteriaceae* ont été observées (Tableau 5). Ces altérations dans la composition de la microflore sont associées aux fortes modulations d'expression de certains peptides antimicrobiens dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 2 semaines, telles que la hausse de 5865 fois de l'expression de *Defa* ainsi que l'augmentation de 32 fois de l'expression de *Mmp7* (Figure 19B). Il est ainsi fort probable que les changements dans la composition de la microflore observée chez les

souris expérimentales soient directement attribuables à la présence des peptides antimicrobiens (Figure 29B et Tableau 5). De plus, chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales, des changements dans la composition de la microflore sont également observés. Entre autres, une diminution des *Firmicutes*, dont plus particulièrement les sous-groupes des *Clostridium leptum* et des *Clostridium coccoïdes* (Kostic *et al.*, 2014) ainsi qu'une augmentation des *Enterobacteriaceae* sont présentes (Baumgart *et al.*, 2007; Lupp *et al.*, 2007). Nous avons d'ailleurs observé des changements dans la composition de la microflore des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> similaires à ceux-ci avant l'apparition de la colite (Tableau 5). Jusqu'à présent, ce n'est pas clair si un changement dans la composition de la flore est suffisant pour engendrer de l'inflammation intestinale. Néanmoins, le transfert d'une flore anormale provenant d'une souris *Nod2*<sup>-/-</sup> vers une souris de type sauvage rend cette dernière beaucoup plus sensible à une colite chimique (Couturier-Maillard *et al.*, 2013). Aussi, le transfert de flore d'une personne saine vers une personne atteinte de colite ulcéreuse, dans certains cas, diminue les signes d'inflammation (Bennet et Brinkman, 1989; Borody *et al.*, 2003). Il serait intéressant d'analyser l'impact d'un transfert de flore provenant de souris de type sauvage vers des souris expérimentales pour voir si cela diminue les signes d'inflammation intestinale chez celles-ci.

### **2.3. SHP-2 contrôle la perméabilité paracellulaire**

Les cellules épithéliales intestinales sont reliées entre elles par des jonctions serrées composées de claudines, d'occludine, de JAM et de ZO-1 (Hartsock et Nelson, 2008). Leur rôle est d'assurer l'étanchéité entre les cellules en permettant seulement une perméabilité sélective et donc, d'empêcher le passage des bactéries tant commensales que pathogènes (Ivanov *et al.*, 2010). Sous les jonctions serrées se retrouvent les jonctions adhérentes composées de la E-cadhérine, de l' $\alpha$ -caténine et de la  $\beta$ -caténine qui contrôlent l'adhésion cellule-cellule. Or, les jonctions adhérentes peuvent aussi affecter la formation des jonctions serrées et indirectement la perméabilité paracellulaire (Hartsock et Nelson, 2008).

Une augmentation de la perméabilité paracellulaire est observée chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales (Mankertz et Schulzke, 2007). Les souris



SHP-2<sup>CEI-KO</sup> présentent une hausse importante de la perméabilité intestinale au FITC-dextran par rapport aux souris témoins (Figure 30A). Parallèlement, l'inhibition d'expression de SHP-2 dans le modèle cellulaire Caco-2/15 diminue significativement la résistance transépithéliale (Figure 31B), ce qui suggère que SHP-2 contrôle directement la perméabilité paracellulaire des cellules épithéliales intestinales. Chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales, des altérations dans la localisation des protéines de jonctions sont associées à l'hyperperméabilité intestinale (Utech *et al.*, 2010). Toutefois, nous n'avons pas observé de changement dans la localisation des protéines de jonctions chez les souris expérimentales (Figure 30C). Néanmoins, une diminution du marquage de la claudine-1 et de la claudine-4 a été notée. D'ailleurs, une diminution d'expression protéique de claudine-1, -4, -8 et -15 a été observée dans le côlon des souris expérimentales par rapport aux souris témoins (Figure 30B) tandis que leurs expressions en ARNm ne sont pas modulées (résultats non montrés). Un changement du niveau d'expression des protéines formant les jonctions est également souvent observé chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales. Plus précisément, une augmentation d'expression de la claudine-2 et une diminution d'expression des claudines -3, -4, -5 et -8 ont été rapportées (Prasad *et al.*, 2005).

Nos résultats en culture cellulaire (Figure 8, sans traitement) et chez la souris (Figure 6B) démontrent que SHP-2 contrôle l'activation de la voie ERK1/2. La réduction d'activation de cette voie de signalisation dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> participe grandement au phénotype inflammatoire (Figure 16). L'effet d'une inhibition de ERK1/2 sur la perméabilité a alors été mesuré dans les cellules Caco-2/15 suite à un traitement avec l'inhibiteur pharmacologique de MEK1/2 (U0126). L'inhibition de la voie ERK1/2 entraîne cependant, non pas une baisse, mais une augmentation dépendante de la dose de la résistance transépithéliale (Figure 31D). Ainsi, la baisse d'activité des kinases ERK1/2 n'est pas responsable de l'augmentation de la perméabilité paracellulaire observée dans les cellules en culture sous-exprimant SHP-2. Des études sont en cours pour vérifier la perméabilité chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>;B-Raf<sup>CEI-CA</sup> comparativement aux souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.

Plusieurs évidences soulignent le rôle de la phosphorylation sur tyrosine dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire. Tout d'abord, le traitement des cellules de rein MDCK avec le pervanadate, un inhibiteur à large spectre des protéines tyrosines phosphatases, induit une augmentation de la phosphorylation de protéines se localisant aux jonctions intercellulaires, une augmentation de la perméabilité paracellulaire ainsi qu'une relocalisation de la E-cadhérine et de ZO-1 (Collares-Buzato *et al.*, 1998; Staddon *et al.*, 1995). Les études *in vitro* démontrent plus en détail que la phosphorylation sur tyrosine de l'occludine (Sallee et Burridge, 2009), de ZO-1 (Sallee et Burridge, 2009) et de claudine-4 (Tanaka *et al.*, 2005) module la perméabilité paracellulaire. Finalement, les souris invalidées pour la protéine tyrosine phosphatase PTP $\sigma$  présentent une augmentation de la perméabilité paracellulaire associée à une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine des protéines de jonction adhérentes notamment la E-cadhérine et la  $\beta$ -caténine (Muise *et al.*, 2007; Murchie *et al.*, 2014). Il est ainsi possible que SHP-2 contrôle la perméabilité paracellulaire en déphosphorylant une ou plusieurs protéine(s) jonctionnelle(s). En effet, dans les cellules endothéliales, SHP-2 contrôle la perméabilité des jonctions en régulant la phosphorylation de la VE-cadhérine et de la  $\beta$ -caténine (Grinnell *et al.*, 2012; Hatanaka *et al.*, 2012). Par spectrométrie de masse, il serait possible d'évaluer le niveau de phosphorylation sur tyrosine des protéines de jonction en présence ou non de SHP-2.

Le complexe apical de jonction (jonctions serrées et jonctions adhérentes) est relié au cytosquelette, soit à un anneau d'actomyosine (actine et myosine de type II). La contraction de cet anneau entraîne une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Madara *et al.*, 1987). Les voies RhoA/ROCK et MLCK contrôlent notamment la contraction de l'anneau d'actomyosine (Ivanov *et al.*, 2010). Certains travaux ont démontré que SHP-2 pouvait réguler l'activité de la petite protéine G RhoA (Kontaridis *et al.*, 2004; Schoenwaelder *et al.*, 2000). D'ailleurs, nos résultats démontrent que SHP-2 contrôle l'activité de RhoA lors de la migration des cellules épithéliales intestinales en culture (Figure 35B). D'autres analyses sont nécessaires pour vérifier si la perte d'expression de SHP-2, par exemple dans les Caco-2/15 polarisées, module l'activité de RhoA. Il serait également intéressant de tester l'impact de l'inhibition de ROCK (Y-27632) sur la résistance transépithéliale des cellules déficientes ou non pour l'expression de SHP-2.

#### **2.4. SHP-2 contrôle la restitution épithéliale intestinale**

Les cellules épithéliales intestinales forment une barrière entre le milieu interne de l'hôte et le contenu de la lumière intestinale. Un dysfonctionnement de la barrière intestinale permet aux bactéries commensales de pénétrer la muqueuse, augmentant ainsi le risque de déclencher une réponse inflammatoire dans la lamina propria (Turner, 2009). Or, l'apparition de brèches dans l'épithélium peut être attribuable à une augmentation de la mort des cellules épithéliales intestinales (Schulzke *et al.*, 2009). D'ailleurs, dans les maladies inflammatoires intestinales, une augmentation de la mort de cellules épithéliales intestinales est observée (Schulzke *et al.*, 2009). Chez la souris, une hausse de la mort cellulaire est suffisante pour induire l'apparition d'inflammation intestinale (Nenci *et al.*, 2007; Gunther *et al.*, 2011; Welz *et al.*, 2011). La phosphatase SHP-2 contrôle la survie de plusieurs types cellulaires dont les cardiomyocytes (Wang *et al.*, 2012), les fibroblastes et les myoblastes (Ivins Zito *et al.*, 2004). Plus précisément, l'inhibition pharmacologique de SHP-2 avec le NSC-87877 entraîne une augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans les cardiomyocytes. Cette augmentation de la mort cellulaire est attribuable à une diminution de l'activation de la voie ERK1/2 (Wang *et al.*, 2012). Chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, une diminution de l'activation du sentier de signalisation ERK1/2 est aussi observée (Figure 6A-B). Toutefois, aucune différence dans le nombre de cellules apoptotiques n'a été décelée entre les souris témoins et expérimentales âgées de 2 semaines (résultats non montrés). De plus, plusieurs études rapportent l'implication de la cytokine TNF $\alpha$  dans différents processus de mort cellulaire dont l'apoptose et la nécroptose (Leppkes *et al.*, 2014). Toutefois, une diminution significative, et non pas une augmentation, de l'expression du TNF $\alpha$  est observée chez les souris mutantes comparativement aux souris témoins (Tableau 1); cela pourrait expliquer qu'il n'y ait aucune modulation dans le nombre de cellules apoptotiques chez ces souris. Néanmoins, bien que SHP-2 n'a pas été rapporté jusqu'à présent pour contrôler la nécrose et la nécroptose, nous ne pouvons pas exclure l'implication de ces processus cellulaires dans l'apparition de l'inflammation intestinale chez nos souris mutantes.

L'épithélium intestinal subit régulièrement des blessures qui doivent se réparer afin de maintenir l'intégrité de la barrière (Turner, 2009). Lors de maladies inflammatoires

intestinales, des défauts dans la réparation de blessure sont observés (Dignass, 2001). Plusieurs études ont démontré que SHP-2 contrôle la migration de différents types cellulaires (Hartman *et al.*, 2013; Inagaki *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1998). Nos résultats montrent d'ailleurs que cette phosphatase est nécessaire également à la migration des cellules épithéliales intestinales (Figure 32A-D), un mécanisme impliquant son activité enzymatique (Figure 32E-H). D'ailleurs, le groupe de Yamashita a démontré que SHP-2 contrôle la migration des cellules épithéliales de l'intestin grêle chez la souris (Yamashita *et al.*, 2014). Ainsi, des défauts dans la migration cellulaire pourraient participer au phénotype inflammatoire observé dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>.

La migration cellulaire se fait en quatre grandes étapes: l'extension, l'adhésion, la contraction et la rétraction. Plus précisément, il y a formation à l'avant de la cellule de structures migratoires comme les lamellipodes et de filopodes, soit des extensions membranaires faites de filaments d'actine, par l'action des petites protéines G Rac et Cdc42 (Parsons *et al.*, 2010). Les microtubules participent aussi à la formation de ces structures (Etienne-Manneville, 2013). Ensuite, de nouveaux points d'adhésion se créent à l'avant de la cellule, ce qui permet l'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire. Par la suite, il y a contraction des fibres de stress, via la myosine II, entraînant le désassemblage des points d'adhésion à l'arrière de la cellule. Celle-ci peut alors avancer (Parsons *et al.*, 2010). Étant donné que les filaments d'actine, les microtubules et les points d'adhésion participent tous à la migration cellulaire, nous avons voulu vérifier la localisation de SHP-2 par rapport à ces derniers. Par immunofluorescence, nous avons observé une forte colocalisation de SHP-2 avec l'actine lors de la migration cellulaire (Figure 33B); par contre, aucune colocalisation n'a été notée avec les points d'adhésion (Figure 33A) et les microtubules (Figure 33C). Dans les cellules de cancer du sein, une relocalisation de SHP-2 au front de migration a également été visualisée, ce qui régulerait la formation de structures migratoires comme les lamellipodes (Hartman *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent que la localisation de SHP-2 lors de la migration cellulaire est importante et que SHP-2 pourrait réguler ce processus en agissant directement sur le cytosquelette d'actine.

SHP-2 contrôle la migration cellulaire en agissant probablement sur plusieurs voies de signalisation intracellulaire. D'ailleurs, l'expression d'une forme constitutive active de

SHP-2 (SHP-2<sup>E61G</sup> ou SHP-2<sup>E76K</sup>) entraîne une augmentation de l'adhésion, de l'étalement et de la migration cellulaire dans des cellules B et des fibroblastes murins. Plus spécifiquement, l'expression de la forme mutante active de SHP-2 entraîne une augmentation de l'activation des voies ERK1/2 et PI3K/AKT ainsi que de l'activité des petites protéines G RhoA, Rac1 et Cdc42 (Wang *et al.*, 2009).

L'activation de la signalisation ERK/MAP kinase semble être un mécanisme crucial par lequel les cellules épithéliales intestinales migrent. En effet, les signalisations induites par l'EGF (Ray *et al.*, 2007) et ainsi que les intégrines (Sanders et Basson, 2004) promeuvent la migration des cellules épithéliales intestinales via l'activation des kinases ERK1/2. De plus, suite à la blessure d'une monocouche épithéliale intestinale, les ERK1/2 sont rapidement activées particulièrement au front de migration (Dieckgraefe *et al.*, 1997). Nos résultats dans les cellules en culture IEC-6 et les Caco-2/15 montrent aussi une activation rapide des ERK1/2 et ce, dès la première minute suivant la blessure (Figure 34A et 34C). D'ailleurs, cette activation des ERK1/2 serait en grande partie dépendante de l'expression de SHP-2 (Figure 34A-D).

D'autres effecteurs de SHP-2 sont également connus pour contrôler positivement la migration des cellules épithéliales intestinales dont la voie RhoA/ROCK (Ray *et al.*, 2002). En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de RhoA inhibe la migration des cellules IEC-6 et Caco-2/15 (Santos *et al.*, 1997). Également, l'expression d'un mutant constitutif actif de RhoA (RhoA<sup>V14</sup>) augmente tandis qu'un mutant dominant inactif (RhoA<sup>N19</sup>) diminue la migration des cellules IEC-6 (Ray *et al.*, 2002). Par contre, Bavaria et collaborateurs ont plutôt démontré que le traitement des cellules IEC-6 avec un inhibiteur de ROCK (Y27632) entraîne une augmentation de l'étalement et de la migration cellulaire (Bavaria *et al.*, 2011). Ainsi, un contrôle adéquat de l'activation de RhoA/ROCK semble essentiel au processus de migration cellulaire. Nos résultats démontrent que suite à une blessure, une augmentation d'activité de RhoA a été mesurée dans les cellules Caco-2/15 déficientes pour l'expression de SHP-2 comparativement aux cellules témoins (Figure 35B). L'inhibition des kinases ROCK1/2 par l'utilisation du Y27632 rétablit la migration cellulaire observée en absence de SHP-2 (Figure 35C). Dans ce contexte, il est possible que RhoA via l'intermédiaire des kinases ROCK1/2 active la myosine II en inhibant les phosphatases de la myosine, ce qui

fait en sorte que la myosine reste phosphorylée sur T18 et S19 (Parsons *et al.*, 2010). Ainsi, une augmentation d'activité de RhoA pourrait entraîner une plus grande contraction de la myosine II et donc du cytosquelette d'actine. D'ailleurs, les cellules Caco-2/15 déficientes pour l'expression de SHP-2 présentent des défauts majeurs dans leur étalement cellulaire (résultats non montrés) ce qui pourrait être une conséquence d'une trop grande contraction de leur cytosquelette. Le mécanisme par lequel SHP-2 régule négativement l'activité de RhoA dans les cellules épithéliales intestinales n'est pas connu. Puisque l'activité enzymatique de SHP-2 semble nécessaire à la migration cellulaire, il est possible que SHP-2 déphosphoryle une protéine RhoGEF, un mécanisme qui a été proposé précédemment (Schoenwaelder *et al.*, 2000). D'ailleurs, la phosphorylation sur tyrosine de RhoGEF a déjà été rapportée pour contrôler son activité enzymatique (Gupta *et al.*, 2014).

Nos analyses par spectrométrie de masse suggèrent que plusieurs isoformes de myosines (Myh9, Myh14, Myl9;12b;Rlc-a, Myl6) (Tableau 6) pourraient être des substrats de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales en migration. En fait, la myosine se compose de 2 chaînes lourdes, 2 chaînes légères régulatrices et 2 chaînes légères essentielles (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009). Dans les cellules épithéliales intestinales, l'isoforme IIa (NMIIa ou Myh9) de la chaîne lourde est la plus exprimée (Babbin *et al.*, 2009; Ivanov *et al.*, 2007). Cette isoforme contrôle d'ailleurs la migration des cellules épithéliales intestinales puisqu'une diminution de son expression engendre une réduction de la migration cellulaire (Babbin *et al.*, 2009). D'ailleurs, une colocalisation de l'actine et de la Myh9 dans les IEC-6 a déjà été montrée (Bavaria *et al.*, 2011). De plus, dans les fibroblastes en migration, une accumulation de Myh9 dans les structures migratoires est également observée (Even-Ram *et al.*, 2007). Or, nos résultats démontrent que dans les cellules IEC-6 qui migrent, SHP-2 colocalise avec l'actine (Figure 33B). Il est donc fort probable que la Myh9 et SHP-2 colocalisent aussi. Il est intéressant de noter que les études rapportent la phosphorylation sur tyrosine de plusieurs isoformes de la myosine dont Myh9 (Harney *et al.*, 2005; Heibeck *et al.*, 2009). Par contre, l'impact de la phosphorylation sur tyrosine dans le processus de migration n'est pas connu.

Les protéines MARK 1 à 4 ont également été identifiées dans notre analyse par spectrométrie de masse comme des substrats potentiels de SHP-2 lors de la migration

cellulaire. Une augmentation de presque 10 fois de la phosphorylation sur tyrosine de ces protéines a été observée dans les cellules IEC-6 déficientes pour SHP-2 par rapport aux cellules témoins (Tableau 6). Les protéines MARK sont des sérine/thréonine kinases qui phosphorylent les protéines MAP (microtubule-associated protein), entraînant leur détachement des microtubules et donc leur déstabilisation (Drewes *et al.*, 1997; Ebner *et al.*, 1999). Dans les cellules épithéliales gastriques, MARK2 régule le cytosquelette d'actine via la voie RhoA/ROCK. Cette kinase phosphoryle la protéine RhoGEF-H1, entraînant une diminution d'activation de RhoA et par le fait même, de la formation de fibres de stress (Yamashita *et al.*, 2011). Il est possible que SHP-2 régule la migration cellulaire en régulant la phosphorylation des protéines MARK1 à 4. D'ailleurs, la phosphorylation sur tyrosine de MARK a déjà été rapportée dans les neurones (Drewes *et al.*, 1997) et les cellules IEC-6 en réponse au TGF $\alpha$  (Oliver *et al.*, 1994).

### ***2.5. Modèle proposé expliquant l'initiation de l'inflammation chez les souris expérimentales***

Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> développent rapidement de l'inflammation intestinale (Figure 3). Nos résultats démontrent que plusieurs défauts ont été rapportés chez ces souris expérimentales. Il est difficile de prédire avec certitude quel est l'événement initiateur de l'inflammation chez ces souris. Néanmoins, il est fort probable que le défaut de détermination cellulaire Paneth/gobelet affecte les autres processus qui sont dérégulés chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> et soit au cœur de l'initiation de l'inflammation dans ce modèle murin.

Chez les jeunes souris expérimentales, une diminution dans l'activation du sentier de signalisation MAP kinase ERK1/2 est détectée comparativement aux souris témoins (Figure 6A-B), soit une voie de signalisation jouant un rôle essentiel dans la détermination cellulaire des cellules à gobelet et des cellules de Paneth (Figure 28). D'ailleurs, rapidement après la naissance, l'épithélium colique des souris déficientes pour *Shp-2* montre une hausse d'expression de plusieurs peptides antimicrobiens (Figure 19A-B) de même que la présence de cellules lysozymes positives (Figure 22). La présence de peptides antimicrobiens est connue pour moduler la composition de la microflore intestinale

(Salzman *et al.*, 2010). En effet, une composition anormale de la flore bactérienne est présente chez les souris mutantes dès l'âge de 2 semaines (Figure 29B-C et Tableau 5). Les bactéries présentes dans la lumière intestinale sont perçues par les récepteurs TLRs exprimés par les cellules épithéliales intestinales et entraînent l'activation de plusieurs cascades de signalisation (Fukata *et al.*, 2009). Plus précisément, nos résultats obtenus à l'aide de cellules en culture montrent, en réponse au produit bactérien LPS, une hyperactivation de la voie NFκB (Figure 14B) ainsi qu'une augmentation d'expression des chimiokines *Cxcl1* et *Cxcl5* (Figure 14C) dans les cellules shSHP-2 comparativement aux cellules shTémoin. Chez les souris expérimentales, une plus grande activation de NFκB (Figure 6D) et une augmentation d'expression de ces chimiokines sont également observées comparativement au souris témoins (Tableau 1). Les chimiokines CXCL1 et CXCL5 servent notamment au recrutement de neutrophiles (Stadnyk, 2002); un type de cellules immunitaires qui a été détecté en grand nombre chez les souris expérimentales en comparaison aux souris témoins (Figure 3E).

De façon concomitante à l'apparition de cellules intermédiaires Paneth/goblet dans le côlon des souris expérimentales (Figure 23), une diminution du nombre de cellules à gobelet est observée (Figure 17). Une diminution de la couche protectrice de mucus peut engendrer plusieurs effets dont permettre aux bactéries présentes dans la lumière intestinale un accès plus facile à l'épithélium intestinal. Cela pourrait engendrer des effets importants sur la signalisation initiée par les bactéries (Chen *et al.*, 2014; Johansson, 2014), mais également permettre aux bactéries de passer plus facilement au travers de l'épithélium via la voie paracellulaire. D'ailleurs, chez les souris expérimentales, une augmentation de la perméabilité paracellulaire est détectée comparativement aux souris témoins (Figure 30A). Chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, il pourrait donc y avoir eu translocation de bactéries jusque dans la lamina propria. Finalement, le mucus sert aussi à protéger l'épithélium intestinal contre l'érosion causée par le passage des selles (Kim et Ho, 2010). Une diminution de la couche de mucus engendre donc plus de blessures à l'épithélium. Or, les cellules épithéliales intestinales sous-exprimant SHP-2 présentent des défauts importants dans la réparation de blessure (Figure 32) ce qui pourrait grandement affecter l'intégrité de la barrière épithéliale.



### 3. Rôle de SHP-2 dans le cancer colorectal associé à la colite

L'inflammation chronique observée chez les patients atteints de maladies inflammatoires augmente le risque de développer un cancer colorectal associé à la colite (Balkwill et Mantovani, 2001). Ceci a été d'ailleurs observé dans des modèles murins ayant développé de l'inflammation intestinale chronique (Itzkowitz et Yio, 2004).

Nous avons tout d'abord vérifié si SHP-2 contrôle la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Dans l'intestin grêle et de façon plus importante dans le côlon, une augmentation du nombre de cellules prolifératives a été observée chez les souris expérimentales par rapport aux souris témoins et ce, dès l'âge de 2 semaines (Figure 36 et 37). Nos résultats sont différents de ceux obtenus par les deux autres groupes de recherche qui n'ont vu aucune différence dans la prolifération cellulaire chez leurs souris déficientes pour l'expression de *Shp-2* dans l'épithélium intestinal (Heuberger *et al.*, 2014; Yamashita *et al.*, 2014). Ainsi, la différence entre les résultats obtenus est peut-être attribuable à une différence dans la composition de la microflore des souris. En effet, un environnement et/ou un fond génétique différents entraînent des changements notables dans la composition de la flore bactérienne (Hufeldt *et al.*, 2010). D'ailleurs, nos résultats suggèrent la participation de la microflore dans la régulation de la prolifération des cellules épithéliales intestinales chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>. En effet, un nombre moins élevé de cellules prolifératives est présent dans le côlon des souris SHP-2;Myd88<sup>CEI-KO</sup> par rapport aux souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> à l'âge de 1 mois (Figure 38). Il serait intéressant de refaire ces expériences sur de plus jeunes souris, soit avant l'apparition de l'inflammation, afin de déterminer si cette diminution de la prolifération est attribuable directement à la signalisation dépendante de Myd88 ou est une conséquence de la diminution de l'inflammation présente chez ces souris (Figure 10B-D).

L'augmentation de la prolifération observée chez les souris mutantes âgées de 2 semaines est intrigante. Elle pourrait être attribuable à l'activation du sentier Wnt/ $\beta$ -caténine que nous avons observée chez ces souris (Figure 7). Cette voie de signalisation joue en effet un rôle primordial dans la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Andreu *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2003). De plus, l'hyperactivation des facteurs de transcription STAT3 et NF $\kappa$ B observée chez les souris mutantes (Figure 6) pourrait

également contribuer à l'hyperprolifération colique puisqu'ils sont connus pour augmenter l'expression de c-Myc et cycline D1 (Bollrath *et al.*, 2009; Greten *et al.*, 2004). Il est intéressant de souligner que ces trois sentiers de signalisation semblent être régulés par Myd88. En effet, la délétion épithéliale de cette protéine adaptatrice chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> ramène à un niveau contrôlé le niveau d'activation de STAT3 et de RelA de même que le niveau d'expression de la  $\beta$ -caténine (Figure 12A-C).

L'analyse des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> âgées de 12 à 15 mois a montré que ces souris souffrent toujours d'inflammation colique (Figure 39B). De plus, sur les 9 souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> analysées, 6 d'entre elles ont développé au moins un adénocarcinome intramuqueux et 3 ont développé au moins un adénocarcinome infiltrant (Figure 40). Ainsi toutes les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> ont développé avec l'âge un cancer associé à la colite.

Dans le cancer colorectal associé à la colite, une délétion allélique d'*APC* est présente dans seulement 33% des cas (Umetani *et al.*, 1999). Néanmoins, une augmentation de la localisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine a été rapportée dans des tumeurs de cancer colorectal associé à la colite (Aust *et al.*, 2001; Shenoy *et al.*, 2012). Les souris mutantes âgées de 12 à 15 mois montrent une hausse d'expression de la  $\beta$ -caténine (Figure 41) encore plus marquée que celle observée à 2 semaines (Figure 7). Une étude faite par Hirata et collaborateurs montre qu'une forte activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine induit une augmentation du nombre de cellules souches Lgr5+ tandis qu'une activation moins prononcée entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire (Hirata *et al.*, 2013). Or, nos résultats préliminaires ne montrent aucune modulation dans l'expression de *Lgr5* dans le côlon des souris expérimentales par rapport aux souris témoins à l'âge de 2 semaines (résultats non montrés). Ces résultats sont contraires à ceux obtenus par le groupe de Heuberger où une augmentation d'expression de plusieurs gènes associés aux cellules souches dont *Lgr5*, *Ascl2* et *Olfm4* a été observée chez les souris n'exprimant pas *Shp-2* dans l'épithélium de l'intestin grêle (Heuberger *et al.*, 2014). Cela suggère que dans le côlon, l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine n'est peut-être pas assez forte pour entraîner des effets sur les cellules souches mais pourrait néanmoins contribuer à l'augmentation de la prolifération cellulaire.

Chez les patients atteints de cancer colorectal associé à la colite, une hyperactivation de la voie Jak/STAT3 est présente dans les cellules épithéliales intestinales (Li *et al.*, 2010). De plus, les études chez la souris démontrent que la cytokine IL-6 et la voie Jak/STAT3 promeuvent le développement du cancer colorectal associé à la colite en régulant notamment la prolifération (*c-Myc*, *Cycline D1*, *Cycline B1*) et la survie (Bcl-X<sub>L</sub>, Survivine, Hsp70) des cellules épithéliales intestinales. L'utilisation d'un anticorps bloquant le récepteur à l'IL-6 prévient d'ailleurs la croissance des tumeurs dans un modèle d'AOM/DSS (Becker *et al.*, 2004). De plus, la délétion conditionnelle de *Stat3* dans les cellules épithéliales intestinales entraîne une réduction du nombre et de la taille des tumeurs induites suite à un traitement à l'AOM/DSS (Bollrath *et al.*, 2009). Chez nos souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, l'hyperactivation de STAT3 (Figure 6E-G) et l'hypersécrétion d'IL-6 (Tableau 1) ont été observées chez les jeunes souris. Dans les souris expérimentales âgées de 12 à 15 mois, l'hyperactivation de STAT3 est toujours présente (Figure 41). Cela suggère que l'activation soutenue de STAT3 doit également participer au développement tumoral chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>. Il serait intéressant de vérifier l'impact d'une inhibition de STAT3 chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> soit pharmacologiquement ou génétiquement par délétion conditionnelle. D'ailleurs, chez des souris n'exprimant pas *Shp-2* spécifiquement dans les hépatocytes, le traitement avec un agent carcinogène (DEN, diethylnitrosamine) entraîne une augmentation du nombre de tumeurs hépatiques par rapport aux souris témoins. De plus, la délétion concomitante de *Shp-2* et de *Stat3* entraîne une réduction de ce nombre de tumeurs par rapport aux souris présentant seulement la délétion de *Shp-2* (Bard-Chapeau *et al.*, 2011).

La voie NFκB est aussi impliquée dans le développement du cancer colorectal associé à la colite. D'ailleurs, une augmentation du marquage nucléaire de RelA est observée dans des tumeurs de cancer colorectal associé à la colite (Cooks *et al.*, 2013) ainsi que dans des tumeurs de souris provenant d'un traitement à l'AOM/DSS (Yao *et al.*, 2014). Aussi, des souris invalidées spécifiquement pour l'expression de la kinase *Ikkβ* dans les cellules épithéliales intestinales développent beaucoup moins de tumeurs suite à un traitement combiné à l'AOM et au DSS (Greten *et al.*, 2004). Également, l'utilisation d'un anticorps bloquant le TNFα, ce qui réduit l'activation de la voie NFκB, engendre une diminution du nombre et de la taille des tumeurs dans un modèle d'AOM/DSS (Popivanova

*et al.*, 2008). À l'inverse, une augmentation du nombre et de la taille des tumeurs dans les souris n'exprimant pas *Sigirr*, un inhibiteur de la signalisation des TLRs et du récepteur de l'IL-1, est notée suite à un traitement à l'AOM/DSS. Dans ces souris, une hyperactivation de NFκB est présente (Xiao *et al.*, 2007). Dans nos souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, une hyperactivation de la voie NFκB est aussi observée chez les jeunes souris (Figure 6D) et les vieilles souris (Figure 41). Ainsi, l'hyperactivation de NFκB pourrait contribuer au développement du cancer colorectal associé à la colite observé dans nos vieilles souris expérimentales.

De plus en plus d'études montrent que la microflore participe au développement du cancer colorectal associé à la colite. En fait, plusieurs modèles murins ne développent pas de dysplasie ou de cancer colorectal associé à la colite dans un environnement axénique (Fukata et Abreu, 2008; Uronis *et al.*, 2009). Chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, la microflore joue un rôle primordial dans le développement de la colite. Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact de la microflore sur le développement du cancer colorectal associé à la colite en plaçant les souris dans un environnement stérile. La microflore participe aussi au développement du cancer colorectal via la génération de métabolites comme le butyrate (Belcheva *et al.*, 2014). Il est possible que la quantité de métabolites présente chez les souris expérimentales soit différente de celle retrouvée chez les souris témoins et participe au développement du cancer colorectal associé à la colite dans les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>. De plus, un changement dans la composition de la microflore est observé lors de la tumorigénèse colorectale (Arthur *et al.*, 2012; Irrazabal *et al.*, 2014). Par exemple, la bactérie commensale *Escherichia coli* NC101 (Arthur *et al.*, 2012), la bactérie anaérobie *Fusobacterium nucleatum* (Kostic *et al.*, 2013) et la bactérie anaérobie *Bacteroides fragilis* (ETBF) (Wu *et al.*, 2009) sont toutes associées au développement du cancer colorectal. Dès l'âge de 2 semaines, les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> présentent un changement dans la composition de leur microflore (Figure 29B et Tableau 5). Une augmentation significative des *Enterobacteriaceae*, ce qui inclut les bactéries *Escherichia coli*, a été observée tandis qu'aucune différence dans les *Bacteroides fragilis* n'a été notée (Tableau 5). Ainsi, une analyse approfondie de la composition de la microflore chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> plus âgées par rapport aux souris témoins serait intéressante.

L'inflammation chronique est généralement associée à l'accumulation de ROS causant des dommages oxydatifs à l'ADN, ce qui entraîne des mutations dans des gènes tels que *CTNBB1* ( $\beta$ -caténine), *KRAS* (Meira *et al.*, 2008; Roessner *et al.*, 2008) et possiblement *TP53* (Ullman et Itzkowitz, 2011). Étant donné que les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> souffrent d'inflammation chronique, il serait intéressant de quantifier les ROS en effectuant, par exemple, une immunohistochimie dirigée contre les nitrotyrosines. En fait, les ROS induisent une réaction de nitration au niveau des tyrosines ce qui sert alors de marqueur indirect du niveau de ROS présent (Murata et Kawanishi, 2004).

#### **4. Statut d'expression de SHP-2 chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales**

Nos résultats chez la souris démontrent que l'absence d'expression de *Shp-2* dans l'épithélium intestinal mène spontanément à l'apparition d'une colite. Nous avons donc vérifié le statut d'expression de SHP-2 chez des patients atteints de maladies inflammatoires intestinales. Par PCR quantitatives, une diminution significative de l'expression de *SHP-2* a été notée dans le côlon des patients atteints de la maladie de Crohn ou de la colite ulcéreuse par rapport aux patients témoins (Figure 42A). Par immunohistochimie, le marquage de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales est bien détecté chez les patients témoins tandis que ce marquage semble plus faible chez les patients atteints de maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse (Figure 42B). Ces résultats devront toutefois être confirmés sur un plus grand échantillonnage de patients. Les mécanismes par lesquels l'expression de SHP-2 est contrôlée lors de l'inflammation intestinale devront être étudiés. Étant donné que la diminution d'expression est présente au niveau des transcrits, il est fort probable qu'une régulation transcriptionnelle soit responsable de la baisse d'expression de SHP-2. Il serait vraiment pertinent de suivre une cohorte de patients et voir si l'expression de *SHP-2* est déjà faible avant l'apparition de la maladie ou si c'est plutôt une conséquence de l'inflammation. Rappelons que le phénotype observé chez nos souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> s'apparente plus à celui d'une colite ulcéreuse qu'à la maladie de Crohn. Il est possible que chez la souris, l'expression de SHP-2 soit plus importante dans le maintien de l'homéostasie colique que chez l'homme.

Deux polymorphismes (rs2301756 et rs3741983) dans les introns du gène *PTPN11* codant pour SHP-2 ont été découverts chez les patients atteints de colite ulcéreuse dans une cohorte de patients japonais (Narumi *et al.*, 2009). La présence de ces deux polymorphismes a été analysée dans notre banque d'échantillons de patients caucasiens. Nos résultats préliminaires suggèrent que les patients atteints de colite ulcéreuse présentent une augmentation de l'allèle G par rapport à l'allèle A (rs2301756) et une augmentation de l'allèle T par rapport à l'allèle C (rs3741983) et ce, comparativement aux patients atteints de la maladie de Crohn et aux patients témoins (Tableau 7). Les patients témoins de cette cohorte ne présentaient pas, au moment de la prise des spécimens, de signe d'inflammation intestinale; toutefois leur condition physique a tout de même nécessité des examens approfondis. Il est probable que certains de ces patients classés initialement parmi les patients témoins développent éventuellement une maladie inflammatoire intestinale. Néanmoins, nos résultats obtenus sont similaires à ceux de Narumi et collaborateurs, c'est-à-dire qu'une augmentation de l'allèle G par rapport à l'allèle A (rs2301756) ainsi que de l'allèle T par rapport à l'allèle C (rs3741983) est détectée chez les patients atteints de colite ulcéreuse et ce, même si les fréquences des allèles des polymorphismes rs2301756 et rs3741983 de *PTPN11* varient selon les groupes ethniques (Jia *et al.*, 2013; Narumi *et al.*, 2009). En effet, selon le projet HapMap, pour le polymorphisme rs2301756, l'allèle A représente 13% et l'allèle G 87% dans la population asiatique, tandis que dans la population caucasienne, c'est plutôt l'inverse, soit 90% pour l'allèle A et 10% pour l'allèle G. Pour le polymorphisme rs3741983, l'allèle T représente 86% et l'allèle C 14% dans la population asiatique, alors que dans la population caucasienne, c'est 14% pour l'allèle T et 86% pour l'allèle C. Puisque les polymorphismes identifiés sont localisés dans les introns, il est difficile de prédire leur impact sur l'expression de SHP-2. Il est possible que ceux-ci influencent l'expression en ARNm de *SHP-2* chez les patients ayant une colite ulcéreuse. Le polymorphisme rs2301756 a déjà été associé à l'atrophie gastrique, une conséquence de l'inflammation chronique présente dans l'estomac (Goto *et al.*, 2006). Puisque la perte d'expression de *Shp-2* dans les hépatocytes entraîne également une inflammation chronique dans le foie (Bard-Chapeau *et al.*, 2011), il serait intéressant de vérifier la présence des polymorphismes rs2301756 et rs3741983 chez des patients atteints d'inflammation hépatique.

## Perspectives et Conclusion

Bien que la protéine tyrosine phosphatase SHP-2 soit exprimée de façon ubiquiste (Feng *et al.*, 1993), ses fonctions dans l'épithélium intestinal n'étaient pas connues. L'objectif de mes travaux de doctorat était donc de déterminer les rôles de cette phosphatase dans les cellules épithéliales intestinales.

Nos résultats obtenus à l'aide d'un modèle murin de délétion conditionnelle de *Shp-2* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales démontrent effectivement que cette phosphatase contrôle l'homéostasie de l'épithélium intestinal, particulièrement de l'épithélium colique. Toutes les souris expérimentales ont développé spontanément de l'inflammation dans le côlon. En fait, plusieurs caractéristiques observées chez les patients ayant une colite ulcéreuse étaient observées chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> dont une inflammation superficielle touchant spécifiquement le côlon, une infiltration de neutrophiles formant des abcès de cryptes et une perte de cellules à gobelet (Xavier et Podolsky, 2007).

Plus en détail, nos résultats ont montré que SHP-2 contrôle l'activation de voies de signalisation majeures dans les cellules épithéliales intestinales. En effet, elle s'avère être un régulateur négatif important des voies Jak/STAT3, NFκB et Wnt/β-caténine. Également, SHP-2 contrôle positivement l'activation des kinases ERK1/2. D'ailleurs, nos résultats avec la souris *BRAF*<sup>CA/+</sup> ont révélé que l'inactivation des ERK1/2 est probablement un des principaux mécanismes par lesquels la délétion épithéliale de *Shp-2* induit de l'inflammation dans le côlon.

De plus en plus d'évidences incriminent le microbiote dans le développement de l'inflammation intestinale (Kim *et al.*, 2005; Nell *et al.*, 2010). D'ailleurs, nos résultats obtenus avec les cellules en culture suggèrent que SHP-2 est impliquée dans la signalisation induite par Myd88 et le produit bactérien LPS. Au niveau cellulaire, cette phosphatase semble atténuer l'activation de NFκB en réponse au LPS. L'analyse des protéines différenciellement phosphorylées sur tyrosine par spectrométrie de masse suggère que ITCH pourrait être un substrat de SHP-2 dans cette voie de signalisation. En plus de

contrôler la réponse des cellules épithéliales à la microflore, SHP-2 affecte aussi sa composition, ce qui pourrait contribuer au phénotype inflammatoire observé chez les souris expérimentales. La contribution de la microflore dans l'inflammation intestinale pourrait être vérifiée via des expériences de transfert de flore de souris expérimentales vers des souris de type sauvage. Ainsi, nous pourrions déterminer si une composition aberrante de la microflore est suffisante pour entraîner l'apparition de colite.

Nos résultats montrent également que SHP-2 contrôle plusieurs processus essentiels pour le maintien du rôle de barrière de l'épithélium intestinal. Tout d'abord, cette phosphatase contrôle la détermination des cellules de Paneth et des cellules à gobelet, deux types cellulaires participant au rôle de barrière chimique de l'épithélium en sécrétant, respectivement, des peptides antimicrobiens et du mucus. La signalisation épithéliale de Myd88 contrôle également la détermination cellulaire et ceci pourrait être attribuable, entre autres, au contrôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. De plus, nos analyses en spectrométrie de masse suggèrent que la stimulation au LPS augmente la phosphorylation sur tyrosine de la  $\beta$ -caténine devenant ainsi un substrat potentiel pour SHP-2. Des travaux antérieurs dans notre laboratoire ont montré que la phosphorylation sur tyrosine des résidus 86 et 654 de la  $\beta$ -caténine augmentait son activité transcriptionnelle (Simoneau *et al.*, 2011). Il serait donc très intéressant de pousser plus loin l'analyse de l'impact de la microflore sur la voie Wnt/ $\beta$ -caténine en vérifiant notamment si SHP-2 contrôle la déphosphorylation de la  $\beta$ -caténine en réponse aux bactéries. Les sites de déphosphorylation de SHP-2 sur la  $\beta$ -caténine pourraient aussi être déterminés de même que leur impact sur son activité transcriptionnelle.

Dans l'épithélium intestinal, SHP-2 régule également la perméabilité paracellulaire, ce qui est essentiel au maintien de la barrière physique entre le contenu de la lumière intestinale et les cellules sous-jacentes. Le mécanisme d'action de SHP-2 dans la perméabilité paracellulaire n'a pas été identifié. Il est possible que SHP-2 agisse en contrôlant la phosphorylation sur tyrosine de protéines de jonction ou bien en régulant l'activité de la voie RhoA/ROCK. Ces deux hypothèses devront être testées.

La phosphatase SHP-2 participe aussi au processus de restitution épithéliale qui s'enclenche lors de la réparation de blessure. Les voies de signalisation ERK1/2 et



RhoA/ROCK ont été identifiées comme pouvant potentiellement participer à ce processus. Également, des substrats potentiels de SHP-2 ont été identifiés par spectrométrie de masse dans des cellules en migration dont des sous-unités de la myosine et les kinases MARK1 à 4. Si ces résultats se confirment, une étude plus en détail des sites de phosphorylation sur ces protéines ainsi que leur impact sur la restitution épithéliale pourra être analysée. En résumé, nos résultats démontrent que SHP-2 joue un rôle crucial dans le maintien de la fonction barrière de l'épithélium colique.

Avec l'âge, les souris déficientes pour l'expression épithéliale de *Shp-2* ont développé des tumeurs colorectales. Selon notre collaboratrice, la pathologiste Pre Marilène Paquet, ces tumeurs s'apparentent à des cancers associés à la colite (adénocarcinomes intramuqueux et adénocarcinomes infiltrants). Plusieurs questions néanmoins demeurent. Est-ce que la microflore joue un rôle dans l'apparition du cancer colorectal associé à la colite chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>? Est-ce qu'une augmentation de stress oxydatif est présente chez ces souris? Si oui, est-ce que ce stress oxydatif entraîne des mutations dans des gènes suppresseurs de tumeur comme *p53*?

Chez les patients atteints de la maladie de Crohn ou de la colite ulcéreuse, nos résultats montrent une baisse d'expression des transcrits et de la protéine SHP-2. Il sera important de confirmer dans le futur si cette baisse d'expression est observée spécifiquement dans l'épithélium. Aussi, il sera pertinent de vérifier à quel moment la baisse d'expression de SHP-2 est observée, si elle précède ou succède à l'apparition de l'inflammation intestinale. Ainsi, est-ce que SHP-2 est un nouveau gène de susceptibilité au développement de maladies inflammatoires intestinales? Nos résultats préliminaires montrent également une différence dans l'incidence de deux polymorphismes (rs2301756 et rs3741983) chez les patients ayant une colite ulcéreuse comparativement aux patients ayant une maladie de Crohn ou aux patients témoins. Il serait intéressant de vérifier s'il existe une corrélation significative entre la présence des polymorphismes et les niveaux d'expression de SHP-2 en ARNm et en protéine dans les cellules épithéliales intestinales. Nos observations obtenues jusqu'à présent suggèrent que SHP-2 jouerait aussi un rôle protecteur contre l'inflammation chez l'humain.

À plus long terme, mes travaux pourraient suggérer que SHP-2 serait une cible thérapeutique de choix pour le traitement des maladies inflammatoires intestinales et potentiellement du cancer colorectal associé à la colite. Par exemple, son niveau d'expression ou son activité enzymatique pourraient être rétablis dans les cellules épithéliales intestinales. Cependant, il faut rappeler que cette phosphatase active aussi les kinases ERK1/2, pro-oncogéniques pour l'épithélium intestinal (Rajagopalan *et al.*, 2002; Roberts et Der, 2007). De plus, une mutation gain-de-fonction de SHP-2 a déjà été identifiée dans le cancer colorectal sporadique (Bentires-Alj *et al.*, 2004). Ainsi, il serait plus pertinent d'identifier clairement les cibles spécifiques de SHP-2 dans l'épithélium intestinal impliquées dans son action anti-inflammatoire. Ceci pourrait servir de base pour de nouvelles études pharmacologiques.

En conclusion, bien que plusieurs questions restent en suspens quant aux rôles de SHP-2 dans l'épithélium intestinal, nos résultats démontrent néanmoins que cette phosphatase protège l'épithélium colique contre le développement de l'inflammation et du cancer colorectal associé à l'inflammation chronique.

## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier la Pre Nathalie Rivard de m'avoir offert l'opportunité de travailler dans son laboratoire de recherche. J'ai reçu une excellente formation. Merci pour ta passion et ta rigueur scientifique.

Ensuite, je tiens à remercier Caroline Leblanc, Marie-Christine Hébert et Ariane Langlois avec qui j'ai eu la chance de travailler durant leurs stages dans le laboratoire. Merci les filles pour votre efficacité et votre désir d'apprendre. Je tiens également à remercier mes collègues de travail: Sébastien Bergeron, Benjamin Bian, Guillaume Chevalier-Soudeyns, Caroline Leblanc, Jessica Gagné-Sansfaçon, Hugo Garneau, Marie-Christine Hébert, Ariane Langlois, Étienne Lemieux, Sébastien Mongrain, Amélie Montagne, Marie-Christine Paquin et Morgane Placet. Merci pour votre contribution à la réussite de ce projet.

Un gros merci à Anne Vézina pour ta patience lorsque j'apprenais à travailler avec les souris. Sans toi, j'en aurais encore une peur bleue. Je tiens aussi à remercier à Marie-Josée Langlois et Sébastien Cagnol, vous faites une bonne équipe dans la gestion du laboratoire.

Je tiens à remercier Sébastien Cagnol, Jessica Gagné-Sansfaçon, Marie-Christine Hébert, Ariane Langlois, Marie-Josée Langlois, Caroline Leblanc, Étienne Lemieux, Faiza Maloum, Éric Tremblay et Anne Vézina pour votre aide dans la réalisation de certaines expériences présentées dans cette thèse.

Je voudrais aussi remercier nos collaborateurs qui ont permis cette étude possible. Tout d'abord, le Pr Geng Feng-Sheng, la Pre Nathalie Perreault et le Pr Martin McMahon pour nous avoir fourni respectivement les souris *Shp-2<sup>flox/flox</sup>*, *Villine-Cre* et *BRaf<sup>CA+</sup>*. Également, je tiens à remercier la Pre Elena Verdu, le Pr Premysl Bercik et la Dre Giada de Palma pour leur aide lors de la l'analyse de la microflore. Je tiens aussi à remercier la Pre Marilène Paquet pour son expertise dans l'analyse de coupes histologiques. Finalement, j'aimerais remercier le Dr Corentin Babakissa pour la prise d'échantillons de patients atteints de maladies inflammatoires intestinales.

Merci aux membres de mon jury de thèse, les Pr Stephen Girardin, Pr Marek Rola-Pleszczynski et Pr Claude Asselin, pour avoir pris le temps de corriger ma thèse.

Je tiens également à remercier mes parents Carmen Corriveau et Réjean Coulombe, ma soeur Émilie Coulombe, mes tantes Diane, Denise et Jacinthe Corriveau ainsi que mon copain Martin St-Onge pour leur support et leur encouragement. Merci aussi à Jean-François Delabre, tu as toujours été d'une aide précieuse. Finalement, je veux remercier tous mes amis et amies qui ont toujours été là durant mes études graduées.

## Liste des références

Abraham, C., et Cho, J.H. (2009) Inflammatory bowel disease. *N.Engl.J.Med.* 361(21): 2066-2078.

Abrams, G.D., Bauer, H., et Sprinz, H. (1963) Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Lab.Invest.* 12: 355-364.

Abrams, G.D., et Bishop, J.E. (1967) Effect of the normal microbial flora on gastrointestinal motility. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 126(1): 301-304.

Abreu, M.T., Arnold, E.T., Thomas, L.S., Gonsky, R., Zhou, Y., Hu, B., et Arditi, M. (2002) TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 277(23): 20431-20437.

Abreu, M.T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L.S., Arnold, E.T., et Arditi, M. (2001) Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J.Immunol.* 167(3): 1609-1616.

Aceto, N., Sausgruber, N., Brinkhaus, H., Gaidatzis, D., Martiny-Baron, G., Mazzarol, G., Confalonieri, S., Quarto, M., Hu, G., Balwierz, P.J., Pachkov, M., Elledge, S.J., van Nimwegen, E., Stadler, M.B., et Bentires-Alj, M. (2012) Tyrosine phosphatase SHP2 promotes breast cancer progression and maintains tumor-initiating cells via activation of key transcription factors and a positive feedback signaling loop. *Nat.Med.* 18(4): 529-537.

Agazie, Y.M., et Hayman, M.J. (2003) Molecular mechanism for a role of SHP2 in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol.Cell.Biol.* 23(21): 7875-7886.

Ahmed, Z., Lin, C.C., Suen, K.M., Melo, F.A., Levitt, J.A., Suhling, K., et Ladbury, J.E. (2013) Grb2 controls phosphorylation of FGFR2 by inhibiting receptor kinase and Shp2 phosphatase activity. *J.Cell Biol.* 200(4): 493-504.

Ahn, V.E., Chu, M.L., Choi, H.J., Tran, D., Abo, A., et Weis, W.I. (2011) Structural basis of Wnt signaling inhibition by Dickkopf binding to LRP5/6. *Dev.Cell.* 21(5): 862-873.

Ali, S., Nouhi, Z., Chughtai, N., et Ali, S. (2003) SHP-2 regulates SOCS-1-mediated Janus kinase-2 ubiquitination/degradation downstream of the prolactin receptor. *J.Biol.Chem.* 278(52): 52021-52031.

Aliaga, J.C., Deschenes, C., Beaulieu, J.F., Calvo, E.L., et Rivard, N. (1999) Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am.J.Physiol.* 277(3): 631-641.

Allen, I.C., Wilson, J.E., Schneider, M., Lich, J.D., Roberts, R.A., Arthur, J.C., Woodford, R.M., Davis, B.K., Uronis, J.M., Herfarth, H.H., Jobin, C., Rogers, A.B., et Ting, J.P. (2012) NLRP12 suppresses colon inflammation and tumorigenesis through the negative regulation of noncanonical NF-kappaB signaling. *Immunity*. 36(5): 742-754.

Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., et Mustelin, T. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 117(6): 699-711.

Amano, A., Nakagawa, I., et Yoshimori, T. (2006) Autophagy in innate immunity against intracellular bacteria. *J.Biochem*. 140(2): 161-166.

Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J.S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y., et Alkalay, I. (2002) Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev*. 16(9): 1066-1076.

An, H., Zhao, W., Hou, J., Zhang, Y., Xie, Y., Zheng, Y., Xu, H., Qian, C., Zhou, J., Yu, Y., Liu, S., Feng, G., et Cao, X. (2006) SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production. *Immunity*. 25(6): 919-928.

Andresen, L., Jorgensen, V.L., Perner, A., Hansen, A., Eugen-Olsen, J., et Rask-Madsen, J. (2005) Activation of nuclear factor kappaB in colonic mucosa from patients with collagenous and ulcerative colitis. *Gut*. 54(4): 503-509.

Andreu, P., Colnot, S., Godard, C., Gad, S., Chafey, P., Niwa-Kawakita, M., Laurent-Puig, P., Kahn, A., Robine, S., Perret, C., et Romagnolo, B. (2005) Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development*. 132(6): 1443-1451.

Andreu, P., Peignon, G., Slomianny, C., Taketo, M.M., Colnot, S., Robine, S., Lamarque, D., Laurent-Puig, P., Perret, C., et Romagnolo, B. (2008) A genetic study of the role of the Wnt/beta-catenin signalling in Paneth cell differentiation. *Dev.Biol*. 324(2): 288-296.

Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Muhlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., Rhodes, J.M., Stintzi, A., Simpson, K.W., Hansen, J.J., Keku, T.O., Fodor, A.A., et Jobin, C. (2012) Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*. 338(6103): 120-123.

Artis, D. (2008) Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat.Rev.Immunol*. 8(6): 411-420.

Atreya, R., et Neurath, M.F. (2010) Chemokines in inflammatory bowel diseases. *Dig.Dis*. 28(3): 386-394.

Aust, D.E., Terdiman, J.P., Willenbacher, R.F., Chew, K., Ferrell, L., Florendo, C., Molinaro-Clark, A., Baretton, G.B., Lohrs, U., et Waldman, F.M. (2001) Altered distribution of beta-catenin, and its binding proteins E-cadherin and APC, in ulcerative colitis-related colorectal cancers. *Mod.Pathol.* 14(1): 29-39.

Avruch, J. (2007) MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim.Biophys.Acta.* 1773(8): 1150-1160.

Babbin, B.A., Koch, S., Bachar, M., Conti, M.A., Parkos, C.A., Adelstein, R.S., Nusrat, A., et Ivanov, A.I. (2009) Non-muscle myosin IIA differentially regulates intestinal epithelial cell restitution and matrix invasion. *Am.J.Pathol.* 174(2): 436-448.

Bain, C.C., et Mowat, A.M. (2014) Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol.Rev.* 260(1): 102-117.

Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Paraskeva, C., Markowitz, S., Willson, J.K., Hamilton, S., et Vogelstein, B. (1990) P53 Gene Mutations Occur in Combination with 17p Allelic Deletions as Late Events in Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Res.* 50(23): 7717-7722.

Baliga, B.S., Borowitz, S.M., et Barnard, J.A. (1989) Effects of EGF and PMA on the growth and proliferation of IEC-6 cells. *Biochem.Int.* 19(5): 1045-1056.

Balkwill, F., et Mantovani, A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 357(9255): 539-545.

Bard-Chapeau, E.A., Li, S., Ding, J., Zhang, S.S., Zhu, H.H., Princen, F., Fang, D.D., Han, T., Bailly-Maitre, B., Poli, V., Varki, N.M., Wang, H., et Feng, G.S. (2011) Ptpn11/Shp2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer.Cell.* 19(5): 629-639.

Barker, N. (2014) Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 15(1): 19-33.

Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., et Clevers, H. (2009) Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature.* 457(7229): 608-611.

Barrett, J.C., Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Brant, S.R., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Barmada, M.M., Bitton, A., Dassopoulos, T., Datta, L.W., Green, T., Griffiths, A.M., Kistner, E.O., Murtha, M.T., Regueiro, M.D., Rotter, J.I., Schumm, L.P., Steinhardt, A.H., Targan, S.R., Xavier, R.J., NIDDK IBD Genetics Consortium., Libioulle, C., Sandor, C., Lathrop, M., Belaiche, J., Dewit, O., Gut, I., Heath, S., Laukens, D., Mni, M., Rutgeerts, P., Van Gossum, A., Zelenika, D., Franchimont, D., Hugot, J.P., de Vos, M., Vermeire, S., Louis, E., Belgian-French IBD Consortium., Wellcome Trust Case Control Consortium., Cardon, L.R., Anderson, C.A., Drummond, H., Nimmo, E., Ahmad, T., Prescott, N.J., Onnie, C.M., Fisher, S.A., Marchini, J., Ghori, J.,

Bumpstead, S., Gwilliam, R., Tremelling, M., Deloukas, P., Mansfield, J., Jewell, D., Satsangi, J., Mathew, C.G., Parkes, M., Georges, M., et Daly, M.J. (2008) Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat.Genet.* 40(8): 955-962.

Battle, E., Henderson, J.T., Beghtel, H., van den Born, M.M., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de Wetering, M., Pawson, T., et Clevers, H. (2002) Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell.* 111(2): 251-263.

Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R.H., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S.G., Berg, D., Schukken, Y., Scherl, E., et Simpson, K.W. (2007) Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J.* 1(5): 403-418.

Bavaria, M.N., Ray, R.M., et Johnson, L.R. (2011) The phosphorylation state of MRLC is polyamine dependent in intestinal epithelial cells. *Am.J.Physiol.Cell.Physiol.* 300(1): 164-175.

Beaulieu, J.F., et Quaroni, A. (1991) Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem.J.* 280(3): 599-608.

Becker, C., Fantini, M.C., Schramm, C., Lehr, H.A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S., Kiesslich, R., Huber, S., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Galle, P.R., Blessing, M., Rose-John, S., et Neurath, M.F. (2004) TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity.* 21(4): 491-501.

Belcheva, A., Irrazabal, T., Robertson, S.J., Streutker, C., Maughan, H., Rubino, S., Moriyama, E.H., Copeland, J.K., Kumar, S., Green, B., Geddes, K., Pezo, R.C., Navarre, W.W., Milosevic, M., Wilson, B.C., Girardin, S.E., Wolever, T.M., Edelmann, W., Guttman, D.S., Philpott, D.J., et Martin, A. (2014) Gut microbial metabolism drives transformation of MSH2-deficient colon epithelial cells. *Cell.* 158(2): 288-299.

Bennet, J.D., et Brinkman, M. (1989) Treatment of ulcerative colitis by implantation of normal colonic flora. *Lancet.* 1(8630): 164.

Bennett, A.M., Tang, T.L., Sugimoto, S., Walsh, C.T., et Neel, B.G. (1994) Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91(15): 7335-7339.

Bentires-Alj, M., Paez, J.G., David, F.S., Keilhack, H., Halmos, B., Naoki, K., Maris, J.M., Richardson, A., Bardelli, A., Sugarbaker, D.J., Richards, W.G., Du, J., Girard, L., Minna, J.D., Loh, M.L., Fisher, D.E., Velculescu, V.E., Vogelstein, B., Meyerson, M., Sellers, W.R., et Neel, B.G. (2004) Activating mutations of the Noonan syndrome-associated



SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 64(24): 8816-8820.

Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., Deng, Y., Blennerhassett, P., Macri, J., McCoy, K.D., Verdu, E.F., et Collins, S.M. (2011) The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology.* 141(2): 599-609.

Berg, D.J., Davidson, N., Kuhn, R., Muller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson-Snipes, L., Leach, M.W., et Rennick, D. (1996) Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J.Clin.Invest.* 98(4): 1010-1020.

Bernink, J.H., Peters, C.P., Munneke, M., te Velde, A.A., Meijer, S.L., Weijer, K., Hreggvidsdottir, H.S., Heinsbroek, S.E., Legrand, N., Buskens, C.J., Bemelman, W.A., Mjosberg, J.M., et Spits, H. (2013) Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat.Immunol.* 14(3): 221-229.

Bevins, C.L., et Salzman, N.H. (2011) Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat.Rev.Microbiol.* 9(5): 356-368.

Biswas, A., Liu, Y.J., Hao, L., Mizoguchi, A., Salzman, N.H., Bevins, C.L., et Kobayashi, K.S. (2010) Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 107(33): 14739-14744.

Bjerknes, M., et Cheng, H. (2005) Gastrointestinal stem cells. II. Intestinal stem cells. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 289(3): 381-387.

Boden, E.K., et Snapper, S.B. (2008) Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 24(6): 733-741.

Bollrath, J., Pheese, T.J., von Burstin, V.A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, O., Schwitalla, S., Matthews, V., Schmid, R.M., Kirchner, T., Arkan, M.C., Ernst, M., et Greten, F.R. (2009) gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer.Cell.* 15(2): 91-102.

Boone, D.L., Turer, E.E., Lee, E.G., Ahmad, R.C., Wheeler, M.T., Tsui, C., Hurley, P., Chien, M., Chai, S., Hitotsumatsu, O., McNally, E., Pickart, C., et Ma, A. (2004) The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat.Immunol.* 5(10): 1052-1060.

Borody, T.J., Warren, E.F., Leis, S., Surace, R., et Ashman, O. (2003) Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J.Clin.Gastroenterol.* 37(1): 42-47.

Boucher, M.J., Jean, D., Vezina, A., et Rivard, N. (2004) Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 286(5): 736-746.

Bowen, M.E., Ayturk, U.M., Kurek, K.C., Yang, W., et Warman, M.L. (2014) SHP2 regulates chondrocyte terminal differentiation, growth plate architecture and skeletal cell fates. *PLoS Genet.* 10(5): e1004364.

Brand, S., Staudinger, T., Schnitzler, F., Pfennig, S., Hofbauer, K., Dambacher, J., Seiderer, J., Tillack, C., Konrad, A., Crispin, A., Goke, B., Lohse, P., et Ochsenkuhn, T. (2005) The role of Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease. *Inflamm.Bowel Dis.* 11(7): 645-652.

Bray, S.J. (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 7(9): 678-689.

Breese, E., Braegger, C.P., Corrigan, C.J., Walker-Smith, J.A., et MacDonald, T.T. (1993) Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology.* 78(1): 127-131.

Brentnall, T.A., Crispin, D.A., Bronner, M.P., Cherian, S.P., Hueffed, M., Rabinovitch, P.S., Rubin, C.E., Haggitt, R.C., et Boland, C.R. (1996) Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer Res.* 56(6): 1237-1240.

Brint, E.K., Xu, D., Liu, H., Dunne, A., McKenzie, A.N., O'Neill, L.A., et Liew, F.Y. (2004) ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat.Immunol.* 5(4): 373-379.

Bruewer, M., Samarin, S., et Nusrat, A. (2006) Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1072: 242-252.

Cadwell, K., Liu, J.Y., Brown, S.L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J.K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J.A., Hunt, S., Stone, C.D., Brunt, E.M., Xavier, R.J., Sleckman, B.P., Li, E., Mizushima, N., Stappenbeck, T.S., et Virgin, H.W.,4th (2008) A key role for autophagy and the autophagy gene Atg1611 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature.* 456(7219): 259-263.

Calvert, R., Bordeleau, G., Grondin, G., Vezina, A., et Ferrari, J. (1988) On the presence of intermediate cells in the small intestine. *Anat.Rec.* 220(3): 291-295.

Cario, E., Gerken, G., et Podolsky, D.K. (2007) Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology.* 132(4): 1359-1374.

Cario, E., et Podolsky, D.K. (2000) Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect.Immun.* 68(12): 7010-7017.

Caruso, R., Fina, D., Peluso, I., Stolfi, C., Fantini, M.C., Gioia, V., Caprioli, F., Del Vecchio Blanco, G., Paoluzi, O.A., Macdonald, T.T., Pallone, F., et Monteleone, G. (2007) A functional role for interleukin-21 in promoting the synthesis of the T-cell chemoattractant, MIP-3alpha, by gut epithelial cells. *Gastroenterology.* 132(1): 166-175.

Cash, H.L., et Hooper, L.V. (2005) Commensal bacteria shape intestinal immune system development *ASM News.* 71(2): 7177-7183.

Chang, C.L., Marra, G., Chauhan, D.P., Ha, H.T., Chang, D.K., Ricciardiello, L., Randolph, A., Carethers, J.M., et Boland, C.R. (2002) Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am.J.Physiol.Cell.Physiol.* 283(1): 148-154.

Chassin, C., Kocur, M., Pott, J., Duerr, C.U., Gutle, D., Lotz, M., et Hornef, M.W. (2010) miR-146a mediates protective innate immune tolerance in the neonate intestine. *Cell.Host Microbe.* 8(4): 358-368.

Chen, C., Edelstein, L.C., et Gelinas, C. (2000) The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol.Cell.Biol.* 20(8): 2687-2695.

Chen, G.Y., Liu, M., Wang, F., Bertin, J., et Nunez, G. (2011) A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *J.Immunol.* 186(12): 7187-7194.

Chen, S.J., Liu, X.W., Liu, J.P., Yang, X.Y., et Lu, F.G. (2014) Ulcerative colitis as a polymicrobial infection characterized by sustained broken mucus barrier. *World J.Gastroenterol.* 20(28): 9468-9475.

Cho, J.H. (2008) The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat.Rev.Immunol.* 8(6): 458-466.

Cho, J.H., et Brant, S.R. (2011) Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 140(6): 1704-1712.

Christofferson, D.E., et Yuan, J. (2010) Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 22(2): 263-268.

Chughtai, N., Schimchowitsch, S., Lebrun, J.J., et Ali, S. (2002) Prolactin induces SHP-2 association with Stat5, nuclear translocation, and binding to the beta-casein gene promoter in mammary cells. *J.Biol.Chem.* 277(34): 31107-31114.

Clevers, H.C., et Bevins, C.L. (2013) Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annu.Rev.Physiol.* 75: 289-311.

Coats, S., Flanagan, W.M., Nourse, J., et Roberts, J.M. (1996) Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science*. 272(5263): 877-880.

Collares-Buzato, C.B., Jepson, M.A., Simmons, N.L., et Hirst, B.H. (1998) Increased tyrosine phosphorylation causes redistribution of adherens junction and tight junction proteins and perturbs paracellular barrier function in MDCK epithelia. *Eur.J.Cell Biol.* 76(2): 85-92.

Conway, K.L., Kuballa, P., Song, J.H., Patel, K.K., Castoreno, A.B., Yilmaz, O.H., Jijon, H.B., Zhang, M., Aldrich, L.N., Villablanca, E.J., Peloquin, J.M., Goel, G., Lee, I.A., Mizoguchi, E., Shi, H.N., Bhan, A.K., Shaw, S.Y., Schreiber, S.L., Virgin, H.W., Shamji, A.F., Stappenbeck, T.S., Reinecker, H.C., et Xavier, R.J. (2013) Atg1611 is required for autophagy in intestinal epithelial cells and protection of mice from Salmonella infection. *Gastroenterology*. 145(6): 1347-1357.

Cooks, T., Pateras, I.S., Tarcic, O., Solomon, H., Schetter, A.J., Wilder, S., Lozano, G., Pikarsky, E., Forshev, T., Rosenfeld, N., Harpaz, N., Itzkowitz, S., Harris, C.C., Rotter, V., Gorgoulis, V.G., et Oren, M. (2013) Mutant p53 prolongs NF-kappaB activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer. *Cancer.Cell*. 23(5): 634-646.

Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S., et Sedergran, D.J. (1993) Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab.Invest.* 69(2): 238-249.

Corridoni, D., Arseneau, K.O., et Cominelli, F. (2014) Inflammatory bowel disease. *Immunol.Lett.* 161(2): 231-235.

Coulombe, G., Leblanc, C., Cagnol, S., Maloum, F., Lemieux, E., Perreault, N., Feng, G.S., Boudreau, F., et Rivard, N. (2013) Epithelial tyrosine phosphatase SHP-2 protects against intestinal inflammation in mice. *Mol.Cell.Biol.* 33(11): 2275-2284.

Couturier-Maillard, A., Secher, T., Rehman, A., Normand, S., De Arcangelis, A., Haesler, R., Huot, L., Grandjean, T., Bressenot, A., Delanoye-Crespin, A., Gaillot, O., Schreiber, S., Lemoine, Y., Ryffel, B., Hot, D., Nunez, G., Chen, G., Rosenstiel, P., et Chamaillard, M. (2013) NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J.Clin.Invest.* 123(2): 700-711.

Dance, M., Montagner, A., Salles, J.P., Yart, A., et Raynal, P. (2008) The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. *Cell.Signal.* 20(3): 453-459.

Dankort, D., Filenova, E., Collado, M., Serrano, M., Jones, K., et McMahon, M. (2007) A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev.* 21(4): 379-384.

Dave, S.H., Tilstra, J.S., Matsuoka, K., Li, F., Karrasch, T., Uno, J.K., Sepulveda, A.R., Jobin, C., Baldwin, A.S., Robbins, P.D., et Plevy, S.E. (2007) Amelioration of chronic murine colitis by peptide-mediated transduction of the IkappaB kinase inhibitor NEMO binding domain peptide. *J.Immunol.* 179(11): 7852-7859.

Dieckgraefe, B.K., Weems, D.M., Santoro, S.A., et Alpers, D.H. (1997) ERK and p38 MAP kinase pathways are mediators of intestinal epithelial wound-induced signal transduction. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 233(2): 389-394.

Dignass, A.U. (2001) Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflamm.Bowel Dis.* 7(1): 68-77.

Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., et Knight, R. (2010) Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 107(26): 11971-11975.

Donohoe, D.R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T.M., Bunger, M.K., et Bultman, S.J. (2011) The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell.Metab.* 13(5): 517-526.

Dourmashkin, R.R., Davies, H., Wells, C., Shah, D., Price, A., O'Morain, C., et Levi, J. (1983) Epithelial patchy necrosis in Crohn's disease. *Hum. Pathol.* 14(7): 643-648.

Drewes, G., Ebnet, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M., et Mandelkow, E. (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell.* 89(2): 297-308.

Eaden, J. (2004) Review article: colorectal carcinoma and inflammatory bowel disease. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 20(4): 24-30.

Ebnet, A., Drewes, G., Mandelkow, E.M., et Mandelkow, E. (1999) Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motil.Cytoskeleton.* 44(3): 209-224.

Eckhart, W., Hutchinson, M.A., et Hunter, T. (1979) An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell.* 18(4): 925-933.

Edelblum, K.L., Washington, M.K., Koyama, T., Robine, S., Baccarini, M., et Polk, D.B. (2008) Raf protects against colitis by promoting mouse colon epithelial cell survival through NF-kappaB. *Gastroenterology.* 135(2): 539-551.

Einerhand, A.W., Renes, I.B., Makkink, M.K., van der Sluis, M., Buller, H.A., et Dekker, J. (2002) Role of mucins in inflammatory bowel disease: important lessons from experimental models. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* 14(7): 757-765.

el Marjou, F., Janssen, K.P., Chang, B.H., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., et Robine, S. (2004) Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis*. 39(3): 186-193.

Etienne-Manneville, S. (2013) Microtubules in cell migration. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 29: 471-499.

Evans, G.S., et Potten, C.S. (1988) The distribution of endocrine cells along the mouse intestine: a quantitative immunocytochemical study. *Virchows Arch.B.Cell.Pathol.Incl Mol.Pathol.* 56(3): 191-199.

Even-Ram, S., Doyle, A.D., Conti, M.A., Matsumoto, K., Adelstein, R.S., et Yamada, K.M. (2007) Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat.Cell Biol.* 9(3): 299-309.

Fearon, E.R., et Vogelstein, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61(5): 759-767.

Feng, G.S., Hui, C.C., et Pawson, T. (1993) SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science*. 259(5101): 1607-1611.

Feng, Y., Bommer, G.T., Zhao, J., Green, M., Sands, E., Zhai, Y., Brown, K., Burberry, A., Cho, K.R., et Fearon, E.R. (2011) Mutant KRAS promotes hyperplasia and alters differentiation in the colon epithelium but does not expand the presumptive stem cell pool. *Gastroenterology*. 141(3): 1003-1013.

Feng, Y., Sentani, K., Wiese, A., Sands, E., Green, M., Bommer, G.T., Cho, K.R., et Fearon, E.R. (2013) Sox9 induction, ectopic Paneth cells, and mitotic spindle axis defects in mouse colon adenomatous epithelium arising from conditional biallelic Apc inactivation. *Am.J.Pathol.* 183(2): 493-503.

Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M., et Kolodner, R. (1993) The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. 75(5): 1027-1038.

Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.M., et Maniatis, T. (2003) IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat.Immunol.* 4(5): 491-496.

Fornaro, M., Burch, P.M., Yang, W., Zhang, L., Hamilton, C.E., Kim, J.H., Neel, B.G., et Bennett, A.M. (2006) SHP-2 activates signaling of the nuclear factor of activated T cells to promote skeletal muscle growth. *J.Cell Biol.* 175(1): 87-97.

Fournier, B.M., et Parkos, C.A. (2012) The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 5(4): 354-366.

Frantz, A.L., Rogier, E.W., Weber, C.R., Shen, L., Cohen, D.A., Fenton, L.A., Bruno, M.E., et Kaetzel, C.S. (2012) Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides. *Mucosal Immunol.* 5(5): 501-512.

Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., et Artavanis-Tsakonas, S. (2005) Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature.* 435(7044): 964-968.

Frolova, L., Drastich, P., Rossmann, P., Klimesova, K., et Tlaskalova-Hogenova, H. (2008) Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis. *J.Histochem.Cytochem.* 56(3): 267-274.

Fukata, M., et Abreu, M.T. (2008) Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies. *Oncogene.* 27(2): 234-243.

Fukata, M., et Arditi, M. (2013) The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 6(3): 451-463.

Fukata, M., Chen, A., Vamadevan, A.S., Cohen, J., Breglio, K., Krishnareddy, S., Hsu, D., Xu, R., Harpaz, N., Dannenberg, A.J., Subbaramaiah, K., Cooper, H.S., Itzkowitz, S.H., et Abreu, M.T. (2007) Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology.* 133(6): 1869-1881.

Fukata, M., Shang, L., Santaolalla, R., Sotolongo, J., Pastorini, C., Espana, C., Ungaro, R., Harpaz, N., Cooper, H.S., Elson, G., Kosco-Vilbois, M., Zaias, J., Perez, M.T., Mayer, L., Vamadevan, A.S., Lira, S.A., et Abreu, M.T. (2011) Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis. *Inflamm.Bowel Dis.* 17(7): 1464-1473.

Fukata, M., Vamadevan, A.S., et Abreu, M.T. (2009) Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin.Immunol.* 21(4): 242-253.

Fuss, I.J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J.S., de la Motte, C., Strong, S.A., Fiocchi, C., et Strober, W. (1996) Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J.Immunol.* 157(3): 1261-1270.

Gallo, R.L., et Hooper, L.V. (2012) Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat.Rev.Immunol.* 12(7): 503-516.

Gao, N., et Kaestner, K.H. (2010) Cdx2 regulates endo-lysosomal function and epithelial cell polarity. *Genes Dev.* 24(12): 1295-1305.

Gerbe, F., Legraverend, C., et Jay, P. (2012) The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell Mol.Life Sci.* 69(17): 2907-2917.

Geremia, A., Arancibia-Carcamo, C.V., Fleming, M.P., Rust, N., Singh, B., Mortensen, N.J., Travis, S.P., et Powrie, F. (2011) IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J.Exp.Med.* 208(6): 1127-1133.

Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G.R., et Di Sabatino, A. (2014) Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun.Rev.* 13(1): 3-10.

Gewirtz, A.T., Navas, T.A., Lyons, S., Godowski, P.J., et Madara, J.L. (2001) Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J.Immunol.* 167(4): 1882-1885.

Ghaleb, A.M., McConnell, B.B., Kaestner, K.H., et Yang, V.W. (2011) Altered intestinal epithelial homeostasis in mice with intestine-specific deletion of the Kruppel-like factor 4 gene. *Dev.Biol.* 349(2): 310-320.

Gionchetti, P., Rizzello, F., Helwig, U., Venturi, A., Lammers, K.M., Brigidi, P., Vitali, B., Poggioli, G., Miglioli, M., et Campieri, M. (2003) Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology.* 124(5): 1202-1209.

Gong, J., Xu, J., Zhu, W., Gao, X., Li, N., et Li, J. (2010) Epithelial-specific blockade of MyD88-dependent pathway causes spontaneous small intestinal inflammation. *Clin.Immunol.* 136(2): 245-256.

Gong, K., Zhou, F., Huang, H., Gong, Y., et Zhang, L. (2012) Suppression of GSK3beta by ERK mediates lipopolysaccharide induced cell migration in macrophage through beta-catenin signaling. *Protein Cell.* 3(10): 762-768.

Goto, Y., Ando, T., Yamamoto, K., Tamakoshi, A., El-Omar, E., Goto, H., et Hamajima, N. (2006) Association between serum pepsinogens and polymorphism of PTPN11 encoding SHP-2 among Helicobacter pylori seropositive Japanese. *Int.J.Cancer.* 118(1): 203-208.

Grady, W.M. (2004) Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 23(1-2): 11-27.

Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destree, O., Kielman, M., et Clevers, H. (2005) Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology.* 129(2): 626-638.

Gregorieff, A., Stange, D.E., Kujala, P., Begthel, H., van den Born, M., Korving, J., Peters, P.J., et Clevers, H. (2009) The ets-domain transcription factor Spdef promotes maturation of goblet and paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology.* 137(4): 1333-1345.



Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F., et Karin, M. (2004) IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 118(3): 285-296.

Grinnell, K.L., Chichger, H., Braza, J., Duong, H., et Harrington, E.O. (2012) Protection against LPS-induced pulmonary edema through the attenuation of protein tyrosine phosphatase-1B oxidation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 46(5): 623-632.

Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., Nam, S., Eweis, I., Diaz, N., Sullivan, D., Yoder, S., Enkemann, S., Eschrich, S., Lee, J.H., Beam, C.A., Cheng, J., Minton, S., Muro-Cacho, C.A., et Jove, R. (2006) Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin.Cancer Res.* 12(1): 11-19.

Grossmann, K.S., Wende, H., Paul, F.E., Cheret, C., Garratt, A.N., Zurborg, S., Feinberg, K., Besser, D., Schulz, H., Peles, E., Selbach, M., Birchmeier, W., et Birchmeier, C. (2009) The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) directs Neuregulin-1/ErbB signaling throughout Schwann cell development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 106(39): 16704-16709.

Gunther, C., Martini, E., Wittkopf, N., Amann, K., Weigmann, B., Neumann, H., Waldner, M., Hedrick, S.M., Tenzer, S., Neurath, M.F., et Becker, C. (2011) Caspase-8 regulates TNF-alpha-induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature*. 477(7364): 335-339.

Gupta, M., Qi, X., Thakur, V., et Manor, D. (2014) Tyrosine phosphorylation of Dbl regulates GTPase signaling. *J.Biol.Chem.* 289(24): 17195-17202.

Hadari, Y.R., Kouhara, H., Lax, I., et Schlessinger, J. (1998) Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Mol.Cell.Biol.* 18(7): 3966-3973.

Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Farkkila, M., et Kontula, K. (2006) Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J.Gastroenterol.* 12(23): 3668-3672.

Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., Matsumoto, K., et Nishida, E. (2004) Shp2, an SH2-containing protein-tyrosine phosphatase, positively regulates receptor tyrosine kinase signaling by dephosphorylating and inactivating the inhibitor Sprouty. *J.Biol.Chem.* 279(22): 22992-22995.

Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., et Nishida, E. (2002) Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat.Cell Biol.* 4(11): 850-858.

Hancock, R.E., Nijnik, A., et Philpott, D.J. (2012) Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat.Rev.Microbiol.* 10(4): 243-254.

Harney, D.F., Butler, R.K., et Edwards, R.J. (2005) Tyrosine phosphorylation of myosin heavy chain during skeletal muscle differentiation: an integrated bioinformatics approach. *Theor.Biol.Med.Model.* 2: 12.

Hart, M., Concordet, J.P., Lassot, I., Albert, I., del los Santos, R., Durand, H., Perret, C., Rubinfeld, B., Margottin, F., Benarous, R., et Polakis, P. (1999) The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr.Biol.* 9(4): 207-210.

Hartman, Z.R., Schaller, M.D., et Agazie, Y.M. (2013) The tyrosine phosphatase SHP2 regulates focal adhesion kinase to promote EGF-induced lamellipodia persistence and cell migration. *Mol.Cancer.Res.* 11(6): 651-664.

Hartsock, A., et Nelson, W.J. (2008) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim.Biophys.Acta.* 1778(3): 660-669.

Hasegawa, M., Yamazaki, T., Kamada, N., Tawaratsumida, K., Kim, Y.G., Nunez, G., et Inohara, N. (2011) Nucleotide-binding oligomerization domain 1 mediates recognition of *Clostridium difficile* and induces neutrophil recruitment and protection against the pathogen. *J.Immunol.* 186(8): 4872-4880.

Hatakeyama, M. (2004) Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat.Rev.Cancer.* 4(9): 688-694.

Hatanaka, K., Lanahan, A.A., Murakami, M., et Simons, M. (2012) Fibroblast growth factor signaling potentiates VE-cadherin stability at adherens junctions by regulating SHP2. *PLoS One.* 7(5): e37600.

He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., et Kinzler, K.W. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 281(5382): 1509-1512.

He, Z., Zhu, H.H., Bauler, T.J., Wang, J., Ciaraldi, T., Alderson, N., Li, S., Raquil, M.A., Ji, K., Wang, S., Shao, J., Henry, R.R., King, P.D., et Feng, G.S. (2013) Nonreceptor tyrosine phosphatase Shp2 promotes adipogenesis through inhibition of p38 MAP kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 110(1): 79-88.

Heibeck, T.H., Ding, S.J., Opresko, L.K., Zhao, R., Schepmoes, A.A., Yang, F., Tolmachev, A.V., Monroe, M.E., Camp, D.G., 2nd., Smith, R.D., Wiley, H.S., et Qian, W.J. (2009) An extensive survey of tyrosine phosphorylation revealing new sites in human mammary epithelial cells. *J.Proteome Res.* 8(8): 3852-3861.

Heuberger, J., Kosel, F., Qi, J., Grossmann, K.S., Rajewsky, K., et Birchmeier, W. (2014) Shp2/MAPK signaling controls goblet/paneth cell fate decisions in the intestine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 111(9): 3472-3477.

- Hirata, A., Utikal, J., Yamashita, S., Aoki, H., Watanabe, A., Yamamoto, T., Okano, H., Bardeesy, N., Kunisada, T., Ushijima, T., Hara, A., Jaenisch, R., Hochedlinger, K., et Yamada, Y. (2013) Dose-dependent roles for canonical Wnt signalling in de novo crypt formation and cell cycle properties of the colonic epithelium. *Development*. 140(1): 66-75.
- Hu, B., Elinav, E., Huber, S., Strowig, T., Hao, L., Hafemann, A., Jin, C., Wunderlich, C., Wunderlich, T., Eisenbarth, S.C., et Flavell, R.A. (2013) Microbiota-induced activation of epithelial IL-6 signaling links inflammasome-driven inflammation with transmissible cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 110(24): 9862-9867.
- Hue, S., Ahern, P., Buonocore, S., Kullberg, M.C., Cua, D.J., McKenzie, B.S., Powrie, F., et Maloy, K.J. (2006) Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J.Exp.Med.* 203(11): 2473-2483.
- Hufeldt, M.R., Nielsen, D.S., Vogensen, F.K., Midtvedt, T., et Hansen, A.K. (2010) Variation in the gut microbiota of laboratory mice is related to both genetic and environmental factors. *Comp.Med.* 60(5): 336-347.
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., et Thomas, G. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 411(6837): 599-603.
- Inagaki, K., Noguchi, T., Matozaki, T., Horikawa, T., Fukunaga, K., Tsuda, M., Ichihashi, M., et Kasuga, M. (2000) Roles for the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in cytoskeletal organization, cell adhesion and cell migration revealed by overexpression of a dominant negative mutant. *Oncogene*. 19(1): 75-84.
- Irrazabal, T., Belcheva, A., Girardin, S.E., Martin, A., et Philpott, D.J. (2014) The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. *Mol.Cell*. 54(2): 309-320.
- Issa, J.P. (2008) Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clin.Cancer Res*. 14(19): 5939-5940.
- Itzkowitz, S.H., et Yio, X. (2004) Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol*. 287(1): 7-17.
- Ivanov, A.I., Bachar, M., Babbitt, B.A., Adelstein, R.S., Nusrat, A., et Parkos, C.A. (2007) A unique role for nonmuscle myosin heavy chain IIA in regulation of epithelial apical junctions. *PLoS One*. 2(7): e658.
- Ivanov, A.I., Parkos, C.A., et Nusrat, A. (2010) Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. *Am.J.Pathol.* 177(2): 512-524.

Ivins Zito, C., Kontaridis, M.I., Fornaro, M., Feng, G.S., et Bennett, A.M. (2004) SHP-2 regulates the phosphatidylinositide 3'-kinase/Akt pathway and suppresses caspase 3-mediated apoptosis. *J.Cell.Physiol.* 199(2): 227-236.

Jakob, S., Schroeder, P., Lukosz, M., Buchner, N., Spyridopoulos, I., Altschmied, J., et Haendeler, J. (2008) Nuclear protein tyrosine phosphatase Shp-2 is one important negative regulator of nuclear export of telomerase reverse transcriptase. *J.Biol.Chem.* 283(48): 33155-33161.

Janssens, S., et Beyaert, R. (2002) A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem.Sci.* 27(9): 474-482.

Jenny, M., Uhl, C., Roche, C., Duluc, I., Guillermin, V., Guillemot, F., Jensen, J., Kedinger, M., et Gradwohl, G. (2002) Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J.* 21(23): 6338-6347.

Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., et Madsen, O.D. (2000) Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat.Genet.* 24(1): 36-44.

Jia, Z.F., Cao, X.Y., Cao, D.H., Kong, F., Kharbuja, P., et Jiang, J. (2013) Polymorphisms of PTPN11 gene could influence serum lipid levels in a sex-specific pattern. *Lipids Health.Dis.* 12(72).

Johansen, F.E., et Kaetzel, C.S. (2011) Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 4(6): 598-602.

Johansson, M.E. (2014) Mucus Layers in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm.Bowel Dis.* 20(11): 2124-2131.

Julien, S.G., Dube, N., Hardy, S., et Tremblay, M.L. (2011) Inside the human cancer tyrosine phosphatome. *Nat.Rev.Cancer.* 11(1): 35-49.

Kadota, C., Ishihara, S., Aziz, M.M., Rumi, M.A., Oshima, N., Mishima, Y., Moriyama, I., Yuki, T., Amano, Y., et Kinoshita, Y. (2010) Down-regulation of single immunoglobulin interleukin-1R-related molecule (SIGIRR)/TIR8 expression in intestinal epithelial cells during inflammation. *Clin.Exp.Immunol.* 162(2): 348-361.

Kamal, M., Wakelin, D., Ouellette, A.J., Smith, A., Podolsky, D.K., et Mahida, Y.R. (2001) Mucosal T cells regulate Paneth and intermediate cell numbers in the small intestine of *T. spiralis*-infected mice. *Clin.Exp.Immunol.* 126(1): 117-125.

Karam, S.M. (1999) Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front.Biosci.* 5(4): 286-298.

- Karrasch, T., et Jobin, C. (2008) NF-kappaB and the intestine: friend or foe? *Inflamm.Bowel Dis.* 14(1): 114-124.
- Kaser, A., Zeissig, S., et Blumberg, R.S. (2010) Inflammatory bowel disease. *Annu.Rev.Immunol.* (28): 573-621.
- Katz, J.P., Perreault, N., Goldstein, B.G., Lee, C.S., Labosky, P.A., Yang, V.W., et Kaestner, K.H. (2002) The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development.* 129(11): 2619-2628.
- Ke, Y., Lesperance, J., Zhang, E.E., Bard-Chapeau, E.A., Oshima, R.G., Muller, W.J., et Feng, G.S. (2006) Conditional deletion of Shp2 in the mammary gland leads to impaired lobulo-alveolar outgrowth and attenuated Stat5 activation. *J.Biol.Chem.* 281(45): 34374-34380.
- Ke, Y., Zhang, E.E., Hagihara, K., Wu, D., Pang, Y., Klein, R., Curran, T., Ranscht, B., et Feng, G.S. (2007) Deletion of Shp2 in the brain leads to defective proliferation and differentiation in neural stem cells and early postnatal lethality. *Mol.Cell.Biol.* 27(19): 6706-6717.
- Kelly, D., Campbell, J.I., King, T.P., Grant, G., Jansson, E.A., Coutts, A.G., Pettersson, S., et Conway, S. (2004) Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat.Immunol.* 5(1): 104-112.
- Khan, K.J., Ullman, T.A., Ford, A.C., Abreu, M.T., Abadir, A., Marshall, J.K., Talley, N.J., et Moayyedi, P. (2011) Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am.J.Gastroenterol.* 106(4): 661-673.
- Khor, B., Gardet, A., et Xavier, R.J. (2011) Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 474(7351): 307-317.
- Kim, H., Hawley, T.S., Hawley, R.G., et Baumann, H. (1998) Protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) moderates signaling by gp130 but is not required for the induction of acute-phase plasma protein genes in hepatic cells. *Mol.Cell.Biol.* 18(3): 1525-1533.
- Kim, S.C., Tonkonogy, S.L., Albright, C.A., Tsang, J., Balish, E.J., Braun, J., Huycke, M.M., et Sartor, R.B. (2005) Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology.* 128(4): 891-906.
- Kim, Y.S., et Ho, S.B. (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr.Gastroenterol.Rep.* 12(5): 319-330.

Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G., et Flavell, R.A. (2005) Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*. 307(5710): 731-734.

Kontaridis, M.I., Eminaga, S., Fornaro, M., Zito, C.I., Sordella, R., Settleman, J., et Bennett, A.M. (2004) SHP-2 positively regulates myogenesis by coupling to the Rho GTPase signaling pathway. *Mol.Cell.Biol.* 24(12): 5340-5352.

Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J., et Clevers, H. (1998) Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat.Genet.* 19(4): 379-383.

Koslowski, M.J., Kubler, I., Chamaillard, M., Schaeffeler, E., Reinisch, W., Wang, G., Beisner, J., Teml, A., Peyrin-Biroulet, L., Winter, S., Herrlinger, K.R., Rutgeerts, P., Vermeire, S., Cooney, R., Fellermann, K., Jewell, D., Bevins, C.L., Schwab, M., Stange, E.F., et Wehkamp, J. (2009) Genetic variants of Wnt transcription factor TCF-4 (TCF7L2) putative promoter region are associated with small intestinal Crohn's disease. *PLoS One*. 4(2): e4496.

Koslowski, M.J., Teltschik, Z., Beisner, J., Schaeffeler, E., Wang, G., Kubler, I., Gersemann, M., Cooney, R., Jewell, D., Reinisch, W., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Schwab, M., Stange, E.F., et Wehkamp, J. (2012) Association of a functional variant in the Wnt co-receptor LRP6 with early onset ileal Crohn's disease. *PLoS Genet.* 8(2): e1002523.

Kostic, A.D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J.N., Gallini, C.A., Michaud, M., Clancy, T.E., Chung, D.C., Lochhead, P., Hold, G.L., El-Omar, E.M., Brenner, D., Fuchs, C.S., Meyerson, M., et Garrett, W.S. (2013) *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell.Host Microbe*. 14(2): 207-215.

Kostic, A.D., Xavier, R.J., et Gevers, D. (2014) The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology*. 146(6): 1489-1499.

Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., et Wajant, H. (2001) NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol.Cell.Biol.* 21(12): 3964-3973.

Kwon, M., Ling, Y., Maile, L.A., Badley-Clark, J., et Clemmons, D.R. (2006) Recruitment of the tyrosine phosphatase Src homology 2 domain tyrosine phosphatase-2 to the p85 subunit of phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase is required for insulin-like growth factor-I-dependent PI-3 kinase activation in smooth muscle cells. *Endocrinology*. 147(3): 1458-1465.

Lavelle, E.C., Murphy, C., O'Neill, L.A., et Creagh, E.M. (2010) The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunol.* 3(1): 17-28.

Leary, R.J., Lin, J.C., Cummins, J., Boca, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Jones, S., Sjoblom, T., Park, B.H., Parsons, R., Willis, J., Dawson, D., Willson, J.K., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Kopelovich, L., Papadopoulos, N., Pennacchio, L.A., Wang, T.L., Markowitz, S.D., Parmigiani, G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., et Velculescu, V.E. (2008) Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105(42): 16224-16229.

Lee, H.H., et Chang, Z.F. (2008) Regulation of RhoA-dependent ROCKII activation by Shp2. *J.Cell Biol.* 181(6): 999-1012.

Lee, J., Mo, J.H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A.N., Liu, Y.T., Lee, H.K., Shen, C., Cojocar, G., Shenouda, S., Kagnoff, M., Eckmann, L., Ben-Neriah, Y., et Raz, E. (2006) Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat.Cell Biol.* 8(12): 1327-1336.

Lee, S.H., Hu, L.L., Gonzalez-Navajas, J., Seo, G.S., Shen, C., Brick, J., Herdman, S., Varki, N., Corr, M., Lee, J., et Raz, E. (2010) ERK activation drives intestinal tumorigenesis in Apc(min/+) mice. *Nat.Med.* 16(6): 665-670.

Leedham, S.J., Graham, T.A., Oukrif, D., McDonald, S.A., Rodriguez-Justo, M., Harrison, R.F., Shepherd, N.A., Novelli, M.R., Jankowski, J.A., et Wright, N.A. (2009) Clonality, founder mutations, and field cancerization in human ulcerative colitis-associated neoplasia. *Gastroenterology.* 136(2): 542-50.

Lehmann, U., Schmitz, J., Weissenbach, M., Sobota, R.M., Hortner, M., Friederichs, K., Behrmann, I., Tsiaris, W., Sasaki, A., Schneider-Mergener, J., Yoshimura, A., Neel, B.G., Heinrich, P.C., et Schaper, F. (2003) SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J.Biol.Chem.* 278(1): 661-671.

Lemieux, E., Boucher, M.J., Mongrain, S., Boudreau, F., Asselin, C., et Rivard, N. (2011) Constitutive activation of the MEK/ERK pathway inhibits intestinal epithelial cell differentiation. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 301(4): 719-730.

Leppkes, M., Roulis, M., Neurath, M.F., Kollias, G., et Becker, C. (2014) Pleiotropic functions of TNF- $\alpha$  in the regulation of the intestinal epithelial response to inflammation. *Int. Immunol.* 26(9): 509-513.

Li, L., Modi, H., McDonald, T., Rossi, J., Yee, J.K., et Bhatia, R. (2011) A critical role for SHP2 in STAT5 activation and growth factor-mediated proliferation, survival, and differentiation of human CD34+ cells. *Blood.* 118(6): 1504-1515.

Li, S., Couvillon, A.D., Brasher, B.B., et Van Etten, R.A. (2001) Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling. *EMBO J.* 20(23): 6793-6804.

- Li, Y., de Haar, C., Chen, M., Deuring, J., Gerrits, M.M., Smits, R., Xia, B., Kuipers, E.J., et van der Woude, C.J. (2010) Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut*. 59(2): 227-235.
- Liew, F.Y., Xu, D., Brint, E.K., et O'Neill, L.A. (2005) Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat.Rev.Immunol.* 5(6): 446-458.
- Lotz, M., Gutle, D., Walther, S., Menard, S., Bogdan, C., et Hornef, M.W. (2006) Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *J.Exp.Med.* 203(4): 973-984.
- Lowe, E.L., Crother, T.R., Rabizadeh, S., Hu, B., Wang, H., Chen, S., Shimada, K., Wong, M.H., Michelsen, K.S., et Arditi, M. (2010) Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer. *PLoS One*. 5(9): e13027.
- Lu, W., Gong, D., Bar-Sagi, D., et Cole, P.A. (2001) Site-specific incorporation of a phosphotyrosine mimetic reveals a role for tyrosine phosphorylation of SHP-2 in cell signaling. *Mol.Cell.* 8(4): 759-769.
- Lupp, C., Robertson, M.L., Wickham, M.E., Sekirov, I., Champion, O.L., Gaynor, E.C., et Finlay, B.B. (2007) Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell.Host Microbe*. 2(3): 204.
- Macpherson, A.J., McCoy, K.D., Johansen, F.E., et Brandtzaeg, P. (2008) The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 1(1): 11-22.
- Madara, J.L., et Carlson, S.L. (1985) Cup cells: further structural characterization of the brush border and the suggestion that they may serve as an attachment site for an unidentified bacillus in guinea pig ileum. *Gastroenterology*. 89(6): 1374-1386.
- Madara, J.L., Moore, R., et Carlson, S. (1987) Alteration of intestinal tight junction structure and permeability by cytoskeletal contraction. *Am.J.Physiol.* 253(6): 854-861.
- Madison, B.B., Dunbar, L., Qiao, X.T., Braunstein, K., Braunstein, E., et Gumucio, D.L. (2002) Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J.Biol.Chem.* 277(36): 33275-33283.
- Magalhaes, J.G., Tattoli, I., et Girardin, S.E. (2007) The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin.Immunol.* 19(2): 106-115.
- Malinen, E., Kassinen, A., Rinttila, T., et Palva, A. (2003) Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*. 149(1): 269-277.



Manichanh, C., Borruel, N., Casellas, F., et Guarner, F. (2012) The gut microbiota in IBD. *Nat.Rev.Gastroenterol.Hepatol.* 9(10): 599-608.

Mankertz, J., et Schulzke, J.D. (2007) Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 23(4): 379-383.

Mashimo, H., Wu, D.C., Podolsky, D.K., et Fishman, M.C. (1996) Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science.* 274(5285): 262-265.

Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H., et Tanaka, R. (2002) Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl.Environ.Microbiol.* 68(11): 5445-5451.

Matthews, R.J., Bowne, D.B., Flores, E., et Thomas, M.L. (1992) Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences. *Mol.Cell.Biol.* 12(5): 2396-2405.

McGuckin, M.A., Eri, R., Simms, L.A., Florin, T.H., et Radford-Smith, G. (2009) Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm.Bowel Dis.* 15(1): 100-113.

Medema, J.P., et Vermeulen, L. (2011) Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature.* 474(7351): 318-326.

Medzhitov, R. (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 449(7164): 819-826.

Meira, L.B., Bugni, J.M., Green, S.L., Lee, C.W., Pang, B., Borenshtein, D., Rickman, B.H., Rogers, A.B., Moroski-Erkul, C.A., McFaline, J.L., Schauer, D.B., Dedon, P.C., Fox, J.G., et Samson, L.D. (2008) DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J.Clin.Invest.* 118(7): 2516-2525.

Melmed, G., Thomas, L.S., Lee, N., Tesfay, S.Y., Lukasek, K., Michelsen, K.S., Zhou, Y., Hu, B., Arditi, M., et Abreu, M.T. (2003) Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J.Immunol.* 170(3): 1406-1415.

Meng, F., Zhao, X., et Zhang, S. (2013) SHP-2 phosphatase promotes cervical cancer cell proliferation through inhibiting interferon-beta production. *J.Obstet.Gynaecol.Res.* 39(1): 272-279.

Meng, T.C., Fukada, T., et Tonks, N.K. (2002) Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol.Cell.* 9(2): 387-399.

Meyer, T.A., Noguchi, Y., Ogle, C.K., Tiao, G., Wang, J.J., Fischer, J.E., et Hasselgren, P.O. (1994) Endotoxin stimulates interleukin-6 production in intestinal epithelial cells. A synergistic effect with prostaglandin E2. *Arch.Surg.* 129(12): 1290-1294.

Miller, H., Zhang, J., Kuolee, R., Patel, G.B., et Chen, W. (2007) Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World J.Gastroenterol.* 13(10): 1477-1486.

Miller, J.R. (2002) The Wnts. *Genome Biol.* 3(1): 3001.

Miquel, C., Borrini, F., Grandjouan, S., Auperin, A., Viguier, J., Velasco, V., Duvillard, P., Praz, F., et Sabourin, J.C. (2005) Role of bax mutations in apoptosis in colorectal cancers with microsatellite instability. *Am.J.Clin.Pathol.* 123(4): 562-570.

Mizoguchi, A. (2012) Animal models of inflammatory bowel disease. *Prog.Mol.Biol.Transl.Sci.* 105: 263-320.

Montagner, A., Yart, A., Dance, M., Perret, B., Salles, J.P., et Raynal, P. (2005) A novel role for Gab1 and SHP2 in epidermal growth factor-induced Ras activation. *J.Biol.Chem.* 280(7): 5350-5360.

Mori-Akiyama, Y., van den Born, M., van Es, J.H., Hamilton, S.R., Adams, H.P., Zhang, J., Clevers, H., et de Crombrughe, B. (2007) SOX9 is required for the differentiation of paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology.* 133(2): 539-546.

Moser, A.R., Pitot, H.C., et Dove, W.F. (1990) A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science.* 247(4940): 322-324.

Mudter, J., Weigmann, B., Bartsch, B., Kiesslich, R., Strand, D., Galle, P.R., Lehr, H.A., Schmidt, J., et Neurath, M.F. (2005) Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am.J.Gastroenterol.* 100(1): 64-72.

Muise, A.M., Walters, T., Wine, E., Griffiths, A.M., Turner, D., Duerr, R.H., Regueiro, M.D., Ngan, B.Y., Xu, W., Sherman, P.M., Silverberg, M.S., et Rotin, D. (2007) Protein-tyrosine phosphatase sigma is associated with ulcerative colitis. *Curr.Biol.* 17(14): 1212-1218.

Munkholm, P. (2003) Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 18(2): 1-5.

Murata, M., et Kawanishi, S. (2004) Oxidative DNA damage induced by nitrotyrosine, a biomarker of inflammation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 316(1): 123-128.

Murchie, R., Guo, C.H., Persaud, A., Muise, A., et Rotin, D. (2014) Protein tyrosine phosphatase sigma targets apical junction complex proteins in the intestine and regulates epithelial permeability. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 111(2): 693-698.

- Naito, Y., Takagi, T., et Yoshikawa, T. (2007) Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. *J.Clin.Biochem.Nutr.* 41(1): 18-26.
- Narumi, Y., Isomoto, H., Shiota, M., Sato, K., Kondo, S., Machida, H., Yanagihara, K., Mizuta, Y., Kohno, S., et Tsukamoto, K. (2009) Polymorphisms of PTPN11 coding SHP-2 as biomarkers for ulcerative colitis susceptibility in the Japanese population. *J.Clin.Immunol.* 29(3): 303-310.
- Neel, B.G., Gu, H., et Pao, L. (2003) The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem.Sci.* 28(6): 284-293.
- Nell, S., Suerbaum, S., et Josenhans, C. (2010) The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. *Nat.Rev.Microbiol.* 8(8): 564-577.
- Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., van Loo, G., Danese, S., Huth, M., Nikolaev, A., Neufert, C., Madison, B., Gumucio, D., Neurath, M.F., et Pasparakis, M. (2007) Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature.* 446(7135): 557-561.
- Neumann, P.A., Koch, S., Hilgarth, R.S., Perez-Chanona, E., Denning, P., Jobin, C., et Nusrat, A. (2014) Gut commensal bacteria and regional Wnt gene expression in the proximal versus distal colon. *Am.J.Pathol.* 184(3): 592-599.
- Neurath, M.F. (2014) Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat.Rev.Immunol.* 14(5): 329-342.
- Neurath, M.F., Pettersson, S., Meyer zum Buschenfelde, K.H., et Strober, W. (1996) Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat.Med.* 2(9): 998-1004.
- Neutra, M.R., Mantis, N.J., et Kraehenbuhl, J.P. (2001) Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat.Immunol.* 2(11): 1004-1009.
- Noah, T.K., Kazanjian, A., Whitsett, J., et Shroyer, N.F. (2010) SAM pointed domain ETS factor (SPDEF) regulates terminal differentiation and maturation of intestinal goblet cells. *Exp.Cell Res.* 316(3): 452-465.
- Noah, T.K., et Shroyer, N.F. (2013) Notch in the intestine: regulation of homeostasis and pathogenesis. *Annu.Rev.Physiol.* 75: 263-288.
- Ogura, Y., Lala, S., Xin, W., Smith, E., Dowds, T.A., Chen, F.F., Zimmermann, E., Tretiakova, M., Cho, J.H., Hart, J., Greenson, J.K., Keshav, S., et Nunez, G. (2003) Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut.* 52(11): 1591-1597.

- Oliver, B.L., Sha'afi, R.I., et Hajjar, J.J. (1994) Transforming growth factor-alpha increases tyrosine phosphorylation of microtubule-associated protein kinase in a small intestinal crypt cell line (IEC-6). *Biochem.J.* 303(2): 455-460.
- O'Neill, L.A. (2003) SIGIRR puts the brakes on Toll-like receptors. *Nat.Immunol.* 4(9): 823-824.
- Oron, T., Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Aizman, E., Brazowski, E., Kloog, Y., et Reif, S. (2012) Prevention of induced colitis in mice by the ras antagonist farnesylthiosalicylic acid. *Dig.Dis.Sci.* 57(2): 320-326.
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., et Seya, T. (2003) TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat.Immunol.* 4(2): 161-167.
- Ostman, A., Hellberg, C., et Bohmer, F.D. (2006) Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat.Rev.Cancer.* 6(4): 307-320.
- Otte, J.M., Cario, E., et Podolsky, D.K. (2004) Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 126(4): 1054-1070.
- Parsons, J.T., Horwitz, A.R., et Schwartz, M.A. (2010) Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 11(9): 633-643.
- Pasparakis, M. (2009) Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat.Rev.Immunol.* 9(11): 778-788.
- Paterson, J.C., et Watson, S.H. (1961) Paneth cell metaplasia in ulcerative colitis. *Am.J.Pathol.* 38: 243-249.
- Peterson, L.W., et Artis, D. (2014) Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat.Rev.Immunol.* 14(3): 141-153.
- Petnicki-Ocwieja, T., Hrcir, T., Liu, Y.J., Biswas, A., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., et Kobayashi, K.S. (2009) Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 106(37): 15813-15818.
- Philpott, D.J., Sorbara, M.T., Robertson, S.J., Croitoru, K., et Girardin, S.E. (2014) NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat.Rev.Immunol.* 14(1): 9-23.
- Pickert, G., Neufert, C., Leppkes, M., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., Lehr, H.A., Hirth, S., Weigmann, B., Wirtz, S., Ouyang, W., Neurath, M.F., et Becker, C. (2009) STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J.Exp.Med.* 206(7): 1465-1472.

- Piedra, J., Martinez, D., Castano, J., Miravet, S., Dunach, M., et de Herreros, A.G. (2001) Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 276(23): 20436-20443.
- Pierik, M., Joossens, S., Van Steen, K., Van Schuerbeek, N., Vlietinck, R., Rutgeerts, P., et Vermeire, S. (2006) Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm.Bowel Dis.* 12(1): 1-8.
- Pinkus, G.S., et Pinkus, J.L. (1991) Myeloperoxidase: a specific marker for myeloid cells in paraffin sections. *Mod.Pathol.* 4(6): 733-741.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., et Clevers, H. (2003) Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* 17(14): 1709-1713.
- Poole, A.W., et Jones, M.L. (2005) A SHPing tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cell.Signal.* 17(11): 1323-1332.
- Popivanova, B.K., Kitamura, K., Wu, Y., Kondo, T., Kagaya, T., Kaneko, S., Oshima, M., Fujii, C., et Mukaida, N. (2008) Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J.Clin.Invest.* 118(2): 560-570.
- Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K.L., Powell, R.M., MacDonald, T.T., et Collins, J.E. (2005) Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab.Invest.* 85(9): 1139-1162.
- Princen, F., Bard, E., Sheikh, F., Zhang, S.S., Wang, J., Zago, W.M., Wu, D., Trelles, R.D., Bailly-Maitre, B., Kahn, C.R., Chen, Y., Reed, J.C., Tong, G.G., Mercola, M., Chen, J., et Feng, G.S. (2009) Deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in muscle leads to dilated cardiomyopathy, insulin resistance, and premature death. *Mol.Cell.Biol.* 29(2): 378-388.
- Qu, C.K., et Feng, G.S. (1998) Shp-2 has a positive regulatory role in ES cell differentiation and proliferation. *Oncogene.* 17(4): 433-439.
- Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R.L., et Isselbacher, K.J. (1979) Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J.Cell Biol.* 80(2): 248-265.
- Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., et Velculescu, V.E. (2002) Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature.* 418(6901): 934.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., et Medzhitov, R. (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 118(2): 229-241.

- Ramos, J.W. (2008) The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 40(12): 2707-2719.
- Rathinam, V.A., Vanaja, S.K., et Fitzgerald, K.A. (2012) Regulation of inflammasome signaling. *Nat.Immunol.* 13(4): 333-342.
- Ray, R.M., Patel, A., Viar, M.J., McCormack, S.A., Zheng, Y., Tigyi, G., et Johnson, L.R. (2002) RhoA inactivation inhibits cell migration but does not mediate the effects of polyamine depletion. *Gastroenterology.* 123(1): 196-205.
- Ray, R.M., Vaidya, R.J., et Johnson, L.R. (2007) MEK/ERK regulates adherens junctions and migration through Rac1. *Cell Motil.Cytoskeleton.* 64(3): 143-156.
- Ren, Y., Chen, Z., Chen, L., Fang, B., Win-Piazza, H., Haura, E., Koomen, J.M., et Wu, J. (2010) Critical role of Shp2 in tumor growth involving regulation of c-Myc. *Genes Cancer.* 1(10): 994-1007.
- Reth, M., et Brummer, T. (2004) Feedback regulation of lymphocyte signalling. *Nat.Rev.Immunol.* 4(4): 269-277.
- Reya, T., et Clevers, H. (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 434(7035): 843-850.
- Rindi, G., Leiter, A.B., Kopin, A.S., Bordi, C., et Solcia, E. (2004) The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1014: 1-12.
- Rivard, N., Boucher, M.J., Asselin, C., et L'Allemain, G. (1999) MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *Am.J.Physiol.* 277(4): 652-664.
- Rivard, N., L'Allemain, G., Bartek, J., et Pouyssegur, J. (1996) Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 271(31): 18337-18341.
- Rivard, N., McKenzie, F.R., Brondello, J.M., et Pouyssegur, J. (1995) The phosphotyrosine phosphatase PTP1D, but not PTP1C, is an essential mediator of fibroblast proliferation induced by tyrosine kinase and G protein-coupled receptors. *J.Biol.Chem.* 270(18): 11017-11024.
- Roberts, P.J., et Der, C.J. (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.* 26(22): 3291-3310.
- Roda, G., Sartini, A., Zambon, E., Calafiore, A., Marocchi, M., Caponi, A., Belluzzi, A., et Roda, E. (2010) Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J.Gastroenterol.* 16(34): 4264-4271.

Roessner, A., Kuester, D., Malfertheiner, P., et Schneider-Stock, R. (2008) Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathol.Res.Pract.* 204(7): 511-524.

Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P.A., Scholmerich, J., et Gross, V. (1998) Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology.* 115(2): 357-369.

Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destree, O., et Clevers, H. (1998) The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature.* 395(6702): 608-612.

Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., Garcia de Herreros, A., et Dunach, M. (1999) Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 274(51): 36734-36740.

Rovedatti, L., Kudo, T., Biancheri, P., Sarra, M., Knowles, C.H., Rampton, D.S., Corazza, G.R., Monteleone, G., Di Sabatino, A., et Macdonald, T.T. (2009) Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut.* 58(12): 1629-1636.

Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., et Polakis, P. (1996) Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science.* 272(5264): 1023-1026.

Rubino, S.J., Selvanantham, T., Girardin, S.E., et Philpott, D.J. (2012) Nod-like receptors in the control of intestinal inflammation. *Curr.Opin.Immunol.* 24(4): 398-404.

Sallee, J.L., et Burridge, K. (2009) Density-enhanced phosphatase 1 regulates phosphorylation of tight junction proteins and enhances barrier function of epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 284(22): 14997-15006.

Salvi, M., Stringaro, A., Brunati, A.M., Agostinelli, E., Arancia, G., Clari, G., et Toninello, A. (2004) Tyrosine phosphatase activity in mitochondria: presence of Shp-2 phosphatase in mitochondria. *Cell Mol.Life Sci.* 61(18): 2393-2404.

Salzman, N.H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjoberg, J., Amir, E., Tegatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., Stoel, M., Zhou, Y., Sodergren, E., Weinstock, G.M., Bevins, C.L., Williams, C.B., et Bos, N.A. (2010) Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat.Immunol.* 11(1): 76-83.

Sanders, M.A., et Basson, M.D. (2004) Collagen IV regulates Caco-2 migration and ERK activation via alpha1beta1- and alpha2beta1-integrin-dependent Src kinase activation. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 286(4): 547-557.

- Santaolalla, R., Sussman, D.A., Ruiz, J.R., Davies, J.M., Pastorini, C., Espana, C.L., Sotolongo, J., Burlingame, O., Bejarano, P.A., Philip, S., Ahmed, M.M., Ko, J., Dirisina, R., Barrett, T.A., Shang, L., Lira, S.A., Fukata, M., et Abreu, M.T. (2013) TLR4 activates the beta-catenin pathway to cause intestinal neoplasia. *PLoS One*. 8(5): e63298.
- Santos, M.F., McCormack, S.A., Guo, Z., Okolicany, J., Zheng, Y., Johnson, L.R., et Tigyi, G. (1997) Rho proteins play a critical role in cell migration during the early phase of mucosal restitution. *J.Clin.Invest.* 100(1): 216-225.
- Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., et Clevers, H. (2011) Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*. 469(7330): 415-418.
- Saxton, T.M., Henkemeyer, M., Gasca, S., Shen, R., Rossi, D.J., Shalaby, F., Feng, G.S., et Pawson, T. (1997) Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2. *EMBO J.* 16(9): 2352-2364.
- Schaedler, R.W., Dubos, R., et Costello, R. (1965) The Development of the Bacterial Flora in the Gastrointestinal Tract of Mice. *J.Exp.Med.* 122: 59-66.
- Schoenwaelder, S.M., Petch, L.A., Williamson, D., Shen, R., Feng, G.S., et BurrIDGE, K. (2000) The protein tyrosine phosphatase Shp-2 regulates RhoA activity. *Curr.Biol.* 10(23): 1523-1526.
- Scholtens, P.A., Oozeer, R., Martin, R., Amor, K.B., et Knol, J. (2012) The early settlers: intestinal microbiology in early life. *Annu.Rev.Food Sci.Technol.* 3: 425-447.
- Schonhoff, S.E., Giel-Moloney, M., et Leiter, A.B. (2004) Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology*. 145(6): 2639-2644.
- Schreiber, S., Nikolaus, S., et Hampe, J. (1998) Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut*. 42(4): 477-484.
- Schroder, N., et Gossler, A. (2002) Expression of Notch pathway components in fetal and adult mouse small intestine. *Gene Expr.Patterns*. 2(3-4): 247-250.
- Schulzke, J.D., Ploeger, S., Amasheh, M., Fromm, A., Zeissig, S., Troeger, H., Richter, J., Bojarski, C., Schumann, M., et Fromm, M. (2009) Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1165: 294-300.
- Scoville, D.H., Sato, T., He, X.C., et Li, L. (2008) Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology*. 134(3): 849-864.
- Segditsas, S., et Tomlinson, I. (2006) Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene*. 25(57): 7531-7537.



Shaked, H., Hofseth, L.J., Chumanevich, A., Chumanevich, A.A., Wang, J., Wang, Y., Taniguchi, K., Guma, M., Shenouda, S., Clevers, H., Harris, C.C., et Karim, M. (2012) Chronic epithelial NF- $\kappa$ B activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 109(35): 14007-14012.

Shang, L., Fukata, M., Thirunarayanan, N., Martin, A.P., Arnaboldi, P., Maussang, D., Berin, C., Unkeless, J.C., Mayer, L., Abreu, M.T., et Lira, S.A. (2008) Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. *Gastroenterology.* 135(2): 529-538.

Sharma, S.V., Bell, D.W., Settleman, J., et Haber, D.A. (2007) Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat.Rev.Cancer.* 7(3): 169-181.

Shembade, N., Harhaj, N.S., Parvatiyar, K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Matesic, L.E., et Harhaj, E.W. (2008) The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20. *Nat.Immunol.* 9(3): 254-262.

Sheng, Y.H., Hasnain, S.Z., Florin, T.H., et McGuckin, M.A. (2012) Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 27(1): 28-38.

Shenoy, A.K., Fisher, R.C., Butterworth, E.A., Pi, L., Chang, L.J., Appelman, H.D., Chang, M., Scott, E.W., et Huang, E.H. (2012) Transition from colitis to cancer: high Wnt activity sustains the tumor-initiating potential of colon cancer stem cell precursors. *Cancer Res.* 72(19): 5091-5100.

Shi, J. (2007) Defensins and Paneth cells in inflammatory bowel disease. *Inflamm.Bowel Dis.* 13(10): 1284-1292.

Shibata, W., Maeda, S., Hikiba, Y., Yanai, A., Ohmae, T., Sakamoto, K., Nakagawa, H., Ogura, K., et Omata, M. (2007) Cutting edge: The IkappaB kinase (IKK) inhibitor, NEMO-binding domain peptide, blocks inflammatory injury in murine colitis. *J.Immunol.* 179(5): 2681-2685.

Shibolet, O., et Podolsky, D.K. (2007) TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 292(6): 1469-1473.

Shroyer, N.F., Wallis, D., Venken, K.J., Bellen, H.J., et Zoghbi, H.Y. (2005) Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev.* 19(20): 2412-2417.

Simoneau, M., Coulombe, G., Vandal, G., Vezina, A., et Rivard, N. (2011) SHP-1 inhibits beta-catenin function by inducing its degradation and interfering with its association with TATA-binding protein. *Cell.Signal.* 23(1): 269-279.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., et Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* 150(1): 76-85.

Sodhi, C.P., Neal, M.D., Siggers, R., Sho, S., Ma, C., Branca, M.F., Prindle, T., Jr., Russo, A.M., Afrazi, A., Good, M., Brower-Sinning, R., Firek, B., Morowitz, M.J., Ozolek, J.A., Gittes, G.K., Billiar, T.R., et Hackam, D.J. (2012) Intestinal epithelial Toll-like receptor 4 regulates goblet cell development and is required for necrotizing enterocolitis in mice. *Gastroenterology.* 143(3): 708-718.

Staddon, J.M., Herrenknecht, K., Smales, C., et Rubin, L.L. (1995) Evidence that tyrosine phosphorylation may increase tight junction permeability. *J.Cell.Sci.* 108(2): 609-619.

Stadnyk, A.W. (2002) Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can.J.Gastroenterol.* 16(4): 241-246.

Stanger, B.Z., Datar, R., Murtaugh, L.C., et Melton, D.A. (2005) Direct regulation of intestinal fate by Notch. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102(35): 12443-12448.

Stehlik, C., de Martin, R., Binder, B.R., et Lipp, J. (1998a) Cytokine induced expression of porcine inhibitor of apoptosis protein (iap) family member is regulated by NF-kappa B. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 243(3): 827-832.

Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J.A., Binder, B.R., et Lipp, J. (1998b) Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J.Exp.Med.* 188(1): 211-216.

Stein-Gerlach, M., Wallasch, C., et Ullrich, A. (1998) SHP-2, SH2-containing protein tyrosine phosphatase-2. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 30(5): 559-566.

Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., et Dove, W.F. (1992) Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science.* 256(5057): 668-670.

Sun, H., et Tonks, N.K. (1994) The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem.Sci.* 19(11): 480-485.

Sutherland, L., Singleton, J., Sessions, J., Hanauer, S., Krawitt, E., Rankin, G., Summers, R., Mekhjian, H., Greenberger, N., et Kelly, M. (1991) Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut.* 32(9): 1071-1075.

Suzuki, A., Hanada, T., Mitsuyama, K., Yoshida, T., Kamizono, S., Hoshino, T., Kubo, M., Yamashita, A., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S., Matsumoto, S., Toyonaga, A., Sata, M., et Yoshimura, A. (2001) CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J.Exp.Med.* 193(4): 471-481.

Suzuki, K., Fukui, H., Kayahara, T., Sawada, M., Seno, H., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H., et Chiba, T. (2005) Hes1-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 328(1): 348-352.

Takahashi, A., Tsutsumi, R., Kikuchi, I., Obuse, C., Saito, Y., Seidi, A., Karisch, R., Fernandez, M., Cho, T., Ohnishi, N., Rozenblatt-Rosen, O., Meyerson, M., Neel, B.G., et Hatakeyama, M. (2011) SHP2 tyrosine phosphatase converts parafibromin/Cdc73 from a tumor suppressor to an oncogenic driver. *Mol.Cell.* 43(1): 45-56.

Takahashi, M., Nakatsugi, S., Sugimura, T., et Wakabayashi, K. (2000) Frequent mutations of the beta-catenin gene in mouse colon tumors induced by azoxymethane. *Carcinogenesis.* 21(6): 1117-1120.

Tanabe, H., Sato, T., Watari, J., Maemoto, A., Fujiya, M., Kono, T., Ashida, T., Ayabe, T., et Kohgo, Y. (2008) Functional role of metaplastic paneth cell defensins in *Helicobacter pylori*-infected stomach. *Helicobacter.* 13(5): 370-379.

Tanaka, M., Kamata, R., et Sakai, R. (2005) EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of Claudin-4 and mediates paracellular permeability. *J.Biol.Chem.* 280(51): 42375-42382.

Tanaka, M., Saito, H., Kusumi, T., Fukuda, S., Shimoyama, T., Sasaki, Y., Suto, K., Munakata, A., et Kudo, H. (2001) Spatial distribution and histogenesis of colorectal Paneth cell metaplasia in idiopathic inflammatory bowel disease. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 16(12): 1353-1359.

Tartaglia, M., Gelb, B.D., et Zenker, M. (2011) Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab.* 25(1): 161-179.

Tartaglia, M., Kalidas, K., Shaw, A., Song, X., Musat, D.L., van der Burgt, I., Brunner, H.G., Bertola, D.R., Crosby, A., Ion, A., Kucherlapati, R.S., Jeffery, S., Patton, M.A., et Gelb, B.D. (2002) PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am.J.Hum.Genet.* 70(6): 1555-1563.

Tartaglia, M., Martinelli, S., Cazzaniga, G., Cordeddu, V., Iavarone, I., Spinelli, M., Palmi, C., Carta, C., Pession, A., Arico, M., Masera, G., Basso, G., Sorcini, M., Gelb, B.D., et Biondi, A. (2004) Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. *Blood.* 104(2): 307-313.

Tartaglia, M., Mehler, E.L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H.G., Kremer, H., van der Burgt, I., Crosby, A.H., Ion, A., Jeffery, S., Kalidas, K., Patton, M.A., Kucherlapati, R.S., et Gelb, B.D. (2001) Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat.Genet.* 29(4): 465-468.

Taupin, D., et Podolsky, D.K. (1999) Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. *Gastroenterology.* 116(5): 1072-1080.

Taupin, D., et Podolsky, D.K. (2003) Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 4(9): 721-732.

Tebbutt, N.C., Giraud, A.S., Inglese, M., Jenkins, B., Waring, P., Clay, F.J., Malki, S., Alderman, B.M., Grail, D., Hollande, F., Heath, J.K., et Ernst, M. (2002) Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nat.Med.* 8(10): 1089-1097.

Tenesa, A., et Dunlop, M.G. (2009) New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nat.Rev.Genet.* 10(6): 353-358.

Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., et Karin, M. (2010) Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology.* 138(6): 2101-2114.

Tetsu, O., et McCormick, F. (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature.* 398(6726): 422-426.

Thibodeau, S.N., Bren, G., et Schaid, D. (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 260(5109): 816-819.

Tien, S.C., et Chang, Z.F. (2014) Oncogenic Shp2 disturbs microtubule regulation to cause HDAC6-dependent ERK hyperactivation. *Oncogene.* 33(22): 2938-2946.

Tonks, N.K. (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 7(11): 833-846.

Tonks, N.K., Diltz, C.D., et Fischer, E.H. (1988) Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J.Biol.Chem.* 263(14): 6722-6730.

Torok, H.P., Glas, J., Endres, I., Tonenchi, L., Teshome, M.Y., Wetzke, M., Klein, W., Lohse, P., Ochsenkuhn, T., Folwaczny, M., Goke, B., Folwaczny, C., Muller-Myhsok, B., et Brand, S. (2009) Epistasis between Toll-like receptor-9 polymorphisms and variants in NOD2 and IL23R modulates susceptibility to Crohn's disease. *Am.J.Gastroenterol.* 104(7): 1723-1733.

Tortora, G., et Grabowski, S. (1994). Principes d'anatomie et de physiologie. *CEC*, Anjou, 1-1204.

Troughton, W.D., et Trier, J.S. (1969) Paneth and goblet cell renewal in mouse duodenal crypts. *J.Cell Biol.* 41(1): 251-268.

Tsutsumi, R., Masoudi, M., Takahashi, A., Fujii, Y., Hayashi, T., Kikuchi, I., Satou, Y., Taira, M., et Hatakeyama, M. (2013) YAP and TAZ, Hippo signaling targets, act as a rheostat for nuclear SHP2 function. *Dev.Cell.* 26(6): 658-665.

- Turner, J.R. (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat.Rev.Immunol.* 9(11): 799-809.
- Ullman, T.A., et Itzkowitz, S.H. (2011) Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology.* 140(6): 1807-1816.
- Umetani, N., Sasaki, S., Watanabe, T., Shinozaki, M., Matsuda, K., Ishigami, H., Ueda, E., et Muto, T. (1999) Genetic alterations in ulcerative colitis-associated neoplasia focusing on APC, K-ras gene and microsatellite instability. *Jpn.J.Cancer Res.* 90(10): 1081-1087.
- Uronis, J.M., Muhlbauer, M., Herfarth, H.H., Rubinas, T.C., Jones, G.S., et Jobin, C. (2009) Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One.* 4(6): e6026.
- Utech, M., Mennigen, R., et Bruewer, M. (2010) Endocytosis and recycling of tight junction proteins in inflammation. *J.Biomed.Biotechnol.* 2010: 484987.
- Vachon, P.H., et Beaulieu, J.F. (1992) Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology.* 103(2): 414-423.
- Vaishnava, S., Behrendt, C.L., Ismail, A.S., Eckmann, L., et Hooper, L.V. (2008) Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105(52): 20858-20863.
- Vaishnava, S., Yamamoto, M., Severson, K.M., Ruhn, K.A., Yu, X., Koren, O., Ley, R., Wakeland, E.K., et Hooper, L.V. (2011) The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science.* 334(6053): 255-258.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Battle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R., et Clevers, H. (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell.* 111(2): 241-250.
- van der Flier, L. G., et Clevers, H. (2009) Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu.Rev.Physiol.* 71: 241-260.
- Van der Sluis, M., De Koning, B.A., De Bruijn, A.C., Velcich, A., Meijerink, J.P., Van Goudoever, J.B., Buller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B., et Einerhand, A.W. (2006) Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology.* 131(1): 117-129.
- van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., et Clevers, H. (2005) Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature.* 435(7044): 959-963.

Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., et Horwitz, A.R. (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 10(11): 778-790.

Vijay-Kumar, M., Sanders, C.J., Taylor, R.T., Kumar, A., Aitken, J.D., Sitaraman, S.V., Neish, A.S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I.R., et Gewirtz, A.T. (2007) Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J.Clin.Invest.* 117(12): 3909-3921.

Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y., Naramura, M., Tian, L., Towne, J., Sims, J.E., Stark, G.R., et Li, X. (2003) SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat.Immunol.* 4(9): 920-927.

Wallis, Y.L., Morton, D.G., McKeown, C.M., et Macdonald, F. (1999) Molecular analysis of the APC gene in 205 families: extended genotype-phenotype correlations in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition. *J.Med.Genet.* 36(1): 14-20.

Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D.M., Munro, K., et Alatossava, T. (2000) Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl.EnvIRON.Microbiol.* 66(1): 297-303.

Wang, G., Jin, C., Hou, Y., Zhang, L., Li, S., Zhang, L., Wu, B., Li, Q., Xu, C., Tian, Y., et Zhang, L. (2012) Overexpression of Shp-2 attenuates apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes through the ERK pathway. *Exp.Mol.Pathol.* 93(1): 50-55.

Wang, K., Yuan, C.P., Wang, W., Yang, Z.Q., Cui, W., Mu, L.Z., Yue, Z.P., Yin, X.L., Hu, Z.M., et Liu, J.X. (2010) Expression of interleukin 6 in brain and colon of rats with TNBS-induced colitis. *World J.Gastroenterol.* 16(18): 2252-2259.

Wang, S., Yu, W.M., Zhang, W., McCrae, K.R., Neel, B.G., et Qu, C.K. (2009) Noonan syndrome/leukemia-associated gain-of-function mutations in SHP-2 phosphatase (PTPN11) enhance cell migration and angiogenesis. *J.Biol.Chem.* 284(2): 913-920.

Wang, S.L., Wang, Z.R., et Yang, C.Q. (2012) Meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active inflammatory bowel disease. *Exp.Ther.Med.* 4(6): 1051-1056.

Warner, N., et Nunez, G. (2013) MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction. *J.Immunol.* 190(1): 3-4.

Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schaffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schroder, J.M., Bevins, C.L., Fellermann, K., et Stange, E.F. (2004) NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut.* 53(11): 1658-1664.

Wehkamp, J., Wang, G., Kubler, I., Nuding, S., Gregorieff, A., Schnabel, A., Kays, R.J., Fellermann, K., Burk, O., Schwab, M., Clevers, H., Bevins, C.L., et Stange, E.F. (2007) The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J.Immunol.* 179(5): 3109-3118.

Welf, E.S., et Haugh, J.M. (2011) Signaling pathways that control cell migration: models and analysis. *Wiley Interdiscip.Rev.Syst.Biol.Med.* 3(2): 231-240.

Welz, P.S., Wullaert, A., Vlantis, K., Kondylis, V., Fernandez-Majada, V., Ermolaeva, M., Kirsch, P., Sterner-Kock, A., van Loo, G., et Pasparakis, M. (2011) FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation. *Nature.* 477(7364): 330-334.

Wellcome Trust Case Control Consortium (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 447(7145): 661-678.

Wells, J.M., Loonen, L.M., et Karczewski, J.M. (2010) The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. *Int.J.Med.Microbiol.* 300(1): 41-48.

Wikoff, W.R., Anfora, A.T., Liu, J., Schultz, P.G., Lesley, S.A., Peters, E.C., et Siuzdak, G. (2009) Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 106(10): 3698-3703.

Wilson, C.L., Ouellette, A.J., Satchell, D.P., Ayabe, T., Lopez-Boado, Y.S., Stratman, J.L., Hultgren, S.J., Matrisian, L.M., et Parks, W.C. (1999) Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science.* 286(5437): 113-117.

Wirtz, S., et Neurath, M.F. (2007) Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 59(11): 1073-1083.

Wolf, G. (2006) Gut microbiota: a factor in energy regulation. *Nutr.Rev.* 64(1): 47-50.

Wood, L.D., Parsons, D.W., Jones, S., Lin, J., Sjoblom, T., Leary, R.J., Shen, D., Boca, S.M., Barber, T., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Dezso, Z., Ustyansky, V., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Karchin, R., Wilson, P.A., Kaminker, J.S., Zhang, Z., Croshaw, R., Willis, J., Dawson, D., Shipitsin, M., Willson, J.K., Sukumar, S., Polyak, K., Park, B.H., Pethiyagoda, C.L., Pant, P.V., Ballinger, D.G., Sparks, A.B., Hartigan, J., Smith, D.R., Suh, E., Papadopoulos, N., Buckhaults, P., Markowitz, S.D., Parmigiani, G., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., et Vogelstein, B. (2007) The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science.* 318(5853): 1108-1113.

Wu, C.J., O'Rourke, D.M., Feng, G.S., Johnson, G.R., Wang, Q., et Greene, M.I. (2001) The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for mediating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by growth factors. *Oncogene.* 20(42): 6018-6025.

- Wu, S., Rhee, K.J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.R., Huso, D.L., Brancati, F.L., Wick, E., McAllister, F., Housseau, F., Pardoll, D.M., et Sears, C.L. (2009) A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat.Med.* 15(9): 1016-1022.
- Wu, T.R., Hong, Y.K., Wang, X.D., Ling, M.Y., Dragoi, A.M., Chung, A.S., Campbell, A.G., Han, Z.Y., Feng, G.S., et Chin, Y.E. (2002) SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J.Biol.Chem.* 277(49): 47572-47580.
- Xavier, R.J., et Podolsky, D.K. (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 448(7152): 427-434.
- Xiao, H., Gulen, M.F., Qin, J., Yao, J., Bulek, K., Kish, D., Altuntas, C.Z., Wald, D., Ma, C., Zhou, H., Tuohy, V.K., Fairchild, R.L., de la Motte, C., Cua, D., Vallance, B.A., et Li, X. (2007) The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. *Immunity.* 26(4): 461-475.
- Xu, D., et Qu, C.K. (2008) Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front.Biosci.* 13: 4925-4932.
- Xu, F., Zhao, R., Peng, Y., Guerrah, A., et Zhao, Z.J. (2001) Association of tyrosine phosphatase SHP-2 with F-actin at low cell densities. *J.Biol.Chem.* 276(31): 29479-29484.
- Xu, J., et Gordon, J.I. (2003) Honor thy symbionts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100(18): 10452-10459.
- Xu, S., Liu, X., Bao, Y., Zhu, X., Han, C., Zhang, P., Zhang, X., Li, W., et Cao, X. (2012) Constitutive MHC class I molecules negatively regulate TLR-triggered inflammatory responses via the Fps-SHP-2 pathway. *Nat.Immunol.* 13(6): 551-559.
- Xu, W., He, B., Chiu, A., Chadburn, A., Shan, M., Buldys, M., Ding, A., Knowles, D.M., Santini, P.A., et Cerutti, A. (2007) Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat.Immunol.* 8(3): 294-303.
- Yamashita, Y., Saito, Y., Murata-Kamiya, N., et Hatakeyama, M. (2011) Polarity-regulating kinase partitioning-defective 1b (PAR1b) phosphorylates guanine nucleotide exchange factor H1 (GEF-H1) to regulate RhoA-dependent actin cytoskeletal reorganization. *J.Biol.Chem.* 286(52): 44576-44584.
- Yamashita, H., Kotani, T., Park, J.H., Murata, Y., Okazawa, H., Ohnishi, H., Ku, Y., et Matozaki, T. (2014) Role of the protein tyrosine phosphatase Shp2 in homeostasis of the intestinal epithelium. *PLoS One.* 9(3): e92904.



- Yan, F., John, S.K., Wilson, G., Jones, D.S., Washington, M.K., et Polk, D.B. (2004) Kinase suppressor of Ras-1 protects intestinal epithelium from cytokine-mediated apoptosis during inflammation. *J.Clin.Invest.* 114(9): 1272-1280.
- Yang, Q., Bermingham, N.A., Finegold, M.J., et Zoghbi, H.Y. (2001) Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science.* 294(5549): 2155-2158.
- Yao, J., Zhao, L., Zhao, Q., Zhao, Y., Sun, Y., Zhang, Y., Miao, H., You, Q.D., Hu, R., et Guo, Q.L. (2014) NF-kappaB and Nrf2 signaling pathways contribute to wogonin-mediated inhibition of inflammation-associated colorectal carcinogenesis. *Cell.Death Dis.* 5: e1283.
- Yi, T.L., Cleveland, J.L., et Ihle, J.N. (1992) Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13. *Mol.Cell.Biol.* 12(2): 836-846.
- Yo, K., Iwata, S., Hashizume, Y., Kondo, S., Nomura, S., Hosono, O., Kawasaki, H., Tanaka, H., Dang, N.H., et Morimoto, C. (2009) SHP-2 inhibits tyrosine phosphorylation of Cas-L and regulates cell migration. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 382(1): 210-214.
- You, J., Nguyen, A.V., Albers, C.G., Lin, F., et Holcombe, R.F. (2008) Wnt pathway-related gene expression in inflammatory bowel disease. *Dig.Dis.Sci.* 53(4): 1013-1019.
- You, M., Flick, L.M., Yu, D., et Feng, G.S. (2001) Modulation of the nuclear factor kappa B pathway by Shp-2 tyrosine phosphatase in mediating the induction of interleukin (IL)-6 by IL-1 or tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* 193(1): 101-110.
- Yu, C.L., Jin, Y.J., et Burakoff, S.J. (2000) Cytosolic tyrosine dephosphorylation of STAT5. Potential role of SHP-2 in STAT5 regulation. *J.Biol.Chem.* 275(1): 599-604.
- Yu, D.H., Qu, C.K., Henegariu, O., Lu, X., et Feng, G.S. (1998) Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. *J.Biol.Chem.* 273(33): 21125-21131.
- Yu, H., et Jove, R. (2004) The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat.Rev.Cancer.* 4(2): 97-105.
- Zaki, M.H., Vogel, P., Body-Malapel, M., Lamkanfi, M., et Kanneganti, T.D. (2010) IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *J.Immunol.* 185(8): 4912-4920.
- Zhang, E.E., Chapeau, E., Hagihara, K., et Feng, G.S. (2004) Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101(45): 16064-16069.

Zhang, G., et Ghosh, S. (2002) Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J.Biol.Chem.* 277(9): 7059-7065.

Zhang, S.Q., Tsiaras, W.G., Araki, T., Wen, G., Minichiello, L., Klein, R., et Neel, B.G. (2002) Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. *Mol.Cell.Biol.* 22(12): 4062-4072.

Zhang, W., Chan, R.J., Chen, H., Yang, Z., He, Y., Zhang, X., Luo, Y., Yin, F., Moh, A., Miller, L.C., Payne, R.M., Zhang, Z.Y., Fu, X.Y., et Shou, W. (2009) Negative regulation of Stat3 by activating PTPN11 mutants contributes to the pathogenesis of Noonan syndrome and juvenile myelomonocytic leukemia. *J.Biol.Chem.* 284(33): 22353-22363.

Zhang, X., Zhang, Y., Tao, B., Teng, L., Li, Y., Cao, R., Gui, Q., Ye, M., Mou, X., Cheng, H., Hu, H., Zhou, R., Wu, X., Xie, Q., Ning, W., Lai, M., Shen, H., Feng, G.S., et Ke, Y. (2012) Loss of Shp2 in alveoli epithelia induces deregulated surfactant homeostasis, resulting in spontaneous pulmonary fibrosis. *FASEB J.* 26(6): 2338-2350.

Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.Y., et Guan, K.L. (2010) A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev.* 24(1): 72-85.

Zheng, H., Pritchard, D.M., Yang, X., Bennett, E., Liu, G., Liu, C., et Ai, W. (2009) KLF4 gene expression is inhibited by the notch signaling pathway that controls goblet cell differentiation in mouse gastrointestinal tract. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 296(3): 490-498.

Zheng, X., Tsuchiya, K., Okamoto, R., Iwasaki, M., Kano, Y., Sakamoto, N., Nakamura, T., et Watanabe, M. (2011) Suppression of *hath1* gene expression directly regulated by *hes1* via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. *Inflamm.Bowel Dis.* 17(11): 2251-2260.

## Annexes

### Annexe 1: Liste complète des substrats potentiels de SHP-2 suite à un traitement avec le LPS

Protéines	Identification	Non traitées	15min LPS	30min LPS
Tpm1;Tpm2 (Tropomyosin alpha-1 chain; beta chain)	Q63607;Q63583;P04692; Q91XN6;Q5FVG5;P58775; Q3SX28;Q6AZ25;Q923Z2		8,07	11,79
Mri1 (Methylthioribose-1-phosphate isomerase)	Q5HZE4		6,91	
Myo1c (Unconventional myosin-Ic)	Q63355		6,78	7,10
Myl6 (Myosin light polypeptide 6)	Q64119;B2GV99;M0RC91; M0RCG4;D3ZHA7	0,51	6,36	21,56
Paics (Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase)	P51583	1,92	6,26	
Mgp (Matrix Gla protein)	Q5RK05;P08494		6,14	
Myh9 (Myosin-9)	G3V6P7;Q62812		5,98	25,28
Cdh19 (Cadherin 19)	Q5NUI3		5,38	4,51
Atn1 (Atrophin-1)	P54258;G3V7W3		4,39	0,82
Lsm14a (Lsm14a protein)	B2GV58		4,23	1,58
Ctgf (Connective tissue growth factor)	Q9R1E9;Q9R2C0;Q6IN11	1,43	4,03	
Ube2d1 (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D1)	D3ZDK2		3,98	
Slc25a13 ( solute carrier family 25 aspartate/glutamate carrier, member 1)	F1LZW6		3,69	
Ugt1a6;Ugt1a1 (UDP-glucuronosyltransferase 1-6)	Q64671;Q63662;P08430; Q6T5E9;P97886;Q91Y43	0,78	3,52	
Myl12b;Rlc-a;Myl9 (Myosin regulatory light chain 12B; RLC-A; 9)	Q63781;P18666;P13832; B0BMS8;Q64122	0,58	3,48	9,97
Myl3;Myl1 (Myosin light chain 3; 1/3, skeletal muscle isoform)	P16409;P02600		3,40	9,84
Ltbp2 (Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2)	O35806;F1M7L7	1,39	3,25	2,59
Chd2 (Chromodomain helicase DNA binding protein 2)	D4AD08;D4AAG9;Q9JIX5; D3ZA12	0,76	3,16	

Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)	P62994	0,67	3,08	
Snd1 (Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1)	D4A8Y5;Q66X93	0,19	2,93	
Ech1 (Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial)	Q62651	1,30	2,92	1,95
Larp4b (Protein Larp4b)	D3ZF45		2,89	
Triobp (Trio and binding actin protein isoform 1a)	A2TIS7;B5DFF5;F1LPB6;D3ZHT2;D3ZN52;A2TIS8		2,86	
Ezr; Msn; Rdx (Ezrin;Moesin)	P31977;T1SRT4;F1LP60;O35763;Q5WQV5;Q5PQK5;	0,28	2,77	
Rpa2 (Replication protein A 32 kDa subunit)	Q63528		2,60	
Rbms1 (RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 1)	Q5PQP1;M0R7Q6;M0R696	1,02	2,54	
Med14 (Mediator complex subunit 14)	D4A020;V9GVN4	0,65	2,45	
Osbpl3 (Oxysterol-binding protein)	D4A3H0;D3ZHZ3		2,36	0,89
Itch (E3 ubiquitin-protein ligase)	Q5YB86;G3V8C2	1,04	2,36	0,18
Mvb12a (Multivesicular body subunit 12A)	Q6P777		2,36	
Kctd3 (Potassium channel tetramerisation domain containing 3)	D3ZNX0;P0C5J9		2,33	1,86
Dock8 (Dedicator of cytokinesis 8)	F1LPG2	0,78	2,28	
Sf3b5 (Splicing factor 3b, subunit 5 )	D4A5T1	0,88	2,27	
Lamb2 (Laminin subunit beta-2)	P15800;M0R6K0;Q5M7W9	0,69	2,26	1,83
Safb (Scaffold attachment factor B1)	O88453;M0RBF0;M0RDD3;M0R6E6	1,12	2,25	1,27
Ap2a2 (AP-2 complex subunit alpha-2)	P18484;Q66HM2	1,01	2,24	4,00
Atp5o (ATP synthase subunit O, mitochondrial)	Q06647	0,46	2,18	
Cct6a (Chaperonin containing Tcp1, subunit 6A (Zeta 1))	Q3MHS9;D4AD79;D3ZZG6;Q6AYJ7;M0R800	0,72	2,16	
Cnot7 (CCR4-NOT transcription complex, subunit 7)	B3DMA5	0,88	2,09	
Hadha (Long-chain enoyl-CoA hydratase; Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase)	Q64428	0,72	2,09	0,96

Arnt (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)	Q80T27;Q80T28;E9PTS2; Q80T26;Q80T29;P41739; Q80T25;F1LMF9		2,07	
Copg1 (Coatomer subunit gamma-1)	Q4AEF8	0,51	2,06	1,37
ErbB2ip (ErbB2-interacting protein)	M0R9X2; M0R6K2; M0R9T2; M0R5K2		2,06	
Trim5 ( tripartite motif protein 5)	Q6AYT1	0,43	2,03	
Trim 25 ( tripartite motif protein 25)	Q6P7B3;D4A9N5	0,60	2,00	1,18
Myh10 (Myosin-10)	Q9JLT0;G3V9Y1;Q9R0H1			8,50
Atp2b3 (Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3)	D3ZJ68;D3ZV04;K4DIC6; Q64568			6,25
Vim (Vimentin)	P31000;G3V8C3;Q6P725; P48675;P23565;G3V8Q2; P12839;F1LRZ7;P16884		1,06	2,60
Synpo (Synaptopodin)	B1VKB4;Q9Z327		1,23	2,54
Atad3 (ATPase family AAA domain-containing protein 3)	Q3KRE0	1,07	1,39	2,28
Ugg1 (UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1)	Q9JLA3	0,96	1,67	2,07

Les cellules IEC-6 ont été cultivées pendant cinq passages dans trois milieux de culture différents contenant des acides aminés légers (R0, K0), des acides aminés moyens (R6, K4) ou des acides aminés lourds (R10, K8). Les cellules ont été infectées avec des lentivirus shTémoin ou shSHP-2 puis sélectionnées. Ensuite, elles ont été amenées à confluence, privées en sérum pendant 24h et traitées pendant 15min ou 30min avec du LPS. Les cellules ont été lysées et une immunoprécipitation dirigée contre les tyrosines phosphorylées a été effectuée. Les protéines immunoprécipitées ont été identifiées par spectrométrie de masse. Les valeurs représentent le ratio du nombre de peptides identifiés correspondant à une protéine donnée dans le milieu lourd (shSHP-2) par rapport au milieu moyen (shTémoin). Seulement les protéines ayant une augmentation de deux fois de la phosphorylation sur tyrosine dans les cellules shSHP-2 comparativement aux cellules shTémoin suite à un traitement au LPS sont présentées dans ce tableau.

**Annexe 2: Liste complète des gènes ayant une expression modulée dans les souris SHP-2<sup>CEL-KO</sup>**

Gènes	Identification	Expression relative	p
fatty acid binding protein 6. ileal (gastrotropin) ( <i>Fabp6</i> )	1450682_at	10,73	4,36 <sup>-5</sup>
matrix metalloproteinase 7 ( <i>Mmp7</i> )	1449478_at	4,23	2,46 <sup>-4</sup>
defensin. alpha. 24 ( <i>Defa24</i> )	1450631_x_at	4,15	2,80 <sup>-6</sup>
Keratin 36 ( <i>Krt36</i> )	1427751_a_at	4,00	2,40 <sup>-4</sup>
indoleamine 2.3-dioxygenase 1 ( <i>Ido1</i> )	1420437_at	2,80	0,014
glucose-6-phosphatase. catalytic ( <i>G6pc</i> )	1417880_at	2,66	9,37 <sup>-4</sup>
dentin matrix protein 1 ( <i>Dmp1</i> )	1443746_x_at	2,64	1,97 <sup>-3</sup>
interleukin 1 receptor-like 1 ( <i>Il1rl1</i> )	1422317_a_at	2,57	0,021
chemokine (C-X-C motif) ligand 5 ( <i>Cxcl5</i> )	1419728_at	2,39	0,047
fructose biphosphatase 1 ( <i>Fbp1</i> )	1448470_at	2,39	1,41 <sup>-5</sup>
antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5 ( <i>Mfi2</i> )	1419755_at	2,37	2,02 <sup>-3</sup>
liver-expressed antimicrobial peptide 2 ( <i>Leap2</i> )	1427480_at	2,34	2,75 <sup>-4</sup>
lectin. galactose-binding. soluble 2 ( <i>Lgals2</i> )	1417079_s_at	2,34	2,19 <sup>-4</sup>
dentin matrix protein 1 ( <i>Dmp1</i> )	1443745_s_at	2,33	2,96 <sup>-3</sup>
fibrinogen alpha chain ( <i>Fga</i> )	1424279_at	2,24	3,46 <sup>-4</sup>
colipase. pancreatic ( <i>Clps</i> )	1415805_at	2,19	5,06 <sup>-3</sup>
solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters). member 1 ( <i>Slc13a1</i> )	1431379_a_at	2,17	1,18 <sup>-4</sup>
regenerating islet-derived 3 beta ( <i>Reg3β</i> )	1416297_s_at	2,12	3,50 <sup>-5</sup>
carbamoyl-phosphate synthetase 1 ( <i>Cps1</i> )	1455540_at	2,09	2,21 <sup>-5</sup>
N-acetylneuraminatase pyruvate lyase ( <i>Npl</i> )	1424265_at	2,06	7,86 <sup>-4</sup>
leukocyte cell-derived chemotaxin 2 ( <i>Lect2</i> )	1449492_a_at	2,04	9,81 <sup>-5</sup>
ATP-binding cassette. sub-family G (WHITE). member 5 ( <i>Abcg5</i> )	1419393_at	2,04	0,013

ubiquitin D ( <i>Ubd</i> )	1419762_at	2,02	0,014
sonic hedgehog ( <i>Shh</i> )	1436869_at	2,00	2,84 <sup>-5</sup>
zinc finger protein 560 ( <i>Zfp560</i> )	1458820_at	-2,00	3,66 <sup>-5</sup>
glutathione S-transferase. alpha 1 (Ya), glutathione S-transferase. alpha 2 (Yc2) ( <i>Gsta1, Gsta2</i> )	1421041_s_at	-2,03	1,21 <sup>-3</sup>
cytochrome P450. family 2. subfamily c. polypeptide 65 ( <i>Cyp2c65</i> )	1429994_s_at	-2,05	3,08 <sup>-4</sup>
sprouty protein with EVH-1 domain 1. related sequence ( <i>Spred1</i> )	1460116_s_at	-2,06	8,59 <sup>-7</sup>
UDP-GlcNAc:betaGal beta-1.3-N- acetylglucosaminyltransferase 5 ( <i>B3gnt5</i> )	1420993_at	-2,06	3,49 <sup>-3</sup>
cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase ( <i>Cmah</i> )	1436039_at	-2,11	1,70 <sup>-3</sup>
serine (or cysteine) peptidase inhibitor. clade B. member 5 ( <i>Serpib5</i> )	1441941_x_at	-2,27	3,59 <sup>-8</sup>
mucin 4 ( <i>Muc4</i> )	1438555_x_at	-2,31	3,84 <sup>-4</sup>
adiponectin. C1Q and collagen domain containing ( <i>Adipoq</i> )	1422651_at	-2,35	0,018
family with sequence similarity 55. member D ( <i>Fam55d</i> )	1456111_at	-2,41	1,43 <sup>-4</sup>
X-linked myotubular myopathy gene 1 ( <i>Mtm1</i> )	1454904_at	-2,50	8,40 <sup>-5</sup>
family with sequence similarity 55. member B	1453220_at	-3,75	4,66 <sup>-4</sup>

Les ARNs d'extraits totaux de côlon de souris témoins et expérimentales nouveau-nées ont été isolés puis un GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (*Affymetrix*) a été effectué (n=3 par groupe). Seulement les gènes ayant une modulation significative de deux fois dans les souris expérimentales par rapport aux souris témoins sont présentées dans ce tableau.

**Annexe 3: Liste complète des substrats potentiels de SHP-2 mobilisés lors de la restitution épithéliale**

<b>Protéines</b>	<b>Identification</b>	<b>Non blessées</b>	<b>5 min post-blessure</b>	<b>24h post-blessure</b>
Mark1; Mark2; Mark3; Mark4 (MAP/microtubule affinity-regulating kinase)	O08679; D4A6T9; F1LNE7; O08678; Q8VHF0; F1M836	1,00	9,19	0,75
Larp7 (La-related protein 7)	Q5XI01;M0RC12;M0R7D1		6,07	
Comp;Thbs4 (Cartilage oligomeric matrix protein; Thrombospondin-4)	P35444;M0RBU0;F1LMS5; P49744	2,25	5,56	5,62
Klhdc10 (Kelch domain-containing protein 10)	Q5U3Y0		5,10	
Mri1 (Methylthioribose-1-phosphate isomerase)	Q5HZE4	2,20	3,80	2,37
Eln (Elastin)	D3ZPX6;D4A9U4;Q99372	2,50	3,23	3,89
Myh9 (Myosin-9)	G3V6P7; Q62812;Q63862; Q62704	1,00	2,86	1,76
Ltbp2 (Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2)	O35806;F1M7L7		2,14	
Uqcrq (Cytochrome b-c1 complex subunit 8)	Q7TQ16		2,10	1,77
F2 (Prothrombin; Thrombin light chain; Thrombin heavy chain)	P00735;P18292;G3V843	3,18	5,78	0,83
Pgk1;Pgk2 (Phosphoglycerate kinase 1-2)	M0R6Y8;P16617;Q5XIV1	1,00	0,29	4,69
Chd5;Chd4 (Chromodomain helicase DNA binding protein 4-5)	D3ZR50;E9PU01;D3ZD32; Q2KML0;Q2KML1;Q2KMK9;Q2KMK7;F1LPP8		1,29	4,50
Colec12 (Collectin 12)	Q4V885			4,31
Pbx1;Pbx2 (Pre B cell leukemia homeobox 1-2)	B1WC30;D3ZJI6;Q6MG87			3,24
Vps28 (Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog)	B5DEN9		1,39	2,75
Ugt1a6;Ugt1a1 (UDP-glucuronosyltransferase 1-6)	Q64671;Q63662;P08430;Q6T5E9;P97886;Q91Y43			2,15
Mdh2 (Malate dehydrogenase;Malate dehydrogenase, mitochondrial)	Q0QF43;P04636		0,50	2,10



---

Ncoa1 (Nuclear receptor coactivator 1)	D4A3Q3	0,83	1,38	2,01
---	--------	------	------	------

---

Les cellules IEC-6 ont été cultivées pendant cinq passages dans trois milieux de culture différents contenant des acides aminés légers (R0, K0), des acides aminés moyens (R6, K4) ou des acides aminés lourds (R10, K8). Les cellules ont été infectées avec des lentivirus shTémoin ou shSHP-2 puis sélectionnées. Ensuite, elles ont été amenées à confluence, mises pendant 24h dans du milieu contenant 0,1% sérum avant d'effectuer des multiblessures à l'aide d'un grattoir pendant 5min ou 24h. Les cellules ont été lysées et une immunoprécipitation dirigée contre les tyrosines phosphorylées a été effectuée. Les protéines immunoprécipitées ont été identifiées par spectrométrie de masse. Les valeurs représentent le ratio du nombre de peptides identifiés correspondant à une protéine donnée dans le milieu lourd (shSHP-2) par rapport au milieu moyen (shTémoin). Seulement les protéines ayant une augmentation de deux fois de la phosphorylation sur tyrosine dans les cellules shSHP-2 comparativement aux cellules shTémoin suite à une blessure sont présentées dans ce tableau.