

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Implication de ERK dans l'effet du cadmium et de cytokines pro-inflammatoires sur l'intégrité de
l'épithélium intestinal: étude sur monocouches de cellules Caco-2

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
ALEX GRENIER

JANVIER 2023

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Dans l'ordre des choses,

Merci à mes amis du collège Ahuntsic soit Ash, Cédric, Anne-Marie, Anne-Frederique et Charles sans qui le plaisir aurait manqué durant ces trois années sans dessus dessous.

Merci à ma troupe de l'UQÀM soit Simon, Mathilde, Stéphanie et Mélanie, c'est grâce à vous que je peux dire haut et fort que mes années à l'université auront été d'une qualité de grade ACS. Pour tous tes conseils en matière de western blot, je te dois un deuxième remerciement Stéphanie, je serais encore en train de me battre avec mes membranes sans toi.

Merci à toi Gabrielle pour avoir été présente durant la majorité de ce projet, et même bien avant. Tes sushis (entre autres) étaient une source de motivation non négligeable pour terminer une journée et retourner à la maison.

Merci à mes panthères Stan et Flok qui ne possèdent malheureusement pas la capacité de lire ces mots, mais que j'aime malgré tout.

Et puis merci à la miche, vous êtes des tranches de vie incroyable.

Puis parmi ceux que j'admire, je remercie,

Mon père pour le lac, la moto, la bière et toutes ces choses qu'incluent le lac Caribou ainsi que toutes ces soirées improvisées à Montréal qui permettent tant de décrocher. Se coucher tôt n'a jamais été notre point fort et j'espère poursuivre cette tradition avec toi.

Ma mère comme meilleure partenaire de voyage et comme modèle professionnel, je n'aurais jamais eu l'énergie de faire ce projet sans la tienne. C'est grâce à toi si j'aime l'école autant que de prendre l'avion et j'espère que nous continuerons de le prendre ensemble encore longtemps.

Puis celle sans qui ce projet n'aurait jamais été possible,

Ma directrice de recherche, Catherine Jumarie, une des seules personnes n'ayant jamais perdu patience devant ma rigueur houleuse. Sans ton optimisme, ton dévouement et ta patience, tout ceci n'aurait jamais été réalisable. Avoir su la tâche qui m'attendait, j'aurais probablement quitté le navire, mais avec toi au gouvernail, j'ai eu confiance dès le premier jour. J'ai eu une chance inouïe de travailler dans ton laboratoire, mille mercis, c'est mon plus grand accomplissement à ce jour.

DÉDICACE

À mon ami Charles,
Que ton intestin reste aussi combatif que toi

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE.....	iii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACCRONYMES	viii
RÉSUMÉ.....	ix
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Les maladies inflammatoires chroniques	1
1.2 Les protéines de jonctions.....	1
1.3 Facteurs d'inflammation exogènes	6
1.3.1 Le cadmium	7
1.3.2 Le LPS	9
1.4 ERK et les cytokines pro-inflammatoires	10
1.5 L'inflammation et les macrophages	15
1.6 Objectifs et hypothèse	15
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	17
2.1 Culture cellulaire.....	17
2.2 Traitements.....	17
2.3 Immunobuvardage.....	18
2.4 Immunofluorescence	19
2.5 Mesure de la perméabilité au rouge de phénol et au dextran	20
2.6 Mesure de la résistance transépithéliale (TEER)	20
2.7 ELISA	21

2.8	Mesure de l'activité MTT	21
2.9	Dosage de la LDH extracellulaire	21
2.10	Tests statistiques	22
CHAPITRE 3 RÉSULTATS		23
3.1	Caractérisation et optimisation du modèle et du choix de filtre semi-perméable	23
3.2	Le Cd affecte la viabilité, la TEER et la perméabilité de la monocouche de cellules TC7 différenciées à partir de 5 µM.....	25
3.3	L'intégrité des cellules TC7 est compromise par le Cd sans potentialisation par le LPS ou les cytokines inflammatoires (TNF-α et IL-1β) et ERK1/2 n'est pas impliquée	31
3.4	La réponse inflammatoire des cellules TC7 est modulée par le côté d'exposition et ERK1/2 est impliquée dans la sécrétion d'IL-8 par le Cd, le TNF-α et l'IL-1β	42
3.5	La dynamique de la phosphorylation de ERK varie d'un traitement à l'autre	44
CHAPITRE 4 DISCUSSION		51
4.1	L'intégrité de la monocouche de cellules entérocytaires différenciées est sensible au Cd, mais résiste au LPS, au TNF-α et à l'IL-1β durant les 24 premières heures.....	51
4.2	Contrairement au TNF-α, le Cd perturbe l'organisation de l'occludine et de ZO-1 sans l'implication de ERK1/2 tandis que le LPS semble démontrer un effet protecteur.....	58
4.3	À l'exception du LPS, tous les traitements de 24 h mènent à une réponse inflammatoire en IL-8 influencée par le côté d'exposition, mais pas en TNF-α, IL-1β et IL-6	61
4.4	La phosphorylation de ERK1/2 est centrale dans la réponse inflammatoire en IL-8 et le Cd, l'IL-1β et le TNF-α utilisent tous cette voie de signalisation	66
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		71
BIBLIOGRAPHIE		73

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Organisation des protéines de jonction entre les entérocytes de l'épithélium intestinal	6
3.1 Variation de la TEER entre le 4 ^e et 21 ^e jour de culture de cellules TC7 sur filtres de polycarbonate et de polyester	24
3.2 Variation de la TEER entre le 4 ^e et 21 ^e jour de culture de cellules Caco-2 sur filtres de polycarbonate et de polyester.....	25
3.3 Impact du Cd sur la chute de la TEER au 21 ^e jour de culture de cellules Caco-2 et TC7 sur filtres de polycarbonate et polyester.....	26
3.4 Viabilité cellulaire sur cultures de cellules Caco-2 et TC7 de 21 jours par le test MTT pour différents traitements (Cd, TNF- α , IL-1 β et LPS).....	27
3.5 Viabilité de cellules Caco-2 de 21 jours par le dosage de la LDH exposées à des concentrations croissantes de Cd.....	28
3.6 Perméabilité paracellulaire par diffusion du rouge de phénol sur des cellules TC7 de 21 jours suite à des expositions de 24 h à différentes concentrations de Cd	29
3.7 Perméabilité paracellulaire par diffusion du Dextran-FITC sur des cellules TC7 de 21 jours suite à des expositions de 24 h à différentes concentrations de Cd	31
3.8 Effets des différents traitements de 24 h (Cd, TNF- α , IL-1 β et LPS) avec et sans inhibiteur de ERK1/2 sur l'augmentation de la perméabilité au rouge de phénol et la chute de la TEER sur des cellules TC7 de 21 jours.....	34
3.9 Fluorescence totale et mesures de la colocalisation de ZO-1 et de l'occludine par microscopie confocale suites à différents traitements de 24 h (Cd, TNF- α , IL-1 β et LPS) avec et sans inhibiteur de ERK1/2.....	37
3.10 Image type de microscopie confocale (noyaux, occludine et ZO-1) sur cellules TC7 de 21 jours suites à différents traitements de 24 h (Cd, TNF- α , IL-1 β et LPS) avec et sans inhibiteur de ERK1/2.....	41
3.11 Sécrétion d'IL-8 mesurée dans le milieu de culture de cellules TC7 maintenues sur filtres semi-perméables pendant 21 jours suite à différents traitements de 24 h (Cd, TNF- α , IL-1 β et LPS).....	42

3.12 Sécrétion d'IL-8 sur pétris en présence d'inhibiteur de ERK1/2 suite à différents traitement de 24 h (Cd, TNF- α et IL-1 β).....	46
3.13 Image type et densité intégrée d'immunobuvardage de ERK1/2, p-ERK1/2 et d'occludine de cellules TC7 de 21 jours suite à différents traitements (Cd, TNF- α , IL-1 β) de 1 h et 24 h avec et sans inhibiteur de ERK1/2.....	50
4.1 Voies de signalisations menant à la sécrétion de l'IL-8 dans les cellules épithéliales.....	66

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AP : Apical

BL : Basolateral

Caco-2 : *Carcinoma colon cell line*

Cd : Cadmium

ERK1/2 : *Extracellular signal regulated kinase*

FBS : Fetal bovine serum

IL-1 α/β : Interleukine-1 alpha/beta

IL-6 : Interleukine-6

IL-8 : Interleukine-8

IFN- γ : Interféron gamma

JA : Jonction adhérente

JS : Jonction serrée

LDH : Lactate déshydrogénase

LPS : Lipopolysaccharides

MAJ : Molécule d'adhésion jonctionnelle

MICI : Maladie inflammatoire chronique intestinale

PC : Polycarbonate

PE : Polyester

RP : Rouge de phénol

TEER : Résistance électrique transépithéliale

TNF- α/β : Facteur de nécrose tumorale alpha/beta

ZO-1: Zonula Occludens-1

RÉSUMÉ

L'ingestion de substances toxiques par l'alimentation est insidieuse et quasi inévitable. Le cadmium fait partie des éléments métalliques non essentiels que l'humain consomme quotidiennement. Sa toxicité varie selon l'état de l'épithélium intestinal et de son degré d'inflammation. Nous avons émis l'hypothèse que, dans le cas d'un épithélium compromis, l'effet de certaines molécules pro-inflammatoires (TNF- α , LPS et IL-1 β) pourrait être exacerbé par la présence du métal via une activation de la kinase ERK1/2. Le premier volet de l'étude porte sur l'intégrité de monocouches de cellules Caco-2 différenciées (21 jours) en présence de Cd et de molécules pro-inflammatoires. Il a été observé par microscopie confocale que le Cd en 24 h a des impacts non négligeables sur l'organisation des jonctions serrées (ZO-1 et occludine). Le TNF- α provoque une désorganisation des jonctions serrées sans cependant altérer la perméabilité ou la TEER en 24 h. De plus, les effets du TNF- α sont renversables par l'inhibition de ERK1/2. L'utilisation d'un inhibiteur de ERK1/2 exacerbe l'effet du Cd sur l'augmentation de la perméabilité mesurable par le flux du rouge de phénol et ne renverse par la désorganisation des protéines. Les cytokines n'ont pas d'impact significatif sur l'intégrité et le LPS semblerait même diminuer les dommages causés par le Cd. Au niveau moléculaire, le Cd, l'IL-1 β et le TNF- α , tel que démontré par dosage en ELISA, déclenchent une sécrétion importante d'IL-8 et une synergie est observable entre le Cd et le TNF- α . Toute sécrétion d'IL-8 est réduite en présence d'inhibiteur de ERK1/2. Ces résultats suggèrent différentes implications de ERK1/2 dans la modulation de l'intégrité de l'épithélium intestinal par le métal et certaines cytokines.

Mots-clés : cadmium, cytokines pro-inflammatoires, ERK1/2, perméabilité intestinale paracellulaire, protéines de jonctions, cellules Caco-2

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les maladies inflammatoires chroniques

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent plusieurs troubles chroniques d'inflammation comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique. Les causes de ces altérations de l'intestin sont souvent inconnues. Bien qu'une grande variété de MICI existe, certains symptômes sont communs comme des diarrhées, des vomissements, des douleurs abdominales, des hémorragies rectales et de mauvaises régulations du poids corporel. On comprend donc que ces maladies chroniques et souvent incurables causent de grands inconforts aux gens touchés, ainsi que des suivis médicaux à vie. L'intestin est l'une des premières lignes de défense contre la plupart des xénobiotiques et métaux absorbés oralement. De plus, il protège aussi contre les pathogènes abondant dans l'intestin. Il doit aussi assurer son rôle d'absorption des nutriments (glucides, lipides et acides aminés) et participer à l'homéostasie des ions, des vitamines et de l'équilibre hydrique. C'est un épithélium très spécialisé et sélectif. L'intestin grêle relie l'estomac au gros intestin, c'est la partie la plus longue du tractus intestinal. C'est dans l'intestin grêle que la majeure partie de l'absorption se fait. L'abondance de nutriments dans l'intestin mène indirectement à une importante quantité de microorganismes principalement répartis dans l'intestin grêle et le colon, au total le microbiote abrite une quantité de microorganismes de l'ordre de 10^{12} - 10^{14} (Gauguier *et al.*, 2021). Dans les conditions normales, le microbiote travaille de concert avec l'hôte et ira même jusqu'à fournir des vitamines et des enzymes de digestion naturellement absentes chez l'humain.

1.2 Les protéines de jonctions

Un épithélium intestinal sain empêche la flore intestinale et les antigènes luminaux de pénétrer dans l'organisme au niveau de la circulation sanguine via diverses méthodes : grâce au mucus ou encore via des complexes protéiques d'adhésion. Ces complexes ont comme but d'augmenter la proximité entre les cellules voisines et de diminuer la perméabilité paracellulaire au travers de

l'épithélium intestinal. Concernant la régulation paracellulaire, trois groupes de complexes protéiques majeurs sont à distinguer. Il y a les desmosomes, les jonctions adhérentes (JA) et les jonctions serrées (JS) (Groschwitz et Hogan, 2009). Ensemble, ils forment une formidable barrière contre le contenu indésirable de l'intestin. Les JA lient les cellules entre elles par des domaines transmembranaires, reliés au cytosquelette par des protéines cytosoliques (Groschwitz et Hogan, 2009). Tout comme les JA, les desmosomes relient les cellules entre elles de façon mécanique. Les JS sont exprimées du côté apical (AP), et contrairement aux deux autres complexes, elles sont en contact avec le lumen. Les JS délimitent le segment AP du segment basolatéral (BL) et leur présence induit une polarisation des cellules intestinales. Les JS régulent aussi le passage de certains ions via la voie paracellulaire (Groschwitz et Hogan, 2009). Les JS et les JA sont des éléments clés de plusieurs processus importants, soit la polarisation, la prolifération et la différenciation cellulaire (Groschwitz et Hogan, 2009).

Les JS se composent de 4 familles de protéines transmembranaires : les occludines, les claudines, les molécules d'adhésion jonctionnelle (MAJ) et les tricellulines (Groschwitz et Hogan, 2009 ; Krug *et al.*, 2009). En tout, plus d'une quarantaine de protéines appartiennent aux JS, parmi celles-ci, ZO-1 (zonula occludens-1, 220 kDa) est connue pour former un lien entre les protéines transmembranaires et le cytosquelette (Fig. 1.1) (McNeil, 2006). Son niveau d'expression augmente avec la différenciation et la polarisation des cellules épithéliales (McNeil, 2006). L'abondance de ZO-1 corrèle avec l'augmentation de la résistance transépithéliale (TEER), contrairement à la claudine-2 qui est plus présente lors d'une chute de la TEER (McNeil, 2006).

Les claudines (20-27 kDa) possèdent deux boucles extracellulaires essentielles pour des liaisons homophiliques et hétérophiliques avec d'autres claudines ou occludines. Les JS sont distribuées au niveau AP ainsi que latéral. Ce sont les principaux régulateurs de perméabilité paracellulaire. Les JS permettent le passage sélectif des ions tout en empêchant la translocation des microorganismes et leurs antigènes respectifs. Le rôle des claudines dans le maintien de l'intégrité de la barrière a été démontré avec des souris déficientes en claudine-1 ayant péri en moins d'une journée post-naissance à la suite de pertes d'eau trop importante au niveau de l'intestin (Groschwitz et Hogan, 2009). Dans les JS, ZO-1, l'occludine et la claudine-2 auront tendance à faire des liens hétérotypiques entre elles à différentes étapes de la prolifération (Itoh

et al., 1999 ; Balda et Matter, 2000). Il a été démontré que la claudine-2 est seulement présente dans les cellules Caco-2 (cellules intestinales immortalisées) non différenciées et qu'elle possède un rôle dans le recrutement des protéines de jonctions entre les cellules lors de la différenciation (Escaffit *et al.*, 2005).

L'occludine (65 kDa) possède, entre autres, une boucle transmembranaire (Rawat *et al.*, 2020). Il est suggéré que ce complexe joue un rôle dans la régulation sélective de la perméabilité paracellulaire (Groschwitz et Hogan, 2009). Une étude menée sur les cellules Caco-2 a démontré que la baisse d'expression de l'occludine mène à une plus grande perméabilité paracellulaire sans toutefois affecter la TEER (Al-Sadi *et al.*, 2011). L'augmentation du flux est observable à l'aide de plusieurs marqueurs de tailles différentes (inuline (5 kDa), urée (60 Da), dextran (10 kDa et 70 kDa) et mannitol/glucose (182 Da)), mais la perméabilité des marqueurs de hauts poids moléculaires est la plus augmentée (Al-Sadi *et al.*, 2011). Pour l'urée et le mannitol/glucose, le flux est respectivement augmenté par un facteur 4 et de 6 tandis que pour l'inuline et le dextran-10 kDa, c'est par un facteur de 25 (Al-Sadi *et al.*, 2011). Le flux du dextran (70 kDa) est augmenté par un facteur de 45 (Al-Sadi *et al.*, 2011). L'occludine jouerait donc un rôle plus important dans la régulation du passage paracellulaire des grosses molécules (> 1 kDa) comme l'inuline et le dextran sans toutefois influencer la TEER (Avdeef, 2010). Deux types de régulation paracellulaire ont été décrits en portant les noms de 'pore pathway' et 'leak pathway' (Zuo *et al.*, 2020). Chacun des deux types régule le passage d'éléments de tailles différentes ; moins de 8 Å pour le 'pore pathway' et moins de 100 Å pour le 'leak pathway', les deux régions sont sensibles aux signaux immuns et à certains stimuli (Zuo *et al.*, 2020). Ceci souligne l'importance d'étudier le système intestinal de concert avec le microbiote pour mieux comprendre certaines situations pouvant causer du dommage à l'épithélium intestinal.

Comme mentionné plus haut, il y aurait au moins 2 'pathway' régulant la perméabilité paracellulaire, soit le 'pore pathway' et le 'leak pathway' ayant des restrictions de taille respective de 8 et 100 Å. Les molécules inférieures à 8 Å devraient donc diffuser librement par la voie paracellulaire. Dans la littérature, les molécules de plus de 8 Å de diamètre sont considérées comme des macromolécules (Zuo *et al.*, 2020). Puisque certaines protéines sont co-localisées, les mêmes auteurs ont étudié l'impact de l'inhibition de l'expression de l'occludine

sur plusieurs claudines (1, 2, 3, 5 et 8). Seuls les niveaux d'expression (protéine et ARNm) de la claudine-2 ont été modulés à la hausse par la sous-expression de l'occludine (Rusanov *et al.*, 2015). La claudine-2 a souvent été soupçonnée d'être une protéine de jonctions pionnière dans la formation des jonctions serrées, c'est-à-dire qu'elle participe au recrutement des autres protéines de JS comme l'occludine et ZO-1 (Escaffit *et al.*, 2005). Ainsi la claudine-2 serait particulièrement abondante lors d'un déficit anormal en JS dans le but d'amorcer un nouveau processus de recrutement de ces protéines.

Les JS ont été pointées du doigt comme étant les principaux acteurs de la régulation de la perméabilité paracellulaire tandis que les JA et les desmosomes seraient plus impliqués dans l'attachement et la proximité des cellules épithéliales entre elles (Zuo *et al.*, 2020). Les JS régulent le passage de l'eau et des solutés. La capacité du soluté à traverser la paroi est influencée par sa taille et la charge (Zuo *et al.*, 2020). La perméabilité du 'pore pathway' serait principalement régulée par les protéines de la famille des claudines tandis que la perméabilité du 'leak pathway' serait dépendante de ZO-1 et de l'occludine (Zuo *et al.*, 2020). Les protéines de JS : ZO-1, la claudine-2 et l'occludine seraient toutes présentes dans le 'pore pathway', mais la claudine-2 semble absente du 'leak pathway' (Zuo *et al.*, 2020). Il a été démontré que la sous-expression de l'occludine mène à une augmentation de la perméabilité paracellulaire dans le 'leak pathway' observable par un plus grand flux des molécules de plus de 100 Å (Zuo *et al.*, 2020). Une expérience menée sur des cellules T84 (lignée cellulaire intestinale humaine) a prouvé que les deux types de régulation ne sont pas affectés par les mêmes stimuli. La présence d'IL-13 augmente le flux des ions sans augmenter celui du dextran à 4 kDa, indiquant ici une modulation du 'pore pathway' (Zuo *et al.*, 2020). L'implication précise de la claudine-2 dans ce résultat est démontrée par le renversement de l'augmentation du flux ionique par l'ajout de miRNA inhibant la surexpression de la claudine-2 par l'IL-13 (Zuo *et al.*, 2020). L'augmentation de la perméabilité du 'pore pathway' s'explique par la quantité de pores totaux qui augmente avec l'expression de la claudine-2 (Zuo *et al.*, 2020). La famille des claudines se divise en 2 classes ; ceux formant des pores et ceux formant des barrières: la claudine-2 appartient à la classe formant des pores (Zuo *et al.*, 2020).

Les MAJ sont des protéines de la super famille des immunoglobulines, elles sont présentes

dans un grand nombre de types de cellule. La portion extracellulaire se lie à plusieurs ligands homophiles ou hétérophiles, suggérant un rôle important dans la régulation des fonctions cellulaires et dans le maintien de la perméabilité (Groschwitz et Hogan, 2009). Les MAJ ont un rôle dans l'adhésion des leucocytes à l'épithélium intestinal (Groschwitz et Hogan, 2009).

Structuralement, les JA se situent au niveau de la membrane latérale des cellules. La majeure partie des JA est formée par des interactions cadhérine-caténine (Groschwitz et Hogan, 2009). Le segment intracellulaire contient la partie formée par les caténines, liant la protéine transmembranaire au cytosquelette. Le domaine extracellulaire, composé du segment cadhérine, forme des liens homotypiques avec les segments exposés aux cadhérines des cellules voisines pour promouvoir l'adhésion cellule-cellule. Ces segments transmembranaires jouent aussi un rôle dans la polarisation cellulaire (Groschwitz et Hogan, 2009). Une régulation négative de la E-cadhérine peut être responsable de l'affaiblissement du lien entre les cellules, ainsi qu'être associée à la perturbation de la prolifération et de la migration des cellules de l'épithélium intestinal (Groschwitz et Hogan, 2009).

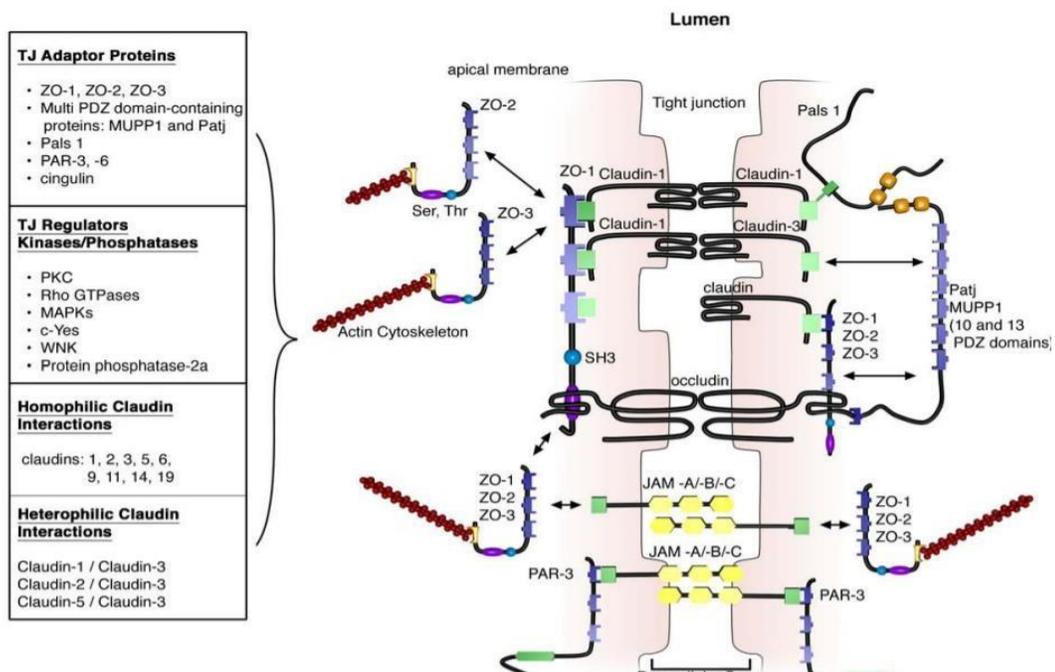


Figure 1.1 : Organisation des protéines de jonction entre les entérocytes de l'épithélium intestinal. Certaines protéines comme la claudine-1 et la claudine-3 font des liens hétérotypiques avec d'autres protéines JS tandis que certaines autres comme l'occludine font des liens homotypiques avec elles-mêmes. (Groschwitz et Hogan, 2009)

1.3 Facteurs d'inflammation exogènes

Les cellules principalement responsables de la perméabilité sélective de l'intestin sont les entérocytes. Malheureusement, les gens atteints de MICI n'ont pas un épithélium intestinal aussi sélectif. L'inflammation cause d'importants dommages et mène à la perte de l'intégrité cellulaire. Le relâchement des jonctions serrées et un détachement plus important des entérocytes augmentent la perméabilité et réduisent la sélectivité de l'épithélium intestinal. Ceci mène à une diminution du potentiel d'absorption des nutriments, de l'eau, des ions et des vitamines. De plus, une infiltration anormale de microorganismes, d'antigènes et d'endotoxines, notamment les lipopolysaccharides (LPS), cause une inflammation accentuée. L'inflammation peut mener à de la nécrose et à un relargage important de cytokines pro-inflammatoires, aggravant ainsi le problème. Il faut comprendre que les MICI sont multifactorielles et qu'il est difficile de cerner la cause primaire de ces maladies.

1.3.1 Le cadmium

Parmi les nombreux facteurs exogènes pouvant créer ou aggraver l'inflammation intestinale, on retrouve le Cd, issu principalement d'aliments contaminés. Au Canada, la quantité de Cd ingéré moyenne par jour par individu via l'alimentation est de 10 - 25 µg selon le site internet Cadmium (<https://www.cadmium.org/cadmium-exposure/>). La teneur en aliments hautement contaminés peut atteindre 22 ppm de Cd (Alloway *et al.*, 1990). Après avoir été ingéré, le Cd non complexé pénètre les cellules intestinales par le transporteur Nramp2 (Rusanov *et al.*, 2015 ; Elisma et Jumarie, 2001). Cependant, lorsqu'il est lié à certaines biomolécules (glutathion ou phytochélatines), son absorption est non négligeable, car le Cd peut ainsi utiliser des transporteurs supplémentaires et sa biodisponibilité est augmentée (Pham *et al.*, 2004). En effet, lorsque complexé aux diverses molécules intestinales, l'utilisation du transporteur Nramp2 est impossible, mais il devient possible pour le Cd d'utiliser des transporteurs spécifiques aux molécules auxquelles il est lié, comme des acides aminés par exemple, par mimétisme moléculaire. La biodisponibilité orale du Cd sous toutes ses formes (lié et libre) est d'environ 5%. Il a été montré *in vitro* que cette faible biodisponibilité orale s'explique par le fait que le Cd emprunte peu la voie paracellulaire (dans des conditions d'intégrité épithéliale maintenue) et que

la majeure partie du Cd transporté dans la cellule intestinale à la membrane AP traverse peu la membrane BL (Jumarie *et al.*, 1999). De cette façon, le Cd atteint difficilement la circulation sanguine, mais les entérocytes accumulent le métal et subissent les effets toxiques du Cd. Les entérocytes deviennent ainsi des accumulateurs de Cd, protégeant la circulation systémique aux dépens d'importants dommages pour l'épithélium intestinal.

Les mécanismes de toxicité du Cd sur la lignée cellulaire Caco-2 sont multiples : modulation de l'activité enzymatique, initiation de stress oxydatif, diminution des fonctions mitochondriales et perturbation de l'homéostasie du calcium (Rusanov *et al.*, 2015). La substitution du calcium par le Cd dans le site de liaison des E-cadhérine perturbe les jonctions adhérentes d'abord, puis plus tard les jonctions serrées (Rusanov *et al.*, 2015). Des études *in vitro* ont démontré la capacité du Cd à déclencher la production de cytokines inflammatoires par l'activation de NF- κ B (Rusanov *et al.*, 2015). L'augmentation de la perméabilité paracellulaire dans le modèle cellulaire Caco-2 différencié à la suite de l'exposition au Cd est, entre autres, due à la substitution du calcium par le Cd sur les sites de liaison de la E-cadhérine (Rusanov *et al.*, 2015). Un autre phénomène noté dans les cellules Caco-2 matures est l'activation de ERK1/2 par le métal aux alentours de 10 μ M, soit une concentration pouvant être comparable à celles *in vivo* suite à l'exposition alimentaire (Mantha et Jumarie, 2010). Les mitochondries sont des cibles sensibles aux métaux ; le Cd ne faisant pas exception se lie aux groupements thiols et affecte la perméabilité de la mitochondrie, perturbant ainsi la chaîne respiratoire. Cette perturbation cause un stress oxydatif qui à son tour mène à l'activation de certaines voies de signalisation comme p38 kinase, MAPK, ERK, PKC et PI3K (Rusanov *et al.*, 2015 ; Mantha et Jumarie, 2010). En plus de moduler les voies de signalisation, le Cd à une concentration d'aussi peu que 1 μ M augmente l'expression de certains gènes clés, notamment ceux codant pour la E-cadhérine et la p120-caténine.

Comme cité précédemment, la E-cadhérine (composante clé des JA) est essentielle au maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal. La relation entre la concentration de Cd et l'augmentation de l'expression de ces gènes est observable jusqu'à 300 μ M durant les trois heures qu'a duré l'expérience (Rusanov *et al.*, 2015). Cependant, les niveaux d'expression d'ARNm sont à tous moments supérieurs au témoin avec une augmentation maximale à 1 μ M suivie d'un déclin dose-dépendant jusqu'à 300 μ M (Rusanov *et al.*, 2015). Puisque les auteurs

de cette étude n'ont procédé à aucun test de viabilité sur ces trois heures, il est impossible de préciser si la baisse d'expression de gènes liés aux JA entre 1 et 300 μM de Cd n'est pas simplement attribuable à de la mortalité cellulaire. Lorsqu'exposée à 60 – 80 μM de Cd durant 24 h, une culture de cellules Caco-2 relargue de la LDH dans le milieu extracellulaire, démontrant de la toxicité (Hyun *et al.*, 2007). Il ne serait donc pas surprenant qu'avec une concentration de 300 μM malgré une incubation plus courte, le signal en ARNm soit affecté par de la mortalité cellulaire.

Il faut ici porter une attention particulière à l'effet du Cd sur ERK1/2. Une étude précédente a évalué l'impact du Cd sur le modèle cellulaire différencié Caco-2 de 21 jours de culture. Les auteurs ont noté une augmentation importante de l'activité déshydrogénase mitochondriale sensible à la cycloheximide, donc probablement liée à une augmentation de synthèse protéique, qui découle d'une activation de ERK1/2 par le Cd à 10 μM (Mantha et Jumarie, 2010). En présence d'un inhibiteur de ERK1/2, une baisse significative des effets associés à la phosphorylation de ERK1/2 par le Cd est observable (Mantha et Jumarie, 2010). L'activation de ERK1/2 par le Cd dans les entérocytes matures (possédant normalement de faibles niveaux de p-ERK1/2 active) pourrait avoir un impact important sur le degré d'inflammation de la muqueuse intestinale. Tel que développé plus bas, la voie de signalisation ERK1/2 est importante dans la production de plusieurs cytokines inflammatoires.

1.3.2 Le LPS

Le LPS est considéré comme bénin lorsqu'il est du côté AP de l'intestin. Il est abondant dû aux bactéries présentes dans le lumen. Par contre, en situation de perméabilité augmentée, l'infiltration du LPS vers la circulation sanguine et l'infiltration des macrophages vers le côté AP peuvent augmenter l'inflammation par contact entre le LPS et les macrophages. Les macrophages activés par le LPS sont connus pour, entre autres, relarguer du TNF- α , molécule pro-inflammatoire. Dans l'intestin la concentration en LPS se mesure en quelques ng/mL, mais au niveau du côlon elle peut atteindre 50 $\mu\text{g/mL}$ (Im *et al.*, 2012 ; Nighot *et al.*, 2017). Le LPS est omniprésent dans l'intestin, il a été prouvé que sa présence contribue à une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et 8) (Denaro *et al.*, 2020 ; Lopes do Carmo *et al.*, 2020).

Tout comme l'épithélium intestinal, les cellules Caco-2 semblent très résistantes au LPS lorsque exposées du côté AP, mais seraient sensibles lorsqu'elles sont exposées du côté BL. Le principal récepteur du LPS est le TLR-4, il est exprimé à l'AP et au BL par les cellules Caco-2 polarisées (Cario et Podolsky, 2000).

Il a été démontré sur la lignée de macrophages RAW 264.7 que le LPS induit l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α via ERK1/2 (Riegler *et al.*, 2012). Lorsqu'il y a inflammation de l'épithélium, une plus grande quantité de macrophages infiltre le lumen intestinal et entre en contact avec le LPS luminal, aggravant ainsi la réaction d'inflammation potentiellement déjà présente. En utilisant le modèle cellulaire Caco-2 sur des filtres semi-perméables, il a été observé que le LPS déposé du côté BL (0 à 1 ng/mL) augmente la perméabilité des JS de façon dépendante au temps d'exposition (Guo *et al.*, 2013). À partir de 0,3 ng/mL de LPS BL, une augmentation du flux d'inuline du côté AP vers le côté BL est notable, signifiant une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Guo *et al.*, 2013). De plus, cette augmentation de perméabilité est accompagnée d'une perte de la résistance transépithéliale (TEER) de la monocouche de cellules Caco-2 (Guo *et al.*, 2013). La perte de TEER est observable seulement après 72 h et l'augmentation du flux d'inuline après 4 jours. Ces résultats ont été reproduits avec les lignées cellulaires NCM460 (cellules non cancéreuses provenant de l'épithélium intestinal du côlon humain) et T84 (cellules cancéreuses provenant de l'épithélium intestinal du côlon humain) par les mêmes auteurs. Les voies de signalisations associées à MAPKs, ERK1/2 et p38 sont activées par le LPS (Serreli *et al.*, 2020). Les mêmes auteurs ont soumis une culture de cellules Caco-2 à une forte concentration de LPS BL (1 μ g/mL) et durant les trois premières heures, la TEER avait déjà chuté de moitié. Cette altération était restaurée après 24 h sous-entendant un effet transitoire venant du LPS. Une analyse subséquente par immunobuvardage a démontré que le LPS causait une détérioration des occludines et des protéines ZO-1. Une concentration de 1 ng/mL est suffisante pour engendrer une augmentation de la perméabilité en 3 - 4 jours sur des monocouches de cellules Caco-2 (Nighot *et al.*, 2017). Pour ce qui est de l'exposition AP, une concentration de 10 μ g/mL est suffisante pour induire la sécrétion d'IL-6 et 8 (Denaro *et al.*, 2020 ; Lopes do Carmo *et al.*, 2020). Au niveau cellulaire, le LPS interagit principalement avec le récepteur TLR-4 à la surface des entérocytes, il s'agit du ligand principal pour ce récepteur (Mollen *et al.*, 2008). Le corécepteur CD-14 semble aussi

grandement impliqué dans l'activation des voies de signalisation, car son expression est augmentée suite à l'exposition au LPS (Mollen *et al.*, 2008). Une investigation plus poussée sur des cellules de la muqueuse intestinale de rat (IEC-6) soumises à une concentration de LPS (50 µg/ml) durant 3 h a démontré par dosage ELISA une surexpression de l'IL-6 par rapport aux témoins et, par immunobuvardage, une phosphorylation plus importante de p38-MAPK et de ERK1/2 (Mollen *et al.*, 2008). L'IL-1β, l'IL-6 et le TNF-α ont été identifiés comme molécules centrales dans l'induction de plusieurs processus inflammatoires.

1.4 ERK et les cytokines pro-inflammatoires

Des études *in vivo* chez la souris et *in vitro* sur les modèles cellulaires Caco-2 et T84 ont démontré que la perméabilité intestinale est influencée par plusieurs facteurs : composés exogènes (alcool, Cd), apoptose, cytokines pro-inflammatoires et même certaines cellules immunitaires du soi (maladie auto-immune). Les cytokines TNF-α (facteur de nécrose tumorale alpha) et IFN-γ (interféron gamma) sont deux médiateurs importants d'inflammation dans les maladies intestinales, ils ont un impact négatif sur les fonctions de l'épithélium intestinal (Groschwitz et Hogan, 2009). Avec les modèles cellulaires T84 et HT-29/B6 (lignées cancéreuses intestinales de côlon humain), la stimulation par l'IL-4 ou l'IL-13 induit une augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire (Groschwitz et Hogan, 2009). Les cellules immunitaires CD4+ naïves se différencient en Th1 ou en Th2 et se démarquent post-activation, entre autres, par les cytokines qu'elles produisent. En effet, les cellules Th2 sont sollicitées pour l'immunité humorale, l'immunité aux parasites et pour la réponse allergique en présence d'allergènes (Hartenstein *et al.*, 2002). En contrepartie, la différenciation en Th1 est observée lors d'une infection virale ou par des pathogènes intracellulaires. Les IL-4, 5, 9, 10 et 13 proviennent d'une réponse immunitaire dite Th2. La sécrétion associée à la réponse Th1 est observable par l'IFN-γ et l'IL-2 ainsi que le TNF-β (modulateur d'inflammation associé à la sécrétion de NF-κβ) (Buhrmann *et al.*, 2013). La surproduction de cytokines par la réponse Th1 est associée aux maladies auto-immunes (Hartenstein *et al.*, 2002). L'IL-10 possède un rôle dans le maintien de l'épithélium intestinal. Appliquée aux cellules T84, l'IL-10 diminue la perméabilité intestinale accrue induite par l'IFN-γ (Groschwitz et Hogan, 2009). Chez la souris, la sécrétion de TNF-α et d'IFN-γ par les cellules T cause une augmentation de la perméabilité

paracellulaire par la désorganisation des JS (Groschwitz et Hogan, 2009). Les mastocytes du tractus intestinal sont à eux seuls capables de relarguer plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-3, 4, 5 et 6. Ces lymphocytes sont des sentinelles déjà présentes au moment d'une infection pour réagir rapidement, ils ne migrent pas par gradient à la suite d'une infection.

Il a été démontré que l'IL-1 β est une cytokine centrale dans l'inflammation au niveau de l'intestin (Al-Sadi *et al.*, 2011). Une concentration de 10 ng/mL serait suffisante pour induire une réponse inflammatoire (Al-Sadi *et al.*, 2011 ; Varilek *et al.*, 1994). Une étude menée sur le modèle Caco-2 a révélé l'effet de l'IL-1 β sur l'étanchéité de la monocouche. Effectivement, la présence de l'IL-1 β dans le milieu cause une augmentation de la perméabilité paracellulaire au niveau des JS, conséquence menant à une augmentation importante de l'inflammation intestinale (Al-Sadi *et al.*, 2011). Cette augmentation de la perméabilité des JS dans le modèle Caco-2 est due à l'activation de récepteurs membranaires par l'IL-1 β menant à une modulation de la voie de signalisation de ERK1/2 (Al-Sadi *et al.*, 2011). Cette activation entraîne une translocation du facteur de transcription Elk-1 vers le noyau. La fixation du facteur de transcription sur la section promotrice MLCK (myosin light chain kinase) active le gène MLCK et ultimement mène à l'ouverture des jonctions serrées et par conséquent de la monocouche cellulaire. Le récepteur de l'IL-1 β (IL-1R 2) serait différent de celui de l'IL-1 α (IL-1R). Dans les cellules Caco-2, le récepteur de l'IL-1 β est exprimé de façon AP et BL, mais la majorité des récepteurs se trouvent au niveau BL (Varilek *et al.*, 1994). L'IL-1 β , avec ses propriétés inflammatoires, est aussi connu pour stimuler la prolifération des cellules Caco-2 (Varilek *et al.*, 1994).

Une autre cytokine importante pouvant être modulée par ERK1/2 dans le cadre de l'inflammation intestinale est l'IL-6 (Michalsky *et al.*, 1997). Dans les cellules Caco-2, l'IL-6 est naturellement produite, contrairement au TNF- α par exemple (Michalsky *et al.*, 1997). Cependant, le TNF- α ainsi que l'IL-1 β sont tous les deux capables de stimuler la sécrétion d'IL-6 (Vitkus *et al.*, 1998). Les fonctions de l'IL-6 sont variées. Dans la lignée cellulaire IEC-6, sa présence protège les cellules en diminuant l'apoptose causée par une hypoxie ou une exposition au LPS (Rollwagen *et al.*, 2006). Malgré son rôle protecteur, l'IL-6 tout comme le TNF- α , a été identifiée comme cytokine pro-inflammatoire relarguée de façon importante chez les sujets

atteints de MICI, suite à l'activation incontrôlée des lymphocytes T CD4+ dans l'intestin (Mudter et Neurath, 2007). Depuis bon nombre d'années, l'IL-6 est utilisée comme biomarqueur pour plusieurs troubles de l'intestin comme la maladie de Crohn. Des corrélations ont été établies entre la concentration d'IL-6 et la sévérité des crises associées aux MICI (Mudter et Neurath, 2007). De plus, une analyse de tissus intestinaux inflammés de patients souffrant de la maladie de Crohn a démontré que des concentrations élevées en IL-1 β , IL-6 et TNF- α étaient corrélées avec le degré d'inflammation des tissus (Mudter et Neurath, 2007). On comprend ici que l'IL-6 est un élément important dans les MICI.

Une interleukine anormalement présente dans l'intestin lors d'inflammation importante est l'IL-8 (Daig *et al.*, 1996). L'IL-8 est considérée comme la chimiokine principale (interleukine de chimiotactisme). Tout comme l'IL-6, la concentration d'IL-8 est en corrélation avec l'inflammation intestinale, autant chez les patients atteints de la maladie de Crohn que de rectocolite hémorragique (Daig *et al.*, 1996). Le rôle principal de l'IL-8 est le chimiotactisme, c'est-à-dire attirer des cellules du système immunitaire (ici les neutrophiles par l'activation des récepteurs CXCR1 et CXCR2) vers un site inflammé via le gradient de chimiokines (Wang *et al.*, 2009). L'IL-8 active aussi les neutrophiles à plusieurs niveaux métaboliques : la sécrétion de plusieurs enzymes, le relargage d'espèces oxygénées réactives et l'expression de molécules d'adhésion de surface (Daig *et al.*, 1996). Une sécrétion constitutive d'IL-8 est observée dans le modèle cellulaire Caco-2. De plus, la présence de LPS, d'IL-1 β et de TNF- α stimule l'expression du gène de l'IL-8 (Daig *et al.*, 1996). En plus d'être une chimiokine, l'IL-8 est aussi retrouvée dans des tissus cancéreux de toute sorte, utilisé de façon autocrine, elle et aide au développement des tumeurs et à la migration des métastases (Ning *et al.*, 2011). La cytokine est retrouvée en concentration anormalement grande et proportionnelle aux crises chez les gens atteints de la maladie de Crohn et de l'entérocolite hémorragique (Ning *et al.*, 2011). L'IL-8 peut promouvoir la migration, l'invasion et la prolifération cellulaire via l'angiogénèse (Ning *et al.*, 2011). Ces processus biologiques causés par l'IL-8 sont modulés par l'activation des récepteurs CXCR1 et CXCR2, tous deux membres de la famille des protéines transmembranaires couplées aux protéines G (Ning *et al.*, 2011). La cytokine confère un potentiel métastatique aux cellules Caco-2 lors d'exposition continue (Ning *et al.*, 2011). Ce potentiel s'observe lors d'injections sous cutanées de cellules Caco-2 exprimant d'avantage d'IL-8 à des souris ; la taille des tumeurs résultantes

est supérieure à celles observées suite à l'injection de cellules Caco-2 témoins (Ning *et al.*, 2011). La sécrétion autocrine de l'IL-8 par des cellules Caco-2 active la voie de signalisation NF- κ B qui elle-même active les voies de signalisation Akt et MAPK (ERK 1/2) (Ning *et al.*, 2011). Comme mentionné plus haut, NF- κ B mène à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β qui à son tour active la sécrétion de l'IL-8 via ERK1/2. Avec toutes ces réactions en chaîne, une boucle d'amplification pouvant mener à de l'inflammation se met en place. La suractivation de NF- κ B par l'IL-8 mènerait aussi à une chimiorésistance lors des traitements utilisés pour les patients atteints du cancer du côlon (Ning *et al.*, 2011). Considérant tous les effets néfastes énumérés de l'IL-8, cette cytokine semble être une cible thérapeutique prometteuse.

Une cytokine importante dans les MICI est le TNF- α , il cause une augmentation de la perméabilité paracellulaire en affectant les jonctions serrées dans le modèle Caco-2 et *in vivo* chez la souris. Une étude a démontré que l'effet de cette cytokine pro-inflammatoire est médié par la voie de signalisation ERK1/2 (via ELK-1 se liant à la région promotrice MLCK) sans toutefois agir sur la voie de signalisation p38-MAPK (Al-Sadi *et al.*, 2013). Actuellement, la thérapie principale pour le traitement de la maladie de Crohn se fait à l'aide d'inhibiteurs de TNF- α administrés en perfusion. Par suite du traitement, l'inflammation est réduite et l'état des JS s'améliore, réduisant ainsi la pénétration d'antigènes luminaux vers la circulation sanguine. L'amélioration de l'état des JS par l'inhibition de TNF- α peut s'expliquer par la diminution de la stimulation du gène de MLCK par le TNF- α , gène identifié comme régulateur négatif des JS (Al-Sadi *et al.*, 2013). D'autres auteurs ont démontré que l'augmentation de la perméabilité induite par le TNF- α dans les monocouches de cellules Caco-2 ne pouvait être possible sans l'activation de NF- κ B (Ma *et al.*, 2004). De plus, ils ont remarqué que le TNF- α n'induisait pas d'apoptose dans le modèle cellulaire Caco-2 et ainsi que ce ne pouvait pas être la cause de l'augmentation de la perméabilité liée au relâchement des JS de la monocouche (Ma *et al.*, 2004). Une apoptose importante peut effectivement réduire la sélectivité de la monocouche. Le TNF- α est, entre autres, synthétisé par les macrophages, une fois secrété il peut induire l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-6 (Kim *et al.*, 2016). L'augmentation de la perméabilité et la diminution de la TEER liées à la présence de TNF- α sont observables en parallèle à une sous expression des protéines d'adhésions ZO-1 (Ma *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2021). Il est démontré

que le TNF- α à 20 ng/mL diminue significativement les niveaux d'ARNm de l'occludine, de ZO-1 et de la claudine-1 dans des cellules Caco-2 de 21 jours (Li *et al.*, 2021). Le modèle cellulaire Caco-2 possède principalement deux récepteurs au TNF- α soit TNFR1 et TNFR2. Le récepteur TNFR1 est présent autant à l'AP qu'au BL tandis que le TNFR2 est seulement exprimé du côté AP (Sonnier *et al.*, 2010). Le côté de la sécrétion est fortement influencé par le côté d'exposition dans le cas de la sécrétion de l'IL-8 via le TNF- α (Sonnier *et al.*, 2010). Effectivement, la réponse sécrétoire s'effectuera majoritairement du même côté que la stimulation si l'intégrité de l'épithélium n'est pas compromise, autrement il peut y avoir de la diffusion paracellulaire.

1.5 L'inflammation et les macrophages

Tandis que plusieurs évaluent le comportement d'une culture à la suite d'une stimulation extrinsèque par différentes cytokines, d'autres auteurs tentent de reproduire plus fidèlement les conditions *in vivo* par une stimulation en coculture. La présence de macrophages THP-1 activés en coculture avec les cellules Caco-2 a mené à une diminution de la TEER et à un relargage important de LDH, enzyme normalement strictement intracellulaire (Ishimoto *et al.*, 2006). Ceci suggère un taux de nécrose important. Effectivement, des analyses biochimiques ont démontré une accentuation de nécrose et d'apoptose dans des monocouches de cellules Caco-2. L'ajout d'anti-TNF- α a drastiquement diminué la perturbation de l'intégrité de la culture de cellules Caco-2, suggérant que la sécrétion de TNF- α par les macrophages activés cause des dommages importants aux cellules (Ishimoto *et al.*, 2006). Les auteurs mentionnent que le NF- κ B et le TNFR1 semblent jouer un rôle dans cette perturbation provoquée par le TNF- α (Ishimoto *et al.*, 2006). Il est connu que les cellules du système immunitaire comme les lymphocytes ont un impact sur l'épithélium intestinal par la sécrétion de facteurs solubles. Cependant, cette sécrétion n'est pas dommageable lorsqu'elle est du côté systémique. Lorsqu'il y a inflammation et que les macrophages ou les lymphocytes intraépithéliaux s'infiltrent du côté luminal, la stimulation à la suite de la rencontre d'antigènes mène à la sécrétion d'IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5 ainsi que de TNF- α et d'IFN- γ (Ishimoto *et al.*, 2006). Cette suractivation immunitaire et la production anormale de cytokines pro-inflammatoires sont néfastes pour la paroi intestinale.

1.6 Objectifs et hypothèse

Il est suggéré que le Cd présent dans la lumière intestinale issu principalement d'aliments contaminés pourrait jouer un rôle déterminant et sous-estimé dans l'inflammation et la perméabilisation de la muqueuse intestinale. Nous émettons ainsi l'hypothèse qu'en activant ERK1/2, le Cd pourrait exacerber la réponse inflammatoire et représenter un facteur aggravant chez les sujets atteints de MICI. L'activation de ERK1/2 par le Cd dans la cellule intestinale mature serait possiblement à l'origine de la production importante de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , 6, 8 et TNF- α). Ainsi, sans toutefois être une cause d'inflammation chronique, l'exposition au Cd pourrait cependant être un élément ralentissant le rétablissement à long terme des gens atteints de MICI.

À défaut de pouvoir utiliser des conditions *in vivo*, le modèle cellulaire Caco-2 a été utilisé. Ce modèle d'entérocyte issu de cellules cancéreuses de côlon humain possède comme caractéristique la possibilité de se différencier spontanément à confluence (à partir de 6 - 8 jours) pour former une monocouche fonctionnelle polarisée, avec des propriétés semblables aux entérocytes de l'intestin humain en 21 jours de culture (Meunier *et al.*, 1995). La lignée cellulaire Caco-2 est un modèle largement utilisé dans le domaine pharmaceutique pour des essais de perméabilité et de transport (Meunier *et al.*, 1995). La présence de plusieurs particularités semblables aux entérocytes humains comme des jonctions serrées, une bordure en brosse, des transporteurs d'hexoses et des hydrolases sur une culture différenciée fait de la lignée Caco-2 un modèle cellulaire avantageux (Hidalgo *et al.*, 1989).

L'objectif du projet était d'évaluer les effets du Cd à des concentrations représentatives d'une contamination alimentaire sur l'intégrité et la réponse inflammatoire de monocouches cellulaires en regard de l'activation de ERK1/2. Pour ce faire, l'IL-1 β , le TNF- α ainsi que le LPS ont été utilisés seuls ou en combinaisons avec le Cd pour stimuler les cellules Caco-2. Un inhibiteur de ERK1/2 a été utilisé pour voir si un renversement des effets toxiques était possible et donc réellement attribuable à la kinase active. Premièrement, l'intégrité de la monocouche a été étudiée par microscopie confocale, mesure de la TEER et évaluation de la perméabilité paracellulaire sur cultures sur filtres. Deuxièmement, la réponse inflammatoire suite à la stimulation par les différents

traitements a été étudiée en mesurant par ELISA les niveaux de sécrétion de cytokines (IL-1 β , 6, 8 et TNF- α) tout en vérifiant l'état de phosphorylation de ERK1/2 par immunobuvardages de type Western.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire

Le clone TC7 de cellules entérocytaires Caco-2 a été utilisé pour l'ensemble des expériences. Les cellules Caco-2 sont issues d'un adénocarcinome de côlon humain et ont été fournies par Dr A. Zweibaum (Chanteret *et al.*, 1994). Le milieu de culture a été changé 3 fois par semaine. Le milieu utilisé était du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle minimum) (GibcoBRL, Grand Island, NY) additionné de FBS (15 % v/v) (Wisent Inc., St-Bruno, QC, Canada). Le FBS a été inactivé à 56 °C pendant 30 min. Le milieu a été enrichi en acides aminés non essentiels 100 µM (tous en conformation L) : acide aspartique, glycine (Sigma-Aldrich Co., Louis, MO, USA) alanine, asparagine, acide glutamique, proline et sérine (GibcoBRL). Un mélange de pénicilline et de streptomycine (GibcoBRL) à des concentrations respectives de 50 U/ml et 50 µg/ml a été utilisé comme antibiotique. Les Caco-2 ont été maintenues dans une atmosphère à 5% de CO₂ à 37 °C. Les cellules ont été trypsinisées une fois par semaine (0,05% v/v + 0,5 mM EDTA) (Gibco Life Technologies). La densité d'encensement pour les différentes expériences était de 1,2 x 10⁴ cellules/cm² sur plaques à 6, 12 (Costar, Corning, NY), 48 et 96 puits (Sarstedt), ou pétris de 60 et 100 mm (Sarstedt), ou lames de microscopie à 8 puits adaptées à la culture cellulaire (Sarstedt) ou sur filtres de polycarbonate et de polyester (Costar). Les cultures de maintien ont été obtenues dans des flasques de 75 cm² (Corning, Inc., Corning, NY, USA).

2.2 Traitements

Préalablement à tous les traitements, les cellules ont été rincées une fois avec du DMEM sans FBS pour éviter toute complexation du Cd avec l'albumine du sérum (Pham *et al.*, 2004). Les différentes solutions de traitements ont aussi été préparées dans du DMEM sans FBS. Le Cd (sous forme de CdCl₂, Fisher) a été utilisé à des concentrations variant de 5 à 100 µM pour les tests de toxicité et de 5 à 10 µM pour les mesures d'intégrité et de réponse inflammatoire. En utilisant au laboratoire des concentrations de 5-10 µM, la concentration d'exposition des cellules correspond à 0,56 - 1,12

ppm soit une concentration environ 20 - 40 fois au-dessous de celles de certains aliments hautement contaminés (Alloway *et al.*, 1990). Le TNF- α et l'IL-1 β (PeproTech, Cranbury, NJ, États unis) ont été utilisés à des concentrations respectives de 50 - 100 ng/mL et 10 - 20 ng/mL. Le LPS (Sigma, souche O55:B5 et O111:B4) a été utilisé à 20 μ g/mL. Les inhibiteurs de ERK1/2; U0126 (EMD millipore, Oakville, Ontario, Canada, Cat#662-009) et PD98059 (EMD millipore, Cat#19-143) ont été utilisés à 20 μ M.

2.3 Immunobuvardage

Pour l'exposition au TNF- α , à l'IL-1 β ou au Cd pendant 24 h, les pétris ont été placés sur glace et rincés une fois au PBS froid avant la récolte. Les milieux de culture ont été récoltés, centrifugés à 1300 RPM 5 min et placés à -20°C pour y effectuer subséquemment des mesures par ELISA. Les cellules ont été lysées dans du RIPA (Abcam inc., Toronto, ON, ab156034) additionné d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (Abcam inc., ab201111) à raison de 1,3 mL/pétri de 60 mm et 1,8 mL/pétri de 100 mm. Après 10 min les cellules ont été récoltées dans des eppendorfs de 1,5 mL et entreposées à -20 °C jusqu'à utilisation (si imminente) puis à -80 °C pour la conservation à long terme. Suite à la décongélation, les échantillons ont été soniqués (avec appareil QSonica modèle Q125) (ampli 33% 8 - 16 secondes) et homogénéisés à la seringue 25g pour ensuite être centrifugés (13 000 RPM, 15 min, à 4 °C). Les protéines totales du surnageant ont été dosées par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) avec le réactif Biorad (Biorad Protein assay Dye reagent concentrate, cat #500-0006) dilué 1:4 dans de l'eau nanopure. Dans une plaque de 96 puits, 50 μ L d'échantillon dilué 1/20 - 1/30 ont été mélangés à 200 μ L de réactif, incubés 5 min avant la lecture à 570 nm au lecteur de microplaque (Biotek Instruments, EON). Après ajustement des concentrations 40 μ g de protéine/20 μ L/puits de chaque échantillon ont été déposés dans un gel d'acrylamide à 10% d'une épaisseur de 1,5 mm. La migration du SDS page a été effectuée à 100 v avec le système Biorad. Le gel et la membrane de nitrocellulose (Millipore, #1620177) ont ensuite été équilibrés dans du tampon de transfert au moins 20 min et placés dans la chambre d'immunobuvardage (système Biorad). La migration a été effectuée à 100 v durant 80 min sur glace. La membrane a ensuite été bloquée durant 1 h dans une solution de lait écrémé 5 % (m/v). L'incubation avec les anticorps primaires a été faite à 4°C durant la nuit avec légère agitation. L'incubation avec les anticorps secondaires jumelés à la HRP a été faite à température pièce durant

1 h avec agitation. Entre chaque étape, les membranes ont été rincées dans du TBST 3 fois 5 min. La lecture a été faite en incubant les membranes avec les réactifs HyGLO A et B (Denville scientific inc. Saint-Laurent, QC) mélangés 1:1 immédiatement avant la lecture. Les anticorps utilisés étaient: anti ZO-1 (lapin, Cell Signaling, Danvers, MA, 01923 United States, cat#13663) (souris, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, États-Unis, 33-9100), anti-occludine (lapin, Cell Signaling, cat#91131), anti-claudine-2 (lapin, ThermoFisher, cat#710221), anti-ERK1/2 totale (lapin, CellSignaling, Cat#9102), anti-phospho-ERK1/2 (lapin, Cell Signaling, Cat#9101), anti- β -actine (lapin, CellSignaling, Cat#4967) et anti-GAPDH (souris, Santa Cruz, Cat#SC-32233). Les anticorps secondaires sont dirigés contre les IgG de lapin (Cell Signaling, Cat#7074) et de souris (Cell Signaling Cat#7076) avec la dilution recommandée par le fabricant.

2.4 Immunofluorescence

Les cellules ont été maintenues 7 ou 21 jours sur des plaques à 48 puits (Sarstedt) ou des lames de culture à 4 ou 8 puits (Ibidi, Fitchburg, Wisconsin, États-unis ou Sarstedt, Ref 94.6190.802). Les cellules ont été rincées 1 fois avec du DMEM sans FBS avant le traitement de 24 h (Cd, LPS, TNF- α , Il-1 β et PD98059). Par la suite les cellules ont été rincées 2 fois rapidement au PBS froid puis fixées au paraformaldéhyde (Sigma) (4% m/v) durant 10 min et rincées 3 fois 5 min au PBS. Les cellules ont ensuite été perméabilisées au triton X-100 (0,2% v/v) dans du PBS durant 5 min à 4 °C. Le blocage a ensuite été effectué 1 h à 4 °C avec du BSA (5% m/v) dans du PBS. L'incubation avec les anticorps primaires anti-ZO-1 (Invitrogen, 33-9100) et anti-occludine (Cell signaling, 91131S) a été fait durant la nuit à 4 °C sous faible agitation avec un volume suffisant pour recouvrir la surface de culture. Après 3 rinçages de 5 min au PBS l'incubation secondaire a été faite à température pièce durant 1 h avec agitation et suivie de deux rinçages au PBS de 5 min et une incubation de 5 min avec du DAPI dilué (Thermo Fisher. Waltham, Massachusetts, États-Unis). Les cellules ont ensuite été rincées deux fois supplémentaires avec du PBS. Les anticorps secondaires utilisés étaient Alexa Fluor 647 anti-IgG de lapin (Invitrogen, A21244) et Alexa Fluor 488 anti-IgG de souris (Invitrogen, A32766TR). Les anticorps secondaires étaient dilués à 5 μ g/mL et les anticorps primaires selon la dilution conseillée par le fabricant. La capture des images a été faite sur un microscope confocal, le laser Nikon AIR (Japon, 2011). Au moins deux photos par

puits ont été prises. La quantification de fluorescence totale a été effectuée à l'aide logiciel ImageJ et les mesures de colocalisation par le logiciel NIS-Elements.

2.5 Mesure de la perméabilité paracellulaire au rouge de phénol et au dextran

Cette mesure a été effectuée sur des cellules de 21 jours maintenues sur filtres en inser (Corning) dans des plaques à 6 puits (Sarstedt). Suite à l'exposition de 24 h dans du DMEM sans FBS, les cellules ont été rincées une fois (chambre supérieure et inférieure) avec du tampon de Krebs et le milieu de culture préalablement prélevé a été congelé pour les mesures par ELISA. Les cellules ont été incubées avec 1,5 mL de rouge de phénol (Sigma, cat #P3532) à 3,54 mg/L dans du tampon de Krebs, à l'AP tandis que le milieu BL (2,5 mL) n'était composé de que tampon Krebs. Les monocouches ont été incubées à 37 °C en absence de CO₂ pour ne pas interférer avec la couleur du phénol. Des volumes de 100 µL ont été recueillis à 30, 60, 90 et 120 min des 2 chambres de l'inser et transférés dans une plaque à 96 puits. Les résultats estimés avec l'équation ci-dessous (lecture à 420 nm) sont exprimés en pourcentages de variation par rapport au témoin. Les expériences avec le dextran-FITC ont été effectuées de la même manière, mais avec une lecture à 520 nm (excitation à 490 nm). La concentration finale du dextran était de 1 mg/mL.

$$\frac{(D.O \text{ chambre inférieure})}{(D.O \text{ chambre inférieure} + D.O \text{ chambre supérieure})} * 100$$

2.6 Mesure de la résistance transépithéliale (TEER)

La variation de la TEER a été mesurée en fonction du temps de culture jusqu'au 22^e jour à l'aide d'un appareil EVOM-G (World precision instrument Inc) avec au moins 2 lectures consistantes par puits. Les cellules ont été cultivées sur filtres (Corning) sur des plaques de 6 ou 12 puits (Sarstedt). Au 21^e jour les cellules ont été rincées avec du DMEM sans FBS avant d'être traitées aux cytokines ou au Cd dans du DMEM sans FBS pendant 24 h. Une dernière lecture de TEER a ensuite été prise en duplicata pour évaluer l'effet du traitement sur l'intégrité de la monocouche cellulaire mature. Les mesures ont été corrigées pour la valeur obtenue sur filtre seul sans cellules et converties en

$\Omega \cdot \text{cm}^2$. Les résultats sont exprimés en pourcentages de variation par rapport aux témoins respectifs avant d'effectuer une moyenne sur plusieurs passages cellulaires.

2.7 ELISA

Les mesures par ELISA pour doser les cytokines libérées dans le milieu de culture (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-8) ont toutes été réalisées avec les Kits Biolegend deluxe (Biolegend, San Diego, CA 92121, United States) selon les protocoles fournis par le fabricant.

2.8 Mesure de l'activité MTT

Les solutions de Cd, d'IL-1 β , de LPS (O55 et O111) et de TNF- α ont été diluées dans du milieu DMEM sans FBS. Les traitements ont été faits dans un volume de 100 μL en plaques de 96 puits durant 24 h. Par la suite, 10 μL de substrat MTT (Sigma, cat #88417) (3-[4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) à 5 mg/mL pour une concentration finale de 0,5 mg/mL ont été ajoutés. Après 1 h, la solution a été aspirée et les cristaux de formazan produits ont été solubilisés avec 100 μL de DMSO pendant 10 - 15 min. La lecture se fait à 575 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoins (cellules non traitées avant l'ajout de MTT).

2.9 Dosage de la LDH extracellulaire

Les solutions de Cd ont été diluées dans du milieu DMEM sans FBS. L'incubation des cellules avec le Cd a été faite dans un volume de 100 μL en plaques de 96 puits durant 24 h. La mesure de relargage de LDH dans le milieu extracellulaire a été effectuée selon les instructions du distributeur en utilisant les réactifs du kit LDH-Cytox Assay Kit (BioLegend, cat #426401). Les modifications principales concernent la confluence et le temps de réaction avec le substrat. La confluence était de 100% (21^e jours de culture) et le temps d'incubation avec le substrat était de 2 min avant l'ajout de la solution d'arrêt. La lecture s'est faite à 490 nm. Les résultats sont exprimés relativement à 100% de mortalité, obtenue sur des puits ayant été exposés à une solution de lyse durant 30 min préalablement à l'ajout du substrat.

2.10 Tests statistiques

Les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel JMP PRO version 16.0.0 et GraphPad Prism version 8.0.1. Les deux tests utilisés dans l'analyse des données sont ceux de Dun et Dunnett.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Caractérisation et optimisation du modèle et du choix de filtre semi-perméable

Avant de débiter l'étude de l'implication de ERK1/2 dans l'impact du Cd et des cytokines pro-inflammatoires sur des monocouches de cellules Caco-2, il est important de procéder à quelques étapes de caractérisation. En travaillant en culture cellulaire, l'utilisation du clone TC7, isolé de la lignée Caco-2, est parfois avantageuse pour l'obtention de résultats plus homogènes. De plus, le clone TC7 est le plus différencié de la culture mère (Chantret *et al.*, 1994). Il était donc important avant toute chose de vérifier l'état de différenciation des cellules. Puisque plusieurs expériences étaient prévues sur des filtres semi-perméables et que plusieurs types de filtre sont disponibles, la première étape était de comparer l'état des cultures maintenues sur deux types de filtres, soit ceux en polyester (PE) et ceux en polycarbonate (PC). De même, la comparaison de la lignée cellulaire Caco-2 avec le clone TC7 sur ces deux types de filtre permettait d'avoir un bon aperçu des meilleures conditions de culture pour la suite du projet.

Lors du travail avec le modèle cellulaire intestinal Caco-2, le temps de culture (la confluence et l'état de la différenciation) est important, car il détermine la maturité de la monocouche et l'étude dépend de cette maturité. Avec ce modèle, la différenciation débute spontanément lors de l'atteinte de la confluence aux alentours du 7^e jour. Ce projet nécessite une monocouche intègre et différenciée qui possède des points communs avec l'épithélium intestinal (JS, bordure en brosse, transporteur d'hexose, etc.). La monocouche doit aussi être polarisée pour que l'étude des deux côtés de la monocouche soit possible. De plus puisque la phosphorylation de ERK1/2 est ici à l'étude pour la 2^e partie du projet, il est important de travailler avec des cellules différenciées de 21 jours, car à ce stade, les taux de p-ERK1/2 en condition normale sont négligeables. De plus en travaillant à 21 jours, la monocouche cellulaire est différenciée et il est possible d'étudier les jonctions serrées, ce qui serait impossible sur une culture de 7 jours. Pour mesurer facilement la formation d'une monocouche intègre, l'utilisation d'un volmètre mesurant la résistance électrique transépithéliale (TEER) est l'outil de choix. C'est donc grâce à cet appareil que la TEER a été

comparée entre la lignée Caco-2 et le clone TC7 maintenus sur les deux types de filtres (polyester PE et polycarbonate PC). Plus la TEER augmente et plus la présence des jonctions serrées (JS) est importante. L'avancement de la différenciation est intimement lié à la présence des JS.

Les figures 3.1 et 3.2 comparent les variations de TEER sur les deux types de surface de culture pour les cellules Caco-2 et TC7. La 1^{ère} figure démontre que les filtres en PC et PE n'influencent pas le développement de la TEER de monocouches de cellules TC7 au cours des 21 jours. Les valeurs initiales et finales sont comparables (elles varient de 30 ± 6 à $244 \pm 48 \Omega.cm^2$ sur filtres PC et de 18 ± 4 à $253 \pm 94 \Omega.cm^2$ sur filtres PE). De plus, dans les deux cas, l'évolution des valeurs se fait de manière très constante et linéaire entre le 4^e et le 21^e jour de culture. Cette linéarité semble cependant plus discutable avec la lignée cellulaire Caco-2 et ce, peu importe le type de filtre (Fig. 3.2). Malgré l'augmentation de la TEER, la variation de la TEER entre les différents passages cellulaires est plus marquée qu'avec le clone. Outre cette plus grande variance, les valeurs entre les deux types de filtre sont cependant similaires indiquant l'absence d'effet du type de filtre sur le développement de la TEER (augmentation de 44 ± 3 à $225 \pm 44 \Omega.cm^2$ sur filtres PC et 55 ± 3 à $298 \pm 78 \Omega.cm^2$ sur filtres PE).

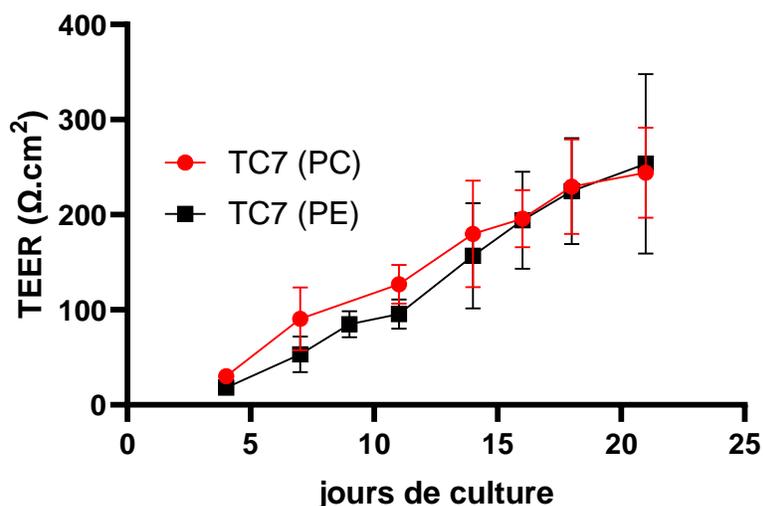


Figure 3.1 : Variation de la TEER entre le 4^e et 21^e jour de culture de cellules TC7 sur filtres de polycarbonate (PC) et de polyester (PE). Les résultats sont représentés en moyenne et écart types (n = 5)

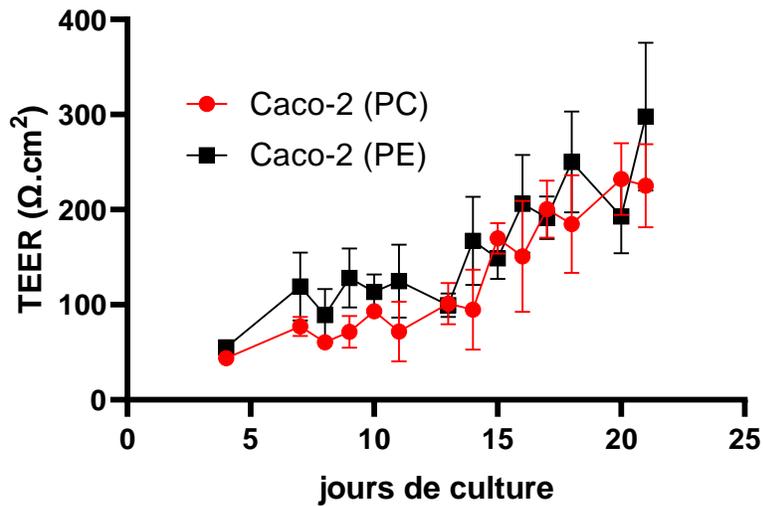


Figure 3.2 : Variation de la TEER entre le 4^e et 21^e jour de culture de cellules Caco-2 sur filtres de polycarbonate (PC) et de polyester (PE). Les résultats sont représentés en moyennes et écarts types (n = 8)

3.2 Le Cd affecte la viabilité, la TEER et la perméabilité de la monocouche de cellules TC7 différenciées à partir de 5 μM

Suite aux 21 jours de culture, une exposition de 24 h à différentes concentrations de Cd (0, 5, 10 et 20 μM déposé du côté AP) est effectuée pour mesurer l'impact du métal sur la chute de la TEER. Les mêmes conditions expérimentales que récemment (TC7 vs Caco-2 et PC vs PE) sont utilisées pour voir s'il y a des combinaisons plus optimales pour la suite des expériences. Tout est démontré dans la figure 3.3 et effectivement les 4 combinaisons affichent que les cultures ont des résistances de base supérieures à 200 Ω.cm² et subissent une perte majeure d'au moins 50% de la TEER en 24 h en présence de 5 μM de Cd. La TEER obtenue avec TC7/PC passe de 193 ± 25 à 88 ± 11 Ω.cm² soit une chute de 54% en 24 h. Pour TC7/PE la TEER chute de 191 ± 21 à 103 ± 12 Ω.cm² représentant une perte de 46% dans un même délai. Pour les cellules Caco-2 sur filtres PC ou PE la TEER varie respectivement de 161 ± 51 à 65 ± 11 Ω.cm² et de 199 ± 47 à 87 ± 19 Ω.cm² ce qui représente des diminutions de 60% et 56%. Pour les cellules Caco-2, les chutes sont légèrement plus importantes que pour les cellules TC7. Tous les traitements à 10 et 20 μM mènent à des chutes

de TEER significatives par rapport au témoin du groupe. Par contre, seulement les expériences menées avec les cellules TC7 (PC et PE) mènent des chutes significatives à 5 μM .

L'impact de la concentration de Cd se remarque aussi à 10 et 20 μM mais la chute majeure de TEER est effectivement observable à 5 μM . Les 4 combinaisons de culture/filtre offrent des profils de réponse très semblable et aucune ne semble présenter d'avantage pour ce type d'expérience.

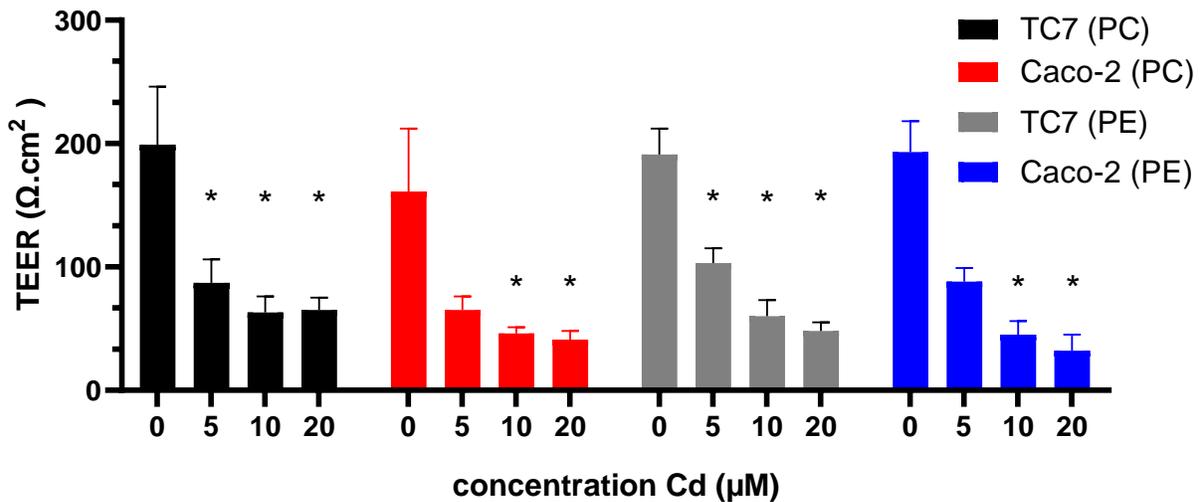


Figure 3.3 : Impact du Cd sur la TEER suite à une exposition de 24 h dans du DMEM sans FBS entre le 21^e et le 22^e jour de culture sur les cellules Caco-2 et son clone (TC7) sur deux types de filtres semi-perméables (PC et PE). Les résultats sont représentés en moyennes et écarts types (n = 4-8). Les tests statistiques avec TC7 sont effectués avec le test paramétrique de Dunnett et les résultats avec Caco-2 de façon non paramétrique avec le test de Dunn* = significativement différent (p < 0,05) du témoin respectif

Pour s'assurer que la chute de TEER par le Cd n'est pas due à une mortalité trop importante, il est important de procéder à des tests de viabilité avant de poursuivre les études d'intégrité et d'inflammation en réponse au Cd, aux cytokines et au LPS. L'effet de cytokines et du LPS sur la viabilité cellulaire a aussi été évalué. Ainsi, il devient possible d'utiliser des concentrations de traitement (pour 24 h) induisant peu de mortalité cellulaire. Plusieurs concentrations de chaque traitement ont été testées, seuls les résultats obtenus avec les concentrations utilisées dans la suite de l'étude sont représentés à la figure 3.4.

Pour information, la viabilité des cellules Caco-2 (21 jours) a été évaluée suite à une exposition de 24 h à des concentrations de 0-500 ng/mL de TNF- α et une mortalité maximale de $13 \pm 9\%$ fût notée à 500 ng/mL. La viabilité cellulaire a aussi été mesurée en fonction de concentrations croissantes (0-150 ng/mL) de l'IL-1 β et une mortalité maximale de $17 \pm 7\%$ a été observée à 150 ng/mL. Deux souches de LPS (O55:B5 et O111:B4) ont été testées avec des concentrations de 0-100 $\mu\text{g/mL}$ et des mortalités maximales respectives de $14 \pm 4\%$ et $16 \pm 3\%$ ont été mesurées à 100 $\mu\text{g/mL}$. Pour le Cd, il était déjà connu que le test MTT ne pouvait être utilisé aux concentrations visées par le projet, car, aux alentours de 10 μM , le Cd active ERK qui à son tour active la déshydrogénase mitochondriale, rendant difficile d'interprétation les résultats MTT et inapproprié comme test de viabilité en présence de Cd (Fig 3.4). D'autres tests de viabilité n'utilisant pas la succinate déshydrogénase comme marqueur d'activité métabolique ont donc été utilisés dans le cas de traitements au Cd.

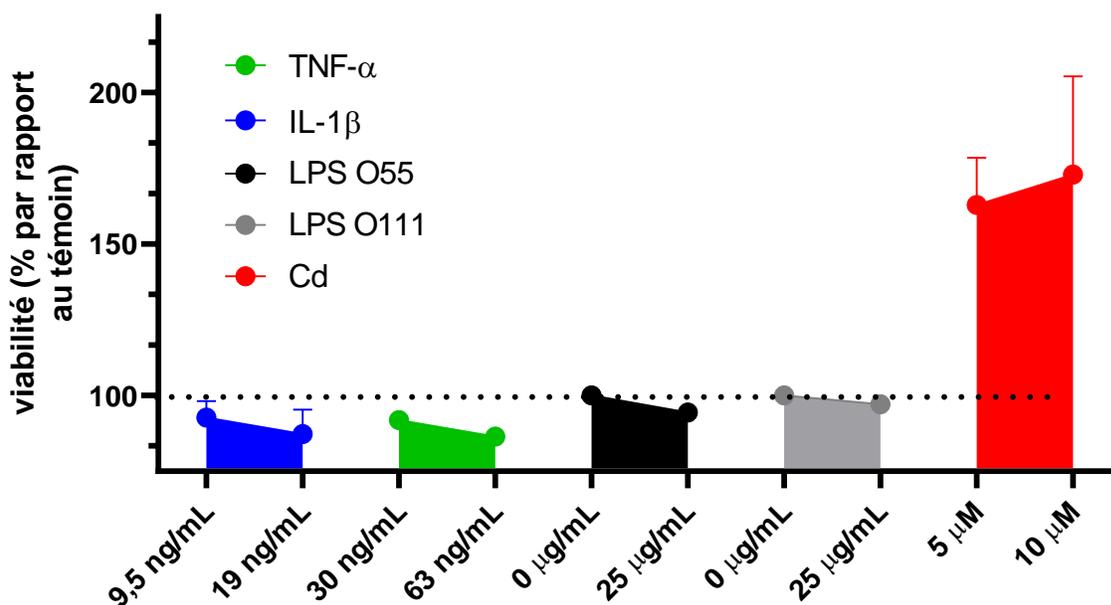


Figure 3.4 : Viabilité cellulaire sur cultures de cellules Caco-2 et TC7 de 21 jours par le test MTT pour différents traitements (Cd, TNF- α , IL-1 β et LPS). Les résultats sont représentés en moyennes et écarts types (n = 3-6). Les expositions étaient de 24 h dans du DMEM sans FBS

La LDH est une enzyme strictement intracellulaire et le test de viabilité se base sur sa concentration extracellulaire par relargage suite à de la nécrose. L'activité enzymatique est mesurée par la

transformation du substrat dans le milieu de culture. La figure 3.5 montre l'augmentation attendue du pourcentage de mort cellulaire en fonction de la concentration croissante de Cd. Les concentrations de 5 et 10 μM utilisées durant les études suivantes ne mènent donc pas à plus de 12% de mortalité (respectivement, $7,6 \pm 6\%$ et $11,6 \pm 5\%$ sont obtenus à 5 et 10 μM de Cd). Une mortalité maximale de $48 \pm 9\%$ est obtenue après 24 h d'exposition à 200 μM de Cd. Ces résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à une valeur contrôle obtenue suite à la lyse complète de cellules représentant 100% de mortalité (relargage total de LDH dans le milieu extracellulaire).

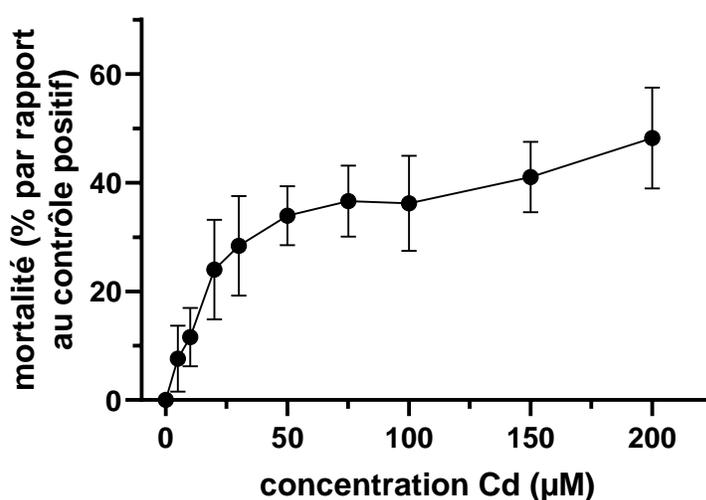


Figure 3.5 : Mortalité, estimée par dosage de LDH, de cellules Caco-2 exposées 24 h dans du DMEM sans FBS à des concentrations croissantes de Cd. Les résultats sont représentés en moyennes et écarts types ($n = 4$)

Une fois la caractérisation du modèle effectuée et la sensibilité des cellules aux divers traitements évaluée, il est possible de procéder aux mesures subséquentes avec davantage de confiance sur des cultures viables. C'est la combinaison TC7/PC qui sera utilisée pour la suite des expériences. Peu de différences se présentaient entre les choix, mais l'évolution de la TEER avec les cellules TC7 était plus linéaire et au 21^e jour, la variance de la TEER est plus petite sur filtres PC que sur filtres PE.

Comme mentionné dans l'introduction, différentes protéines de jonction régulent la perméabilité paracellulaire à différents niveaux. Par exemple, le passage des ions et des macromolécules (> 1 kDa) n'est pas géré par les mêmes molécules de jonction. Sachant ceci, des tests de perméabilité

paracellulaire mesurant le flux paracellulaire (AP à BL) peuvent être effectués avec des marqueurs de différentes tailles. Ici le dextran-FITC (4 kDa) et le rouge de phénol (354 Da) ont été utilisés pour comparer le passage de molécules de grande et petite taille. Puisque l'effet dose-réponse est présent sur la chute de TEER en fonction de concentrations croissantes de Cd, il devrait aussi être observable sur le flux paracellulaire.

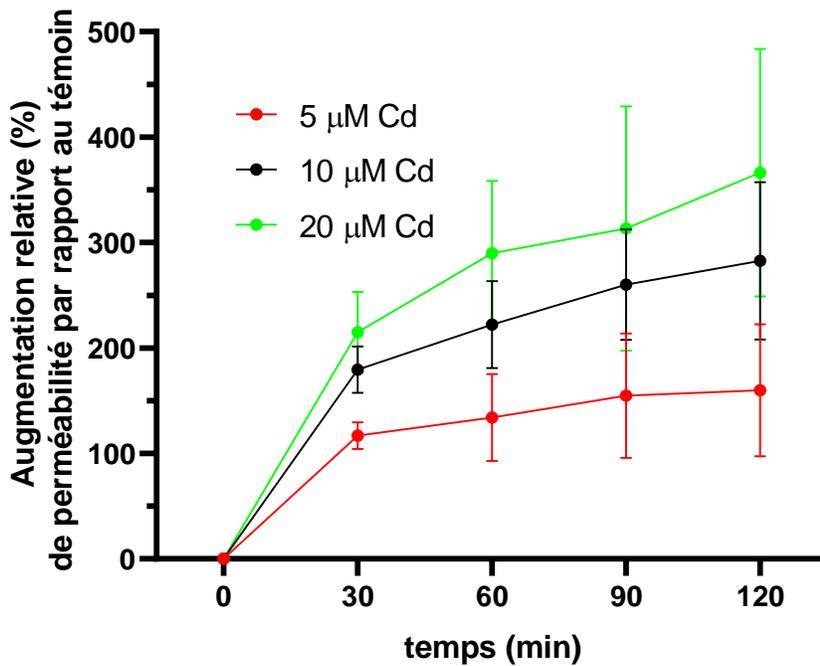


Figure 3.6 : Perméabilité paracellulaire estimée par diffusion du rouge de phénol (354 Da) sur des cellules TC7 différenciées de 21 jours suite à des expositions de 24 h à différentes concentrations de Cd dans du DMEM sans FBS. Les résultats sont représentés en moyennes et écarts types (n = 3-4)

Les figures 3.6 et 3.7 représentent l'augmentation de ce flux durant 2 heures suite à une exposition de 24 h aux différentes concentrations de Cd. Pour la diffusion du rouge de phénol (354 Da) en présence de Cd, le phénomène observable est semblable à celui du dextran-FITC (4 kDa) malgré la différence de taille. Après 2 heures, les cultures sur filtres exposées à 5 μM ont laissé passer $160 \pm 62\%$ de plus de rouge de phénol que leur témoin respectif (Fig. 3.6). Pour les cultures exposées à 10 et 20 μM , c'est respectivement $283 \pm 74\%$ et $366 \pm 118\%$ de plus que leur témoin respectif. Comme attendu, l'importance de la diffusion du dextran-FITC augmente aussi avec la

concentration de Cd. Pour le cas du dextran il est impossible ici d'exprimer les résultats en pourcentage d'augmentation par rapport au témoin car les valeurs brutes de fluorescence varient trop d'un témoin à un autre. Avec le calcul des valeurs de fluorescence ($BL / (BL+AP)$), la valeur de fluorescence des témoins de différents passage d'une même condition variaient de 0,05 à 4,01 et ce, en absence de Cd. Avec l'ajout de Cd ce phénomène s'exacerbe. C'est donc avec les moyennes des variations, brutes (et non relatives), d'un même passage entre le témoin et la culture traitée que le graphique a été construit. Malgré la variation de la fluorescence de base, l'augmentation du signal en fonction des traitements est comparable entre les passages. Ainsi, la figure 3.7 démontre que plus la concentration de Cd augmente et plus la différence de perméabilité entre le témoin et l'échantillon traité augmente après 24 h de traitement.

La figure 3.3 suggère que la majeure partie du dommage à la monocouche est effectué à 5 μM de Cd vu la chute de TEER moyenne de 50%, mais l'augmentation radicale de la perméabilité au RP et au dextran pour les cultures sur filtres à 10 et 20 μM suggère le contraire. Il y aurait donc différentes informations fournies par la variation de la TEER et les changements de perméabilité réelle suite aux traitements de Cd. C'est donc avec ces deux outils (TEER et marqueurs de perméabilité paracellulaire) que l'impact de l'ensemble des traitements (seuls et conjugués au Cd) sur l'intégrité de la monocouche sera mesuré. Ceci permettra d'observer si différents traitements affectent indépendamment la TEER et le flux paracellulaire ou si la perte de TEER corrèle toujours avec l'augmentation de la perméabilité de la monocouche. Le Cd affecte donc le passage des petites et grosses molécules ($> 1 \text{ kDa}$) au travers de la monocouche. Après avoir déposé le dextran à l'AP (durant 120 min), la différence de perméabilité des cultures traitées à 5, 10 et 20 μM de Cd par rapport aux témoins est respectivement de $1 \pm 0,9$, 7 ± 2 et 13 ± 5 . Les cellules exposées à 10 μM laissent donc passer 7 fois plus de dextran que celles exposées à 5 μM et celles exposées à 20 μM en laisse passer 13 fois plus que celles traitées à 5 μM de Cd. Ce phénomène s'accroît davantage avec l'augmentation de la concentration de Cd alors que la chute maximale de TEER est déjà atteinte à 5 μM de Cd.

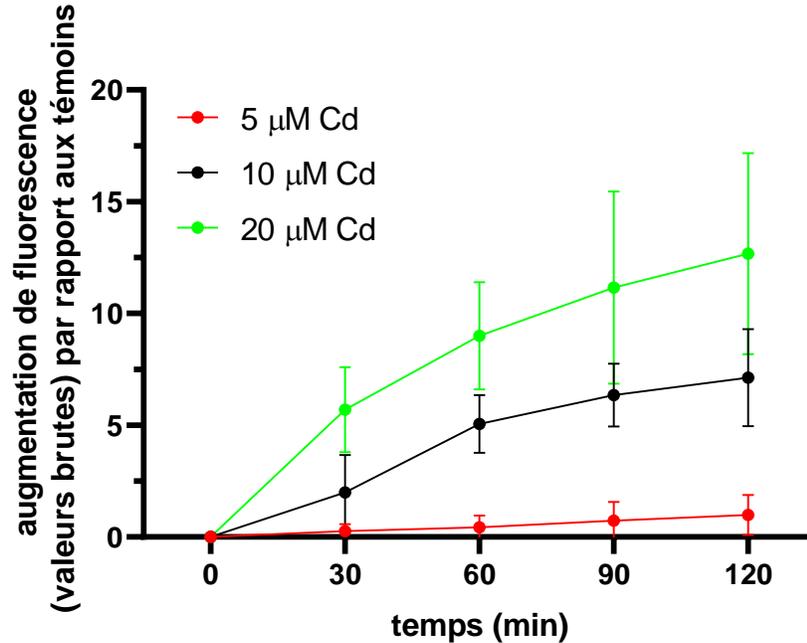


Figure 3.7 : Perméabilité paracellulaire par diffusion du Dextran-FITC (4 kDa) sur des cellules TC7 de 21 jours suite à des expositions de 24 h à différentes concentrations de Cd. Les résultats sont représentés en moyennes et écarts types (n = 3-5)

3.3 L'intégrité des cellules TC7 est compromise par le Cd sans potentialisation par le LPS ou les cytokines inflammatoires (TNF- α et IL-1 β) et ERK1/2 n'est pas impliquée

Lors d'une exposition sur filtre, le côté (AP ou BL) auquel le traitement est déposé importe. Dans le cas du Cd et du LPS O55:B5, ils seront toujours déposés à l'AP, car c'est de ce côté qu'ils se retrouveront initialement *in vivo*. Cependant, pour le TNF- α et l'IL-1 β , les cellules seront exposées des deux côtés (AP et BL) car ils peuvent normalement être sécrétés de chaque côté de la monocouche. L'inhibiteur de ERK1/2 a toujours fonctionné au laboratoire lorsque déposé au côté AP et c'est donc de ce côté qu'il sera utilisé. Le rouge de phénol (RP) sera utilisé pour la suite, car ce marqueur est plus facile à utiliser et fournit des résultats plus reproductibles que le dextran-FITC. Nous sommes néanmoins conscients que chaque marqueur ne donne pas les mêmes informations étant donné leur différence de taille.

Puisque l'absence d'effet de l'inhibiteur de ERK1/2 sur la viabilité cellulaire n'a pas été vérifié,

son effet sur la monocouche au niveau de la TEER et de la perméabilité doit d'être mesuré. La figure 3.8 démontre l'absence d'effet de l'inhibiteur sur les deux paramètres étudiés. Il peut donc être utilisé conjointement aux traitements. Chacun des traitements peut être appliqué avec ou sans inhibiteur de ERK1/2. De cette façon, il est possible de noter si l'effet d'un traitement sur la culture de TC7 est attribuable (complètement ou partiellement) à p-ERK1/2. La figure 3.8 montre des résultats avec inhibiteur obtenus seulement en présence d'IL-1 β et de Cd, car ce sont initialement les deux traitements ayant provoqué une réponse inflammatoire marquée par ELISA par la sécrétion d'IL-8. Nous avons remarqué seulement plus tard l'effet du TNF- α sur la sécrétion d'IL-8. Cependant, en microscopie confocale, l'impact du TNF- α a été étudié en l'utilisant seul et conjointement à l'inhibiteur de ERK1/2 sur l'expression de ZO-1 et de l'occludine par immunofluorescence (Fig. 3.9 et 3.10). De plus, leur colocalisation a aussi été mesurée car ce paramètre peut être indépendant de l'expression protéique totale. Les informations fournies par les expériences de microscopie confocale suggèrent que le TNF- α (avec ou sans inhibiteur) n'a pas d'impact significatif sur l'expression totale des 2 protéines de jonction ainsi que sur leur capacité à faire des liens hétérophiles (Fig. 3.9 et 3.10). Ce résultat est en accord avec l'absence d'effet du TNF- α AP sur la TEER ou la perméabilité au RP (Fig. 3.8). Par contre, une légère perte (non significative) de TEER ($84 \pm 10 \%$) sans variation de perméabilité est observée lorsque le TNF- α est appliqué au niveau BL.

L'information la plus frappante fournie par la figure 3.8 est l'impact du Cd sur la perméabilité et la TEER. Effectivement, comme vu précédemment (Fig. 3.3), le Cd à $5 \mu\text{M}$ cause une perte de TEER de $50 \pm 12 \%$ en 24 h. De plus il augmente de façon non négligeable le flux du RP (354 Da) et même du dextran (4 kDa) (Fig. 3.6, 3.7 et 3.8). La question était de voir si la présence de LPS, TNF- α ou d'IL-1 β avec ou sans inhibiteur de ERK1/2 pouvait exacerber ou au contraire renverser l'effet du Cd. Il était aussi intéressant de tester ces traitements seuls puisqu'ils sont tous considérés comme pro-inflammatoires (à l'exception de l'inhibiteur). Seul, ni le LPS (AP), le TNF- α (AP ou BL) ou l'IL-1 β (AP ou BL) ne causent d'augmentation significative du flux de RP suite à un traitement de 24 h (Fig. 8). Par contre, ils diminuent tous légèrement la TEER à des valeurs relatives aux témoins respectives de $97 \pm 6\%$, $84 \pm 10\%$, $90 \pm 9\%$, $95 \pm 10\%$ et $94 \pm 8\%$ pour le TNF- α (AP puis BL), l'IL-1 β (AP puis BL) et le LPS (AP). Ce n'est évidemment pas comparable au Cd qui cause une chute de TEER de $50 \pm 12\%$ et une augmentation de perméabilité du RP de $68 \pm 35\%$.

Le Cd est le seul traitement individuel qui cause une augmentation significative de la perméabilité et une baisse significative de la TEER. Les co-traitements au Cd avec du LPS, du TNF- α et de l'IL-1 β ne révèlent aucun effet de potentialisation sur l'effet du Cd. Les résultats obtenus sont alors similaires à ceux observés en présence de Cd seul, et ce, avec ou sans inhibiteur. La seule nuance notable se remarque avec deux traitements en particulier soit Cd + inhibiteur et Cd + IL-1 β + inhibiteur. Ces deux conditions induisent une chute de TEER moins importante qu'elles n'augmentent la perméabilité du RP. Dans tous les autres cas, la chute de TEER est toujours plus forte que la variation de perméabilité du RP. Malgré tout, les variations de ces deux mesures (TEER et perméabilité) sont à tout moment influencées par les traitements similaires. En co-traitement, seul les combinaisons Cd + inhib et Cd + IL-1 β + inhib mènent à des augmentations significatives de la perméabilité. Tous les co-traitements provoquent des chutes significatives de la TEER principalement dues au Cd. Bien que le LPS AP n'affecte pas la monocouche de quelconque manière, sa présence concomitante avec le Cd diminue légèrement l'impact négatif du Cd autant sur la chute de TEER que sur l'augmentation de la perméabilité. C'est le co-traitement où l'impact du Cd est le plus réduit. Les valeurs respectives obtenues suite au traitement du Cd seul sont de $50 \pm 12\%$ et $168 \pm 35\%$ pour la TEER et la variation de la perméabilité. Pour le co-traitement Cd + LPS, les valeurs respectives par rapport au témoin pour la chute de TEER et la variation de perméabilité sont de $68 \pm 7\%$ et $130 \pm 19\%$. La chute de TEER (LPS + Cd) est donc réduite de 36% relativement à celle du Cd seul et l'augmentation de perméabilité est réduite de 29% relativement à celle du Cd seul. Malgré cette diminution de l'effet du Cd, la chute de la TEER reste significative. Par contre, l'augmentation de la perméabilité n'est pas significative contrairement à ce qui est obtenu avec un traitement au Cd seul. Un phénomène semblable (diminution de l'effet du Cd par le LPS) est aussi observé pour la sécrétion AP d'IL-8 (Fig. 10) qui sera discuté plus tard.

La chute de TEER la plus importante est produite par le Cd seul ($50 \pm 12\%$) et le traitement (excluant l'inhibiteur) affectant le moins cette résistance est le TNF- α AP ($97 \pm 6\%$). Les traitements apicaux seuls (à l'exception du Cd) n'ont aucun impact sur la perméabilité du RP. La valeur relative par rapport au témoin de la perméabilité induite par le LPS, l'IL-1 β et le TNF- α est respectivement de $101 \pm 11\%$, $99 \pm 10\%$ et $106 \pm 7\%$ donc aucun impact peu importe le côté d'exposition pour les cytokines. Pour les traitements précédents, mais BL, la valeur respective par rapport au témoin pour l'IL-1 β et le TNF- α est de $102 \pm 9\%$ et $104 \pm 5\%$. Les traitements affectant

la perméabilité de façon plus importante sont le Cd + inhibiteur et le Cd + IL-1 β + inhibiteur avec des valeurs respectives par rapport au témoin de 219 \pm 39% et 185 \pm 26%. Il faut noter que l'inhibiteur de ERK1/2 ne renverse pas la perte d'intégrité de la monocouche induite pas le Cd.

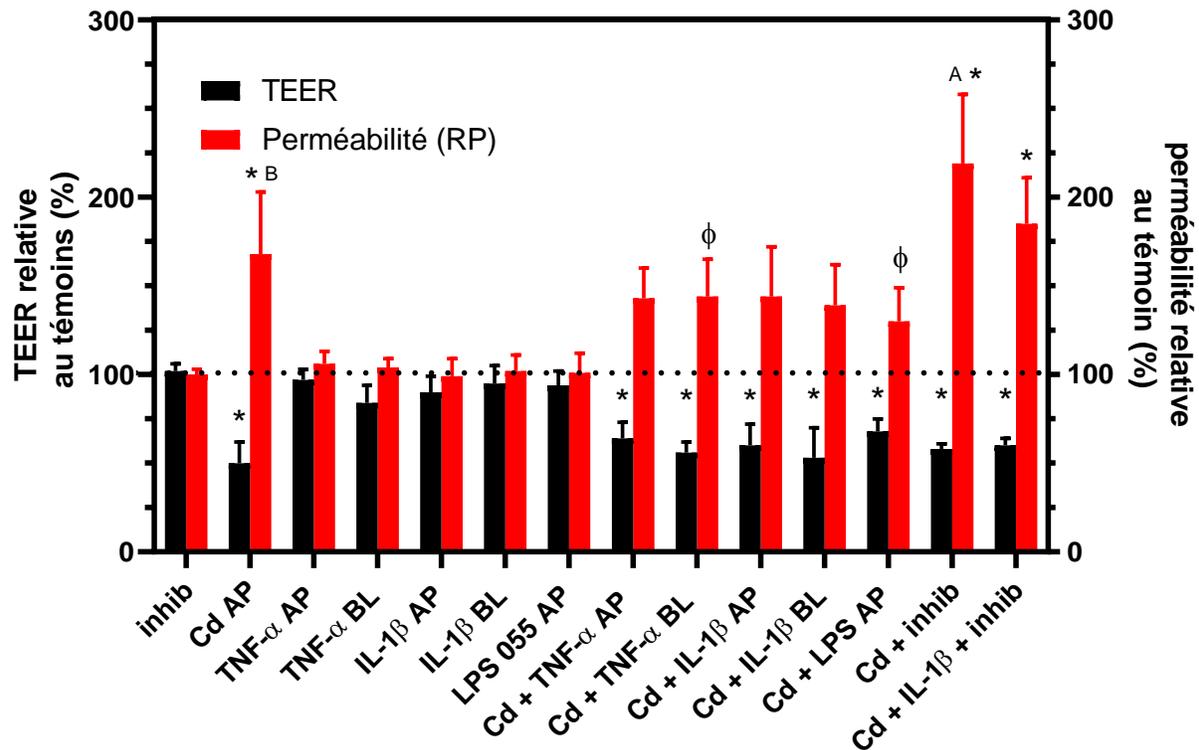


Figure 3.8 : Effet des différents traitements de 24 h dans du DMEM sans FBS (LPS 20 μ g/mL, TNF- α 50 ng/mL et IL-1 β 10 ng/mL) seuls et jumelés au Cd (5 μ M) et/ou un inhibiteur de ERK1/2 (20 μ M) sur l'augmentation de la perméabilité paracellulaire au rouge de phénol (RP / 354 Da) et la chute de TEER sur des cellules TC7 de 21 jours. Les résultats sont représentés en moyennes et écarts types (n = 3-12). * = différence significative (p < 0,05) par rapport au témoin (non paramétrique (RP) et paramétrique (TEER) selon les tests de Dun/Dunnett. Les lettres A et B indiquent des résultats significativement différents selon le test de Dunnett paramétrique. Φ = tendance (p < 0,1) par rapport au témoin selon le test de Dun (non paramétrique).

Il existe plusieurs protéines de jonction, parmi celles-ci (et parmi celles associées à des entérocytes différenciés) il y a l'occludine et ZO-1. Ces protéines peuvent faire des liens entre elles-mêmes (homophiles) ou avec d'autres protéines de jonction (hétérophiles) comme un lien ZO-1/occludine par exemple. Sachant quels traitements ont des impacts significatifs sur la perméabilité et la TEER, il est intéressant de savoir si ZO-1 ou l'occludine font partie des protéines affectées.

La figure 3.9 représente l'ensemble des mesures de fluorescence totale et de colocalisation entre ZO-1 et l'occludine. L'aspect sur la désorganisation sera discuté plus bas. La première chose qu'il faut noter à la figure 3.9 est l'absence de changement au niveau de la colocalisation. Puisqu'il s'agit d'une superposition de pixels associés à ZO-1/occludine sur une image, la quantité de protéine ne fait pas varier la colocalisation tant que le rapport entre les protéines liées (superposition) est le même. Effectivement, contrairement ce qui a été mentionné plus haut, plusieurs co-traitement semblent avoir un effet significatif sur l'expression de l'occludine et de ZO-1 mais le nombre de réplica ($n=2$) n'est pas suffisant pour un traitement statistique. Étonnamment, malgré l'effet non négligeable du Cd sur l'intégrité de la monocouche telle que mesurée par la variation de TEER et de perméabilité au RP, sa présence n'a aucun effet significatif sur la quantité d'occludine, de ZO-1 et sur leur colocalisation.

Il y a cependant un traitement où l'intensité et l'écart sur la variation de colocalisation se démarque. L'effet sur la colocalisation induite par le co-traitement Cd/TNF- α + inhibiteur mène à une augmentation de la colocalisation par rapport au témoin. Étonnamment ceci n'est pas observé en absence d'inhibiteur. Cependant ce résultat est à confirmer car il ne provient que de deux expériences indépendantes dont les données varient beaucoup entre elles. Un phénomène semblable est observé en comparant l'effet du TNF- α seul avec et sans inhibiteur sur la quantité d'occludine. Encore une fois, le TNF- α seul n'affecte pas significativement le niveau de fluorescence totale obtenu pour l'occludine, mais l'ajout d'inhibiteur le diminue (non significativement) à $81 \pm 13,6\%$ de la valeur témoins. En observant les photos de microscopie confocale (Fig. 3.10) on peut remarquer une désorganisation du marquage de l'occludine par les traitements au TNF- α et au Cd/TNF- α et ce, avec ou sans inhibiteur. La perturbation de l'organisation de l'occludine est principalement due au TNF- α , mais le Cd semble aggraver le phénomène (Fig. 3.10).

Pour le traitement au Cd seul avec et sans inhibiteur, l'impact de l'inhibition de la kinase se remarque aussi légèrement (pour l'occludine) avec respectivement $91 \pm 16\%$ et $104 \pm 24\%$ de niveaux de fluorescence relatifs. Dans le cas du traitement à l'IL-1 β , ce sont les niveaux de fluorescence de ZO-1 qui diminuent légèrement en présence d'inhibiteur ($89 \pm 18\%$ vs $104 \pm 10\%$). Aucune modulation majeure de la quantité de protéine totale n'est observable pour aucun des

traitements individuels. Par contre, la tendance de l'inhibiteur à diminuer légèrement la fluorescence totale s'observe souvent.

Il est important de mentionner que tous les co-traitements (avec ou sans inhibiteur) n'ont été que répétés deux fois. Il est donc impossible d'analyser statistiquement ces résultats (Cd + LPS, Cd + IL-1 β et Cd + TNF- α). Pour ces co-traitements, malgré la colocalisation qui ne varie pas, presque toutes les conditions mènent à une légère diminution de protéine totale (ZO-1 et occludine). Le traitement où l'impact simultané sur les deux protéines est minimal est celui composé de Cd + LPS avec des baisses respectives d'occludine et de ZO-1 de $87 \pm 14\%$ et de $86 \pm 3\%$ par rapport au témoin. Soulignons que ces deux traitements individuels n'ont pas d'impact sur la fluorescence totale. Une fois de plus l'impact de l'inhibiteur se remarque en présence de Cd + LPS avec les valeurs les plus basses obtenues: la fluorescence totale chute respectivement à $57 \pm 4\%$ et $53 \pm 13\%$ (par rapport au témoin) pour l'occludine et ZO-1 ce qui représente une baisse supplémentaire respective de 30 et 33% par rapport au traitement sans inhibiteur. Concernant le traitement Cd + IL-1 β , l'impact de l'inhibiteur est négligeable, et dans les deux cas, la baisse de fluorescence totale s'observe, mais n'est pas analysable statistiquement ($n = 2$). Le co-traitement Cd + l'IL-1 β baisse les niveaux d'occludine à $63 \pm 7\%$ du niveau témoin. Pour ZO-1, la fluorescence chute à $55 \pm 12\%$ par rapport aux niveaux témoins, soit presque la moitié. L'ajout d'inhibiteur renverse légèrement les effets avec une restauration relative des niveaux protéiques par rapport au témoin respective de $72 \pm 1\%$ et $64 \pm 25\%$ pour l'occludine et ZO-1, soit une augmentation d'environ 10% dans les deux cas.

Selon les photos de microscopie, les co-traitements Cd + TNF- α + inhibiteur et Cd + IL-1 β + inhibiteur sont ceux désorganisant davantage l'occludine, mais souvenons-nous que désorganisation des JS et fluorescence totale ne sont pas nécessairement proportionnelles. La fluorescence totale correspond à la quantité de protéine totale et ceci est indépendant de la désorganisation qui témoigne de leur conformation dans l'espace (souvent associé à leur fonction). Pour l'occludine, le co-traitement (Cd + TNF- α) mène à une fluorescence totale de $90 \pm 20\%$ par rapport aux témoins tandis que pour ZO-1, on obtient $74 \pm 12\%$. La photo de microscopie confirme que le traitement Cd + TNF- α affecte peu la quantité de protéines malgré une légère désorganisation des JS. Cette désorganisation s'observe ici par une mosaïque moins définie et une colocalisation

(ZO-1/occludine) moins homogène. L'ajout d'inhibiteur abaisse davantage la quantité d'occludine avec $79 \pm 45\%$ de fluorescence par rapport au témoin (Fig. 3.10) tandis que celle de ZO-1 ne varie pas significativement avec ou sans inhibiteur ($78 \pm 20\%$ vs. $74 \pm 12\%$).

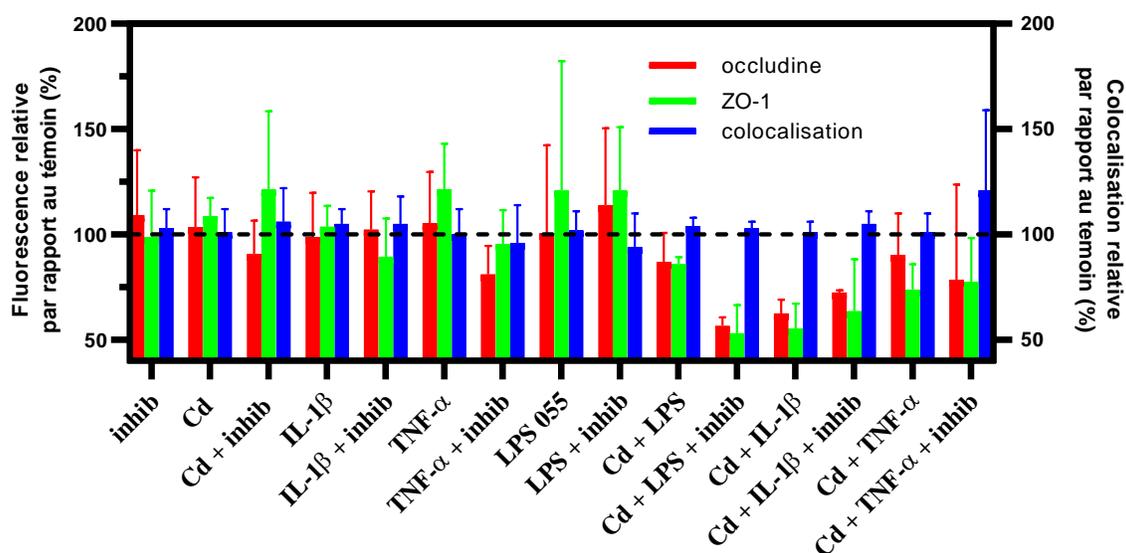
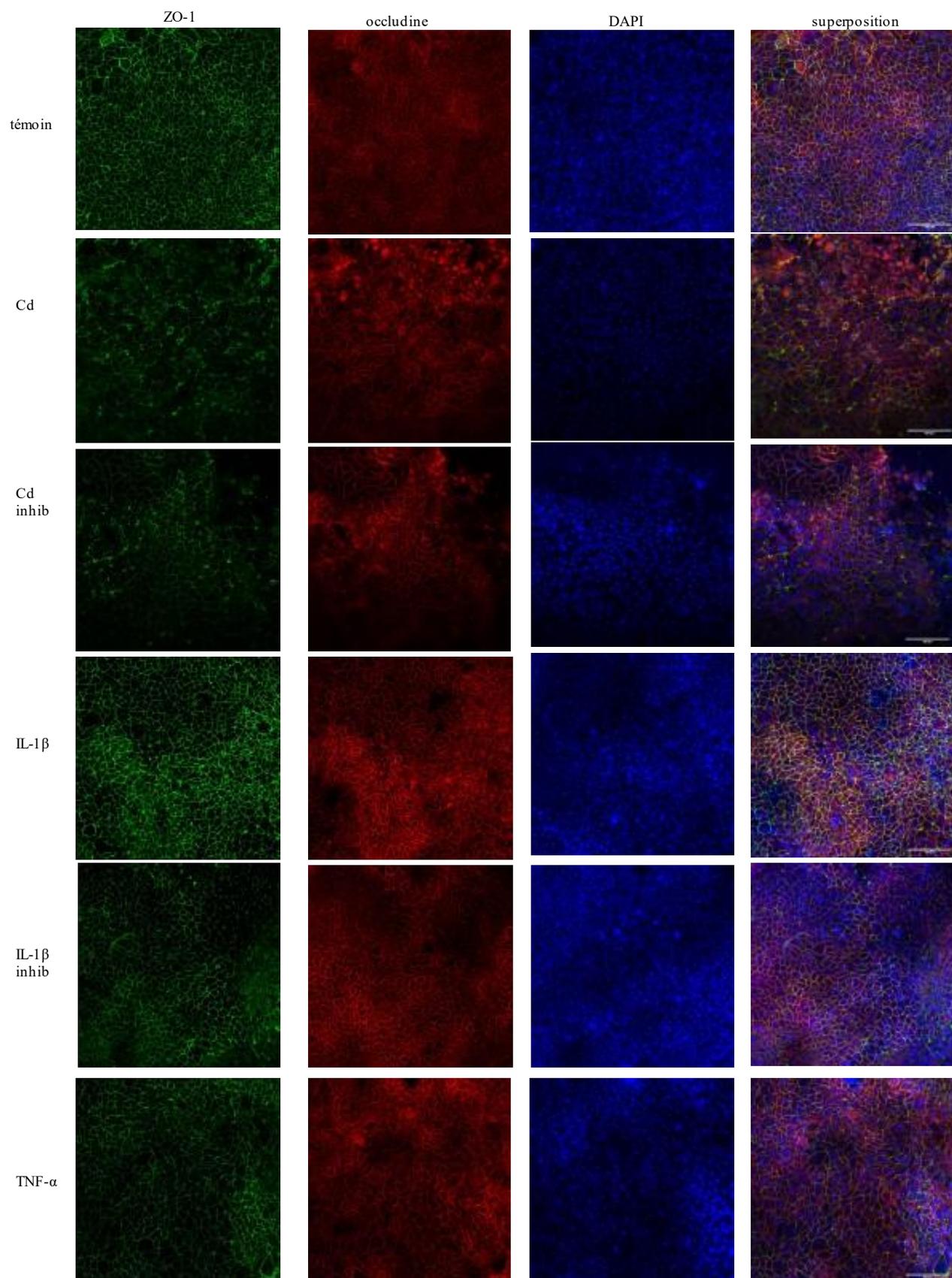
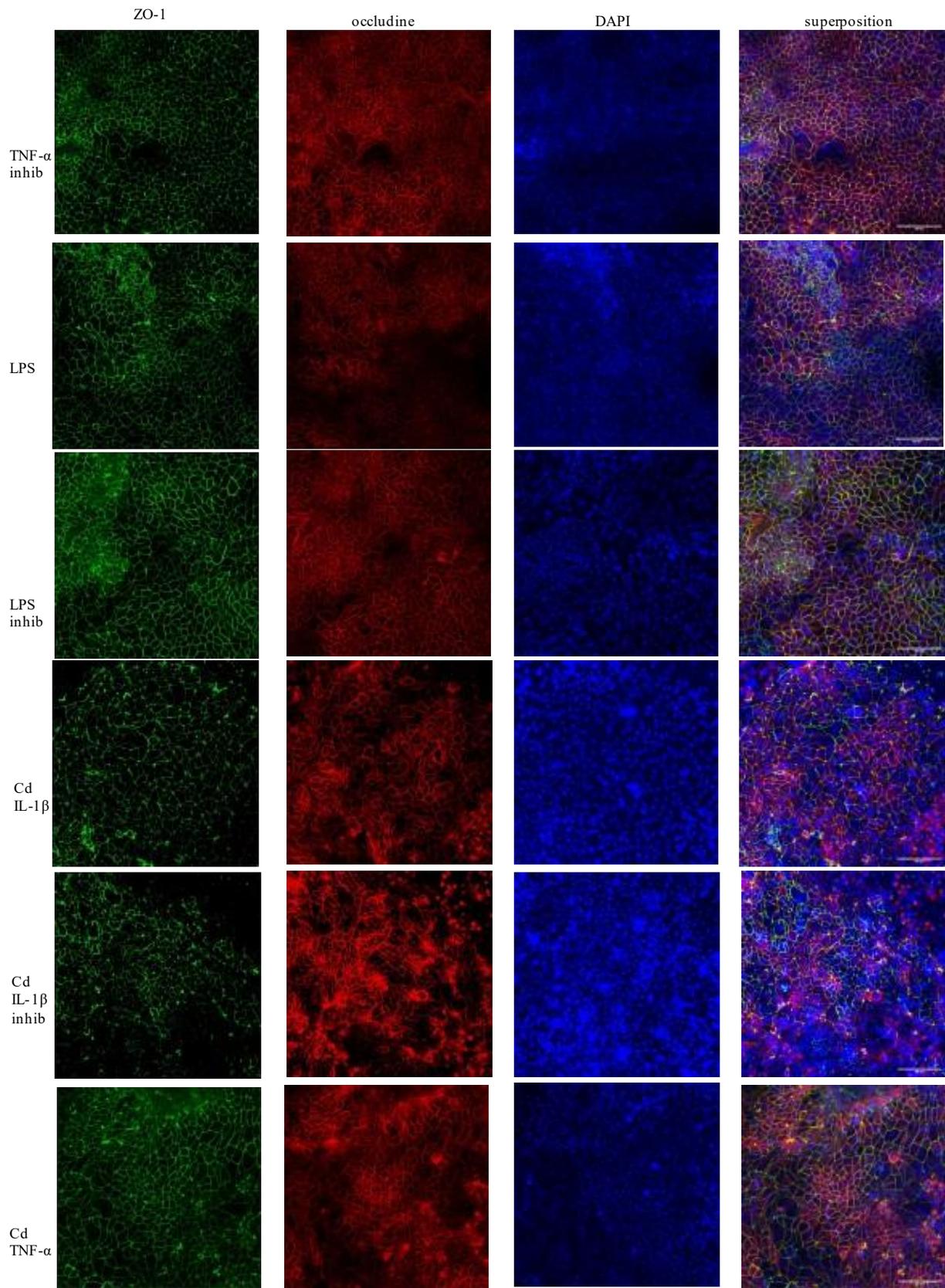


Figure 3.9 : Fluorescence totale et mesures de la colocalisation de ZO-1 et de l'occludine par microscopie confocale suite à différents traitements de 24 h au LPS (20 µg/mL), au Cd (10 µM), au TNF-α et à l'IL-1β (10 ng/mL) avec ou sans inhibiteur (20 µM). La durée des traitements est de 24 h sur une culture de cellules TC7 différenciées de 21 jours. La quantité de fluorescence des protéines de jonction est normalisée sur la fluorescence du DAPI associée au noyau et ensuite exprimée par rapport aux valeurs de témoins respectifs. La colocalisation est mesurée à l'aide du coefficient de Manders puis exprimée par rapport au témoin respectif du même passage. Les résultats sont représentés en moyennes et écarts types (n = 2-5)

Les images de microscopie (issues de 2 passages différents) sont observables à figure 3.10. Concernant les traitements individuels (avec ou sans inhibiteur) qui selon la figure 3.9 n'ont aucun impact significatif, sur les 3 paramètres mesurés. Tout d'abord le Cd induit une désorganisation du marquage autant pour l'occludine que pour ZO-1. Sur la superposition des images, la culture ne paraît pas se porter aussi bien que le témoin. L'intensité de ZO-1 fluctue comparativement au témoin où la fluorescence est homogène. L'ajout d'inhibiteur n'amène aucune différence notable entre les deux séries d'images. Cette absence d'effet de l'inhibiteur est aussi visible sur la figure 3.8 en ne renversant pas l'impact du Cd sur la TEER ou la perméabilité. Pour ce qui est de l'IL-1β,

que ce soit avec ou sans inhibiteur, l'aspect de la culture n'est pas différent du témoin. Encore une fois, ceci confirme les résultats des figures 3.8 et 3.9 où la cytokine n'a aucun impact sur la TEER, la perméabilité et l'intensité de fluorescence/colocalisation. Le TNF- α n'a aucun impact significatif sur les figures 3.8 et 3.9. Il en est de même pour les images de microscopie (Fig. 3.10). Par contre, en regardant attentivement, l'occludine présente une légère désorganisation qui semble renversable par l'inhibiteur. Pour ZO-1, le marquage est aussi bien défini que le témoin. Les images prises suite à l'exposition au LPS, tout comme l'IL-1 β , ne suggèrent aucune altération de la monocouche (avec et sans inhibiteur). Ce résultat est aussi représenté aux figures 3.8 et 3.9 avec l'absence d'effet. Dans le cas des co-traitements, le Cd + IL-1 β mène à une culture à l'aspect semblable à celle traitée au Cd seul, suggérant qu'il est la cause de l'altération de la monocouche. Ici encore, l'inhibiteur n'a pas d'impact sur l'apparence de la culture. La protéine ZO-1 semble plus affectée que l'occludine. Il y a un phénomène qui doit être relevé ; les deux co-traitements Cd + LPS et Cd + TNF- α semblent mener à une meilleure intégrité cellulaire sans l'ajout d'inhibiteur. Effectivement, l'image du traitement Cd + LPS a un aspect comparable à celle du témoin mais l'ajout d'inhibiteur semble grandement affecter ZO-1 et légèrement l'occludine. Dans le cas du TNF- α , même phénomène, mais les deux protéines de jonction sont grandement affectées. Dans tous les cas, l'aspect des noyaux (DAPI) est comparable, suggérant une mortalité négligeable aux concentrations utilisées comme démontré aux figures 3.4 et 3.5.





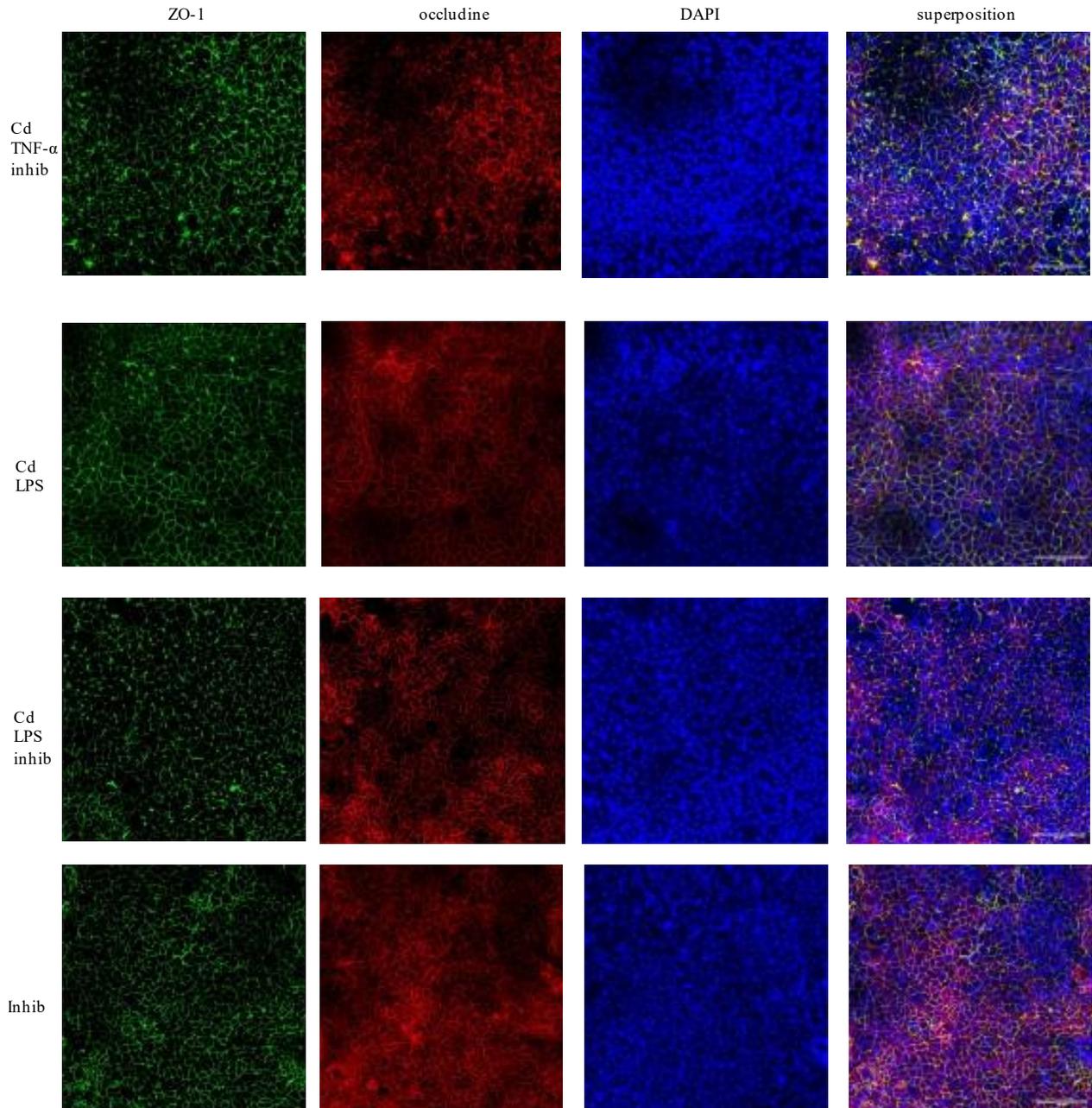


Figure 3.10 : Images type de microscopie confocale (noyaux, occludine et ZO-1) sur cellules TC7 de 21 jours suites à différents traitements de 24 h (Cd, TNF- α , IL-1 β et LPS) avec et sans inhibiteur de ERK1/2. Les noyaux sont colorés au DAPI et les anticorps marqués aux fluorophores sont dirigés contre ZO-1 (vert) et occludine (rouge). Les traitements sont effectués dans du DMEM sans FBS. Les photos sont issues de deux passages différents. Les images de la colonne superposition regroupe les photos de cellules marquées avec les anticorps et celles où les noyaux sont colorés au DAPI. Les photos ont été prises avec un objectif 10X plan APO sur lamelle à 8 chambres Sarstedt.

3.4 La réponse inflammatoire des cellules TC7 est modulée par le côté d'exposition et ERK1/2 est impliquée dans la sécrétion d'IL-8 par le Cd, le TNF- α et l'IL-1 β

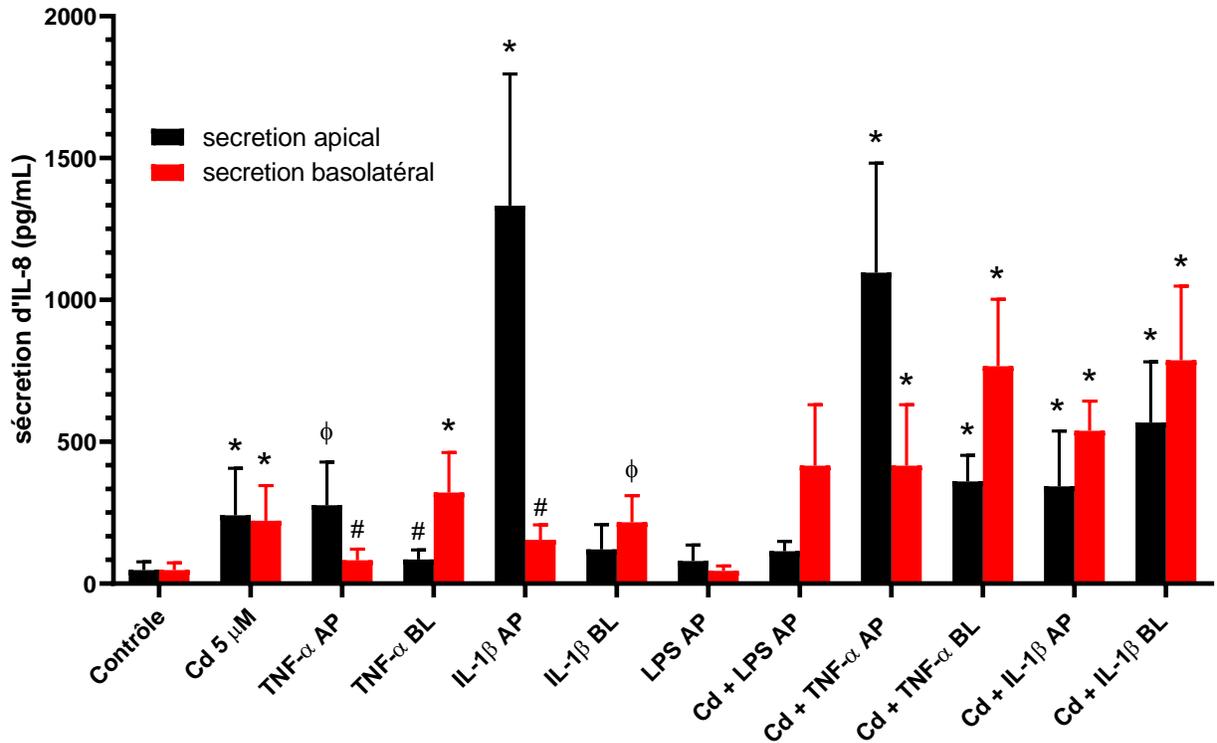


Figure 3.11; Sécrétion d'IL-8 mesurée dans le milieu de culture de cellules TC7 maintenues sur filtres semi-perméables pendant 21 jours. Les traitements au TNF- α (50 ng/mL), à l'IL-1 β (10 ng/mL), au Cd (5 μ M), et au LPS (20 μ g/mL) sont d'une durée de 24 h dans du DMEM sans FBS à l'AP (1,5 mL) ou au BL (2,5 mL). Les résultats sont représentés en moyennes et écarts types (n = 3-12) * = significativement différent (p < 0,05) de la sécrétion par rapport au témoin du côté respectif ; # = sécrétion significativement différente (p < 0,05) de la sécrétion du côté opposé pour un même traitement. Φ = tendance (p < 0,1120) à différence par rapport au témoin du côté respectif. Tous les tests statistiques sont non paramétriques selon le test de Dun

La réponse en IL-8 sur filtres est représentée à la figure 3.11. La sécrétion d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-8 et de TNF- α en réponse aux précédents traitements a été mesurée (résultats non montrés), mais seule la sécrétion d'IL-8 était notable. Il était complexe et peu pertinent de mesurer la sécrétion d'IL-1 β à la suite d'un traitement contenant de l'IL-1 β et de même pour le TNF- α . La première étape était donc de mesurer la réponse en IL-8, mais aussi de distinguer le côté de la sécrétion. Effectivement, la littérature mentionne une modulation de la sécrétion en fonction de la répartition des récepteurs aux côtés AP et BL. Ce phénomène est montré à la figure 3.11. Chaque traitement

comportant du Cd mène à une sécrétion d'IL-8 significative. Il y a une exception pour le co-traitement au Cd + LPS qui malgré la présence du métal, ne mène pas à une sécrétion d'IL-8 AP ou BL significative en présence de LPS. Le seul traitement menant à une réponse en IL-8 semblable à celle du témoin est le LPS AP avec une sécrétion BL de 45 ± 17 pg/mL. Les concentrations d'IL-8 de base du témoin sont de 48 ± 29 pg/mL à l'AP et 45 ± 25 pg/mL au BL. Les traitements seuls outre le Cd menant à une sécrétion d'IL-8 significative sont l'IL-1 β AP (sécrétion AP) et le TNF- α BL (sécrétion BL). Une tendance s'observe avec les traitements au TNF- α AP (sécrétion AP) et à l'IL-1 β (sécrétion BL).

Étant donné son impact sur l'intégrité des monocouches, on pourrait s'attendre à ce que le Cd ait le plus grand effet sur le relargage de cytokines pro-inflammatoires. En effet, la figure 3.11 montre que le Cd AP provoque des sécrétions AP et BL respectives de 241 ± 166 et 222 ± 123 pg/mL soit environ 5 fois les concentrations de base. Pour le TNF- α , les concentrations d'IL-8 secrétées sont très semblables à celles obtenues en présence de Cd. Par contre, contrairement au Cd qui mène à un relargage d'IL-8 de concentrations semblables des deux côtés de la monocouche, le TNF- α mène à une sécrétion favorisée du côté de l'exposition. Lorsque le TNF- α est déposé du côté AP, la sécrétion d'IL-8 de ce côté atteint 276 ± 153 pg/mL, mais seulement 82 ± 40 pg/mL au côté BL. Le phénomène se reproduit lors de l'exposition BL avec une concentration d'IL-8 de 321 ± 141 pg/mL au côté BL et de seulement 85 ± 34 pg/mL à l'AP. Dans les deux cas, la différence de sécrétion d'IL-8 d'une part et d'autre de la monocouche est significative au sein du même traitement. Concernant le traitement à l'IL-1 β , malgré une grande variation obtenue dans les résultats, c'est la cytokine menant à la plus grande sécrétion d'IL-8 sur filtres. La cytokine agit principalement à l'AP avec une concentration secrétée d'IL-8 de 1332 ± 464 pg/mL à l'AP comparativement à seulement 154 ± 54 pg/mL au BL. Lorsqu'exposée au BL, la monocouche semble moins affectée par le traitement puisque des concentrations de 121 ± 87 et 216 ± 94 pg/mL sont respectivement obtenues au côté AP et BL. Encore ici, le traitement à l'IL-1 β AP mène à une différence significative d'IL-8 des deux côtés de la monocouche. Malgré un effet négligeable sur l'intégrité de la monocouche, les cytokines inflammatoires ont un effet significatif sur la sécrétion d'IL-8.

Comme mentionné précédemment, le LPS AP est le traitement menant à des sécrétions comparables aux sécrétions témoins avec des concentrations de 80 ± 56 pg/mL à l'AP et 45 ± 17 pg/mL au BL. Cependant, en co-traitement, comme observé à la figure 8, la présence de LPS semble amoindrir l'impact du Cd pour la sécrétion AP mais augmenter l'impact du Cd sur la sécrétion BL. En effet, des concentrations AP en IL-8 induites par le Cd, de 241 ± 166 et 114 ± 35 pg/mL sont mesurées en absence et en présence de LPS alors que des concentrations BL de 222 ± 123 et 416 ± 215 pg/mL sont respectivement obtenues dans les mêmes conditions.

Pour les co-traitements, un effet synergique (voir discussion) est observable entre le Cd et le TNF- α AP (pour la sécrétion AP). De plus, plusieurs traitements ont des effets additifs comme la sécrétion BL du traitement Cd + LPS et la sécrétion BL du traitement Cd + TNF- α BL. Concernant le co-traitement Cd + IL-1 β , la quantité totale d'IL-8 ne semble pas varier pour le traitement Cd + IL-1 β AP, mais la répartition de la chimiokines des deux côtés du filtre est plus homogène qu'avec le traitement à l'IL-1 β AP seul. Le phénomène de sécrétion d'IL-8 favorisée par le côté d'exposition en présence de TNF- α est toujours observable en co-traitement avec le Cd, et amplifié. La nuance est au niveau de la concentration totale. À la suite d'expositions seules (Cd ou TNF- α AP), les concentrations d'IL-8 varient entre 82 ± 40 (sécrétion AP par TNF- α AP) et au maximum 321 ± 141 pg/mL (sécrétion BL par TNF- α BL). En co-traitement, les moyennes varient entre 360 ± 92 (sécrétion AP par Cd/TNF- α BL) et 1096 ± 386 pg/mL (sécrétion AP par Cd + TNF- α AP). Cela représente une synergie entre les deux traitements car la somme des traitements individuels est inférieure à celle des traitements conjoints. C'est en présence de Cd + TNF- α AP que la sécrétion est maximale (1096 ± 386 pg/mL). Concernant la sécrétion AP par le traitement à l'IL-1 β AP, les résultats suggèrent que le co-traitement avec le Cd diminue la concentration d'IL-8. Par contre, sachant que le Cd affecte significativement la perméabilité, on remarque que ce qui est perdu à l'AP est gagné au BL pour mener à des quantités d'IL-8 totales environ semblables.

3.5 La dynamique de la phosphorylation de ERK varie d'un traitement à l'autre

La suite des choses était de mettre les résultats d'ELISA en lien avec l'hypothèse. Il est important de vérifier s'il y a implication de ERK1/2 dans la sécrétion de l'IL-8 par le Cd, le TNF- α et l'IL-1 β . Considérant les effets négligeables du LPS seul, il a été omis de l'expérience suivante. La

meilleure technique pour vérifier l'implication de la kinase est d'évaluer l'impact de son inhibition sur la réponse en IL-8. Les résultats sont représentés à la figure 3.12. Les sécrétions d'IL-8 sont ici obtenues sur cultures sur pétris dans le but de pouvoir récolter le milieu de culture pour les ELISA et les cellules pour les immunobuvardages. Les profils de sécrétion d'IL-8 sont différents sur filtres et sur pétris (Fig. 3.11 et 3.12). La sécrétion de la chimiokine suite au traitement à l'IL-1 β sur pétris semble moins affectée que sur filtres et à l'opposé le TNF- α est le traitement avec l'effet le plus marqué sur pétris. Effectivement, avec une exposition AP la sécrétion AP de l'IL-1 β sur filtres est de 1332 ± 464 pg/mL comparativement à seulement à 358 ± 156 pg/mL sur pétris. Concernant le traitement au Cd (ici à 10 μ M), la sécrétion d'IL-8 est de 384 ± 111 pg/mL sur pétris contre 241 ± 166 pg/mL à l'AP sur filtres. Malgré la concentration supérieure de Cd utilisée, les niveaux d'IL-8 sécrétée sont comparables. La concentration d'IL-8 AP suite au traitement au TNF- α AP est de 276 ± 153 pg/mL sur filtres (négligeable au BL) comparativement à 599 ± 223 pg/mL sur pétris. En résumé, la concentrations d'IL-8 sécrétées par les cellules via le traitement au TNF- α est plus importante sur pétris que sur filtres, elle est inchangée dans le cas du traitement au Cd et inférieure sur pétris pour l'IL-1 β . Les 3 traitements induisent une sécrétion significative d'IL-8 qui est inhibée par l'inactivation de ERK1/2.

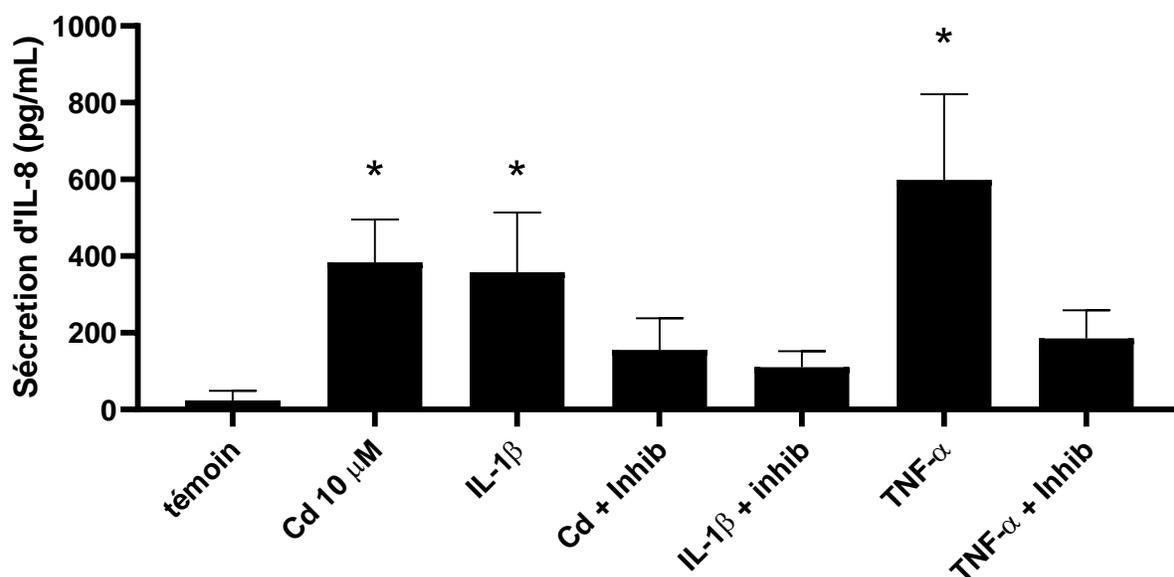


Figure 3.12 : Sécrétion d'IL-8 dans milieu de culture de cellules TC7 maintenues sur pétris en présence d'inhibiteur de ERK1/2 (20 µM) suite à divers traitements de 24 h dans 5 mL de DMEM sans FBS: Cd (10 µM), du TNF-α (50 ng/mL) et de l'IL-1β (10 ng/mL). Les résultats sont représentés en moyennes et écarts types (n = 3-13). * = significativement différent (p < 0,05) du témoin selon le test non paramétrique de Dun.

À ce moment du projet, les résultats suggèrent une implication majeure de ERK1/2 dans la sécrétion de la chimiokine, mais la confirmation par immunobuvardages sert à démontrer le phénomène d'une manière complémentaire. L'immunobuvardage sert aussi à observer une inhibition incomplète de la phosphorylation de la kinase (ERK1/2) si il y a lieu et d'ajuster la concentration et/ou le type d'inhibiteur. De plus, avec cette technique, il est aussi possible d'utiliser des anticorps contre ZO-1, la claudine-2 et l'occludine en plus de ERK1/2/p-ERK1/2. Ainsi, il est possible de comparer les résultats d'immunobuvardage avec ceux de microscopie confocale. Malheureusement, la claudine-2 est difficilement observable sur une culture différenciée. Malgré qu'il ait été rapporté que sa présence augmente lors d'une diminution de TEER ou de baisse d'expression de ZO-1 ou d'occludine, la protéine n'a pu être détectée par immunobuvardage peu importe l'âge de la culture (Huang *et al.*, 2021). Par contre, la claudine-2 a été observée par immunofluorescence sur cultures de 7 jours connues pour exprimer plus abondamment cette protéine comparativement aux cultures différenciées, ce qui démontre la fonctionnalité de l'anticorps. Il est donc possible que sa concentration soit trop faible pour être détectée en

immunobuvardage. La détection de ZO-1 était difficile et peu reproductible sur les cellules différenciées. Seule l'occludine a été étudiée par immunobuvardage.

La figure 3.13 montre l'impact des traitements (IL-1 β , TNF- α , 1 h et 24 h; ou Cd 24 h) avec et sans inhibiteur de ERK1/2 sur la phosphorylation de ERK, et l'expression totale de ERK et de l'occludine. Initialement, les traitements étaient effectués sur une durée de 24 h, mais nous nous sommes rendu compte que contrairement au Cd, l'effet des cytokines n'est pas soutenu aussi longtemps que celui du métal. La cinétique d'effet est donc très différente entre le métal et les cytokines. La stimulation par les cytokines menait effectivement à un relargage d'IL-8 renversable par l'ajout d'inhibiteur, mais aucune phosphorylation de ERK1/2 n'était toujours pas observable après 24 h de traitement. Des traitements plus courts (1 h) ont donc été effectués pour vérifier une activation de ERK1/2 possiblement transitoire par les cytokines, ce qui a été corroboré par immunobuvardage. Comme observé à la figure 3.13, la phosphorylation de ERK1/2 induite par le TNF- α et de l'IL-1 β est plus forte après 60 min de traitement (malgré que la différence ne soit statistiquement pas significative). De plus, dans tous les cas, la phosphorylation de la kinase est totalement ou partiellement (dans le cas du Cd) renversable par l'inhibiteur. Le Cd mène à une augmentation de phosphorylation de ERK1/2 de 24 fois les niveaux témoin, et des augmentations d'environ 2,5 fois sont observées par l'IL-1 β et en TNF- α après 1 h de traitement comparativement à respectivement 1,9 et 1,5 fois lors de traitements de 24 h. L'activation très importante de la kinase par le Cd explique probablement la difficulté de l'inhibiteur à renverser la phosphorylation de la kinase à des taux de phosphorylation de base. Il y a une tendance significative ($p < 0,1$) entre les traitements de 1 h au TNF- α et TNF- α + inhibiteur et une variation significative ($p < 0,05$) entre le traitement au Cd et le témoin ainsi que le Cd avec et sans inhibiteur.

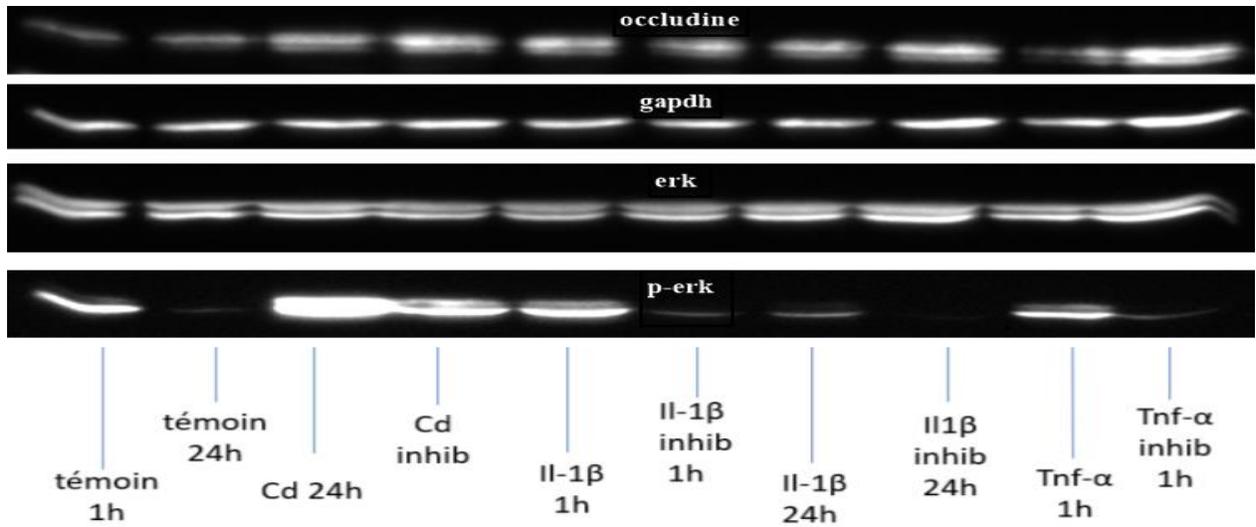
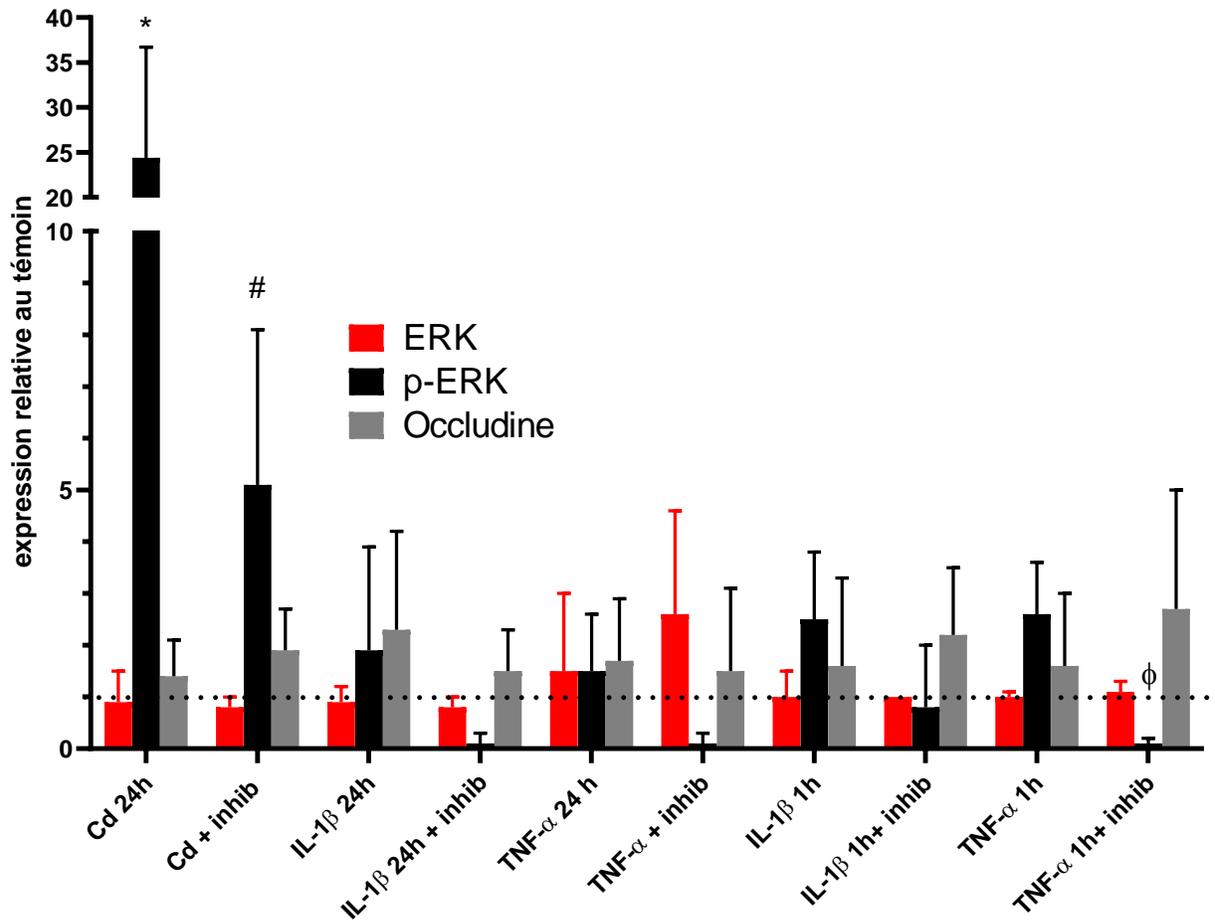
Après avoir vérifié la capacité de l'inhibiteur à renverser l'effet de chaque traitement (principalement par ELISA), il est important de vérifier que les différences de phosphorylation entre les traitements ne sont attribuables à des variations d'expression totale ERK1/2. La figure 3.13 démontre l'absence de variation des niveaux de ERK1/2 totale.

La dernière information fournie par cette figure est la différence d'expression de l'occludine suite aux traitements de 1 h et de 24 h. Il est intéressant de rappeler que des baisses significatives du

niveau d'occludine sont observées en immunofluorescence seulement lorsqu'il y a présence de co-traitement soit avec du LPS ou les cytokines additionnées de Cd (Fig. 3.9). Il y a une exception pour le traitement de 24 h au TNF- α + inhibiteur pour lequel une baisse de 19% est obtenue par rapport au témoin (soit $81 \pm 14\%$ de la quantité normale). Ce résultat s'explique difficilement dû à l'absence d'effet par le TNF- α seul, mais significatif lors d'ajout d'inhibiteur.

En immunobuvardage (Fig. 3.13), la quantité d'occludine ne varie pas significativement pour aucun traitement. L'expérience sur la perméabilité a aussi montré que le TNF- α AP n'a aucun impact sur le flux de rouge de phénol ni sur la TEER (Fig. 3.8). Considérant tous ces résultats, il semblerait que le TNF- α seul n'affecte pas l'intégrité à une concentration de 50 ng/mL pendant 24 h. Malgré tout il n'est pas bénin car les images de microscopie démontrent une désorganisation de l'occludine par le traitement au TNF- α . Tout comme le TNF- α , l'IL-1 β seule à une concentration de 10 ng/mL (1 h et 24 h), n'affecte pas significativement les niveaux d'expression de l'occludine malgré une légère hausse observable à 24 h (Fig. 3.13). En analyse de fluorescence totale, la cytokine ne module pas l'expression de la protéine en 24 h (Fig. 3.9) et n'affecte ni la TEER ni le flux du rouge de phénol (Fig. 3.8).

Le seul traitement que l'on se serait attendu à affecter les niveaux de protéines de jonction (occludine ou ZO-1) est le Cd. Étonnamment, malgré son impact sur l'intégrité de la monocouche (chute de la TEER de 50% à 5 μ M) et son activation de ERK1/2 (24 fois la phosphorylation de base à 10 μ M), il n'a aucun impact sur les niveaux d'occludine (Fig. 3.13) en 24 h malgré une concentration de 10 μ M. Il n'affecte pas non plus (en 24 h à 5 μ M) les niveaux d'occludine ou de ZO-1 en fluorescence totale et ne réduit pas la colocalisation entre les deux protéines (Fig. 3.9).



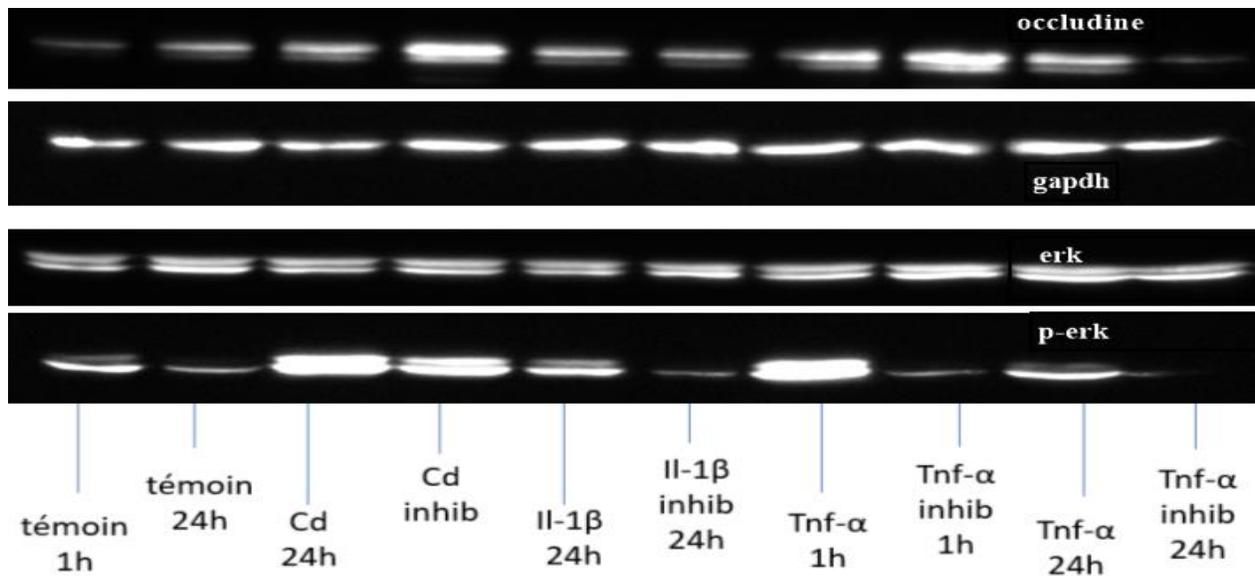


Figure 3.13 ; a) Niveaux d'expression de ERK1/2, de p-ERK1/2 et d'occludine relatifs aux témoins de lysats cellulaires de cultures de TC7 différenciées de 21 jours suite à des traitements de 1 h et 24 h à l'IL-1 β (10 ng/mL), au TNF- α (50 ng/mL) et au Cd (10 μ M) avec ou sans inhibiteur de ERK (20 μ M) dans du DMEM sans FBS. Les résultats sont représentés en moyennes et écarts types (n = 2-6). b) Image type d'un immunobuvardage avec protéine de normalisation (GAPDH). * variation significative via le test non paramétrique de Dunn par rapport au témoins ($p < 0,05$). Φ = variation significative par rapport au même traitement sans inhibiteur ($p < 0,1$). # = variation significative ($p < 0,05$) par rapport au même traitement sans inhibiteur (PD98058 et U0126)

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 L'intégrité de la monocouche de cellules entérocytaires différenciées est sensible au Cd, mais résiste au LPS, au TNF- α et à l'IL-1 β durant les 24 premières heures

L'intégrité d'une culture de cellules TC7 différenciées (21 jours) est telle qu'elle séparerait le lumen intestinal de la circulation sanguine avec une seule couche de cellules. Les cellules sont nombreuses et la présence de jonctions serrées et adhérentes (JS et JA) leur confère une proximité qui rend la monocouche assez étanche aux petites et grosses molécules (> 1 kDa). Les cellules utilisent différentes JS pour faire des liens entre elles aux niveaux apicaux et latéraux du tissu épithélial. La polarisation permet aux cellules de gérer, entre autres, les signaux immuns différenciellement de part et d'autre de la monocouche. *In vivo*, l'inflammation intestinale peut perturber l'homéostasie de l'intestin et endommager le tissu épithélial. L'inflammation peut être causée par de multiples facteurs (infection, alcool, métaux, maladies auto-immunes, etc.) et mener à une diminution de l'étanchéité. Avec le modèle cellulaire TC7 (clone de la lignée Caco-2), nous avons pu au laboratoire tester différents traitements considérés pro-inflammatoires et ensuite mesurer l'augmentation de la perméabilité et/ou l'altération de la monocouche par diverses méthodes.

Les deux premières méthodes utilisées furent la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) qui est connue pour chuter en même temps que l'étanchéité et l'utilisation du rouge de phénol (354 Da) comme marqueur de perméabilité de petites masses moléculaires (< 1 kDa) (McNeil, 2006). Avec ces deux outils, il a été possible de mesurer l'impact individuel du Cd, du TNF- α , de l'IL-1 β et du LPS. De plus, puisque l'inflammation est souvent multifactorielle, les cytokines et le LPS ont aussi été appliquées sur les cultures en co-traitement avec le Cd. Après quelques mesures de caractérisation, de toxicité et d'optimisation, l'étude des impacts physiques des traitements inflammatoires était la première grande étape de ce projet (Fig. 3.1 à 3.5). Ces paramètres préalablement cités nous ont permis de voir l'évolution normale de la TEER de monocouches de cellules Caco-2 et de cellules TC7 en fonction du temps de culture (Fig. 3.1 et 3.2). Dans les deux cas l'augmentation de la TEER confirmait la différenciation normale de la

culture et ce, peu importe le type de filtre. Ultiment les résultats étaient très satisfaisants pour les deux cultures, mais les cellules TC7 présentait des résultats plus reproductibles d'un passage à l'autre, ce qui compose un avantage considérable. Pour le choix des filtres, le PC avait une tendance à offrir des résultats de TEER avec moins de variabilité au 21^e jour que le PE. Par contre, l'étude aurait sans doute pu se faire avec n'importe quelle combinaison de cellules et de filtres. Les cultures de cellules TC7 sur PC avaient une résistance moyenne de $244 \pm 48 \Omega \cdot \text{cm}^2$ au 21^e jour. Dans la littérature les valeurs de résistance en termes de maturité de cultures équivalentes sont souvent plus élevées, mais l'âge des cultures (en termes de nombre de passages) dans ces articles est inférieur, il est donc difficile de comparer.

Concernant la toxicité engendrée par les traitements utilisés, la mesure de l'activité MTT a révélée que l'IL-1 β causait $7,3 \pm 5,4\%$ de mortalité à 9,5 ng/mL (concentration utilisée pour le projet : 10 ng/mL) (Fig 3.4). Le TNF- α , de façon semblable cause $13,5 \pm 2,6\%$ de mortalité à 63 ng/mL (concentration utilisée : 50 ng/mL) et $8 \pm 3\%$ de mortalité à 30 ng/mL. Deux LPS ont été appliqués (O55 vs. O111) et celui provenant de la souche O55 fournissait une meilleure réponse inflammatoire (réponse restant toutefois très faible). La mortalité cellulaire à 25 $\mu\text{g/mL}$ était de $5,6 \pm 0,2\%$ (concentration utilisée : 20 $\mu\text{g/mL}$). Finalement, comme mentionné plus haut, la mesure de l'activité MTT et le Cd sont incompatibles pour avoir une idée réelle de la toxicité du Cd aux alentours de 10 μM . Le dosage de la LDH a révélé une mortalité cellulaire respective de $7,6 \pm 6,1\%$, $11,6 \pm 5,4\%$ et $24 \pm 9,2\%$ à 5, 10 et 20 μM (Fig. 3.5).

La question qui se pose ici est : à partir de combien de mortalité (%), la variation des résultats devient attribuable à de la mortalité cellulaire. La réponse est en partie fournie (pour le Cd) par la figure 3.3. La TEER devrait normalement chuter avec la mortalité qui est synonyme de perte d'intégrité. Seulement, l'impact majeur est observable à 5 μM de Cd avec une chute de 54%. Pour l'impact du Cd à 10 et 20 μM , ce sont des chutes respectives de 77% et 83%. On peut donc comparer la chute de TEER de 54% observée à une mortalité de 7,6% à 5 μM de Cd avec une chute de 83% obtenue avec 24% de mortalité à 20 μM de Cd. La relation n'est pas linéaire. De plus, la mortalité entre 10 et 20 μM de Cd est plus de 2 fois plus importante tandis que la chute TEER n'augmente que de 6 %. Une autre façon d'évaluer l'impact de la mortalité sur la TEER de la monocouche après 24 h de traitement est en regardant l'effet du TNF- α . Hormis le Cd, le TNF- α

était le traitement causant la plus grande mortalité avec 13,5% à 63 ng/mL (Fig. 3.4). Malgré ceci, aucune perte significative de TEER n'est observable à une concentration légèrement inférieure, soit 50 ng/mL (Fig. 3.8). Dans le cas du LPS, très peu de mortalité et aucune chute de TEER n'a été observée. C'est l'effet de l'IL-1 β que l'on peut comparer le mieux avec celui du Cd sur la TEER. La cytokine mène à une mortalité de 7,3% à environ 10 ng/mL sans causer de chute de TEER. À 5 μ M, le Cd mène à une mortalité de 7,6%, semblable à celle de l'IL-1 β , mais fait chuter la TEER de 54%. Ceci suggère donc que la mortalité cellulaire n'est pas impliquée dans la perturbation de l'étanchéité causée par le Cd en 24 h.

Comme mentionné plus haut, la polarisation permet de gérer certains signaux différemment selon le côté d'exposition AP/BL. Dans le cas des cytokines, ce phénomène s'explique par la modulation de l'expression des récepteurs de part et d'autre. Le récepteur principal du LPS (TLR-4) est essentiellement exprimé à l'AP mais peut être modulé selon le côté de la stimulation par le LPS (Cario et Podolsky, 2000). Dans le cas du Cd, il est malheureusement accumulé par les entérocytes et, oralement seulement 5% de la dose se rend dans la circulation systémique. Ceci explique pourquoi les cellules intestinales agissant comme accumulateur de Cd souffrent autant de l'exposition au métal. La TEER mesure la résistance électrique d'une monocouche, mais ne fournit pas d'information sur le flux de certaines molécules du côté AP vers le côté BL. Selon la littérature, une protéine importante régulant la perméabilité paracellulaire est l'occludine (Al-Sadi *et al.*, 2011). Son inhibition augmente légèrement le flux des petites molécules et grandement celui des grosses molécules (> 1 kDa et 8 Å) sans toutefois affecter la TEER (Al-Sadi *et al.*, 2011). La sous-expression de l'occludine coïncide aussi avec l'augmentation de l'expression de la claudine-2 qui normalement est faiblement exprimée dans une culture de TC7 différenciée (Al-Sadi *et al.*, 2011). Une quantité élevée de protéine ZO-1 est associée à une différenciation cellulaire avancée et contrairement à l'occludine, la TEER corrèle positivement avec les niveaux de ZO-1 (McNeil, 2006).

La figure 3.6 montre comment le Cd influence la diffusion paracellulaire d'une petite molécule, le rouge de phénol (RP, 354 Da) au travers de la monocouche. Puisque la chute de TEER a déjà été observée, l'occludine ne peut pas être la seule protéine de JS à être impliquée (si elle est impliquée) considérant qu'elle ne corrèle pas avec la TEER (McNeil, 2011). Avec l'impact observé

précédemment sur la TEER par le Cd, on pourrait s'attendre à ce que 5 μM cause déjà une perte d'étanchéité majeure. Par contre, contrairement aux résultats sur la TEER, l'augmentation de la perméabilité du RP est beaucoup plus linéaire en fonction de la concentration de Cd. La chute de TEER en 24 h n'est donc pas intimement liée à la perméabilité du RP. Effectivement, 120 min après avoir déposé le RP à l'AP, le flux paracellulaire était plus important : $160 \pm 63\%$ par rapport au témoin après une exposition de 24 h à 5 μM de Cd. Dans le cas des cultures exposées à 10 et 20 μM , c'était respectivement $283 \pm 75\%$ et $366 \pm 117\%$ d'augmentation de perméabilité du RP. La conclusion de cette figure est que malgré l'observation d'un plateau sur la chute de TEER à partir de 10 μM de Cd, la perméabilité au RP, une petite molécule, continue d'augmenter à 20 μM .

Pour évaluer si le Cd affecte aussi les protéines régulant le passage des macromolécules, nous avons étudié la perméabilité au dextran-FITC (4 kDa) (Fig. 3.7). Malheureusement ici les résultats ne peuvent être exprimés en pourcentage par rapport au témoin, car les valeurs témoins fluctuaient trop d'un passage à l'autre et il était impossible de les comparer. Ainsi, ce sont les moyennes des écarts entre les fluorescences initiales et finales entre les cellules traitées et leurs témoins respectifs qui sont représentées. Malgré qu'il soit inadéquat de comparer les résultats avec la figure 3.6, l'impact sur la perméabilité est indiscutable. Encore ici, l'effet dose réponse est linéaire jusqu'à au moins 20 μM . La chute de la TEER qui semblait atteindre un plateau à 10 μM de Cd ne peut pas ici être mise en relation avec le flux paracellulaire du dextran qui augmente proportionnellement avec la concentration de Cd. Suite au dépôt du dextran (durant 120 min) à l'AP sur une culture ayant été exposée à 5 μM de Cd durant 24 h, la moyenne des différences était de $1 \pm 0,9$. Avec une concentration de 10 μM de Cd, cette différence était $7,1 \pm 2,2$ soit presque 7 fois plus. Pour 20 μM de Cd le résultat est $12,7 \pm 4,5$ soit 12 fois plus que la culture exposée à 5 μM et presque le double de celle exposée à 10 μM . À titre démonstratif, la valeur de base de la solution de dextran AP au temps zéro est de 7950 (unité arbitraire) tandis que celle au BL (sans fluorophore) est proche de 0. Après 120 min à 20 μM de Cd, les valeurs moyennes de fluorescence AP et BL sont respectivement de 5963 et de 1622. Ainsi donc il est possible d'affirmer que la majeure partie du fluorophore n'avait pas traversé la monocouche en 2 h, car l'équilibre n'était pas proche d'être atteint entre les deux compartiments.

Sachant désormais que le Cd augmente le flux des molécules de petites et grandes tailles en plus de causer des chutes importantes de TEER, il est intéressant de comparer son effet avec les autres traitements cités précédemment. La figure 3.8 montre que parmi les 4 traitements pro-inflammatoires, seul le Cd affecte significativement la TEER et la perméabilité, comme discuté dans les résultats. Le LPS AP, comme attendu, ne cause pas de perte d'intégrité sur une culture saine. Considérant sa présence abondante dans l'intestin, ceci ne surprend pas. Pour les deux cytokines pro-inflammatoires, il est surprenant de voir qu'elles n'ont aucun impact sur aucun des deux facteurs mesurés et ce, peu importe le côté d'exposition. En revanche certains articles démontrent que le TNF- α a des effets à partir de 48 h (Al-Sadi *et al.*, 2007). La littérature mentionne que le LPS à une concentration BL de seulement 0,3 ng/mL durant 72 h affecte la TEER et le flux d'inuline (macromolécule) en 4 jours (Guo *et al.*, 2013). Ainsi, à des concentrations maintes fois plus basses que celles utilisées dans notre étude, le LPS peut affecter l'intégrité lorsque déposé au côté BL. Selon notre expérience, la co-exposition Cd + LPS AP n'affecte pas l'intégrité de façon différente du Cd seul (Fig. 3.8). Il faut souligner que nos expositions sont seulement de 24 h et malgré l'effet connu du Cd, rien ne confirme que le LPS traverse la monocouche. Sa masse moléculaire est maintes fois supérieure à celle du dextran utilisé au laboratoire et est estimée à quelques millions de Da. Sa capacité de former des micelles et des agrégats rend son analyse de masse difficile, mais en présence de traitements (EDTA, SDS, chaleur, etc.) sa forme la plus pure obtenue est de 1000 kDa Selon le site de Sigma (www.sigmaaldrich.com/CA/en/technical-documents/protocol/clinical-testing-and-diagnostics-manufacturing/bacteriology/lipopolysaccharides).

Considérant l'infime pourcentage de la concentration utilisée comparativement à la concentration BL affectant la monocouche (20 μ g/mL vs. 1 ng/mL), il serait juste d'hypothétiser que le LPS n'a pas traversé la monocouche malgré la présence de Cd. Il a été démontré que le LPS avait la capacité de lier les cations (plus particulièrement divalent, comme le Cd) dû à sa charge négative (Coughlin *et al.*, 1983). Il est important de soulever cette information pour les prochains résultats présentés, car certains effets semblent avoir tendance à être influencés positivement par la présence du LPS.

La figure 3.8 confirme l'absence d'effet significatif de l'IL-1 β sur l'intégrité de monocouches cellulaires, autant sur la TEER que la perméabilité. En co-traitement avec le Cd, le profil ressemble à celui du métal seul avec une chute de TEER significative et sans différence visible avec ou sans IL-1 β . Selon les tests statistiques, l'augmentation de la perméabilité n'est plus significative, ce qui

suggérerait un léger renversement de l'effet du Cd par la cytokine. La littérature mentionne que dans une culture de cellules Caco-2, les deux principaux récepteurs à l'IL-1 β sont exprimés des deux côtés de la monocouche, mais qu'ils sont principalement exprimés au BL (Varilek *et al.*, 1994). Une concentration AP de 10 ng/mL serait suffisante pour ouvrir les JS via l'activation de ERK1/2 (niveaux de p-ERK augmentés environ 15 fois par rapport au témoin) avec une activation maximale de la kinase à 30 min suivi d'un déclin déjà notable à 60 min (Varilek *et al.*, 1994). Le début d'une chute de TEER et une augmentation du flux d'inuline s'observent à partir de 12 h d'exposition (Al-Sadi *et al.*, 2011). L'ajout d'un inhibiteur (100 μ M) de ERK1/2 serait suffisant pour renverser l'augmentation de la perméabilité et la chute de TEER causées par l'IL-1 β (Al-Sadi *et al.*, 2011). La phosphorylation de la kinase dans un court délai (60 min) à 10 ng/mL a aussi été observée au laboratoire, mais cela sera discuté plus bas (Fig. 3.13). Malgré l'activation de la kinase, contrairement à la littérature, aucune ouverture significative des JS n'a été remarquée pour une même concentration d'IL-1 β . Une différence notable entre les deux protocoles (celui cité ci-dessus et celui du présent projet) qui pourrait expliquer la divergence dans les résultats est le type d'exposition. Effectivement, sans préciser le côté d'exposition, les auteurs laissent croire que l'IL-1 β était présente à 10 ng/mL des deux côtés de la monocouche. Dans notre cas, l'exposition ne se faisait que d'un côté à la fois. La chimiokine a une masse moléculaire de 1 kDa selon le site de Pubchem et ne devrait donc pas avoir diffusé lorsque déposée à l'AP ou au BL (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Interleukin-1beta-163-171). Ainsi la concentration d'exposition n'est pas diluée par le volume total des deux chambres. De plus, les essais inflammatoires subséquents démontrent une forte réponse des cellules à l'IL-1 β et donc une concentration suffisante pour créer de l'inflammation. Sachant ceci, il devient donc possible que l'altération de l'intégrité soit exacerbée lorsque le traitement est appliqué des deux côtés de la monocouche simultanément.

Le dernier traitement évalué dans cette expérience était le TNF- α . Cette cytokine démontre des effets sur l'intégrité de la monocouche très comparables à ceux de l'IL-1 β . Premièrement, seul, le TNF- α n'a aucun impact significatif en 24 h sur la TEER ou la perméabilité. Le co-traitement Cd + TNF- α offre un profil très comparable au Cd seul, suggérant que la cytokine n'a aucun effet synergique ou additif avec le Cd. Étonnamment, tout comme dans le cas de l'IL-1 β , la littérature mentionne le contraire. Effectivement, le TNF- α aurait la capacité d'altérer la TEER de la

monocouche à partir de seulement 1 h d'exposition BL (à 10 ng/mL). Il était connu que les effets de l'IL-1 β et du TNF- α implique ERK1/2 mais aussi préalablement NF- κ B (Nie *et al.*, 2019). L'ajout d'un inhibiteur de NF- κ B ou de p38 MAPK permet de réduire l'impact du TNF- α sur la TEER et sur la sécrétion d'IL-6 et 8 (Nie *et al.*, 2019). Dans notre étude, aucun effet sur l'intégrité par le TNF- α n'était observable malgré une concentration 5 fois supérieure (50 ng/mL vs. 10 ng/mL). Une cause possible de divergence entre ces résultats pourrait être associée au temps de culture (maturité de la monocouche), car les auteurs ne précisent pas cette information. Ceci pourrait suggérer qu'une culture plus jeune ou plus vieille serait plus sensible à l'effet du TNF- α . Malgré l'absence d'impact de la cytokine sur l'intégrité, une réponse inflammatoire significative a été observée et sera discutée plus bas.

Le dernier élément de discussion concernant la figure 3.8 concerne l'effet de l'inhibiteur dans les traitements Cd et Cd + IL-1 β . Sachant que ces deux traitements mène à la phosphorylation de ERK1/2, les résultats obtenus suite à l'ajout d'inhibiteur permettent de voir quel rôle la kinase joue dans la perte d'intégrité. Rapidement, on remarque que l'inhibiteur n'a pas d'impact sur la chute de la TEER et/ou l'augmentation de la perméabilité. Ici l'IL-1 β ne modifie pas la réponse malgré qu'elle semble diminuer légèrement l'augmentation de la perméabilité induite par le Cd. La littérature mentionne que l'ajout d'un inhibiteur de ERK1/2 renverse les dommages effectués sur la monocouche par la cytokine, mais ici l'IL-1 β n'est pas en cause donc on pourrait croire que le Cd et l'IL-1 β agissent différemment, car l'inhibiteur en présence de Cd ne diminue pas la perte d'intégrité (Al-Sadi *et al.*, 2011). Par contre, la plus grande augmentation de la perméabilité observée dans notre étude est associée au traitement Cd + inhibiteur avec $219 \pm 39\%$ comparativement à $168 \pm 35\%$ obtenu avec un traitement au Cd seul. La différence sur la perméabilité entre ces deux conditions est significative. En présence de Cd, l'inhibition de ERK1/2 pourrait donc exacerber la perte d'étanchéité tandis que selon la littérature, en présence de l'IL-1 β , l'inhibiteur renverse les effet négatif de la cytokine. Ceci renforce l'idée que la cytokine et le Cd opère avec des mécanismes différents malgré l'activation de ERK1/2.

Dans le futur, quelques tests seraient à faire pour confirmer de nouvelles hypothèses. Il faudrait tout d'abord mieux cerner l'impact de l'inhibiteur en présence de Cd pour voir comment il exacerbe l'effet du métal. De plus, utiliser l'IL-1 β (10 ng/mL) des deux côtés de la monocouche semble

affecter l'intégrité selon la littérature (Al-Sadi *et al.*, 2011). Ce phénomène est absent au laboratoire lorsqu'appliqué d'un seul côté. Finalement, le TNF- α (10 ng/mL) affecte l'intégrité après 48 h selon certains auteurs, cela serait donc à vérifier car nos incubations de 24 h étaient sans effet sur la perméabilité et la TEER.

4.2 Contrairement au TNF- α , le Cd perturbe l'organisation de l'occludine et de ZO-1 sans l'implication de ERK1/2 tandis que le LPS semble démontrer un effet protecteur

À la suite de l'expérience montrée à la figure 3.8, il est encore impossible de démontrer l'implication spécifique de ZO-1 et de l'occludine dans la perte d'intégrité. Il y a plusieurs façons de mesurer l'impact d'un traitement sur une protéine précise. L'immunobuvardage permet d'avoir la quantité de protéine totale à un moment précis dans le lysat cellulaire. Le dosage d'ARNm fournit de l'information sur l'impact au niveau de la transcription par rapport à un témoin. L'utilisation d'anticorps marqués permet de voir *in situ* l'arrangement des protéines. Cette dernière information est pertinente, car la quantité totale ne varie pas nécessairement malgré une désorganisation possible des protéines. Il est aussi possible par immunomarquage d'analyser la fluorescence totale (et donc la quantité de protéine étudiée) d'une culture ayant subi un traitement et de voir où se trouve la protéine exprimée. Finalement, en immunofluorescence, il est aussi possible de mesurer la colocalisation entre deux protéines pouvant faire des liens hétérophiliques. Vu la polyvalence de cette technique, il paraissait logique d'utiliser la microscopie confocale et des anticorps dirigés contre ZO-1 et l'occludine. L'immunobuvardage a aussi été utilisé pour le dosage de l'occludine et sera discuté plus tard (Fig. 3.13).

Tout d'abord, ce sont les figures 3.9 et 3.10 qui résument l'entièreté de l'expérience sur la microscopie confocale. Suite aux résultats précédents, il ne fallait pas s'attendre à une différence significative pour les traitements aux chimiokines et au LPS. Aucune variation de la quantité de ZO-1, de l'occludine et aucune modification de la colocalisation entre ces deux protéines n'est observable. Puisque ces traitements n'ont eu aucun impact sur la perméabilité ou la TEER, il est tout à fait normal d'observer cette absence de variation. De plus, les images de microscopie confocale montrées à la figure 3.10 permettent de comparer l'aspect des cultures pour ces 3 traitements (LPS, TNF- α et IL-1 β) avec les photos de la condition témoin. Dans le cas de l'IL-1 β

et du LPS, l'aspect des cultures est très comparable aux images du témoin. Le marquage de ZO-1 et de l'occludine est bien défini, la fluorescence est en apparence, équivalente, et les noyaux sont abondants et typiques. Pour ces deux traitements, aucune différence notable n'est observable suite à l'ajout d'inhibiteur. Malgré que la littérature confirme ces résultats pour le LPS AP (effet bénin lorsque appliqué à l'AP), l'IL-1 β était plus susceptible d'altérer les JS. Cependant, comme mentionné précédemment, les conditions d'exposition de notre expérience sont différentes. Pour le cas du TNF- α , la littérature mentionne un impact sur l'occludine et ZO-1 lors d'une exposition AP. Avec des cellules MDCK (cellules épithéliales rénales canines), le TNF- α affecte l'intégrité de la monocouche sans toutefois modifier les quantités de ZO-1 et d'occludine (Poritz *et al.*, 2004). Le mécanisme observé est la relocalisation de ZO-1 (Poritz *et al.*, 2004). Pour l'impact de la cytokine sur l'occludine, une étude sur les cellules Caco-2 a démontré qu'une baisse de l'occludine phosphorylée était observable, mais pas l'occludine non phosphorylée (Cui *et al.*, 2010). Ainsi nos résultats sont comparables avec ce qui est énoncé dans la littérature considérant que le TNF- α ne fait pas varier la quantité de ZO-1 ni d'occludine. Cependant, il semble effectivement tout de même avoir un impact autre sur ces protéines, car les images de la culture traitée au TNF- α de la figure 3.10 démontrent une certaine désorganisation de l'occludine et de ZO-1. Le marquage est moins défini dans le cas de l'occludine et l'aspect de celui de ZO-1 diffère des images témoins. L'ajout d'inhibiteur de ERK1/2 au traitement du TNF- α semble réellement améliorer l'état du marquage de l'occludine, car les petits points épars ne sont pas observables sur les cultures traitées au TNF- α avec inhibiteur. En ce qui concerne l'impact du métal sur les JS, contrairement aux autres traitements, nous nous serions attendus à un effet notable sur la colocalisation et/ou la quantité totale de protéine. Évidemment, pour des protéines membranaires bien ancrées dans les membranes comme celles-ci, 24 h peut être trop court pour noter des différences au niveau de la quantité. Par contre, avec son effet drastique sur la TEER et la perméabilité, il est surprenant que la colocalisation ne varie pas en moyenne (Fig. 3.9), mais un effet est observé *in situ* (Fig. 3.10). Tout comme à la figure 3.8, le Cd est le seul traitement unique à avoir un impact sur l'immunofluorescence de ZO-1 et de l'occludine (Fig. 3.10). Effectivement, outre le TNF- α qui semble désorganiser légèrement le JS, le Cd altère l'ensemble de la monocouche de façon plus dramatique. L'aspect des noyaux diffère du témoin, le marquage de l'occludine prend un aspect arrondi à certains endroits et dans le marquage de ZO-1 et de l'occludine, la fluorescence n'est pas homogène. Il a été mentionné plus haut, lors de la discussion de la figure 3.8, que l'inhibiteur

n'avait aucun impact positif sur la TEER ou la perméabilité, mais qu'en plus, il augmentait l'effet du Cd seul. En immunofluorescence aussi, l'inhibiteur ne semble effectivement pas jouer de rôle protecteur vis-à-vis de l'effet du Cd, comparativement à l'effet du TNF- α (Fig. 3.10).

Puisque le Cd est le seul traitement individuel altérant l'intégrité significativement selon la figure 3.8 et qu'il est aussi celui qui altère le plus l'état de la monocouche selon les images de la figure 3.10, on s'attend à ce que les effets des co-traitements observés en immunofluorescence s'apparentent aux effets observés sur l'intégrité. L'effet du Cd est dominant et les autres traitements ne devraient pas mener à des différences significatives sur l'aspect de la culture, avec ou sans inhibiteur. Dû aux valeurs de deux seuls répliquas pour les co-traitements de la figure 3.9, aucun test statistique n'a pu être effectué. Par contre, il semble avoir un impact au niveau de la fluorescence totale de l'occludine et ZO-1 pour chaque co-traitement. Il ne faut pas omettre que cela peut être dû à de la mortalité puisque nous n'avons pas procédé aux tests de viabilité pour les co-traitements. Le co-traitement le plus comparable au témoin est celui composé de Cd + LPS. Nous avons mentionné plus tôt que le LPS pouvait lier les cations divalents, ceci pourrait être un mécanisme possible de réduction des effets toxiques du Cd. Malheureusement, l'ajout d'inhibiteur de ERK1/2 diminue le fluorescence totale de ZO-1 et de l'occludine aux plus basses valeurs (Fig. 3.9). Ceci contredit l'hypothèse précédente de la complexation du Cd par le LPS car cette variation démontre que les cellules sont suffisamment exposées au Cd pour voir des effets, et donc que le LPS ne lie pas tout le métal. Il faut cependant mentionner que les images de la figure 3.10 obtenues en présence de Cd + LPS démontrent une diminution des effets du Cd seul sur la monocouche. Effectivement, les images des cultures traitées au Cd + LPS ressemblent davantage aux images des cultures témoins comparativement aux cellules exposées au Cd seul. Si le graphique 3.9 suggère que l'ajout d'inhibiteur renverse l'effet protecteur du LPS les images de la figure 3.10 confirment l'effet protecteur du LPS car l'ajout d'inhibiteur mène à une culture semblable aux images de cellules exposées au Cd seul. La culture exposée au Cd + LPS + inhibiteur semble plus saine que celle exposée au Cd seul selon les images de microscopie.

Pour le co-traitement Cd + IL-1 β , l'ajout de la cytokine semble très légèrement améliorer l'aspect général de la culture. Cette légère réduction d'impact négatif du Cd par l'IL-1 β est aussi notable à la figure 3.8, comme mentionnée précédemment. La présence d'agglomérat rouge (occludine) se

fait moins remarquer qu'avec le Cd seul. Pour ZO-1, la fluorescence semble équivalente, soit moins homogène et abondante que le témoin. Selon le graphique 3.9, la colocalisation ne varie pas, mais la fluorescence totale subit une baisse. Pour la fluorescence totale, l'ajout d'inhibiteur ne modifie pas le signal et les photos de microscopie de la figure 3.10 ne démontrent aucune différence sur l'aspect général de la culture avec ou sans inhibiteur.

La dernière analyse est celle du traitement au Cd + TNF- α . Dans ce cas-ci, l'impact de chaque traitement individuel est notable. Le TNF- α seul altère davantage l'occludine en désorganisant le marquage, observable par l'apparition de petits points épars sans toutefois diminuer la quantité de protéine, comme mentionnée dans la littérature (Poritz *et al.*, 2004). De plus, sur la même protéine, le Cd cause des petits agglomérats arrondis autour des cellules. Le TNF- α n'a pas d'impact majeure visible sur ZO-1 selon les photos, mais la perte d'homogénéité due au Cd est observable dans le co-traitement. Il y a aussi des jonctions intercellulaires plus foncées que d'autres au marquage de ZO-1, phénomène absent chez le témoin. La figure 3.9 démontre aussi une baisse de la fluorescence totale des deux protéines (plus marquée pour ZO-1) pour le co-traitement sans modification de la colocalisation. Les effets du co-traitement Cd + TNF- α est semblable avec et sans inhibiteur selon la figure 3.9. Par contre, en immunofluorescence, on observe une amplification des effets néfastes du co-traitement par l'inhibiteur, comme avec le co-traitement Cd + LPS (Fig. 3.10). Contrairement au TNF- α + inhibiteur, les cellules traitées au Cd + TNF- α + inhibiteur présentent encore les petits points au marquage à l'occludine (propre au TNF- α) malgré l'ajout d'inhibiteur. L'occludine semble particulièrement souffrir de ce dernier traitement.

4.3 À l'exception du LPS, tous les traitements de 24 h mènent à une réponse inflammatoire en IL-8 influencée par le côté d'exposition, mais pas en TNF- α , IL-1 β et IL-6

Précédemment, nous avons démontré que seul le Cd a un impact observable en 24 h sur l'intégrité de la monocouche au niveau de la perméabilité et de la TEER. Cet impact est dose-dépendant jusqu'à au moins 20 μ M et, contrairement à l'augmentation de la perméabilité, la chute de TEER est déjà majeure à 5 μ M. Les co-traitements avec le Cd (TNF- α , IL-1 β et LPS) ne modifient pas l'impact du métal sur la TEER, mais démontrent une tendance à légèrement renverser l'augmentation de la perméabilité. De plus, l'ajout d'inhibiteur de ERK1/2 exacerbe

significativement l'augmentation de perméabilité provoquée par le Cd seul. Malgré l'absence d'impact mesurable des cytokines sur l'intégrité, le TNF- α mène à une désorganisation de l'occludine et ZO-1 visible par microscopie confocale. Contrairement au Cd, cette altération des JS par le TNF- α semble réversible par l'ajout d'inhibiteur de ERK1/2, suggérant un mécanisme différent entre le métal et le TNF- α . Le LPS a aussi une tendance à minimiser l'impact du Cd sur les JS par microscopie confocale sans toutefois significativement en renverser la chute de TEER et la perte d'étanchéité.

À ce stade-ci, on pourrait donc croire que les cytokines sont sans effets dramatiques sur la monocouche et qu'elles ne potentialisent pas les effets du métal en co-exposition. De plus, l'implication de ERK1/2 dans les dommages causés par le Cd sur l'intégrité ne semble pas être un pivot dans la minimisation des effets. L'ajout de l'inhibiteur au traitement par le Cd potentialise l'effet du métal sur l'intégrité en augmentant la perméabilité. Par contre, l'altération de l'intégrité se mesure plus facilement que l'inflammation, processus plus pernicieux et complexe. Pour mesurer la réponse inflammatoire, le dosage de 4 marqueurs d'inflammation (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-8) a été effectué par ELISA suite aux mêmes traitements que précédemment. Comme mentionné dans les résultats, seule une réponse significative en IL-8 a été observée. L'IL-8 est une cytokine pro-inflammatoire classée comme chimiokine. C'est-à-dire que son rôle majeur est de créer un gradient servant de chemin pour diverses cellules du système immunitaire, phénomène appelé chimiotactisme. Ce phénomène attire donc par exemple les macrophages sur le site d'inflammation. La présence de macrophages mène souvent au relargage subséquent de nouvelles cytokines pro-inflammatoires et par effet boule de neige, une augmentation de l'inflammation. Comme mentionné précédemment, malgré que les cytokines pro-inflammatoires ne causent pas d'altération rapide (en 24 h) de l'intégrité, le phénomène de chimiotactisme mentionné ci-dessus peut mener à des problèmes sous-jacents.

En travaillant sur des filtres semi-perméables, il est possible de mieux simuler les conditions *in vivo* en traitant et mesurant indépendamment les deux côtés de la monocouche. La littérature mentionne effectivement une modulation des récepteurs pour le LPS, l'IL-1 β et le TNF- α en fonction du côté de la monocouche.

Dans le cas du TNF- α , il y a deux principaux récepteurs, mais c'est à l'AP que les deux sont présents, au BL il n'y en a qu'un (Sonnier *et al.*, 2010). Dans le cas de l'IL-8, le côté de sécrétion est favorisé par le côté d'exposition (AP favorise sécrétion AP et inversement) (Sonnier *et al.*, 2010). L'IL-1 β est gérée par le récepteur IL-1R2 et ce récepteur est réparti des deux côtés de la monocouche, mais principalement au BL (Varilek *et al.*, 1994). Le LPS est principalement géré par le TLR-4, un récepteur exprimé à l'AP et au BL par les cellules Caco-2 polarisées (Cario et Podolsky, 2000). Selon la littérature, l'exposition des cellules Caco-2 au LPS mène à la sécrétion du TNF- α , de l'IL-1 β et 6, mais pas d'IL-8 (Kim *et al.*, 2016 ; Im *et al.*, 2012). Dans notre cas, appliqué à l'AP, le LPS n'a jamais mené à aucune sécrétion en 24 h.

Connaissant maintenant le profil d'expression des récepteurs pertinents aux traitements mentionnés ci-dessus, il est intéressant de comparer avec la littérature et de mesurer l'impact du Cd avec ces traitements. La figure 3.11 illustre l'ensemble des résultats sur la sécrétion d'IL-8 suite aux divers traitements. Plus haut il a été mentionné que selon la littérature, le LPS ne menait pas à des sécrétions significatives d'IL-8 par une culture de Caco-2 différenciée. Effectivement nos résultats ne démontrent aucune variation significative par rapport au contrôle avec une sécrétion AP de 80 ± 56 pg/mL et BL de 45 ± 17 pg/mL (sécrétion constitutive de 48 pg/mL de chaque côté de la monocouche). Il avait aussi été observé que le LPS pouvait amoindrir l'impact du Cd sur l'intégrité de la monocouche, et selon la littérature, sa charge négative peut lier les cations divalents. Par contre on sait aussi qu'avec sa grande masse moléculaire (> 1000 kDa), le LPS ne devrait pas traverser si facilement la monocouche. De manière intéressante, en sécrétion d'IL-8 ce phénomène pourrait être suggéré. Le Cd seul mène à des sécrétions significatives d'IL-8 à l'AP et au BL par rapport au témoin, en ajoutant du LPS à l'AP en présence de Cd, la sécrétion d'IL-8 AP devient comparable au témoin. Par contre, une tendance s'observe en sécrétion d'IL-8 BL (non significative) par rapport au témoin. La sécrétion d'IL-8 BL par les cellules suite au traitement Cd + LPS AP et semblable à celle du Cd seul. On pourrait donc hypothétiser que le LPS ne lie que le Cd AP puisqu'il ne traverse pas vers le côté BL. Sachant que le traitement Cd + LPS AP affecte significativement la TEER et démontre une tendance à augmenter la perméabilité, le Cd non lié pourrait traverser la monocouche et mener à une sécrétion d'IL-8 BL puisque le LPS ne peut pas traverser. N'ayant pas fait d'exposition au Cd BL, il nous est impossible de savoir à quoi ressemble le profil de sécrétion de ce côté. Ainsi l'hypothèse du LPS complexant le Cd AP reste à démontrer

car nous n'avons ici aucun moyen de confirmer ce qui est suggéré. Dans le même ordre d'idée, on pourrait aussi croire que l'IL-8 ne traverse pas la monocouche, car en réponse au traitement Cd + LPS la concentration d'IL-8 n'est pas homogène d'une part et d'autre de la monocouche. Avec le Cd seul, la concentration est équivalente des deux côtés, il est donc impossible de dire s'il s'agit de diffusion ou de sécrétion homogène de part et d'autre de la monocouche cellulaire.

Concernant l'effet du TNF- α , il y a effectivement une sécrétion favorisée par le côté d'exposition. Lors d'une exposition AP, la sécrétion AP d'IL-8 tend à être supérieure à celle du témoin ($p < 0,1120$) et significativement différente de la sécrétion BL ($p < 0,05$). Dans le cas du TNF- α BL, l'analyse est la même. La différence est significative entre les deux côtés de sécrétion et la concentration BL d'IL-8 est significativement supérieure à la sécrétion témoin BL. En ajoutant du Cd à ce traitement, sachant qu'il augmente la perméabilité, on s'attend à ce que la concentration d'IL-8 soit semblable de part et d'autre de la monocouche. Dans les faits, il ne semble pas avoir de diffusion d'IL-8 ou de TNF- α après 24 h d'exposition. De plus, le profil de sécrétion d'IL-8 induit par le TNF- α ressemble à celui causé par le traitement TNF- α + Cd, avec une hausse des concentrations. La présence du TNF- α favorise encore la sécrétion d'IL-8 du côté de l'exposition, mais l'ajout du métal augmente la concentration d'IL-8 partout. Il faut noter que, l'effet ne semble pas additif, mais synergique les niveaux de sécrétion obtenus en présence de TNF- α + Cd sont supérieurs à la somme des niveaux obtenus par chaque traitement. Par exemple, la concentration d'IL-8 AP suite au traitement par le Cd est de 241 ± 166 pg/mL. Pour le TNF- α AP, elle est de 276 ± 153 pg/mL. La somme serait donc de 517 ± 319 pg/mL, mais la concentration observée en présence de co-traitement est de 1096 ± 386 pg/mL soit presque le double. Pour la somme de la concentration BL suite aux traitements AP seuls, on obtient 304 ± 163 pg/mL comparativement à 416 ± 215 pg/mL pour la somme de sécrétion obtenue par chaque traitement. Ici on parle d'additivité, car il y a égalité. En effectuant les mêmes calculs avec le TNF- α BL et le Cd AP, les résultats suggèrent une additivité. Il y aurait donc seulement un effet synergique entre le Cd AP et le TNF- α AP sur la sécrétion d'IL-8 AP. Malheureusement, *in vivo* la sécrétion d'IL-8 AP sera dommageable, car elle peut mener à la migration de lymphocytes au niveau du lumen. Les lymphocytes sont connus (particulièrement les macrophages) pour relarguer du TNF- α lorsqu'ils rencontrent des pathogènes ou du LPS, tous deux abondant dans l'intestin (Kim *et al.*, 2016 ; Im *et al.*, 2012).

L'IL-1 β est aussi identifiée comme cytokine pro-inflammatoire dans la littérature. Dans nos expériences sur les cellules TC7 sur filtres, c'est la cytokine menant à la plus importante sécrétion d'IL-8 AP. Suite à l'exposition AP des cellules à la cytokine, la concentration AP d'IL-8 est de 1332 ± 464 pg/mL comparativement à seulement 154 ± 54 pg/mL au BL. Dans le cas de la stimulation BL, les sécrétions des deux côtés de la monocouche sont presque négligeables. La sécrétion AP n'est pas significativement différente du témoin et la sécrétion BL légèrement supérieure avec 216 ± 94 pg/mL ($p < 0,1120$). Encore ici, le côté d'exposition favorise la sécrétion au même côté, grandement à l'AP et légèrement au BL. On s'aperçoit aussi qu'avec les différences de concentrations en IL-8 en fonction du côté d'exposition, l'IL-1 β ne diffuse pas. Précédemment, nous avons mentionné que la majorité des récepteurs de l'IL-1 β était BL, la quantité (et la diversité) de récepteurs possiblement à affinité variable permet peut-être une meilleure gestion de la réponse en IL-8 suite à l'exposition de l'IL-1 β au BL. De même, sans l'avoir mesuré au laboratoire, on sait par la littérature que le LPS BL mène à de l'inflammation (Cario et Podolsky, 2000)

Le co-traitement de l'IL-1 β avec le Cd (AP) mène à un phénomène surprenant, peu importe le côté d'exposition à la cytokine, un maximum de sécrétion d'IL-8 est observé au BL. Par contre, si on émet l'hypothèse qu'en présence de Cd, l'IL-1 β diffuse par la voie paracellulaire, une plus grande quantité de cytokine se retrouve au BL, là où son effet devrait être grandement minimisé. De plus, le volume de milieu au BL est plus grand (2,5 vs. 1,5 mL) donc il y a une grande dilution du traitement. Selon le site de Pubchem, la masse moléculaire de l'IL-1 β est de seulement 1 kDa, soit plus petit que le dextran que nous avons démontré pouvoir traverser la monocouche en présence de Cd à 5 μ M (Fig. 3.7). Ce phénomène de diffusion ne s'applique peut-être pas avec le TNF- α , car sa masse moléculaire de 17,3 kDa est nettement supérieure.

4.4 La phosphorylation de ERK1/2 est centrale dans la réponse inflammatoire en IL-8 et le Cd, l'IL-1 β et le TNF- α utilisent tous cette voie de signalisation

Une hypothèse centrale de cette étude était l'implication de ERK1/2 dans les dommages causés par le Cd et les traitements pro-inflammatoires soit: le TNF- α , l'IL-1 β et le LPS. Il a été démontré que

dans l'altération rapide (24 h) de l'intégrité de la monocouche, principalement par le Cd, la kinase ne jouait pas de rôle décisif dans le renversement des effets. Au contraire, l'ajout d'inhibiteur augmente significativement la perméabilité par rapport au traitement du Cd seul. Par contre, dans le cas de la réponse inflammatoire, menant souvent à des problèmes à long terme, la kinase est impliquée. Pour mesurer l'implication d'une voie de signalisation (ici ERK1/2) sur une réponse (ici l'IL-8), une astuce est d'inhiber cette voie et de voir l'impact sur la réponse. La sécrétion d'IL-8 peut être causée par plusieurs voies de signalisation et ERK1/2 n'est pas nécessairement la seule kinase impliquée (totalement ou partiellement). Dans le cas des cellules épithéliales humaines, il y a au moins 3 voies, soit la voie étudiée ici : MAPK/ERK ou encore JAK2/STAT3 et AKT (Fig. 4.1).

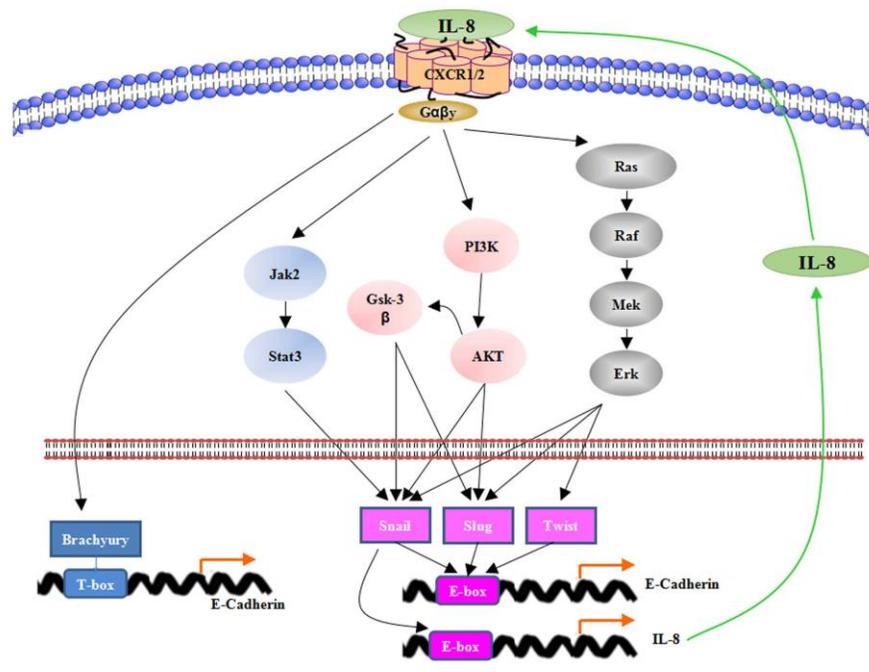


Figure 4.1 : Voies de signalisation menant à la sécrétion de l'IL-8 dans les cellules épithéliales. L'inhibition de ERK1/2 peut réduire la sécrétion d'IL-8 causée par le traitement au Cd agissant sur la voie de signalisation de ERK1/2, mais d'autres voies peuvent aussi causer la sécrétion de l'IL-8. La cytokine peut agir sur sa propre sécrétion de façon autocrine par rétroaction positive (Long *et al.*, 2015)

Nous avons testé l'inhibition de la sécrétion d'IL-8 sur des cultures en pétris en inhibant MEK, une voie de signalisation en amont de ERK1/2 (Fig. 4.1). La figure 3.12 résume l'ensemble des résultats. La première chose à noter sur cette figure est la variation des profils de sécrétion par rapport aux

cultures sur filtres. Étant sur pétris, il n'est pas surprenant que les valeurs ne soient pas identiques, de plus il n'y a que le côté AP et le volume est de 5 mL comparativement à 1,5 mL sur filtre. Tout d'abord, le Cd est ici utilisé à 10 μ M car les cellules étaient aussi utilisées pour les immunobuvardage et cette concentration était plus pertinente dans ce cas-ci. Dans le cas du Cd à 5 μ M sur filtres, les concentrations d'IL-8 étaient respectivement de 241 et 222 pg/mL à l'AP et au BL. La quantité totale de la chimiokine dans les 4 mL totaux du puits était donc de 917 pg. Sur pétri, la concentration est de 384 ± 111 pg/mL soit 1920 pg totaux pour 5 mL. Il faut donc comprendre que la sécrétion qui est semblable en apparence peut varier en quantité. Avec l'ajout d'inhibiteur de ERK1/2, la concentration d'IL-8 chute à 155 ± 83 pg/mL soit 775 pg totaux. Une baisse considérable, mais pas totale considérant que le témoin affiche une concentration d'IL-8 de 24 ± 25 pg/mL soit 120 pg totaux, un peu plus que 6 fois moins les valeurs obtenues sur cultures traitées au Cd seul. Selon les tests statistiques, la concentration d'IL-8 est significativement différente du témoin lorsque les cellules sont exposées au Cd et la concentration de chimiokine descend à une concentration non significative suite à l'ajout d'inhibiteur. Pour les 3 traitements (Cd, IL-1 β et TNF- α), la différence est significative après 24 h, mais non significative avec l'ajout d'inhibiteur. Pour le traitement à l'IL-1 β , l'IL-8 secrétée varie de 358 ± 111 pg/mL à 110 ± 42 pg/mL avec inhibiteur et pour le traitement au TNF- α la diminution est de 599 ± 223 pg/mL à 185 ± 74 pg/mL. L'inhibiteur affecte donc, dans tous les cas, la sécrétion d'IL-8, ce qui confirme l'hypothèse de l'implication de ERK1/2 dans la sécrétion d'IL-8 par les divers traitements. Certaines publications utilisent le même inhibiteur à une concentration de 100 μ M tandis que certains l'utilisent à 20 μ M avec les cellules Caco-2. Dans notre cas, il a été utilisé à 20 μ M et cette concentration est suffisante pour inhiber la sécrétion d'IL-8. Il a été démontré par la littérature que le TNF- α et l'IL-1 β activent aussi NF- κ B. Ce facteur de transcription est impliqué dans plusieurs rôles comme dans la synthèse des cytokines/chimiokines, mais aussi l'apoptose, la réponse au stress oxydatif, le contrôle du cycle cellulaire et l'expression des récepteurs immuns (Liu *et al.*, 2017). Il ne serait donc pas surprenant que la sécrétion de l'IL-8 ne soit pas uniquement modulée par ERK1/2 lors d'une stimulation par que le TNF- α et l'IL-1 β . Le LPS n'a pas été testé ici vu son absence d'effet sur l'ensemble des autres paramètres étudiés.

Il a été mentionné dans l'introduction que l'IL-8 pourrait être une bonne cible thérapeutique car elle peut promouvoir la migration, l'invasion et la prolifération cellulaire (Ning *et al.*, 2011). De

plus, elle aurait un potentiel métastatique dans les cellules Caco-2 lorsque injectée de manière sous cutanée à des souris (Ning *et al.*, 2011). La sécrétion autocrine de l'IL-8 active NF- κ B (comme le TNF- α et l'IL-1 β) qui ultimement active ERK1/2, que nous avons identifiée comme kinase responsable de la sécrétion d'IL-8 (Ning *et al.*, 2011). Cette boucle d'activation peut donc poser un problème sachant que tous nos traitements (à l'exception du LPS AP) déclenchent la sécrétion de la chimiokine d'une manière ou d'une autre. L'inhibition de ERK1/2 pourrait donc être indirectement une cible thérapeutique pour la réponse inflammatoire.

Ultimement, l'immunobuvardage devait être utilisé pour confirmer certains concepts. Tout d'abord, cela permet de comparer les niveaux de protéines de JS avec les résultats obtenus en fluorescence totale de la figure 3.9. Malheureusement, le signal de ZO-1 sur membranes apparaissait de façon momentanée et avec une mauvaise résolution. Avec le temps disponible à ce moment, nous avons pris la décision de ne pas mettre davantage d'effort sur la détection de cette protéine. La détection de l'occludine était aussi complexe, mais il a été possible d'obtenir suffisamment de résultats indépendants pour analyser la quantité d'occludine dans le lysat cellulaire suite aux traitements. Comme observé pour les traitements individuels de la figure 3.9, aucune variation significative de la quantité totale d'occludine n'est observable suite aux traitements au métal (24 h) et aux cytokines pro-inflammatoires (1 h et 24 h). L'inhibiteur de ERK1/2 n'a pas non plus d'effet, positif ou négatif. La littérature mentionne effectivement que le TNF- α ne modifie pas la quantité d'occludine, il l'a désorganise (Poritz *et al.*, 2004). Cette désorganisation est observable et réversible par l'ajout d'inhibiteur (Fig. 3.10). Pour le Cd, la littérature mentionne aussi que malgré son effet sur les protéines de JS, particulièrement ZO-1 et l'occludine, le phénomène causant une augmentation de la perméabilité paracellulaire est la relocalisation intercellulaire et non une baisse d'expression dans les cellules épithéliales intestinales et pulmonaires (Cao *et al.*, 2015 ; Duizer *et al.*, 1999). Ici aussi c'est ce qui a été observé par immunobuvardage et immunofluorescence totale. Dans le cas de l'IL-1 β , il a été démontré par la littérature que sa présence dans une culture de cellules intestinales mène à une dégradation de l'ARNm de l'occludine (Rawat *et al.*, 2020). Ici malgré la dégradation de l'ARNm, on peut hypothétiser que 24 h de traitement n'est pas suffisant pour noter une baisse de la quantité totale, il faudrait donc mesurer l'impact de l'IL-1 β à plus long terme sur l'intégrité de la monocouche. Un article mentionne qu'après 48 h de traitement, une baisse de l'occludine est observable sans

toutefois affecter ZO-1 (Al-Sadi et Ma, 2007). La littérature et nos résultats sont donc concordants dans la mesure où aucune baisse de la quantité de ZO-1 et d'occludine n'est observable en immunofluorescence totale et en immunobuvardage (occludine) suite à des traitements (Cd, IL-1 β et TNF- α) de 24 h (Fig. 3.9 et 3.13). Par contre, la désorganisation de ZO-1 et de l'occludine mentionnée par la littérature est définitivement observable par le Cd et le TNF- α à la figure 3.10. Rappelons-nous que ZO-1 est une protéine importante dans la variation de la TEER, les deux chutent en même temps. Puisqu'aucune cytokine n'affecte significativement la quantité de ZO-1 en 24 h, il est normal qu'aucune perte de TEER ne soit notable par ces traitements à la figure 3.8.

Outre pour mesurer les niveaux de protéines de JS, l'immunobuvardage se voulait aussi une manière de confirmer l'activation de ERK1/2 par les traitements et son inhibition par l'inhibiteur. De plus, cette technique permet de voir si l'inhibition est totale ou partielle, un concept important dans l'analyse des résultats. La littérature mentionnait aussi que les cytokines phosphorylaient rapidement et de façon non soutenue, contrairement au Cd (Mantha et Jumarie, 2010 ; Varilek *et al.*, 1994). Malgré les profils de sécrétion d'IL-8 inhibable sur pétris, cette expérience ne donnait pas d'information sur le degré d'inhibition et la dynamique de phosphorylation de la kinase par les traitements. La variation de p-ERK1/2 doit être indépendante de ERK1/2 totale et comme la figure 3.13 le démontre, aucune variation significative de ERK1/2 totale n'est observable par aucun des traitements. Dans le cas de p-ERK1/2, l'étude de la cinétique de phosphorylation par les cytokines n'a pu être menée à terme mais l'implication de p-ERK dans la sécrétion de l'IL-8 a été confirmée. Une panoplie de problèmes techniques ont rendus difficile la finalisation de cette partie du projet, malgré tout, quelques phénomènes sont comparables avec la littérature. Tout d'abord, comme il avait été démontré précédemment dans notre laboratoire, le Cd aux alentours de 10 μ M mène à la phosphorylation de la kinase de manière significative (Mantha et Jumarie, 2010). La différence entre le traitement au Cd avec et sans inhibiteur est aussi significative malgré une inhibition incomplète. Une autre tendance observée est la différence entre le traitement au TNF- α (1 h) avec et sans inhibiteur. Comme mentionnée par la littérature, les deux cytokines (TNF- α et l'IL-1 β) mènent à la phosphorylation de la kinase avec des maximums dans la première heure suivis d'un déclin. Cela aurait dû s'observer aussi via l'IL-1 β , mais malheureusement cela fut impossible dans le cadre de ce projet. Malgré tout, l'implication de ces cytokines dans la phosphorylation de ERK1/2 est bien démontrée à la figure 3.12 et la cinétique de leur action de phosphorylation est

suffisamment démontré par la littérature (Varilek *et al.*, 1994). Malgré un manque de significativité, on peut remarquer que les niveaux de p-ERK sont légèrement plus élevés pour les traitements de 1 h que 24 h dans le cas des cytokines. Pour le traitement à l'IL-1 β , les niveaux d'expression par rapport au témoin pour 1 h et 24 h sont respectivement de $2,5 \pm 1,3$ et de $1,9 \pm 2,0$. Pour le traitement au TNF- α , les niveaux d'expression relatifs à 1 h et 24 h sont respectivement de $2,6 \pm 1$ et de $1,5 \pm 1,1$. Par contre, les différences devraient être beaucoup plus notables, car dans le cas du traitement à l'IL-1 β , la phosphorylation de ERK1/2 à 60 min est déjà presque de moitié celle observée à 30 min (Varilek *et al.*, 1994). Ces phosphorylations courtes sont tout de même suffisantes pour mener à une sécrétion d'IL-8 comparable à celle induite par le Cd qui est maintenue plus de 24 h.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La toxicité du Cd sur l'humain n'était plus à démontrer. Cependant, ses effets sur l'épithélium intestinal suite à l'ingestion d'aliments contaminés sont encore trop peu connus. Au laboratoire nous avons pu étudier son impact sur des cellules intestinales en présence de cytokines inflammatoires étant connues comme souvent présentes lors d'une crise inflammatoire intestinale. Tout d'abord, il a été observé que le métal affecte l'intégrité de la monocouche en aussi peu que 24 h. Cela implique une augmentation de la perméabilité de petites et grosses molécules (> 1 kDa) traversant la monocouche à partir d'une concentration de 5 μM . La chute de la résistance transépithéliale (TEER) démontre aussi une désorganisation des protéines de jonctions, normalement responsables du maintien d'une TEER élevée. Heureusement, les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α) et le LPS n'ont pas d'impact significatif sur l'intégrité de la monocouche (mesure de la TEER et perméabilité au RP) dans des délais de 24 h, seuls ou en présence du métal. Des images de microscopie confocale en immunofluorescence ont démontré que le TNF- α désorganise tout de même les protéines de JS (occludine et ZO-1) en 24 h. À l'inverse, le LPS semblerait diminuer les dommages causés par le métal, probablement par sa capacité à complexer les cations divalents.

Une partie de ce projet consistait à étudier le rôle de ERK1/2, une kinase activée par 5 – 10 μM de Cd, dans les dommages causés par les traitements. Étonnamment, l'inhibition de ERK1/2 en présence de Cd mène à une exacerbation de l'augmentation de la perméabilité par le métal. Dans le cas du TNF- α , l'ajout d'inhibiteur améliore l'aspect du marquage de ZO-1 et de l'occludine. De plus, même si les cytokines n'ont pas altéré l'intégrité de la monocouche elles ont déclenché une importante sécrétion d'IL-8 en aussi peu que 1 h. Dans le cas du Cd et des cytokines, la sécrétion d'IL-8 implique une activation de ERK1/2 car elle est inhibable par l'ajout d'inhibiteur de la kinase. Contrairement à l'hypothèse, tous les traitements utilisés durant ce projet en 24 h ne mènent pas à une sécrétion significative d'IL-1 β , de TNF- α et d'IL-6.

Pour la suite des choses, il serait intéressant d'utiliser un système de coculture avec les cellules Caco-2 et des macrophages sensibles au gradient d'IL-8 pour mesurer l'impact de l'activation des macrophages. Leur réaction pourraient devenir incontrôlable en présence de LPS, une endotoxine

sans effet dommageable lorsque seule au côté AP, suite à leur migration. Les effets protecteurs du LPS seraient aussi à mesurer en variant sa concentration en présence de Cd. Selon la littérature, les deux cytokines pro-inflammatoires devraient altérer l'intégrité. Pour reproduire ce qui a été fait, il faut stimuler simultanément les deux côtés de la monocouche avec l'IL-1 β sans modifier la concentration pour pouvoir comparer avec la littérature. Nous saurions ainsi si notre modèle s'avérait plus résistant ou si le type exposition explique les différences. Dans le cas du TNF- α , des expositions de 48 h menaient à l'ouverture des JS selon la littérature, il faudrait donc prolonger le temps d'exposition. Nos résultats démontrent la pertinence d'étudier les effets d'expositions conjointes au Cd et aux cytokines pro-inflammatoires sur l'épithélium intestinal dans un contexte pathologique de sensibilité accrue et pourraient motiver des études *in vivo*.

Bibliographie

- Alloway, B. J., Jackson A, P. et Morgan, H. (1990). The accumulation of cadmium by vegetables grown on soils contaminated from a variety of sources. *Science of the environment* 91: 223-236.
- Al-Sadi, R. M. et Ma, T. Y. (2007). IL-1 Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability. *The Journal of Immunology* 177(5): 2310-2322.
- Al-Sadi, R., Guo, S., Ye, D. et Ma, T. Y. (2013). TNF- α Modulation of Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier Is Regulated by ERK1/2 Activation of Elk-1. *The American Journal of Pathology* 183(6): 1871-1884.
- Al-Sadi, R., Khatib, K., Guo, S., Ye, D., Youssef, M. et Ma, T. (2011). Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 300(6): G1054-64.
- Al-Sadi, R., Ye, D., Said, H.M. et Ma, T.Y. (2011), Cellular and molecular mechanism of interleukin-1 β modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15(4): 970-982.
- Avdeef, A. (2010). Leakiness and Size Exclusion of Paracellular Channels in Cultured Epithelial Cell Monolayers—Interlaboratory Comparison. *Pharmaceutical Research* 27(3): 480-9.
- Balda, M. S. et Matter, K. (2000). The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *The EMBO journal* 19(9): 2024-33.
- Buhrmann, C., Shayan, P., Aggarwal, B. B., et Shakibaei, M. (2013). Evidence that TNF- β (lymphotoxin α) can activate the inflammatory environment in human chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, 15(6): R202.
- Cao, X., Lin, H., Muskhelishvili, L., Latendresse, J., Richter, P. et Heflich, R. H. (2015). Tight junction disruption by cadmium in an in vitro human airway tissue model. *Respiratory Research* 16(1): 30.
- 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. *Infection and Immunity*, 68(12): 7010–17.
- Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A. et Rousset, M. (1994). Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J. Cell Sci* 107(Pt1): 213-15.
- Coughlin, R. T., Tonsager, S., et McGroarty, E. J. (1983). Quantitation of metal cations bound to membranes and extracted lipopolysaccharide of Escherichia coli. *Biochemistry* 22(8): 2002-7.
- Cui, W., Li, L. X., Sun, C. M., Wen, Y., Zhou, Y., Dong, Y. L. et Liu, P. (2010). Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 43(4): 330-7.
- Daig, R., Andus, T., Aschenbrenner, E., Falk, W., Scholmerich, J., et Gross, V. (1996). Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 38(2): 216-22.
- Denaro, M., Smeriglio, A., De Francesco, C., Xiao, J., Cornara, L., et Trombetta, D. (2020). In vitro intestinal transport and anti-inflammatory properties of ideain across Caco-2 transwell model. *Fitoterapia* 146: 104723.
- Duizer, E., Gilde, A. J., Versantvoort, C. H. M. et Groten, J. P. (1999). Effects of Cadmium Chloride on the Paracellular Barrier Function of Intestinal Epithelial Cell Lines. *Toxicology and Applied Pharmacology* 155(2): 117-26.
- Elisma, F., et Jumarie, C. (2001). Evidence for Cadmium Uptake through Nramp2: Metal Speciation Studies with Caco-2 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285(3): 662-68.

- Escaffit, F., Boudreau, F. et Beaulieu, J.-F. (2005). Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J. Cell. Physiol.* 203(1): 15-26.
- Groschwitz, K. R., et Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124(1): 3-20.
- Guo, S., Al-Sadi, R., Said, H. M., et Ma, T. Y. (2013). Lipopolysaccharide Causes an Increase in Intestinal Tight Junction Permeability in Vitro and in Vivo by Inducing Enterocyte Membrane Expression and Localization of TLR-4 and CD14. *The American Journal of Pathology* 182(2): 375-87.
- Hartenstein B, Teurich S, Hess J, Schenkel J, Schorpp-Kistner M et Angel P. (2002). Th2 cell-specific cytokine expression and allergen-induced airway inflammation depend on JunB. *The EMBO Journal* 21(23): 6321-29.
- Hidalgo, I. J., Raub, T. J., et Borchardt, R. T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96(3): 736-49.
- Huang, X., Oshima, T., Tomita, T., Fukui, H. et Miwa, H. (2021). Butyrate Alleviates Cytokine-Induced Barrier Dysfunction by Modifying Claudin-2 Levels. *Biology* 10(3): 205.
- Hyun, JS., Satsu, H. et Shimizu, M. (2007). Cadmium induces interleukin-8 production via NF-kappaB activation in the human intestinal epithelial cell, Caco-2. *Cytokine* 37(1): 26-34.
- Im, E., Riegler, F. M., Pothoulakis, C., et Rhee, S. H. (2012). Elevated lipopolysaccharide in the colon evokes intestinal inflammation, aggravated in immune modulator-impaired mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 303(4): G490-7.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M. et Tsukita S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell. Biology* 147(6): 1351-63.
- Ko, E.-Y., Jung, W.-K. (2016). 5-Bromo-2-hydroxy-4-methyl-benzaldehyde inhibited LPS-induced production of pro-inflammatory mediators through the inactivation of ERK, p38, and NF-κB pathways in RAW 264.7 macrophages. *Chemico-Biological Interactions* 258: 108-14.
- Krug, S. M., Amasheh, S., Richter, J. F., Milatz, S., Günzel, D., Westphal, J. K., Fromm, M. (2009). Tricellulin Forms a Barrier to Macromolecules in Tricellular Tight Junctions without Affecting Ion Permeability. *Molecular Biology of the Cell* 20(16): 3713-24.
- Li, C., Bai, X., Liu, X., Zhang, Y., Liu, L., Zhang, L., Xu, F., Yang, Y. et Liu, M. (2021). Disruption of Epithelial Barrier of Caco-2 Cell Monolayers by Excretory Secretory Products of *Trichinella spiralis* Might Be Related to Serine Protease. *Frontiers in microbiology* 12: 634185.
- Li, Z., Wei-Ting, K., Turner. et Jerrold R. (2020). Tight Junctions as Targets and Effectors of Mucosal Immune Homeostasis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 10(2): 327-40.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., et Sun, S.-C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2: 17023.
- Long, X., Ye, Y., Zhang, L., Liu, P., Yu, W., Wei, F., et YU, J. (2015). IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways (Review). *International Journal of Oncology*, 48(1): 5-12.
- Lopes do Carmo, C., M., Mateus M, I., Ramos Magalhães, E, A., Maróstica R, J, M., et Macedo, A, J. (2020). Passion fruit (*Passiflora edulis*) leaf aqueous extract ameliorates intestinal epithelial barrier dysfunction and reverts inflammatory parameters in Caco-2 cells monolayer. *Food Research International* 133: 109162.
- Ma, T. Y., Iwamoto, G. K., Hoa, N. T., Akotia, V., Pedram, A., Boivin, M. A. et Said, H. M. (2004). TNF-α-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-κB activation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 286(3): G367-76.
- Mantha, M., et Jumarie, C. (2010). Cadmium-induced hormetic effect in differentiated Caco-2 cells: ERK and p38 activation without cell proliferation stimulation. *Journal of Cellular Physiology* 224(1): 250-61.

- McNeil, E. (2006). Zonula Occludens-1 Function in the Assembly of Tight Junctions in Madin-Darby *Canine Kidney Epithelial Cells*. *Molecular Biology of the Cell* 17(4): 1922-32.
- Meunier, V., Bourri, M., Berger, Y., et Fabre, G. (1995). The human intestinal epithelial cell line Caco-2; *pharmacological and pharmacokinetic applications*. *Cell Biology and Toxicology* 11(3-4): 187-94.
- Michalsky MP, Deitch EA, Ding J, Lu Q et Huang Q. (1997). Interleukin-6 and tumor necrosis factor production in an enterocyte cell model (Caco-2) during exposure to Escherichia coli. *Shock* 7(2): 139-46.
- Mollen, K. P., Gribar, S. C., Anand, R. J., Kaczorowski, D. J., Kohler, J. W., Branca, M. F. et Hackam, D.J. (2008). Increased expression and internalization of the endotoxin coreceptor CD14 in enterocytes occur as an early event in the development of experimental necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery* 43(6): 1175-81.
- Mudter, J., et Neurath, M. F. (2007). Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: Pathophysiological role and clinical relevance. *Inflammatory Bowel Diseases* 13(8): 1016-23
- Nie, N., Bai, C., Song, S., Zhang, Y., Wang, B. et Li, Z. (2019). Bifidobacterium plays a protective role in TNF- α -induced inflammatory response in Caco-2 cell through NF- κ B and p38MAPK pathways. *Molecular and Cellular Biochemistry* 464(1-2): 83-91.
- Nighot, M., Al-Sadi, R., Guo, S., Rawat, M., Nighot, P., Watterson, M. D., et Ma, T. Y. (2017). Lipopolysaccharide-Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Permeability Is Mediated by Toll- Like Receptor 4/Myeloid Differentiation Primary Response 88 (MyD88) Activation of Myosin Light Chain Kinase Expression. *The American Journal of Pathology* 187(12): 2698-710.
- Ning, Y., Manegold, P.C., Hong, Y.K., Zhang, W., Pohl, A., Lurje, G., Winder, T., Yang, D., LaBonte, M.J., Wilson, P.M., Ladner, R.D. et Lenz, H.-J. (2011). Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *Int. J. Cancer* 128(9): 2038-49.
- Pham, T, N, D., F, Denizeau. et Jumarie, C. (2005). Kinetics of the early subcellular distribution of cadmium in rat hepatocytes. *Biometals* 18(3): 255-67.
- Pham, T. N. D., Ségui, J. A., Fortin, C., Campbell, P. G. C., Denizeau, F., et Jumarie, C. (2004). Cadmium uptake in rat hepatocytes in relation to speciation and to complexation with metallothionein and albumin. *Journal of Cellular Physiology* 201(2): 320-30.
- Poritz, L. S., Garver, K. I., Tilberg, A. F. et Koltun, W. A. (2004). Tumor necrosis factor alpha disrupts tight junction assembly. *Journal of Surgical Research* 116(1): 14-8.
- Rawat, M., Nighot, M., Al-Sadi, R., Gupta, Y., Viszwapriya, D., Yochum. et G., Ma, T, Y. (2020). IL-1B Increases Intestinal Tight Junction Permeability by Upregulation of MIR200C-3p, Which Degrades Occludin mRNA. *Gastroenterology* 159(4): 1375-89.
- Rollwagen, F. M., Madhavan, S., Singh, A., Li, Y.-Y., Wolcott, K., et Maheshwari, R. (2006). IL-6 Protects enterocytes from hypoxia-induced apoptosis by induction of bcl-2 mRNA and reduction of fas mRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347(4): 1094-108.
- Rusanov, A. L., Smirnova, A. V., Poromov, A. A., Fomicheva, K. A., Luzgina, N. G., et Majouga, A. G. (2015). Effects of cadmium chloride on the functional state of human intestinal cells. *Toxicology in Vitro* 29: 1006-11.
- Satsu, H., Ishimoto, Y., Nakano, T., Mochizuki, T., Iwanaga, T., & Shimizu, M. (2006). Induction by activated macrophage-like THP-1 cells of apoptotic and necrotic cell death in intestinal epithelial Caco-2 monolayers via tumor necrosis factor-alpha. *Experimental Cell Research* 312(19): 3909-19.
- Serrelli, G., Melis, M, P., Zodio, S., Naitza, M, R., Casula, E., Peñalver, P., Lucas, R., Loi, R., Morales, J, C. et Deiana, M. Altered paracellular permeability in intestinal cell monolayer challenged with lipopolysaccharide: *Modulatory effects of pterostilbene metabolites*, *Food and Chemical Toxicology* 145(1): 111729.

Sonnier, D. I., Bailey, S. R., Schuster, R. M., Lentsch, A. B. et Pritts, T. A. (2010). TNF- α Induces Vectorial Secretion of IL-8 in Caco-2 Cells. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 6(1): 431.

Varilek, G. W., Neil, G. A., et Bishop, W. P. (1994). Caco-2 cells express type I interleukin-1 receptors: ligand binding enhances proliferation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 267(6): G1101-G1107.

Vitkus, S. J. D., Hanifin, S. A., et McGee, D. W. (1998). Factors affecting Caco-2 intestinal epithelial cell interleukin-6 secretion. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* 34(8): 660-4.

Wang, D., Dubois, R. N. et Richmond, A. (2009). The role of chemokines in intestinal inflammation and cancer. *Current opinion in pharmacology* 9(6): 688-96.

Zuo, L., Wei-Ting, K. et Turner, J. R. (2020). Tight Junctions as Targets and Effectors of Mucosal Immune Homeostasis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 10(2): 327-40.