

# Thèse de Doctorat

Laëtitia KERMARREC

Laëtitia KERMARREC

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Biologie  
Spécialité : Neurogastroentérologie  
Unité de recherche : U913

Soutenue le 26 février 2016

## *Etude des interactions entre le Système Nerveux Entérique et le Système Immunitaire en conditions physiologique et pathologique*

### JURY

Rapporteurs : **Brigitte LE MAUFF**, PhD, PU-PH, Inserm U643, Caen  
**Serge NATAF**, PhD, PU-PH, Laboratoire CarMeN, Inserm 1060, Lyon

Directeur de Thèse : **Philippe NAVEILHAN**, PhD, CR, HDR, Inserm U913, Nantes

Co-directeur de Thèse : **Isabelle NEVEU**, PhD, CR, Inserm U913, Nantes



*Merci à toi Nicoletta pour ton soutien et ta gentillesse. Merci aussi pour toutes nos discussions et ton humour !*

*Merci à Thomas pour nos discussions plus ou moins sérieuses, tes conseils scientifiques et tes blagues... parfois un peu spéciales mais qui nous ont toujours permis de bien décompresser !*

*Merci à Tiphaine pour ta bonne humeur et tes bonnes idées de resto et d'activités extra-labo.*

*Merci à Camille pour nos aventures viennoises ! Tu es imbattable à l'extermination de polypes virtuels !*

*Merci à tous les autres thésards : merci à Anne pour ta vitalité et ta joie de vivre, merci au nouveau Captain America, Aurélien, pour ton humour et ta participation à la bonne ambiance dans le bureau, merci à la petite fabricante de bijoux Charlene pour ta sympathie et ta bonne humeur, merci à Lucie pour ton dynamisme et ta sympathie. Merci également à Emilie, Simon et Anne-Gaëlle pour leur participation à l'ambiance générale.*

*Je tiens également à remercier tous les stagiaires qui ont travaillé à mes côtés et qui ont contribué à ce travail : merci à Julie, Anaïs, Erwan et Jacques. Merci aussi à Elodie et Alice pour nos franches rigolades, ainsi que tous les autres stagiaires avec qui j'ai passé de bons moments.*

*D'une manière plus générale je remercie ma famille et mes amis. Merci à mes parents pour leur aide et de m'avoir donné les moyens de concrétiser mes choix d'orientation. Merci à Roselyne, ma « deuxième maman » pour tous ses précieux encouragements et son affection. Je remercie également mon frère et ma belle-sœur pour nos soirées détente ! Merci à mes amis pour tous nos moments passés ensemble et nos fous rires qui font changer les idées, mais aussi, pour ceux qui sont plus loin, pour tous les messages et mails qu'on s'échange et qui font toujours du bien ! J'adresse un remerciement tout particulier à Axel, mon ami de longue date, qui m'a toujours encouragé depuis que je le connais. Merci pour ton positivisme et de m'avoir montré que j'étais capable. Un merci particulier aussi à José et Yann qui ont toujours su me faire rire. Enfin un immense merci à toi Anthony de m'avoir toujours soutenu depuis qu'on se connaît, pour toutes tes attentions à mon égard et pour ton amour constant quel que soit mes états d'âme.*

# Sommaire

<b>Liste des abréviations</b>	<b>1</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>4</b>
<b>Etude bibliographique</b>	<b>9</b>
<hr/>	
<b>I- Le système nerveux entérique</b>	<b>9</b>
I-1- Organisation	9
I-2- Développement	11
I-3- Fonctions du SNE	13
I-3-1- Contrôle de la motilité gastrointestinale	14
I-3-1-1- Cas de l'intestin	14
I-3-2- Contrôle de la muqueuse intestinale et du mouvement des fluides	16
I-3-3- SNE et système endocrine	19
I-4- Connexion entre le SNE et le SNC	19
I-4-1- Fibres afférentes	19
I-4-2- Fibres efférentes	20
I-5- Les cellules du SNE	22
I-5-1- Les neurones entériques	22
I-5-1-1- Les neurones afférents primaires intrinsèques	24
I-5-1-2- Les interneurones	25
I-5-1-3- Les neurones moteurs	25
I-5-2- Les CGE	27
I-5-2-1- Classification et localisation des CGE	27
I-5-2-2- Fonctions des CGE dans le SNE	28
I-5-2-3- Les CGE et l'inflammation	32
<b>II- Le système immunitaire du Tube digestif</b>	<b>35</b>
II-1- Caractéristiques générales du système immunitaire	35
II-1-1- Immunité naturelle et adaptative	35
II-1-2- Cellules du système immunitaire inné	36
II-1-3- Cellules du système immunitaire adaptatif	40

II-1-3-1- Les lymphocytes	40
II-1-3-2- Les cellules présentatrices d'antigène	47
II-1-3-3- Les mastocytes	48
II-1-3-4- Les éosinophiles	48
II-1-3-5- Les cellules Natural Killer	49
II-2- Le système immunitaire du tractus intestinal	49
II-2-1- Les plaques de Peyer	50
II-2-2- La lamina propria	51
II-2-3- Les lymphocytes intra-épithéliaux	53
II-2-4- Migration des lymphocytes intestinaux	55
II-2-5- Les immunoglobulines dans la muqueuse intestinale	56
<b>III- Les cytokines</b>	<b>58</b>
III-1- Historique	58
III-2- Classification et propriétés des cytokines	59
III-3- Récepteurs des cytokines	63
<b>IV- Les maladies inflammatoires chroniques intestinales</b>	<b>65</b>
IV-1- Symptômes principaux	65
IV-2- Diagnostic	66
IV-3- Répartition	66
IV-4- Etiologie des MICI	69
IV-4-1- Facteurs environnementaux	69
IV-4-2- Facteurs génétiques	70
IV-4-2-1- Formes génétiques spécifiques	71
IV-4-3- Facteurs immunitaires	73
IV-4-3-1- Réponse humorale : autoanticorps et réponse altérée	73
IV-4-3-2- Réponse immunitaire cellulaire	75
IV-4-3-3- Potentiels mécanismes d'action	75
IV-4-3-4- Complexes immunitaires et système du complément	76
IV-4-3-5- Médiateurs solubles	76
<b>V- L'interleukine-7 : un rôle dans les MICI ?</b>	<b>79</b>

V-1- L'interleukine-7	79
V-2- Le récepteur à l'IL-7	81
V-3- Les fonctions biologiques de l'IL-7	84
V-4- Les fonctions biologiques des isoformes d'IL-7	88
V-5- L'IL-7 dans la paroi intestinale	90
V-5-1- Impact sur les cellules immunes de l'intestin	90
V-5-2- Implication de l'IL-7 dans les MICI	92

## **TRAVAIL DE THESE**

---

### **Objectif de la thèse** **95**

#### **- Premier article – (en rédaction)**

Expression des transcrits de l'IL-7 et des sous-unités du récepteur IL-7R $\alpha$  et  $\gamma$ c dans des biopsies de patients atteints de MICI

**Introduction article 1** **96**

**Discussion article 1** **98**

#### **- Deuxième article - (en rédaction)**

Expression et régulation de l'IL-7 dans l'intestin de rat : détection de nouveaux variants d'épissage dans les CGE

**Introduction article 2** **102**

**Discussion article 2** **103**

#### **- Troisième article - (soumis)**

Impact des CGE sur la prolifération des lymphocytes T

**Introduction article 3** **112**

**Discussion article 3** **113**

---

**DISCUSSION ET PERSPECTIVES** **112**

**BIBLIOGRAPHIE** **115**

**PARTICIPATION À DES TRAVAUX TIERS**

---

**Article 4 (soumis)** **153**

Le développement post-natal du réseau glial myentérique et sa modulation par le butyrate

**Article 5 (publié)** **193**

Contrôle local de la réponse immunitaire de l'hôte par les cellules souches mésenchymateuses : perspectives pour la xénotransplantation intracérébrale fonctionnelle



## Liste des abréviations

<b>5ASA</b>	5-aminosalicylate
<b>5-HT</b>	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
<b>15dpGJ2</b>	15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2
<b>aa</b>	Acides aminés
<b>ACh</b>	Acétylcholine
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>AH</b>	After Hyperpolarization
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ATP</b>	Adénosine tri-phosphate
<b>BEI</b>	Barrière épithéliale intestinale
<b>C</b>	Complément
<b>CCN</b>	Cellules de la crête neurale
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CEI</b>	Cellules épithéliales intestinales
<b>CGE</b>	Cellule gliale entérique
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CMM</b>	Complexe myoélectrique migratoire
<b>CPA</b>	Cellule présentatrice d'antigène
<b>EDN3</b>	Endothéline 3

<b>EdnRB</b>	Endothelin receptor B
<b>GALT</b>	Gut-associated lymphoid tissue
<b>GDNF</b>	Glial derived neurotrophic factor
<b>GFAP</b>	Glial fibrillary acidic protein
<b>GLP</b>	Glucagon like peptide
<b>IEL</b>	Intra-epithelial lymphocyte
<b>IFN</b>	Interféron
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IPAN</b>	Intrinsic primary afferent neuron
<b>JAK</b>	Janus kinase
<b>kb</b>	kilo bases
<b>kDa</b>	kilo Dalton
<b>LPL</b>	Lamina propria lymphocyte
<b>LTB4</b>	Leucotriène B4
<b>MALT</b>	Muqueuse-associated lymphoid tissue
<b>MC</b>	Maladie de Crohn
<b>MICI</b>	Maladie inflammatoire chronique intestinale
<b>NK</b>	Natural killer
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>NOD2</b>	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
<b>NOS</b>	Nitric oxide synthase
<b>PGE2</b>	Prostaglandie E2

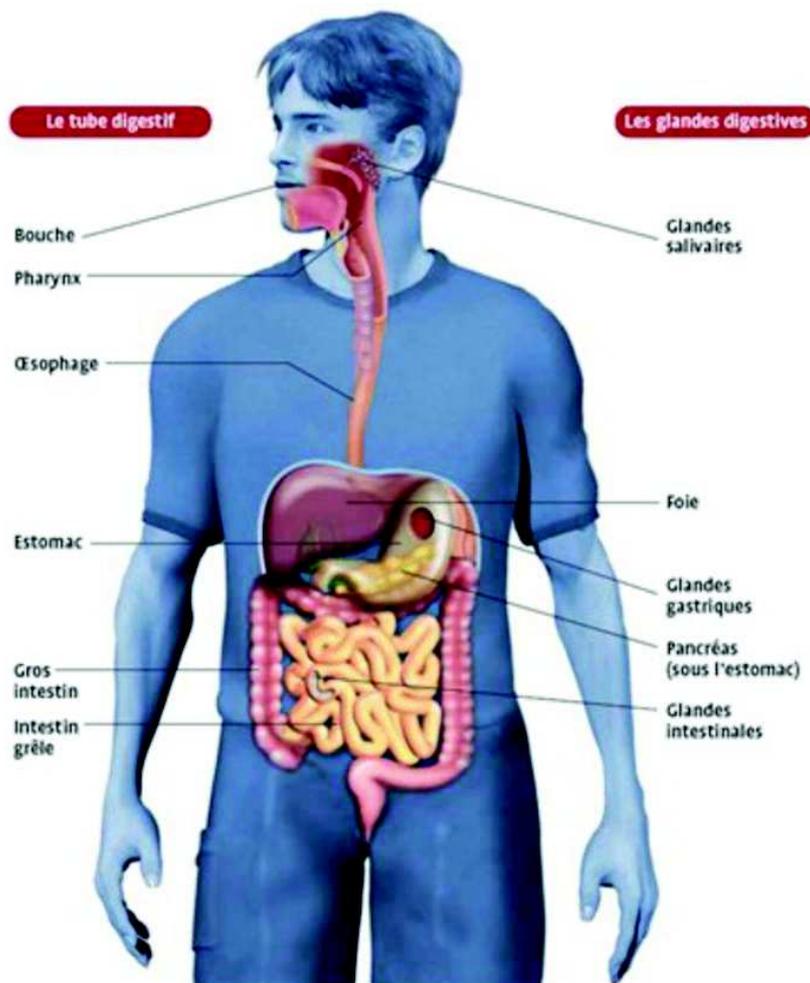
<b>PNH</b>	Progénitrice neurale humaine
<b>RAG</b>	Recombination activating gene
<b>RCH</b>	Rectocolite hémorragique
<b>S</b>	Synaptic
<b>S100β</b>	S100 Ca <sup>2+</sup> binding protein beta
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodécyl sulphate- poly-acrylamide gel electrophoresis
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>SNE</b>	Système nerveux entérique
<b>SNP</b>	Single nucleotide polymorphisms
<b>STAT</b>	Signal transducer and activators of transcription
<b>TCR</b>	T cell receptor
<b>TD</b>	Tube digestif
<b>TGFβ</b>	Transforming growth factor beta
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TNFα</b>	Tumor necrosis factor alpha
<b>TSLP</b>	Thymic stromal lymphopoietin
<b>VIP</b>	Peptide vasoactif intestinal
<b>ZO-1</b>	Zonula occludens 1

# **INTRODUCTION GENERALE**

## **Introduction générale**

L'appareil digestif a un rôle crucial chez tous les organismes vivants. C'est lui qui permet l'assimilation des aliments destinés à apporter tous les éléments indispensables au fonctionnement des cellules et donc à la survie de l'organisme. Cet apport est continu bien que les repas soient ponctuels. Ceci s'explique par la capacité de l'appareil digestif à maintenir les aliments en réserve.

L'appareil digestif se compose des organes du tube digestif (TD) et des organes annexes au TD (glandes salivaires, pancréas, etc.) (Fig.1).

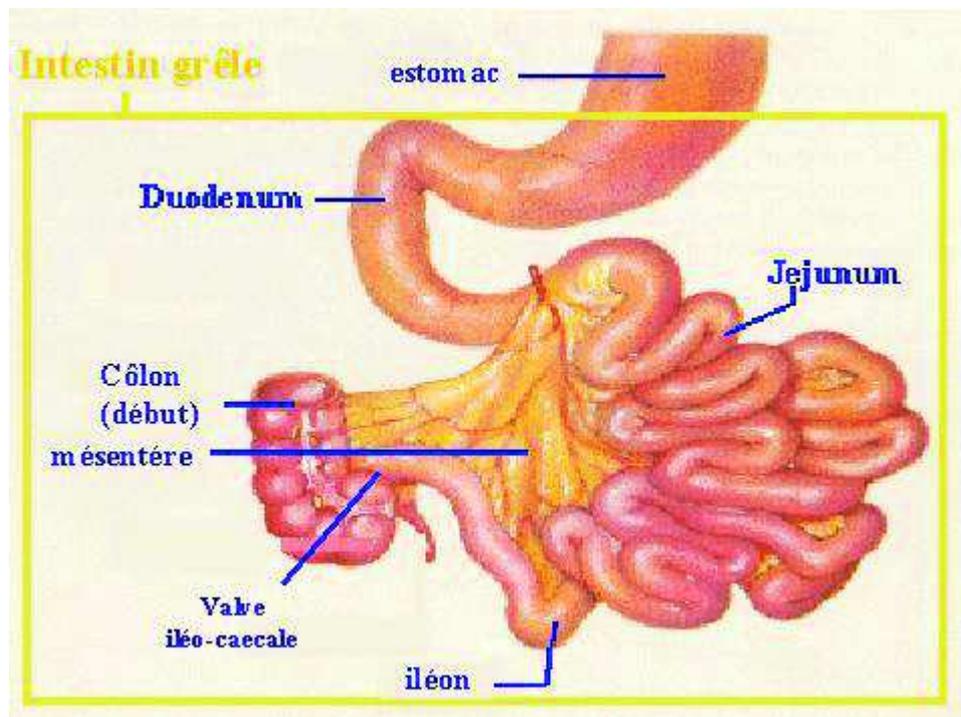


*Figure 1 : L'appareil digestif chez l'Homme. L'appareil digestif humain est composé des organes du tube digestif (à gauche) et des glandes digestives associées (à droite).*

Le TD débute par l'œsophage. C'est l'organe qui conduit les aliments de la bouche à l'estomac. Il débute au niveau de l'extrémité inférieure du pharynx et descend jusqu'à l'estomac dans l'abdomen, sur lequel il s'ouvre par un orifice équipé d'un sphincter appelé cardia.

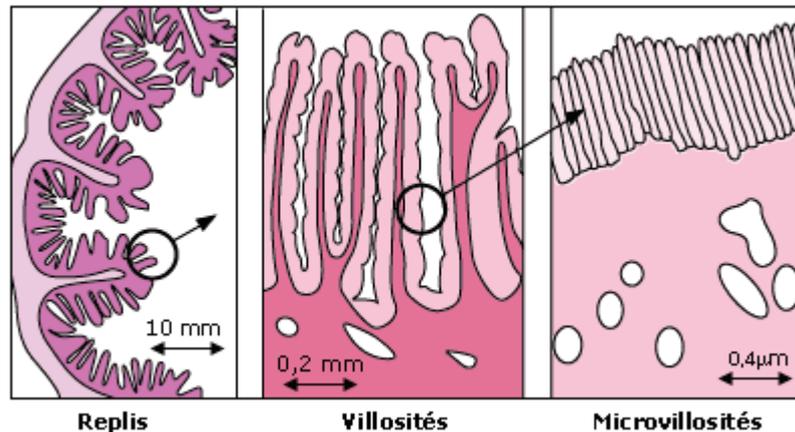
L'estomac fait suite à l'œsophage juste sous le diaphragme. Il forme une poche dont l'extrémité supérieure est dilatée (*grosse tubérosité*) et contient l'air dégluti au cours des repas. La partie inférieure de l'estomac est plus effilée et forme un coude avec la *grosse tubérosité* : c'est l'*antre*. L'*antre* est fermé à son extrémité par le pylore et débouche sur l'intestin.

L'intestin se compose de deux parties : l'intestin grêle, ou petit intestin, et le colon, encore appelé gros intestin. L'intestin grêle est l'organe le plus long du TD : il peut faire jusqu'à 7 mètres de long chez l'adulte. Il comprend trois parties qui sont le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Fig.2).



*Figure 2* : Composition de l'intestin grêle. L'intestin grêle comporte trois parties qui sont le duodénum, le jéjunum et l'iléon.

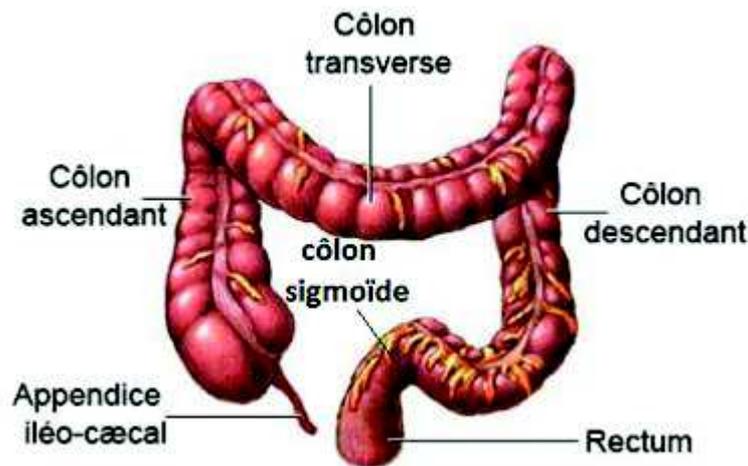
Sa surface interne est également très étendue : on l'estime à 200 m<sup>2</sup>. Ceci est possible grâce à la présence de très nombreux replis à l'intérieur surmontés de villosités et microvillosités (Fig.3).



*Figure 3 : Surface interne de l'intestin grêle. L'épithélium interne de l'intestin grêle forme de nombreux replis. Chaque repli est tapissé de nombreuses villosités intestinales elles mêmes surmontées de microvillosités. Cette organisation augmente grandement la surface d'échange entre la muqueuse intestinale et le bol alimentaire dans la lumière intestinale.*

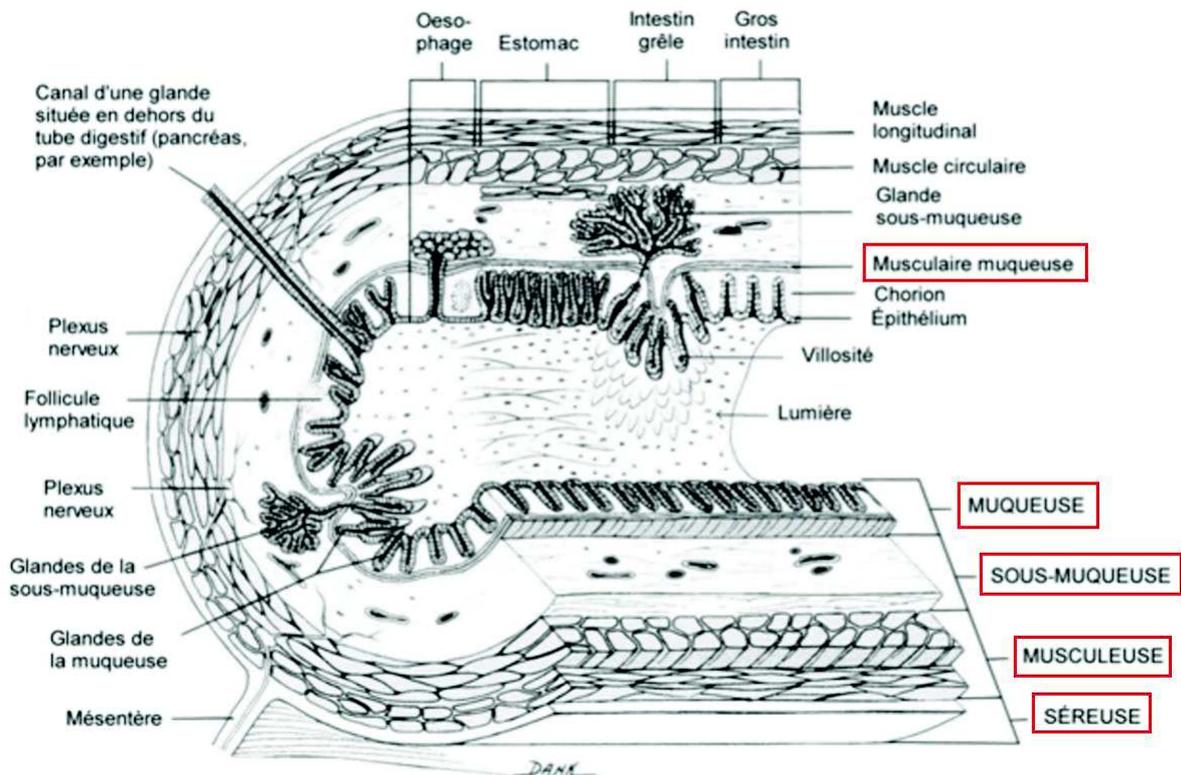
On comprend la présence de ces nombreux replis par la fonction de l'intestin grêle puisque c'est dans cet organe que s'effectue la très grande majorité de l'absorption des nutriments provenant des aliments ingérés et préalablement dégradés dans la bouche et l'estomac. C'est donc un lieu d'échange privilégié, comme l'atteste son importante irrigation.

L'intestin grêle est abouché au côlon par le caecum. Dans le colon, on distingue les parties ascendantes, transverses, descendantes et sigmoïdes (Fig.4). Le colon se termine par un petit réservoir (environ 12 cm) appelé rectum qui débouche sur l'anus. La longueur totale du côlon est d'environ 150 cm chez l'adulte. Sa fonction principale est d'absorber l'eau et les électrolytes mais également de concentrer les matières non digérées.



*Figure 4 : Représentation du colon. Il comporte plusieurs parties à savoir le colon ascendant, le colon transverse, le colon descendant et le rectum.*

Le TD est grossièrement assimilé à un tube creux composé sur toute sa longueur, de cinq couches successives concentriques appelées « tuniques » (Fig.5). La première tunique la plus interne est la muqueuse : elle est composée d'un épithélium et d'un tissu conjonctif sous-jacent nommé chorion ou *lamina propria*. L'épithélium est composé d'une unique couche de cellules épithéliales insérée sur la lame basale. La *lamina propria* contient, quant à elle, un tissu lymphoïde diffus, des follicules lymphoïdes et elle est très riche en vaisseaux sanguins. La deuxième tunique est la musculaire muqueuse qui est en fait une fine couche de muscles lisses. Elle est absente au niveau des deux extrémités du TD, c'est-à-dire sur le premier tiers de l'œsophage et au niveau du canal anal. La troisième couche est la sous-muqueuse : elle est constituée de tissu conjonctif et comporte des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Elle renferme également un plexus nerveux appelé plexus sous-muqueux de Meissner. La quatrième tunique est la musculuse. Elle peut être divisée en deux couches de muscles lisses à savoir la couche musculaire circulaire interne et la couche musculaire longitudinale externe. La musculuse renferme également un plexus nerveux entre les deux couches musculaires appelé le plexus myentérique d'Auerbach. Enfin, la cinquième tunique est appelée tunique externe : elle est soit une adventice, soit une séreuse suivant sa localisation au sein du TD. En effet, on lui donne le nom d'adventice aux extrémités car elle est constituée d'un tissu conjonctif lâche. Entre les deux extrémités, on lui donne le nom de séreuse car elle est composée d'un tissu conjonctif tapissé d'un épithélium externe simple appelé mésothélium.



*Figure 5: Organisation générale du tube digestif. Il est composé de cinq tuniques concentriques avec, du plus interne au plus externe : la muqueuse, la musculaire muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse ou adventice en fonction de la localisation dans le TD. Chaque tunique possède des particularités.*

En plus de cette organisation générale, chaque étage du TD a des caractéristiques histologiques particulières liées à leurs fonctions au sein du système digestif.

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I – Le Système Nerveux Entérique**

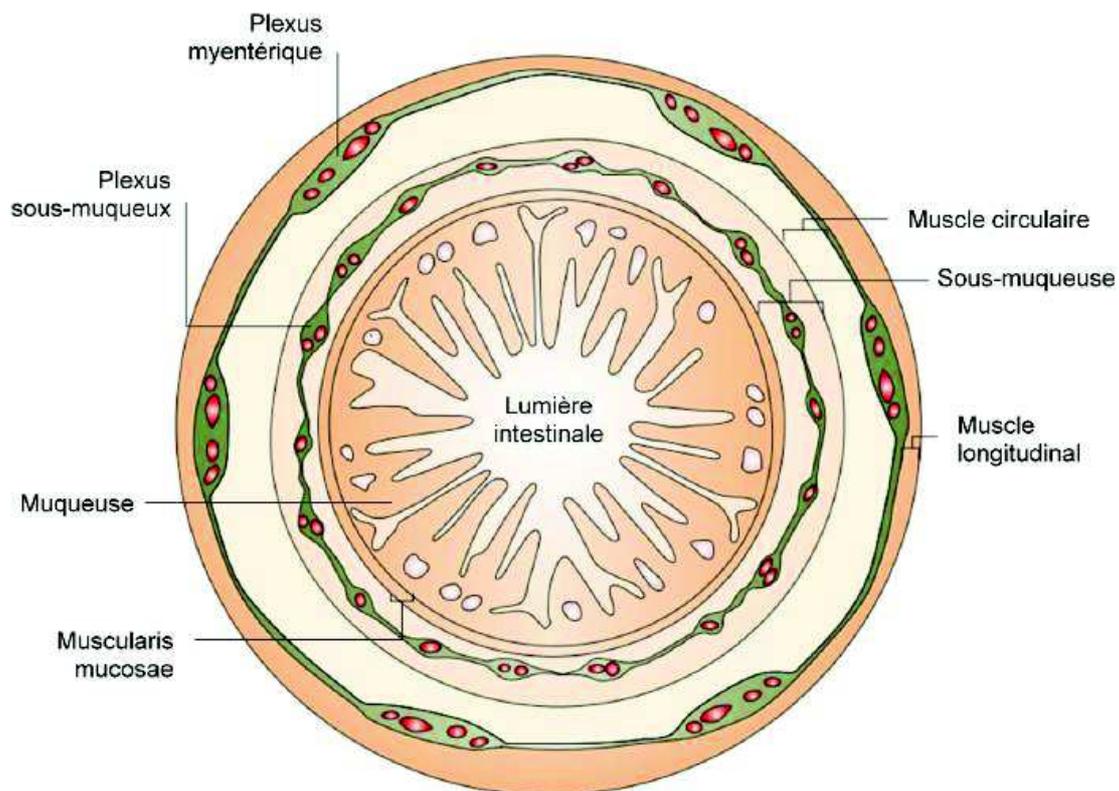
### **I-1- Organisation**

La présence de plexus nerveux dans la paroi du tractus digestif a été rapportée pour la première fois en 1857 par Georg Meissner, un anatomiste et physiologiste allemand, qui a décrit le plexus sous-muqueux (Plexus de Meissner) ; puis en 1864 par Leopold Auerbach, un anatomiste et neuropathologiste allemand qui a décrit le plexus myentérique (Plexus d'Auerbach) (Timmermans et al., 1997a). Dans son ouvrage daté de 1921, John Newport Langley, un physiologiste britannique, définit le système nerveux entérique (SNE) comme une troisième composante indépendante du système nerveux autonome, et non plus comme un simple relais post-ganglionnaire du système nerveux parasympathique (Hansen, 2003). C'est lui qui proposa le terme de « système nerveux entérique » pour décrire les éléments neuronaux retrouvés au sein de la paroi intestinale (Brehmer et al., 1999). Malgré l'importance de ces découvertes, elles finissent par tomber dans l'oubli. Ce n'est que 50 ans plus tard que se manifeste un regain d'intérêt pour la neurobiologie entérique, notamment à travers les travaux de Michael Gershon, un spécialiste d'anatomie et de biologie cellulaire à qui l'on doit le terme de « second cerveau » pour désigner le SNE.

Le SNE se présente sous la forme d'un réseau organisé de ganglions et de fibres nerveuses répartis dans la paroi du tube digestif, depuis le tiers inférieur de l'œsophage jusqu'à l'anus, en passant par les glandes salivaires, le pancréas et la vésicule biliaire (Furness, 2012a; Kirchgessner and Gershon, 1990). Les fibres nerveuses de ce réseau innervent tous les éléments qui composent le tube digestif (TD) (vaisseaux sanguins, muscles, épithélium, etc.) (Gabella, 1979). C'est un système conséquent puisqu'il contient plus de neurones que la moelle épinière, avec plus de 100 millions de neurones de différents types répartis de façon particulière en fonction du segment du TD et de l'espèce étudiés. Il comporte 5 à 10 fois plus de cellules gliales que de neurones. La majorité des neurones et des cellules gliales sont regroupés dans des structures appelées ganglions qui communiquent entre eux par des fibres interganglionnaires (Wedel et al., 1999).

Le SNE s'organise en deux plexus ganglionnaires majeurs, le plexus myentérique (Plexus d'Auerbach) et le plexus sous-muqueux (Plexus de Meissner) (Fig.6). Le plexus myentérique est situé entre la couche musculaire longitudinale (la plus externe) et la couche musculaire circulaire. Il régule principalement les fonctions de motricité (Hansen, 2003). Le plexus sous-

muqueux se trouve quant à lui, dans la sous-muqueuse, entre la couche musculaire circulaire et la muqueuse. Particulièrement développé dans l'intestin, il régule les fonctions de sécrétion et d'absorption de la muqueuse intestinale, ainsi que les interactions avec le système immunitaire (Hansen, 2003). Chez les grands mammifères, le plexus sous-muqueux est en réalité, composé de plusieurs couches (Timmermans et al., 1997a) : un réseau plus interne, côté muqueuse, qui est le plexus de Meissner; et un plexus plus externe, adjacent à la couche musculaire circulaire, qui est le plexus de Schabadasch (ou Henle). Chez l'Homme, on distingue un troisième plexus intermédiaire qui fait le lien entre les plexus de Meissner et de Schabadasch (Hoyle and Burnstock, 1989; Ibba-Manneschi et al., 1995). Dans le SNE, il existe également des plexus aganglionnaires. Par exemple au sein de la muqueuse où l'on observe un réseau nerveux plus diffus.



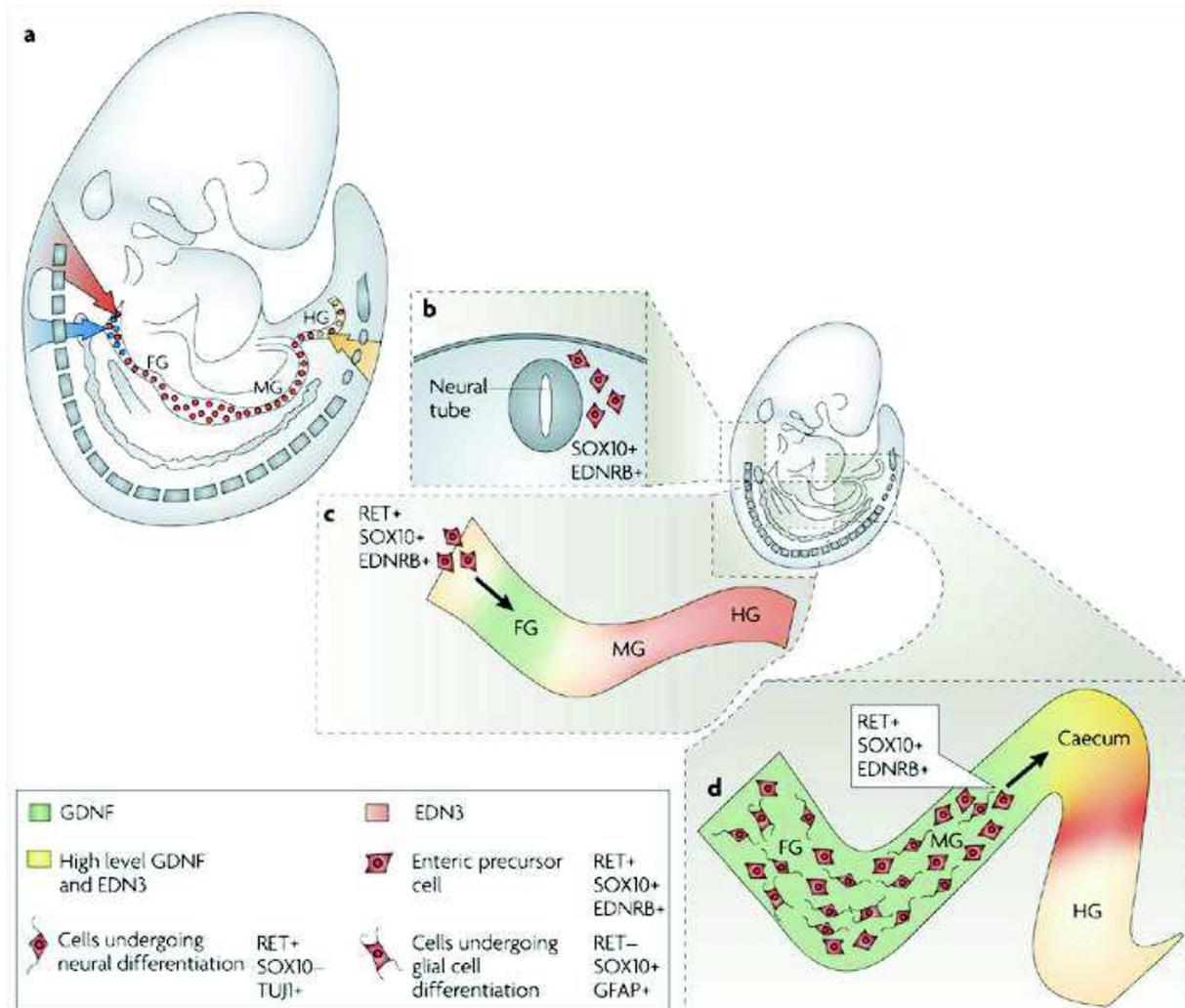
*Figure 6 : Représentation schématique d'une coupe transversale de l'intestin grêle mettant en évidence l'organisation du SNE : le plexus myentérique situé entre la couche musculaire longitudinale et circulaire de la musculature, et le plexus sous-muqueux entre la couche musculaire circulaire et la muqueuse (en gris). Adapté de (Heanue and Pachnis, 2007).*

## **I-2- Développement**

Le tractus digestif se forme à partir d'un tube intestinal primitif qui se met en place rapidement au cours du développement : celui-ci se compose d'un endoderme, qui donnera par la suite la partie interne épithéliale, et d'un mésoderme splanchnique, qui donnera les muscles lisses. Au cours du développement, les cellules précurseurs multipotentes dérivées de la crête neurale du neuro-ectoderme envahissent le tractus digestif (Fig.7). Elles envahissent la partie la plus antérieure du tractus et migrent ensuite dans le sens rostro-caudal pour finalement coloniser la totalité du tractus. Quand les cellules de la crête neurale envahissent le tractus, elles deviennent des progéniteurs du SNE et sont appelées cellules de la crête neurale (CCN) entérique. Progressivement, elles s'organisent en plexus pour former le SNE. Tous les neurones et les CGE dérivent des CCN et la majorité des cellules du SNE dérivent du segment antérieur vagal : divers sous-types de ces cellules viennent former les différentes régions du TD. Des cellules dérivées de deux autres régions contribuent dans une plus faible proportion à la colonisation du tractus digestif : la région rostro-troncale qui se superpose au segment vagal dans la colonisation de l'œsophage et de la partie antérieure de l'estomac, et la région sacrée de la crête neurale dont les cellules migrent plus tardivement que dans les premières régions citées, dans le sens caudo-rostral pour coloniser l'intestin post-ombilical (Burns et al., 2004a; Gershon, 1998; Young and Newgreen, 2001). La colonisation du TD débute dès la septième semaine chez l'Homme (Burns et al., 2004b). La migration de ces cellules est possible grâce à des facteurs neurotrophiques, comme le « glial derived neurotrophic factor » (GDNF) par exemple, qui est plus fortement sécrété dans les régions précédents le front de migration des CCN (Natarajan et al., 2002). Une perte de fonction du gène *Ret* qui code pour une sous-unité du récepteur au GDNF est l'une des causes de la maladie de Hirschprung dans 5 à 50% des cas (Newgreen and Young, 2002). Cette perte de fonction est plus fréquente dans les formes familiales que sporadiques. D'autres gènes comme ceux codant pour l'endothéline récepteur B (*EdnRB*) (Carrasquillo et al., 2002) ou l'endothéline 3 (*EDN3*) (Hosoda et al., 1994) seraient en cause dans l'aganglionose du côlon terminal.

Les CCN commencent à se différencier en neurones entériques ou en cellules gliales entériques (CGE) dès le début de leur migration (Young et al., 2003a). Leur différenciation est coordonnée par un ensemble de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Parmi les facteurs intrinsèques, on trouve *Mash-1* et *Sox-10* qui sont respectivement impliqués dans le développement des neurones sérotoninergiques (Blaugrund et al., 1996) et dans la

différenciation des CGE (Kelsh, 2006). Au cours de leur migration, les neurones et les CGE acquièrent un phénotype particulier grâce à ces facteurs, mais ils doivent également recevoir d'autres signaux pour acquérir une localisation correcte. La formation du plexus sous-muqueux est par exemple, coordonnée par les netrines et leurs récepteurs présents au sein de la muqueuse intestinale (Jiang et al., 2003).



*Figure 7 : Ontogénèse du système nerveux entérique. Au stade embryonnaire 8.5-9 chez la souris, les cellules de la crête neural du segment vagal envahissent la partie antérieure du tractus digestif (flèche rouge) et migrent dans le sens rostro-caudal pour coloniser tout le tube digestif et donner la majorité du SNE. La colonisation est complète au stade 15.5 de l'embryon. Les cellules de deux autres régions viennent compléter la colonisation du tractus digestif : les cellules du segment rostro-troncal au niveau de l'œsophage et la partie antérieure de l'estomac (flèche bleue), et la région sacrée de la crête neurale au niveau de l'intestin post-ombilical en suivant une migration caudo-rostrale cette fois-ci (flèche jaune).*

*EDNRB et sox-10 sont exprimés par les cellules de la crête neurale vagale lorsqu'elles migrent vers le tractus (c). Le ligand de l'EDNRB (EDN3) est exprimé dans l'intestin moyen et postérieur (rose). A partir du 9<sup>ème</sup> jour, les cellules de la crête neurale migrantes expriment le gène Ret dont le ligand (GDNF) est présent dans l'estomac (vert). Au stade E11 (d), EDN3 et GDNF sont fortement exprimés dans le caecum (jaune) et les cellules qui précèdent le front de migration commencent à se différencier (Heanue and Pachnis, 2007).*

### **I-3- Fonctions du SNE**

C'est au début du XX<sup>ième</sup> siècle, en Angleterre, que le rôle fonctionnel du SNE fût mis en évidence pour la première fois chez le chien par William Bayliss et Ernest Starling (Bayliss, W.M., and Starling, E.H, 1900). Ils observèrent notamment que l'introduction d'un bolus solide dans une anse intestinale isolée de chien entraînait un réflexe ascendant de contraction propulsant ainsi le bolus côté anal (Bayliss, W.M., and Starling, E.H, 1900). Ils énoncèrent alors le principe connu sous le nom de la « Loi de l'intestin » selon lequel une stimulation, mécanique, chimique ou électrique, induit une contraction des muscles en amont du bolus sur 2-3 cm (côté oral), et une relaxation en aval sur 6-7 cm (côté anal). Ils montrèrent que ce réflexe entérique coordonné était contrôlé par le SNE et plus particulièrement par le plexus d'Auerbach. Au début du XX<sup>ième</sup> siècle, Paul Tredelengurg, un pharmaco-toxicologiste allemand, fit le même constat sur le porc en observant que l'intestin de l'animal continuait à se contracter même une fois séparé du corps (Papillon and Rambert, 2014). La présence d'une innervation intrinsèque autonome que les scientifiques soupçonnaient déjà, devint désormais claire. Elle sera confirmée en 1905 par John Newport Langley et Rudolf Magnus, un pharmaco-physiologiste allemand, qui montrèrent la persistance des contractions intestinales après la dégénérescence des nerfs mésentériques. John Newport Langley étudia par la suite le fonctionnement neurochimique du SNE avec l'effet de la nicotine notamment (Hansen, 2002). Plus tard, les travaux de John Furgess et Marcello Costa sur l'identification de neuromessagers produits et utilisés par l'appareil digestif, et bien d'autres travaux, ont vu le jour grâce à l'avancée de techniques comme l'électrophysiologie ou la neuropharmacologie.

Le SNE a de multiples fonctions au sein du tractus gastro-intestinal. Il contrôle la motricité, les échanges de fluides entre la lumière intestinale et le compartiment interne, le flux sanguin et le passage des nutriments. Il contribue également au maintien de l'intégrité de la barrière

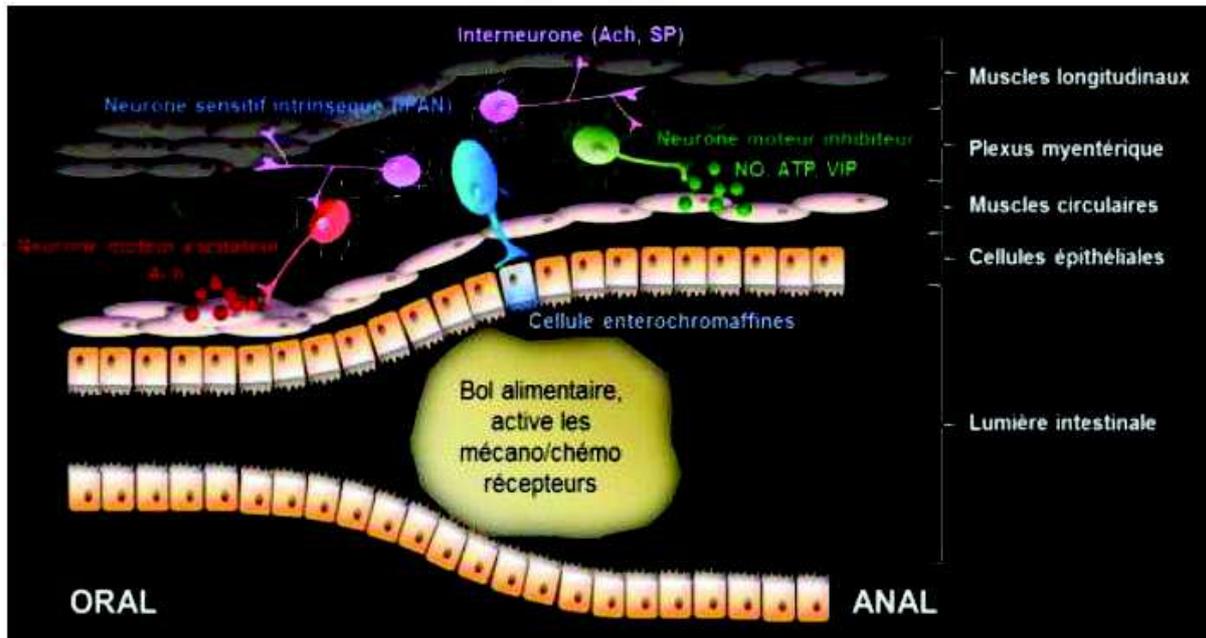
épithéliale intestinale (BEI) (Savidge et al., 2007a; Toumi et al., 2003). Pour assurer ses fonctions le SNE interagit avec d'autres systèmes comme le système endocrine et le système immunitaire intestinal (Furness J.B., 2007). L'importance du SNE est mise en évidence lorsqu'il y a effondrement d'une ou plusieurs de ses fonctions, qui provoque l'apparition d'une neuropathie. On en distingue différents types à savoir les neuropathies congénitales ou développementales, sporadiques et acquises, ou encore les neuropathies associées c'est-à-dire qui se déclarent secondairement à une autre pathologie, et enfin les neuropathies iatrogènes ou induite par les effets d'un médicament.

### **I-3-1- Contrôle de la motricité gastrointestinale**

Le SNE participe de manière inégale au contrôle de la motricité gastrointestinale suivant le segment du TD et les circonstances physiologiques. Par exemple, le SNE n'a qu'une fonction auxiliaire dans la motilité de l'œsophage car ces mouvements sont principalement contrôlés par des entrées nerveuses provenant du système nerveux central (SNC), et plus précisément de la zone medulla oblongata. Le SNC participe aussi au contrôle de l'estomac, son volume, sa force de contraction et la sécrétion d'acide via des centres nerveux situés dans le tronc cérébral, et les réflexes oesophagastrique et gastrogastrique (Schubert and Peura, 2008; Hasler, W.L., 2003).

#### **I-3-1-1- Cas de l'intestin**

Le SNE contrôle la majeure partie des contractions de l'intestin (2007b). Celles-ci peuvent être déclenchées par des stimuli mécaniques, comme la distension de la paroi musculaire ou le frottement de la muqueuse, ou par des stimuli chimiques comme l'acidité, les acides aminés, le glucose ou les acides gras (Fig.8). De tels stimuli s'accompagnent d'une libération de médiateurs comme la sérotonine (5-HT) par les cellules entérochromaffines, des cellules neuroendocrines dispersées dans l'épithélium digestif. La sérotonine va alors activer les neurones afférents primaires intrinsèques (IPANs; Intrinsic Primary Afferent Neuron) décrit plus loin, qui vont communiquer l'information aux autres types de neurones. Les cellules interstitielles de Cajal sont des cellules pacemakers électriquement couplées aux cellules musculaires : elles ont un rôle important dans le mouvement intestinal. Organisées en réseau entre les cellules musculaires et les fibres nerveuses, elles génèrent des ondes lentes de contraction. Les médiateurs du SNE libérés dans leur voisinage vont faire varier leur potentiel membranaire qu'elles vont ensuite transmettre aux cellules musculaires lisses (Ward, 2000).



*Figure 8 : Représentation schématique du réflexe péristaltique dans l'intestin. Le passage du bol alimentaire stimule les cellules entérochromaffines qui sécrètent alors la sérotonine. La molécule va alors activer les IPANs qui vont à leur tour libérer différents médiateurs comme l'acétylcholine, permettant ainsi de communiquer l'information aux autres types de neurones. Les cellules de Cajal ne sont pas représentées sur ce schéma.*

## L'intestin grêle

Le SNE contrôle l'ensemble des mouvements de l'intestin grêle. Cet ensemble comprend les mouvements de propulsion orthograde du contenu luminal (péristaltisme), le mixage des aliments (segmentation), la lente propulsion orthograde (complexe myoélectrique migratoire CMM), et enfin la rétropulsion, c'est-à-dire l'expulsion des substances nocives (Ehrlein, 1981; Hasler, W.L., 2003; Lang, 2015). Le CMM traverse l'intestin grêle périodiquement entre les repas (Wingate, 1981) et assure le déplacement du contenu résiduel après la digestion pour limiter la prolifération bactérienne dans ce compartiment (Hasler, W.L., 2003). Pour que le mouvement de l'intestin soit orchestré correctement, le système senseur évalue continuellement l'état du grêle et dirige l'activité des neurones moteurs (2007b).

Le circuit neural est bien caractérisé mais les mécanismes du circuit intégratif grâce auxquels un motif d'activité est converti à un autre reste mal définis. Néanmoins, les signaux générant

les changements de motifs ont été identifiés. Par exemple, les acides gras présents à la surface luminale entraînent une modification du mouvement intestinal qui passe d'un mouvement contractile propulsif à un mouvement de mixage grâce à un mécanisme neural (Gwynne et al., 2004). La conversion d'un mouvement à un autre peut aussi être provoquée par certains médicaments qui ont pour cible les neurones entériques (Ferens et al., 2007; Thomas and Bornstein, 2003).

### **Le colon**

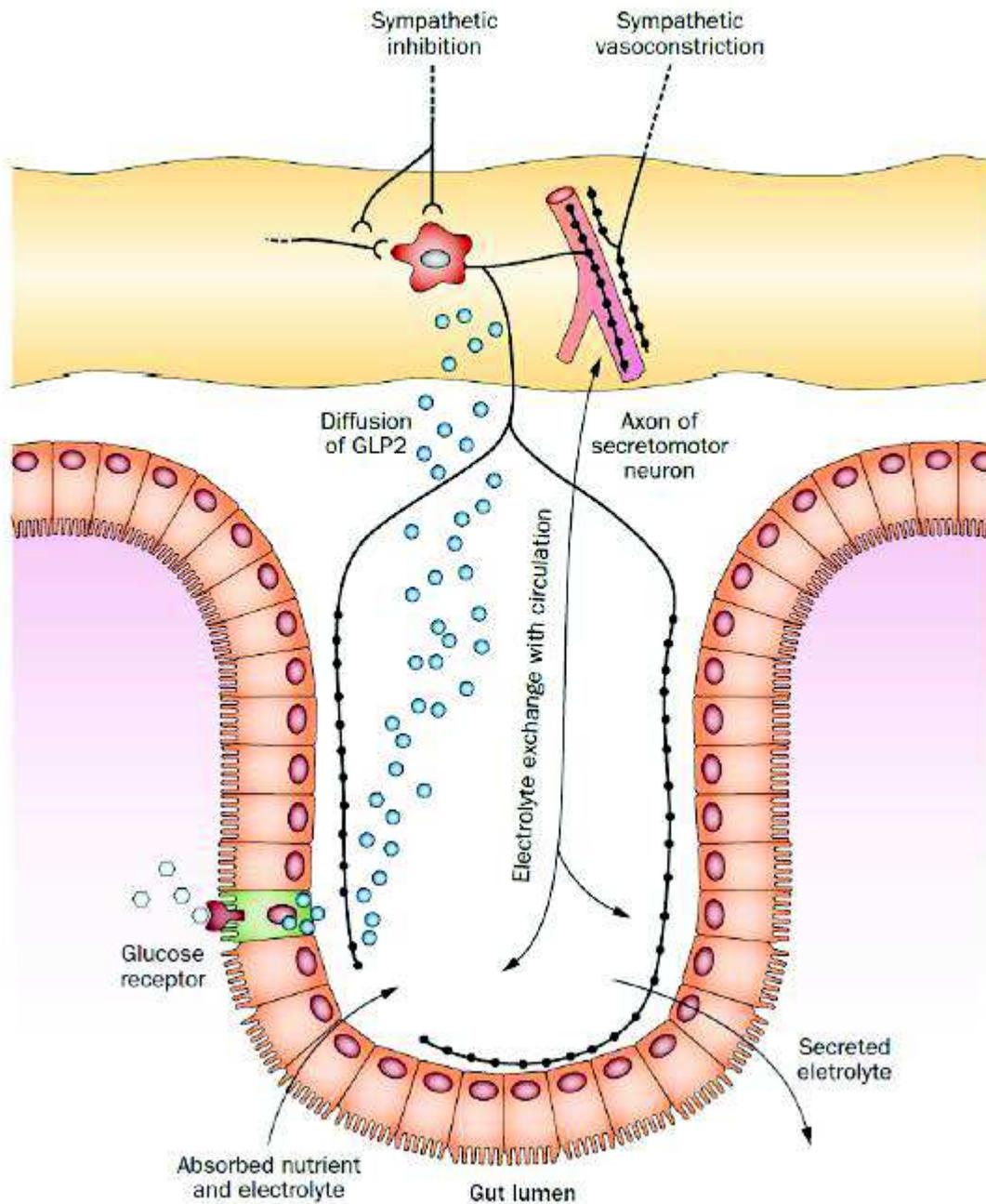
La contraction du colon est dépendante du SNE pour la propulsion du contenu. Elle est impossible dans certaines maladies où le SNE est absent dans le colon distal et le rectum, ce qui est le cas dans la maladie congénitale de Hirschsprung (Swenson, 2002), ou dans la maladie dégénérative de Chagas (Matsuda et al., 2009) par exemple. Des centres de contrôle centraux interviennent néanmoins dans le réflexe propulsif du colon pour maintenir la continence fécale, et la défécation est contrôlée par un centre de défécation située dans la région lombo-sacrée de la moelle épinière directement connecté au SNC (de Groat et al., 1981; Lynch and Frizelle, 2006). Dans des conditions pathologiques, le SNE génère une sécrétion importante de fluides et de larges contractions du muscle circulaire de la paroi intestinale pour expulser les pathogènes (Field, 2003; Mellander et al., 2000; Vallance et al., 1997).

#### **I-3-2- Contrôle de la muqueuse intestinale et du mouvement des fluides**

La muqueuse intestinale, située à l'interface entre le milieu intérieur et le milieu extérieur, a un rôle clef dans l'homéostasie du TD. Elle doit à la fois, permettre le passage d'eau, d'électrolytes et de nutriments, et empêcher le passage d'agents pathogènes ou toxiques. Elle comporte une grande variété de types cellulaires comme les cellules épithéliales, les cellules immunitaires, les cellules musculaires et les cellules nerveuses. La fonction de barrière est assurée par une monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEI) qui sont en constante prolifération et qui sont liées les unes aux autres par des protéines de jonctions serrées (exemple de Zona Occludens 1, ZO-1) et adhérentes (exemple de E-Cadhérine et B-Caténine).

La muqueuse intestinale est très irriguée (80% du flux sanguin) de manière à recevoir l'oxygène et les nutriments nécessaires à ses fonctions d'échange d'eau et de solutés (Furness, 2012b). L'absorption des sucres (monosaccharides) et des acides aminés passe par des transporteurs couplés aux cations (2007c; Wright and Loo, 2000). Le déplacement d'eau et

d'électrolytes de la lamina propria vers la lumière intestinale est assuré par des réflexes entériques déclenchés par l'activation des neurones sécrétomoteurs décrits plus loin. Il résulte de l'activation de deux voies sympathiques, la voie de vasoconstriction et la voie d'inhibition de la sécrétion, qui se déclenchent grâce à des détecteurs du volume et de la pression sanguine (Sjövall et al., 1986; 2007c). Par exemple, la stimulation du récepteur entérique au glucose sur les cellules L entéroendocrines (Shirazi-Beechey et al., 2011; Young, 2011) entraîne la libération d'un groupe d'hormones : le glucagon-like peptide (GLP1 et GLP2), l'oxyntomoduline et le peptide YY (PYY) (Fig.9). En activant les neurones sécrétomoteurs non-cholinergiques, le GLP2 va permettre la libération d'eau et d'électrolytes vers la lumière intestinale (Shirazi-Beechey et al., 2011; Sigalet et al., 2007). Les autres hormones régulent plusieurs fonctions comme la sécrétion des fluides, l'inhibition de la vidange gastrique, l'augmentation de la satiété, la prolifération des cellules épithéliales et la sécrétion d'insuline (Cox, 2007; Estall and Drucker, 2006; Sigalet et al., 2007).



*Figure 9* : Schéma représentant le contrôle neural du déplacement de l'eau et des électrolytes vers la lumière intestinale dans l'intestin grêle. Les fluides contenant des nutriments comme le glucose sont absorbés par la muqueuse intestinale. Le passage des nutriments vers le compartiment interne se fait par des transporteurs couplés aux ions. Les fluides sont ensuite à nouveau excrétés vers la lumière intestinale par un réflexe sécrétomoteur. Sur le schéma est représentée une molécule de glucose qui se lie à son récepteur sur une cellule endocrine de

*type L (vert) et stimule la libération de l'hormone GLP2 qui diffuse dans la lamina propria jusqu'aux neurones sécrétomoteurs qu'elle active (Furness, 2012a).*

### **I-3-3- SNE et système endocrine**

La coopération entre le SNE et le système endocrine du tractus digestif pour assurer les fonctions digestives est connue sous le nom de système endocrine gastroentéropancréatique. Ce système comprend approximativement trente types de cellules endocrines capables de sécréter une centaine de molécules différentes (Rehfeld, 2004). Les neurones senseurs étant séparés de la lumière intestinale par la barrière épithéliale, ce sont les récepteurs exprimés à la surface des cellules entéroendocrines, qui, en fonction du contenu luminal, vont libérer des molécules messagères du côté basolatéral pour activer les neurones senseurs spinaux, entériques et vagues (Bertrand et al., 1997a; Raybould, 2007; Shirazi-Beechey et al., 2011). Le contrôle de la sécrétion gastrique est un bon exemple de l'intégration neurale et endocrine. Par exemple les cellules entéroendocrines de type G présentes au niveau de l'antrum sécrètent la gastrine en réponse au peptide libérant la gastrine (PLG), produit par les neurones entériques qui innervent les cellules G (Furness, 2012a; Schubert and Peura, 2008b).

Dans l'intestin le SNE a donc des voies réflexes essentielles au mouvement des différents segments et à l'échange de fluides entre la lumière intestinale et le compartiment interne. Pour un bon fonctionnement il travaille de concert avec d'autres systèmes comme le système gastroentéropancréatique mais aussi avec le SNC.

### **I-4- Connexion entre le SNE et le SNC**

Le SNE est un système nerveux autonome, capable de fonctionner de manière indépendante, mais il reste néanmoins en communication permanente avec le SNC qui a la capacité de moduler ses activités (Fig.10). L'échange bidirectionnel se fait par l'intermédiaire des voies afférentes et efférentes des systèmes nerveux sympathique (noradrénergique) et parasympathique (cholinergique) (Wood, 1999a).

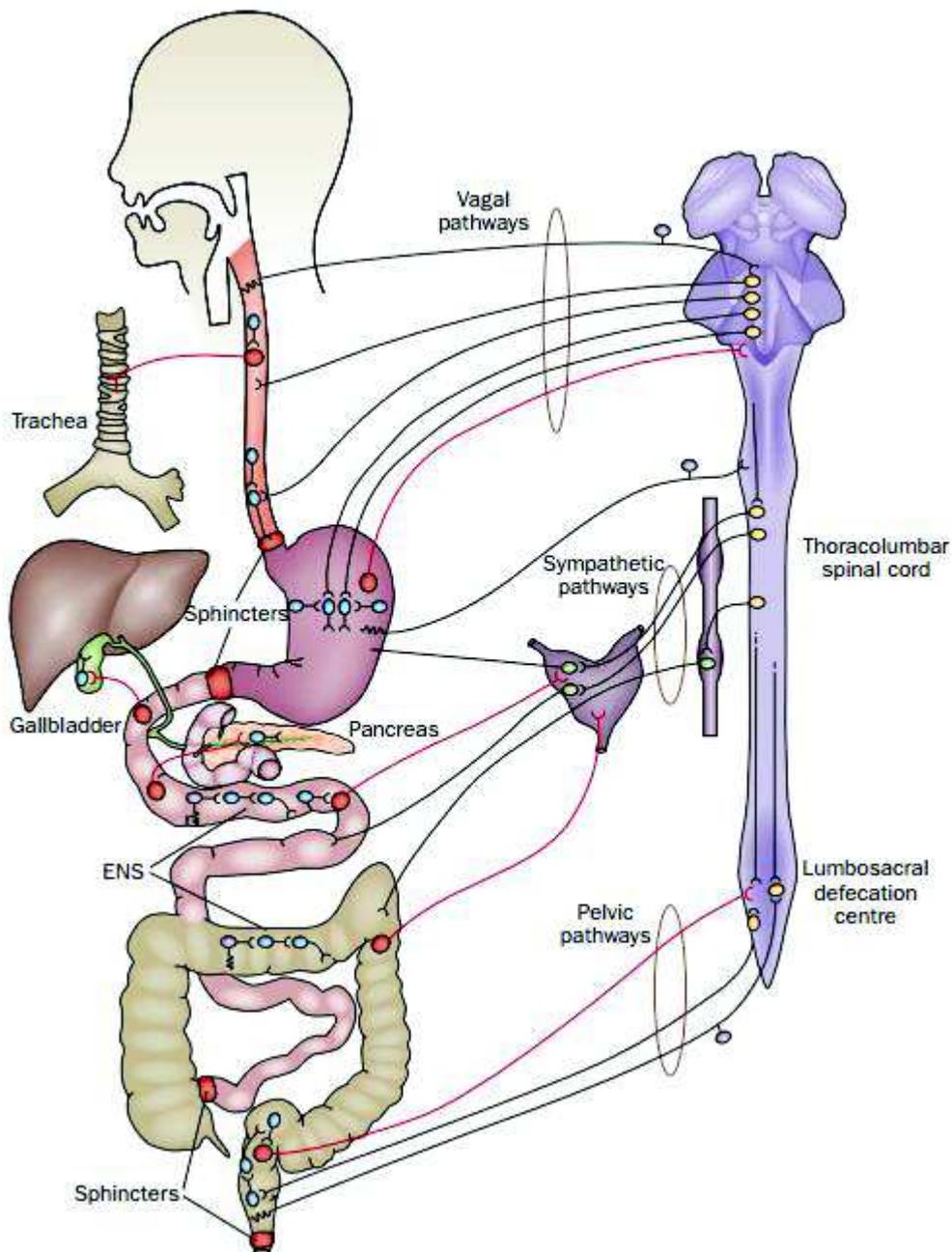
#### **I-4-1- Fibres afférentes**

Les afférences transmettent aux centres nerveux supérieurs les informations sensibles (stimuli chimiques ou mécaniques) (Berthoud and Neuhuber, 2000). La plupart des fibres

afférentes sont démyélinisées. On distingue deux types d'afférences : les afférences vagales, qui sont présentes dans le nerf pneumogastrique (ou nerf vague), et les afférences splanchniques ou spinales que l'on retrouve dans les systèmes sympathique et parasympathique pelviens. Néanmoins elles sont surtout développées dans le nerf vague (Mei et al., 1980). Les extrémités distales ou centrales des afférences viennent s'articuler à différents niveaux (tronc cérébral, moëlle épinière, ganglions sympathiques pré-vertébraux, etc.) pour transmettre l'information aux centres nerveux supérieurs ou directement aux voies efférentes. Les afférences communiquent par l'intermédiaire de nombreux peptides au niveau des extrémités centrales et périphériques des neurones, comme le monoxyde d'azote (NO) par exemple (Salt and Hill, 1983).

#### **I-4-2- Fibres efférentes**

Les voies efférentes transmettent des fonctions motrices. Elles appartiennent aux systèmes sympathique et parasympathique puisque ces voies sont retrouvées dans le nerf sacré et dans le nerf vague. Les voies efférentes sympathiques transmettent les fonctions motrices des parties supérieures du TD, et les voies efférentes parasympathiques les fonctions motrices du colon distal et du rectum (Kirchgessner and Gershon, 1989). Dans les deux systèmes les voies efférentes sont des voies à deux neurones c'est-à-dire qu'elles se composent d'un neurone pré-ganglionnaire qui fait synapse avec un second neurone post-ganglionnaire. Les neurones pré-ganglionnaires viscéromoteurs issus du noyau moteur dorsal du nerf vague qui innervent les plexi myentérique et sous-muqueux font synapse avec les neurones post-ganglionnaires à proximité des organes associés (Hopkins et al., 1996; Walter et al., 2009). En revanche, les fibres sympathiques issues de la corne intermedio-latérale de la moelle épinière font synapse au sein des ganglions paravertébraux et prévertébraux situés à distance des organes associés.



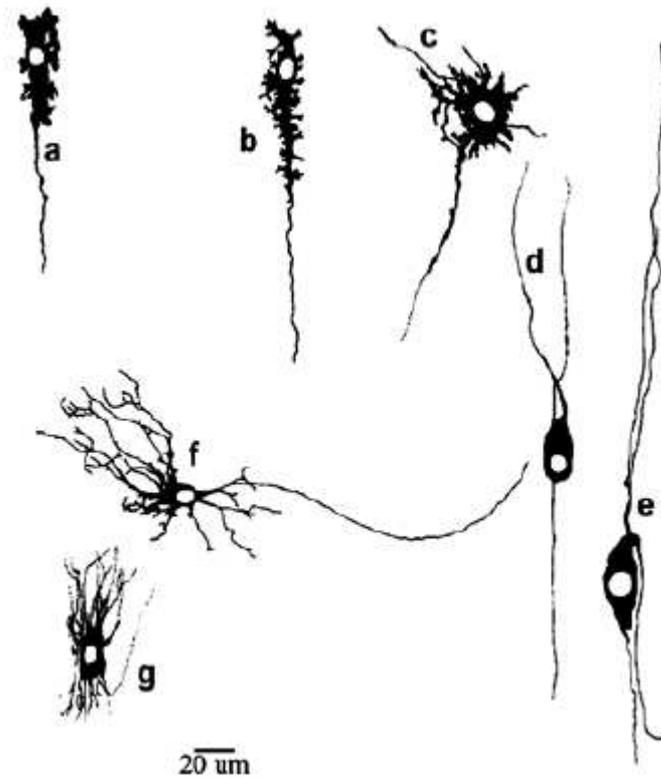
*Figure 10 : Schéma représentant l'innervation du tractus gastrointestinal. Le système digestif contient de nombreux circuits réflexes du SNE (neurones moteurs et interneurons en bleu, neurones senseurs en violet). Les neurones des ganglions sympathiques pré-vertébraux (en vert) reçoivent des entrées du SNE et du SNC. L'information sensitive est transmise au SNE via les IPANs (violet), et au SNC via les neurones afférents primaires extrinsèques (violet également) suivant les voies afférentes spinale et vagale (Furness, 2012a).*

## **I-5- Les cellules du SNE**

Les neurones entériques et les CGE sont les deux types cellulaires qui composent le SNE.

### **I-5-1- Les neurones entériques**

Dans les années 1890, alors que deux théories s'opposent au sujet de l'organisation du système nerveux, Santiago Ramon y Cajal, un histologiste et neurobiologiste espagnol, réfute la théorie selon laquelle le système nerveux est organisé en un réseau continu (« théorie réticulée »). En se basant sur ce premier travail, Waldeyer a ensuite décrit les neurones comme des unités structurelles et fonctionnelles de ce système nerveux, séparés par de fins espaces (il appelle ce concept « Neuronlehre ») (Kirsche, 1984; Riese and Arrington, 1971; 10:17:06 UTC). Il identifia différents sous-types de neurones que Alexandre Stanislavovitch Dogiel, un histologiste et neurobiologiste russe, classifia 6 ans plus tard selon leur microarchitecture. Il avait regroupé les neurones en sept groupes (I à VII) avec en plus, un groupe de neurones géants (« giant neurones »). Les groupes les plus importants sont les groupes de I à III (Furness, 2000a) (Fig.11). Bien qu'il décrivit à l'époque ces trois principaux types de neurones, en fonction de la morphologie et de la longueur des dendrites, la plupart des auteurs ne tinrent compte que de deux types : le type I, caractérisé par un prolongement long et plusieurs prolongements courts; le type II, caractérisé par plusieurs prolongements longs. Jusque dans les années 70, il n'y eut aucun progrès substantiel quant à cette classification en raison de difficultés méthodologiques. De plus, beaucoup d'histologistes continuaient de suivre la « théorie réticulé ».



*Figure 11* : Représentation schématique des différents types de neurones selon la classification de Dogiel : (a-c) Neurones de type I uniaxonaux multidendritiques (courtes et lamellaires). (d-e) Neurones de type II adendritiques et pluriaxonaux. (f-g) Neurones de type III uni-axonaux multidendritiques voire filamenteux. D'après (Timmermans et al., 1997b).

Au cours des dernières années, il y eut d'autres tentatives de classification des neurones en fonction de leur morphologie, leur neurochimie ou leurs propriétés fonctionnelles. Ces caractéristiques ont été étudiées par des méthodes comme la microscopie optique ou électronique, l'immunocytochimie, l'analyse électrophysiologique, etc. Les études ont généralement été menées chez le cobaye, mais on retrouve une organisation et des fonctionnements assez semblables chez les autres mammifères, avec quelques différences morphologiques. Parmi les soixante-dix sous-types neuronaux différents identifiés dans l'intestin grêle, quatorze ont été définis comme fonctionnellement importants.

La classification des neurones selon leurs propriétés électrophysiologiques (Lomax and Furness, 2000) a décrit trois types de neurones mais le troisième type, non excitable, correspondait en fait aux CGE (Hirst et al., 1974; Nishi and North, 1973; Wood and Mayer, 1978). Les neurones ont donc finalement été classés selon deux catégories : le type S pour « Synaptic » et le type AH pour « After Hyperpolarization » (Hirst et al., 1974; Wood, 1999b). Le premier sous-type possède plutôt une morphologie de type I et le second, une morphologie de type II selon la classification de Dogiel (Gershon, 1998a).

D'autres classifications suivirent, notamment en étudiant le codage neurochimique des neurones (Schemann et al., 2002), car les neurones expriment une combinaison de neurotransmetteurs, qui varie en fonction du type de neurones, de l'espèce et du segment intestinal étudié (Timmermans et al., 1997b). Plus de trente neurotransmetteurs ont été identifiés dans le SNE (Furness, 2000b; Galligan, 1998). Ce sont de petites molécules (ex : 5-HT), de grosses molécules (ex : peptides) ou des gaz (ex : NO). L'acétylcholine (Ach) est le neurotransmetteur excitateur majeur du SNE. À noter que le codage neurochimique présente une certaine plasticité et qu'il peut varier dans certaines conditions physiopathologiques (Ekblad et al., 2000; Ekelund and Ekblad, 2001; Gershon, 1998a).

Il existe également des classifications basées sur les connections établies par les neurones avec les autres types cellulaires, ou sur leurs fonctions. La distinction entre les différents sous-types reste encore mal définie mais il est néanmoins possible de distinguer trois grands groupes de neurones entériques : les IPANs, les interneurons et les neurones moteurs.

#### **I-5-1-1- Les neurones afférents primaires intrinsèques**

Les neurones afférents primaires intrinsèques, ou IPANs, sont des neurones senseurs multipolaires connectés les uns aux autres pour former un réseau (Kunze and Furness, 1999) (Fig. 12). Ce sont de larges neurones avec plusieurs longs prolongements (généralement entre 2 et 6), ce qui correspond à une morphologie de type II dans la classification de Dogiel. Ils ont pour fonction de répondre aux changements du contenu chimique de la lumière intestinale ainsi qu'à la distorsion mécanique de la muqueuse ou de la musculature externe (Bertrand et al., 1997b; Furness et al., 1998, 2004; Kirchgessner et al., 1992; Kunze et al., 1998). Les distorsions mécaniques excitent aussi certains neurones unipolaires du SNE (Mazzuoli and Schemann, 2009; Spencer and Smith, 2004; Spencer et al., 2006). Les IPANs représentent 10 à 30% des corps cellulaires dans les ganglions sous-muqueux et myentériques de l'intestin. Le

prolongement « axone-like » de ces neurones permet de conduire des potentiels d'action (PA) à d'autres IPANs, des interneurones ou des neurones moteurs (Furness et al., 1998; Hendriks et al., 1990). Ces neurones de type II sont absents dans l'œsophage et sont rares dans l'estomac (2007b).

### **I-5-1-2- Les interneurones**

Les interneurones représentent la population neuronale entérique la plus importante. Ils peuvent être de type S ou AH et présentent généralement une morphologie de type II selon Dogiel. Leur rôle est d'intégrer les informations provenant des neurones senseurs pour les transmettre ensuite aux neurones moteurs. On distingue un type d'interneurones ascendants et trois types d'interneurones descendants. Ces termes correspondent à leur organisation : les quatre types de neurones sont organisés en chaîne le long du TD dans le plexus myentérique, mais les neurones ascendants vont dans le sens caudo-rostral alors que les neurones descendants vont dans le sens rostro-caudal. Les neurones ascendants sont majoritairement cholinergiques tandis que les neurones descendants ont un codage neurochimique plus complexe incluant l'ACh, le NO, le polypeptide intestinal vasoactif (VIP), la 5-HT et la somatostatine. Parmi les trois types de neurones descendants, un exprime la synthétase d'oxyde nitrique (NOS) et le VIP, un autre exprime la somatostatine, et le dernier exprime la 5-HT et l'ACh. Ces particularités neurochimiques leur confèrent des fonctions spécifiques. Ils sont respectivement impliqués dans la motilité locale du TD, dans la propagation du CMM (Pompolo and Furness, 1993), et dans les réflexes sécrétomoteurs locaux. Deux potentiels post-synaptiques excitateurs non cholinergiques générés par l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) et par la 5-HT interviennent dans la transmission interneuronale (Furness, 2000b).

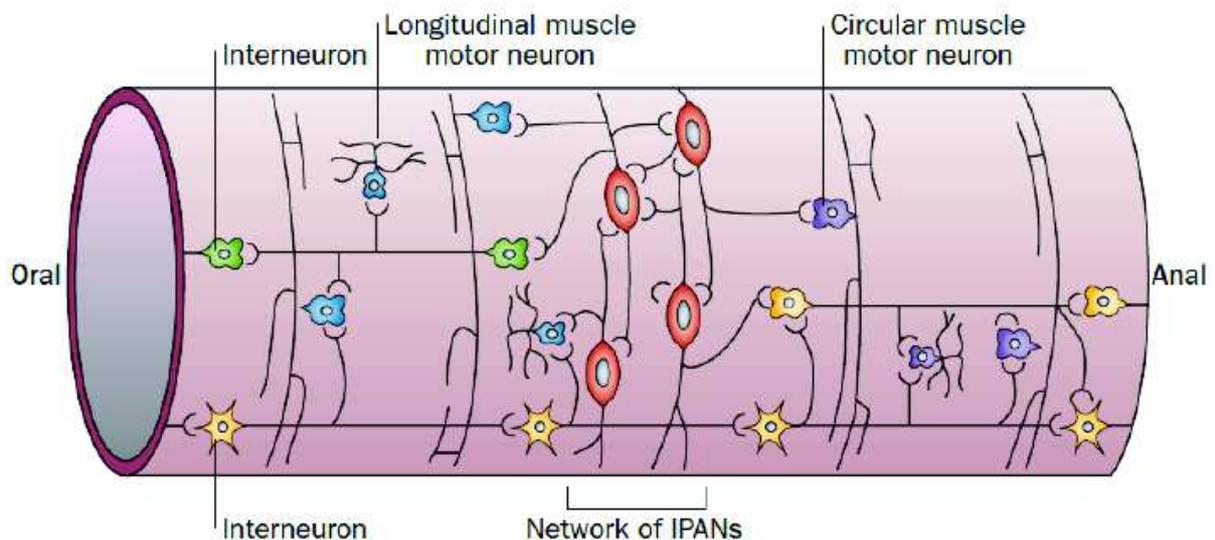
### **I-5-1-3- Les neurones moteurs**

Les neurones moteurs sont de type S et de morphologie I selon Dogiel. Il en existe cinq types : les neurones excitateurs et les neurones inhibiteurs des muscles du tractus intestinal, les neurones sécrétomoteurs-vasodilatateurs, les neurones sécrétomoteurs non vasodilatateurs et les neurones innervant les cellules endocrines de l'estomac (Furness, 2000b).

Les neurones moteurs excitateurs et inhibiteurs viennent innerver tous les muscles du TD, c'est-à-dire les muscles circulaires et longitudinaux ainsi que la musculaire muqueuse. Les neurones excitateurs sécrètent principalement l'ACh et les tachykinines. Les neurones

inhibiteurs produisent différents neurotransmetteurs comme le NO, le VIP ou l'ATP (Furness et al., 2000).

Les sécrétions d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale sont contrôlées par les neurones sécrétomoteurs. Certains de ces neurones innervent la sous-muqueuse où ils contrôlent le flux sanguin par vasodilatation des artérioles. On les appelle les neurones sécrétomoteurs-vasodilatateurs (Furness et al., 2000). Les neurones sécrétomoteurs peuvent être cholinergiques ou non-cholinergiques. Les neurones cholinergiques répondent après stimulation de leurs récepteurs muscariniques dans la muqueuse. Les non-cholinergiques génèrent la plupart des réponses réflexes locales. Ils utilisent le VIP, la substance P, l'ATP ou le « Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide » (PACAP) (Reddix et al., 1994) comme neurotransmetteur. L'équilibre entre les sécrétions de la muqueuse et le contrôle du flux sanguin est assuré par les neurones sécrétomoteurs intrinsèques à travers un circuit réflexe local qui est lui-même modulé de manière extrinsèque par le SNC via les voies sympathiques (Furness et al., 2000).



*Figure 12 : Figure simplifiée des circuits nerveux contrôlant la motilité de l'intestin grêle. Sur le schéma sont représentés les trois grands groupes de neurones entériques dans la paroi intestinale. Les IPANs (rouge) détectent la distorsion mécanique de la paroi et le changement du contenu luminal. Ils font synapse avec les interneurons descendants (jaune) et ascendants (vert), avec les neurones moteurs excitateurs (bleu) et inhibiteurs (violet) (Furness, 2012a).*

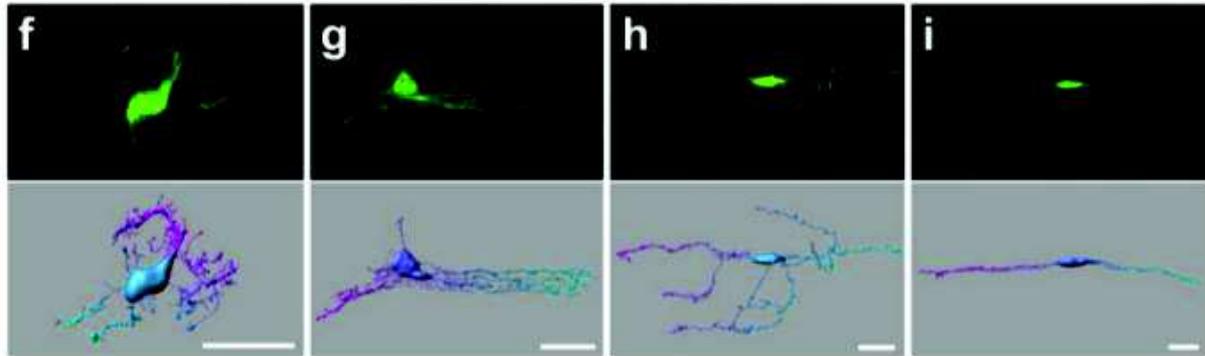
## **I-5-2- Les CGE**

### **I-5-2-1 Classification et localisation des CGE**

Les cellules gliales entériques, ou CGE, furent initialement considérées comme les homologues des cellules de Schwann mais la mise en évidence d'une morphologie de type étoilée des CGE a amené à reconsidérer leur « classification » et à les apparenter aux astrocytes. En effet, les relations entre les neurones et les CGE rappellent plutôt celles que l'on retrouve entre les astrocytes et les neurones (Gabella, 1971). D'autre part, Jessen et Mirsky ont mis en évidence qu'un marqueur des astrocytes, la « glial fibrillary acidic protein » ou GFAP, était exprimé dans les ganglions entériques (Gershon MD, 1991; Jessen and Mirsky, 2005). Des travaux complémentaires ont confirmé l'expression de la GFAP dans les CGE, ainsi que celle de la protéine S100 $\beta$  (S100 Ca<sup>2+</sup> binding protein  $\beta$ ), une protéine exprimée dans les astrocytes matures, et du facteur de transcription Sox10 (Hoff et al., 2008; Laranjeira et al., 2011; Young et al., 2003b). Actuellement, ces protéines sont couramment utilisées comme marqueurs de CGE.

Seulement au sein d'un même ganglion, les marqueurs GFAP, S100 $\beta$  et sox10 sont différenciellement exprimés par les CGE (Boesmans et al., 2015). On note aussi des différences dans l'expression des récepteurs et dans les flux calciques au sein de ces cellules (Boesmans et al., 2015; Maudlej and Hanani, 1992; Nasser et al., 2006a), ainsi que des différences morphologiques. L'ensemble de ces données suggèrent une certaine diversité dans cette population cellulaire. Une première classification fût donc proposée en fonction de la structure du microenvironnement (Hanani and Reichenbach, 1994) mais en 2012, Gulbransen and Sharkey proposèrent d'aller plus loin en regroupant les CGE en fonction de leur localisation le long de l'axe transversal (de la séreuse vers la lumière intestinale) (Gulbransen and Sharkey, 2012). En effet les CGE sont organisées en réseau dense dans les ganglions entériques au sein des plexi myentérique et sous-muqueux et le long des fibres aganglionnaires, mais on les retrouve aussi dans la lamina propria et au niveau de la muqueuse dans les cryptes, les villosités et autour des vaisseaux sanguins (Liu et al., 2013) (Cabarrocas et al., 2003). L'analyse morphologique des cellules Sox10<sup>+</sup> par microscopie électronique a confirmé l'existence d'au moins quatre morphologies gliales chez la souris (Boesmans et al., 2015) (Fig.13). On distingue la forme étoilée pour les CGE intra-ganglionnaires (type I), la forme allongée pour les CGE inter-ganglionnaires (type II), les

CGE de la muqueuse (type III) et les CGE intra-musculaires (type IV) (Gulbransen and Sharkey, 2012).



*Figure 13* : Immunomarkage représentant les quatre types de CGE. Ici les CGE sont marquées par la Green Fluorescent Protein (GFP) dans des souris Sox10Cre/MADM : ce modèle permet de marquer une CGE en vert de temps en temps (« single-cell labeling ») et ainsi d'observer leur morphologie. Les images du dessus correspondent à une projection déconvoluée au maximum des marquages obtenus pour les quatre types I (f), II (g), III (h) et IV (i) de CGE, en bas les reconstructions 3-D des CGE. Echelle : 20 $\mu$ m. Adapté de (Boesmans et al., 2013a).

Comme les astrocytes, les CGE ont un rôle dans l'homéostasie et le contrôle des fonctions neuronales (Rühl et al., 2004) mais elles ont des phénotypes bien particuliers et présentent une certaine hétérogénéité.

### **I-5-2-2- Fonctions des CGE dans le SNE**

Les CGE ont longtemps été considérées comme de simples cellules de soutien pour les neurones (du grec *gloios* « gluant »). La caractérisation des CGE d'un point de vue fonctionnel, était difficile par le manque de techniques d'étude sur les cellules non excitables. Mais l'ablation des CGE (génétique ou chimique) dans des modèles animaux (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001) et la mise en culture des CGE ont permis de mieux comprendre leur fonctions. Il est désormais clair qu'elles ont une importance cruciale dans l'homéostasie intestinale avec une implication dans des maladies digestives et extradiigestives.

## **Effets des CGE sur la fonction neuronale**

La possibilité de l'existence de connections entre les neurones entériques et les CGE avaient été proposée dès les années 70 par Gabella, après l'observation d'une importante innervation des CGE par des prolongements neuronaux (Gabella, 1972). L'existence d'une communication neurogliale a ensuite été confirmée par la mise en évidence d'une augmentation du niveau intracellulaire en calcium ( $Ca^{2+}$ ) et en Adénosine Mono-Phosphate cyclique (AMPC) dans les CGE en réponse à l'activité neuronale (Boesmans et al., 2013b; Gulbransen and Sharkey, 2012). Dès lors, plusieurs fonctions des CGE sur les neurones ont été mises en évidence.

Des modèles de culture primaire de SNE ont permis de déterminer le rôle des CGE dans la survie des neurones par une réduction de la mort cellulaire induite par le stress oxydant (Abdo et al., 2010, 2012). Ce mécanisme est possible grâce à la sécrétion de facteurs neuroprotecteurs par les CGE comme le glutathion réduit, la 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine-J2 (15dPGJ2) ou le GDNF notamment (Abdo et al., 2012; Anitha et al., 2006).

Lorsqu'il y a destruction des neurones, des données suggèrent que les CGE favorisent la neurogénèse également car, en culture, elles sont capables de générer des neurones possédant les caractéristiques de neurones entériques (Laranjeira et al., 2011). Il en va de même in vivo après destruction de ganglions entériques par un agent chimique par exemple (Joseph et al., 2011; Laranjeira et al., 2011).

Parallèlement à ces découvertes, il a été montré que les CGE pouvaient intervenir sur le fonctionnement neuronal en régulant l'expression de neuromédiateurs (Aubé et al., 2006a) ou en contrôlant les apports en substrats nécessaires à leur synthèse (Nagahama et al., 2001). Par exemple la L-arginine stockées dans les CGE est l'unique substrat de l'enzyme NOS pour produire le NO, un neuromédiateur majeur du SNE (Nagahama et al., 2001). Il est donc clair que les CGE sont impliquées dans la neurotransmission et la neuroprotection entérique.

## **Effets des CGE sur les fonctions non-neuronales**

### ***Motilité gastro-intestinale***

Les CGE participeraient à la vidange gastrique et au transit dans l'intestin grêle et le colon (Aubé et al., 2006a; McClain et al., 2014; Nasser et al., 2006b). Selon Aubé et al., cette fonction passerait par des mécanismes dépendant du NO car des perturbations au niveau de la

glie entérique sur modèle animal induisent une baisse de la proportion de neurones exprimant la NOS, et donc une diminution de la réponse neuromusculaire inhibitrice induite par le NO (Aubé et al., 2006a; Theis and Giaume, 2012), mais les données sont contradictoires à ce sujet. Les courants calciques opérant au sein des CGE seraient aussi directement impliqués dans la motilité gastrointestinale. En effet, des courants calciques ont été observés dans les CGE secondairement à la formation du CMM dans l'intestin grêle, générée par les cellules de Cajal (Broadhead et al., 2012). La propagation de l'activité gliale entérique pourrait se faire via des hémicanaux de connexine 43 (McClain et al., 2014), à l'image des astrocytes du SNC (Theis and Giaume, 2012). Ce mécanisme a été suggéré lors d'une étude sur modèle murin : une délétion spécifique de la connexine 43 dans les CGE exprimant la GFAP a entraîné un ralentissement du transit colique et de la force isométrique de contraction du côlon chez ces souris par rapport aux animaux contrôles (McClain et al., 2014).

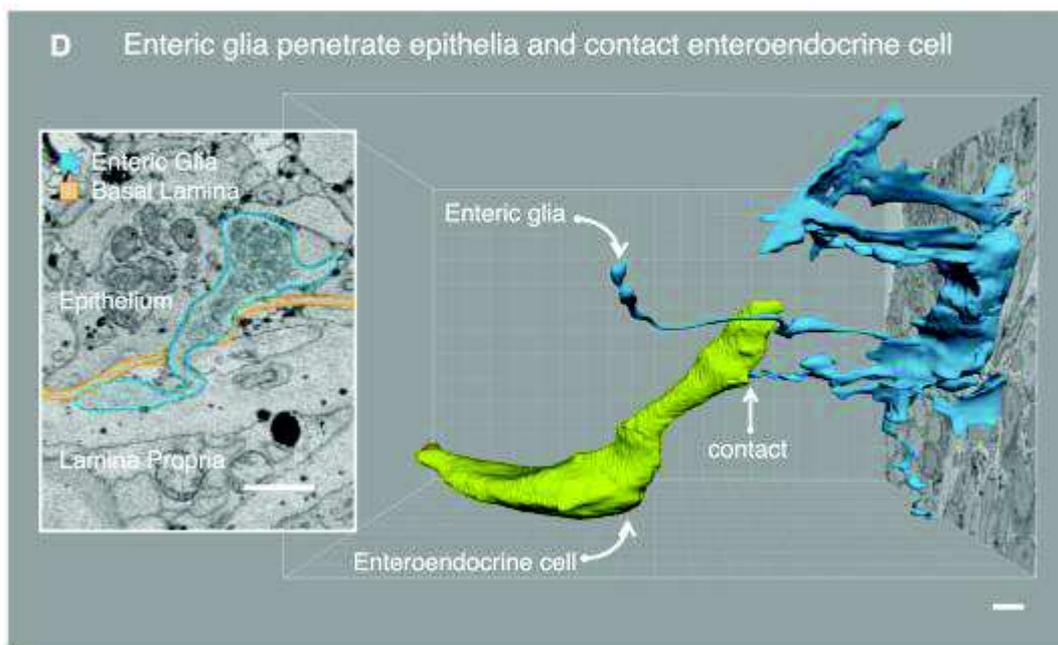
### ***Fonctions de la barrière épithéliale intestinale***

Une des fonctions bien connue des CGE est la régulation de l'homéostasie au niveau de la barrière épithéliale intestinale (BEI). Des études *in vivo* ont en effet permis de le mettre en évidence. Une ablation ciblée partielle et progressive des CGE chez la souris entraîne une augmentation de la perméabilité paracellulaire, sans inflammation intestinale (Aubé et al., 2006b), et une ablation totale conduit à une rupture de la barrière avec une inflammation fulminante du jéjunum et de l'iléon (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001). Des études de co-culture de CGE avec une monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEI) sont venues renforcer ces résultats, en montrant que les CGE augmentaient la résistance trans-épithéliale et réduisaient la perméabilité para-cellulaire, en partie en modulant l'expression des protéines de jonctions serrées comme l'occludine ou ZO-1 dans les CEI (Savidge et al., 2007b). Le facteur Glial-Derived-S-nitrosoglutathion (GSNO) libéré par les CGE participerait aussi en partie à l'augmentation de la résistance trans-épithéliale (Savidge et al., 2007b).

En plus de leur rôle dans la résistance de la BEI, les CGE sont impliquées dans les processus de réparation de la barrière (Van Landeghem et al., 2011). Elles produisent pour cela divers glio-médiateurs qui ont des effets bénéfiques sur la BEI (Yu and Li, 2014). Un mécanisme nécessaire sa réparation après des altérations mécaniques ou inflammatoires est l'étalement des CEI : celui-ci est favorisé par le proEGF libéré par les CGE, qui va activer les voies de signalisation Focal Adhesion Kinase (FAK). Les CGE inhibent en parallèle la prolifération

des cellules épithéliales, en partie par la libération du Transforming Growth Factor beta1 (TGF $\beta$ 1) (Neunlist et al., 2007), et augmentent leur différenciation grâce à la production de 15dPGJ2 (Bach-Ngohou et al., 2010). Elles sécrètent également du GDNF, un facteur connu pour augmenter la survie et la différenciation des neurones dans le SNC, qui a des effets anti-apoptotiques sur les CEI (Steinkamp et al., 2003; Zhang et al., 2010).

Les CGE participent également directement aux fonctions d'absorption et de sécrétion de l'épithélium intestinal (MacEachern et al., 2011; McClain et al., 2014). Elles communiquent avec les cellules entéro-endocrines via des contacts axon-like nommés neuropodes (Fig.14) dont elles favorisent la formation sur ces cellules par la libération de médiateurs comme le GDNF (Bohórquez et al., 2014). Les cellules entéro-endocrines sont des cellules régulatrices importante de la BEI. Elles projettent des villi au niveau de la lumière intestinale pour en tester le contenu (Sternini et al., 2008) et sécrètent des facteurs du côté basolatéral qui pourraient agir sur le fonctionnement des CGE localement. En réponse les CGE pourraient réguler les fonctions de la BEI. La formation des neuropodes est aussi modulée par des facteurs du microenvironnement comme le Nerve Growth Factor (NGF) (Bohórquez et al., 2014).



*Figure 14 : Reconstruction 3-D d'un contact axon-like entre une CGE et une cellule entéro-endocrine. La glie entérique (en bleu) étire des prolongements cytoplasmiques dans*

*l'épithélium qui viennent aux contacts des neuropodes des cellules entéro-endocrines (en jaune). Echelle : 1  $\mu$ m (Bohórquez et al., 2014).*

### **I-5-2-3- Les CGE et l'inflammation**

Tout comme les astrocytes, les CGE peuvent changer de phénotype sous la pression de l'environnement. En effet, en cas d'inflammation, les astrocytes se modifient en glie réactive. Cette réaction nommée astrogliose se caractérise par une prolifération cellulaire, des modifications morphologiques et des variations dans l'expression des protéines comme une surexpression de la GFAP (Sofroniew, 2009). Les CGE possèdent des récepteurs leur permettant de répondre aux stimuli inflammatoires comme des récepteurs aux cytokines ou les Toll Like Receptor (TLR) (Turco et al., 2014a), des récepteurs qui reconnaissent des motifs moléculaires présents chez les microorganismes pathogènes (Stoffels et al., 2014). En réponse à ces stimuli inflammatoires, la concentration calcique intracellulaire varie dans les CGE (Murakami et al., 2009), ainsi que l'expression de protéines comme la GFAP ou S100 $\beta$  (von Boyen et al., 2004; Cirillo et al., 2011; Turco et al., 2014b). Certains médiateurs de l'inflammation modifient également la prolifération des CGE (von Boyen et al., 2004; Bradley et al., 1997; Cirillo et al., 2011; Rühl et al., 2001). De plus, une altération de l'expression de certains récepteurs comme le récepteur au glutamate (Nasser et al., 2007) ou à l'endothéline (von Boyen et al., 2010) a été observée, ouvrant la possibilité d'une modification des fonctions des CGE en cas d'inflammation.

Les CGE sont capables de répondre aux stimuli inflammatoires mais elles peuvent aussi produire des médiateurs de l'inflammation, comme le NO (Cirillo et al., 2011; Turco et al., 2014a) ou la prostaglandine E2 (PGE2) (Murakami et al., 2009), ce qui suggère qu'elles aient un rôle dans les processus inflammatoires. Cette hypothèse est confortée par des études qui montrent que des souris knockout (KO) pour les récepteurs TLR2 et TLR4 exprimés par les CGE, présentent une sensibilité moindre au dextran sulfate sodium (DSS) utilisé pour induire des colites (Brun et al., 2013; Esposito et al., 2014).

À l'inverse, elles peuvent aussi produire des médiateurs qui vont protéger les neurones et les cellules épithéliales au cours d'une inflammation (Anitha et al., 2006; von Boyen et al., 2004, 2006a, 2006b; Steinkamp et al., 2012).

### **Interactions entre CGE et cellules immunitaires**

Dans le SNC, les astrocytes participent aux réponses inflammatoires et immunitaires en produisant des chimiokines (Ransohoff and Tani, 1998) et des cytokines proinflammatoires ou modulatrices (Eddleston and Mucke, 1993; Meinel et al., 1994; Ridet et al., 1997; Shrikant and Benveniste, 1996). Ils expriment le complexe majeur d'histocompatibilité-I (CMH-I) constitutivement et le CMH-II par induction, ainsi que les molécules de costimulation CD80 et CD86 in vitro et in vivo (Fontana et al., 1984; Nikceovich et al., 1997). Selon ces observations, les astrocytes pourraient présenter les antigènes aux cellules T CD8<sup>+</sup> et aux CD4<sup>+</sup> naïves ou effectrices (Cornet et al., 2000; Nikceovich et al., 1997; Sedgwick et al., 1991; Soos et al., 1998). Comme les astrocytes, les CGE expriment constitutivement le CMH-I en condition physiologique, (Geboes et al., 1992; Koretz et al., 1987) et en réponse à une stimulation par les cytokines, elles sont capables de synthétiser le CMH-II et de produire des interleukines (Rühl and Collins, 1995). Une implication des CGE dans les réponses immunes restent cependant à démontrer.

### **Les CGE dans les maladies gastrointestinales**

Du fait de leur rôle central dans l'homéostasie du système digestif et des modifications observées en cas d'inflammation, les CGE ont été étudiées dans les maladies gastrointestinales. Les analyses montrent diverses modifications (Bassotti et al., 2007; von Boyen et al., 2011; Cirillo et al., 2009), si bien que le concept de « gliopathie entérique » a été introduit, notamment dans le cas des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Plus particulièrement dans le cas de la rectocolite hémorragique (RCH) car les marqueurs gliaux GFAP et S100 $\beta$  sont surexprimés dans le côlon des patients RCH (von Boyen et al., 2011). Ce n'est pas le cas de la maladie de Crohn (MC) où il a été observé une diminution du nombre de CGE exprimant la GFAP dans les segments non inflammatoires de l'intestin des patients (Cornet et al., 2001). Ces données suggèrent un processus pathologique différent à l'origine de la RCH et de la MC. Rien ne permet de conclure pour le moment quant à l'origine de l'activation gliale entérique observée (cause ou conséquence), mais ces données montrent quoi qu'il en soit une atteinte des CGE dans les MICI.

## **II- Le système immunitaire du tube digestif**

L'intestin n'a pas qu'une fonction digestive. Il est aussi le premier organe de défense immunitaire de l'homme. Doté de la plus grande surface du corps exposée à l'environnement, il doit tolérer les aliments indispensables à notre survie tout en rejetant les agents pathogènes. Cette protection est assurée par une multiplicité de cellules et de réponses immunes qui agissent de concert pour prévenir l'entrée et la prolifération des pathogènes.

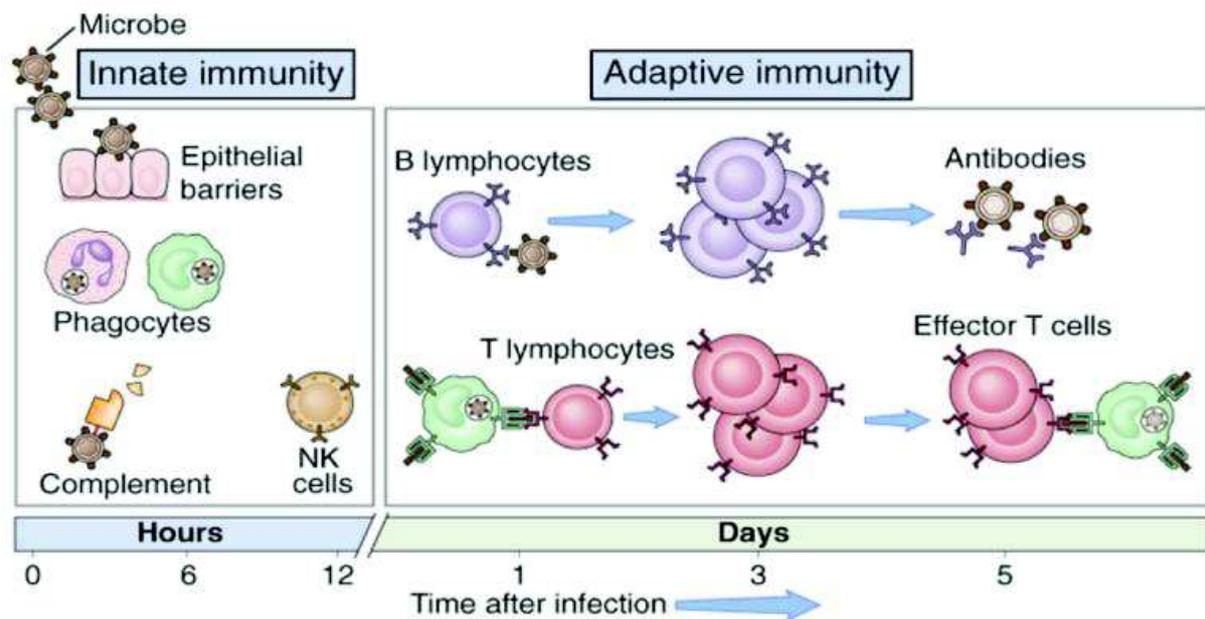
### **II-1- Caractéristiques générales du système immunitaire**

#### **II-1-1- Immunité naturelle et adaptative**

L'immunité naturelle, aussi appelée immunité innée ou native, est la première ligne de défense contre les virus et les bactéries. Elle est immédiate, peu spécifique et son efficacité n'augmente pas après réinfection par l'agent pathogène. L'immunité naturelle repose sur une distinction globale du soi et du non-soi grâce à un ensemble de récepteurs (pathogen Recognition Receptors ou PRRs) capables de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen Associated Molecular Patterns ou PAMPs). Elle fait intervenir des mécanismes humoraux (cytokines, compléments, protéines de l'inflammation aiguë) et le recrutement de cellules immunes à fonction lytique ou phagocytaire comme les macrophages, les mastocytes, les cellules *natural killer* (NK) ou les neutrophiles. Elle est également facilitée par la présence de barrières épithéliales et par la production d'antibiotiques peptidiques à leur surface grâce notamment aux cellules de Paneth (Fig.15).

L'immunité adaptative, connue également sous le nom d'immunité acquise ou spécifique, a pour caractéristique d'être spécifique de l'agent infectieux qui l'a induite. C'est une immunité acquise au cours de la vie. Son efficacité augmente à chaque rencontre avec l'agent. Réservée aux vertébrés, elle est essentiellement basée sur le recrutement de lymphocytes B, responsables de l'immunité humorale, et de lymphocytes T, responsables de l'immunité cellulaire. L'intervention de ces deux types de leucocytes permet d'optimiser l'élimination des pathogènes. L'immunité à médiation humorale cible les micro-organismes extra-cellulaires. Les anticorps produits par les lymphocytes B sont libérés dans le sang, la lymphe et les fluides extracellulaires. Ils se fixent aux toxines microbiennes ou aux antigènes présents à la surface des micro-organismes pour les neutraliser. L'immunité à médiation cellulaire cible les micro-organismes intracellulaires en détruisant les cellules infectées par l'agent pathogène. Les

lymphocytes T agissent directement ou indirectement en fonction de la présence ou l'absence des CMH sur les cellules infectées.



*Figure 15 : Représentation des principaux acteurs de l'immunité innée et adaptative. L'immunité innée (à gauche) constitue la première défense contre l'infection : elle est basée sur la présence de barrières épithéliales qui empêchent la pénétration des pathogènes, et de cellules ou composants qui les inactivent de manière aspécifique et les éliminent. L'immunité adaptative (à droite) est déclenchée plus tardivement au cours de l'infection ; elle est basée sur la réponse spécifique des lymphocytes (T et B) envers un élément pathogène (Abbas et Lichtman, 2008).*

Les deux systèmes immunitaires, inné et acquis, ont évolué de manière à tolérer le microbiote intestinal tout en assurant la défense de l'organisme vis-à-vis des agents infectieux (Iwasaki and Medzhitov, 2010; Pulendran and Artis, 2012).

### **II-1-2- Cellules du système immunitaire inné**

L'immunité innée est la première ligne de défense contre les pathogènes. Dans l'intestin, elle est assurée par un ensemble de composants physiques, moléculaires et cellulaires qui incluent la barrière épithéliale, des peptides antimicrobiens naturellement présents à la surface de l'épithélium et un ensemble de cellules spécialisées.

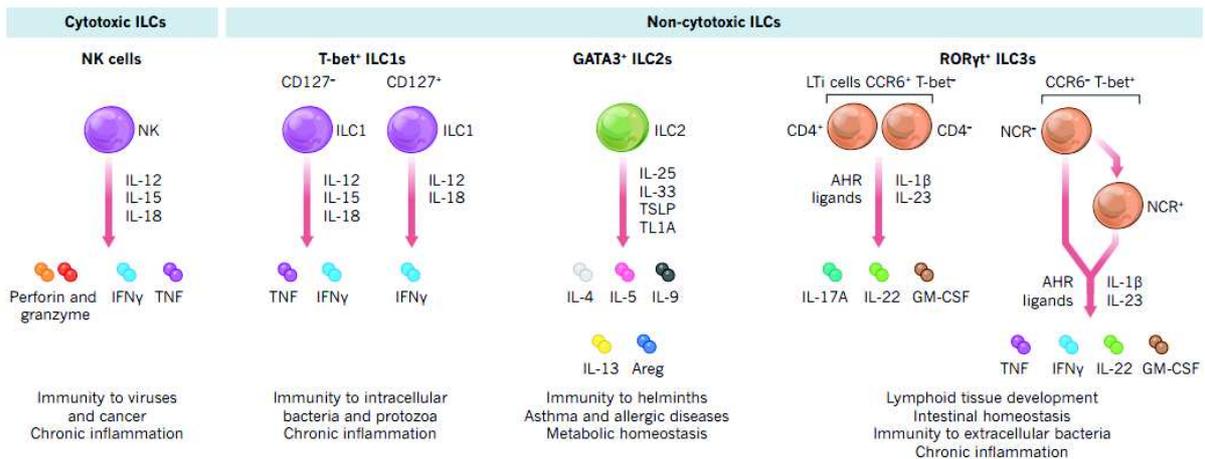
Parmi ces cellules spécialisées, on distingue les **cellules lymphoïdes innées ou ILCs** (« innate lymphoid cells ») qui interagissent avec une grande variété de cellules hématopoïétiques ou non hématopoïétiques, pour protéger l'organisme contre les pathogènes et assurer l'homéostasie tissulaire (Eberl, 2012; Spits and Di Santo, 2011; Spits et al., 2013).

La famille des ILCs comprend les cellules natural killer (NK) classiques et une population d'ILCs non cytotoxiques. Tous les membres de cette famille ont une morphologie de cellule lymphoïde classique mais ils n'expriment aucun marqueur myéloïde ou dendritique. Les ILCs sont donc définies comme des cellules négatives pour le marqueur de lignée (Lin<sup>-</sup>) (Eberl et al., 2004; Mebius et al., 1997; Moro et al., 2010; Neill et al., 2010; Price et al., 2010; Spits and Di Santo, 2011; Spits et al., 2013). Les ILCs expriment certaines sous-unités des récepteurs aux cytokines comme la sous-unité  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (CD25) ou la sous-unité  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7 (CD127) mais, contrairement aux lymphocytes B et T conventionnels, elles n'expriment pas de récepteurs spécifiques aux antigènes (Eberl, 2012; Spits and Di Santo, 2011; Spits et al., 2013). En cas d'infection, elles sont donc rapidement activées par des cytokines, mais aussi par d'autres molécules comme des facteurs de croissance (Eberl, 2012; Spits and Di Santo, 2011; Spits et al., 2013) sécrétés notamment par les cellules épithéliales (Spits et al., 2013), les ILCs étant très présentes au niveau des barrières biologiques. Elles sont également régulées par d'autres facteurs endogènes comme des neuropeptides ou des hormones (Eberl, 2012; Spits and Di Santo, 2011; Spits et al., 2013).

Bien que les ILCs n'aient pas de spécificité vis-à-vis de l'antigène, elles possèdent néanmoins des similitudes avec les sous-groupes de T helper en termes de cytokines exprimées et de fonctions effectrices mises en œuvre par ces cellules.

Les ILCs non cytotoxiques se subdivisent en trois groupes distincts : les ILCs 1, les ILCs 2 et les ILCs 3 (Constantinides et al., 2014; Klose et al., 2014; Spits et al., 2013; Yagi et al., 2014). Les ILCs 1 produisent des molécules comme l'interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) et le « tumour necrosis factor » (TNF). Elles sont impliquées dans l'immunité vis-à-vis des bactéries intracellulaires et des parasites comme les protozoaires (Bernink et al., 2013; Fuchs et al., 2013; Klose et al., 2014; Vonarbourg et al., 2010). Les ILCs 2 produisent des cytokines associées aux T helper 2 (T<sub>H</sub>2) comme par exemple, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13. Elles sont impliquées dans la défense de l'organisme contre les vers parasites et les mécanismes d'inflammation au cours de la réaction allergique ou la réparation tissulaire (Buonocore et al., 2010; Cella et al., 2009; Cupedo et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008; Sonnenberg et al.,

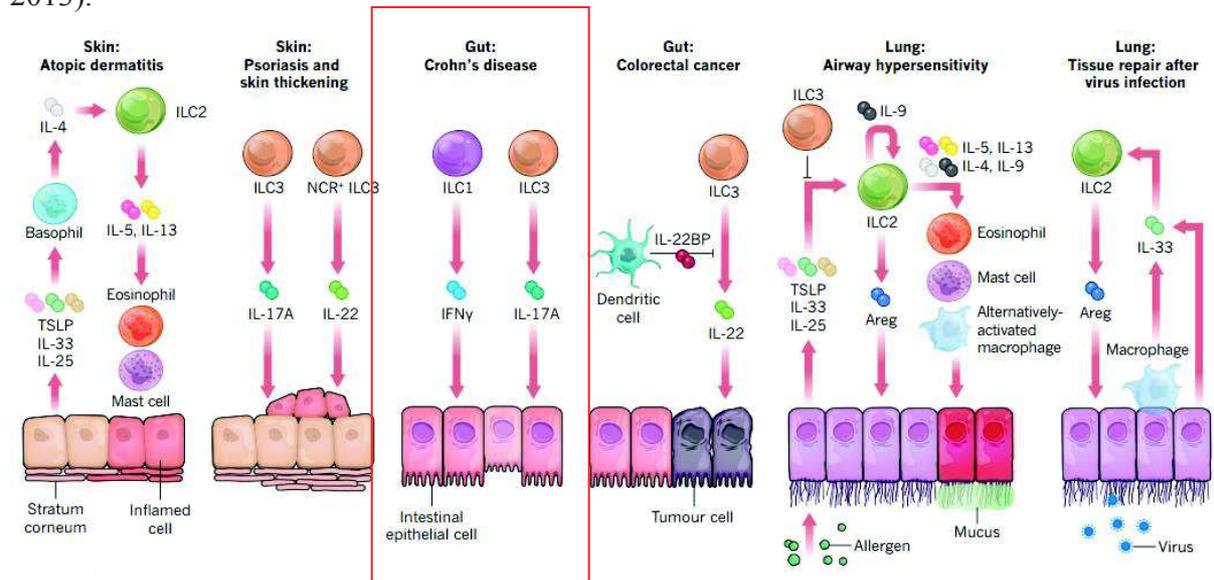
2011a). Chez l'Homme, toutes les ILCs 3 expriment le récepteur aux chimiokines CCR6 et le CD117 (ou c-kit) mais on distingue deux groupes en fonction de l'expression du récepteur de cytotoxicité naturelle NCR NKp44 (Cella et al., 2009; Cupedo et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008). Les ILCs 3 NCR<sup>-</sup> forment un groupe hétérogène comprenant les inducteurs de tissus lymphoïdes (LTi). Les ILCs 3 sont importantes dans la maintenance de la barrière épithéliale intestinale et l'expression de peptides antimicrobiens, notamment grâce à l'expression d'IL-22 (Sonnenberg et al., 2011b; Zheng et al., 2008). En effet, des souris déficientes en IL-22 présentent une très forte inflammation intestinale qui entraîne une rupture de la barrière épithéliale intestinale et la mort de l'animal par infection (Satoh-Takayama et al., 2008; Sonnenberg et al., 2011b). Les ILCs 3 interviennent également dans les interactions entre l'hôte et les bactéries commensales de l'intestin, avec en particulier un rôle dans la localisation des bactéries dans le tissu lymphoïde. Leur disparition entraîne d'ailleurs une dissémination de certaines bactéries et une inflammation de bas grade (Sonnenberg et al., 2012) par des mécanismes comme une baisse de l'expression d'IL-22 ou une hyperproduction d'IgA par des lymphocytes B (Kruglov et al., 2013; Sonnenberg et al., 2012). Les ILCs 3 qui expriment la molécule de présentation des antigènes CMH II, mais pas de molécule de co-stimulation (Hepworth et al., 2013), ont également un rôle dans le maintien d'un état de tolérance dans l'intestin en limitant la réponse des cellules T vis-à-vis des bactéries commensales. Ainsi, une déplétion en ILCs 3 entraîne une réponse exagérée des T<sub>H</sub>17 vis-à-vis des bactéries commensales ; cette réaction est parfois suivie d'une inflammation intestinale (Goto et al., 2014; Hepworth et al., 2013; Qiu et al., 2012). Quant aux LTi, elles ont un rôle essentiel dans la formation des organes lymphoïdes secondaires comme les plaques de Peyer, au cours du développement embryonnaire (Eberl et al., 2004). Elles participent donc au modelage et au maintien de l'homéostasie du tissu intestinal.



*Figure 16 : La famille des cellules lymphoïdes innées. Les groupes 1, 2 et 3 des cellules lymphoïdes innées (ILCs) se distinguent par l'expression de facteurs de transcription, de cytokines effectrices et de marqueurs de surface particuliers. Les ILCs peuvent être activées par différents stimuli comme les cytokines, les eicosanoïdes, les hormones, etc. Elles sont impliquées dans diverses fonctions comme l'immunité, l'inflammation et l'homéostasie tissulaire.*

De par leur rôle dans le maintien de l'homéostasie des tissus et des barrières biologiques, un déséquilibre et des altérations dans le fonctionnement des ILCs pourraient contribuer au développement de pathologies inflammatoires comme la maladie de Crohn (Spits and Di Santo, 2011; Spits et al., 2013). Cette hypothèse est confortée par diverses observations dans des modèles de colites chez la souris et chez des patients affectés par des MICI. Des études effectuées sur la souris ont montré que les ILCs 1 intra-épithéliaux ainsi que les ILCs 3 produisant de l'IFN $\gamma$ , étaient capables d'induire une inflammation intestinale et que le blocage spécifique de l'IFN $\gamma$  entraînait une amélioration des symptômes (Buonocore et al., 2010; Fuchs et al., 2013). L'IL-17 produite par les ILCs 3 pourrait également être impliquée dans le développement d'une inflammation intestinale selon un mécanisme indépendant des cellules T (Buonocore et al., 2010; Powell et al., 2012). Chez l'homme, l'analyse du tissu intestinal de patients atteints de la MC a révélé une prolifération excessive des ILCs 1 (Bernink et al., 2013; Fuchs et al., 2013) ainsi qu'une augmentation de la production de l'IFN $\gamma$  dans les zones inflammatoires (Bernink et al., 2013; Fuchs et al., 2013). Il a également été observé chez les patients MC, une baisse de la production d'IL-22 par les ILCs 3 ; or cette cytokine est très

importante dans le maintien de l'homéostasie intestinale (Bernink et al., 2013; Fuchs et al., 2013).



*Figure 17 : Les fonctions réparatrices et pro-inflammatoires des cellules lymphoïdes innées. Une prolifération des ILCs est observée dans de multiples pathologies inflammatoires affectant les barrières biologiques et diverses données suggèrent un rôle de l'interféron  $\gamma$  dérivé des ILC1 et de l'IL-17 dérivé des ILC3 dans le développement des MICI.*

L'ensemble de ces données suggère que les ILCs, plus particulièrement les ILCs 1 et 3, jouent un rôle important dans les désordres inflammatoires de l'intestin.

## II-1-3- Cellules du système immunitaire adaptatif

### II-1-3-1-Les lymphocytes

#### Origine et caractéristiques générales

Les lymphocytes sont les seules cellules à exprimer des récepteurs spécifiques des antigènes. Ils sont donc essentiels à la réponse immunitaire adaptative. Ils forment un groupe très hétérogène capable d'actions biologiques complexes. On les distingue par des protéines de surface détectables par des anticorps monoclonaux. Ces protéines sont regroupées sous le terme « CD » pour « *cluster of differentiation* ». Elles diffèrent suivant le type cellulaire et le stade de différenciation.

Tous les lymphocytes se développent à partir des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Elles forment des progéniteurs lymphocytaires communs (CLP) dont une

partie reste dans la moelle osseuse pour finir sa maturation et donner les lymphocytes B tandis qu'une autre partie migre vers le thymus pour donner les lymphocytes T. Ces organes sont qualifiés d'organes lymphoïdes primaires, ou centraux. Une fois matures, les lymphocytes gagnent la circulation en passant par les organes lymphoïdes périphériques. A ce stade, les lymphocytes sont naïfs : ils expriment les récepteurs aux antigènes mais ne sont pas encore capables de les éliminer. S'ils ne rencontrent pas l'antigène au bout de plusieurs jours ou mois, alors ils meurent par apoptose et sont remplacés. Ce phénomène appelé homéostasie permet de maintenir un nombre stable de lymphocytes. S'ils rencontrent l'antigène, ils prolifèrent et se différencient en cellules effectrices capables d'éliminer l'antigène, ou en cellules mémoire : c'est la réponse primaire. Les cellules effectrices provenant des lymphocytes B sont appelées plasmocytes et produisent des anticorps. Les cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices produisent des cytokines qui activent les lymphocytes B et les macrophages. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effectrices tuent directement les cellules infectées. La durée de vie des cellules effectrices est souvent très courte. Elles vivent généralement jusqu'à l'élimination du pathogène, contrairement aux cellules mémoires qui survivent pendant de longues périodes en l'absence d'antigène. Si elles rencontrent à nouveau l'antigène à l'origine de leur développement, les cellules mémoires s'activent et induisent une réponse immunitaire plus efficace, plus rapide et plus importante que la réponse primaire. C'est la réponse secondaire caractéristique de la réponse adaptative.

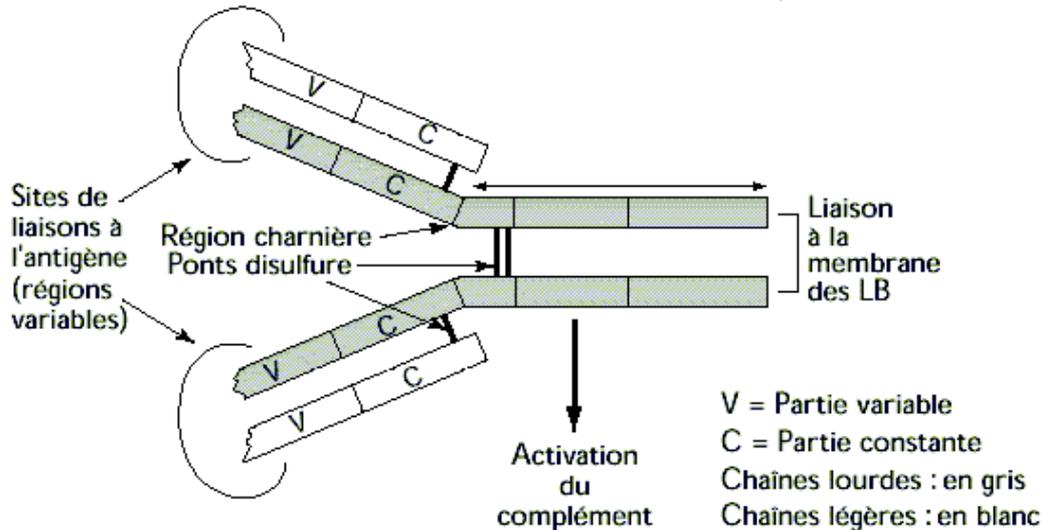
### **Les lymphocytes B**

Les lymphocytes B sont à la base de la réponse immune à médiation humorale car ce sont les seules cellules à produire et à sécréter des anticorps ou immunoglobulines (Ig), une fois différenciés en plasmocytes sous l'action de cellules T auxiliaires ou de cytokines libérées par les lymphocytes T comme l'IL-2. Chaque plasmocyte ne produit qu'un type d'Ig parmi les différents isotypes (ou classes) existants (IgM, IgD, IgA, IgG, IgE) ou même sous-classes (IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Dans le tractus intestinal, la majorité (80%) des Ig produites sont des IgA.

Les plasmocytes expriment à leur surface des récepteurs aux antigènes qui sont aussi des immunoglobulines avec la même région variable, c'est à dire la même structure de reconnaissance de l'antigène, que les Ig sécrétées. À l'inverse des cellules T qui ne reconnaissent leur antigène que lorsqu'il est présenté sous forme de peptides dénaturés par le CMH, les Ig produites par les lymphocytes B sont capables de reconnaître et de se lier aux

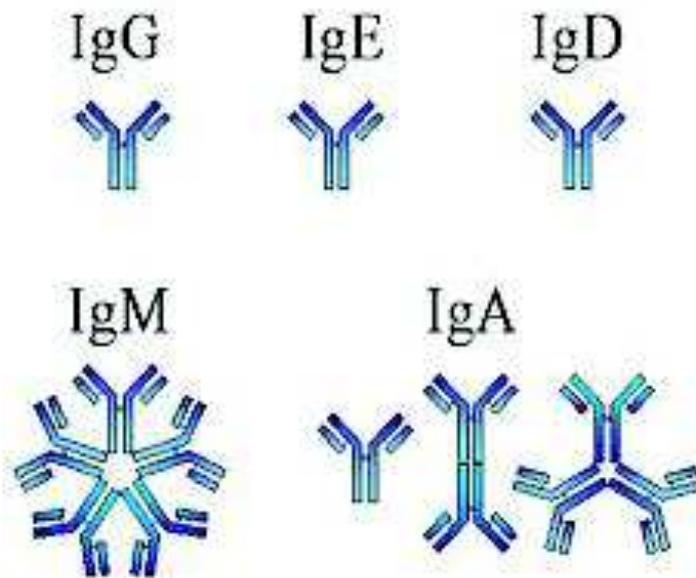
protéines et aux peptides solubles présents dans la circulation sanguine et autres fluides corporels sous leur structure tertiaire. Elles peuvent, de ce fait, reconnaître des déterminants antigéniques discontinus c'est-à-dire des déterminants présents dans différentes parties de la séquence normalement éloignées les uns des autres et qui se retrouvent proches du fait de la structure native de la protéine (Barlow et al., 1986).

Chaque Ig comporte au moins quatre chaînes polypeptidiques (Fig.16). Deux de ces chaînes,  $\kappa$  ou  $\lambda$ , sont dites légères (souvent symbolisées « L » pour light). Les deux autres ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  ou  $\alpha$ ) sont lourdes (symbolisées H pour heavy). Chaque chaîne lourde et légère est composée d'une région variable, qui est la partie qui va reconnaître l'antigène, et d'une région constante qui est la partie qui comporte la fonction effectrice de la molécule. Les Ig peuvent être clivées par action enzymatique en deux fragments : le fragment Fc (fragment, cristalline) qui a la fonction effectrice de la molécule (fixation des molécules du complément, opsonisation, cytotoxicité) et qui comporte une grande partie de la région constante, et le fragment Fab (« antigen-binding fragment ») qui reconnaît et lie l'antigène et qui inclue toute la région variable et une petite partie de la région constante.



*Figure 18 : Représentation schématique d'une immunoglobuline (Ig). L'Ig comporte deux chaînes légères et deux chaînes lourdes. Chaque chaîne lourde et légère comporte une région variable capable de lier l'antigène, et une région constante avec une fonction effectrice.*

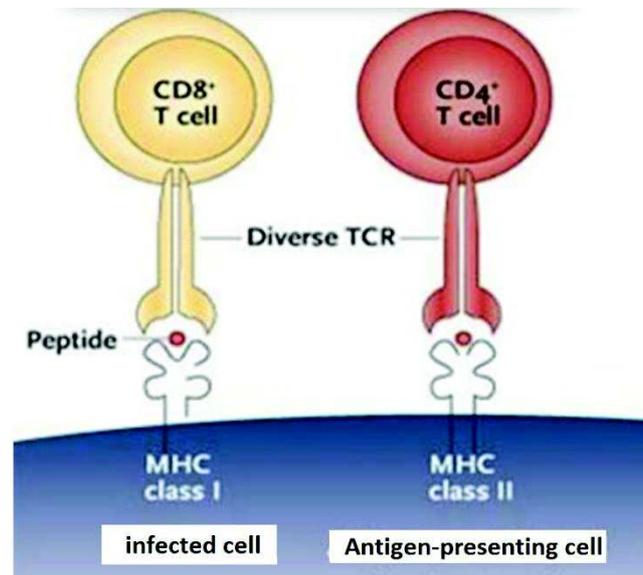
Les isotypes d'Ig (classes) et les sous-types (sous-classes) sont déterminées par les variabilités retrouvées dans la région constante de la chaîne lourde. Chez l'Homme, on distingue cinq isotypes : IgM ( $\mu$ ), IgG ( $\gamma$ ), IgA ( $\alpha$ ), IgE ( $\epsilon$ ) et IgD ( $\delta$ ) (Fig.17). L'isotype IgG se divise en quatre sous-classes (IgG1, G2, G3 et G4) et l'isotype IgA se divise en deux sous-classes (IgA1 et A2). Dans le sérum humain, on retrouve essentiellement les IgA1 sous forme de monomères mais dans les sécrétions, les IgA sont surtout dimériques (deux monomères assemblés). En fonction de la région de l'intestin, on retrouve soit majoritairement des IgA1 ou des IgA2. Toutes les autres sous-classes d'Ig sont des monomères excepté l'IgM qui est un pentamère (cinq monomères assemblés). Les différents isotypes et sous-classes d'Ig peuvent générer une variété de fonctions effectrices. Certains d'entre eux sont présents en faible quantité dans le sérum, comme l'IgG3, G4, l'IgA2 ou l'IgE par exemple, par conséquent ils sont difficiles à mesurer et les déficiences difficiles à détecter or ils peuvent avoir une importance cruciale dans la défense de l'hôte. L'IgD quant à lui n'est pas sécrété : c'est une Ig de membrane.



*Figure 19 : Les différents types d'immunoglobulines. Les IgG, E et D sont sous forme de monomères, les IgA peuvent être retrouvées sous forme monomérique, dimérique ou trimérique (non abordé ici), et les IgM sous forme de pentamères.*

## Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sont essentiels pour la réponse immune à médiation cellulaire. On distingue deux principales classes de cellules T en fonction de l'expression de CD4 et CD8 (Fig.18), des co-récepteurs qui prolongent l'interaction lymphocyte T/cellule présentatrice d'antigène (CPA) et participe à la transduction. Les lymphocytes T expriment tous le TCR (T cell receptor) et le complexe CD3. Ces deux complexes s'associent ensemble au niveau de la membrane pour former le complexe TCR, seul capable de transduire les signaux. Le TCR ne reconnaît les peptides antigéniques que lorsqu'ils sont liés aux molécules des CMH-I ou -II exprimées à la surface des CPA. Les cellules T  $CD8^+$ , dites cytotoxiques sont restreintes par le CMH-I. Quand elles sont activées par un complexe CMH-I-antigène, elles lysent les cellules infectées en libérant des toxines cytolytiques comme les perforines, les sérine-estérases, les granulysines et les granzymes. Les cellules T  $CD4^+$ , appelés lymphocytes T auxiliaires ou Helper ( $CD4^+$ ), sont restreintes par le CMH-II. Une fois activées par un complexe CMH-II-antigène, elles favorisent l'activation, la prolifération et la différenciation des autres lymphocytes. Elles stimulent également la production d'Ig par les lymphocytes B et la phagocytose des agents pathogènes par les phagocytes. Une sous-population de cellules T  $CD4^+$  inhibe ou atténue les réponses immunitaires : on les appelle les lymphocytes T régulateurs.



*Figure 20 : Les deux principales classes de lymphocytes T. (A gauche) Les lymphocytes T  $CD8^+$  cytotoxiques qui expriment le TCR ainsi que le co-récepteur CD8. Ils sont restreints par le CMH I exprimés par les cellules infectées. (A droite) les lymphocytes T  $CD4^+$*

*auxiliaires* qui expriment le TCR et le co-récepteur CD4. Ils sont restreints par le CMH II exprimé par les CPA.

La grande majorité des lymphocytes T présents dans les organes lymphoïdes périphériques expriment un TCR composé d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  mais environ 5% exprime un récepteur de type  $\gamma/\delta$  (Porcelli et al., 1991; 1989). Ces chaînes permettent la reconnaissance de l'antigène grâce aux domaines extracellulaires hautement polymorphiques. Chaque chaîne peut exister sous la forme disulfide ou non disulfide en fonction de leur localisation (Brenner et al., 1987; 1989).

### ***Les lymphocytes T $\alpha/\beta$***

Les lymphocytes T  $\alpha/\beta$ , qui terminent leur développement dans le thymus, subissent une double sélection positive et négative en son sein. La résultante est l'export vers la périphérie de lymphocytes capables de reconnaître un antigène étranger couplé au CMH du soi (Davis, 1990; Strominger, 1989). Pour acquérir une tolérance du soi, les cellules T subissent tout d'abord une sélection positive vis-à-vis du CMH au sein du cortex. Le thymus possède pour cela des cellules épithéliales qui vont présenter les molécules du CMH du soi aux cellules double positives ( $CD4^+CD8^+$ ). Trois scénarios sont alors possibles :

- 1) Le thymocyte reconnaît la molécule de CMH avec une faible affinité, dans ce cas il sera sélectionné positivement et recevra un signal de survie ;
- 2) Il la reconnaît avec une forte affinité, dans ce cas il sera considéré comme délétère et ne recevra pas de signal de survie ;
- 3) Il ne reconnaît aucune molécule du CMH et ne reçoit donc aucun signal de survie.

À cette étape, les cellules reconnaissent encore les molécules du soi comme étant du non soi, elles vont donc poursuivre leur maturation au sein de la médulla où elles subiront une sélection vis-à-vis du peptide cette fois-ci, appelée sélection négative.

La sélection négative est possible grâce à la capacité des cellules dendritiques à exprimer un facteur de transcription nommé AIRE pour « Auto-Immune-Regulator-Element » qui permet à la cellule d'exprimer des peptides du soi n'appartenant pas au thymus et qui seront présentés par les molécules du CMH. Ces cellules sont donc auto-réactives. Il y a alors à nouveau trois possibilités :

- 1) Le thymocyte est capable de reconnaître le peptide avec une forte affinité, il sera alors considéré comme délétère et sera sélectionné négativement en recevant un signal de mort ;
- 2) Le thymocyte est capable de reconnaître le peptide avec une faible affinité, il sera dans ce cas considéré comme acceptable et ne recevra pas de signal de mort ;
- 3) Le thymocyte n'interagit pas et reçoit alors un signal de mort.

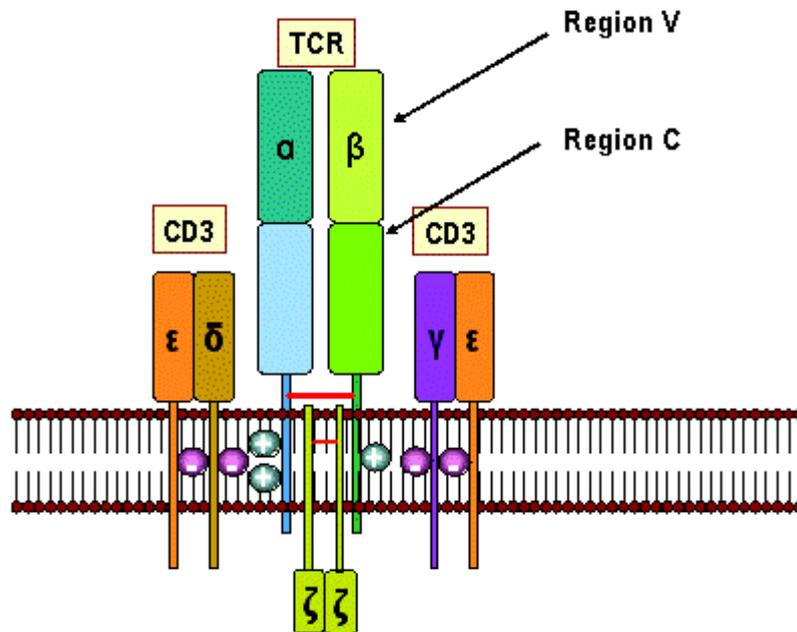
Malgré cette double sélection, certains lymphocytes auto-réactifs restent en vie car le facteur de transcription AIRE ne permet pas l'expression de la totalité des peptides du soi. Mais ils restent sous silence grâce à des mécanismes de tolérance périphérique.

Un grand nombre de lymphocytes T exprime à leur surface, les co-récepteurs CD4 et CD8 dont le fonctionnement est dépendant des TCRs, et vice-versa. Dans le thymus, les cellules T expriment simultanément les deux co-récepteurs ainsi que le TCR  $\alpha/\beta$  à faible niveau. Par la suite, les cellules n'expriment plus que CD4 ou CD8 ainsi qu'un plus haut niveau de TCR  $\alpha/\beta$  ; c'est cette population qui quitte majoritairement le thymus. Pendant l'activation des T, le co-récepteur et le TCR sont physiquement couplés ; le co-récepteur a un rôle dans l'adhésion cellule-cellule et la signalisation cellulaire (Miceli et al., 1991).

### ***Les lymphocytes T $\gamma/\delta$***

Les connaissances vis-à-vis des lymphocytes T  $\gamma/\delta$  sont beaucoup moins avancées. Un bon nombre de ces lymphocytes n'exprime ni CD4 ni CD8 (Groh et al., 1989) mais la population qui colonise la région intra-épithéliale de l'intestin est CD8<sup>+</sup>. Cependant le CD8 présente sur ces cellules des particularités que nous décrirons plus loin (Bucy et al., 1989; Jarry et al., 1990a).

Qu'il soit de type  $\alpha/\beta$  ou  $\gamma/\delta$ , le TCR est toujours associé au complexe CD3 (Fig.19). Ce complexe est composé d'au moins cinq polypeptides transmembranaires nécessaires au transport du TCR à la surface et à la transmission du signal à l'intérieur de la cellule. Le complexe CD3 est composé de plusieurs éléments nommés chaînes gamma ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) et zeta ( $\zeta$ ) (Weissman et al., 1988). Un faible pourcentage de la population possède une forme glycosylée de zeta qu'on appelle alors eta ( $\eta$ ) (Orloff et al., 1989). On retrouve la chaîne zeta en tant que dimère ( $\zeta$ - $\zeta$ ) ou hétérodimère avec eta ( $\zeta$ - $\eta$ ).



*Figure 21 : Représentation schématique du TCR associé au complexe CD3. Le TCR est composé de deux chaînes polypeptidiques (ici,  $\alpha$  et  $\beta$ ) et le complexe CD3 est constitué d'au moins cinq polypeptides transmembranaires : les chaînes  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  et la chaîne  $\zeta$  en tant que dimère ( $\zeta$ - $\zeta$ ) ou hétérodimère avec  $\eta$  ( $\zeta$ - $\eta$ ).*

### II-1-3-2- Les cellules présentatrices d'antigènes

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont déterminantes pour la réponse adaptative car ce sont ces cellules qui vont capturer les antigènes des agents pathogènes, les apprêter et les présenter aux lymphocytes afin de stimuler leur expansion clonale par division cellulaire et induire leur différenciation en cellules effectrices. Les cellules dendritiques qui expriment B7 et le CMH II de manière constitutive fonctionnent exclusivement comme CPA alors que les macrophages qui ont en plus des fonctions de phagocytose, n'expriment ces molécules qu'après contact avec les microorganismes pathogènes. On dit que les cellules dendritiques sont des CPA professionnelles. Les lymphocytes B qui n'expriment B7 qu'après activation, peuvent reconnaître directement les agents pathogènes ou être stimulés après présentation des antigènes par des macrophages bordant les canaux lymphatiques. Les CPA sont présentes dans les ganglions lymphatiques, les follicules lymphoïdes mais également au sein même des tissus.

### **II-1-3-3- Les mastocytes**

Les mastocytes sont un groupe très hétérogène en termes de fonctions, de morphologies et de médiateurs générés. Ils sont présents tout le long du TD, mais on les retrouve en plus grande quantité au sein de la muqueuse et de la séreuse de l'intestin grêle. Ils expriment des récepteurs Fc de haute affinité pour les IgE (Barrett K.E, 1992). Les mastocytes possèdent une fonction effectrice dont le rôle a été décrit dans les maladies ou désordres de type allergique et dans la réponse de l'hôte à une infection parasitaire. Les mastocytes de la muqueuse se singularisent de ceux de la sous-muqueuse ou d'autres sites car leur développement est dépendant des lymphocytes T et ils produisent d'autres médiateurs biochimiques (Befus, 1988; Gilead et al., 1987; Schwartz et al., 1987) avec des champs d'action différents. Ils diffèrent aussi de par leur morphologie, comme l'ont démontré des études d'ultrastructure (Craig et al., 1988; Weidner and Austen, 1990). Les médiateurs que produisent les mastocytes sont soit préformés et stockés dans la cellule (exemple de l'histamine) soit synthétisés de novo (exemple des cytokines). Ils ont pour cibles différents types cellulaires, y compris les cellules lymphoïdes, et agissent dans le cadre de réactions allergiques, inflammatoires ou cytotoxiques. Certains médiateurs libérés dans l'intestin peuvent venir altérer directement la fonction du muscle lisse, la perméabilité vasculaire, la sécrétion d'acide gastrique, le transport des électrolytes par les CEI ou stimuler la sécrétion de mucus par les cellules caliciformes (Barrett K.E, 1992).

### **II-1-3-4- Les éosinophiles**

Très peu d'études ont porté sur les éosinophiles dans l'intestin. Les quelques références montrent une augmentation de ces cellules au cours des infections par des vers parasites intestinaux de type helminthes contre lesquels elles sont capables de générer des réactions cytotoxiques. On les retrouve également augmentées dans le cas des gastroentérites à éosinophiles. Une fois activées ces cellules peuvent sécréter des médiateurs préformés (exemple de la protéine cationique éosinophile) ou produire des prostaglandines et des leucotriènes, qui vont contribuer au phénomène d'inflammation (Lee T. D. G., 1988). Les éosinophiles expriment un FcR de basse affinité pour les IgE et IgA et de très basse affinité pour les IgG (CD16, CD32). La cytokine IL-5 est connue pour influencer leur croissance et leur différenciation.

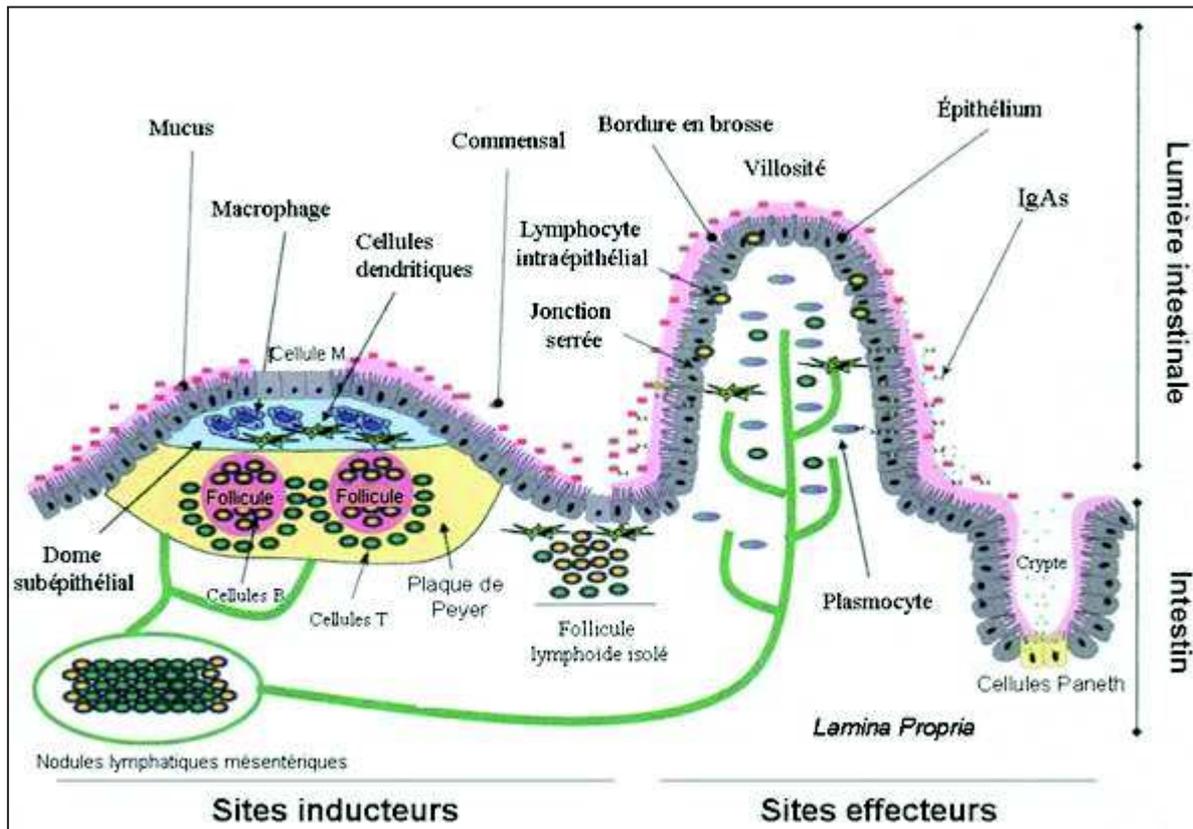
### **II-1-3-5- Les cellules Natural Killer**

Les cellules Natural Killer (NK) appartiennent au groupe des lymphocytes. Ce qui les caractérise est la présence de larges granules cytoplasmiques et l'expression du CD16, un récepteur FcR de basse affinité pour les IgG1 et 3. En revanche elles n'expriment pas les marqueurs CD2 et HNK-1 contrairement aux autres lymphocytes. Les cellules NK ont aussi été remarquées pour leur capacité à tuer certaines cellules de type tumorale in vitro. Elles possèdent des propriétés cytolytiques in vitro et in vivo et peuvent par exemple tuer des cellules cibles qui ont été préalablement coatées avec des anticorps. Elles produisent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ , et tuent les cellules cibles par la sécrétion de médiateurs préformés comme les perforines.

### **II-2- Le système immunitaire du tractus intestinal**

Les cellules du système immunitaire sont dispersées partout dans l'organisme mais elles sont préférentiellement localisées dans les organes lymphoïdes. On distingue les organes lymphoïdes primaires qui assurent la maturation des lymphocytes B (moelle osseuse) et T (thymus), et les organes lymphoïdes secondaires (ou organes lymphoïdes périphériques) dans lesquels s'opèrent l'activation des lymphocytes après leur interaction avec les antigènes. Dans la catégorie des organes lymphoïdes secondaires, on discerne les ganglions lymphatiques, la pulpe blanche de la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses encore appelé MALT pour « Muqueuse-Associated Lymphoid Tissue ».

Parmi les MALT, on distingue les tissus lymphoïdes associés au tube digestif ou GALT pour « Gut-Associated Lymphoid Tissue » GALT) (Fig.20). Chez l'Homme, les GALT contiennent plus de lymphocytes que tous les autres organes lymphoïdes secondaires. Il est le principal support du système immunitaire du tractus digestif. Au niveau des intestins, le tissu lymphoïde se présente sous la forme de plaques de Peyer, d'agrégats lymphoïdes (colon), de cellules lymphoïdes et de plasmocytes disséminés dans la lamina propria et de lymphocytes intra-épithéliaux réparties entre les cellules épithéliales.



*Figure 22 : Tissus lymphoïdes associés aux muqueuses intestinales. Les sites inducteurs sont essentiellement les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés. Les sites effecteurs sont les cellules immunitaires qui colonisent toute la hauteur de la muqueuse (Okada et al., 2005).*

### **II-2-1- Les plaques de Peyer**

Présentes au niveau de l'intestin grêle, les plaques de Peyer s'organisent en follicules lymphoïdes qui se répartissent dans la muqueuse jusqu'à la sous muqueuse. Chez l'Homme, leur développement se fait après 24 semaines de gestation. Leur nombre augmente jusqu'à l'âge de 12 à 14 ans, puis décroît ensuite jusqu'à la fin de vie. Elles sont plus nombreuses dans l'iléon afin de prévenir une potentielle infection par les nombreuses bactéries présentes dans le colon.

Les plaques de Peyer sont des lieux d'échantillonnage des antigènes intestinaux. Leur pénétration est facilitée par la présence d'un épithélium spécialisé (follicule-associated epithelium FAE) qui ne possède pas les caractéristiques d'un épithélium d'absorption. Il ne possède pas de cellules caliciformes produisant de mucus, ni de microvillosités du côté luminal, ni de lysosomes. En revanche, il comporte des cellules épithéliales dédifférenciées

appelées cellules M insérées entre les entérocytes qui présentent des invaginations au niveau de leur pôle basal. Ces invaginations permettent un contact étroit avec les cellules dendritiques, les macrophages et des lymphocytes qui viennent s'y loger. De plus, leurs propriétés d'endocytose leur permettent de capter sélectivement les particules antigéniques du côté apicale. Elles les font ensuite traverser le cytoplasme sous forme de microvésicules et les libèrent du côté basal où sont localisés les cellules immunes, notamment les lymphocytes B et T (Kagnoff, 1975, 1977).

Les plaques de Peyer constituent une source importante de lymphocytes B et T pour les autres régions de la muqueuse intestinale (Kagnoff, 1987). À l'intérieur des plaques, les lymphocytes sont compartimentés dans deux régions distinctes : le follicule lymphoïde contient la plupart des lymphocytes B et l'aire interfolliculaire contient une majorité de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Bjerke et al., 1988). Le contour du follicule lymphoïde contient de petits lymphocytes (immunoblastes, lymphocytes B mémoires, etc.) alors que son centre germinatif est composé de lymphocytes B et de CPA. C'est à ce niveau que se fait le contact entre les cellules B et les antigènes. Les cellules T peuvent eux aussi être activées après présentation des antigènes intestinaux par les CPA. Des études sur des modèles animaux ont montré que l'administration d'antigènes par voie intestinale entraînait l'expansion d'une population T précurseur spécifique dans les plaques de Peyer.

Les follicules lymphoïdes isolés auraient un rôle à peu près similaire à celui des plaques de Peyer (Keren et al., 1978).

Après cette première étape d'activation dans les follicules lymphoïdes isolés ou les plaques de Peyer, les lymphocytes vont migrer vers d'autres compartiments lymphoïdes comme les ganglions lymphoïdes mésentériques qui accueillent la lymphe ayant drainé l'intestin. Bien qu'ils possèdent des similitudes structurales avec les ganglions lymphocytaires de la périphérie, ces ganglions présentent des propriétés particulières qui en font une composante importante de l'immunité de la muqueuse intestinale. Ainsi, les lymphocytes B ont la particularité de produire des Ig de type IgA (McWilliams et al., 1977).

### **II-2-2- La lamina propria**

La lamina propria est un tissu conjonctif lâche situé juste sous l'épithélium intestinal. Elle a un rôle clé dans la défense contre les pathogènes grâce aux nombreuses cellules immunes qui la colonisent (Barrett K.E, 1992; Pavli et al., 1990). Elle est notamment très riche en

mastocytes (Barrett K.E, 1992; Befus et al., 1987; Lee T. D. G., 1988). Ces cellules granuleuses contiennent de nombreux médiateurs chimiques *de novo* ou pré-formés comme l’histamine et la sérotonine, qui sont libérées au contact d’agents chimiques, de toxines, ou après activation par des facteurs immunologiques. La libération des médiateurs de l’inflammation et de neuromédiateurs est susceptible de modifier diverses fonctions comme la perméabilité vasculaire, la contraction musculaire, la sécrétion d’électrolytes, la production d’acide gastrique et de mucus. Les médiateurs produits par les mastocytes contribuent également au recrutement des cellules inflammatoires et au déclenchement des diarrhées dans les maladies inflammatoires et les désordres d’ordre allergique dans l’intestin. Les éosinophiles sont également abondants dans la lamina propria. Ils sont très actifs contre les pathogènes grâce à des enzymes comme la lysophospholipase et à des protéines cytotoxiques, la protéine basique majeur. Les cellules NK sont quant à elle, souvent pro-inflammatoires et ont comme propriété majeure d’éliminer les cellules cibles préalablement coatées avec des anticorps, grâce notamment à la sécrétion de médiateurs préformés comme les perforines. Dans la lamina propria, les macrophages, appelés aussi les « éboueurs » ont un important rôle de phagocytose. De concert avec les cellules dendritiques, ils participent à la réponse adaptative en produisant des cytokines et en allant présenter les antigènes aux lymphocytes T présent dans la muqueuse intestinale (Roth et al., 1985; 1983).

Dans la lamina propria, les lymphocytes T (lamina propria lymphocytes LPLs) sont nombreux constituant 25 à 40% de la population totale. Quatre-vingt-quinze pourcent porte le TCR  $\alpha/\beta$  (Berg et al., 1991; James et al., 1986) et la plupart exprime le marqueur de cellules T mémoires CD45 RO mais pas CD29 (Byrne et al., 1988; Zeitz et al., 1991). La majorité des LPLs sont CD4<sup>+</sup> indiquant un rôle majeur des lymphocytes T auxiliaires (Berg et al., 1991; James et al., 1986). Les LPLs CD8<sup>+</sup> sont également présents (James et al., 1986) dans la lamina propria. Environ 40% d’entre eux exprime l’intégrine  $\alpha E\beta 7$  (CD103 ou HML1 pour human mucosal lymphocyte intégrin). Cette intégrine, caractéristique des cellules T de la muqueuse (Cerf-Bensussan et al., 1987; Parker et al., 1992; Schieferdecker et al., 1990) est produite par moins de 1% des lymphocytes T périphériques. L’activité cytotoxique de ces cellules n’a pas été encore bien démontrée *in vivo* mais *in vitro*, elles présentent une activité cytolytique après stimulation par un anti-CD3 (Deem et al., 1991; MacDonald and Spencer, 1988). Les lymphocytes T de la lamina propria expriment fortement les marqueurs d’activation CD25 et CD71 indiquant que cette région est l’objet d’intense activité immunitaire (Zeitz et al., 1991). Leur activité est importante pour coordonner les réponses

immunitaires adaptives contre des pathogènes, notamment en régulant l'activation, la croissance et la différenciation des lymphocytes B de la lamina propria.

Les lymphocytes B sont également présents dans la lamina propria et l'importante sécrétion d'Ig en conditions physiologiques suggère une plus forte activation de ces lymphocytes B comparativement aux lymphocytes B dans le sang (Peters et al., 1989). Plus de 80% de lymphocytes B de la lamina propria produisent des IgA, le reste produisant des IgM (15-20%) et des IgE (2%) (Kagnoff, 1987). Cette forte proportion d'IgA contraste avec ce qui est observé dans les sites extra-intestinaux, comme les ganglions lymphatiques ou la rate, où la production d'IgM est majoritaire (plus de 50%). Cette différence s'explique par le rôle majeur que jouent les IgA dans la protection de l'hôte contre les microorganismes pathogènes qui arrivent par la lumière intestinale (Williams and Gibbons, 1972).

Des lymphocytes particuliers qu'on ne peut assigner à la lignée B ou T ont été détectés dans la muqueuse intestinale. Ces lymphocytes expriment des marqueurs spécifiques des cellules NK comme NKH-1, mais pas CD16. Ils sont capables d'exercer une activité cytolytique envers les cibles des cellules NK (Shanahan et al., 1987) et ils auraient un rôle dans la résistance aux infections (James, S.P., 1988; MacDermott et al., 1980). Des précurseurs de cellules NK activées par les lymphokines ont aussi été décrits dans la lamina propria mais leur rôle n'est pas encore clairement défini (Fiocchi et al., 1985; Kanof and Strober, 1989).

### **II-2-3- Les lymphocytes intra-épithéliaux**

Les lymphocytes intra-épithéliaux (IELs) correspondent à une population hétérogène de lymphocytes localisés entre les cellules épithéliales à la partie basale de l'épithélium intestinal. Elles sont donc idéalement placées pour interagir avec les antigènes qui traversent la BEI depuis la lumière intestinale. Chez l'Homme adulte en bonne santé, on compte une IEL pour cinq à huit cellules épithéliales dans l'intestin grêle et une IEL pour vingt cellules épithéliales dans le colon (Cerf-Bensussan et al., 1983; Dobbins, 1986). Les IELs sont de taille variable et on distingue, pour 20% de la population, des IELs de petite taille, c'est-à-dire une taille standard pour un lymphocyte, et pour 80% de la population des IELs de taille moyenne avec une certaine granularité. Les cellules B et les plasmocytes sont rares dans la zone intraépithéliale. Ils constituent moins de 1% de la population (Cerf-Bensussan et al., 1985; Hirata et al., 1986) et une très faible proportion exprime le CD16 caractéristique des cellules NK (Cerf-Bensussan et al., 1983, 1985; Dobbins, 1986). Plus de 90% des IELs appartiennent à la lignée T comme le démontre la présence de marqueurs comme CD3 (Cerf-

Bensussan et al., 1983; Selby et al., 1983). Chez l'Homme, 90% des cellules T intra-épithéliales portent le TCR  $\alpha/\beta$ . Le reste de la population exprime le TCR  $\gamma/\delta$  mais cette proportion peut grandement varier selon les individus (entre 2 et 30% pour le TCR  $\gamma/\delta$ ) (Brandtzaeg et al., 1989; Trejdosiewicz et al., 1989; Viney et al., 1990). Tout comme les LPLs, les IELs expriment plus fortement le marqueur CD45 RO que les cellules de la périphérie, suggérant un nombre important de lymphocytes de type mémoire dans ce compartiment (Halstensen et al., 1990). Contrairement à ce qui est observé dans la lamina propria, la population CD4<sup>+</sup> est minoritaire dans l'épithélium avec 80 à 90% des IELs ( $\alpha/\beta$  et  $\gamma/\delta$ ) qui expriment CD8. En périphérie, la plupart des cellules CD8<sup>+</sup> possèdent une forme hétérodimérique  $\alpha/\beta$  du CD8 tandis que dans l'épithélium, tous les IELs  $\gamma/\delta$  et la moitié des  $\alpha/\beta$  n'expriment pas la chaîne  $\beta$  du CD8 indispensable à la différenciation thymique des lymphocytes T CD8  $\alpha/\beta$ . L'hétérodimère est remplacé par un homodimère  $\alpha/\alpha$  dont le rôle exact reste à définir (Jarry et al., 1990b; MacDonald et al., 1990).

Parmi les IELs, on distingue une population qui présente un TCR  $\alpha/\beta$  et une forme hétérodimérique  $\alpha/\beta$  de CD8. Cette population serait originaire du thymus, étape de différenciation et de sélection importante pour la reconnaissance des antigènes présentés par le CMH. Les cellules seraient ensuite sensibilisées aux antigènes intraluminaux dans les organes lymphoïdes associés à l'intestin, comme les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques avant de se localiser dans l'épithélium intestinal.

Une seconde population d'IELs présente un TCR  $\alpha/\beta$  ou  $\gamma/\delta$  et la forme  $\alpha/\alpha$  du CD8. Ces cellules se développeraient en dehors du thymus (Bandeira et al., 1991; de Geus et al., 1990; Guy-Grand et al., 1991; Pardoll et al., 1988; 1991). Il est à noter que les IELs  $\gamma/\delta$  expriment majoritairement la forme non disulfide du récepteur TCR  $\gamma/\delta$  (Spencer et al., 1989) et que leur proportion est augmentée dans l'intestin grêle des patients atteints de la maladie coeliaque. La fonction des IELs  $\alpha/\beta$  et  $\gamma/\delta$  est encore assez peu connue mais les  $\gamma/\delta$  possèdent une activité effectrice car elles sont capables de générer une activité cytolytique et de sécréter des cytokines. Leur cible reste mal connue mais elles pourraient intervenir dans la reconnaissance de protéines générées à partir de cellules endommagées ou de composants bactériens. Selon certaines études, les cellules épithéliales pourraient lier des antigènes à une molécule CD1 « CMH-I like » ou à une autre molécule non classique de type CMH-I pour les présenter aux cellules T  $\gamma/\delta$  (Balk et al., 1991; Bleicher et al., 1990; Blumberg et al., 1991; Hershberg et al., 1990).

Il à noter que 95% des IELs expriment l'intégrine  $\alpha E\beta 7$  (Cerf-Bensussan et al., 1987; Schieferdecker et al., 1990). Cette intégrine permet l'adhésion des IELs aux cellules épithéliales par l'intermédiaire de son ligand, l'E-cadhérine, impliquée dans la formation des jonctions serrées. La molécule  $\alpha E\beta 7$  favoriserait la rétention des IELs au sein de l'épithélium (Cerf-Bensussan et al., 1987, 1992)

Le rôle exact des IELs chez l'homme reste à définir mais les analyses en cas de pathologie digestives indiquent une forte augmentation de leur densité, notamment dans la maladie coeliaque (2012). De par leur répartition très structurée au sein de l'épithélium, elle pourrait jouer un rôle de sentinelle. Leurs propriétés de cytotoxicité (Klein and Kagnoff, 1984), de mémoire (Halstensen et al., 1990) et de sécrétion de diverses cytokines ouvre la possibilité d'un rôle dans l'immunité innée et adaptative (2012).

#### **II-2-4- Migration des lymphocytes intestinaux**

L'immunité adaptative requiert des étapes de reconnaissance, de sélection, d'expansion clonale et de différenciation qui ont lieu dans différents tissus lymphoïdes. Ainsi, les lymphocytes B présents dans les plaques de Peyer sont les précurseurs des plasmocytes producteur d'IgA retrouvés dans la lamina propria (Craig and Cebra, 1971). De même, ce sont les lymphocytes T présents dans les plaques de Peyer qui, après stimulation et maturation, colonisent la lamina propria et la région intra-épithéliale. Ces circuits de migration importants pour la défense de l'hôte, présentent des similitudes avec les muqueuses des poumons, des glandes mammaires et du tractus génital de la femme ; leurs similitudes ont conduit à la notion d'un système immunitaire commun muqueux (Czerkinsky et al., 1987; McDermott and Bienenstock, 1979; Mestecky, 1987; Mestecky, J., 1990). Ainsi, la migration des IgA vers les glandes mammaires dans les derniers mois de gestation et pendant l'allaitement permet de fournir à l'enfant des IgA, qui reflètent l'exposition antigénique des cellules B dans l'intestin de la maman (Lamm, M.E., 1979).

Des études sur modèles animaux ont montré qu'après stimulation par un antigène, les lymphocytes B et T quittent la plaque de Peyer et migrent par le réseau lymphatique sous-séreux vers les ganglions lymphoïdes mésentériques (McWilliams et al., 1977). Les lymphocytes rejoignent ensuite la circulation sanguine par le canal thoracique, avant de retourner dans la muqueuse intestinale à travers les veinules post-capillaires de la lamina propria et de migrer dans l'épithélium ou la lamina propria (Cheroutre, 2004). Cette migration dure de 4 à 6 jours. Certains lymphocytes B qui quittent les plaques de Peyer aboutissent dans

les glandes salivaires, les tissus lymphoïdes associés aux bronches, les glandes mammaires et le tractus génital de la femme (McDermott and Bienenstock, 1979).

Ce circuit de migration est possible grâce à l'expression d'intégrines à la surface des lymphocytes et à la présence de ligands appelés addressines à la surface des tissus (Stoolman, 1989). Pour exemple, la sensibilisation antigénique de lymphocytes T stimule l'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  qui va interagir avec son ligand, MADCAM-1, présent à la surface des vaisseaux sanguins intestinaux. Cette interaction va permettre l'adhésion des LT sur la paroi vasculaire intestinale (Guy-Grand and Vassalli, 2002; Kruse et al., 1999).

### **II-2-5- Les immunoglobulines dans la muqueuse intestinale**

Dans l'intestin sont retrouvés différentes immunoglobulines comme les IgM, les IgE et les IgG mais la particularité de la muqueuse intestinale est de produire des IgA sécrétoires qui ont un rôle majeur dans la protection de l'organisme contre l'entrée de pathogènes ou de toxines.

Dans le sang humain, les IgA sont minoritaires (10 à 15%) mais, comme vu précédemment, elles sont largement majoritaires dans les sécrétions intestinales. Synthétisées par les plasmocytes dans la lamina propria, elles sont majoritairement libérées au niveau des cryptes intestinales afin d'en tapisser la muqueuse (Kagnoff et al., 1972, 1973; Mestecky, J., 1988). Dans l'intestin, le système de production d'IgA est complètement développé dès l'âge de 2 ans alors que la synthèse d'IgA dans le sang augmente graduellement jusqu'à la puberté. Dans l'intestin adulte, on compte  $10^{10}$  cellules productrices d'IgA par mètre d'intestin (Brandtzaeg, 1985; Jonard et al., 1984). En conditions physiologiques, la quantité produite d'IgA sécrétoires est assez faible mais elle est fortement augmentée en cas d'inflammation et en fonction de la présence d'antigènes au niveau intestinal (Kagnoff, 1987).

Dans le sang, les IgA sont présents sous forme de monomères, mais dans des muqueuses comme l'intestin, plus de 80% des IgA se présentent sous forme d'un dimère dont les parties sont reliés par la pièce J, un peptide riche en cystéines (Kagnoff, 1987; Koshland, 1975; Mestecky, J., 1988). C'est grâce à cette chaîne J que le récepteur des Ig polymériques (poly IgR ou pièce sécrétoire) produit par les cellules épithéliales fixe les IgA lors leur endocytose au niveau basolatéral des enterocytes. Ce récepteur qui facilite le transport et protège les IgA de la protéolyse est conservée en partie lors de l'exocytose des IgA à la surface apicale (Kühn and Kraehenbuhl, 1979). Il transporte aussi les IgM et son expression est régulée par des cytokines (Kvale et al., 1988; Phillips et al., 1990; Sollid et al., 1987).

Chez l'Homme, la région charnière entre le domaine variable et le domaine constant est plus longue pour la sous-classe des IgA1 que pour celle des IgA2. Cette différence de structure les rend plus sensibles aux enzymes protéolytiques mais il leur permet de fixer à des épitopes bivalents plus distants et avec plus d'affinité. La forme IgA1 est largement majoritaire dans le sérum (80 à 90%) alors que la sous-classe IgA2 est surtout présente dans les sécrétions, notamment au niveau de l'intestin où elle constitue 20 à 60% des IgA (André et al., 1978; Brandtzaeg, 1985; Colombel et al., 1988; Jonard et al., 1984; Koshland, 1975; Kühn and Kraehenbuhl, 1979; Kvale et al., 1988; Mestecky, J., 1988; Mostov et al., 1984; Phillips et al., 1990; Sollid et al., 1987).

Les IgA sécrétoires ont un mode d'action et des activités biologiques particulières. Tout d'abord, ils n'activent pas la cascade du complément et ne participent pas à la cytotoxicité induite par les lymphocytes, ni à l'opsonisation (Kagnoff, 1987; Kagnoff and Campbell, 1976), mais leurs domaines constants et variables permettent la fixation des toxines et les agents pathogènes qui sont alors maintenus dans le mucus avant d'être expulsés lors des contractions de l'intestin. Par ailleurs, la fixation des IgA aux bactéries commensales de l'intestin favoriserait la formation d'un film protecteur qui empêcherait la colonisation de la muqueuse par des bactéries pathogènes (McWilliams et al., 1977). Ces propriétés auraient été sélectionnées au cours de l'évolution pour éviter le déclenchement de réponses immunes inappropriées dans un environnement riche en bactéries.

En cas de déficience en IgA, la quantité d'IgM, naturellement plus faible que celle des IgA, augmente. Cette réaction intervient notamment pour compenser la fonction des IgA (Fassett, R.T., 1987), mais initialement ces deux Ig polymériques qui empruntent la même voie de transport à travers la cellule épithéliale, fonctionnent différemment puisque les IgM sont capables d'activer la voie du complément. Une autre particularité de la muqueuse intestinale, comparativement aux autres sites lymphoïdes, est sa richesse en cellules productrices d'IgE et en mastocytes exprimant à leur surface des monomères d'IgE (Kagnoff, 1987). Ces Ig sont importants en cas d'infection parasitaire (Helminthe, etc..) et dans les réactions d'hypersensibilité. Les IgG sont, quant à eux, un constituant mineur de la réponse immunitaire intestinale mais le taux de cellules productrices d'IgG augmente dans la lamina propria intestinale des patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin. Un éventuel rôle des IgG dans la pathogénèse de ces maladies reste à définir.

### **III- Les Cytokines**

Les cytokines ont un rôle majeur dans la régulation du système immunitaire et dans la réponse inflammatoire. Ce sont des médiateurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Elles ont des propriétés pro- ou anti-inflammatoires qui s'exercent sur un très grand nombre de cellules de l'organisme dont bien sûr les cellules immunitaires des lignées lymphoïdes et myéloïdes (Beutler and Cerami, 1989; Piguet et al., 1987).

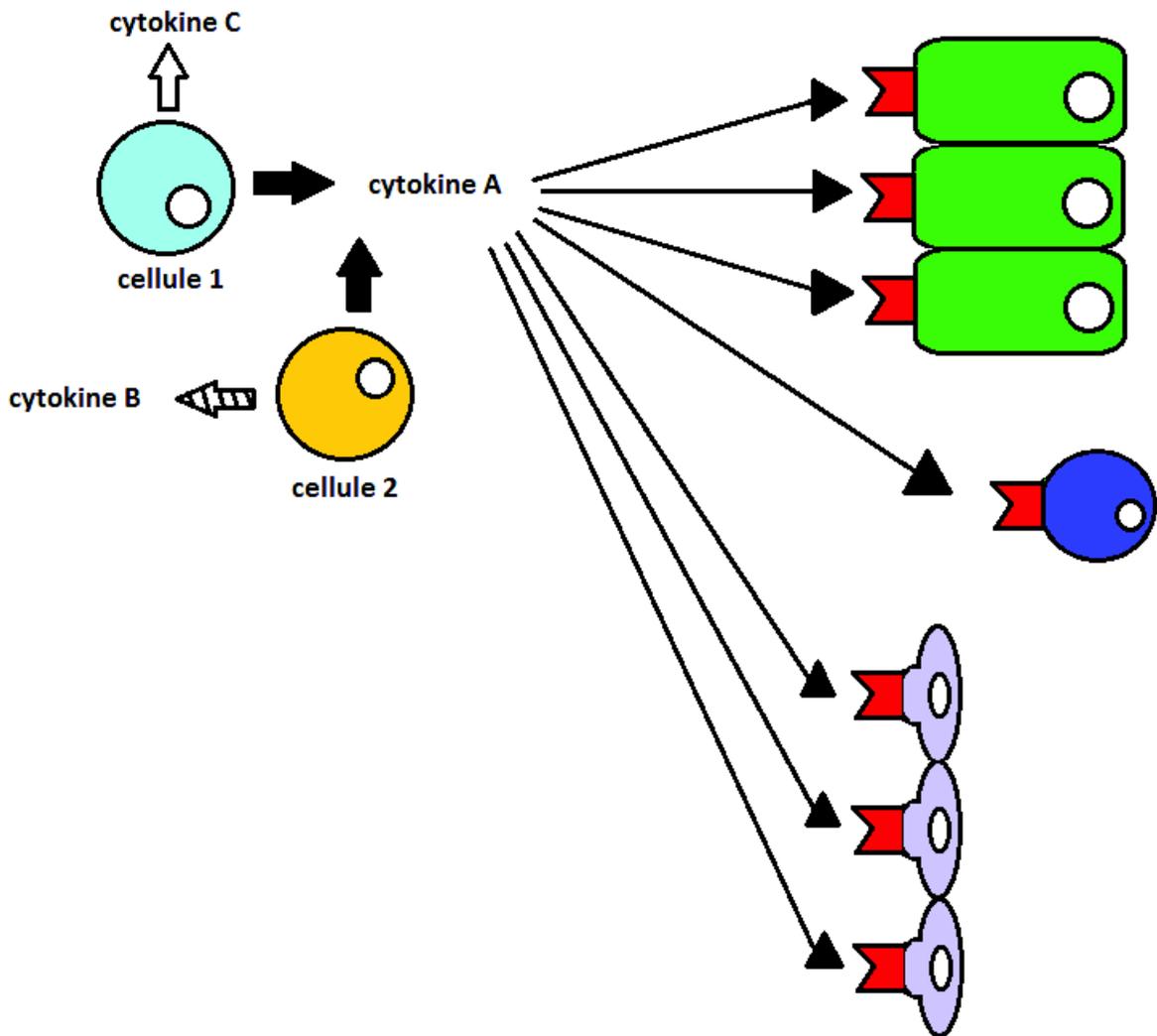
#### **III-1- Historique**

La mise en évidence de la première cytokine date de 1957. A l'époque, Alick Isaacs et Jean Lindenmann observèrent un phénomène jusqu'alors appelé interférence virale qui se traduit par une diminution de la réplication virale dans une cellule ayant été antérieurement ou simultanément en contact avec un autre virus (Isaacs and Lindenmann, 1957). Ils la dénommèrent interféron (IFN) en regard de sa fonction. Il fallut attendre les années 1980 pour que ces molécules soient purifiées grâce à l'avancée des techniques de biochimie. Dans les années qui suivirent, entre 1980 et 1990, les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique permirent de cloner et de produire les multiples cytokines présentes dans les organismes vivants. Celles-ci ont tout d'abord été utilisées à des fins de recherche en biologie cellulaire mais elles ont très rapidement été étudiées à des fins thérapeutiques car l'administration de cytokines ou le blocage de leur fonction ouvraient la possibilité d'induire ou de diminuer une réponse immunitaire. L'IFN $\alpha$  fût la première cytokine administrée pour ses propriétés immunostimulatrices à visée vaccinale chez des patients souffrants de l'hépatite B (Scullard et al., 1981). Puis ce fût le tour de l'interleukine(IL)-2 pour son utilisation dans l'immunothérapie anti-tumorale (Rosenberg et al., 1985) puis chez des patients immunodéprimés souffrants d'insuffisance rénale et d'hépatite B (Meuer et al., 1989). Depuis, malgré les difficultés rencontrées dans l'élaboration des cytokines recombinantes du fait de leurs propriétés (voir chapitre suivant), des compagnies pharmaceutiques ont entrepris leur fabrication et des protocoles thérapeutiques ont été mis en place. Plusieurs cytokines sont désormais disponibles sur prescription médicale, comme certains interférons ou l'érythropoïétine (EPO). De nouvelles techniques utilisant des antagonistes de récepteurs aux cytokines, des récepteurs solubles, ou encore des anticorps anti-cytokines se sont également développées (Feldmann, 1991a).

### **III-2- Classification et propriétés des cytokines**

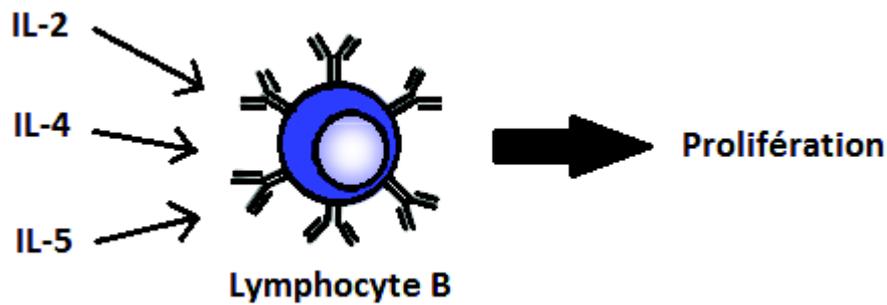
Les cytokines sont des glycoprotéines de 8 à 70 kilo Dalton (kDa). Initialement identifiées comme des produits des cellules immunitaires et nommées en regard de leur première fonction mise en évidence, elles ont ensuite été regroupées sous le terme de cytokines par Cohen et ses collaborateurs en 1974, sur la base que ces molécules pouvaient intervenir dans des fonctions biologiques extrêmement variées et qu'elles étaient synthétisées par diverses cellules. On trouve cependant les dénominations lymphokines et monokines pour les cytokines produites respectivement par les lymphocytes et les phagocytes mononucléés. Le terme interleukine a, quant à lui, été utilisé pour classer les molécules synthétisées ou actives sur les leucocytes mais de nombreuses cytokines ne sont pas produites par ce type cellulaire. A ce jour, plus de 200 cytokines ont été identifiées. Elles ont été classées dans le groupe des hormones protéiques et sont réparties en 6 familles : les interleukines (IL-1, ... IL-35) ; les interférons (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , ... ) ; les Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) ; les facteurs de croissance de transformation (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) ; les facteurs de croissance hématopoïétique (CSF) ; et les chimiokines (CCL1 à CCL28, CXCL1 à CXCL16, XCL1 & 2, CX3CL1).

Les cytokines ont des propriétés particulières. D'une part, elles peuvent être produites par différents types cellulaires. D'autre part, elles sont dites pléiotropiques car elles agissent sur une grande variété de cellules en induisant des effets différents (Fig.21). Ainsi, l'IL-4, produite par les cellules T activées, stimulent l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules B alors qu'elle n'induit que la prolifération des thymocytes et des mastocytes.



*Figure 23 : Schéma représentant l'origine diverse des cytokines et leur pléiotropisme. La cytokine A produite ici par deux types cellulaires différents (cellule 1 et cellule 2) va se lier à divers types cellulaires (cellules en vert, bleu ou violet) pour induire différentes fonctions (pléiotropisme).*

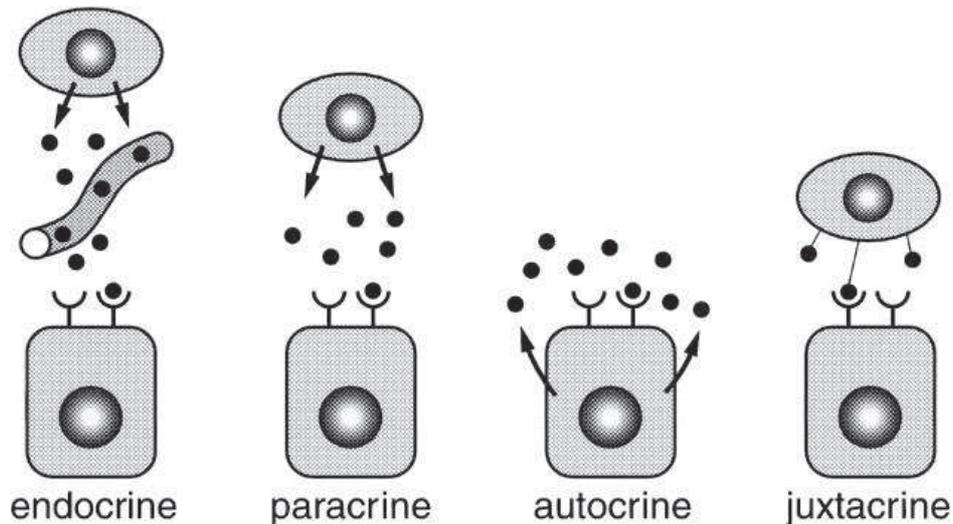
Enfin, les cytokines sont dites redondantes car plusieurs cytokines ont des effets similaires. On peut citer l'exemple des IL-2, 4 et 5 qui activent toutes les trois, la prolifération des cellules B (Fig.22).



*Figure 24 : Illustration de la redondance des cytokines. Diverses cytokines peuvent jouer des rôles identiques sur certaines tissus cibles. Par exemple, les interleukines 2, 4 et 5 ont toutes la capacité de stimuler la prolifération des cellules B.*

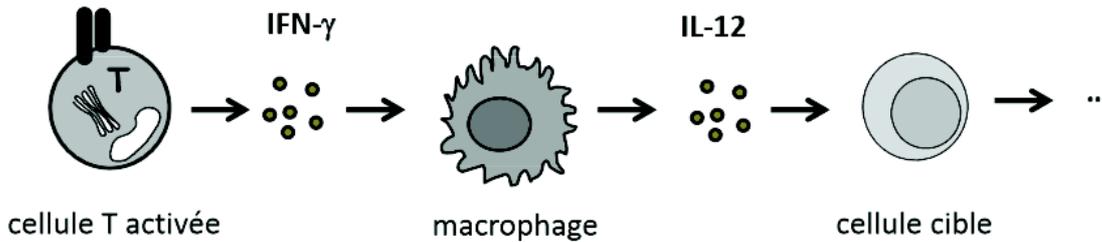
Les cytokines agissent à très faible concentration sur leur population cible, généralement de l'ordre du picomolaire. Elles possèdent diverses modes d'action (Fig.23) :

- l'action autocrine qui définit un mode selon lequel la molécule sécrétée n'agit que sur la cellule qui l'a émise. Cette dernière est donc à la fois la cellule sécrétrice et la cellule cible.
- l'action juxtacrine lorsque la molécule de signalisation ancrée à la membrane cellulaire de la cellule émettrice, se lie et active le récepteur exprimé à la surface de la cellule cible adjacente (les membranes cellulaires sont juxtaposées).
- l'action paracrine dont les effets s'exercent sur les cellules à proximité de la cellule sécrétrice. La molécule sécrétée diffuse sur de faibles distances dans l'espace immédiat de la cellule émettrice pour agir sur les cellules voisines (Furness et al., 2014).
- l'action endocrine lorsque la molécule sécrétée passe directement dans la circulation sanguine, sans passer par l'intermédiaire d'un canal excréteur, pour agir à distance de la cellule émettrice. Ce mode d'action s'oppose à la sécrétion exocrine où la molécule émise est libérée dans une cavité naturelle de l'organisme ou vers l'extérieur comme c'est respectivement le cas pour les sucs gastriques ou les larmes.



*Figure 25 : Mode d'action des cytokines. Les cytokines peuvent agir de manière autocrine, juxtacrine, paracrine ou endocrine (Abe, 2000).*

Les cytokines ont la particularité d'induire des réactions en cascade (Fig.24). Ainsi, l'interaction d'une cytokine avec une cellule induit très fréquemment la production d'une autre cytokine par la cellule cible qui elle-même induira la production d'une troisième cytokine. Les cytokines agissent également en réseau. Plusieurs cytokines peuvent agir de façon coordonnée sur l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules d'une même lignée. Les interactions au sein de ce système sont donc complexes et une même cytokine peut avoir des effets différents sur sa cellule cible suivant les autres signaux qu'elle reçoit. Les effets qui en résultent peuvent être antagonistes : les deux molécules annulent mutuellement leurs effets comme c'est le cas pour l'IL-4 et l'IFN- $\gamma$  sur un bon nombre de propriétés des cellules B (Arai et al., 1990; Balkwill and Burke, 1989; Feldmann, 1991b). Ils peuvent aussi être additifs (effet biologique qui est la simple somme des effets des molécules agissant de façon indépendante) ou bien synergiques (effet biologique des deux molécules ensemble supérieur à la somme de leurs effets pris séparément).



*Figure 26 : Exemple d'activité en cascade des cytokines. Ici l'IFN- $\gamma$  libéré par la cellule T activée induit la libération d'IL-12 par le macrophage qui va à son tour stimuler une cellule cible.*

La réponse de la cellule cible après fixation de la cytokine à son récepteur est une réponse lente car les cytokines ne sont généralement pas stockées sous forme de protéines apprêtées. En effet, la protéine est synthétisée selon les besoins, initiée par la transcription de novo des gènes. L'ARN messager produit est instable et a, de ce fait, une faible durée de vie. Les gènes codant pour les cytokines peuvent aussi produire divers transcrits à la suite de l'épissage alternatif, dont la bio-activité peut légèrement différer.

Il est également à noter que l'activité biologique de la cytokine doit faire l'objet d'un contrôle efficace à différents niveaux, pour limiter ses effets dans le temps et l'espace.

### **III-3- Récepteurs des cytokines**

Les cytokines agissent en se fixant à leur récepteur qui est généralement hétérodimérique (parfois hétérotrimérique), spécifique, de forte affinité et couplé à des tyrosines kinases. L'activation de ces récepteurs entraîne la phosphorylation du récepteur et une cascade de signalisation intracellulaire qui transduit le signal jusqu'au noyau.

Les récepteurs des cytokines sont classés selon leurs caractéristiques structurales et la présence de motifs communs dans leur structure primaire. On distingue : les récepteurs des hématopoïétines, les récepteurs des TNF, récepteurs des IFN, récepteurs de la superfamille des Ig, et les récepteurs des chimiokines.

Tous ces récepteurs aux cytokines sont différenciellement exprimés au cours de la croissance et de la différenciation cellulaire. Leur nombre est assez limité sur la cellule mais leur affinité pour le ligand est très forte.

## **IV- Les maladies inflammatoires chroniques intestinales**

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales, ou MICI, sont caractérisées par une inflammation de la paroi d'une partie du TD. Cette inflammation se manifeste par des poussées inflammatoires de durée et de fréquence variables qui alternent avec des phases de rémission pendant lesquels les signes cliniques ne sont plus visibles même si une inflammation à bas bruit perdure.

Les MICI comprennent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Dans la MC, l'inflammation peut être localisée dans tout TD mais elle se déclare le plus souvent au niveau de l'intestin dans la région iléo-caecale. Elle est dite transmurale car elle atteint toutes les couches du TD (muqueuse, sous muqueuse, etc.) et discontinue car on observe une alternance de zones saines et inflammatoires dans la région atteinte (Kirsner, 2001; Levy, 2009; Marteau et al., 2004; de Saussure and Bouhnik, 2007; Xavier and Podolsky, 2007). Dans la RCH, l'inflammation ne se manifeste qu'au niveau du rectum et du colon. Elle n'atteint que la muqueuse mais de manière continue (Buisson et al., 2012; De Dombal, 1968; Farahat K, 1999; Kirsner, 2001; Levy, 2009).

### **IV-1- Symptômes principaux**

Ces maladies ont longtemps été négligées car elles n'affectent pas directement le pronostic vital des patients. Elles impactent toutefois grandement leur qualité de vie et peuvent entraîner de graves complications.

Les principaux symptômes des MICI sont des douleurs abdominales et des diarrhées fréquentes avec passage de sang et/ou de mucus dans les fèces. La région anale peut également être touchée avec notamment l'apparition de fissures ou d'abcès. Elles s'accompagnent aussi souvent de fièvre, de fatigue et d'anorexie. Des manifestations extra-intestinales comme des atteintes oculaires, hépatiques, articulaires ou cutanées peuvent apparaître. Les patients peuvent également présenter des carences nutritionnelles dues à des problèmes d'absorption intestinale. L'intensité des crises peut être importante et nécessiter l'hospitalisation : le patient doit alors cesser de s'alimenter et être perfusé durant plusieurs jours.

Dans certains cas, la maladie conduit à un rétrécissement du segment intestinal atteint. Ce rétrécissement peut aller jusqu'à l'occlusion. Les abcès peuvent quant à eux, aboutir à la formation de fistules, nécessitant une intervention chirurgicale. Il est également important de souligner que les patients atteints de MICI ont 2 à 2,5 fois plus de risque de développer un

cancer colorectal après 10 ans d'évolution de la maladie (Gillen et al., 1994a, 1994b; Jess et al., 2004; Palli et al., 1998). C'est notamment le cas des patients atteints de la MC qui ont plus de risque de développer une prolifération anormale des cellules épithéliales au niveau des sténoses intestinales (grêle, colon) ou de la région rectale, entraînant ainsi la formation d'un adénocarcinome (Farahat K, 1999; Marteau et al., 2004; de Saussure and Bouhnik, 2007).

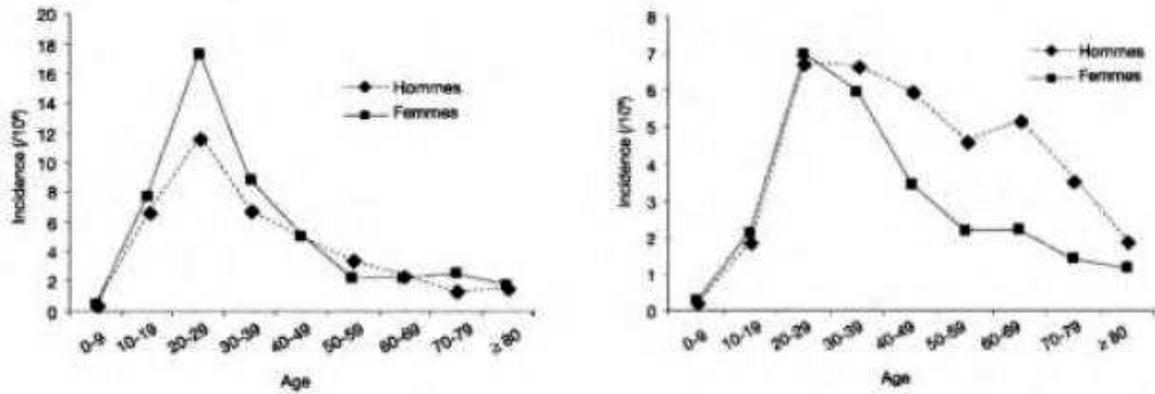
#### **IV-2- Diagnostic**

Plusieurs critères d'ordre biologique, clinique (Fakhoury et al., 2014) et d'imagerie médicale doivent être recensés pour confirmer une MICI. Le patient est d'abord interrogé sur ses symptômes. Le syndrome inflammatoire et les éventuelles carences nutritionnelles sont ensuite vérifiés grâce à un bilan biologique. Ce bilan est complété par une endoscopie digestive qui consiste à introduire au patient une sonde équipée d'une caméra dans son système digestif par les voies naturelles (en fonction de la zone touchée). L'endoscopie permet de visualiser les lésions tout en effectuant des prélèvements grâce à une pince à biopsie. Ces biopsies permettent l'étude de la muqueuse et de la sous muqueuse, incluant ainsi une partie du SNE (Neunlist et al., 2011). Une radiographie peut aussi être faite en complément pour estimer l'étendue des lésions. Les praticiens définissent ainsi un score d'activité clinique et endoscopique qu'ils continuent de renseigner tout au long du suivi du patient.

D'autres techniques d'investigation comme l'endomicroscopie confocale sont de plus en plus utilisées pour diagnostiquer la maladie avec plus de précision que l'endoscopie digestive courante (Musquer et al., 2013).

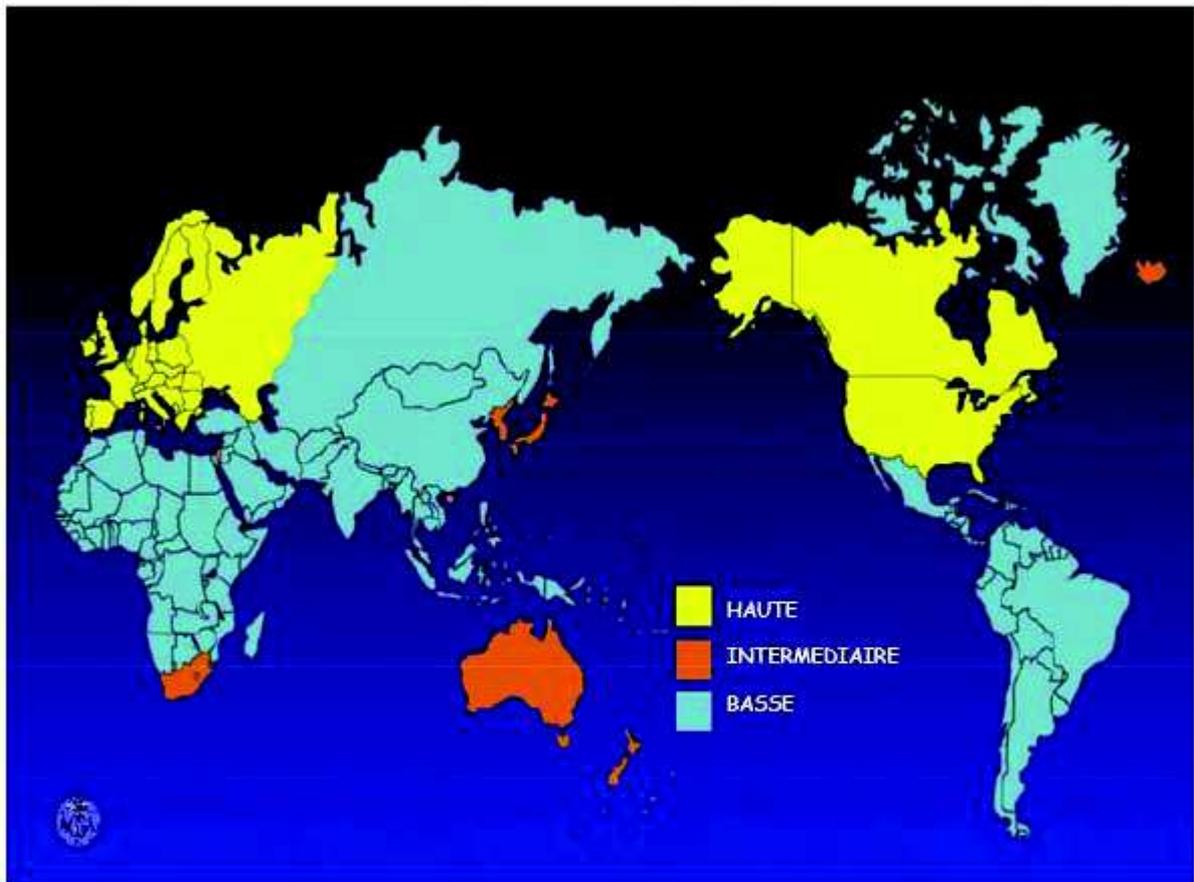
#### **IV-3- Répartition**

Les MICI surviennent le plus souvent chez des sujets jeunes. Elles peuvent cependant se déclarer à tout âge et 10% des cas recensés concernent les enfants et les personnes âgées (Cosnes et al., 2011; Langholz, 2010; Peyrin-Biroulet et al., 2010). Pour la MC, le pic d'incidence maximale se situe entre 20 et 29 ans pour les hommes et les femmes (Fig.25). Il en va de même pour la RCH en ce qui concerne la femme, mais l'âge d'apparition de la maladie chez l'homme est plus étendue puisque les premiers symptômes peuvent intervenir jusqu'à 60 ans (Lerebours et al., 2003; Molinié et al., 2004). On recense de plus en plus de cas à travers le monde quels que soient l'ethnie et l'âge (Ventham et al., 2013). Les MICI constituent donc un problème de santé majeur.



*Figure 27 : Incidence de la maladie de Crohn (MC) et de la rectocolite hémorragique (RCH) suivant l'âge et le sexe. Le pic d'incidence maximal est situé entre 20 et 29 ans pour la MC (à gauche) et la RCH (à droite). Un autre pic d'incidence est observée vers 60 ans pour la RCH chez l'homme (Lerebours et al., 2003).*

La fréquence d'apparition de la maladie est très variable suivant le pays (Fig.26) mais elle semble corrélée à son niveau de développement, les taux les plus importants étant retrouvés dans les pays industrialisés tels que les Etats-Unis ou l'Europe.

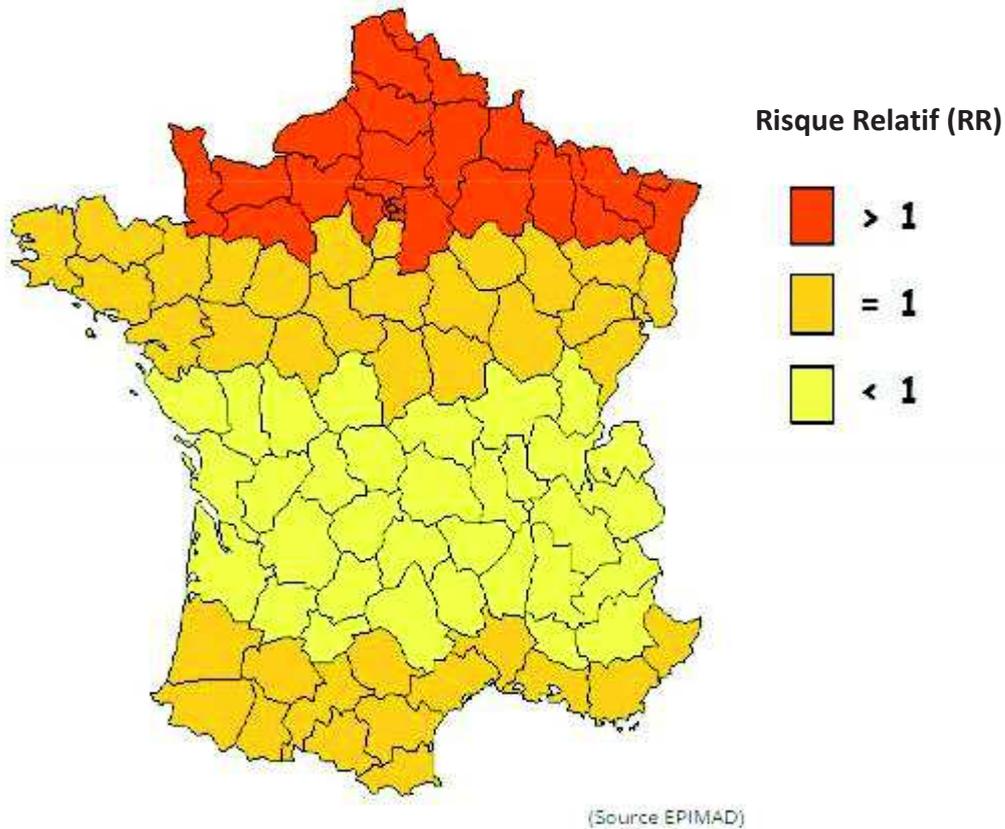


(Source ONU)

*Figure 28 : Fréquence d'apparition des MICI dans le monde. Les fréquences les plus élevées sont retrouvées dans les pays industrialisés tels que l'Europe ou les Etats-Unis (source : ONU).*

En Europe, par exemple, l'incidence est respectivement de 12,7 et 24,3 pour 100 000 personnes par an pour la RCH et la MC, avec une prévalence de 0,5% et 1% (données 2015). Dans certains pays, l'incidence a rapidement augmenté en l'espace de quelques années sans cause évidente. Ainsi, au Danemark, l'incidence a été multipliée par 2,5 entre 1978 et 2002.

En France, l'incidence de la MC est particulièrement élevée par rapport aux autres pays d'Europe (8,2 pour 100 000 habitants en 2012). On constate un gradient Nord-Sud avec une incidence plus élevée dans le tiers nord (Fig.27), à l'image de la répartition mondiale où les incidences les plus élevées sont retrouvées dans les états du Nord de l'Amérique du Nord et dans le centre du Canada.



*Figure 29 : Risque Relatif (RR) de développer une MICI suivant la localisation géographique en France. Il existe un gradient Nord-Sud avec un risque relatif maximal (>1) dans le nord de la France (source : EPIMAD).*

#### **IV-4- Etiologie des MICI**

L'étiologie de ces maladies est encore mal comprise. Les études les plus récentes ont mis en avant des causes environnementales, génétiques, bactériennes (microbiote intestinal) et immunitaires. L'héritabilité de ces maladies est encore inconnue mais la combinaison des facteurs génétiques et environnementaux conduit à l'apparition de cas familiaux.

##### **IV-4-1- Facteurs environnementaux**

Certains facteurs ont été montrés comme ayant une incidence dans la survenue des MICI. La consommation de tabac multiplie le risque de développer une MC par deux et aggrave l'évolution de la maladie, plus particulièrement chez la femme (Bernstein, 2010; Cosnes, 2004). Le mécanisme d'action du tabac est inconnu mais il pourrait favoriser la perméabilité

intestinale, la production de cytokines, et la motricité intestinale (Lakatos et al., 2007). Curieusement, la consommation de tabac a, à l'inverse, un effet protecteur pour la RCH puisqu'elle réduit le risque de 40% (Calkins, 1989; Cosnes, 2004). Le mode de vie, l'hygiène alimentaire ou la prise de médicaments pourraient également être des facteurs important dans la survenue d'une MICI (Ananthakrishnan, 2013; Cornish et al., 2008; Ekbom and Montgomery, 2004; Jantchou et al., 2010; Miner, 1997; Ponder and Long, 2013; Powell et al., 2000; Russel et al., 1998). En 2000, une méta-analyse regroupant treize études différentes a démontré que l'appendicectomie limitait d'environ 70% le risque de développer une RCH (Koutroubakis and Vlachonikolis, 2000). Cet effet pourrait être du à une modification du système immunitaire au niveau de la muqueuse après l'opération (Koutroubakis et al., 2002). Un impact de l'appendicectomie n'a pas été démontré dans le cas de la MC.

#### **IV-4-2- Facteurs génétiques**

Certains facteurs génétiques contribuent au développement des MICI avec un risque 8 à 10 fois plus important pour une personne ayant un lien de parenté avec un malade, et ce risque est encore accru chez les jumeaux (Cho and Brant, 2011). Un enfant a, ainsi, 26 fois plus de risque de développer une MC si son jumeau est atteint. Pour la RCH, ce risque est multiplié par 9 (Uhlir et al., 2014).

Le premier gène de susceptibilité au développement de la maladie de Crohn a été découvert en 2001 : il s'agit de Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) qui code pour un récepteur intracellulaire capable de reconnaître des composants bactériens dans les monocytes. Les patients atteints de la MC présentent des variants de ce gène : le récepteur devient alors défectueux, entraînant une baisse du nombre de bactéries dans les phagolysosomes. De plus, NOD2 est nécessaire à l'expression des molécules CMH-II et donc, à la présentation des antigènes aux lymphocytes CD4<sup>+</sup> (Cooney et al., 2010). En 2014, des études d'association génétique pangénomiques (GWAS pour « genome-wide association study ») ont identifié des polymorphismes au niveau d'un seul nucléotide (SNPs pour « Single Nucleotide Polymorphisms ») (Gaya et al., 2006; Zhang and Li, 2014). Des études génétiques sur des échantillons de population importants ont, quant à elles, permis d'identifier un nombre important de loci significativement liés au développement des MICI. Ces loci de gènes sont liés à des mécanismes physiopathologiques variés comme par exemple, la reconnaissance de micro-organismes, l'activation des lymphocytes, la signalisation des cytokines ou la défense par la BEI (Cho and Brant, 2011). Des gènes de susceptibilité en lien avec l'autophagie ont

aussi été identifiés dans la MC (IRGM et ATG16L1), ou le système immunitaire intestinal (Baumgart and Sandborn, 2012). La plus récente et importante étude génétique d'association portait sur plus de 75 000 adolescents et adultes contrôles ou atteints de MICI. Elle a permis d'identifier 163 loci de susceptibilité, soit environ 300 gènes candidats. Parmi ces loci, 110 conféraient un risque accru de développer les deux MICI, 30 la MC seule et 23 la RCH seule. En 2015, les résultats d'une étude inter-ethnique incluant plus de 20 000 individus, a identifié 38 nouveaux loci de gènes de susceptibilité et ceci quel que soit l'ethnie concernée, amenant ainsi le nombre de loci à 200 (Liu et al., 2015; McGovern et al., 2015). Chacun de ces loci ne contribue que pour un faible pourcentage à l'héritabilité des MICI (Uhlir et al., 2014) mais le nombre conséquent de gènes de susceptibilité laisse supposer un rôle important des facteurs génétiques dans le développement des MICI.

#### **IV-4-2-1- Formes génétiques spécifiques**

Sur l'ensemble des patients, environ 20 à 25% sont diagnostiqués avant 16 ans. Quand les MICI se manifestent chez l'enfant, elles peuvent altérer son développement et sa croissance. L'âge d'apparition de la maladie donne des informations sur le type de MICI dont il s'agit et sur les problèmes génétiques associés. En effet, si la plupart des MICI sont la résultante de l'expression d'un ensemble de gènes de susceptibilité, il existe quelques rares cas causés par un seul défaut génétique (Xavier and Rioux, 2008) : on dit alors que la maladie est monogénique. Ces formes particulières apparaissent avant 2 ans pour la forme très précoce et avant 5 ans pour la forme précoce, et elles sont alors particulièrement sévères. Les défauts génétiques entraînent notamment une altération de l'homéostasie immunitaire par différents mécanismes comme des ruptures de la barrière épithéliale, une altération de la réponse des cellules de la BEI, ainsi qu'une diminution de la clairance des bactéries par les granulocytes, les neutrophiles et autres phagocytes. Les défauts génétiques peuvent aussi causer une inflammation excessive, ou bien une rupture de la sélection et de l'activation des cellules B et T (Uhlir et al., 2014). Par exemple, les enfants portant des mutations sur le gène de l'IL-10, de l'IL10RA ou de l'IL10RB présentent des colites sévères durant les premières semaines de vie et dans ce cas, l'immunosuppression permet le retour à la normale (Pigneur et al., 2013).

Dans la plupart des cas, les facteurs génétiques ne sont responsables que d'une partie de la manifestation des MICI, supposant l'intervention d'autres facteurs comme l'environnement ou le microbiote intestinal dans la pathogénèse.

## **Epigénétique et MICI**

L'épigénétique définit des modifications transmissibles de l'expression des gènes sans que la séquence ADN soit altérée. Ces changements se manifestent dans la structure et la fonction de la chromatine. Ils permettent de faire varier le niveau d'expression et les fonctions d'un gène au sein de cellules qui partagent le même code génétique. Le mécanisme épigénétique le plus connu est la méthylation de l'ADN. C'est un mécanisme réversible et héritable au cours des divisions (Yi and Kim , 2015).

Une hyperméthylation de certains promoteurs a été clairement détectée dans les MICI. Par exemple il a été constaté une hyperméthylation dans la région promoteur du gène CDH1, qui code pour la protéine du même nom (ou cadhérine-1), dans des tissus intestinaux dysplastiques de patients atteints de RCH. La protéine CDH1 a un rôle prépondérant dans la division cellulaire (Ventham et al., 2013). Les modifications épigénétiques sont donc importantes dans l'expression phénotypique de ces pathologies. Elles permettraient d'expliquer les différences observées chez les jumeaux (Ventham et al., 2013). La méthylation des gènes est à présent étudiée en tant que biomarqueurs de MICI.

## **Micro ARNs dans les MICI**

Des études récentes suggèrent que les micro ARNs (miARNs) joueraient un rôle dans l'induction des MICI. Ces petites molécules d'ARN endogènes non codantes (monobrin) peuvent être localisées partout dans le génome : dans des séquences introniques de gènes codants, dans des régions introniques ou exoniques non codantes, ou encore dans des régions intergéniques, c'est-à-dire entre deux unités indépendantes de transcription. Certains miARNs ont leur propre promoteur et sont transcrits indépendamment des autres gènes, tandis que d'autres partagent le promoteur d'un gène ou sont co-transcrits (Kalla et al., 2015; Saini et al., 2007). Les miARNs peuvent réguler des fonctions importantes comme la différenciation, la prolifération, la transduction des signaux et l'apoptose par exemple. On estime qu'ils régulent plus de 60% des ARNs messagers codant pour des protéines et que plus d'un tiers des gènes humains sont la cible de régulation par les miARNs.

Dans le TD, ils sont impliqués dans l'homéostasie du tissu, dans la différenciation des cellules intestinales et la maintenance de la BEI (Iborra et al., 2012). Des études ont révélé un profil d'expression miARNs unique dans les organes cibles des patients RCH et Crohn ; des analyses fonctionnelles préliminaires les associent à la pathogénèse des MICI (Chapman and

Pekow, 2015). Le sang de ces patients présente aussi des profils miARNs particuliers. Si ces observations sont confirmées, les profils miARNs pourraient servir de marqueurs pour les MICI et les miARNs de cibles thérapeutiques.

#### **IV-4-3- Facteurs immunitaires**

Des mécanismes immunitaires sont à l'œuvre dans la pathogénèse des MICI et on soupçonne leur implication dans l'initiation et/ou le maintien de ces maladies (MacDermott, R.P., 1988). L'infiltration de la muqueuse intestinale par des cellules immunitaires de type macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, lymphocytes et plasmocytes dans la RCH étaye cette hypothèse. Dans la MC, des granulomes et une inflammation est observée dans toutes les couches de l'intestin. Les diverses manifestations extra-intestinales qui accompagnent souvent les MICI suggèrent également l'intervention de mécanismes d'ordre immunologique. Il est à noter que les patients atteints de MICI présentent souvent des comorbidités d'ordre immunologique comme par exemple, l'anémie hémolytique auto-immune. À l'évidence, des désordres immuologiques existent dans ces pathologies même s'il reste à définir si ces désordres en sont la cause ou la conséquence.

Les études menées sur les patients MICI sont assez difficiles à mettre en place car il existe une grande hétérogénéité entre les patients inclus : la sévérité de la maladie est variable suivant le patient, elle dure depuis plus ou moins longtemps et ils ne suivent pas nécessairement le même régime alimentaire, ni le même traitement. La plupart des traitements existants ou en préparation ont pour cibles les réponses immunitaire et inflammatoire, avec notamment le recours aux corticostéroïdes ou aux immunosuppresseurs. Bien qu'on ne connaisse pas le rôle exact du système immunitaire dans la pathogénèse de ces maladies, plusieurs hypothèses sont proposées. L'atteinte des tissus provoquée par la réponse immune pourrait refléter la réponse de l'hôte à des micro-organismes exogènes comme des bactéries ou des virus. Les personnes atteintes d'une MICI pourraient avoir acquis une régulation anormale de la réponse humorale ou cellulaire, ou avoir développer une réaction auto-immune envers des composants normaux et/ou altérés du soi. D'autres mécanismes inconnus pourraient également être en cause.

##### **IV-4-3-1- Réponse humorale : autoanticorps et réponse altérée**

Des anomalies de la réponse humorale ont été observées chez les patients atteints de MICI.

Tout d'abord, il a été observé que les lymphocytes B des patients atteints de MICI sécrétaient davantage d'immunoglobulines que ceux des patients contrôles (MacDermott and Nahm, 1987; MacDermott and Stenson, 1988). De plus, parmi les immunoglobulines sécrétées, on note une plus forte proportion d'IgG dans la muqueuse des patients MICI par rapport aux IgM et IgA. Dans la RCH, ce sont plutôt les sous-types IgG1 et IgG3 qui sont augmentés, et dans la MC, le sous type IgG2. Ces immunoglobulines ont un rôle important dans la réponse inflammatoire et dans les dommages causés à la muqueuse. La sécrétion d'IgA est à l'inverse diminuée chez ces patients. Parmi les IgA produites, on note une plus grande proportion de monomères, et ce sont plus particulièrement des IgA1 qui sont sécrétées (Kett and Brandtzaeg, 1987; MacDermott et al., 1986a).

Une autre anomalie détectée dans la circulation des patients atteints de MICI, est la fréquence d'anticorps dirigés contre des composants de cellules épithéliales ou de bactéries comme E.Coli. Cette observation étaye l'hypothèse selon laquelle des antigènes du non-soi comme les antigènes bactériens, pourraient stimuler une réaction autoimmune par cross-réactivité avec les antigènes du tissu intestinal. La quantité d'anticorps détectée ne semble pas corrélérer avec la sévérité et l'étendue de la maladie mais de tels anticorps ont été retrouvés chez les personnes ayant un lien de parenté avec les patients MICI (Lagercrantz et al., 1971). L'importance de ces autoanticorps dans la pathogénèse des MICI reste à définir mais il a été montré que les IgG de patients RCH réagissaient spécifiquement envers le tissu intestinal de leur hôte mais pas contre un tissu intestinal contrôle (Nagai and Das, 1981). D'autres chercheurs ont montré que ces immunoglobulines réagissaient contre une protéine présente sur les CEI normales ou pathologiques, mais pas avec les autres tissus. Ces observations suggèrent la présence d'un autoantigène colon spécifique (Das et al., 1978, 1987; Takahashi and Das, 1985; Takahashi et al., 1990). Ce type d'IgG n'a pas été retrouvé chez les patients atteints de la MC mais plusieurs protéines issues de leur tissu intestinal sont reconnues spécifiquement par des anticorps sériques présents chez ces patients (Bagchi and Das, 1984; Bagchi et al., 1986).

Enfin, il a été montré que certains patients Crohn et RCH produisaient une faible quantité d'IgG en réponse à une vaccination contre la toxine tétanique ou diphtérique. (Stevens et al., 1985). Cette difficulté à produire des anticorps dirigés contre des toxines soutient l'hypothèse d'une altération de la réponse humorale chez les patients atteints de MICI.

#### **IV-4-3-2- Réponse immunitaire cellulaire**

Différentes études sur le nombre de cellules T et B circulantes et leurs réponses aux divers stimuli ont donné des résultats assez contradictoires.

Des études immunohistologiques ont montré une diminution de la proportion d'IELs possédant le TCR  $\gamma/\delta$  dans le colon des patients Crohn, et encore plus dans celui des patients RCH (Fukushima et al., 1991). En revanche, la proportion de cellules exprimant CD45 RO (cellules T mémoires) semble augmentée dans la muqueuse des patients Crohn (James, S.P., 1988) ainsi que différents marqueurs d'activation sur les cellules T et B issues de patients Crohn (Schreiber et al., 1991). Les lymphocytes isolés de la lamina propria des patients RCH, ont quant à eux, pour caractéristique de répondre faiblement à une stimulation par la phytohaemagglutinine ou la concanavaline A.

#### **IV-4-3-3- Potentiels mécanismes d'action**

Des études ont révélés que les lymphocytes périphériques des patients MICI (mais pas des patients atteints d'autres maladies) étaient cytolytiques pour des cellules épithéliales du colon et spécifiquement pour ces cellules (Shorter et al., 1969a, 1969b). De façon fort intéressante, il a été montré que des lymphocytes issus de patients contrôles devenaient elle-aussi cytolytiques vis-à-vis des cellules épithéliales du colon si elles étaient préalablement incubées dans le sérum de patients MICI. Des résultats similaires ont été retrouvés avec des cellules mononucléées (Shorter et al., 1984). Cette cytotoxicité serait générée par des cellules immunitaires, mais elle serait dépendante d'anticorps présents dans le sérum des patients MICI (absents du sérum de patients contrôles), et dirigée contre un antigène présent sur les cellules épithéliales du colon. Le même phénomène est observé chez les patients atteints d'un cancer, mais les mécanismes d'action sont différents (Shorter et al., 1984). Selon certaines d'études, les lymphocytes des patients MICI pourraient être sensibilisés aux antigènes bactériens (microbiote intestinal) ou des cellules épithéliales du colon (Bull and Ignaczak, 1973) mais rien ne permet de déterminer si c'est une cause primaire ou secondaire.

Certaines cytokines libérées pendant l'inflammation dans les MICI, comme l'IFN $\gamma$ , stimule l'expression des molécules de présentation d'antigène CMH-II sur les cellules épithéliales du colon des patients MICI (Mayer et al., 1991; Poulsen et al., 1986; Selby et al., 1983). Les cellules épithéliales activent ainsi préférentiellement des cellules T CD4<sup>+</sup> contrairement au cas contrôle où ce sont essentiellement des cellules CD8<sup>+</sup> qui sont activées.

#### **IV-4-3-4- Complexe immunitaire et système du complément**

Les études sur les complexes immuns sont très controversées. Certaines indiquent une augmentation des complexes immuns dans les MICI, d'autres non (Elmgreen et al., 1985; Hodgson et al., 1977a; Kemler and Alpert, 1980; Knoflach et al., 1986; Nielsen et al., 1978; Soltis et al., 1979). La production de certains complexes immuns ne semblent pas corrélés avec l'activité de la maladie et ses manifestations extra-intestinales (Knoflach et al., 1986). En revanche, chez les patients RCH, des dépôts des IgG1 et C3b ont été détectés à la surface des CEI du côté luminal (Halstensen et al., 1990). Cette observation a conduit à l'hypothèse que l'activation du système du complément dans les vaisseaux pourrait causer des lésions continues dans les MICI, secondairement au processus inflammatoire et à la formation des complexes immuns (Halstensen et al., 1989). L'altération du système du complément, la consommation des protéines de ce système, et la baisse de composants de la voie alternative d'activation du complément (properdine et properdine convertase) dans le sérum des patients MICI ont aussi été notés chez les patients MICI (Hodgson et al., 1977b; Lake et al., 1979).

#### **IV-4-3-5- Médiateurs solubles**

Les médiateurs solubles ont un rôle important dans la pathogénèse des réponses inflammatoires. Ils incluent des cytokines pro- ou anti-inflammatoires, des molécules du chimiotactisme, des facteurs d'activation, des eicosanoïdes (leucotriènes, prostaglandines), des quinines et des amines vasoactives (histamine, sérotonine). Ces facteurs importants dans le développement et le maintien des processus inflammatoires observés dans des MICI, constituent de potentielles cibles thérapeutiques.

La synthèse des prostaglandines est par exemple, une cible dans le traitement des MICI grâce à l'utilisation de corticostéroïdes, de sulfasalazine ou de 5-aminosalicylate (5ASA). L'inhibition de la synthèse des prostaglandines corrèle avec l'inhibition de la cytotoxicité générée par les cellules mononucléées chez les patients MICI et contrôles (MacDermott et al., 1986b). De plus, il a été montré que la prostaglandine PGE2 dont l'expression est augmentée dans la muqueuse et le sang des patients RCH, a un niveau d'expression diminué après traitement avec des corticostéroïdes ou du sulfasalazine (Sharon et al., 1978). Une diminution similaire a été observée avec des traitements anti-inflammatoires non stéroïdiens. Une augmentation du leucotriène LTB4 a également été observée dans la muqueuse des patients MICI (Di Gennaro and Haeggström, 2014). Ce médiateur lipidique est un puissant agent chimiotactique pour les polynucléaires. Il a également pour effet d'augmenter la perméabilité

vasculaire et la sécrétion des glandes muqueuses. Sa production est diminuée par l'administration de corticostéroïdes ou de 5ASA.

Certaines cytokines comme l'IL-1 $\beta$  est également une cible thérapeutique potentielle en cas de MICI. Cette cytokine produite par les macrophages et les monocytes dans la lamina propria, est augmentée chez les patients atteints de MICI. Elle aurait un rôle en régulant la production et la fonction des autres médiateurs de l'inflammation (Cominelli et al., 1989, 1990a). La baisse de l'inflammation colique et de la production de LTB<sub>4</sub> et de PGE<sub>2</sub> après administration d'un antagoniste du récepteur à l'IL-1 dans des modèles expérimentaux de colites, fut un des arguments avancés pour utiliser la perte de fonction de certaines cytokines comme stratégie pour limiter l'inflammation en cas de MICI (Cominelli et al., 1990b, 1992) mais ce sont des anticorps anti-TNF qui ont, en fait, révolutionné le traitement des MICI. En effet, en 1996, des analyses ont révélé que cette cytokine produite par les macrophages et à moindre degré par les lymphocytes T (Papadakis and Targan, 2000), était synthétisée de manière excessive dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MICI (Reimund et al., 1996). Or cette molécule joue un rôle central dans le développement d'une inflammation. Elle est capable d'induire la libération de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 ou l'IL-6, et d'inhiber la production de cytokines anti-inflammatoires. Elle a également pour effet de stimuler la migration des leucocytes ainsi que l'activité des neutrophiles et des éosinophiles. Enfin, elle a un réel impact sur la perméabilité intestinale qui a pour effet de favoriser l'entrée des antigènes et renforcer la réaction inflammatoire.

Pour contrecarrer l'effet délétère du TNF chez les patients MICI, différentes molécules ont été produites. On distingue les anticorps monoclonaux anti-TNF (l'infliximab, l'adalimumab, le CDP571, etc), les récepteurs solubles comme l'éta nercept qui inhibent de façon compétitive la liaison du TNF à ses récepteurs de surface, ou des agents non biologiques comme les anti-métalloprotéinases qui inhibent le clivage du propeptide précurseur du TNF. Parmi ces molécules, les anticorps monoclonaux sont les plus utilisés mais ils ne sont administrés qu'en seconde intention à des patients ne répondant pas aux traitements conventionnels car ils entraînent beaucoup d'effets secondaires. L'infliximab, efficace et relativement bien toléré, est notamment prescrit en cas de MC réfractaire ou compliquée de fistules. Il est à noter qu'une large proportion de patients ne répond pas à ce type de médicaments. En effet, on estime à 30% la proportion de patients non-répondants et à plus de 50%, la proportion de répondants devenant réfractaires au cours de la première année de traitement (Nielsen et Ainsworth, 2013 ; Steenholdt et al., 2014). Ces observations suggèrent que bloquer le TNF

n'est pas toujours suffisant au moins pour un traitement à long terme. De ce fait, même si les traitements anti-TNF sont une révolution dans la prise en charge des patients atteints de MICI, il reste donc important de rechercher d'autres cibles thérapeutiques.

La cause des MICI reste à déterminer mais une des hypothèses avancées serait une réponse excessive de l'hôte envers un antigène environnemental ou bien encore, une réaction autoimmune (cross-réaction). Une fois la réponse immunitaire initiée, l'ensemble des médiateurs et cellules de l'inflammation contribuerait à l'altération du tissu intestinal.

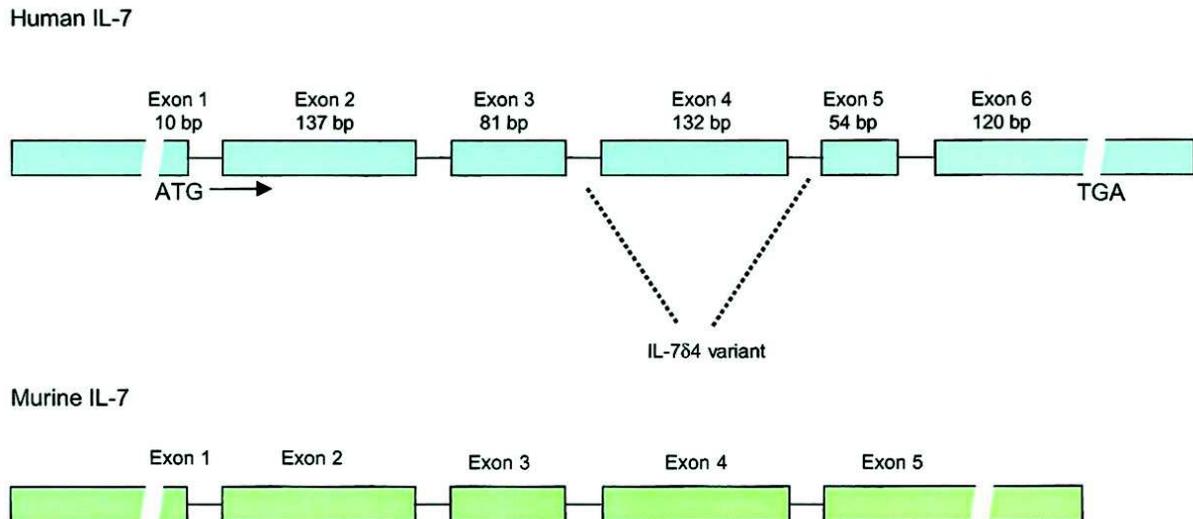
## **V- L'Interleukine-7 : un rôle dans les MICI ?**

### **V-1- L'interleukine-7**

#### **Gène IL-7**

Chez le rat, le gène de l'interleukine-7 (IL-7) compte environ 56 kilobase (kb), est localisé sur le chromosome 2 (2q23), comporte cinq exons (Fig.28) et aucun variant d'épissage n'a été décrit (Gene ID: 25647).

Chez l'homme, le gène de l'IL-7 compte autour de 33 kb, est localisé sur le chromosome 8 (8q13-13) (Goodwin et al., 1989) et possède un insert supplémentaire de 54 paires de bases (pb) par rapport à son homologue murin (Lupton et al., 1990). Cet insert additionnel codé par l'exon 5 du gène humain donne une séquence supplémentaire de 18 acides aminés (aa) qui n'aurait pas d'impact particulier sur l'activité biologique de la protéine. Le gène humain possède six exons qui peuvent donner lieu par épissage alternatif à plusieurs transcrits d'ARN. Le premier variant a été décrit dans les cellules d'enfants atteints de leucémie lymphoblastique (Korte et al., 1999). Ce variant a été appelé IL-7  $\delta$ 4, en raison de l'absence de l'exon 4. D'autres variants ont ensuite été décrits comme l'IL-7  $\delta$ 5 auquel il manque l'exon 5. L'IL-7  $\delta$ 4/5, l'IL-7  $\delta$ 3/4 et l'IL-7  $\delta$ 3/4/5 se caractérisent par l'absence de combinaisons particulières d'exons. Des transcrits présentant des variations en dehors du cadre de lecture ont aussi été identifiés dans des cellules hématopoïétiques humaines transformées (Korte et al., 1999). Ils sont appelés IL-7(-56bpExon2), IL-7  $\delta$ 4(-56bpExon2), et IL-7  $\delta$ 3/4/5(-56bpExon2).



*Figure 30 : Représentation schématique de la structure du gène de l'IL-7 humaine (Human IL-7) et murine (Murine IL-7). Le gène humain consiste en 6 exons et le variant IL-7 $\delta$ 4 a perdu l'exon 4 au cours de l'épissage alternatif. Le gène murin comporte, quant à lui, 5 exons et aucun variant d'épissage n'a été décrit (Fry and Mackall, 2002).*

Les ADNc de l'IL-7 murin et humain présentent de fortes homologies dans la région codante (81%) et des homologies moins importantes dans la région non codante 5' (73%) et 3' (63%).

L'expression de l'IL-7 est régulée, notamment grâce à huit sites d'initiation distribués sur une séquence régulatrice de 200 pb située dans la région 5' non codante de l'ADNc. La séquence canonique TATA (T pour Thymine, A pour Adénine) et les autres séquences régulatrices généralement retrouvées au niveau des promoteurs des gènes eucaryotes sont absentes de la région 5'. En revanche, des séquences de reconnaissance pour des protéines régulatrices de type « hélice-boucle-hélice » ont été retrouvées au niveau 5' dans les gènes humains et murins.

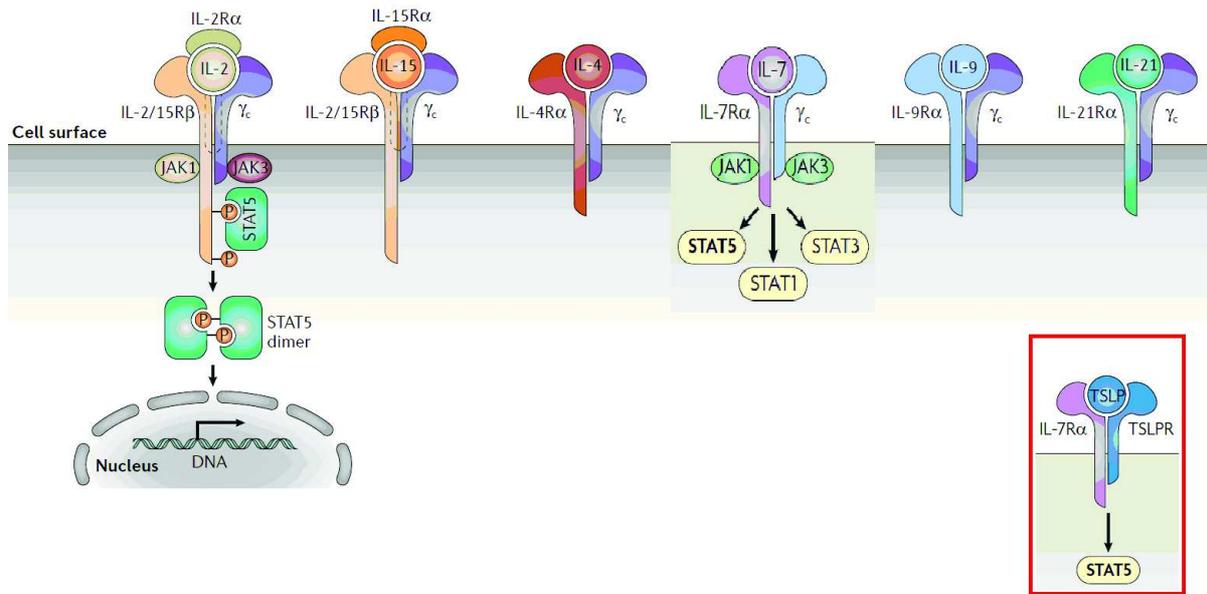
### **Protéine IL-7**

L'IL-7 est une glycoprotéine d'environ 25 kDa qui est sécrétée sous forme de monomère. La séquence protéique prédite à partir de l'ADNc murin est de 129 aa (Namen et al., 1988) (GenBank accession number X07962), alors que pour l'homme, elle est de 152 aa (GenBank accession number J04156). La protéine possède trois sites de glycosylation qui ne sont pas

essentiels à la bioactivité de la protéine contrairement aux six résidus cystéine hautement conservés. A l'inverse de bon nombre de cytokines et de facteurs de croissance, il existe pour l'IL-7 une réactivité croisée inter-espèces, avec des activités comparables (Goodwin, R.G., 1992). Une fois purifiée, la protéine est relativement stable et résistante à la dénaturation (dans 1% de SDS), aussi longtemps que le pont disulfure est stable lui-même. Aucune isoforme de l'IL-7 n'a été décrite chez le rat mais chez l'Homme, il a été répertorié plusieurs isoformes qui dérivent des différents variants d'épissage.

### **V-2- Le récepteur à l'IL-7**

L'IL-7 agit en se fixant sur un récepteur composé de la sous-unité IL-7R $\alpha$  (ou IL-7RA), encore appelé CD127, et de la sous-unité  $\gamma_c$ , aussi appelée IL-2RG ou CD132 (Fig.29). La sous-unité IL7R $\alpha$  est spécifique de l'IL-7 et de la molécule TSLP pour « Thymic Stromale Lymphopoïétine ». La sous-unité  $\gamma_c$  est la chaîne commune des récepteurs aux interleukines (IL-2, 15, 4, 9 et 21). En l'absence de fonction catalytique au niveau du domaine intracellulaire de ces deux sous-unités, les signaux transmembranaires sont transmis grâce à des protéines associées telles que Janus Kinase (JAK) 1 (associé à IL-7R $\alpha$ ) et JAK3 (associé à  $\gamma_c$ ). La liaison de l'IL-7 à la sous-unité IL-7R $\alpha$  induit son hétérodimérisation avec la chaîne  $\gamma_c$ , et par voie de conséquence, la juxtaposition des JAK associées à leurs domaines intracellulaires respectifs. Cette dimérisation entraîne leur phosphorylation réciproque, qui a pour effet d'activer une Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) ainsi que le recrutement des protéines « Signal Transducers and Activators of Transcription » (STAT) 5a et 5b qui après phosphorylation et dimérisation seront transloquées jusqu'au noyau pour exercer leur rôle de facteurs de transcription (Dibirdik et al., 1991; Sharde, 1995; Uckun et al., 1991a, 1991b).



*Figure 31* : Le récepteur de l'interleukine-7. Le récepteur de l'IL-7 est composé de deux sous-unités : la sous-unité  $\gamma_c$  commune à plusieurs interleukines, et la sous-unité IL-7R $\alpha$  commune à l'IL-7 et à la TSLP (encadré rouge). Le signal transmembranaire est transmis grâce aux protéines JAK1 et JAK3 qui vont agir sur des activateurs de transcription tels que STAT5. Adapté de (Waldmann, 2006).

### Gènes du récepteur à l'IL-7

Le gène de la sous-unité IL-7R $\alpha$  est localisé sur le chromosome 5p13 chez l'homme (Lynch et al., 1992) et le gène murin vers la fin proximale du chromosome 15. Ils comportent huit exons, réparties sur 19 kb (gène humain) et 24 kb (gène murin) (Pleiman et al., 1991).

Il est donc situé à proximité des gènes des autres membres de cette superfamille de récepteurs qui comprend les récepteurs de la prolactine et des hormones de croissance (HGF pour Human Growth Factor). L'analyse du gène murin a révélé la présence en 5' d'un élément fonctionnel de réponse à l'interféron capable de fixer les facteurs de transcription IRF-1 et IRF-2 (Interferon Regulatory Factor). Cet élément est fonctionnel (Pleiman et al., 1991).

La sous-unité  $\gamma_c$  a, quant à elle, été identifiée en 1992 par Takeshita et ses collaborateurs lors de la mise en évidence d'une troisième sous-unité pour le récepteur à l'IL-2. Initialement, dénommé IL-2R $\gamma$ , cette sous-unité partagée par d'autres récepteurs de cytokines est à présent appelé chaîne commune  $\gamma_c$  (Kondo et al., 1993; Noguchi et al., 1993a; Russell et al., 1993).

Son ADNc code pour une protéine de 369 aa de masse moléculaire de 39.9 kDa, et l'analyse des séquences a révélé d'importantes homologies avec les ADNc des autres membres de la famille des récepteurs aux cytokines (Nicola, N. A., 1994). Une étude par northern blot a permis de détecter un ARNm majoritaire de 1,8 kb et un ARNm minoritaire de 3.6 kb dans les cellules T et B humains (Takeshita et al., 1992). Les transcrits codant pour la chaîne commune  $\gamma$ c n'ont pas été détectés dans les cellules non lymphoïdes humaines comme les cellules épithéliales ou les hépatocytes (Takeshita et al., 1992). Chez l'homme, le gène de la chaîne commune  $\gamma$ c comporte huit exons, fait autour de 4,2 kb (Noguchi et al., 1993b) et est situé sur le chromosome X (Xq13.1) (Puck et al., 1993). Comme pour l'homme, le gène murin de la chaîne commune  $\gamma$ c comporte huit exons et est localisé sur le chromosome X (Xq31) (<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:96551>).

### **Protéines du récepteur à l'IL-7**

Chez l'homme, la sous-unité IL-7R $\alpha$  est d'abord produite en tant que précurseur de 459 aa avec un peptide signal de 20 aa (GenBank accession number M29696). Elle possède un domaine extra-cellulaire de 219 aa, un domaine transmembranaire de 25 aa, et un domaine cytoplasmique de 195 aa. D'après sa séquence, la protéine mature a un poids moléculaire de 49 500 kDa mais les analyses par SDS-PAGE indiquent un poids moléculaire d'environ 75 000 kDa. Cette différence est probablement due à des modifications post-traductionnelles, notamment au niveau des sites de N-glycosylation (Goodwin et al., 1990). De par l'homologie de sa structure primaire avec celle d'autres récepteurs aux cytokines, l'IL-7R $\alpha$  a été classé comme un membre de la superfamille des récepteurs aux hématopoïétines. Le domaine intracytoplasmique n'a pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. La partie extracellulaire de l'IL-7R $\alpha$  ne possède que deux des quatre résidus cystéine présents chez les autres membres de cette famille mais il possède bien le motif commun Trp-Ser-X-Trp-Ser (Trp pour Tryptophane, Ser pour Sérine). Des variants d'épissage caractérisés par l'absence des domaines transmembranaires et cytoplasmiques ont été identifiés (Goodwin et al., 1990; Pleiman et al., 1991). Ils codent pour une forme soluble capable de lier l'IL-7 avec une forte affinité. D'autres membres de cette famille de récepteurs sont aussi capables de produire des formes solubles, soit par épissage des transcrits, soit par l'action de protéases. Le rôle physiologique de ces formes solubles est encore mal connu mais elles pourraient jouer un rôle d'inhibiteur ou de transporteur de leurs ligands respectifs. L'IL7R $\alpha$  murin (GenBank accession number M29697) a une séquence protéique de 459 aa et montre 64% d'homologie

avec la protéine humaine. Aucune forme soluble de l'IL7R $\alpha$  murin n'a été identifiée (Pleiman et al., 1991).

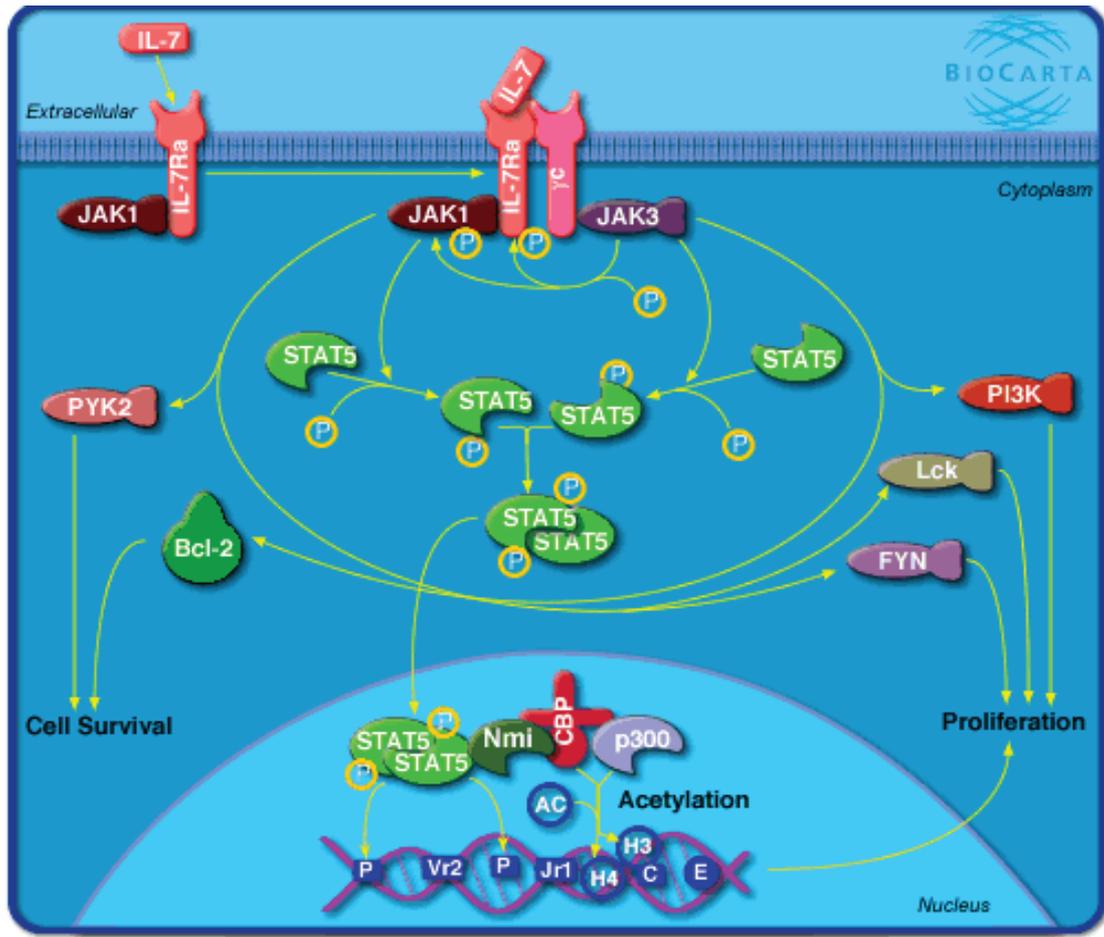
La liaison de l'IL-7 à l'IL-7R $\alpha$  serait biphasique avec tout d'abord la liaison des composants de haute affinité ( $K_a$  de  $5.10^9$  à  $5.10^{10} M^{-1}$ ) puis la liaison des composants de basse affinité ( $5.10^7$  à  $1.10^9 M^{-1}$ ) à la sous-unité du récepteur (Goodwin et al., 1990).

D'après l'ADNc humain, la sous-unité  $\gamma$ c est une protéine de 369 aa de masse moléculaire de 39.9 kDa qui comporte une séquence signal de 22 aa, un domaine extracellulaire de 232 aa, un domaine transmembranaire de 29 aa et un domaine cytoplasmique de 86 aa (GenBank accession number D11086) (Takeshita et al., 1992). La migration sur SDS-PAGE révèle une protéine de 64 kD. Le domaine extracellulaire comporte quatre résidus cystéine conservés et un motif WSXWS caractéristique de la famille des récepteurs aux hématopoïétines. Le domaine intracytoplasmique est très court. Il contient un domaine SH2 mais pas de motif catalytique apparent (Sprang, S. R. & Bazan, J. F., 1993).

La séquence protéique prédite à partir de l'ADNc murin, présente 70% d'homologie avec la séquence humaine, incluant les résidus cystéine, le motif WSXWS et le domaine SH2 intracytoplasmique mais ce dernier est moins conservé dans la séquence murine (Cao et al., 1993).

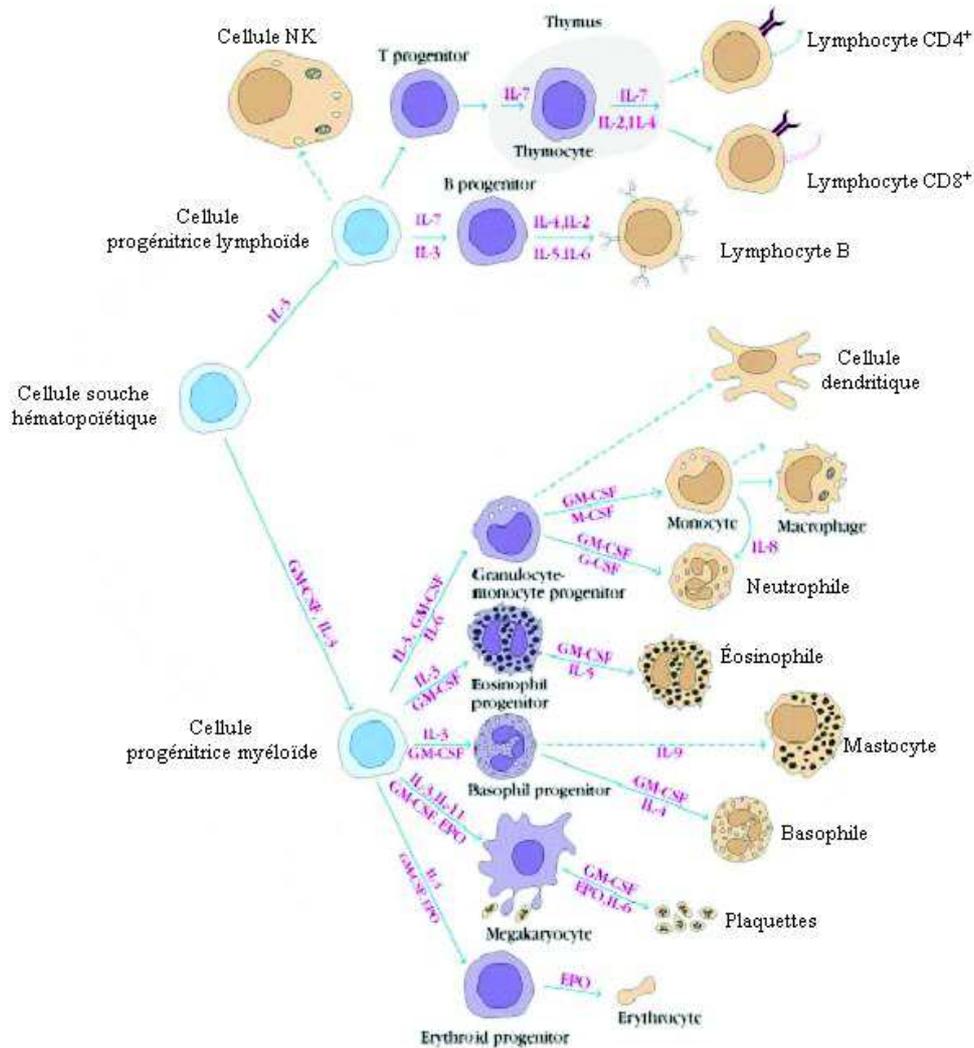
### **V-3- Les fonctions biologiques de l'IL-7**

Initialement identifiée comme un facteur de croissance pour des cellules pre-B isolées du stroma de la moelle épinière, l'IL-7 s'est rapidement révélé être un facteur indispensable au développement des lymphocytes T (Conlon et al., 1989; Henney, 1989; Suda et al., 1990). Fortement exprimé dans les organes lymphoïdes primaires comme la moelle osseuse et le thymus, l'IL-7 assure la survie et la prolifération des progéniteurs B et T (Fig.30). Au sein du thymus, elle contribue à la formation et à la survie des différents sous-types de lymphocytes T, notamment les CD4<sup>+</sup> et les CD8<sup>+</sup> (Alderson et al., 1990) (Fig.31). En périphérie, elle stimule la prolifération et la fonction des cellules CD4<sup>+</sup>, mais encore plus des cellules CD8<sup>+</sup> (Geiselhart et al., 2001). Il a également été montré un rôle de l'IL-7 dans la survie des cellules T matures mémoires et naïves et le maintien de l'homéostasie de la population T (Park et al., 2010; Porter and Malek, 2000; Van De Wiele et al., 2004; Yu et al., 2006).



*Figure 32 : Voie de signalisation de l'IL-7. En se fixant à son récepteur, l'IL-7 va notamment activer la transcription de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire (Totsuka et al., 2007a).*

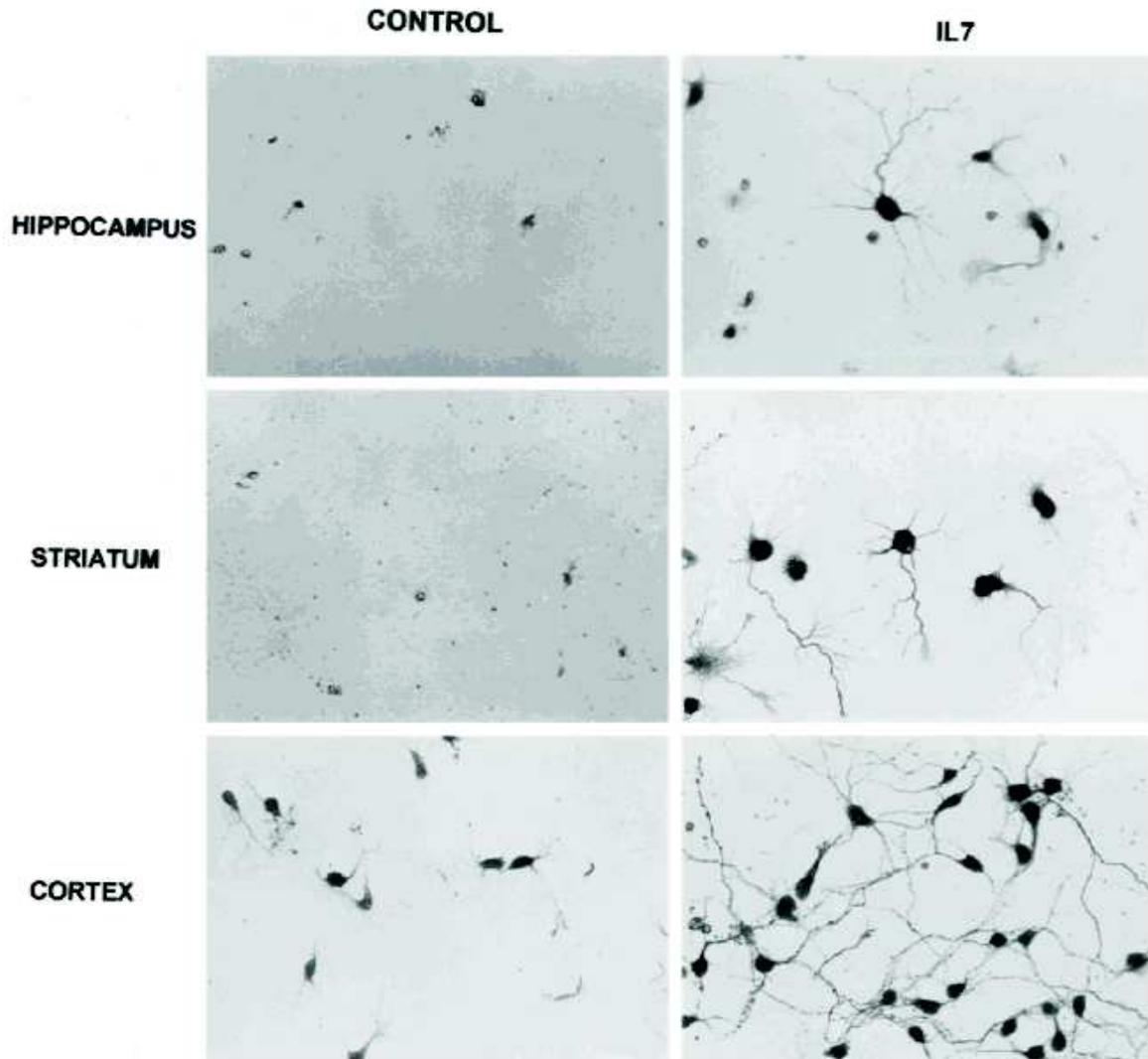
En périphérie, l'IL-7 a également un impact sur les monocytes. L'administration d'IL-7 chez la souris stimule le recrutement des monocytes/macrophages dans l'endothélium (Li et al., 2012). Le traitement de monocytes/macrophages par de l'IL-7 stimule leur activité cytotoxique probablement en partie due à l'up-régulation d'IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ . (Alderson et al., 1991).



*Figure 33 : Implication de l'IL-7 dans la leucopoïèse. L'IL-7 intervient à différents niveaux dans la leucopoïèse. Elle contribue par exemple à la formation et à la survie des différents sous-types de lymphocytes T (Goldsby RA, 2000).*

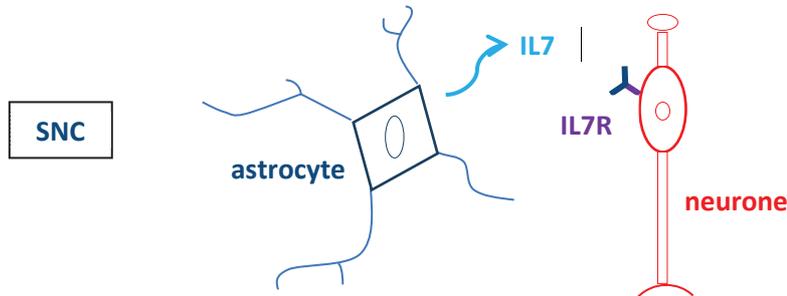
Outre son implication dans la lymphopoïèse et dans l'homéostasie du système immunitaire, l'IL-7 pourrait également avoir un rôle dans le développement ou la maintenance du système nerveux. Une première série d'expériences avait montré que l'IL-7 favorisait la survie des neurones de l'hippocampe de rat *in vitro* mais les neurones étant cultivés en présence d'astrocytes, les auteurs n'avaient pu conclure à un effet direct ou indirect (Araujo and Cotman, 1993). En 1996, Michaelson et al., ont réitéré la même expérience avec des cultures pures de neurones. Ils ont alors montré que l'IL-7 avait un effet direct sur la survie et la

neuritogénèse des neurones de l'hippocampe ou du cortex de rat (Fig.32). La présence de transcrits codant pour l'IL-7R dans ces cultures de neurones et leur absence dans les cultures d'astrocytes supportent cette hypothèse (Michaelson et al., 1996).



*Figure 34 : Effets neurotrophiques de l'interleukine-7. L'addition d'IL-7 augmente le nombre de neurones (survie) et favorise le développement de neurites dans des cultures de neurones préparées à partir de différentes aires cérébrales d'embryons de rat (Michaelson et al., 1996).*

En revanche, la présence de transcrits codant pour l'IL7 dans les cultures de neurones et d'astrocytes (Michaelson et al., 1996) ouvre la possibilité d'un effet neurotrophique de l'IL-7 produit par les astrocytes sur les neurones portant le récepteur à l'IL7 (Fig.33).



*Figure 35 : Interaction IL-7/IL-7R dans le SNC. L'IL-7 produit par les astrocytes stimulerait la survie et la poussée neuritique de neurones centraux (hippocampe, cortex, striatum).*

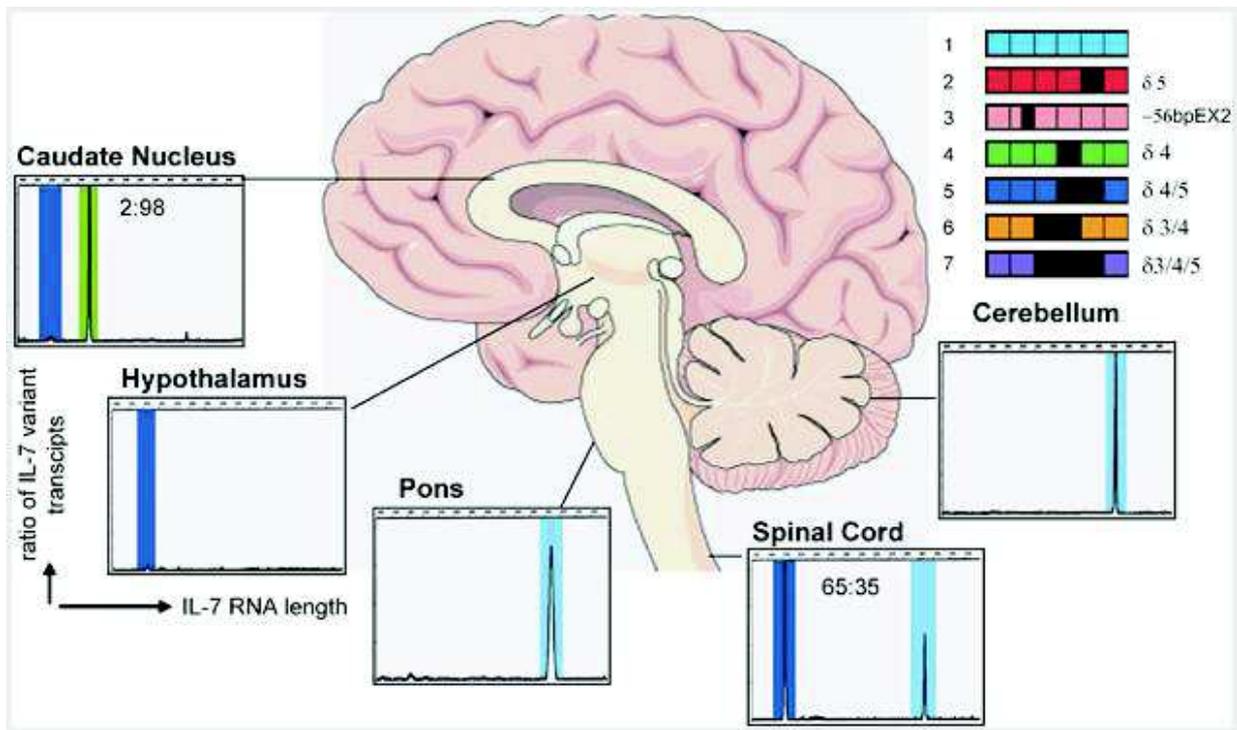
Un effet de l'IL-7 sur la différenciation des progéniteurs neuronaux a été confirmé par deux autres études (Mehler et al., 1993; Rozental et al., 1998) La mise en évidence d'une expression de l'IL-7 et de son récepteur dans le cerveau de rat au cours de son développement et chez l'adulte suggère un potentiel rôle de cette cytokine dans le SNC (Michaelson et al., 1996).

#### **V-4- Les fonctions biologiques des isoformes d'IL-7**

Chez l'Homme, on distingue plusieurs isoformes de l'IL-7, et quelques études ont tenté de déterminer si certaines de ces isoformes avaient une activité distincte.

Une équipe de chercheurs s'est par exemple intéressée à la répartition des différentes isoformes de l'IL-7 dans le cerveau humain. Ils ont ainsi montré que certaines isoformes pouvaient n'être exprimées que dans des régions bien particulières (Fig.34). Par exemple, seule la forme canonique de l'IL-7 (IL-7 full pour « full length ») est exprimée dans le cervelet et le pont. Dans le noyau caudé, seule l'IL-7  $\delta 4$  a été détectée. Les chercheurs ont également observé une différence d'effet des isoformes sur la différenciation de cellules progénitrices neurales humaines (PNH), En effet, le traitement de neurosphères avec de l'IL-7 full ou ses isoformes, stimulait la différenciation des PNH en neurones et en cellules gliales mais certaines molécules favorisaient la voie de différenciation des PNH en cellules gliales

(IL-7 full > IL-7  $\delta 4/5$  > IL-7  $\delta 5$ ), démontrant un niveau d'activité propre à chaque isoforme. Le rôle exact de l'IL-7 et de ses isoformes dans le cerveau reste à définir mais ces observations suggèrent que ces molécules pourraient contribuer à la spécialisation et la diversité des cellules neurales dans le cerveau (Moors et al., 2010).



*Figure 36 : Expression des variants d'ARNm de l'interleukine-7 dans le cerveau de l'Homme adulte. Une couleur a été attribuée à chaque transcrite et les sites de délétion par rapport à la forme canonique (bleu ciel) sont indiqués en noir. Dans le SNC, l'ARNm de la forme canonique de l'IL-7, n'est par exemple, exprimée que dans le cervelet, le pont et la moelle épinière (Moors et al., 2010).*

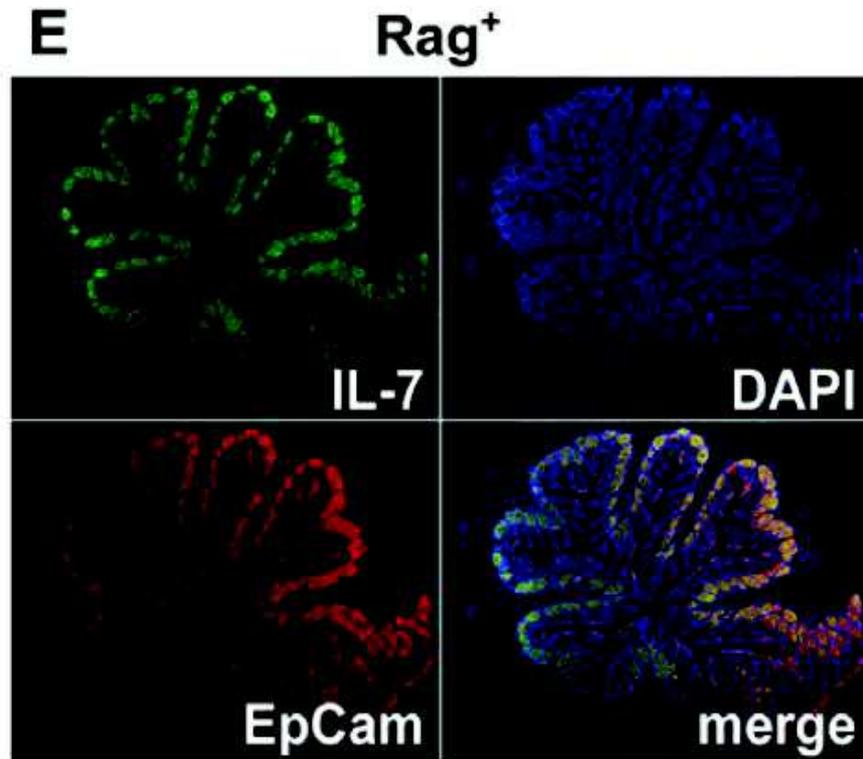
La fonction des isoformes de l'IL-7 dans le système immunitaire a, jusqu'à ce jour été très peu étudiée. Une étude s'est néanmoins intéressée aux effets de l'IL-7 full, l'IL-7  $\delta 5$ , l'IL-7  $\delta 4$  et l'IL-7  $\delta 4/5$  sur les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC pour Peripheral Blood Mononuclear Cells) et les thymocytes humains (Vudattu et al., 2009). Ils ont alors noté que seule l'IL-7 full et l'IL-7  $\delta 5$  étaient capables de stimuler la survie des cellules T et d'induire la différenciation des thymocytes. De même, la phosphorylation de STAT5 dans les

cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, n'a pu être observé qu'après traitement par l'IL-7 full ou l'IL-7  $\delta 5$  avec un effet plus important de l'IL-7  $\delta 5$ .

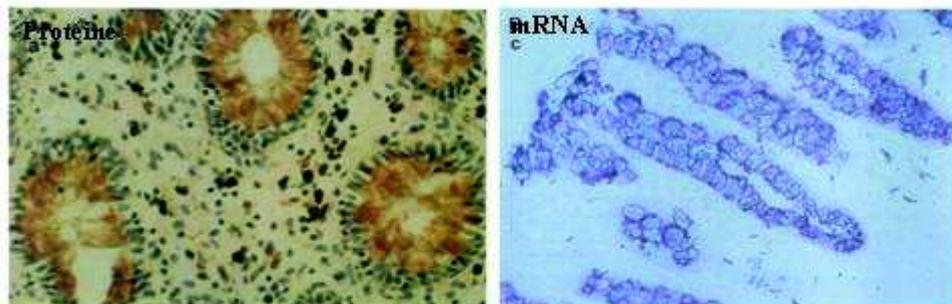
## **V-5- L'IL-7 dans la paroi intestinale**

### **V-5-1- Impact sur les cellules immunes de l'intestin**

Dans la paroi intestinale, l'IL-7 est produit par les cellules épithéliales, et plus spécifiquement par les cellules caliciformes (« goblet cells ») (Watanabe et al., 1995) (Fig.35, 36). Son rôle dans l'intestin reste à définir mais l'expression de son récepteur par les lymphocytes de la muqueuse suggérait une implication dans la régulation de ces cellules immunes. Cette hypothèse a été confirmée par la mise en évidence d'un effet de l'IL-7 sur la prolifération des LPL (Watanabe et al., 1995). Les lymphocytes T  $\gamma/\delta$  qui ont la particularité de se développer essentiellement au sein de muqueuses comme celle de la paroi intestinale, seraient eux-aussi concernés car différentes équipes ont révélé un rôle déterminant de l'interaction IL-7/IL-7R dans leur développement (He and Malek, 1996; Laky et al., 2000; Moore et al., 1996). Cette interaction serait même critique pour la formation du GALT d'une manière générale. En effet, il a été démontré chez la souris que l'IL-7 et son récepteur sont tous deux essentiels dans la formation des plaques de Peyer et des cryptopatches (Adachi et al., 1998; Laky et al., 2000; Okada et al., 2005).



*Figure 37* : Expression de l'interleukine-7 dans les cellules épithéliales de souris transgéniques pro-IL7-GFP. Ces souris transgéniques expriment l'IL-7 (vert) dans les cellules épithéliales marquées par un anticorps anti-EpCam (rouge) dirigé contre la molécule d'adhésion des cellules épithéliales. Les deux molécules sont co-exprimées (merge) (Shalapour et al., 2012).



*Figure 38* : Expression de l'interleukine-7 dans les cellules de l'épithélium intestinal humain. L'analyse immunohistochimique montre la présence de la **protéine IL-7** dans les cellules épithéliales (photo **de gauche**). L'hybridation in situ montre la présence de l'**ARNm IL-7** dans les cellules épithéliales (photo **de droite**) (Watanabe et al., 1995).

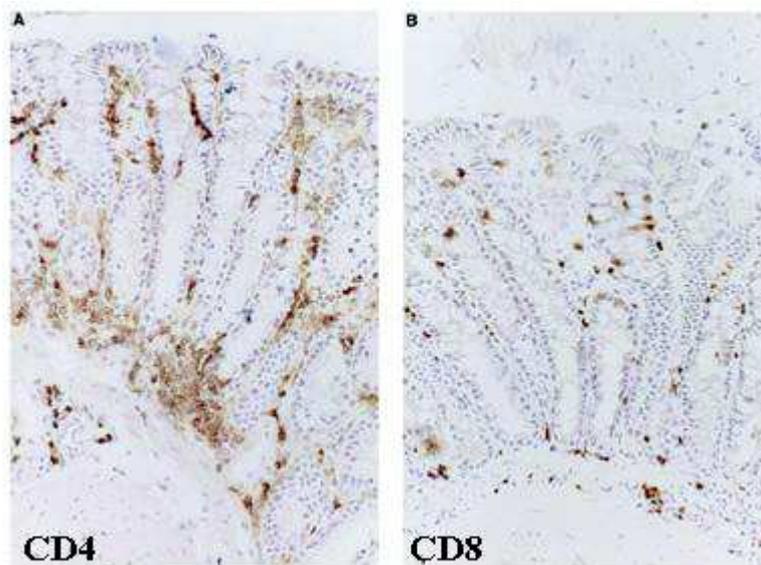
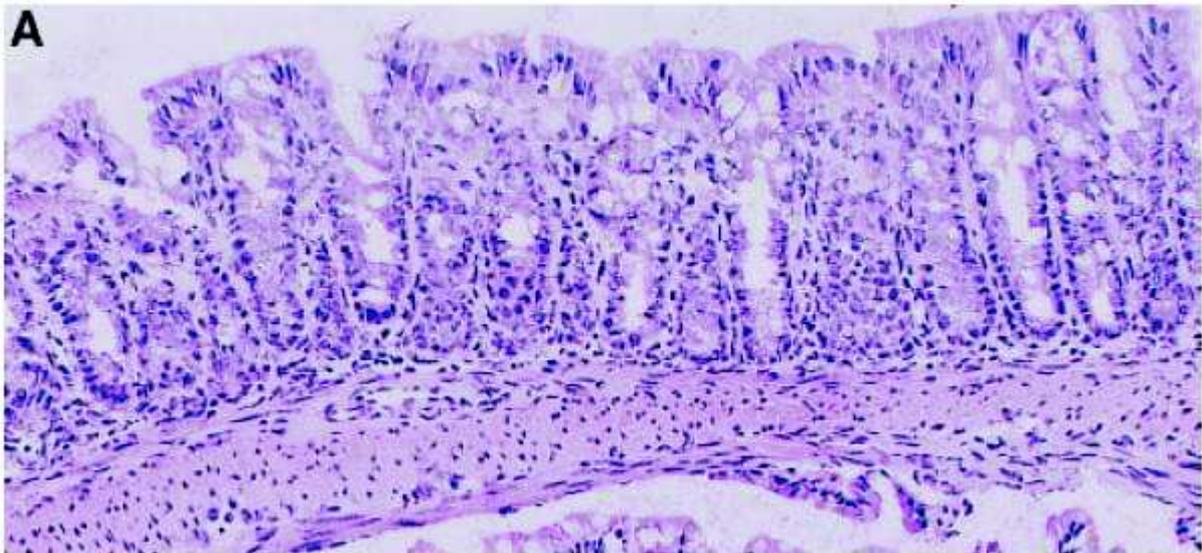
L'impact des différentes isoformes de l'IL-7 dans l'intestin n'a pas encore été étudié mais l'IL-7 full, l'IL-7  $\delta 4$ , l'IL-7  $\delta 4/5$ , l'IL-7  $\delta 3/4$ , ont été détectées dans le colon (Vudattu et al., 2009) (Tab.1) :

<b>Exon lacking</b>	<b>full length</b>	<b>5</b>	<b>2 (-56 bp)</b>	<b>4</b>	<b>4/5</b>	<b>3/4</b>	<b>3/4/5</b>
<i>Organ (percentage of IL-7 isoform expression/the entire IL-7 transcript/each organ)</i>							
Heart	16			20			64
Kidney	72	8	9				11
Spleen	15	51		6		28	
Liver	44	10		8	20		17
<b>Colon</b>	<b>20</b>			<b>30</b>	<b>46</b>	<b>4</b>	
Lung	30		10	20	22	10	8
Muscle	43			57			
Stomach	24	11		8	5	22	
Placenta	15	6	9	20			50
Salivary gland	8	9		20	25		48
Ovary	17			33			50
Uterus	100						
Prostate	55				17		28
Testis	5	5		5			85
Skin	68			32			
Bone marrow	13			64			23
Fetal liver	23						77

*Tableau 1 : Expression des isoformes de l'IL-7 dans divers organes chez l'Homme. Plusieurs variants d'ARNm ont été mises en évidence dans le colon (Vudattu et al., 2009).*

### **V-5-2- Implication de l'IL-7 dans les MICI**

Une implication de l'IL-7 dans les MICI est confortée par l'observation que des souris transgéniques surexprimant l'IL-7 développent des colites chroniques proches de ce qu'on peut observer chez des patients atteints de RCH (Watanabe et al., 1998). Le tissu intestinal des souris transgéniques est infiltré par des cellules de l'immunité, notamment par les lymphocytes CD4<sup>+</sup>, comme observé chez l'homme.



*Figure 39 : Développement de colites chroniques de type rectocolite hémorragique chez la souris transgénique IL-7<sup>+</sup>. Ces souris transgéniques surexpriment l'IL-7 dans la muqueuse colique ce qui provoque le développement de colites avec une **infiltration importante du tissu** (coloration hématoxyline-éosine) **par des neutrophiles et des lymphocytes (photo du haut)**. On note une infiltration plus importante des **lymphocytes de type CD4<sup>+</sup>** (photo en bas à gauche) dans la muqueuse comparativement aux **lymphocytes CD8<sup>+</sup>** (photo en bas à droite) (Watanabe et al., 1998).*

Les lymphocytes de ces souris sont dits colitogéniques. Lorsque de tels lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant fortement le récepteur à l'IL-7 (LT CD4<sup>+</sup> IL7R<sup>high</sup>) sont isolés de la muqueuse de

souris malades et administrés à des souris immunodéficientes syngéniques (de type SCID pour « severe combined immunodeficiency », RAG-1 ou RAG-2 pour « Recombinase-Activating Gene ») par transfert adoptif, elles développent à leur tour une maladie de type MICI (Yamazaki et al., 2003). L'effet était spécifique car l'élimination sélective de ces lymphocytes par administration de petites quantités de toxines conjuguées à des anticorps anti-IL-7R $\alpha$  avait pour effet de supprimer les colites induites (Yamazaki et al., 2003).

Une autre étude supporte l'hypothèse selon laquelle l'IL-7 serait indispensable à l'initiation de l'activation des cellules T et à la persistance des T CD4<sup>+</sup> effecteurs/mémoires colitogéniques (Totsuka et al., 2007a). En effet, après transfert de cellules T CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> ou de T mémoires CD4<sup>+</sup> colitogéniques, une inflammation massive de la muqueuse du gros intestin a été observée dans des souris IL-7<sup>+/+</sup> x RAG1<sup>-/-</sup>, mais pas dans des souris IL-7<sup>-/-</sup> x RAG1<sup>-/-</sup> (Totsuka et al., 2007b). Cette inflammation s'accompagne d'une infiltration par des cellules Th1 qui font partie des T effecteurs auxiliaires CD4 (ou T helper). Ces T auxiliaires Th1 sécrètent l'IL-2 et l'IFN $\gamma$ , ce qui leur confère des fonctions d'hypersensibilisation retardée ainsi que d'activation des T cytotoxiques et des macrophages. Le niveau d'expression du CD45 RB sur les cellules T CD4<sup>+</sup> permet de distinguer les cellules naïves (CD45 RB<sup>high</sup>) des cellules activées/mémoires (Ten Hove et al., 2004) et détermine leur potentiel pathogénique. Chez les patients contrôles, les cellules T CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> produisent plus de TNF $\alpha$  et moins d'IL-10 et d'IL-4 que les CD45RB<sup>low</sup>. Chez les patients atteints de MICI, les cellules T CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>low</sup> produisent moins d'IL-10 que ceux des patients contrôles. Quant à la production d'IFN $\gamma$  par les deux sous-types de cellules T, elle est diminuée chez les patients MICI par rapport aux patients contrôles (Ten Hove et al., 2004). On observe pourtant une même prolifération rapide des cellules T CD4<sup>+</sup> colitogéniques chez les IL-7<sup>+/+</sup> x RAG1<sup>-/-</sup> et les IL-7<sup>-/-</sup> x RAG1<sup>-/-</sup>. C'est donc la prolifération lente de ces cellules qui serait dépendante de l'IL-7. La prolifération rapide est, quant à elle, partiellement supprimée avec administrant un traitement antibiotique aux deux lignées de souris: elle serait donc induite par des antigènes issus des bactéries commensales sans exclure une implication d'autres antigènes (aliments, auto-antigènes, etc.). L'expression de Bcl-2 est aussi diminuée dans les souris IL-7<sup>-/-</sup> x RAG1<sup>-/-</sup> contrairement aux IL-7<sup>+/+</sup> x RAG1<sup>-/-</sup>. L'IL-7 serait donc critique dans la survie des T CD4<sup>+</sup> colitogéniques.

# **TRAVAIL DE THESE**

## **Objectif du travail de thèse**

L'objectif du travail de thèse était de mieux comprendre les interactions opérant entre deux grands systèmes que sont le SNE et le système immunitaire, en conditions physiologiques mais également en conditions pathologiques dans le cadre des MICI. La thèse s'articule autour de trois études. La première étude a porté sur l'expression des transcrits de l'IL-7 et des sous-unités de son récepteur, l'IL-7R $\alpha$  et le  $\gamma$ c dans des biopsies et le sérum de patients atteints de MICI (Article 1). La seconde étude a permis d'analyser la production de l'IL-7, de ses différents variants d'épissage et de ses isoformes, par les CGE chez le rat (Article 2). Enfin, la dernière partie a conduit à l'étude de l'impact des CGE humaines sur la prolifération des lymphocytes T (Article 3).

**- PREMIER ARTICLE -**

**(En rédaction)**

**Expression des transcrits de l'IL-7 et des sous-unités du récepteur IL-7R $\alpha$   
et  $\gamma$ c dans des biopsies de patients atteints de MICI**

Kermarrec L.\* , Durand T\* , Neunlist M., Vanhove B., Boureille A., Neveu I., Naveilhan P.

## **Introduction article 1**

L'étude des transcrits de l'IL-7 et des sous-unités de son récepteur, IL-7R $\alpha$  et  $\gamma$ C, dans des biopsies de patients atteints de MICI s'appuie sur des observations effectuées sur des modèles animaux (délétion ou surexpression d'un gène) qui suggèrent une implication de la voie IL7/IL7R dans le développement de maladies de type Rectocolite Hémorragique (RCH) ou maladie de Crohn (MC). Ainsi, en 1998, Watanabe et al., montraient que des souris surexprimant l'IL-7 dans la muqueuse intestinale, développaient des colites chroniques de type RCH, avec une augmentation de l'infiltration de la muqueuse par des cellules immunitaires sans altération de la population systémique (Watanabe et al., 1998). Par ailleurs, l'injection à des souris immunodéficientes, de lymphocytes IL7R $^{+}$  isolées à partir de la lamina propria de souris malades entraînait le développement de colites (Yamazaki et al., 2003). C'est dans ce contexte que nous avons entrepris d'analyser l'expression de l'IL-7 et des deux sous-unités, IL-7R $\alpha$  et  $\gamma$ C, formant son récepteur dans des biopsies coliques et dans le sérum de patients atteints de RCH ou de MC. L'existence d'isoformes et d'une forme soluble de l'IL-7R $\alpha$  susceptibles d'interférer avec l'activité de l'IL-7 nous a conduit à étudier l'expression et la régulation de ces variants.

Chez l'Homme, il existe pour l'IL-7, huit variants d'épissage. Le premier à avoir été décrit est l'IL-7  $\delta$ 4 à qui il manque l'exon 4 (Korte et al., 1999). D'autres transcrits caractérisés par l'absence d'un seul ou d'une combinaison d'exons ont ensuite été décrits, il s'agit de l'IL-7  $\delta$ 5, l'IL-7  $\delta$ 4/5, l'IL-7  $\delta$ 3/4 et l'IL-7  $\delta$ 3/4/5. Des variants présentant des variations en dehors du cadre de lecture ont aussi été identifiés : ils sont appelés IL-7(-56bpExon2), IL-7  $\delta$ 4(-56bpExon2), et IL-7  $\delta$ 3/4/5(-56bpExon2).

Pour l'IL-7R $\alpha$ , trois variants d'épissage ont été décrits chez l'Homme : IL-7R $\alpha$  full, IL-7R $\alpha$   $\delta$ 6 et IL-7R $\alpha$   $\delta$ 5/6. Les variants IL-7R $\alpha$  full et IL-7R $\alpha$   $\delta$ 5/6 codent pour des isoformes transmembranaires qui se lient à la sous-unité  $\gamma$ C pour transduire le signal. Le variant IL-7R $\alpha$   $\delta$ 6 aboutit quant à lui, à une forme soluble du récepteur à l'IL-7, appelée sIL7R $\alpha$ . L'épissage alternatif entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition prématurée d'un codon stop, ce qui donne naissance à une protéine sans domaine transmembranaire. Cette forme soluble pourrait interférer avec l'activité de l'IL-7 (Crawley et al., 2010).

L'étude de ces variants est d'autant plus importante que certaines isoformes peuvent avoir une activité ou une fonction différente de l'IL-7 ou de l'IL-7R $\alpha$  canoniques. Différents variants d'épissage de l'IL-7 ont été détectés dans les biopsies coliques de patients RCH et CD. Les analyses quantitatives ont révélé une régulation de l'IL-7 et de la sous-unité l'IL-7R $\alpha$ , dans les zones inflammatoires des biopsies coliques.

## **Regulation of IL-7 and their receptors in patients suffering from intestinal bowel diseases**

Kermarrec L.<sup>1-4\*</sup>, Durand T<sup>1-4\*</sup>, Neunlist M.<sup>1-4</sup>, Vanhove B.<sup>5,6</sup>, Boureille A.<sup>1-4,7</sup>, Neveu I.<sup>1-4</sup>, Naveilhan P.<sup>1-4</sup>,

<sup>1</sup> INSERM, UMR 913, Nantes F-44035, France

<sup>2</sup> Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes F-44035, France

<sup>3</sup> CHU de Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, IMAD, Nantes F-44093, France

<sup>4</sup> Centre de Recherche en Nutrition Humaine, Nantes F-44093, France

<sup>5</sup> INSERM, UMR1064, Nantes F-44093, France

<sup>6</sup> CHU de Nantes, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie, ITUN, Nantes F-44093, France

<sup>7</sup> INSERM, CIC-04, CHU Nantes, Nantes F-44093, France

### **Corresponding:**

Philippe Naveilhan, INSERM UMR913, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France ;

[philippe.naveilhan@univ-nantes.fr](mailto:philippe.naveilhan@univ-nantes.fr)

## **Abstract**

### **Background**

Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are characterized by an activation of the innate and adaptive immune systems. Among the cytokines important in the maintenance of the immune system, the interleukin-7 (IL-7) plays a critical role. Indeed, surexpression of IL-7 in mice induces a spontaneous colitis which is prevented by the blockage of IL-7/IL-7R pathway. To evaluate the role of IL-7 in IBD, the expression of IL-7 and its receptors were evaluated in biopsies and serum from patients suffering from UC or CD.

### **Methods**

The mRNA levels of IL-7 and receptor isoforms were analysed by Q-PCR in colic biopsies derived from control, UC and CD patients. The levels of IL-7 and soluble IL-7R $\alpha$  (sIL7R $\alpha$ ) proteins were analyzed by ELISA in the serum of patients with UC and CD (symptomatic or in remission).

### **Results**

Our data showed different splice variants of IL-7 and IL-7R in the human biopsies. IL-7 full length and IL-7 splice variant mRNA were all up-regulated in the inflamed regions of UC and CD biopsies. Similarly, splice variants and mRNA coding for the membrane bound IL-7 receptor  $\alpha$ , showed a stronger expression in the inflamed regions of UC and CD biopsies as compared to healthy areas or to control biopsies. No variation in the expression of the  $\gamma$ C receptor was observed in UC or in CD biopies, Serum analyses showed a decrease in the levels of IL-7 protein but the soluble form of the interleukin 7 receptor  $\alpha$  (sIL-7R $\alpha$ ) was not affected.

### **Conclusions**

Regulation of IL-7/IL-7R in IBD suggests an implication of this cytokine in the inflammatory process, and raise the possibility that blockage of the IL-7/IL-7R pathway may be beneficial in IBD.

## Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD) including ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are characterized by chronic and relapsing inflammation of the gastrointestinal tract. These diseases greatly impair life quality and need long lasting treatment. In a physiopathological point of view, CD could affect the entire intestinal tract and classically, the distal part of the ileum, the colon and the perianal region whereas in UC, the inflammation occurred in the colon and the rectum. In UC, the inflammation is localized in the superficial mucosal layer of the gut where CD causes inflammation throughout the whole thickness of the intestinal wall (transmural).

The etiology of these diseases is largely unknown but genetic, environmental, microbial and immunological factors are believed to play a critical role in their development. Recent evolution in genetic techniques led to the identification of a large number of loci associated with IBD. These loci were common or specific to CD or UC (Jostins et al., 2012) and several were associated with immune system mediators such as interleukins. Transgenic models (KO or gene over-expression) also contribute to the demonstration that some molecules favor the development of IBD (Valatas et al., 2013). This includes the interleukin-7 (IL-7), produced by epithelial cells in the gut (Watanabe et al., 1995).

IL-7 is a cytokine extremely important for the development and the maintenance of the immune system. It acts on a large panel of immune cells, including memory T cells, and belongs to the common cytokine receptor gamma-chain family. IL-7 signalsthroughan heterodimeric complex consisting of the common gamma-chain,  $\gamma_C$  (CD132) and IL-7R $\alpha$  (CD127) (Rochman et al., 2009). IL-7R $\alpha$  also mediates the signaling of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) along with the cytokine receptor-like 2 (CRLF2 or TSLPR). Interestingly, IL-7 and TSLP have opposite effects. While TSLP protects mice against colitis by limiting the differentiation of Th17 cells (Spadoni et al., 2012; Taylor et al., 2009), transgenic mice overexpressing IL-7 in the intestinal mucosa develop spontaneous chronic UC-like (Watanabe et al., 1998). IL-7 overexpression induces an increase of mucosal lymphocytes without affecting the systemic populations (Yang et al., 2008) while injection of IL7R+ lamina propria lymphocytes (LPL) in immunodeficient mice induce colitis (Yamazaki et al., 2003). Taken together, these observations argue for a role of the IL7/IL7R pathway in IBD.

The regulation of IL-7 and its receptors in human is poorly documented, but it has been recently shown a two times decrease in the level of circulating IL-7 in CD patients (Andreu-Ballester et al., 2013a, 2013b). This observation is in accordance with elevated serum IL7 in CD and UC patients in clinical remission as compared to patients with active disease (Kader et al., 2005).

In the present paper, we investigated the regulation of IL-7 and its receptors in biopsies of control and IBD patients. The levels of IL-7 and of the soluble form of the interleukin 7 receptor  $\alpha$  (sIL-7R $\alpha$ ) were also investigated in the serum of UC and CD patients during active disease and remission.

## **Material and methods**

### ***Sample material***

Biopsies and serum were obtained from an existing biobank (agreement n° DC-2008-408) declared to the local ethical committee, the Fédération des Biothèques, University Hospital, Nantes, France and approved by the French Ministry of Education and Research. Informed patient consents were obtained according to the French Bioethics law. Biopsies of UC and CD patients were collected in the colon during colonoscopy in inflamed and visually non-inflamed area. Control samples were collected from healthy patients during endoscopies indicated for polyp surveillance.

### ***IL-7 and IL-7r expression analyses***

IL-7 isoform expression was analyzed using primers that span the entire six exons (5'-GAGTGAAGTATGGGCGGTGAG-3', 5'-GGAGGATGCAGCTAAAGTTCG-3' and a nested primer set 5'-TCCCGCAGACCATGTTCCATG-3', 5'-TCAGTGTCTTTAGTGCC-3'). IL-7R $\alpha$  expression was analyzed using primers that span the entire eight exons, as described previously (Moors et al., 2010). PCR product, amplified by non-proofreading taq polymerase (Invitrogen, Courtaboeuf, France) were run on a 2% agarose gel, bands were extracted and cloned into the PCR 2.1 Topo vector (Thermo Fisher Scientific, Saint Aubin, France) for further sequencing using a big dye Terminator V.3.1 Cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, Saint Aubin, France). Sequences were validated using FinchTV software.

### ***Quantitative real-time PCR***

Total RNA were isolated from biopsies using the NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel EURL, Hoerdt, France). Total RNA (1  $\mu$ g) were reverse transcribed in cDNA using the Superscript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Saint Aubin, France). PCR reactions were performed using Taqman Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific, Saint Aubin, France) and performed on the StepOne + instrument (Thermo Fisher Scientific, Saint Aubin, France). Samples were tested in duplicate and the average values were used for quantification using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method as previously described (Livak and Schmittgen, 2001).

## ***ELISA***

Natural and recombinant Human IL-7 levels were determined by ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Lille, France). Hundred microliters of serum was necessary to perform this test. Soluble IL-7 receptor was assayed by ELISA kit (Antibodies-online, Paris, France) with 100 µl of diluted serum at 1:100. Measurement were allowed with Skanlt Software of Varioskan (Thermo Electron, Vantaa, Finland).

## ***Statistical analysis***

The significance of differences was determined using Kruskal-Wallis test followed by Dunns post test or the nonparametric Wilcoxon's signed rank test. Differences with a p-value of 0.05 or less were considered statistically significant; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

## Results

### Expression of IL-7 and its receptor in control and UC biopsies.

The expression of IL-7 mRNA was analyzed in biopsies of control (n=20) and UC patients (n=21). History of the clinical treatments is reported in table 2. For each patient with UC, the biopsies were collected in inflamed (IA) and healthy (HA) area of the colon. IL-7 primers were designed to amplify all the IL-7 splice variants (IL-7 all) and Q-PCR was performed. Significant increase (1.57-fold) in the level of IL-7 all mRNA was detected in the inflamed regions of UC biopsies as compared to control biopsies ( $p < 0.001$ ; Fig. 1). The Wilcoxon matched pairs test was used to compare IL-7-all mRNA levels in IA and HA of UC biopsies. The levels of IL-7 all mRNA were significantly higher in IA as compared to HA in UC biopsies ( $p = 0.0123$ , Tab 3).

To analyze the expression of IL-7 receptors, primers were generated to amplify all the splice variants of IL-7 R $\alpha$  (IL-7R $\alpha$  all). Q-PCR analyses showed a 2.71-fold increase in the levels of IL-7R $\alpha$  all mRNA in the inflamed regions of UC biopsies as compared to control biopsies ( $p < 0.001$ , Fig. 1). The Wilcoxon matched pairs test indicates that the levels of IL-7R $\alpha$  all mRNA were significantly higher in IA as compared to HA in UC biopsies ( $p = 0.0007$ ; Tab 3). The expression of the receptor subunit  $\gamma_c$ , was also investigated by Q-PCR. Significant difference in the levels of  $\gamma_c$  mRNA was observed between IA and HA of UC biopsies ( $p = 0.0003$ ).

### Expression of full-length IL7 (IL-7 full) and membrane IL-7R $\alpha$ (IL7R $\alpha$ Mb) in control and UC biopsies

Seven isoforms of IL-7 have been described in human, whereas hIL-7R $\alpha$  exhibits three isoforms generated by alternative splicing. To analyze their expression in colonic biopsies, PCR were performed with RNA purified from four control biopsies and submitted to electrophoresis. Analyses of IL-7 showed four bands in all samples and a smaller one in two of them (Fig. 2A). Cloning and sequencing of the amplicons revealed the presence of full-length,  $\delta 4$  and  $\delta 4/5$  isoforms as well as the out-of-frame isoforms named -56bpExon2 and  $\delta 3/4(-56bpExon2)$ . As determined by densitometry, the full-length isoform was the most abundantly expressed in colonic biopsies ( $89.4 \pm 1.9\%$  of the total). Analyses of IL-7R $\alpha$  permit the detection of the three mRNA variants in the human colonic biopsies. Densitometry

analyses showed that the IL-7R $\alpha$  full-length isoform was overexpressed (92.6% $\pm$ 1.5) as compared to the  $\delta 6$  and  $\delta 5/6$  IL-7R $\alpha$  mRNA (Fig. 2B).

To analyse the expression of the full-length IL-7 (IL-7-full), a pair of primers was generated. A 1.89-fold increase in the mRNA levels of IL-7-full was detected in IA of UC biopsies as compared to control ones ( $p < 0.001$ ; Fig. 2C). To analyze the expression of the transmembrane splice variants of IL-7R $\alpha$  (IL-7R $\alpha$  Mb), a specific pair of primers was designed. Q-PCR analyses show a 2.75-fold increases in the levels of IL-7R $\alpha$  Mb mRNA in the IA area of UC biopsies ( $p < 0.001$ ; Fig. 2D).

### **Expression of IL-7 and its receptor in control and CD biopsies.**

To determine whether IL-7 and IL-7R $\alpha$  regulation in the IA of colonic biopsies was present in other IBD, similar analyses were performed with CD biopsies ( $n=24$ , Tab. 2). Clinical treatments are reported in table 2. Higher levels of IL-7 full and IL-7 all mRNA were detected in the IA of colonic biopsies ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  respectively; Fig. 3). This indicates that the canonic IL-7 mRNA and its variants were upregulated in the inflamed region of colonic biopsies from CD patients. We also observed an increased levels of IL-7R $\alpha$  Mb and IL-7R $\alpha$  all mRNA in the IA of colonic biopsies ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$  respectively). This indicates that the canonic membrane bound IL-7R $\alpha$  and its variants were upregulated in the inflamed region of colonic biopsies from CD patients. No regulation of  $\gamma C$  was found in CD biopsies (Data not shown).

Wilcoxon matched pairs test show no significant difference in the levels of IL-7 full and IL-7 all mRNA in IA and HA of CD biopsies but difference between inflamed and healthy regions was observed for IL-7R $\alpha$  Mb and IL-7R $\alpha$  all mRNA ( $p=0.0006$  and  $p=0.0008$  respectively, Tab 3). Significant difference in the levels of  $\gamma c$  mRNA was also observed between IA and HA of CD biopsies ( $p=0.0076$ ).

### **Serum levels of IL-7 and sIL-7R $\alpha$ in UC and CD patients**

To investigate potential changes in the concentration of IL-7 in the systemic circulation, serum from control, UC and CD patients with active disease or in remission ( $n=10$  per group, Tab.4) were collected and the levels of IL-7 were quantified by ELISA. All patients received TNF inhibitors (Tab. 4).

The basal level of IL-7 in the serum of control patients was  $40.99 \pm 3.16$  pg/ml. Serum IL-7 was significantly lower in UC patients during active disease ( $19.99 \pm 2.72$  pg/ml;  $p < 0.01$ ) or in remission ( $15.71 \pm 2.27$  pg/ml;  $p < 0.001$ ) as compared to control patients (Fig. 4 A). No significant difference between active and remission conditions was observed (Wilcoxon matched pairs test,  $p = 0.10$ ) (Fig. 4 B). The level of IL-7 in the serum of Crohn's disease patients was significantly lower ( $21.19 \pm 4.78$  pg/ml;  $p < 0.05$ ) during the remission as compared to control patient but no significant difference was found ( $35.55 \pm 9.45$  pg/ml) during active disease (Fig. 4 C). The Wilcoxon matched pairs test indicates that the level of IL-7 in the serum was significantly different in patients in remission versus active (Wilcoxon matched pairs test,  $p = 0.037$ ) (Fig. 4 D).

We next analyzed the level of sIL-7R $\alpha$  in the serum. Basal concentration of sIL-7R $\alpha$  in the serum of control patients was  $1.40$   $\mu$ g/ml. No significant variation in the level of sIL-7R $\alpha$  was observed in the serum of UC or CD patients as compared to control patients (Fig. 4 E, G). The Wilcoxon matched pairs test indicates that the level of sIL-7R $\alpha$  in the serum of UC or CD patients were not significantly different during remission and active disease (Fig. 4 F, H). No correlation between IL-7 and sIL-7R $\alpha$  levels was found in any condition (Data not shown).

## Discussion

During the past decade, experimental work in animal models suggested an implication of IL-7 in colitis but only few studies analyzed the expression of IL-7 and its relative molecules in the human intestinal track. In the present study, we show that IL-7 and IL-7R $\alpha$  but not  $\gamma$ C are upregulated in UC and CD colic biopsies as compared to control biopsies. This upregulation is only observed in inflamed area and is accompanied by a downregulation of the IL-7 protein in the serum. No variation of sIL-7R $\alpha$  was detected.

Among the cytokines important in the development and homeostasis of the gut immune system, the interleukin 7 (IL-7) have been suggested to play a critical role. Besides its production at high level in bone marrow, thymus and spleen, IL-7 is constitutively synthesized by intestinal epithelial cells (IEC) in human and mice (Watanabe et al., 1995). Its implication in IBD is supported the demonstration that overexpression of IL-7 in the colonic mucosa induced spontaneous colitis in mice (Watanabe et al., 1998). It has also been demonstrated that CD4 intraepithelial lymphocytes (IEL) expressing high level of the IL7 receptor (IL-7R $\alpha$ ) transferred in RAG<sup>-/-</sup> mice induced chronic colitis whereas their counterparts expressing low level of the receptor did not (Yamazaki et al., 2003). In the colonic biopsies from IBD patients, an upregulation of IL-7 and IL-7R $\alpha$  was detected in the inflamed and not in healthy areas, indicating a correlation between IL-7/IL-7R and disease activity.

In human, IL-7 transcripts have numerous splice variants that code or not for proteins. Analysis of the different open reading frame in the human colonic biopsies showed the presence of three splice variants that can be translated, namely IL-7 full, IL-7  $\delta$ 4 and IL-7  $\delta$ 4/5 mRNA whereas IL-7  $\delta$ 5 mRNA was absent. Vudattu found the same variants in colic biopsies but with different proportions (Vudattu et al., 2009). This discrepancy could be due to a difference in the type of mucosa (colon versus colic biopsies), but also to the lack of quantitative tools like specific Q-PCR primers to determine the exact proportion of each variants. Such an evaluation is, however, important as some IL-7 isoforms have specific effects on immune cells. For instance, IL-7 full and IL-7  $\delta$ 5, but not IL-7  $\delta$ 4 or IL-7  $\delta$ 4/5, act on lymphocytes (Vudattu et al., 2009). So, in absence of IL-7  $\delta$ 5 like observed in the human colonic biopsies, only IL-7 full will stimulate T cells and our present data indicate that such IL-7/IL-7R activity could be enhanced in gut disorders such as IBD. Indeed, an upregulation of the active form of IL-7 and IL-7R $\alpha$  was observed in IA of UC and CD biopsies.

Interestingly, IL-7 is known for inducing in T cells, the  $\alpha 4\beta 7$  integrin, a molecule important for T cell homing in gut (Cimbro et al., 2012). The production of IL-7 all in IA of colonic mucosa could play a role in the recruitment and function of T cells at the inflammatory site (Shinohara et al., 2011). The role of sIL-7R $\alpha$  in the immune response is still unclear, but in 2013, Lunströmet coll., showed that sIL-7R $\alpha$  that bind IL-7 but not TSLP, decreases the consumption of IL-7 but increases its bioactivity over time (Lundstrom et al., 2013). sIL-7R $\alpha$  in colonic biopsies, as suggested by the presence of its transcript, may prolong IL-7 activity in gut by trapping locally the interleukine.

Previous studies reported changes in the concentration of IL-7 in the serum of IBD patients but the data were conflicting. For instance, up-or down-regulation of serum IL-7 were observed in UC patients according to the study (Dai et al., 2013; Yamada et al., 1997). These discrepancies could be due to the method of analyses, the classification of the patients or their basal. Here, individual analyses were performed with the serum of the same patient collected during active disease or remission, and all the patients received the same anti-TNF basal treatment. In these conditions, we observed a significant decrease of IL-7 in the serum collected from CD patient in remission. Changes in the levels of IL-7 were also observed in the serum collected during active disease but the concentrations were extremely variable from one patient to another patient. These variations most probably reflect the fluctuations of IL-7 production and consumption during acute inflammatory processes in CD. We also observed a drop in the concentration of IL-7 in the serum collected from UC patients both in active and remission stages. These data are in contradiction with the results of Watanabe et al., who reported no serum variation of IL-7 in UC (Watanabe et al., 1997) but they strengthen those of Andreu-Ballaster et al., who found a two-fold decrease of IL-7 levels in the serum of UC patients in active disease or in remission (Andreu-Ballester et al., 2013a, 2013b).

Taken together, these data argue in favor an implication of IL-7/IL-7R in the immune processes characteristics of UC and CD. This raises the opportunity of blocking the IL-7/IL-7R signaling as a treatment for IBD. This possibility is further supported by the demonstration that deletion of IL-7 or IL-7R alter the course of colitis (Totsuka et al., 2007; von Freuden-Jeffry et al., 1998). Suppression of inflammatory responses after the administration of blocking IL-7R $\alpha$  antibody in mice model of experimental colitis open the possibility of using anti-IL-7R $\alpha$  for IBD treatment (Willis et al., 2012). In perspective of using such an approach,

cells responsive to IL-7 in normal and pathological situations should be characterized to clearly define the cell targets.

## References

- Andreu-Ballester, J.C., Garcia-Ballesteros, C., Amigo, V., Ballester, F., Gil-Borras, R., Catalan-Serra, I., Magnet, A., Fenoy, S., del Aguila, C., Ferrando-Marco, J., Cuellar, C., 2013a. Microsporidia and its relation to Crohn's disease. A retrospective study. *PLoS One* 8, e62107. doi:10.1371/journal.pone.0062107
- Andreu-Ballester, J.C., Perez-Griera, J., Garcia-Ballesteros, C., Amigo, V., Catalan-Serra, I., Monforte-Albalat, A., Bixquert-Jimenez, M., Ballester, F., 2013b. Deficit of interleukin-7 in serum of patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 19, E30–1. doi:10.1002/ibd.22914
- Cimbro, R., Vassena, L., Arthos, J., Cicala, C., Kehrl, J.H., Park, C., Sereti, I., Lederman, M.M., Fauci, A.S., Lusso, P., 2012. IL-7 induces expression and activation of integrin  $\alpha 4 \beta 7$  promoting naive T-cell homing to the intestinal mucosa. *Blood* 120, 2610–2619. doi:10.1182/blood-2012-06-434779
- Dai, S.-X., Wu, G., Zou, Y., Feng, Y.-L., Liu, H.-B., Feng, J.-S., Chi, H.-G., Lv, R.-X., Zheng, X.-B., 2013. Balance of CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T lymphocytes is vital for patients with ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 58, 88–96. doi:10.1007/s10620-012-2327-9
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Schumm, L.P., Sharma, Y., Anderson, C.A., Essers, J., Mitrovic, M., Ning, K., Cleynen, I., Theatre, E., Spain, S.L., Raychaudhuri, S., Goyette, P., Wei, Z., Abraham, C., Achkar, J.P., Ahmad, T., Amininejad, L., Ananthakrishnan, A.N., Andersen, V., Andrews, J.M., Baidoo, L., Balschun, T., Bampton, P.A., Bitton, A., Boucher, G., Brand, S., Buning, C., Cohain, A., Cichon, S., D'Amato, M., De Jong, D., Devaney, K.L., Dubinsky, M., Edwards, C., Ellinghaus, D., Ferguson, L.R., Franchimont, D., Fransen, K., Gearry, R., Georges, M., Gieger, C., Glas, J., Haritunians, T., Hart, A., Hawkey, C., Hedl, M., Hu, X., Karlsen, T.H., Kupcinskis, L., Kugathasan, S., Latiano, A., Laukens, D., Lawrance, I.C., Lees, C.W., Louis, E., Mahy, G., Mansfield, J., Morgan, A.R., Mowat, C., Newman, W., Palmieri, O., Ponsioen, C.Y., Potocnik, U., Prescott, N.J., Regueiro, M., Rotter, J.I., Russell, R.K., Sanderson, J.D., Sans, M., Satsangi, J., Schreiber, S., Simms, L.A., Sventoraityte, J., Targan, S.R., Taylor, K.D., Tremelling, M., Verspaget, H.W., De Vos, M., Wijmenga, C., Wilson, D.C., Winkelmann, J., Xavier, R.J., Zeissig, S., Zhang, B., Zhang, C.K., Zhao, H., Silverberg, M.S., Annesse, V., Hakonarson, H., Brant, S.R., Radford-Smith, G., Mathew, C.G., Rioux, J.D., Schadt, E.E., Daly, M.J., Franke, A., Parkes, M., Vermeire, S., Barrett, J.C., Cho, J.H., 2012. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491, 119–24. doi:10.1038/nature11582
- Kader, H.A., Tchernev, V.T., Satyaraj, E., Lejnine, S., Kotler, G., Kingsmore, S.F., Patel, D.D., 2005. Protein microarray analysis of disease activity in pediatric inflammatory bowel disease demonstrates elevated serum PLGF, IL-7, TGF-beta1, and IL-12p40 levels in Crohn's disease and ulcerative colitis patients in remission versus active disease. *Am J Gastroenterol* 100, 414–23. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.40819.x
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262

- Lundstrom, W., Highfill, S., Walsh, S.T., Beq, S., Morse, E., Kockum, I., Alfredsson, L., Olsson, T., Hillert, J., Mackall, C.L., 2013. Soluble IL7R $\alpha$  potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1761–70. doi:10.1073/pnas.1222303110
- Moors, M., Vudattu, N.K., Abel, J., Krämer, U., Rane, L., Ulfig, N., Ceccatelli, S., Seyfert-Margolies, V., Fritsche, E., Maeurer, M.J., 2010. Interleukin-7 (IL-7) and IL-7 splice variants affect differentiation of human neural progenitor cells. *Genes Immun* 11, 11–20.
- Rochman, Y., Spolski, R., Leonard, W.J., 2009. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol* 9, 480–90. doi:10.1038/nri2580
- Shinohara, T., Nemoto, Y., Kanai, T., Kameyama, K., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Totsuka, T., Ikuta, K., Watanabe, M., 2011. Upregulated IL-7 receptor  $\alpha$  expression on colitogenic memory CD4<sup>+</sup> T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 2623–2632. doi:10.4049/jimmunol.1000057
- Spadoni, I., Iliev, I.D., Rossi, G., Rescigno, M., 2012. Dendritic cells produce TSLP that limits the differentiation of Th17 cells, fosters Treg development, and protects against colitis. *Mucosal Immunol* 5, 184–93. doi:10.1038/mi.2011.64
- Taylor, B.C., Zaph, C., Troy, A.E., Du, Y., Guild, K.J., Comeau, M.R., Artis, D., 2009. TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J Exp Med* 206, 655–67. doi:10.1084/jem.20081499
- Totsuka, T., Kanai, T., Nemoto, Y., Makita, S., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Watanabe, M., 2007. IL-7 Is Essential for the Development and the Persistence of Chronic Colitis. *J. Immunol.* 178, 4737–4748. doi:10.4049/jimmunol.178.8.4737
- Valatas, V., Vakas, M., Kolios, G., 2013. The value of experimental models of colitis in predicting efficacy of biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305, G763–85. doi:10.1152/ajpgi.00004.2013
- von Freeden-Jeffry, U., Davidson, N., Wiler, R., Fort, M., Burdach, S., Murray, R., 1998. IL-7 deficiency prevents development of a non-T cell non-B cell-mediated colitis. *J Immunol* 161, 5673–80.
- Vudattu, N.K., Magalhaes, I., Hoehn, H., Pan, D., Maeurer, M.J., 2009. Expression analysis and functional activity of interleukin-7 splice variants. *Genes Immun* 10, 132–40. doi:10.1038/gene.2008.90
- Watanabe, M., Ueno, Y., Yajima, T., Iwao, Y., Tsuchiya, M., Ishikawa, H., Aiso, S., Hibi, T., Ishii, H., 1995. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest* 95, 2945–53. doi:10.1172/JCI118002
- Watanabe, M., Ueno, Y., Yajima, T., Okamoto, S., Hayashi, T., Yamazaki, M., Iwao, Y., Ishii, H., Habu, S., Uehira, M., others, 1998. Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J. Exp. Med.* 187, 389–402.
- Watanabe, M., Watanabe, N., Iwao, Y., Ogata, H., Kanai, T., Ueno, Y., Tsuchiya, M., Ishii, H., Aiso, S., Habu, S., Hibi, T., 1997. The serum factor from patients with ulcerative colitis that induces T cell proliferation in the mouse thymus is interleukin-7. *J Clin Immunol* 17, 282–92.

- Willis, C.R., Seamons, A., Maxwell, J., Treuting, P.M., Nelson, L., Chen, G., Phelps, S., Smith, C.L., Brabb, T., Iritani, B.M., others, 2012. Interleukin-7 receptor blockade suppresses adaptive and innate inflammatory responses in experimental colitis. *J Inflamm Lond* 9, 39.
- Yamada, K., Shimaoka, M., Nagayama, K., Hiroi, T., Kiyono, H., Honda, T., 1997. Bacterial invasion induces interleukin-7 receptor expression in colonic epithelial cell line, T84. *Eur. J. Immunol.* 27, 3456–3460. doi:10.1002/eji.1830271246
- Yamazaki, M., Yajima, T., Tanabe, M., Fukui, K., Okada, E., Okamoto, R., Oshima, S., Nakamura, T., Kanai, T., Uehira, M., Takeuchi, T., Ishikawa, H., Hibi, T., Watanabe, M., 2003. Mucosal T Cells Expressing High Levels of IL-7 Receptor Are Potential Targets for Treatment of Chronic Colitis. *J. Immunol.* 171, 1556–1563. doi:10.4049/jimmunol.171.3.1556
- Yang, H., Madison, B., Gumucio, D.L., Teitelbaum, D.H., 2008. Specific overexpression of IL-7 in the intestinal mucosa: the role in intestinal intraepithelial lymphocyte development. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G1421–1430. doi:10.1152/ajpgi.00060.2008

Name	Forward	Reverse	Size (bp)
hIL-7 all	TGACTTGTGTTTCCTAAAGAGACT	GGAGGATGCAGCTAAAGTTTCG	130
hIL-7 full	TGAGAGTGTCTAATGGTCAGCA	TGGTTTTCTTCCTTTAACCTGGC	268
hIL-7R all	AGGGAGAGTGGCAAGAATGG	TTGTCGCTCACGGTAAGTTCA	249
hIL-7r mb	TTGGTCATCTTGGCCTGTGT	CACCCTATGAATCTGGCAGTC	168
hGammaC	CCACTGTTGGAGCACTTGG	TTGGGTGGCTCCATTCCTC	191

**Table 1:** Oligonucleotide sequences and amplicon sizes

	Control	UC	CD
Number	20	21	24
Gender (F/M)	12/8	8/13	15/9
Age in years (Median, [Min-Max])	47.7 [22.3-67.4]	41.3 [21.4-57.3]	34 [17.4-47.7]
Disease duration in years (Median, [Min-Max])	NA <sup>a</sup>	5.7 [0.9-24.7]	9.9 [0.5-27.8]
Familial history [n (%)]	NA	2 (9.5)	3 (12.5)
Phenotype [n (%)]			
	NA	E1 : 2 (9.5)	L1 : 1 (4.2)
	NA	E2 : 10 (47.6)	L2 : 8 (33.3)
	NA	E3 : 9 (42.9)	L3 : 15 (62.5)
	NA		B1 : 18 (75)
	NA		B2 : 2 (8.3)
	NA		B3 : 4 (16.7)
Endoscopic activity <sup>b</sup> (Y/N)	NA	18/3	19/5
Surgery (Y/N)		0/21	6/18
Anti-TNF [n (%)]	0	6 (28.6%)	11 (45.8)
Immunosuppressor [n (%)]	0	6 (28.6%)	11 (45.8)
Corticosteroid [n (%)]	0	3 (14.3%)	0 (0)

**Table 2:** History of the clinical treatments of patients included in the study on biopsies. Biopsies were collected from the colon of UC and CD patients during colonoscopy. Here is reported general characteristics of the patients (gender, age, etc), phenotype and activity of their disease as well as the clinical treatments they follow during the study. Biopsies Q-PCR sample, <sup>a</sup> Not Applicable; <sup>b</sup> activity defined by an endoscopic subscore of MAYO  $\geq$  2

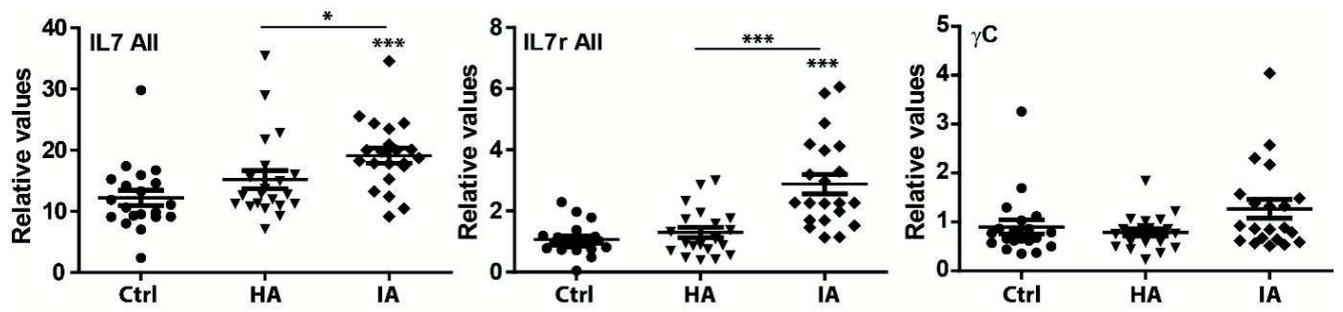
	UC	CD
IL-7 all	0.0123 (*)	0.3385 (NS)
IL-7 full	0.0239 (*)	0.1443 (NS)
IL-7R all	0.0007 (***)	0.0008 (***)
IL-7r mb	0.0007 (***)	0.0006 (***)
GammaC	0.0003 (***)	0.0076 (**)

**Table 3:** Q-PCR analyses of IL-7 all, IL-7 full, IL-7R all, IL-7R mb and  $\gamma$ C mRNAs in biopsies of UC and CD patients between healthy (HA) and inflamed (IA) area with Wilcoxon matched paired test. Here is reported p values for the different mRNAs in inflamed versus healthy area (NS, non-significant; \*, p< 0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.).

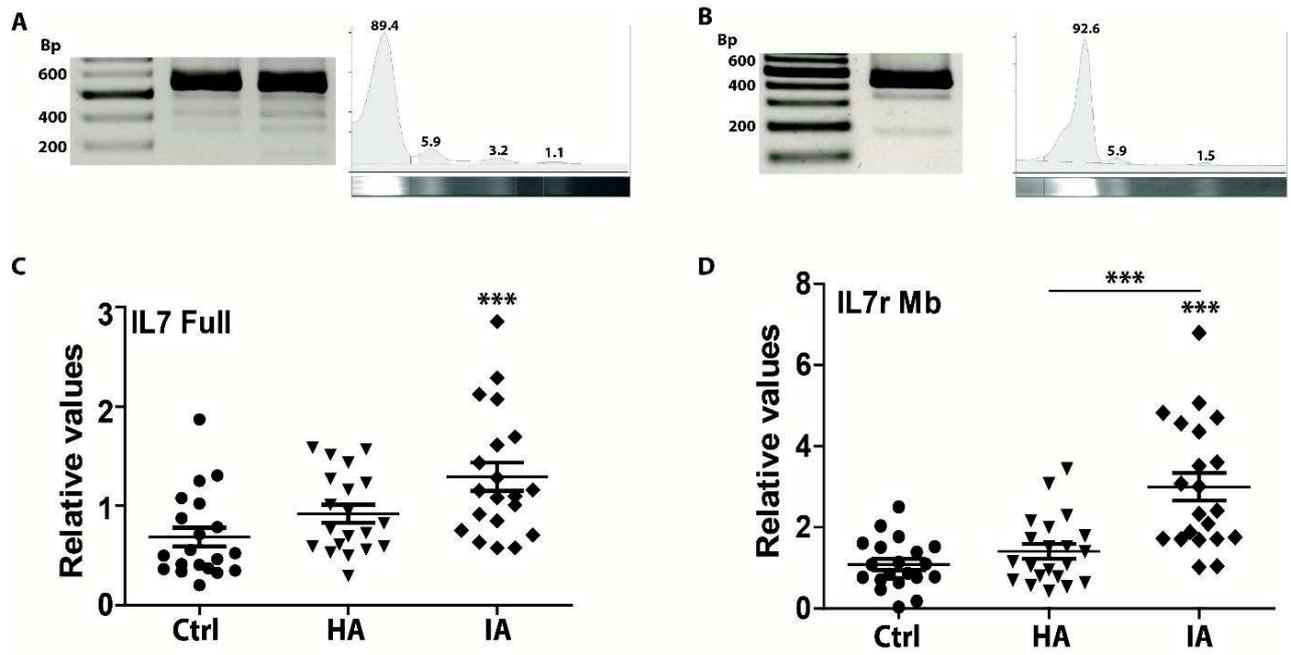
	Control	UC	CD
Number	10	10	10
Gender (F/M)	7/3	6/4	5/5
Age (Median, [Min-Max])	42.6 [29.3-65.8]	52.1 [20.8-70.2]	26.6 [21.8-31.8]
Disease duration (Median, [Min-Max])	NA <sup>a</sup>	2.75 [0.1-8.2]	1.3 [0-4]
Phenotype [n (%)]			
	NA	E1 :2 (20%)	L1 : 1 (10)
	NA	E2 :6 (60%)	L2 : 1 (10)
	NA	E3 :2 (20%)	L3 : 8 (80)
			B1 : 10 (100)
			B2 : 0 (0)
			B3 : 0 (0)
<b>Treatment before anti-TNF administration</b>			
Immunosuppressor [n (%)]	NA	5 (50)	6 (60)
Corticosteroid [n (%)]	NA	3 (30)	3 (30)
<b>Treatment during anti-TNF administration [n(%)]</b>	NA	10 (100)	10 (100)
	NA		
Immunosuppressor [n (%)]	NA	5 (50)	5 (50)
Corticosteroid [n (%)]	NA	0 (0)	0 (0)
Time between sampling (month)(Median, [Min-Max])	NA	5.5 [1-17]	3 [1-4]

**Table 4:** Characteristics and clinical treatments of the recruited patients for serum sampling. Serum was collected on UC and CD patients to perform Elisa test. General characteristics of

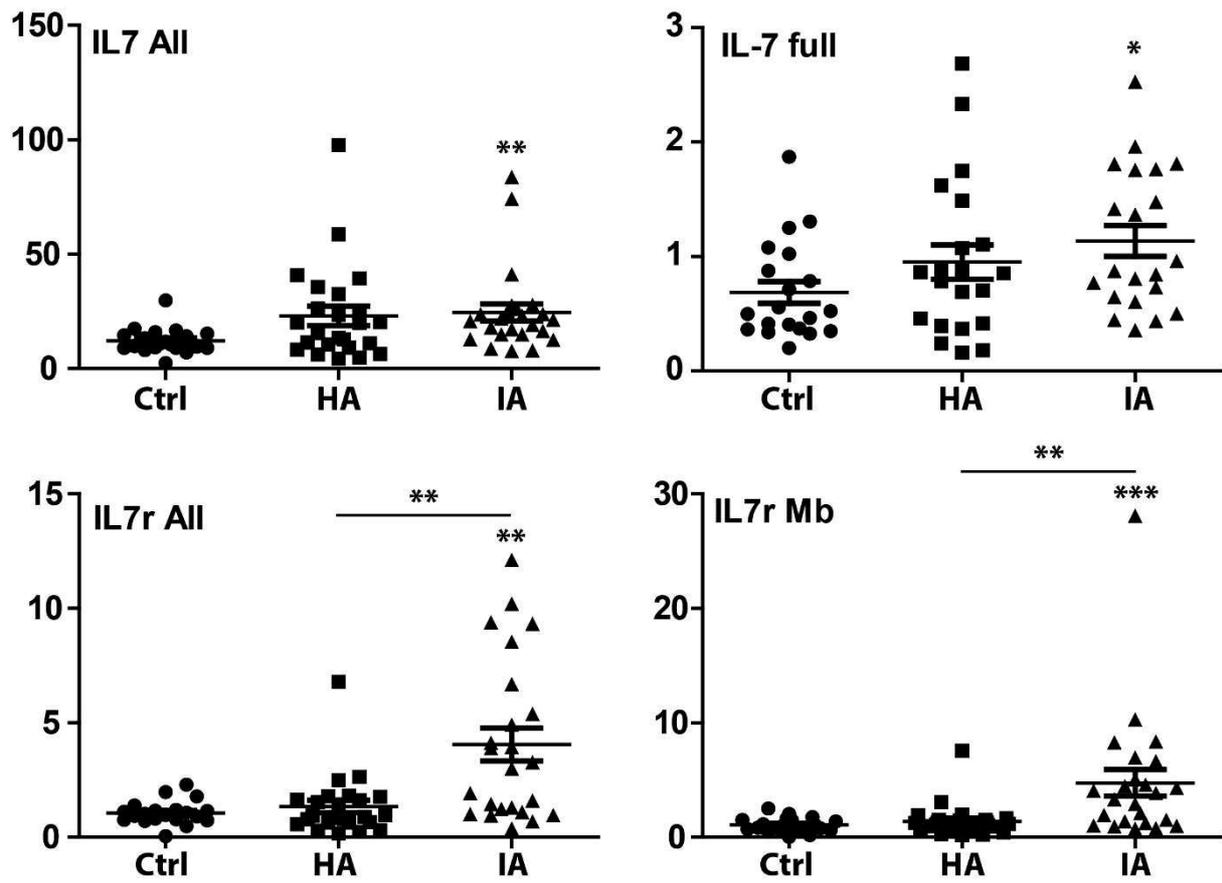
the patients, clinical treatments, phenotype and activity of their disease are reported in this table. <sup>a</sup> Not Applicable



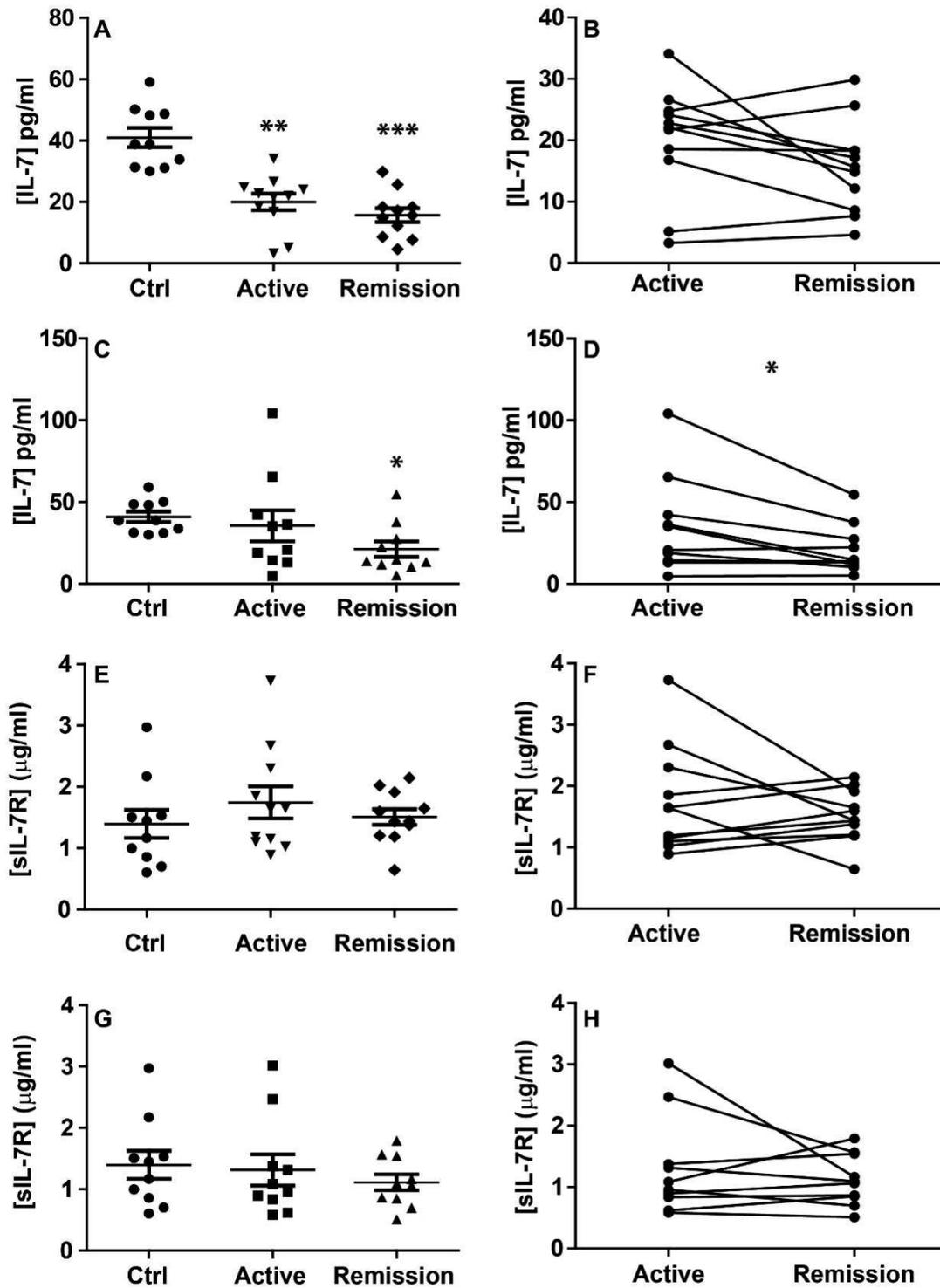
**Figure 1:** Q-PCR analyses of IL-7 all, IL-7R all and  $\gamma$ C mRNAs in biopsies of control (Ctrl) and in healthy (HA) and inflamed (IA) area of UC biopsies.



**Figure 2:** A-B, PCR analyses of IL-7 all (A) and IL-7R $\alpha$  (B) variant mRNAs in the biopsies of control patients. C-D, Q-PCR analysis of the full-length IL-7 isoform (C) and of the transmembrane IL-7R $\alpha$  (D) isoform in biopsies of control (Ctrl) and in healthy (HA) and inflamed (IA) area of UC biopsies.



**Figure 3:** Q-PCR analyses of IL-7 (all and full-length) and IL-7R $\alpha$  (all and transmembrane) in biopsies of control (Ctrl), and in healthy (HA) and inflamed (IA) area of CD biopsies.



**Figure 4:** Quantification of IL-7 and sIL-7R $\alpha$  proteins in the serum of Control (Ctrl), UC (A, B, E, F) and CD (C, D, G, H) patients. For each UC or CD patient, the serum samples were collected during active disease or during the remission phase.

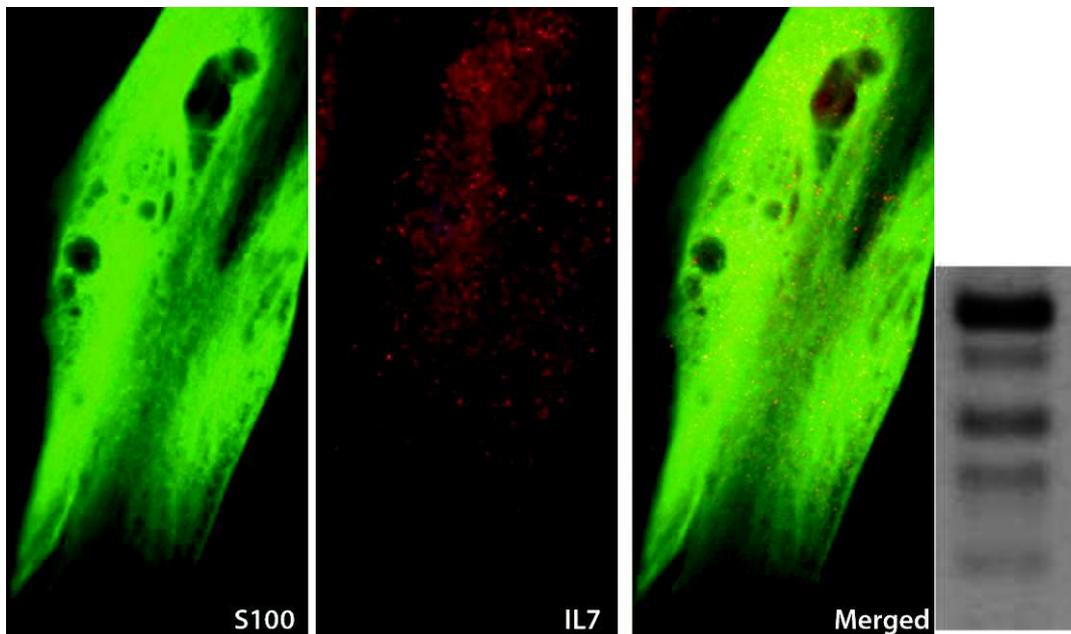
## **Discussion article 1**

La régulation de l'IL-7 et de son récepteur a été étudiée sur des biopsies coliques issues de la biocollection développée par le CHU de Nantes. Celle-ci comprend des biopsies coliques de patients contrôles et des biopsies effectuées au niveau de zones saines ou inflammatoires chez des patients atteints de RCH ou de MC. Les analyses par Q-PCR ont été réalisées avec des amorces amplifiant tous les variants d'épissage de l'IL-7 (IL-7-all), de l'IL-7 R $\alpha$  (IL-7 R $\alpha$ -all) et de  $\gamma$ C. Les résultats montrent une surexpression des ARNm de l'IL-7-all dans les biopsies de patients MC et RCH. Cette augmentation a été uniquement observée dans la zone inflammatoire. Concernant le récepteur à l'IL-7, aucune régulation n'a été détectée pour la sous-unité  $\gamma$ C mais une surexpression des ARNm codant pour l'IL-7 R $\alpha$  all a été observée dans les zones saines et inflammatoires de patients atteints de MICI.

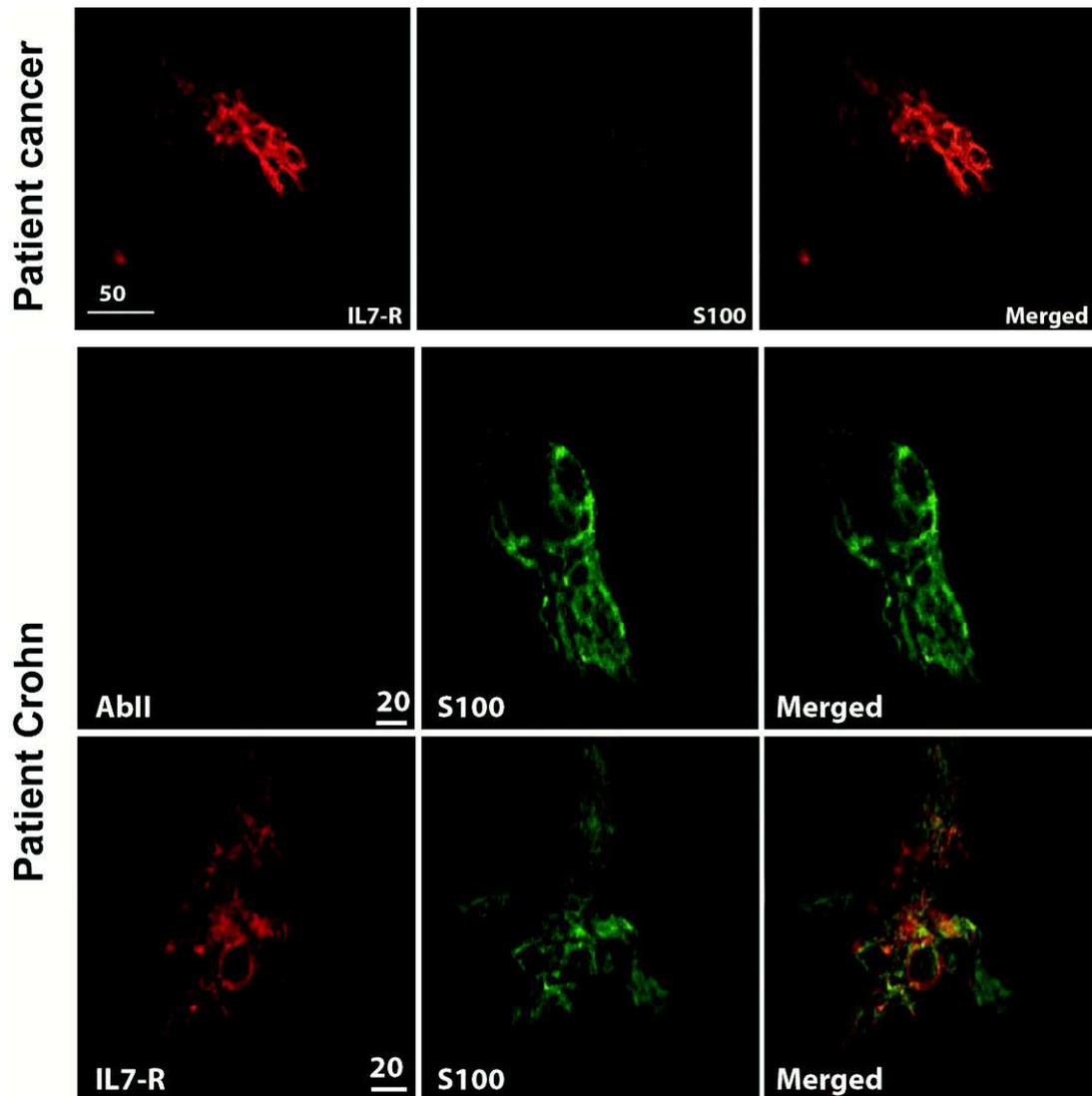
Les transcrits de l'IL-7 et de l'IL-7R $\alpha$  existent sous différents variants d'épissage qui génèrent des isoformes protéiques variées. Les isoformes de l'IL-7 peuvent être actives ou non sur certains types cellulaires, notamment les cellules immunitaires (Vudattu et al., 2009). Quant aux différents variants d'épissage de l'IL-7R $\alpha$ , ils génèrent des récepteurs sous forme soluble ou transmembranaire mais seules les formes membranaires sont capables de transduire le signal. Afin de déterminer quels variants d'épissage sont exprimés dans les biopsies coliques, des analyses par PCR ont été réalisées. Les analyses sur gel ont révélé la présence de quatre ou cinq (variations selon l'origine des biopsies) différents amplicons pour l'IL-7 et trois pour l'IL-7R $\alpha$ . Le séquençage des amplicons a permis de caractériser les variants de l'IL-7 présents dans les biopsies coliques : IL-7 full (canonique), IL-7  $\delta$ 4 et  $\delta$ 4/5 ainsi que des variants d'épissage avec un décalage du cadre de lecture comme IL-7-56bpExon2 et  $\delta$ 3/4(-56bpExon2). Pour l'IL-7R $\alpha$ , les trois amplicons détectés correspondent aux trois variants d'épissage connus pour cette sous-unité du récepteur à l'IL-7 : IL-7 R $\alpha$  full,  $\delta$ 6 et  $\delta$ 5/6.

La multiplicité des transcrits nous a conduit à générer des paires de primers spécifiques de l'IL-7R $\alpha$  transmembranaire et de l'IL-7 canonique, la seule forme de l'IL-7 présente dans les biopsies qui soit active sur les cellules immunitaires. Les analyses ont révélé une augmentation des transcrits codant pour l'IL-7 R $\alpha$  transmembranaire et pour l'IL-7 canonique dans les zones inflammatoires des biopsies coliques de patients UC et CD. Ces résultats demandent à être confirmées au niveau traductionnelle.

Il avait précédemment été montré que les cellules épithéliales intestinales produisaient constitutivement l'IL-7 (Watanabe et al., 1995) et que son récepteur était exprimé par certaines cellules du système immunitaire intestinal comme les lymphocytes de la lamina propria (LPL) (Watanabe et al., 1995) et les lymphocytes T  $\gamma/\delta$  (He and Malek, 1996; Laky et al., 2000; Moore et al., 1996). Nos résultats indiquent que l'IL-7 pourrait également être un médiateur du SNE. En effet, les CGE humaines produisent in vitro de l'IL-7 (Fig. A, ci-dessous rouge) et une expression de l'IL-7R $\alpha$  (Fig. B, ci-dessous rouge) a été détectée au sein des ganglions sous-muqueux issus de patients contrôles (cancer mais prélèvement à distance de la tumeur), ou de patients atteints de la maladie de Crohn.



*Figure A : Expression de l'interleukine-7 dans les cellules gliales entériques humaines. Son expression (en rouge) est mise en évidence par immunocytochimie dans les CGE (S100 $\beta^+$  en vert) à gauche. Différents variants d'épissage d'IL-7 semblent présents dans les CGE comme indiqué par la PCR présenté sur la photo de droite, mais le résultat demande à être confirmé par séquençage.*



*Figure B : Expression de la sous-unité IL-7R $\alpha$  (en rouge) dans les ganglions sous-muqueux de patients contrôle (cancer) en haut et Crohn en bas. La glie est marquée en vert (S100 $\beta^+$ ).*

La prochaine étape consistera à caractériser les cellules qui expriment l'IL-7 et l'IL-7R $\alpha$ . Une étude sur des cryosections préparées à partir de biopsies intestinales de patients contrôles, Crohn ou RCH (zone saine ou inflammatoire) pourra également permettre de déterminer dans quelle mesure, l'expression de l'IL-7 et de l'IL-7R $\alpha$  est modifiée en cas de MICI.

Pour évaluer le niveau d'IL-7 circulant, les sérums des patients ont été analysés par ELISA. Une diminution des concentrations en IL-7 sérique a été observée en phase de rémission pour les patients atteints de la maladie de Crohn, en phase active et de rémission chez les patients RCH. Dans le cas de la maladie de Crohn, nos résultats corroborent certaines

études précédentes (Andreu-Ballester et al., 2013a, 2013b) mais elles sont en contradiction avec d'autres résultats (Watanabe et al., 1997). De même pour la RCH, nos résultats vont dans le sens de certaines observations précédemment décrites (Dai et al., 2013) et elles sont en contradiction avec d'autres données (Yamada et al., 1997). Ces variations pourraient être dues à des différences d'échantillonnage des groupes de patients (âge, sexe, traitement, évolution et phase de la maladie, etc.). À ce propos, il serait intéressant de réaliser ces analyses sur des patients au tout début de leur maladie afin de savoir si ces régulations apparaissent précocement ou sont la conséquence d'une inflammation chronique. Comme les dosages sériques ont été réalisés sur des patients qui répondaient favorablement à un traitement anti-TNF, il serait intéressant d'analyser le sérum de patients réfractaires aux anti-TNF afin de savoir si les variations d'IL-7 vont dans le même sens.

Les variations d'expression et de disponibilité de l'IL-7 chez les patients RCH et CD, suggèrent une implication de cette interleukine dans les processus inflammatoires observés dans les MICI. Un blocage de cette voie de signalisation a été suggéré pour tenter de limiter les réponses immunes et inflammatoires qui provoquent des lésions au niveau des muqueuses de l'intestin. Cette possibilité est soutenue par divers travaux qui montrent que la voie IL-7/IL-7R $\alpha$  est essentielle dans le développement et la persistance des colites chroniques chez l'animal (Totsuka et al., 2007; von Freeden-Jeffry et al., 1998). Un essai avec des anticorps bloquants a même été tenté dans un modèle de colites chez la souris. Il montre que l'administration d'anticorps bloquants anti-IL-7 inhibe les réponses innées et adaptatives responsables des colites (Willis et al., 2012). Avant d'envisager l'utilisation d'anticorps bloquants chez l'homme, il apparaît important de caractériser l'ensemble des cellules susceptibles d'être affectées par le traitement, notamment les cellules du SNE comme les neurones, présents dans la muqueuse intestinale et qui expriment le récepteur à l'IL-7.

**- DEUXIEME ARTICLE -**

**(En rédaction)**

**Expression et régulation de l'IL-7 dans l'intestin de rat : détection de nouveaux variants d'épissage dans les CGE**

Kermarrec Laetitia\*, Durand Tony\*, Gonzales Jacques, Hulin Philippe, Neunlist Michel, Neveu Isabelle, Naveilhan Philippe.

## Introduction article 2

Initialement connues pour leur implication dans le développement et le fonctionnement du système immunitaire, les cytokines sont à présent également reconnues pour leur rôle de médiateur dans des fonctions biologiques extrêmement variées (prolifération, différenciation, activation, survie) d'un grand nombre de cellules. Parmi ces cellules, on note celle du SNC avec notamment, un effet de l'IL-7 sur la différenciation des progéniteurs neuraux, sur la survie des neurones de l'hippocampe ou du striatum, sur la neuritogénèse, et sur la prolifération des astrocytes (Araujo and Cotman, 1993; Michaelson et al., 1996; Moors et al., 2010). De plus, l'existence chez l'homme, de variants d'épissage de l'IL-7 différenciellement exprimés suivant la zone du cerveau, suggère un rôle spécifique des isoformes de l'IL-7 au sein du SNC (Moors et al., 2010). Cette hypothèse est confortée par la démonstration que certaines isoformes sont plus efficaces que d'autres pour différencier les progéniteurs neuraux humains en cellules gliales (Moors et al., 2010).

Ces observations nous ont incités à essayer de mieux comprendre le rôle de l'IL-7 au sein du SNC, et ce d'autant plus, que nous avons mis en évidence une production de cette cytokine par les CGE humaines. Dans cette perspective, nous avons analysé l'expression et la régulation de l'IL-7 et de ses isoformes dans l'intestin de rat.

## **Expression and regulation of new splice variants of IL-7 in rat enteric glial cells.**

Kermarrec Laetitia<sup>1,2,3\*</sup>, Durand Tony<sup>1,2,3\*</sup>, Gonzales Jacques<sup>1,2,3</sup>, Hulin Philippe<sup>4</sup>, Neunlist Michel<sup>1,2,3</sup>, Neveu Isabelle<sup>1,2,3</sup>, Naveilhan Philippe<sup>1,2,3</sup>

1, INSERM, UMR 913, Nantes F-44035, France

2, Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes F-44035, France

3, CHU de Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, IMAD, Nantes F-44093, France

4, Plateforme MicroPICell, SFR Santé, Nantes F-44093, France

**Objective:** IL-7 was suggested to be implicated in the development and persistence of intestinal disorders. Taking in account that enteric glial cells (EGC) are important players in gut homeostasis, we explore the expression of IL-7 in the enteric nervous system.

**Design:** The study was performed on the rat intestinal tract. Using Q-PCR techniques, we investigated the expression of IL-7 in the intestinal tract during the postnatal maturation and analysed its mRNA levels in embryonic or adult EGCs in basal and pro-inflammatory conditions. Expression of IL-7 proteins in glial and neuronal cells of the enteric nervous system (ENS) was investigated by immunohistochemistry.

**Results:** Q-PCR analyses indicate an expression of IL-7 in enteric neurons and glial cells and reveal that IL-7 mRNAs are regulated in the intestinal tract during the postnatal development. PCR and sequencing analyses disclose the existence in EGCs of unknown splice variants that could give rise to new C-terminal variant of IL-7. Pro-inflammatory factors upregulated IL-7 mRNAs in embryonic but not in adult EGCs. The presence of IL-7 protein isoforms in EGCs and/or neurons in the submucosal ganglia was confirmed by immunohistochemistry using specific antibodies raised against the different IL-7 variants.

**Conclusion:** IL-7 is expressed by neural cells in the gastrointestinal track. The discovery of new splice variants suggest the existence of unknown IL-7 isoforms, which functions remain to be characterized.

## Introduction

Interleukin-7 (IL-7), an essential cytokine implicated in immune system homeostasis, is produced by different cell types, including bone marrow stromal cells, endothelial cells and intestinal epithelial cells [1]. Originally discovered for its implication in the maturation of B lymphocytes, later experiments showed that IL-7 also plays a major role in the maturation and the differentiation of T lymphocytes. IL-7 mediates its action through a combination of receptors namely the Interleukin-7 receptor (IL-7R $\alpha$ , CD127) and the common gamma C receptor ( $\gamma$ C). In Human, IL-7 exists as different isoforms. Few data are available on their bioactivity but differences in their capacity to induce STAT-5 phosphorylation or promote T cell survival have been described [2].

In addition to its role as immune mediator, IL-7 acts on cells of the central nervous system cells. It improves the survival of hippocampal neurons *in vitro* and induces the proliferation of astrocytes and microglial cells [3]. The cytokine also improves the maturation of a neuronal cell line, eliciting inwards currents and action potentials [4,5]. IL-7 and in particular, some of its isoforms are also able to act on human neural stem cells, favoring their differentiation toward a glial phenotype [6]. Astrocytes and microglial cells expressed IL-7 *in vitro* and its expression is regulated by cytokines such as IL-12 [7]. Increased level of IL-7 has been observed in astrocytes and microglial cells in the brain and spinal cord of mice developing experimental autoimmune encephalomyelitis.

In the gastro intestinal track, IL-7 is produced by the intestinal epithelial cells (IEC) [8], but nothing is known about its expression in the enteric nervous system (ENS). The ENS is organized into two main plexus namely the submucosal and myenteric plexus, which contains numerous ganglia. The majority of the enteric glial cells (EGC) is found in these ganglia but some are also present along the nerve fibers that innervate the gut [9]. EGC, considered as the counterpart of astrocytes, have a role in gut homeostasis [10,11]. They produces numerous cytokines such IL-1 $\beta$  or IL-6 [12,13]. In the present study, we analyzed the expression and the regulation of IL-7 in EGC derived from embryonic or adult rats. We showed that IL-7 is expressed and regulated in rat EGC. We also described new splice variant.

## **Materials and methods**

### ***Cell culture***

The experiment was carried out in accordance with the local Animal Care and Use Committee of Nantes (France). Sprague-Dawley rats (Janvier Laboratories S.A, Le Genest-St-Isle, France) were housed under standard conditions. Animals were anesthetized with isoflurane and sacrificed by cervical dislocation. Rat EGC were prepared from myenteric plexus as previously described [14]. JUG2 cell line was obtained from ENS primary cultures derived from rat E15 intestine [15]. Cells were treated or not with 10 ng/mL IL1 $\beta$ , 10 ng/mL TNF $\alpha$  or both. RNAs were collected at various time points. For immunocytochemistry, cells were cultured in 24 wells plate. At 80-90% of confluence, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 minutes at room temperature (RT).

### ***Isoforms production***

IL-7 full, IL-7 Ex5 and IL-7 -17bpEx5 ORF coupled in C-term with biotinylation sequence of BirA were synthesized and cloned in pKCR6 vector (Thermo fisher Scientific, Carlsbad, USA). Construct were transfected in COS-7 Monkey Kidney Fibroblasts (ATCC Cat. No. CRL-1651) using Lipofectamine 2000 (Thermo fisher Scientific, Saint Aubin, France) according to the manufacturer specification. Supernatants were collected after 3 days. To evaluate protein concentration, supernatants or positive controls with tagged protein were seeded in 96 wells plate overnight. After washing, protein concentration was evaluated by adding a mouse anti-Tag antibody followed by a goat anti-mouse HRP. Substratum was revealed by TMB solution (Becton Dickinson, Le pont de Claix, France) and concentrations were analysed by Varioskan (Thermo Fisher Scientific, Saint Aubin, France). Supernatants from GFP-transfected COS cells were used as negative control. Commercial rat recombinant IL-7 was used for positive control.

### ***Antibody production***

Antibodies against the different IL-7 isoforms were generated by Proteogenix (Schitigheim, Fr) using synthetic peptides of the C-terminal part of IL-7 full / IL-7 $\delta$ 4/5, IL-7 Ex5 and IL-7 -17bpEx5 (EKTIKEQKKNDPC, PYSRTKPQPSGSYC and CDHAGRKNHKGTEKE respectively) conjugated to KLH in rabbit. The antibodies were antigen affinity purified. For immunohistochemistry, the antibodies were used at 1/200 (initial concentration 1 mg/ml).

### ***Tissues preparation***

Sprague-Dawley rats (Janvier Laboratories S.A, Le Genest-St-Isle, France) were housed under standard conditions. Animals were anesthetized with isoflurane and sacrificed by decapitation or cervical dislocation according to their age. For RNA preparation, the intestinal tracks were collected, cleaned up and directly processed. For immunocytochemistry, segments of the distal colon of adult Sprague-Dawley rats were opened longitudinally, pinned on Sylgard (Dow Corning, Midland, MI)-coated Petri dish, and fixed with 4 % PFA in 0.1 M PBS at RT for 2 hours. Submucosal tissues were micro-dissected under microscope and collected in PBS containing 0.1 % sodium azide at 4°C until use.

### ***Quantitative real-time PCR***

Total RNA were isolated using the NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel EURL, Hoerd, France). Then, total RNA were treated with Dnase (Dnase Macherey or TurboDnase Ambion). After reverse transcription of 1µg of RNA, Q-PCR was performed on 40 or 4 ng RNA equivalent according to the gene, using Fast SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Saint Aubin, France) kit. Amplification conditions have been optimized for the StepOne + instrument (Thermo Fisher Scientific, Saint Aubin, France). Samples were tested in duplicate and the average values were used for quantification using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method as previously described [16]. Primers used are presented in Tab 1.

### ***Analyze of IL-7 isoform expression by PCR***

IL-7 isoform expression was analyzed using primers that span the entire open reading frame 5'- TCCCGCAGACCATGTTCC -3', 5'- TGCTTTATTTGACCAGGAGGC -3' with 10 cycles, and a nested primer set 5'- CCGCAGACCATGTTCCATG -3', 5'- GGTTCCAAACTCTCCAAGTATGC -3' with 35 cycles. The PCR products, amplified by non-proofreading taq polymerase (Invitrogen, Courtaboeuf, France) were run on a 2% agarose gel. The bands were excised and purified with PCR clean-up Gel Extraction kit (Macherey-Nagel EURL, Hoerd, France). Products were then cloned into the PCR 2.1 Topo vector (Invitrogen, Courtaboeuf, France) for further sequencing using a big dye Terminator V.3.1 Cycle sequencing kit (Life technologies, Courtaboeuf, France). Sequences were validated using FinchTV software.

### ***Immunohistochemistry/Immunocytochemistry***

Cells or tissues were first incubated in PBS containing 0.1 % sodium azide, 10 % donkey serum, and 0.5 % Triton X-100 for 30 min at RT. Samples were then incubated with primary antibodies overnight at 4°C. After 3 washes, samples were incubated one hour with secondary antibodies. Nuclei were stained with Dapi (1:2000, Life Technologies, Courtaboeuf, France). Primary antibodies were rabbit anti-IL-7 (1:200; Bioss, Interchim, Montlucon, France), mouse anti-S100 $\beta$  (1:500; Abcam, Cambridge, Angleterre), human anti-Hu. Secondary antibodies, including anti-rabbit CY5, anti-mouse FITC and anti-human CY3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, Baltimore, USA) were used at 1:500 and incubated one hour at RT. After 3 washes, tissues were mounted with Prolong Gold antifade reagent (Life Technologies, Carlsbad, USA). Analyses were performed with the fluorescent microscope AxioZoom.V16 (Carl Zeiss, Marly le Roi, France) and the Zen 2012 software. Analyses were also performed with the confocal microscope Nikon A1 RSi Nikon SAS, Champs-sur-Marne, France), and the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

### ***Statistical analysis***

The significance of differences was determined using the non-parametric Kruskal-Wallis followed by Dunns post-hoc tests. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Prism 5.0, GraphPad software Inc.) and differences with a p-value of 0.05 or less were considered statistically significant. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$

## Results

### Expression of IL-7 in rat EGCs

We first investigate the expression of IL-7 mRNA during the postnatal maturation of intestinal track. RNA were prepared from the gut of rat from embryonic day 15 (E15) up to post-natal day 36 (P36) and submitted to Q-PCR using a pair of primer in the last exon of IL-7 (IL-7 all). Analysis showed that the level of IL-7 mRNAs increased progressively over time to reach maximal expression at P21 and P36 (Fig. 1). To determine if cells of the enteric nervous system produce IL-7, double immunohistochemistry was performed using a commercial IL-7 antibody, and anti-neuronal (Hu) or anti- glial (S100 $\beta$ ) antibodies. As shown in the figure 2A, IL-7 was expressed in S100 $\beta$ <sup>+</sup> and Hu<sup>+</sup> cells. An expression of IL-7 by EGC was confirmed by immunocytochemistry on embryonic (JUG) or adult (rEGC) rat EGC cultured in vitro (Fig 2B).

### Expression of IL-7 splice variants in EGC

In Human, transcription of IL-7 gene gives raise to different mRNA, which in turn elicit the synthesis of different isoforms. As such mRNA variants were not described in rat, we examine whether alternative splicing may occurred in rat EGC. Double PCR with primers directed against coding sequences was performed on JUG and rEGC and the products were submitted to gel analysis (Fig 3A-B). Results show the presence of two bands in JUG and five bands in rEGC. The predominant amplicon around 530 bp have the same size that the cloned IL-7 (NM\_013110, 537 bp, IL-7) but the second amplicon around 650 bp did not correspond to any cloned IL-7 mRNA. The three other bands present in rEGC were probably also new splice variants of IL-7. To characterize these amplicons, PCR products were subcloned and submitted to sequencing. The amplicon around 530 bp corresponds to the cloned IL-7 mRNA (NM\_013110, 537 bp, IL-7). The two amplicons with higher molecular weight were sequenced : a 669 bp and 652 bp. The 669 bp amplicon partially aligns with the predicted IL-7 variants (XM\_008760860.1, IL-7 Ex5) and contained an extra exon (Exon 5) compared to the canonic IL-7 (Fig. 3C, D). Most probably, the predicted IL-7 X1 and X2 splice variants are partial sequence lacking part or the entire exon 6. The translated IL-7 Ex5 gives a 157 aa predicted protein corresponding to the predicted IL-7 isoform X1 (XP\_006232201). IL-7 Ex5 aligns to the first 119 aa with IL-7 but the C-terminal part was different for both proteins (Fig. 3E). The 652 bp amplicons (IL-7 -17bpEx5) partially aligns to the clone IL-7 mRNA

(NM\_013110) and the predicted IL-7 variant (XM\_008760860.1) (Fig. 3C). These new sequences correspond to the cloned IL-7 mRNA with an additive exon between the two last exons. Alignment to the Rat genome, indicates that the missing nucleotides are in inter-exonic regions. When translated the sequence into proteins, the new 168 aa predicted IL-7 isoform (IL-7 -17bpEx5) match to the first 119 aa of the IL-7 precursor (NP\_037242.2) and of IL-7 Ex5 but the C-terminal sequences were different (Fig 3D). In rEGC, we were able to sequence three other splice variants, IL-7  $\delta 2/5$ ; IL-7  $\delta 3/5$  and IL-7  $\delta 2/3/5$ . IL-7  $\delta 3/5$  could be translated into a 127 aa predicted protein (Fig. 3E). Using the same ATG than IL-7 precursor, IL-7  $\delta 2/5$  and IL-7  $\delta 2/3/5$  could be translated into short peptides covering part of the signal peptide (9 aa, 19 aa respectively). The ORF finder program (NCBI) also raises the possibility of an ORF that produces IL-7 truncated protein, (80 and 107 aa, respectively) without signal peptide (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

We next investigate the expression of the IL-7 mRNA splice variants during the maturation of the intestinal track. Total RNAs were submitted to Q-PCR using primers targeting the mRNA splice variants coding for the IL-7 isoforms with signal peptide (Fig. 4). Expression of all the splice variants increased with the maturation of the intestinal track. The lowest level of mRNA was detected at E15. It reached a maximum at P21 and remained stable afterwards (Fig 4). A stronger increase was observed for the IL-7 mRNA without Exon 5. The expression of IL-7 mRNA splice variants was then explored in JUG and ROG (Fig 5 A). A higher level of IL-7 mRNA splice variants was found in rEGC as compared to JUG. This difference was of 6 to 50 fold according to the splice variants. Some variants were more expressed than others: IL-7 Ex5 > IL-7 full > IL-7 -17bpEx5 > IL-7  $\delta 3/5$  with approximately 10 fold differences between the different splice variants in rEGC.

### **Regulation of IL-7 mRNAs in EGC**

We next examine a potential regulation of IL-7 mRNA by pro-inflammatory cytokines. JUG and rEGC were treated with a mix of IL1 $\beta$  and TNF $\alpha$ . RNA was then collected and submitted to Q-PCR (Fig.5 B, C). No variation in the expression of IL-7 all mRNAs was observed in rEGC at any time point tested. In contrast, IL1 $\beta$  together with TNF $\alpha$  induces a 2.2 fold increase in the level of IL-7 all mRNA at 8 hrs post-treatment. This upregulation was maximum at 24 hrs (4.4 fold) and the mRNA levels decreased afterward. To determine whether treatment with only one cytokine is sufficient to upregulate IL-7, JUG cells were treated with IL1 $\beta$  or TNF $\alpha$  (Fig 5D). Both cytokines induced a similar increase of IL-7 all

mRNAs at 8 hrs but the upregulation was only transient for IL1 $\beta$  whereas it lasted up to 36hrs after treatment with TNF $\alpha$ . We next explore the expression of IL-7 mRNA splice variants coding for IL-7 isoforms with signal peptide. JUG cells were treated or not by IL1 $\beta$  or TNF $\alpha$ . Total RNAs were submitted to Q-PCR using specific primers for IL-7 full, IL-7 Ex5, IL-7 -17bpEx5 and IL-7  $\delta$ 3/5 (Fig 5E-H). Regulation of the different isoforms resemble to the one observed for IL-7 all. One striking observation is the strong upregulation of only two variants, IL-7 full and IL-7  $\delta$ 3/5, after 36 hrs of TNF $\alpha$  treatment ; a 24 and 12 fold increases over the basal level were observed, respectively.

### **Expression of the IL-7 isoforms**

Using the fact that the C-terminal parts of Il-7 isoforms were different, we generated 3 antibodies raised against IL-7 Ex5, IL-7 -17bpEx5 and both IL-7 full / IL-7  $\delta$ 3/5. Specificity of the different antibodies was first tested on COS cells transfected with expression vectors coding for the different Il-7 isoforms. Analyses were performed by immunocytochemistry in presence or absence of specific blocking peptides (Fig. S2-3). As shown in the figure S3, the positive labelling was abrogated by an excess of blocking peptides. Abrogation of immunoreactivity by blocking peptides was also observed in rat submucosal ganglia labelled with the specific antibodies (Fig. S2). IL-7 Ex5 staining was found in the ganglia (Fig. 6B, Arrows) and rarely along the nerve fibers whereas IL-7 -17bpEx5 staining was more pronounced in the nerve fibers but also present in ganglia (Fig. 6C, Arrows). Immunoreactivity for IL-7 full/ IL-7  $\delta$ 3/5 was discrete in ganglia (data not shown). To characterize the cells that express IL-7 isoforms, triple staining were performed using S100 $\beta$  as glial marker and Hu as neuronal marker, and analyses was performed by confocal microscopy analyses. IL-7 Ex5 partially co-localized with S100 $\beta$ , not with Hu, and immunoreactivity was observed between Hu and S100 $\beta$  staining (Fig. 7B-C). IL-7 -17bpEx5 co-localized with Hu and S100 $\beta$  (Fig 7D) with a stronger staining in ECG as compared to neurons. As compared to IL-7 Ex5 and IL-7 -17bpEx5, IL-7 full/ IL-7  $\delta$ 3/5 staining was much lower and the immunoreactivity was concentrated in neurons. Staining in ECG was also observed (Fig 7E).

## Discussion

In the present manuscript, we showed that rECG expressed IL-7 at mRNA and protein levels. We also cloned new splice variants of rIL-7 mRNAs that could be transcribed in different isoforms. IL-7 mRNA are differentially regulated by pro-inflammatory cytokine according the developmental stage of EGC.

To our knowledge, we provided here the first evidence that IL-7 is expressed by EGC. IL-7 was previously described to be expressed in postnatal rat astrocytes [19] and in embryonic human astrocytes [20] in culture. Astrocytes are believed to be the central counterpart of EGC [21]. Up to now, no splice variant of IL-7 mRNAs has been cloned in rat or mice. In human, transcription of IL-7 gene gives raise to several spliced variants but such an alternative splicing has never been described in rat [22,23]. Here, we showed that six different splice variants were expressed in rat EGC and sequencing revealed the presence in the rat gene, of a new exon that could be partially spliced. Alignment of this new exon for cross-species comparison revealed homology with mice IL-7 gene but not with the human gene which already contains six exons. Such differences between species have already been reported. Indeed, the new in-frame exon discovered by Siewe et al., in the rabbit gene were also found in horse and leopard, but absent in human or mouse IL-7 gene [24]. Out of the six IL-7 mRNA splice variants in rat, only four seems able to be translated into proteins with signal peptide. Also, in human, several splice variants mRNA are out-of-frame. However, differences between rat IL-7 isoforms are quite dissimilar from the human ones. Indeed, the N- and C-terminal regions of the human IL-7 isoforms are identical and the disparities between the different isoforms are due to internal amino acid deletion. In rat, the IL-7  $\delta 3/5$  isoform exhibits an internal deletion but the two other isoforms have a complete different C-terminal region. So, these isoforms may have different function or receptor affinity. Interestingly, it has been shown that the C-terminal part of hIL-7 is important for its binding to IL-7R and in particular for its interaction with the subunit  $\gamma C$  [25,26]. Change in the C-terminal region in rat IL-7 isoforms raises the possibility of alternative receptor binding. Concerning IL-7  $\delta 2/5$  and IL-7  $\delta 2/3/5$ , if translated, these isoforms will lack the N-terminal part of IL-7 and notably, the signal peptide allowing its secretion. Preliminary work with our antibodies indicated that the different isoforms were produced by neurons and glial cells in the submucosal ganglia. Further investigations will be needed to specify if expression of these isoforms is restricted to the ENS or is broader.

In addition to its implication in immune homeostasis, IL-7 has also been shown to act on neurons. Experiments performed with the neuronal precursor cell line, MK31, showed that treatment with IL-7 favored its neuronal maturation whereas co-treatment with both IL-7 and TGF $\alpha$  elicited action potentials [4]. Neurons in primary cultures respond to IL-7 by increased survival and neurogenesis [3,19]. Neurons expressed IL-7R $\alpha$  and treatment of neurons with IL-7 induces p59<sup>lyn</sup> phosphorylation, as observed in lymphocyte. In adult mice, subcutaneous injection of IL-7 induced c-Fos and STAT-3 phosphorylation in the hypothalamus, a region that express IL-7R $\alpha$  and  $\gamma$ C [27].

The production of rat IL-7 isoforms is of great interest as these isoforms may elicit specific function. Indeed, in human, IL-7 full and IL-7  $\delta$ 5 promoted T cell survival and STAT-5 phosphorylation whereas IL-7  $\delta$ 4 and IL-7  $\delta$ 4/5 had no effect [2]. Functional test on human neural progenitor cells showed that IL-7 full, IL-7  $\delta$ 4/5 and IL-7  $\delta$ 5 but not IL-7  $\delta$ 4, favored their differentiation towards the glial lineage [6]. These data suggest that IL-7 full and IL-7  $\delta$ 5 have similar action on immune and neural cells whereas IL-7  $\delta$ 4/5 could restrict its activity to neural cells. It would be interesting to determine if these discrepancies are due to a different affinity to their receptors as described in a theoretical model of binding [28]. In contrast to human IL-7, the C-terminal region of rat IL-7 isoforms are different, enlarging the possibility of different biological activities and receptor binding that remained to be characterized.

## References

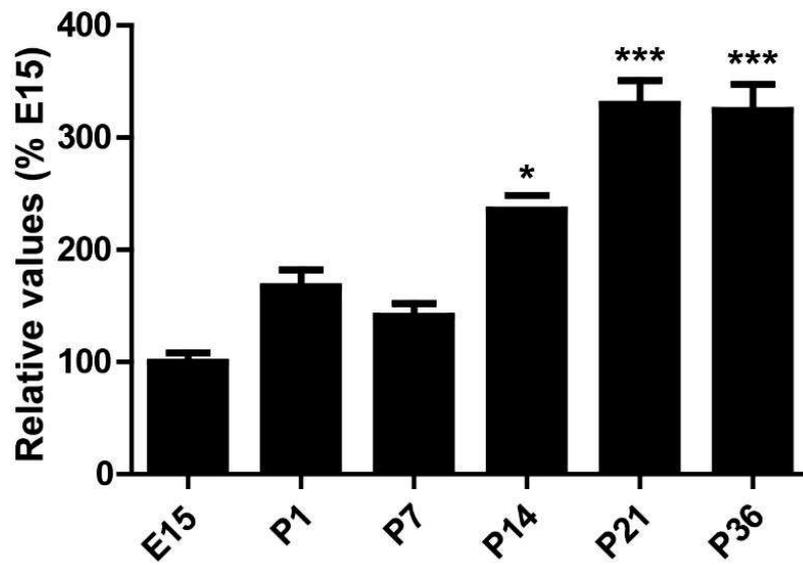
- 1 Lundström W, Fewkes NM, Mackall CL. IL-7 in human health and disease. *Semin Immunol* 2012;**24**:218–24. doi:10.1016/j.smim.2012.02.005
- 2 Vudattu NK, Magalhaes I, Hoehn H, *et al.* Expression analysis and functional activity of interleukin-7 splice variants. *Genes Immun* 2009;**10**:132–40. doi:10.1038/gene.2008.90
- 3 Araujo DM, Cotman CW. Trophic effects of interleukin-4, -7 and -8 on hippocampal neuronal cultures: potential involvement of glial-derived factors. *Brain Res* 1993;**600**:49–55.
- 4 Mehler MF, Rozental R, Dougherty M, *et al.* Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *Nature* 1993;**362**:62–5. doi:10.1038/362062a0
- 5 Rozental R, Morales M, Mehler MF, *et al.* Changes in the properties of gap junctions during neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *J Neurosci* 1998;**18**:1753–62.
- 6 Moors M, Vudattu NK, Abel J, *et al.* Interleukin-7 (IL-7) and IL-7 splice variants affect differentiation of human neural progenitor cells. *Genes Immun* 2010;**11**:11–20.
- 7 Jana M, Mondal S, Jana A, *et al.* Interleukin-12 (IL-12), but not IL-23, induces the expression of IL-7 in microglia and macrophages: implications for multiple sclerosis. *Immunology* 2014;**141**:549–63. doi:10.1111/imm.12214
- 8 Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, *et al.* Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest* 1995;**95**:2945–53. doi:10.1172/JCI118002
- 9 Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, *et al.* The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol* 2014;**817**:39–71. doi:10.1007/978-1-4939-0897-4\_3
- 10 Neunlist M, Rolli-Derkinderen M, Latorre R, *et al.* Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology* 2014;**147**:1230–7. doi:10.1053/j.gastro.2014.09.040
- 11 Neunlist M, Van Landeghem L, Mahé MM, *et al.* The digestive neuronal-glial-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;**10**:90–100. doi:10.1038/nrgastro.2012.221
- 12 Murakami M, Ohta T, Ito S. Lipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin-1beta from enteric glial cells. *J Neurosci Res* 2009;**87**:2095–104. doi:10.1002/jnr.22036
- 13 Rühl A, Franzke S, Collins SM, *et al.* Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;**280**:G1163–71.

- 14 Soret R, Coquenlorge S, Cossais F, *et al.* Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells. *Neurogastroenterol Motil* 2013;**25**:e755–64. doi:10.1111/nmo.12200
- 15 Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, *et al.* Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol-Lond* 2008;**586**:1963–75. doi:10.1113/jphysiol.2007.149815
- 16 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 2001;**25**:402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
- 17 Bonnamain V, Mathieux E, Thinard R, *et al.* Expression of heme oxygenase-1 in neural stem/progenitor cells as a potential mechanism to evade host immune response. *Stem Cells Dayt Ohio* 2012;**30**:2342–53. doi:10.1002/stem.1199
- 18 Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;**171**:131–7.
- 19 Michaelson MD, Mehler MF, Xu H, *et al.* Interleukin-7 is trophic for embryonic neurons and is expressed in developing brain. *Dev Biol* 1996;**179**:251–63.
- 20 Kremlev SG, Gaurnier-Hausser AL, Del Valle L, *et al.* Angiocidin promotes pro-inflammatory cytokine production and antigen presentation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2008;**194**:132–42. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.11.003
- 21 Jessen KR, Mirsky R. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 1980;**286**:736–7.
- 22 Korte A, Moricke A, Beyermann B, *et al.* Extensive alternative splicing of interleukin-7 in malignant hematopoietic cells: implication of distinct isoforms in modulating IL-7 activity. *J Interferon Cytokine Res* 1999;**19**:495–503. doi:10.1089/107999099313947
- 23 Rane L, Vudattu N, Bourcier K, *et al.* Alternative splicing of interleukin-7 (IL-7) and interleukin-7 receptor alpha (IL-7R $\alpha$ ) in peripheral blood from patients with multiple sclerosis (MS). *J Neuroimmunol* 2010;**222**:82–6. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.02.014
- 24 Siewe BT, Kalis SL, Esteves PJ, *et al.* A novel functional rabbit IL-7 isoform. *Dev Comp Immunol* 2010;**34**:828–36. doi:10.1016/j.dci.2010.03.003
- 25 Görgün G, van der Spek J, Cosenza L, *et al.* ALTERED BIOLOGICAL ACTIVITY ASSOCIATED WITH C-TERMINAL MODIFICATIONS OF IL-7. *Cytokine* 2002;**20**:17–22. doi:10.1006/cyto.2002.1974
- 26 McElroy CA, Dohm JA, Walsh STR. Structural and Biophysical Studies of the Human IL-7/IL-7R $\alpha$  Complex. *Structure* 2009;**17**:54–65. doi:10.1016/j.str.2008.10.019
- 27 Macia L, Viltart O, Delacre M, *et al.* Interleukin-7, a New Cytokine Targeting the Mouse Hypothalamic Arcuate Nucleus: Role in Body Weight and Food Intake Regulation. *PLoS ONE* 2010;**5**:e9953. doi:10.1371/journal.pone.0009953

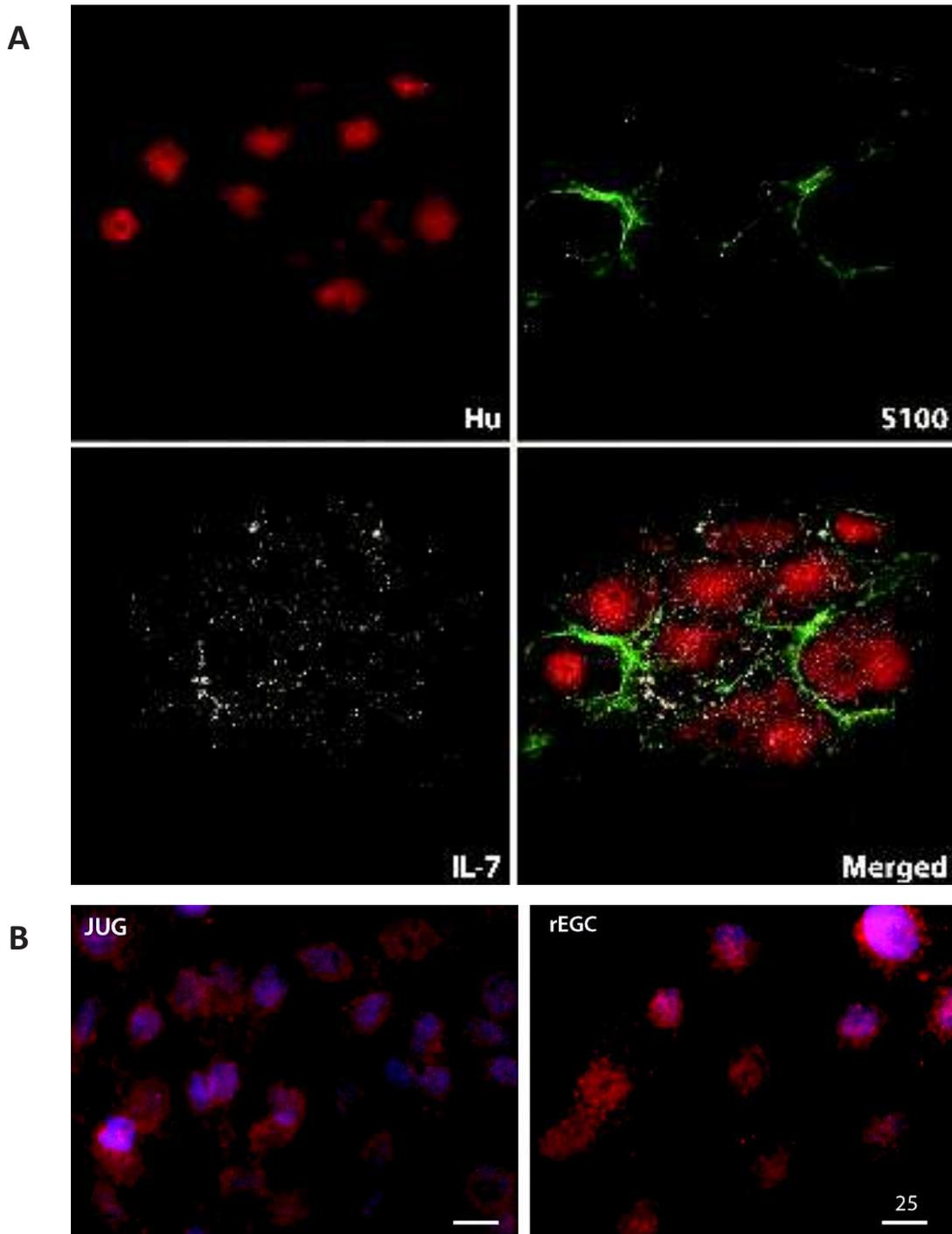
28 Kroemer RT, Kröncke R, Gerdes J, *et al.* Comparison of the 3D models of four different human IL-7 isoforms with human and murine IL-7. *Protein Eng* 1998;**11**:31–40.

Name	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')	Size (pb)
rIL-7 all	CTGGATGCCTCCTGGTCAAA	TGCAGATGACAGGGTTGCTT	145
rIL-7R all	GTATCAAGACTTGCTGCCAAGC	TGGTTTTCTGTGGAAGGGGTC	212
rIL7 X1	AAGCAAGGTATCCCCTACTCTAG	TGTTCAATGTCCCTGAGTGGT	127
rIL7 X1-17pb	CACAAGCAAGAACAAAGCCTC	TGTTCAATGTCCCTGAGTGGT	113
rIL7 Full	TCAATCAACTGGACAAAATGACAG	GTTTTTCTTCCTTGCTTGTGC	235
rIL7 d3.5	CAATCAACTGGAAGCTGCTTTT	GTTTTTCTTCCTTGCTTGTGC	

**Table 1:** Primers used for Q-PCR

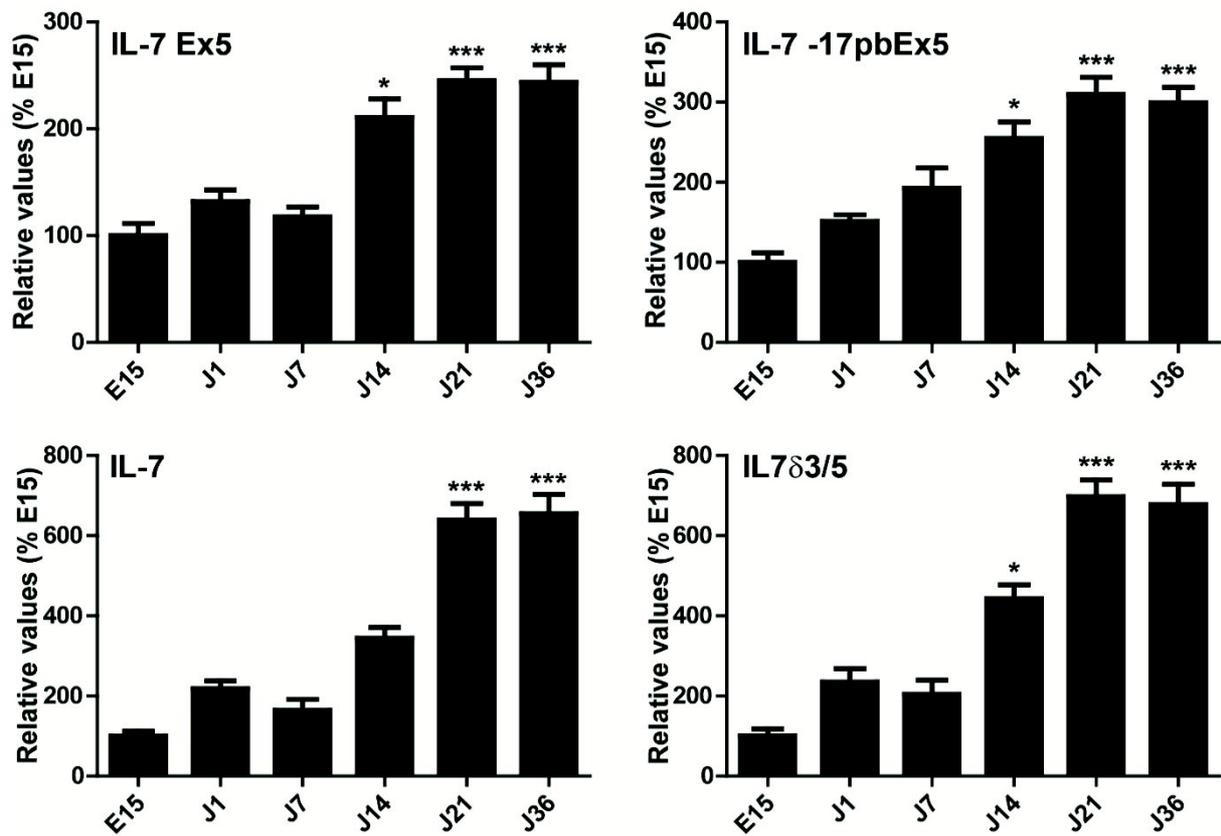


**Figure 1:** Expression of IL-7 all in the gastrointestinal track during the development. The RNA were prepared from the gastrointestinal track of embryonic (E) or postnatal (P) rats and submitted to Q-PCR using IL-7 primers. Values are expressed in percentage of the mean value of E15. (n= 7-8).

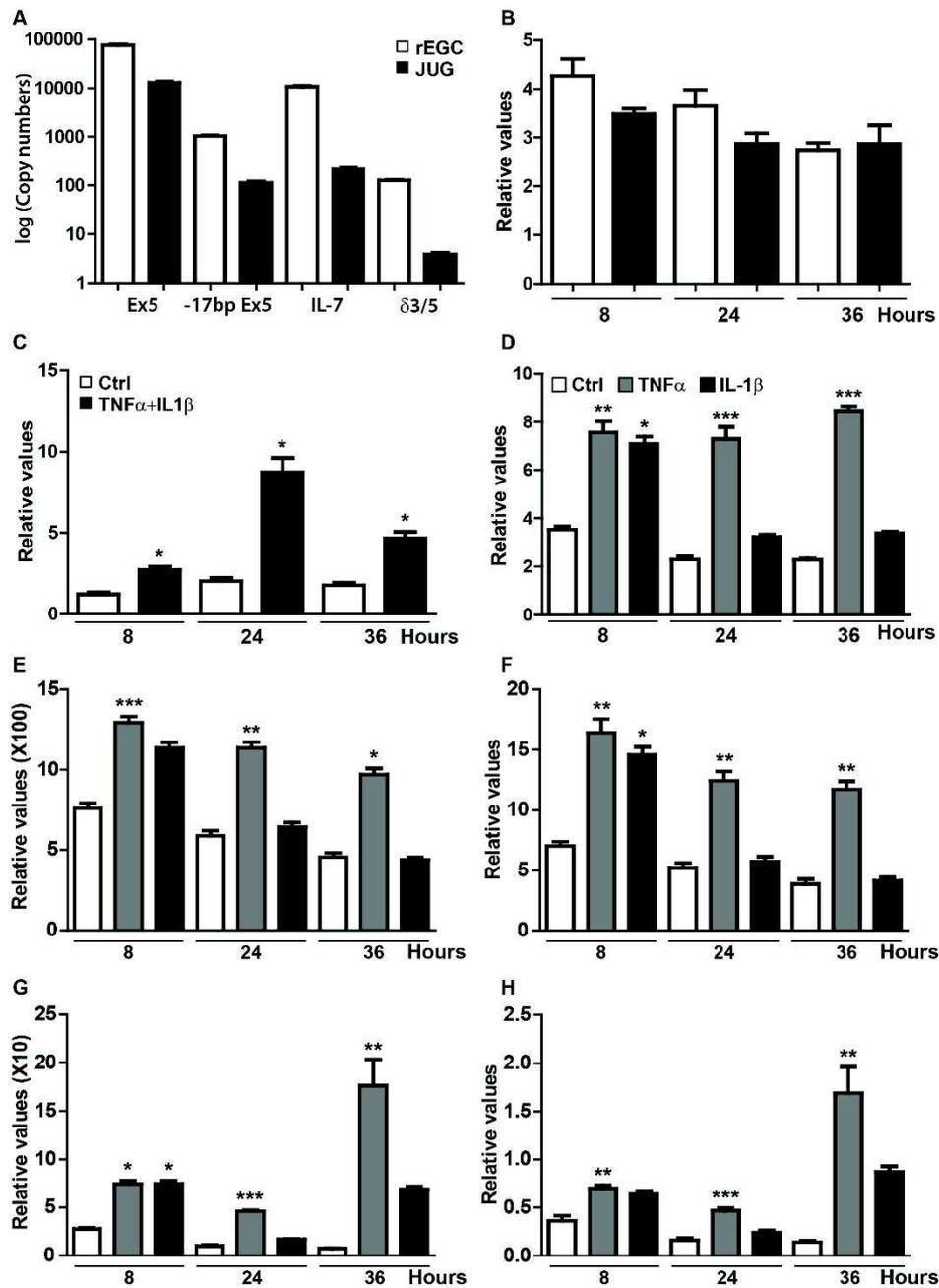


**Figure 2:** **A**, Expression of IL-7 full in the submucosal ganglia. Expression was analysed using a commercial antibody raised against IL-7 full. Confocal micrograph of double immunohistochemistry against S100 $\beta$  (green), Hu (red) and IL-7 full (purple). **B**: Micrograph of immunocytochemistry against IL-7 full (red) performed on rEGC and JUG labelled with Dapi (blue). Scale bar: 25  $\mu$ m. Scale Bar: A, 10  $\mu$ m; B, 25  $\mu$ m

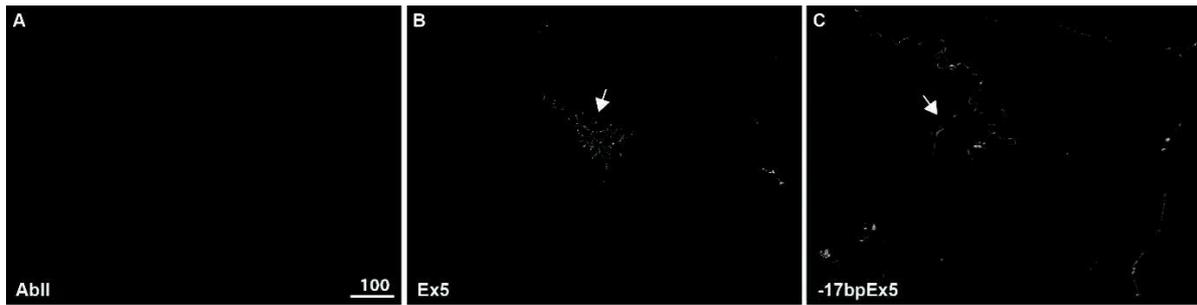




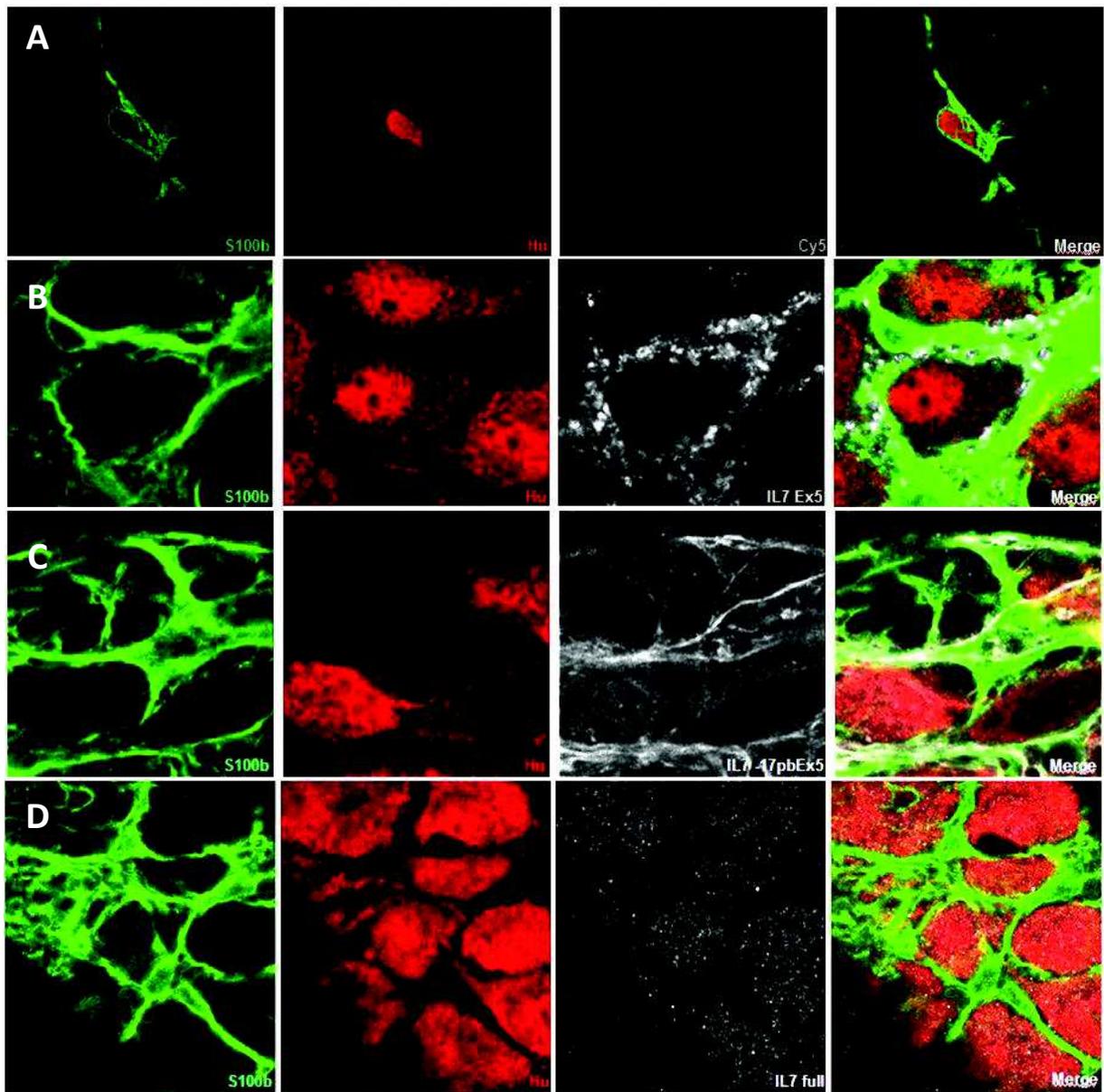
**Fig 4:** Expression of IL-7 Ex5, IL-7 -17bpEx5, IL-7 full and IL-7  $\delta$ 3/5 mRNA during the development of the rat intestinal track. (n= 7-8 per group). Q-PCR data are expressed as percentage of the mean of the mRNA levels at E15.



**Figure 5:** A: Expression of IL-7 Ex5, IL-7 -17bpEx5, IL-7 full and IL-7  $\delta 3/5$  mRNA in JUG (black bar) and rEGC (white bar) in culture. The mRNA levels are expressed in copy number for 40 ng RNA equivalent cDNA. B-C, Time-course expression of IL-7 all in rEGC (B) or JUG (C) after treatment with TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (black bar) or vehicle (white bar). D-H, Time-course expression of IL-7 all (D) IL-7 Ex5 (E), IL-7 -17bpEx5 (F), IL-7 full (G) and IL-7  $\delta 3/5$  (H) in JUG after treatment with TNF $\alpha$  (grey bar), IL-1 $\beta$  (black bar) or vehicle (white bar). N=6 per group.



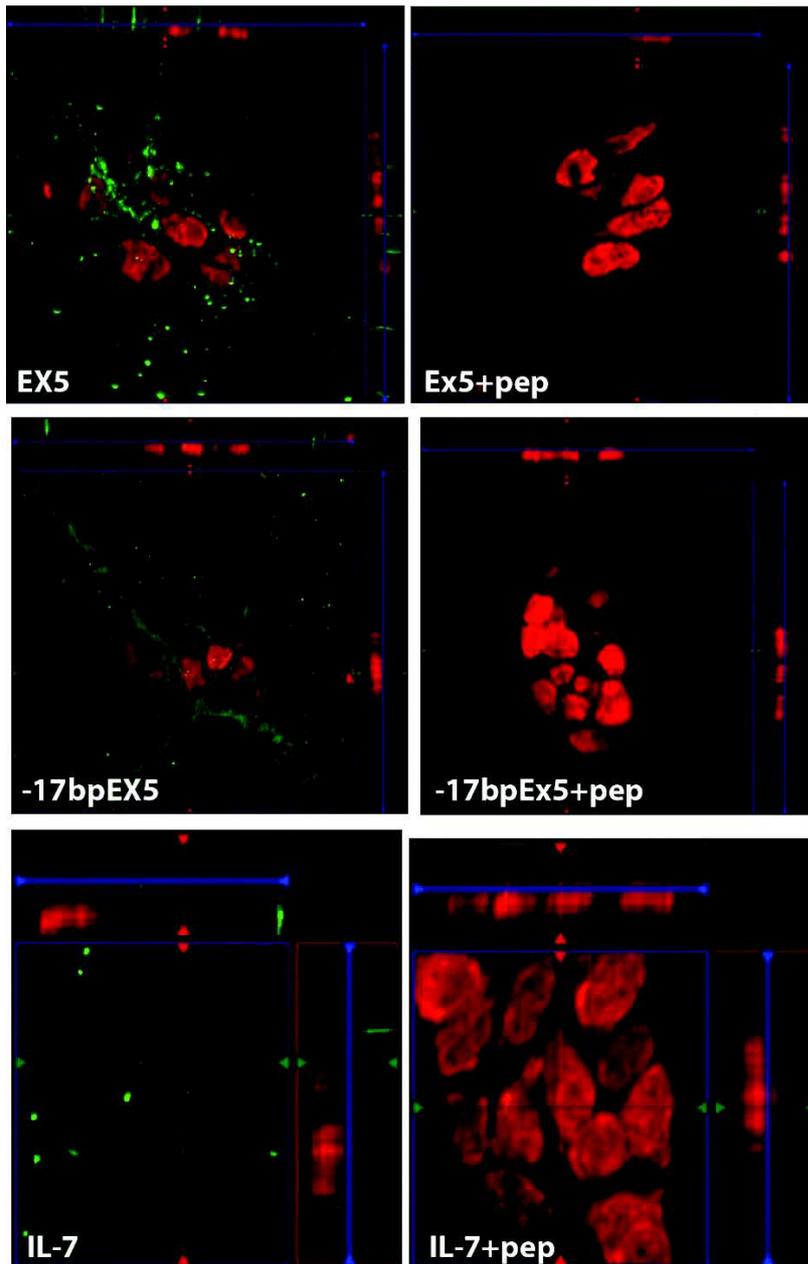
**Figure 6:** Expression of IL-7 isoforms in submucosal plexus. Micrograph of submucosal plexus after immunohistochemistry with IL-7 Ex5 (Ex5, B), IL-7 -17bpEx5 (-17bpEx5, C) antibodies or only with the secondary antibody (AbII, A). Arrows point submucosal ganglia. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ .



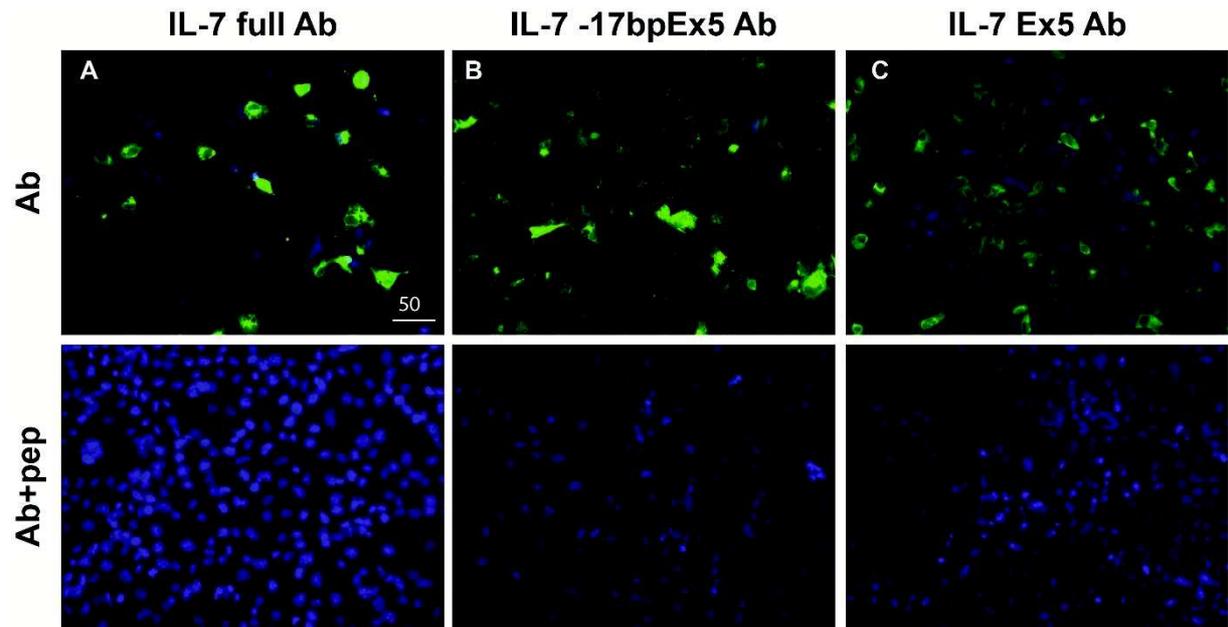
**Figure 7:** Expression of IL-7 isoforms in the submucosal plexus. Confocal micrograph of submucosal ganglia stained with anti-S100 $\beta$  (green, A-E) or anti-Hu (red, A-E) antibodies in combination with antibodies (blue) directed against IL-7 Ex5 (B-C), IL-7 -17bpEx5 (D) or IL-7 full (E). Secondary antibody alone was used as a negative control (A).



**Figure 8:** Schematic representation of the primers (Arrows) used to differentiate IL-7 isoforms.



**Figure S2:** Double immunohistochemistry of submucosal ganglia stained with anti-Hu (red, A-E) and antibodies (green) raised against IL-7 Ex5, IL-7 -17bpEx5 or IL-7 full in presence or absence of 5-fold excess of blocking peptides (+pep). Analyses were performed with a fluorescent microscope AxioZoom.V16 equipped with an Apotome.



**Figure S3:** Cos cells were transfected with expression vectors coding for IL-7 full (A), IL-7 -17bpEx5 (B) or IL-7 Ex5 (C). After 48 hrs, the cells were fixed and submitted to immunocytochemistry with the specific antibodies (green) in presence or absence of 5-fold excess of blocking peptide.

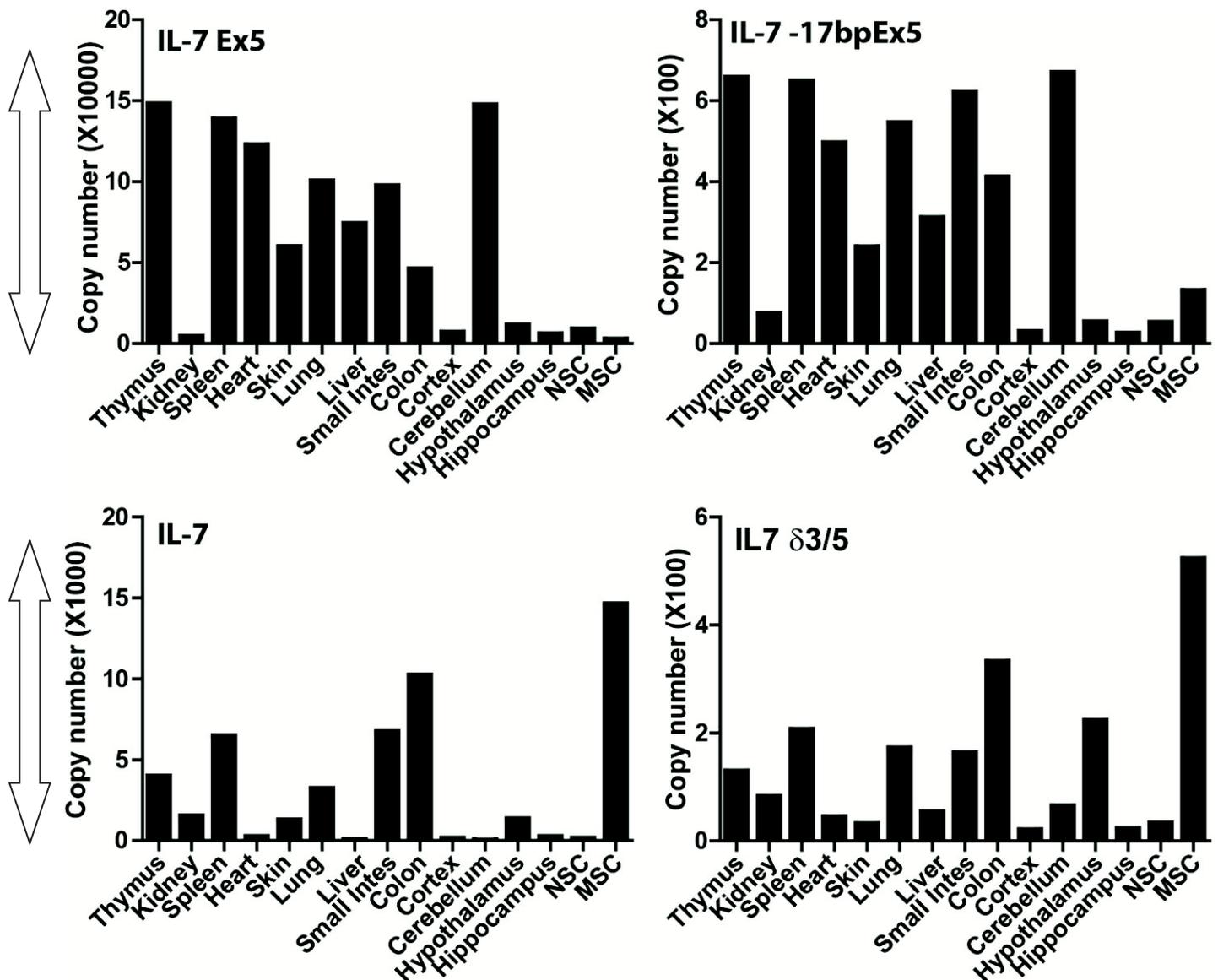
## Discussion article 2

Une production d'IL-7 par les cellules gliales du SNC avait été montrée *in vitro* à partir de cellules de rat (Michaelson et al., 1996) ou humaines (Kremlev et al., 2008). Les analyses immunocytochimiques que nous avons réalisées ont montré que la glie entérique est également capable que synthétiser l'IL-7 *in vitro*. Les conditions d'expression de cette interleukine *in vivo* restent à définir mais *in vitro*, son expression dans les CGE issues d'embryons de rat est stimulée par des médiateurs de l'inflammation comme l'IL-1 ou le TNF $\alpha$ .

La complexité de l'épissage alternatif du gène de l'IL-7 chez l'homme et l'absence de variant d'épissage cloné chez le rat, nous a conduit à rechercher un potentiel épissage alternatif de ce gène chez le rat. Une analyse par PCR réalisée sur la partie codante de l'IL-7, a permis de détecter différents variants d'épissage. Le clonage et le séquençage ont révélé la présence de six transcrits dont quatre codants, ainsi que la présence d'un nouvel exon. Parmi les quatre transcrits codants, un correspond à la forme classique de l'IL-7, un second correspond à une forme tronquée et les deux derniers dotés d'un exon supplémentaire généreraient des protéines ayant une partie C-terminale très différente de l'IL-7 classique. L'analyse du nombre de copies indique une plus forte expression des différents variants d'épissage dans les CGE adultes comparativement aux cellules embryonnaires. Une augmentation de l'expression des ARNm de l'IL-7 a été observée après traitement par l'IL-1 et le TNF $\alpha$  mais uniquement dans les CGE embryonnaires. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour déterminer si cette différence de réponse aux médiateurs de l'inflammation est due à une différence de sensibilité des cellules aux cytokines ou si l'expression du gène de l'IL-7 est plus difficilement régulée dans les CGE adultes. A ce sujet, il est important de noter qu'en culture, les variants d'épissage sont plus fortement exprimés dans les CGE adultes comparé aux cellules embryonnaires, et que les expériences ont été effectuées en présence de sérum de veau fœtal qui contient de nombreux facteurs capables d'interférer avec la réponse des CGE.

La génération d'anticorps spécifiques dirigés contre l'IL-7 full, l'IL-7 Ex5, l'IL-7 -17pbEx5 nous a permis de mettre en évidence que ces isoformes étaient toutes exprimées dans les ganglions sous-muqueux avec une certaine spécificité quant à la localisation et le niveau d'expression. Une expérience préliminaire par PCR indique que ces variants sont exprimés

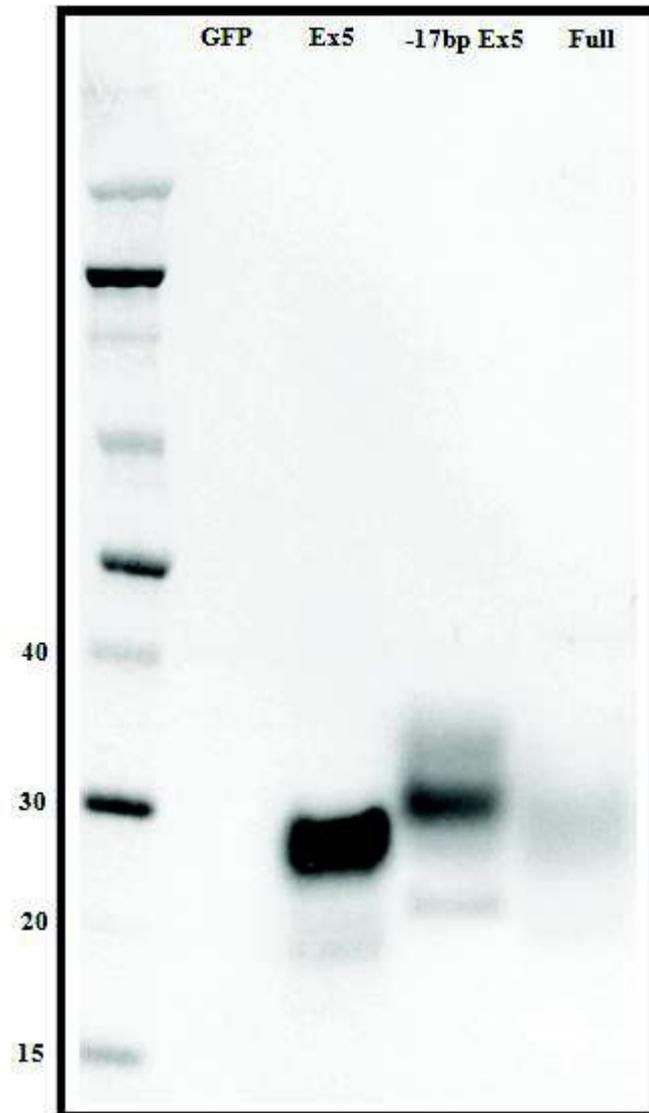
dans différents tissus avec des niveaux d'expression très variables selon le tissu et le type de variants (Fig. C). Une analyse au niveau protéique sera nécessaire pour confirmer que ces variations transcriptionnelles se traduisent par des changements au niveau protéique.



*Figure C : Expression des variants d'épissage de l'ARNm IL-7 dans différents tissus. L'échelle est exprimée en nombre de copies. Les niveaux d'expression sont très variables suivant les tissus et les variants.*

La seconde partie de l'étude a consisté à rechercher d'éventuelles différences dans l'activité biologique des isoformes. Dans ce but, des constructions comprenant la séquence codante pour l'une des isoformes (IL-7, IL-7 Ex5 ou IL-7 -17bpEx5 et IL-7 δ3/5) couplée à une séquence de biotinylation en C-terminale ont été clonées dans un vecteur pKCR6.

Chacune des constructions a ensuite été transfectée dans des cellules COS. Le surnageant de ces cellules a été récupéré après 3 jours. Une analyse par western blot avec un anticorps anti-biotine montre que les protéines sont bien produites par les cellules COS (Fig. D). Nous n'avons pour l'instant pas réussi à produire la forme IL-7  $\delta 3/5$ .



*Figure D* : Détection des isoformes protéiques IL-7 full, IL-7 Ex5, IL-7 -17pbEx5 et le contrôle GFP par Western blot dans les cellules COS transfectées, avec un anticorps anti-TAG (séquence de biotinylation). Les isoformes d'intérêt sont bien produites dans les cellules transfectées.

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer si les différentes isoformes avaient une action sur les lymphocytes T. Pour étudier un éventuel effet stimulateur de ces isoformes,

des lymphocytes T marqués au CFSE et activés par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 ont été traités par les différentes isoformes (20 ng/mL) et analysés par cytométrie de flux après 3 jours de traitement.

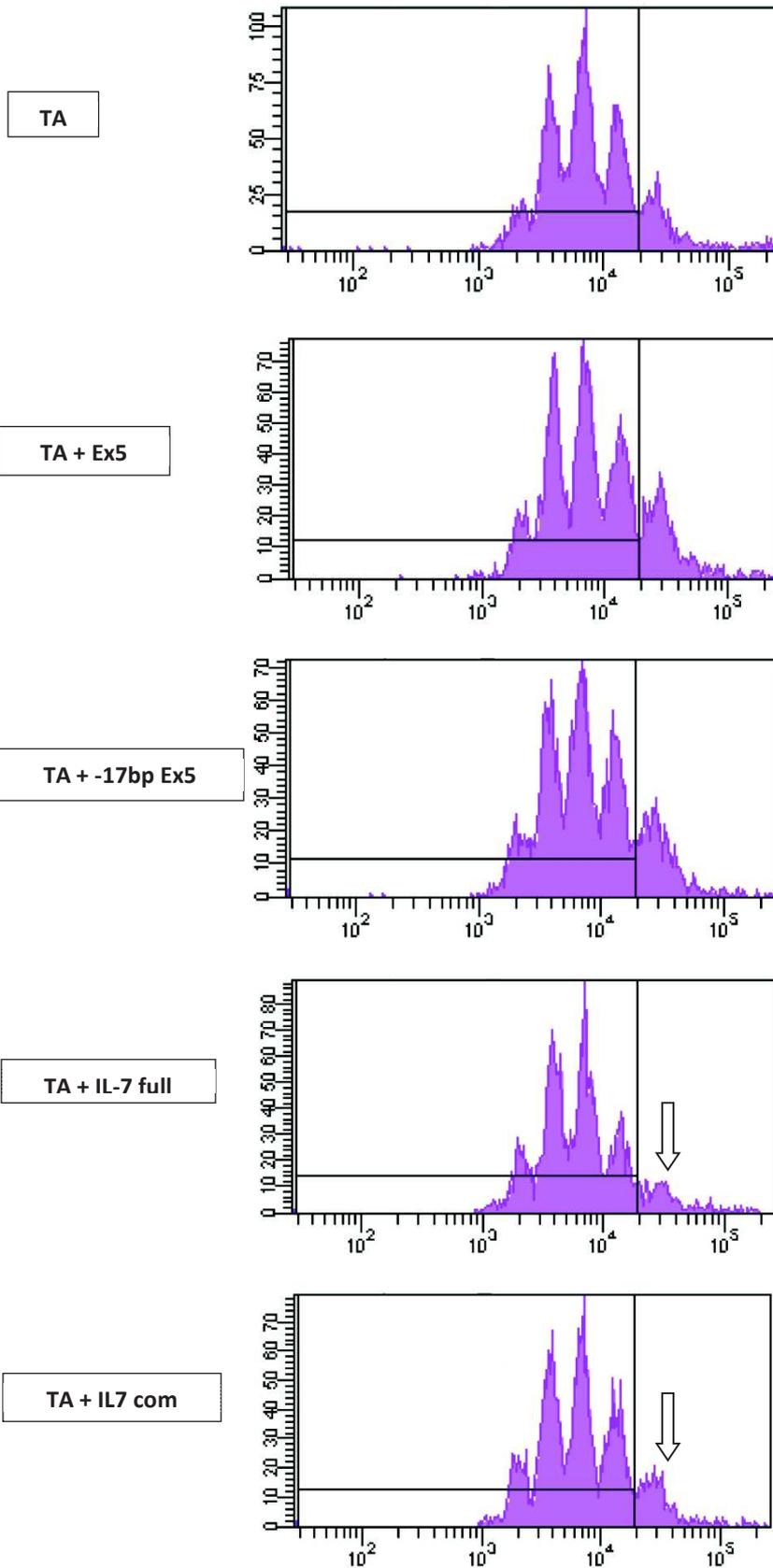


Figure E : Effet des isoformes de l'IL-7 sur la prolifération des cellules T activées. Etude par cytométrie de flux de la prolifération des lymphocytes T, marqués par du CFSE, activés par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (TA) et traités par l'IL-7 Ex5 (TA + Ex5), l'IL-7 -17pbEx5 (TA + -17pbEx5), l'IL-7 canonique (TA + IL-7 full) ou par l'IL-7 canonique commercial (TA +IL7 com).

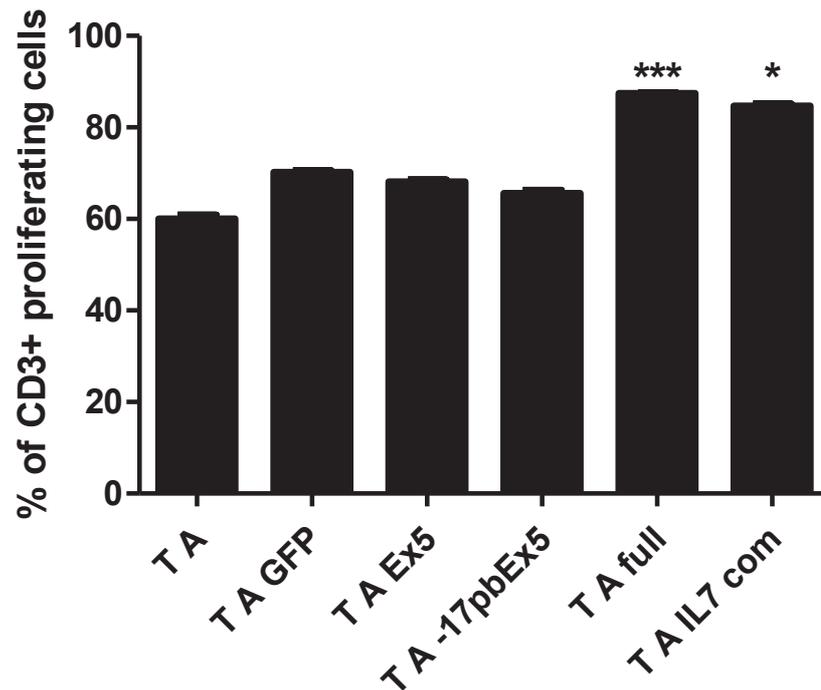


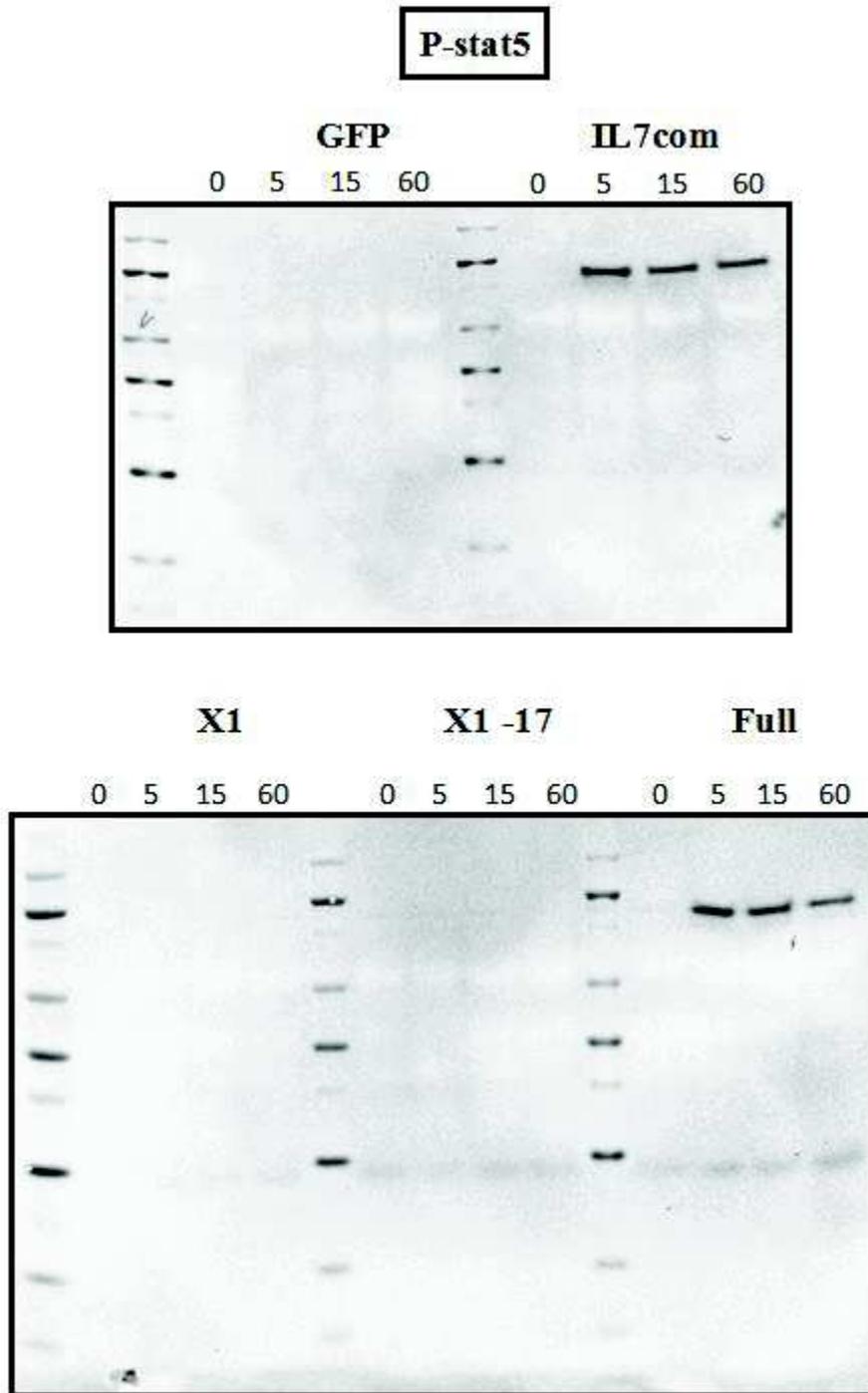
Figure F : Effet des isoformes de l'IL-7 sur la prolifération des cellules T activées Les données de cytométrie de flux (Fig. E) ont été analysées par un test non paramétrique Kruskal-Wallis suivi d'un post-test Dunns sur GraphPad Prism (GraphPad Prism 5.0, GraphPad software Inc.). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ .

Les résultats préliminaires indiquent que la prolifération des lymphocytes T activés est stimulée en présence de l'IL-7 canonique (full et commercial) par rapport aux lymphocytes T activés mais non traités (Fig. E et F). Cette augmentation n'a pas été retrouvée avec les isoformes Ex5 et -17pbEx5, ni avec le surnageant des cellules contrôles transfectées avec le vecteur GFP (TA GFP).

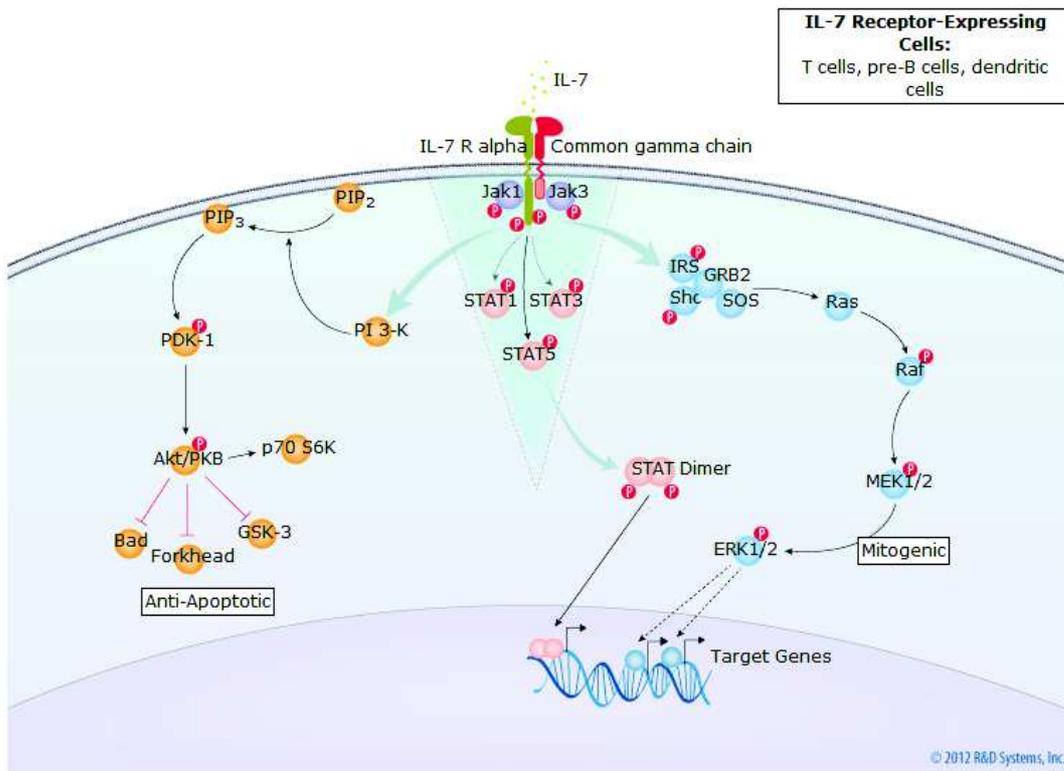
Comme l'IL-7 a pour voie de transduction, l'activation de la voie Jak-Stat (Fig. H), nous avons analysé dans quelle mesure les isoformes de l'IL-7 induisaient la phosphorylation précoce de Stat-5. Pour ce faire, des lymphocytes traités ou non (0) avec les différentes

isoformes de l'IL-7 pendant 5, 15 ou 60 minutes, ont été collectés et la phosphorylation de Stat-5 a été analysée par Western blot (Fig. G). Une phosphorylation de Stat-5 a été détectée dans les lymphocytes stimulés pendant 5, 15 ou 60 minutes avec les isoformes canoniques full et commerciale. La phosphorylation est restée indétectable après traitement par les isoformes Ex5 (X1) et -17pbEx5 (X1 -17) ou le contrôle GFP, quel que soit le temps d'exposition.

Les résultats préliminaires indiquent une absence d'effet des nouvelles isoformes sur la prolifération des lymphocytes T et la phosphorylation de Stat-5, alors que les isoformes canoniques de l'IL7 sont, quant à elles, actives. Avant de conclure quant à l'inactivité des isoformes Ex5 (X1) et -17pbEx5 (X1 -17) sur les lymphocytes, il serait important de tester aussi les autres voies de signalisation.



*Figure G : Détection par Western blot de la protéine Phospho-Stat5 dans les cellules T traitées ou non (0) avec les différentes isoformes d'IL-7. Les lymphocytes T collectés ont été traités 5, 15 ou 60 minutes avec les isoformes IL-7 Ex5 (X1), -17pbEx5 (X1-17), l'IL-7 canonique full ou commercial, ou le contrôle GFP. Un contrôle lymphocytes T non traités a également été testé. P-Stat5 est détectée après traitement avec l'IL-7 canonique full ou commercial quel que soit le temps de stimulation.*



*Figure H : Voie de signalisation de IL-7 dans les cellules de l'immunité (lymphocytes T et pré-B, cellules dendritiques).*

Une différence d'effets entre les isoformes a déjà été observée sur des cellules humaines. Ainsi, l'IL-7 canonique et l'isoforme  $\delta 5$  activent la phosphorylation de Stat5 et stimulent la survie des cellules T contrairement aux isoformes  $\delta 4$  et  $\delta 4/5$  qui étaient sans effet (Vudattu et al., 2009). Il est toutefois à noter que la partie C-terminale de l'IL-7 est identique pour les différentes isoformes humaines, contrairement à ce qui observé pour les isoformes de rat. Des modifications dans la partie C-terminale des isoformes de l'IL-7 de rat pourraient être à l'origine de leur absence d'effet car ce domaine semble important pour l'interaction de l'IL-7 avec son récepteur, et plus particulièrement avec la sous-unité  $\gamma C$  (Görgün et al., 2002; McElroy et al., 2009).

Les études que nous avons effectuées à ce jour, ne sont que très préliminaires et la production des différentes isoformes permettra de tester leurs effets sur différents types cellulaires. En effet, l'IL-7 a une action pléiotropique, aussi bien sur les lymphocytes T que sur les cellules non immunes. Ainsi, l'IL-7 a des effets particuliers selon l'origine des lymphocytes T (intraépithéliale ou sanguine) (Watanabe et al., 1995). De même, l'IL-7 favorise la prolifération des cellules épithéliales entériques (Shalapour et al., 2012) alors que

dans le SNC, elle a un impact sur la survie des neurones ou la différenciation des cellules souches neurales (Araujo and Cotman, 1993; Michaelson et al., 1996). Il a également été rapporté chez l'Homme, que les isoformes avaient leur propre spécificité suivant le type cellulaire (Moors et al., 2010; Vudattu et al., 2009). Ainsi, l'isoforme IL-7  $\delta 4/5$  est active sur les progéniteurs neuraux mais pas sur lymphocytes. Au vu de ces observations, les isoformes produits pourront être testés sur la prolifération, la différenciation ou la survie des lymphocytes intraépithéliaux entériques, des cellules du SNE et des cellules épithéliales. Un éventuel effet antagoniste des différentes isoformes et leurs effets combinés seront également testés. Ces études constituent une première étape pour comprendre l'effet et le rôle des isoformes de l'IL-7. Il serait intéressant également de savoir si chez l'Homme, il existe des isoformes avec des parties C-terminal différentes de celle de l'IL-7 classique.

**- TROISIEME ARTICLE -**

**(Soumis)**

**Impact des CGE sur la prolifération des lymphocytes T**

Kermarrec Laetitia<sup>1,2,3</sup>, Durand Tony<sup>1,2,3</sup>, Neunlist Michel<sup>1,2,3</sup>, Naveilhan Philippe<sup>1,2,3</sup> and  
Neveu Isabelle<sup>1,2,3</sup>.

## Introduction article 3

De récentes données suggèrent que les CGE pourraient jouer un rôle immunomodulateur au sein du tractus digestif. Tout d'abord, les CGE sécrètent des molécules immunomodulatrices comme l'IL-6, l'oxyde nitrique, le TGF $\beta$  et différents neurotransmetteurs (De Winter and De Man, 2010). De plus, les CGE répondent elles-mêmes aux cytokines (Cabarrocas et al., 2003) et des études menées chez la souris ont montré que l'ablation des CGE entraînait une inflammation digestive massive (Cornet et al., 2001). De toute évidence, les CGE pourraient influencer sur les réponses immunes. En outre, leurs homologues du SNC, les astrocytes, sont capables de réguler la prolifération des lymphocytes T. Partant de ce constat, nous avons entrepris d'étudier l'impact de CGE contrôles ou issues de patients MICI, sur la prolifération des lymphocytes T. Pour ce faire, nous avons isolé des CGE à partir de pièces opératoires issues de trois patients atteints de cancer comme contrôle (pris à distance de la tumeur) et de trois patients atteints de la maladie de Crohn, et nous avons testé leurs effets sur les lymphocytes T in vitro.

## **Enteric Glial Cells have specific immunosuppressive properties**

Kermarrec Laetitia<sup>1,2,3</sup>, Durand Tony<sup>1,2,3</sup>, Neunlist Michel<sup>1,2,3</sup>, Naveilhan Philippe<sup>1,2,3</sup> and Neveu Isabelle<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>, INSERM, UMR 913, Nantes F-44035, France

<sup>2</sup>, Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes F-44035, France

<sup>3</sup>, CHU de Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, IMAD, Nantes F-44093, France

Corresponding author: Dr Isabelle Neveu. Faculté de Médecine, Nantes F-44035, France. [isabelle.neveu@univ-nantes.fr](mailto:isabelle.neveu@univ-nantes.fr)

### **Abstract**

Enteric glial cells (EGC) have trophic and neuroregulatory functions in the enteric nervous system, but whether they exert a direct effect on immune cells is unknown. Here, we used co-cultures to show that human EGC can inhibit the proliferation of activated T lymphocytes. Interestingly, EGC from Crohn's patients were effective at one EGC for two T cells whereas EGC from control patients required a ratio of 1:1. These data suggest that EGC contribute to local immune homeostasis in the gastrointestinal wall. They also raise the possibility that EGC have particular immunosuppressive properties in inflammatory bowel diseases such as Crohn's disease.

**Keywords :** Enteric Glial Cells, Immunoregulation, Inflammatory Bowel Diseases, T Cell.

### **Abbreviations :**

PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells; EGC, Enteric Glial Cells; ENS, Enteric Nervous System; PHA, Phytohaemagglutinin; CFSE, Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester; CD, Cluster of Differentiation; FCS, Fetal Calf Serum.

## **INTRODUCTION**

Enteric glial cells (EGC) are a particular class of glial cells that play a critical role in the function and homeostasis of the neurogastrointestinal tract (Gulbransen and Sharkey, 2012). Some are present in the lamina propria or associated with interganglionic nerve fiber tracts, but major populations are found in the myenteric and submucosal ganglia of the enteric nervous system (ENS). As central glial cells, intraganglionic EGC have neurotrophic functions and modulate neural transmission (Neunlist et al., 2013) but nothing is known about their impact on immune cells as reported for astrocytes and central neural stem cells (Bonnamain et al., 2012; Einstein et al., 2003; Gimsa et al., 2004; Meinel et al., 1994). Yet, control of the immune response is essential to ensure host defense without compromising gut integrity. Such a control is particularly critical in inflammatory bowel disorders as Crohn's disease characterized by intestinal chronic inflammation, abdominal cramping and persistent diarrhea (Baumgart and Sandborn, 2012). To investigate potential immunomodulatory properties of EGC, glial cells from human myenteric plexus were cocultured with activated T lymphocytes. Here, we show that hEGC inhibit T cell proliferation. Comparative analyses indicate a stronger immunosuppressive effect of EGC from patients with Crohn's disease as compared to control patients.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Cell preparation**

Patients undergoing colon resection (3 Cancer, 3 Crohn) gave their informed consent. The study was approved by the "Federation des Biotheques" (biobank) of the University Hospital of Nantes, according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Human, and registered under the no. DC-2008-402. Primary cultures of hEGC were prepared from the myenteric plexus of the patients and expanded as previously described (Soret et al., 2013). Blood cells were obtained by cytopheresis from healthy donors who gave their written informed consent (Etablissement Français du Sang, Nantes, France). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences Europe GmbH, Milan, Italy), according to the manufacturer's instructions.

### **Proliferation assay**

The impact of hEGC on the proliferation of T cells was evaluated by incubating variable ratios of hEGCs (3-5 passages) with  $10^5$  PBMC labelled with 5  $\mu$ M of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) (Lyons and Parish, 1994). In some experiments, hEGC were replaced by 50% (vol/vol) of EGC-conditioned media (3 days). A ratio of one T cell for two hEGC was used to evaluate the allogeneic reaction. The proliferation assay was performed by plating hEGC in 96-well flat-bottomed culture plates. After one night,  $10^5$  PBMC stimulated or not with the phytohaemagglutinin (PHA, a lectin from the *Phaseolus vulgaris*, 5  $\mu$ g/mL Sigma-Aldrich, Missouri, USA), were

added to hEGC. Cells were cocultured for 3 days in DMEM medium/ RPMI 1640 medium (1:1) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 5% inactivated FCS, 1% non-essential amino acids, 5 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate and 1  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol. Before flow cytometry analyzes, cells were stained with aqua Live/Dead reagent (Thermo Fisher Scientific) for 30 min on ice. To characterize T lymphocytes, cells were immunostained with HIT3a (CD3)-APC and RPA-T8 (CD8)-PECy7 (BD Pharmingen, San Diego, CA) for 30 min on ice. Analyses were performed using LSR II Flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, <http://wwwbdbiosciences.com>) and data were analyzed with BD FACSDiva Software (BD Biosciences). The percentage of proliferating living (Aqua<sup>-</sup>) T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>) was determined for each well. Six wells were tested for each cell density and the published results correspond to the mean values of six wells.

## RESULTS

### **Human EGC inhibit the proliferation of activated T cells.**

To characterize the properties of hEGC, primary cultures were prepared from the myenteric plexus of patients suffering from colorectal cancer (control EGC, away from the tumor) or Crohn's disease (Crohn EGC). Their effects on T cell proliferation were investigated by co culturing variable number of hEGC with 10<sup>5</sup> PHA-activated hPBMC. After three days, CFSE profiles were analyzed by flow cytometry (Fig. 1A) and the mean percentage of proliferating living (Aqua<sup>-</sup>) T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>) was determined. As PBMC and EGC were collected from different individuals, the allogeneic response was controlled and no increase in the number of proliferating CD3<sup>+</sup> cells was observed when incubating EGC with unstimulated PBMC (Fig. 1B and C). As expected, PBMC stimulation with PHA strongly stimulated the proliferation of CD3<sup>+</sup> cells. Coculture of PBMC with small amount of EGC did not affect the rate of proliferation but a ratio of one control EGC for one stimulated T cell strongly inhibited T cell proliferation as illustrated by the decrease in the percentage of proliferating CD3<sup>+</sup> cells (48.8 % decrease) (Fig. 1D). This inhibitory effect was also observed with Crohn EGC with an even more pronounced effect as only 1.1% of the CD3<sup>+</sup> cells proliferated at a ratio of one Crohn EGC for one stimulated T cell (Fig.1 E).

### **Crohn EGC exert a stronger inhibition than control EGC.**

To control the property differences between control and Crohn EGC, the results from three control and three Crohn's disease patients were averaged and statistically compared (Fig. 2A and B). The low percentage of proliferating CD3<sup>+</sup> cells at a ratio of one EGC for one stimulated T cell was confirmed with an inhibitory effect clearly lower for control EGC (64.1% decrease) as compared to Crohn EGC (95.8% decrease). Interestingly, only Crohn EGC inhibited significantly T cell proliferation at a ratio of one EGC for two stimulated T cells (82.2% decrease) (Fig. 2B). A tendency to a lower proliferation was observed at other ratios (1/5, 1/10) but the results were not statistically significant.

## **EGC inhibit the proliferation of both CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lymphocytes.**

To determine whether EGC had a selective effect on the CD8<sup>+</sup> subpopulation, double immunostaining was performed. Flow cytometry analyses showed a reduced number of both proliferating CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells in the presence of EGC. A stronger inhibition of T cell proliferation was observed in all cases with Crohn EGC (Fig. 2C-F).

### **A moderate contribution of soluble factors**

The contribution of soluble factors in the suppressive effect of EGC was determined by incubating PHA-activated T cells for three days with EGC-conditioned media. A low but significant inhibition of the percentage of CD3<sup>+</sup> proliferating cells was observed with the supernatants from both control and Crohn EGC (Fig.3). Conditioned media from Crohn EGC had a more pronounced effect (19.7% decrease) than conditioned media from control EGC (13.5% decrease).

## **DISCUSSION**

In the present paper, we provide the first evidence that human EGC may locally modulate immune responses by inhibiting the proliferation of activated T cells. These observations are in line with the demonstration that astrocytes and neural stem cells have immunosuppressive activity that can be important in case of inflammatory or immune reaction in the central nervous system ( Bonnamain et al., 2012; Einstein et al., 2003; Gimsa et al., 2004; Meinel et al., 1994). The signal transduction pathways remain to be characterized but the modest inhibitory effects of EGC-conditioned media on T cell proliferation rather suggest the requirement of a direct cell-cell contact. As inhibitory effects are observed on CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells, hEGC are most probably able to control the proliferation of CD8 and CD4 lymphocytes. This observation is important as both cell types are implicated in the intestinal immune homeostasis (Izcue et al., 2009). Interestingly, EGC isolated from the myenteric plexus of Crohn's disease patients were more potent than EGC isolated from patients unaffected by this inflammatory bowel disease. Difference in the properties of Crohn and control EGC has already been observed by Pochard et al., who showed that Crohn EGC were unable to reduce the permeability of the intestinal epithelial barrier (Pochard et al., 2015). Whether increased immunosuppressive activity of EGC is specific of Crohn's disease remains to be determined but we may hypothesize that such a change is an adaptive response to control the immune response around the neuronal ganglia in case of inflammatory bowel diseases.

## **CONCLUSION**

By demonstrating that EGC have the ability to inhibit the proliferation of activated T cells, our present data suggest effective crosstalk between EGC and immune cells that can vary in pathophysiological conditions.

## **Acknowledgments**

L. Kermarrec was supported by a fellowship from the Région of Pays de la Loire. The work was supported by the Région of Pays de la Loire.

### **Bibliographic references**

Baumgart, D.C., and Sandborn, W.J. (2012). Crohn's disease. *Lancet Lond. Engl.* *380*, 1590–1605.

Bonnamain, V., Mathieux, E., Thinard, R., Thébault, P., Nerrière-Daguin, V., Lévêque, X., Anegon, I., Vanhove, B., Neveu, I., and Naveilhan, P. (2012). Expression of heme oxygenase-1 in neural stem/progenitor cells as a potential mechanism to evade host immune response. *Stem Cells Dayt. Ohio* *30*, 2342–2353.

Einstein, O., Karussis, D., Grigoriadis, N., Mizrachi-Kol, R., Reinhartz, E., Abramsky, O., and Ben-Hur, T. (2003). Intraventricular transplantation of neural precursor cell spheres attenuates acute experimental allergic encephalomyelitis. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 1074–1082.

Gimsa, U., ØRen, A., Pandiyan, P., Teichmann, D., Bechmann, I., Nitsch, R., and Brunner-Weinzierl, M.C. (2004). Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T helper cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152). *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *82*, 364–372.

Gulbransen, B.D., and Sharkey, K.A. (2012). Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *9*, 625–632.

Izcue, A., Coombes, J.L., and Powrie, F. (2009). Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 313–338.

Lyons, A.B., and Parish, C.R. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* *171*, 131–137.

Meinl, E., Aloisi, F., Ertl, B., Weber, F., de Waal Malefyt, R., Wekerle, H., and Hohlfeld, R. (1994). Multiple sclerosis. Immunomodulatory effects of human astrocytes on T cells. *Brain J. Neurol.* *117 (Pt 6)*, 1323–1332.

Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahé, M.M., Derkinderen, P., des Varannes, S.B., and Rolli-Derkinderen, M. (2013). The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 90–100.

Pochard, C., Coquenlorge, S., Jaulin, J., Cenac, N., Vergnolle, N., Meurette, G., Freyssinet, M., Neunlist, M., and Rolli-Derkinderen, M. (2015). Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells from Patients With Crohn's disease. *Gastroenterology*.

Soret, R., Coquenlorge, S., Cossais, F., Meurette, G., Rolli-Derkinderen, M., and Neunlist, M. (2013). Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells. *Neurogastroenterol. Motil.* *25*, e755–e764.



**Figure 1.** Impact of hEGC on T cell proliferation. EGC prepared from the myenteric plexus of one control (ctrl) or one Crohn's patient were plated in sextuplicate (six replicate wells per cell density) and cultured for three days with  $10^5$  CFSE-labeled PBMC stimulated (Stim T) or not (T) with PHA. CFSE profiles were analyzed by flow cytometry as shown in (A). The percentage of proliferating living (Aqua<sup>-</sup>) T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>) was determined for each well and the mean was calculated for each cell density. The absence of allogeneic reaction was controlled by coculturing EGC with unstimulated T (B, C). Analyses were performed with various ratio of control (D) and Crohn (E) EGC. Data are expressed as mean values  $\pm$  SEM using the non-parametric Kruskal-Wallis followed by Dunns post-hoc tests; \*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .001$ ; \*\*\*,  $p < .0001$ .

**Figure 2.** Impact of control and Crohn EGC on the proliferation of stimulated CD3<sup>+</sup> (A, B), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (C, D) and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (E, F) T cells. The proliferation test was performed with EGC from three control patients ( $n = 3$ ) and three patients with Crohn's disease ( $n = 3$ ). Data are expressed as mean values  $\pm$  SEM using the non-parametric Kruskal-Wallis followed by Dunns post-hoc tests; \*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .001$ ; \*\*\*,  $p < .0001$ .

**Figure 3.** Impact of EGC-conditioned media on T cell proliferation.  $10^5$  CFSE-labeled PBMC stimulated (Stim T) or not (T) with PHA were incubated with conditioned media (vol/vol : 50/50) from cultures of control or Crohn EGC. Data are expressed as mean values  $\pm$  SEM using the non-parametric Kruskal-Wallis followed by Dunns post-hoc tests; \*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .001$ ; \*\*\*,  $p < .0001$ .

Figure 1

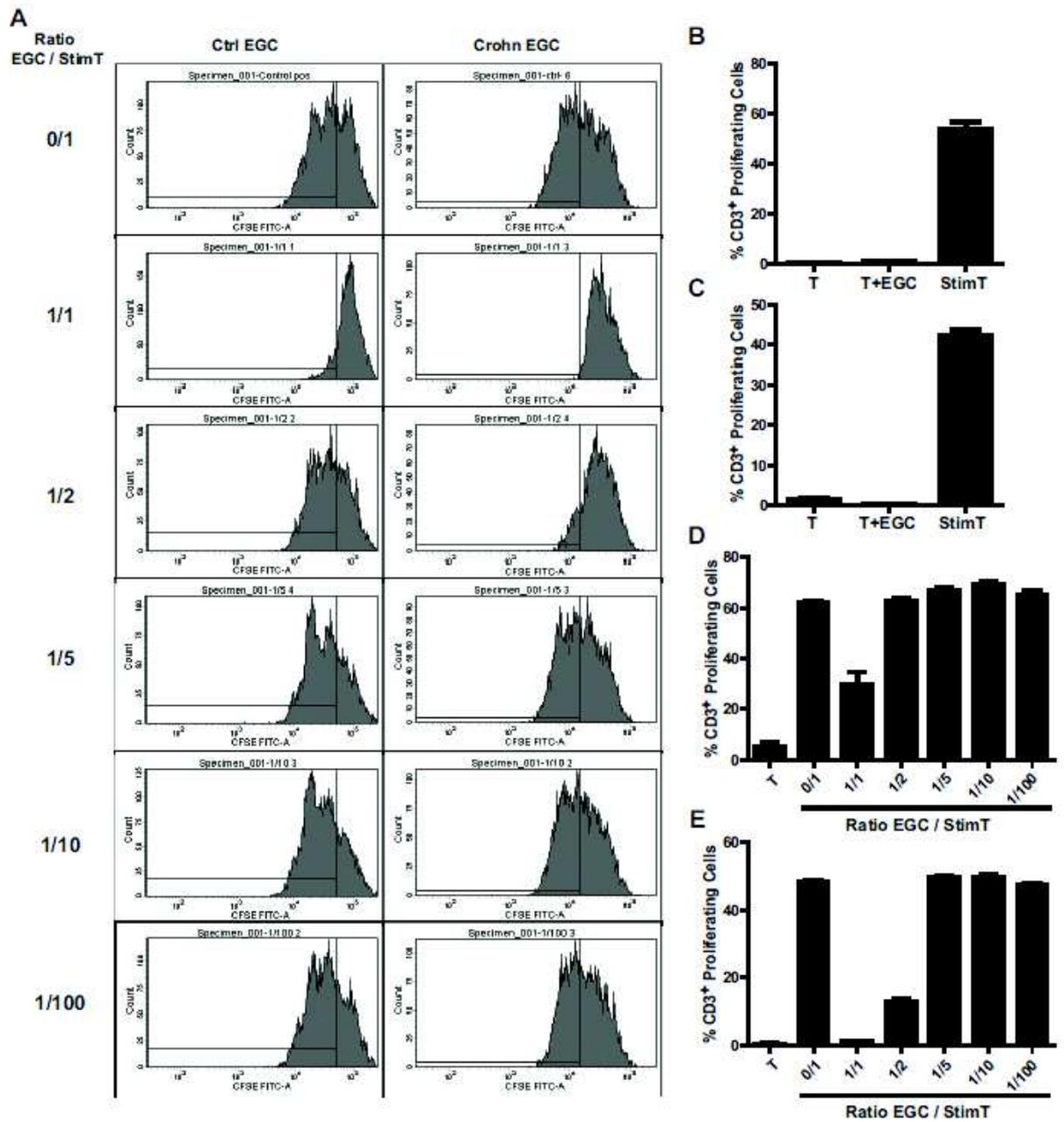


Figure 2

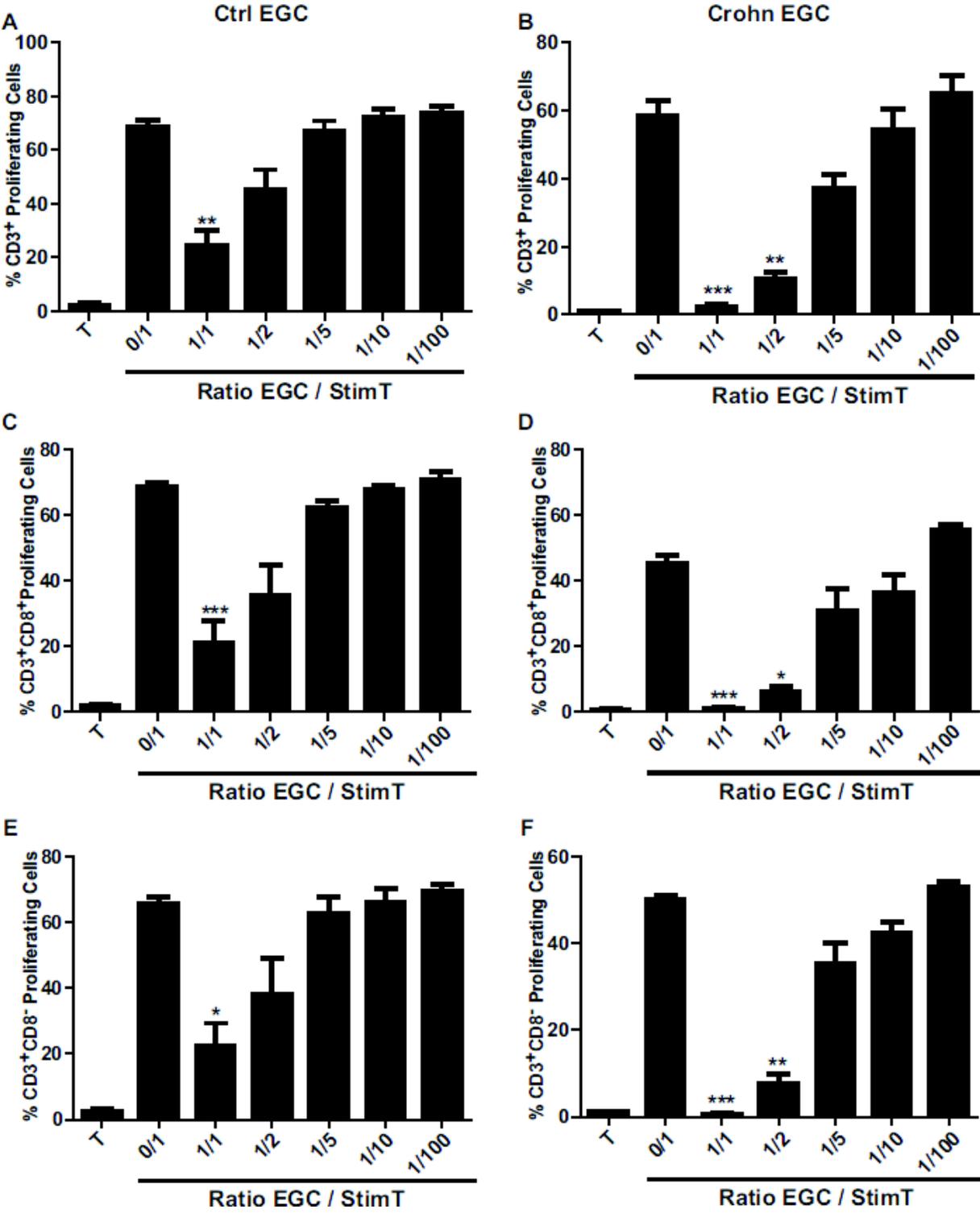
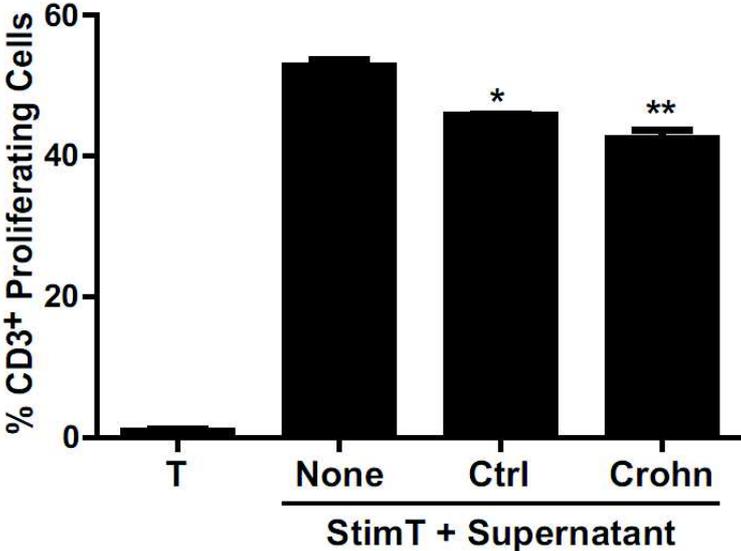


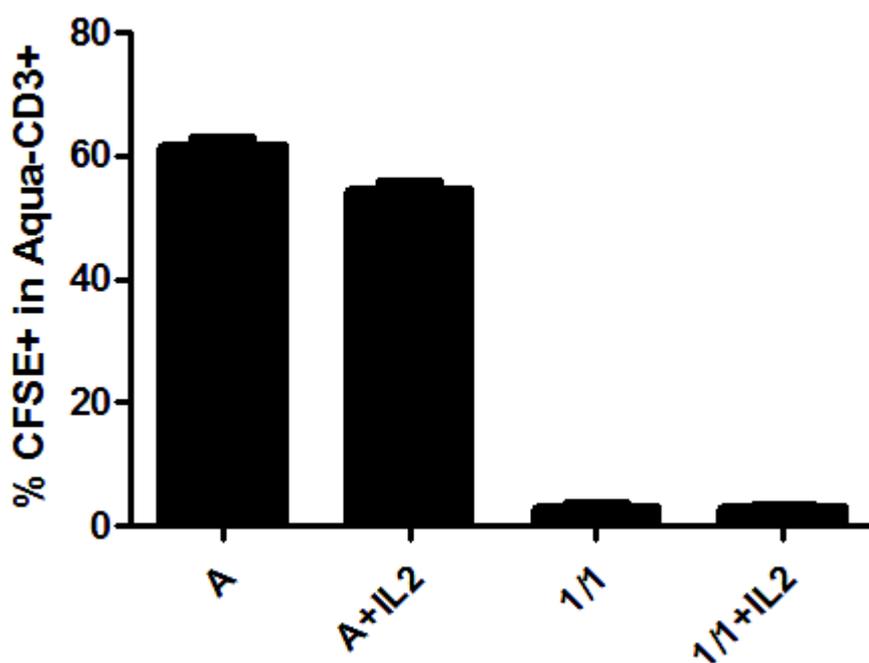
Figure 3



## Discussion article 3

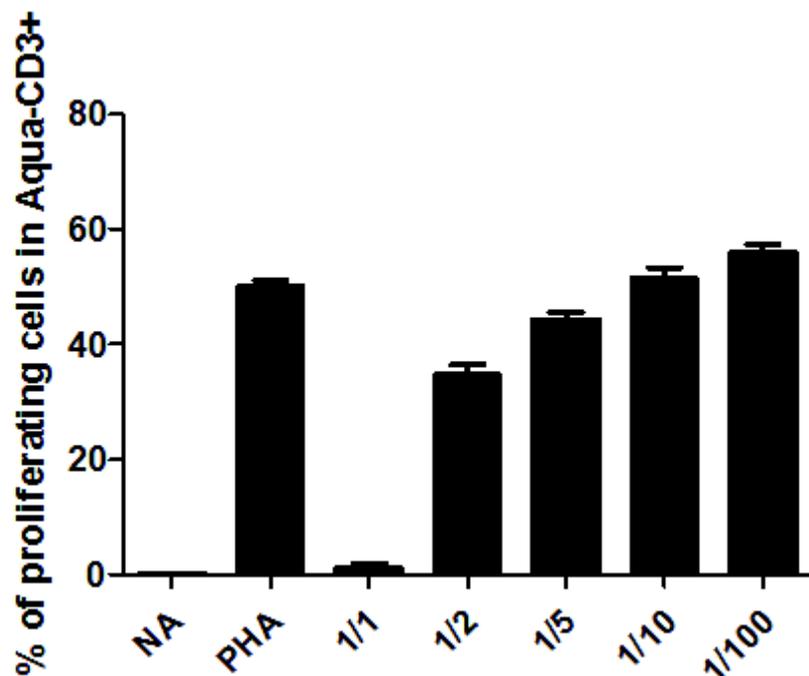
Dans cette étude, nous avons montré que les CGE humaines étaient capables de réguler la prolifération des lymphocytes T. Les effets mis en évidence vont dans le sens d'une immunosuppression avec une baisse de la prolifération des lymphocytes T activés en présence des CGE. Cette observation corrobore des études montrant une inflammation intestinale importante et une infiltration par des lymphocytes T chez le rongeur après ablation sélective des CGE (Bush *et al.* 1998; Cornet *et al.* 2001; Aube *et al.* 2006). Un effet immunomodulateur des astrocytes humains avait été mis en évidence par Meinel *et al.*, sur les cellules T CD4+ (Meinel *et al.*, 1994). Ici, nous montrons que l'effet immunosuppresseur des CGE s'exerce aussi bien sur les cellules CD4+ que sur les cellules CD8+.

Pour caractériser le mécanisme d'action des CGE sur les lymphocytes, nous avons recherché si l'ajout d'interleukine-2 dans le milieu des CGE en co-culture avec les lymphocytes T en 1/1 entraînait une levée d'inhibition de la prolifération de ces derniers ou non. Nous n'avons pas observé de retour à un niveau de prolifération contrôle. On peut donc penser que le mécanisme impliqué dans l'immunosuppression exercée par les CGE sur les lymphocytes T ne passe pas par un phénomène d'anergie. Cependant il faudrait reconduire l'expérience pour confirmer ce résultat (n=1).



Par ailleurs, les résultats d'inhibition de la prolifération sont ici portés sur les cellules négatives pour le marqueur aqua, c'est-à-dire sur les cellules vivantes. Le phénomène immunosuppresseur observé pourrait donc passer par une augmentation de la mort cellulaire des lymphocytes T provoquée par les CGE. Nous avons donc vérifié le pourcentage de cellules aqua<sup>+</sup> dans la population T en absence de CGE versus en présence de CGE et nous n'avons pas vu de différence. La viabilité cellulaire n'est donc pas en cause dans l'effet immunosuppresseur exercé par les CGE.

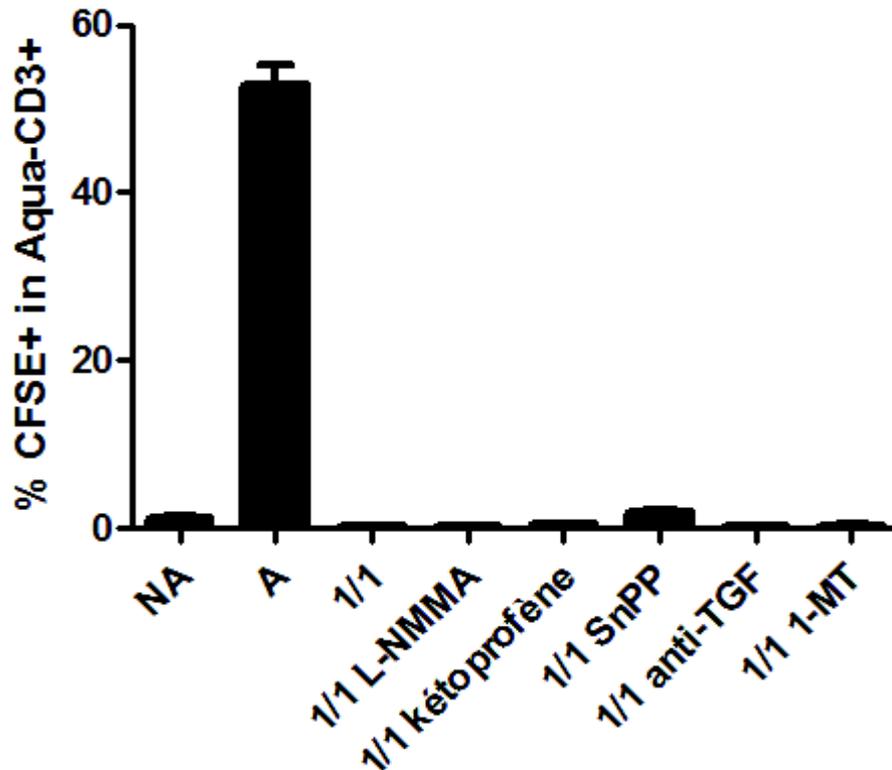
Nous avons ensuite comparé l'effet d'un milieu conditionné par les CGE à l'effet des CGE en co-culture. L'effet immunosuppresseur observé s'est avéré très faible après traitement des lymphocytes activés par le milieu conditionné, suggérant qu'un contact entre les CGE et les lymphocytes T est probablement nécessaire. L'implication d'un facteur soluble labile ou induit par la présence de lymphocytes T ne peut toutefois pas être exclu. De nouvelles expériences, notamment des études de co-culture sur filtre Transwell, permettront de confirmer ce point. L'étude comparative entre les CGE contrôle et les CGE Crohn ont révélé un effet immunosuppresseur plus puissant des CGE issues de patients atteints de MICI. Ce résultat nécessite une confirmation avec un nombre plus important de patients mais il a été retrouvé chez le seul patient RCH dont nous avons pu récupérer les cellules en grand nombre (Fig. I).



*Figure 1: Effet de CGE RCH sur la prolifération de cellules T activées. Les lymphocytes T marqués par du CFSE et activés avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 ont été mis en présence de CGE issues d'un patient atteint de RCH. Les co-cultures ont été réalisées à différents ratios (nb de CGE /nb de PBMC). Après trois jours de culture, le pourcentage de lymphocytes Aqua+CD3+ qui se sont divisés a été étudié par cytométrie de flux.*

Le graphique indique une diminution très importante du pourcentage de lymphocytes T (CD3+) qui se sont divisés en présence d'une CGE RCH pour un lymphocyte. Cet effet, déjà nettement moindre pour un ratio d'une CGE pour deux lymphocytes, est négligeable pour des ratios plus importants. Les cellules de ce patient RCH ont été utilisées pour caractériser le mécanisme d'action des CGE à l'aide d'inhibiteurs spécifiques de voies de signalisation connues pour leur implication dans l'inhibition de la prolifération cellulaire :

- **Le NG-monomethyl L-arginine (L-NMMA)**, est un inhibiteur non sélectif des isoformes de l'oxyde nitrique synthétase (NOS). Cette enzyme génère la molécule NO qui a des effets immunosuppresseurs sur les macrophages (Albina et al., 1991; Bingisser et al., 1998) ;
- **Le Kétoprofène** inhibe la biosynthèse de Prostaglandine E2 (PGE2) et F2a (PGF2a), deux agents de signalisation qui sont impliqués dans diverses activités immunosuppresseurs (Wang et al., 2009) ;
- **Le Sn-protoporphyrin (SnPP)** est un inhibiteur compétitif de la hème oxygénase (HO). Cette enzyme produit du monoxyde de carbone (CO) responsable des effets immunosuppresseurs sur des cellules comme les cellules souches neurales (Bonnamain et al., 2012) ;
- **L'anti-TGFβ** inhibe la voie du TGFβ, une cytokine multifonctionnelle qui a des effets immunosuppresseurs sur les cellules T (Kehrl et al., 1986) ;
- **Le 1-Methyl-DL-tryptophan (1-MT)** inhibe l'activité de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). Cette enzyme est connue pour avoir des effets immunosuppresseurs par déplétion du tryptophane couplée à la production de métabolites kynuréniniques. Cette voie d'inhibition est notamment utilisée par les cellules souches mésenchymateuses (MSC) (Jones et al., 2007; Meisel et al., 2004).



*Figure J : Recherche des voies de signalisation impliquées dans l'effet immunosuppresseur des CGE sur les lymphocytes T activés. Les LT activés ont été incubés en présence d'inhibiteurs spécifiques des voies de signalisation (L-NMMA, kétoprofène, SnPP, anti-TGF et 1-MT) et de CGE issues d'un patient RCH (ratio 1/1). Après trois jours de culture, le pourcentage de lymphocytes Aqua+CD3+ qui se sont divisés a été étudié par cytométrie de flux.*

Nos résultats sont présentés sur la figure J. En présence des inhibiteurs, les CGE à un ratio 1/1 exercent toujours un effet anti-prolifératif important sur les lymphocytes T activés. Quelque soit la voie bloquée, aucune levée de l'inhibition même partielle n'a été observée, indiquant que les voies testées ne sont probablement pas impliquées dans l'effet immunosuppresseur des CGE humaines. Ces résultats restent toutefois à confirmer car nous avons effectué ces tests avec des CGE issues d'un seul et même patient.

Nous avons mené les mêmes expériences chez le rat. Comme pour l'homme, les CGE ont été récupérées à partir du plexus myentérique du colon de l'animal adulte. Les lymphocytes ont, quant à eux, été récupérés à partir de la rate après déplétion des globules rouges, des cellules NK, des cellules B et des monocytes. Contrairement à ce que nous avons observé chez l'Homme, aucun effet anti-prolifératif n'a pu être mis en évidence avec les CGE

de rat, même dans des conditions mimant une inflammation (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ). Cet effet immunosuppresseur des CGE ne serait peut-être pas commun à toutes les espèces. Des études sur les molécules produites par les CGE humaines et de rat seraient intéressantes afin de caractériser des expressions différentielles par exemple à travers l'utilisation de la technique de RNAseq.

Ce travail montre que les CGE humaines ont des propriétés qui leur permettent d'inhiber la prolifération de lymphocytes T. Les conditions où cet effet immunosuppresseur s'exerce chez l'Homme demandent à être définies mais les CGE pourraient intervenir en cas d'inflammation de la paroi intestinale pour limiter la prolifération des lymphocytes T activés et ainsi, protéger localement des cellules sensibles comme par exemple, les neurones. Le ratio d'une CGE pour un lymphocyte et la nécessité d'un contact entre ces cellules, seraient des moyens pour limiter le champ d'activité immunosuppressive des CGE au niveau local. Cette hypothèse permettrait aussi de comprendre pourquoi les CGE issues de patients atteints de MICI ont un effet immunosuppresseur plus puissant que les CGE contrôles. Comme les CGE issues de patients MICI baignent en permanence dans un environnement inflammatoire, elles ont potentiellement développé un processus adaptatif qui leur permettrait d'atténuer la réponse immune, notamment en inhibant la prolifération des lymphocytes T. Ces hypothèses de travail restent à démontrer.

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## Discussion générale

Différentes observations suggèrent que la voie IL-7/IL-7R est impliquée dans des pathologies de type MICI. Nos résultats sur les biopsies coliques de patients atteints de MICI vont globalement dans le sens d'une augmentation de l'expression de tous les transcrits de l'IL-7 et de la sous-unité IL-7R $\alpha$  en zone inflammatoire. À l'inverse, dans le sérum humain, on observe une plus faible quantité d'IL-7 en phase de rémission pour la MC et en phase active ou de rémission pour la RCH. Il faudrait compléter l'étude avec une analyse protéique mais on peut déjà suggérer que ces différences puissent être dues à une utilisation de l'IL-7 par les tissus ou à des régulations compartimentées.

Concernant l'exploitation des résultats, il faut prendre en compte le type de MICI (MC ou RCH), l'hétérogénéité des compartiments étudiés, l'état de la zone intestinale étudiée (inflammatoire ou saine). La constitution d'un groupe homogène de patients est particulièrement complexe car il faut en plus, prendre en considération des critères comme l'âge, le sexe, le traitement, etc. À ce sujet, il serait intéressant de comparer les niveaux d'IL-7 et de son récepteur chez des patients venant de déclencher la maladie et des patients dont la maladie est déjà installée depuis un certain temps. Ce type d'analyse permettrait de déterminer si les variations sont un facteur précoce de déclenchement de la maladie ou bien si les dérégulations apparaissent dans le temps. Il serait également intéressant d'étudier l'expression de la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) dans les biopsies des patients affectés par les MICI. En effet, la TSLP connue pour son rôle dans l'inflammation d'origine allergique et l'autoimmunité (Ziegler et al., 2013) est susceptible d'interférer ou de remplacer l'IL-7, car ces deux cytokines partagent un récepteur commun, la sous-unité IL-7R $\alpha$ . Comme dans le cas de l'IL-7, la partie C-terminale de la TSLP est importante pour sa fonction (Sonesson et al., 2011) et les différents variants de transcription sont à l'origine de deux isoformes qui, elles-aussi, présentent une expression et des propriétés biologiques différentes (Harada et al., 2009). Une série d'études montre des variations de l'expression de la TSLP dans la MC et la RCH (Noble C, 2008 et 2010). Il serait intéressant de compléter ces résultats par l'analyse de ses deux isoformes, notamment pour caractériser leur implication respective dans les MICI. En effet, la TSLP présente dans certains cas, des effets tolérogènes et protecteurs dans l'intestin (He et al., 2007) qui peuvent contraster avec les effets observés en cas d'autoimmunité, d'allergie ou de cancer (Ziegler et al., 2013). Une meilleure

compréhension des différentes sources (cellules dendritiques, cellules épithéliales, cellules gliales ...), cibles (lymphocytes T, cellules dendritiques, mastocytes...), fonctions (réaction immune, inflammation, homéostasie des tissus, etc.), et voies de signalisation cellulaire des isoformes de la TSLP et de l'IL-7 aiderait certainement à comprendre les interactions et les mécanismes mis en jeu lors de MICI (Kashyap et al., 2011; Soumelis et al., 2002).

Notre étude chez le rat nous permet justement d'aller plus loin dans notre réflexion, notamment par la mise en évidence de l'expression spécifique des différents transcrits et isoformes de l'IL-7 dans les cellules et tissus de la paroi intestinale. Les variants d'épissage de l'IL-7 et les isoformes qui en dérivent sont bien décrits chez l'Homme (Korte et al., 1999) mais encore très peu d'études se sont intéressées à leurs activités biologiques. Pourtant, les premières analyses réalisées ont fournis des résultats intéressants puisqu'ils montrent une activité différentielle des isoformes en fonction des cellules cibles. Ainsi, seules, les isoformes IL-7 full et IL-7 $\delta$ 5 montrent une activité sur des cellules immunitaires comme les PBMC ou les thymocytes (Vudattu et al., 2009) alors que trois isoformes (IL-7 full, IL-7 $\delta$ 5, IL-7 $\delta$ 4/5) stimulent la différenciation des cellules progénitrices neurales humaines (PNH) (Moors et al., 2010). Ces observations soulignent l'intérêt d'étudier l'activité biologique des isoformes sur des cellules autres que celles du système immunitaire comme par exemple les cellules du SNC, surtout quand on sait que l'IL-7 exerce une action neurotrophique sur les neurones du SNC (Araujo and Cotman, 1993; Michaelson et al., 1996).

Lors d'une analyse préliminaire sur des lymphocytes T chez le rat, nous avons montré que seule, l'IL-7 canonique (full ou commercial) stimulait la prolifération cellulaire et activait la phosphorylation de Stat-5. L'absence d'effet des autres isoformes sur les lymphocytes T de rat rappelle le fait que les cellules immunes humaines répondent, elles-aussi, de façon très sélective aux isoformes de l'IL-7 (IL-7 full, IL-7 $\delta$ 5). Il serait donc utile de déterminer si les isoformes sont actives, si elles utilisent IL-7R $\alpha$  comme récepteur et si les voies de signalisation sont les mêmes que pour l'IL-7. À ce propos, il est important de souligner que les modifications sont en C-terminal chez le rat alors qu'elles sont en milieu de séquence protéique chez l'Homme. Ces modifications pourraient empêcher la liaison des isoformes de rat à la sous-unité  $\gamma$ c du récepteur à l'IL-7. Les mécanismes selon lesquels une forme serait plus ou moins active sont donc probablement différents chez l'Homme et le rat. Il ne faut pas non plus exclure la possibilité que certains isoformes aient des effets antagonistes et que ces effets antagonistes aient un rôle dans la régulation de l'activité de l'IL-7.

Chez le rat, nous avons observé une augmentation du niveau d'expression de l'IL-7 (toutes les isoformes) dans l'intestin au cours du développement. Cette augmentation est probablement due à l'implication de l'IL-7 dans le développement du système nerveux (Araujo and Cotman, 1993; Michaelson et al., 1996) et du système immunitaire intestinal avec notamment un rôle dans la mise en place du GALT (Okada et al., 2005).

Dans ce travail de thèse, nous avons montré que les CGE inhibaient la prolifération des lymphocytes T. La production d'IL-7 par les CGE ouvrait la possibilité d'un rôle de cette interleukine dans l'effet immunosuppresseur observé mais différents arguments contestent cette possibilité. Tout d'abord, l'IL-7 est plutôt connue pour avoir des effets pro-prolifératifs. Une action de l'IL-7 via la stimulation des lymphocytes T régulateurs immunosuppresseurs aurait pu être envisagée mais ces lymphocytes n'expriment le récepteur à l'IL-7 qu'après plusieurs jours de stimulation (Di Caro et al., 2011; Simonetta et al., 2012), c'est-à-dire après le début de notre étude. Un autre argument repose sur le fait que les facteurs solubles ne participent que faiblement à l'effet immunosuppresseur des CGE sur les lymphocytes. Le rôle et le mode d'action des CGE sur les cellules du système immunitaire intestinal ou du SNE restent donc à caractériser. Il serait notamment très intéressant d'étudier l'expression différentielle des molécules produites par les CGE de patients contrôles ou atteints de MICI.

Ce travail sur les CGE et l'IL-7 nous a permis d'aborder quelques aspects des interactions entre les cellules du SNE et du système immunitaire intestinal mais l'étude des interactions entre ces deux systèmes majeurs a très certainement encore beaucoup de choses à nous apprendre quant au maintien de l'homéostasie intestinale et aux dysfonctionnements à la base des MICI.

## **BIBLIOGRAPHIE**

## Bibliographie

Abbas et Lichtman (2008). *Basic Immunology* (Elsevier).

Abdo, H., Derkinderen, P., Gomes, P., Chevalier, J., Aubert, P., Masson, D., Galmiche, J.-P., Vanden Berghe, P., Neunlist, M., and Lardeux, B. (2010). Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *24*, 1082–1094.

Abdo, H., Mahé, M.M., Derkinderen, P., Bach-Ngohou, K., Neunlist, M., and Lardeux, B. (2012). The omega-6 fatty acid derivative 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress. *J. Physiol.* *590*, 2739–2750.

Abe, K. (2000). Therapeutic Potential of Neurotrophic Factors and Neural Stem Cells Against Ischemic Brain Injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *20*, 1393–1408.

Adachi, S., Yoshida, H., Honda, K., Maki, K., Saijo, K., Ikuta, K., Saito, T., and Nishikawa, S.I. (1998). Essential role of IL-7 receptor alpha in the formation of Peyer's patch anlage. *Int. Immunol.* *10*, 1–6.

Albina, J.E., Abate, J.A., and Henry, W.L. (1991). Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *147*, 144–148.

Alderson, M.R., Sassenfeld, H.M., and Widmer, M.B. (1990). Interleukin 7 enhances cytolytic T lymphocyte generation and induces lymphokine-activated killer cells from human peripheral blood. *J. Exp. Med.* *172*, 577–587.

Alderson, M.R., Tough, T.W., Ziegler, S.F., and Grabstein, K.H. (1991). Interleukin 7 induces cytokine secretion and tumoricidal activity by human peripheral blood monocytes. *J. Exp. Med.* *173*, 923–930.

Ananthkrishnan, A.N. (2013). Antibiotic exposure is associated with development of inflammatory bowel disease. *J. Pediatr.* *162*, 1077.

André, C., André, F., and Fargier, C. (1978). Distribution of IgA 1 and IgA 2 plasma cells in various normal human tissues and in the jejunum of plasma IgA-deficient patients. *Clin. Exp. Immunol.* *33*, 327–331.

Andreu-Ballester, J.C., Pérez-Griera, J., Garcia-Ballesteros, C., Amigo, V., Catalán-Serra, I., Monforte-Albalat, A., Bixquert-Jiménez, M., and Ballester, F. (2013a). Deficit of interleukin-7 in serum of patients with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *19*, E30–E31.

Andreu-Ballester, J.C., Garcia-Ballesteros, C., Amigo, V., Ballester, F., Gil-Borrás, R., Catalán-Serra, I., Magnet, A., Fenoy, S., del Aguila, C., Ferrando-Marco, J., et al. (2013b). Microsporidia and its relation to Crohn's disease. A retrospective study. *PloS One* *8*, e62107.

- Anitha, M., Gondha, C., Sutliff, R., Parsadanian, A., Mwangi, S., Sitaraman, S.V., and Srinivasan, S. (2006). GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. *J. Clin. Invest.* *116*, 344–356.
- Arai, K.I., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N., and Yokota, T. (1990). Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu. Rev. Biochem.* *59*, 783–836.
- Araujo, D.M., and Cotman, C.W. (1993). Trophic effects of interleukin-4, -7 and -8 on hippocampal neuronal cultures: potential involvement of glial-derived factors. *Brain Res.* *600*, 49–55.
- Aubé, A.-C., Cabarrocas, J., Bauer, J., Philippe, D., Aubert, P., Doulay, F., Liblau, R., Galmiche, J.P., and Neunlist, M. (2006a). Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* *55*, 630–637.
- Aubé, A.-C., Cabarrocas, J., Bauer, J., Philippe, D., Aubert, P., Doulay, F., Liblau, R., Galmiche, J.P., and Neunlist, M. (2006b). Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* *55*, 630–637.
- Bach-Ngohou, K., Mahé, M.M., Aubert, P., Abdo, H., Boni, S., Bourreille, A., Denis, M.G., Lardeux, B., Neunlist, M., and Masson, D. (2010). Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J. Physiol.* *588*, 2533–2544.
- Bagchi, S., and Das, K.M. (1984). Detection and partial characterization of Crohn's disease tissue specific proteins recognized by Crohn's disease sera. *Clin. Exp. Immunol.* *55*, 41–48.
- Bagchi, S., Baral, B., and Das, K.M. (1986). Isolation and characterization of Crohn's disease tissue-specific glycoproteins. *Gastroenterology* *91*, 326–332.
- Balk, S.P., Ebert, E.C., Blumenthal, R.L., McDermott, F.V., Wucherpfennig, K.W., Landau, S.B., and Blumberg, R.S. (1991). Oligoclonal expansion and CD1 recognition by human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Science* *253*, 1411–1415.
- Balkwill, F.R., and Burke, F. (1989). The cytokine network. *Immunol. Today* *10*, 299–304.
- Bandeira, A., Itohara, S., Bonneville, M., Burlen-Defranoux, O., Mota-Santos, T., Coutinho, A., and Tonegawa, S. (1991). Extrathymic origin of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing T-cell antigen receptor gamma delta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 43–47.
- Barlow, D.J., Edwards, M.S., and Thornton, J.M. (1986). Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature* *322*, 747–748.
- Barrett K.E (1992). Immunopharmacology of Mast Cells and Basophils.
- Bassotti, G., Villanacci, V., Antonelli, E., Morelli, A., and Salerni, B. (2007). Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *87*, 628–632.
- Baumgart, D.C., and Sandborn, W.J. (2012). Crohn's disease. *The Lancet* *380*, 1590–1605.

- Bayliss, W.M., and Starling, E.H (1900). The movements and the innervation of the large intestine. *J Physiol*.
- Befus, A.D. (1988). Isolation and characterization of human intestinal mast cells. *Immunol Allergy Clin North Am*.
- Befus, A.D., Dyck, N., Goodacre, R., and Bienenstock, J. (1987). Mast cells from the human intestinal lamina propria. Isolation, histochemical subtypes, and functional characterization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950 138*, 2604–2610.
- Berg, M., Murakawa, Y., Camerini, D., and James, S.P. (1991). Lamina propria lymphocytes are derived from circulating cells that lack the Leu-8 lymph node homing receptor. *Gastroenterology 101*, 90–99.
- Bernstein, C.N. (2010). New insights into IBD epidemiology: Are there any lessons for treatment? *Dig. Dis. Basel Switz. 28*, 406–410.
- Berthoud, H.R., and Neuhuber, W.L. (2000). Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton. Neurosci. Basic Clin. 85*, 1–17.
- Bertrand, P.P., Kunze, W.A., Bornstein, J.C., Furness, J.B., and Smith, M.L. (1997a). Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am. J. Physiol. 273*, G422–G435.
- Bertrand, P.P., Kunze, W.A., Bornstein, J.C., Furness, J.B., and Smith, M.L. (1997b). Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am. J. Physiol. 273*, G422–G435.
- Beutler, B., and Cerami, A. (1989). The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol. 7*, 625–655.
- Bingisser, R.M., Tilbrook, P.A., Holt, P.G., and Kees, U.R. (1998). Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950 160*, 5729–5734.
- Bjerke, K., Brandtzaeg, P., and Fausa, O. (1988). T cell distribution is different in follicle-associated epithelium of human Peyer's patches and villous epithelium. *Clin. Exp. Immunol. 74*, 270–275.
- Blaugrund, E., Pham, T.D., Tennyson, V.M., Lo, L., Sommer, L., Anderson, D.J., and Gershon, M.D. (1996). Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence. *Dev. Camb. Engl. 122*, 309–320.
- Bleicher, P.A., Balk, S.P., Hagen, S.J., Blumberg, R.S., Flotte, T.J., and Terhorst, C. (1990). Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium. *Science 250*, 679–682.
- Blumberg, R.S., Terhorst, C., Bleicher, P., McDermott, F.V., Allan, C.H., Landau, S.B., Trier, J.S., and Balk, S.P. (1991). Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950 147*, 2518–2524.

- Boesmans, W., Cirillo, C., Van den Abbeel, V., Van den Haute, C., Depoortere, I., Tack, J., and Vanden Berghe, P. (2013a). Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *25*, e151–e160.
- Boesmans, W., Cirillo, C., Van den Abbeel, V., Van den Haute, C., Depoortere, I., Tack, J., and Vanden Berghe, P. (2013b). Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *25*, e151–e160.
- Boesmans, W., Lasrado, R., Vanden Berghe, P., and Pachnis, V. (2015). Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia* *63*, 229–241.
- Bohórquez, D.V., Samsa, L.A., Roholt, A., Medicetty, S., Chandra, R., and Liddle, R.A. (2014). An Enteroendocrine Cell – Enteric Glia Connection Revealed by 3D Electron Microscopy. *PLoS ONE* *9*.
- Bonnemain, V., Mathieux, E., Thinard, R., Thébault, P., Nerrière-Daguin, V., Lévêque, X., Anegon, I., Vanhove, B., Neveu, I., and Naveilhan, P. (2012). Expression of heme oxygenase-1 in neural stem/progenitor cells as a potential mechanism to evade host immune response. *Stem Cells Dayt. Ohio* *30*, 2342–2353.
- von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schäfer, K.-H., Adler, G., and Kirsch, J. (2004). Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* *53*, 222–228.
- von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schäfer, K.-H., Adler, G., and Kirsch, J. (2006a). Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines. *J. Neuroendocrinol.* *18*, 820–825.
- von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Geerling, I., Reinshagen, M., Schäfer, K.H., Adler, G., and Kirsch, J. (2006b). Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *12*, 346–354.
- von Boyen, G.B.T., Degenkolb, N., Hartmann, C., Adler, G., and Steinkamp, M. (2010). The endothelin axis influences enteric glia cell functions. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *16*, BR161–BR167.
- von Boyen, G.B.T., Schulte, N., Pflüger, C., Spaniol, U., Hartmann, C., and Steinkamp, M. (2011). Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol.* *11*, 3.
- Bradley, J.S., Parr, E.J., and Sharkey, K.A. (1997). Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res.* *289*, 455–461.
- Brandtzaeg, P. (1985). Role of J chain and secretory component in receptor-mediated glandular and hepatic transport of immunoglobulins in man. *Scand. J. Immunol.* *22*, 111–146.

- Brandtzaeg, P., Bosnes, V., Halstensen, T.S., Scott, H., Sollid, L.M., and Valnes, K.N. (1989). T lymphocytes in human gut epithelium preferentially express the alpha/beta antigen receptor and are often CD45/UCHL1-positive. *Scand. J. Immunol.* *30*, 123–128.
- Brehmer, A., Schrodll, F., and Neuhuber, W. (1999). Morphological classifications of enteric neurons--100 years after Dogiel. *Anat. Embryol. (Berl.)* *200*, 125–135.
- Brenner, M.B., McLean, J., Scheft, H., Riberdy, J., Ang, S.L., Seidman, J.G., Devlin, P., and Krangel, M.S. (1987). Two forms of the T-cell receptor gamma protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. *Nature* *325*, 689–694.
- Broadhead, M.J., Bayguinov, P.O., Okamoto, T., Heredia, D.J., and Smith, T.K. (2012). Ca<sup>2+</sup> transients in myenteric glial cells during the colonic migrating motor complex in the isolated murine large intestine. *J. Physiol.* *590*, 335–350.
- Brun, P., Giron, M.C., Qesari, M., Porzionato, A., Caputi, V., Zoppellaro, C., Banzato, S., Grillo, A.R., Spagnol, L., De Caro, R., et al. (2013). Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system. *Gastroenterology* *145*, 1323–1333.
- Bucy, R.P., Chen, C.L., and Cooper, M.D. (1989). Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T gamma delta cells in humans. *J. Immunol.* *142*, 3045–3049.
- Buisson, A., Bommelaer, G., and Peyrin-Biroulet, L. (2012). Rectocolite hémorragique : épidémiologie, physiopathologie, diagnostic, histoire naturelle et stratégie thérapeutique. *EMC - Gastro-Entérologie* *7*, 1–19.
- Bull, D.M., and Ignaczak, T.F. (1973). Enterobacterial common antigen-induced lymphocyte reactivity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *64*, 43–50.
- Burns, A.J., Pasricha, P.J., and Young, H.M. (2004a). Enteric neural crest-derived cells and neural stem cells: biology and therapeutic potential. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *16 Suppl 1*, 3–7.
- Burns, A.J., Pasricha, P.J., and Young, H.M. (2004b). Enteric neural crest-derived cells and neural stem cells: biology and therapeutic potential. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *16 Suppl 1*, 3–7.
- Bush, T.G., Savidge, T.C., Freeman, T.C., Cox, H.J., Campbell, E.A., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* *93*, 189–201.
- Byrne, J.A., Butler, J.L., and Cooper, M.D. (1988). Differential activation requirements for virgin and memory T cells. *J. Immunol.* *141*, 3249–3257.
- Cabarrocas, J., Savidge, T.C., and Liblau, R.S. (2003). Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* *41*, 81–93.
- Calkins, B.M. (1989). A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* *34*, 1841–1854.

- Cao, X., Kozak, C.A., Liu, Y.J., Noguchi, M., O'Connell, E., and Leonard, W.J. (1993). Characterization of cDNAs encoding the murine interleukin 2 receptor (IL-2R) gamma chain: chromosomal mapping and tissue specificity of IL-2R gamma chain expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 8464–8468.
- Carrasquillo, M.M., McCallion, A.S., Puffenberger, E.G., Kashuk, C.S., Nouri, N., and Chakravarti, A. (2002). Genome-wide association study and mouse model identify interaction between RET and EDNRB pathways in Hirschsprung disease. *Nat. Genet.* *32*, 237–244.
- Cerf-Bensussan, N., Schneeberger, E.E., and Bhan, A.K. (1983). Immunohistologic and immunoelectron microscopic characterization of the mucosal lymphocytes of human small intestine by the use of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *130*, 2615–2622.
- Cerf-Bensussan, N., Guy-Grand, D., and Griscelli, C. (1985). Intraepithelial lymphocytes of human gut: isolation, characterisation and study of natural killer activity. *Gut* *26*, 81–88.
- Cerf-Bensussan, N., Jarry, A., Brousse, N., Lisowska-Grospierre, B., Guy-Grand, D., and Griscelli, C. (1987). A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* *17*, 1279–1285.
- Cerf-Bensussan, N., Bègue, B., Gagnon, J., and Meo, T. (1992). The human intraepithelial lymphocyte marker HML-1 is an integrin consisting of a beta 7 subunit associated with a distinctive alpha chain. *Eur. J. Immunol.* *22*, 885.
- Chapman, C.G., and Pekow, J. (2015). The emerging role of miRNAs in inflammatory bowel disease: a review. *Ther. Adv. Gastroenterol.* *8*, 4–22.
- Cheroutre, H. (2004). Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 217–246.
- Cho, J.H., and Brant, S.R. (2011). Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *140*, 1704–1712.
- Cirillo, C., Sarnelli, G., Esposito, G., Grosso, M., Petruzzelli, R., Izzo, P., Cali, G., D'Armiento, F.P., Rocco, A., Nardone, G., et al. (2009). Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *21*, 1209–e112.
- Cirillo, C., Sarnelli, G., Turco, F., Mango, A., Grosso, M., Aprea, G., Masone, S., and Cuomo, R. (2011). Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglia cells and induces autocrine nitric oxide production. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *23*, e372–e382.
- Colombel, J.F., Rambaud, J.C., Vaerman, J.P., Galian, A., Delacroix, D.L., Nemeth, J., Duprey, F., Halphen, M., Godeau, P., and Dive, C. (1988). Massive plasma cell infiltration of the digestive tract. Secretory component as the rate-limiting factor of immunoglobulin secretion in external fluids. *Gastroenterology* *95*, 1106–1113.
- Cominelli, F., Nast, C.C., Dinarello, C.A., Gentilini, P., and Zipser, R.D. (1989). Regulation of eicosanoid production in rabbit colon by interleukin-1. *Gastroenterology* *97*, 1400–1405.

- Cominelli, F., Nast, C.C., Llerena, R., Dinarello, C.A., and Zipser, R.D. (1990a). Interleukin 1 suppresses inflammation in rabbit colitis. Mediation by endogenous prostaglandins. *J. Clin. Invest.* *85*, 582–586.
- Cominelli, F., Nast, C.C., Clark, B.D., Schindler, R., Llerena, R., Eysselein, V.E., Thompson, R.C., and Dinarello, C.A. (1990b). Interleukin 1 (IL-1) gene expression, synthesis, and effect of specific IL-1 receptor blockade in rabbit immune complex colitis. *J. Clin. Invest.* *86*, 972–980.
- Cominelli, F., Nast, C.C., Duchini, A., and Lee, M. (1992). Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. *Gastroenterology* *103*, 65–71.
- Conlon, P.J., Morrissey, P.J., Nordan, R.P., Grabstein, K.H., Prickett, K.S., Reed, S.G., Goodwin, R., Cosman, D., and Namen, A.E. (1989). Murine thymocytes proliferate in direct response to interleukin-7. *Blood* *74*, 1368–1373.
- Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D.J.P., Campbell, B.J., Jewell, D., and Simmons, A. (2010). NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med.* *16*, 90–97.
- Cornet, A., Bettelli, E., Oukka, M., Cambouris, C., Avellana-Adalid, V., Kosmatopoulos, K., and Liblau, R.S. (2000). Role of astrocytes in antigen presentation and naive T-cell activation. *J. Neuroimmunol.* *106*, 69–77.
- Cornet, A., Savidge, T.C., Cabarrocas, J., Deng, W.L., Colombel, J.F., Lassmann, H., Desreumaux, P., and Liblau, R.S. (2001). Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 13306–13311.
- Cornish, J.A., Tan, E., Simillis, C., Clark, S.K., Teare, J., and Tekkis, P.P. (2008). The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* *103*, 2394–2400.
- Cosnes, J. (2004). Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *18*, 481–496.
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., and Cortot, A. (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* *140*, 1785–1794.
- Cox, H.M. (2007). Peptide YY: a neuroendocrine neighbor of note. *Peptides* *28*, 345–351.
- Craig, S.W., and Cebra, J.J. (1971). Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J. Exp. Med.* *134*, 188–200.
- Craig, S.S., Schechter, N.M., and Schwartz, L.B. (1988). Ultrastructural analysis of human T and TC mast cells identified by immunoelectron microscopy. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *58*, 682–691.
- Crawley, A.M., Faucher, S., and Angel, J.B. (2010). Soluble IL-7R alpha (sCD127) inhibits IL-7 activity and is increased in HIV infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 4679–4687.

- Czerkinsky, C., Prince, S.J., Michalek, S.M., Jackson, S., Russell, M.W., Moldoveanu, Z., McGhee, J.R., and Mestecky, J. (1987). IgA antibody-producing cells in peripheral blood after antigen ingestion: evidence for a common mucosal immune system in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 2449–2453.
- Dai, S.-X., Wu, G., Zou, Y., Feng, Y.-L., Liu, H.-B., Feng, J.-S., Chi, H.-G., Lv, R.-X., and Zheng, X.-B. (2013). Balance of CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T lymphocytes is vital for patients with ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* *58*, 88–96.
- Das, K.M., Dubin, R., and Nagai, T. (1978). Isolation and characterization of colonic tissue-bound antibodies from patients with idiopathic ulcerative colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *75*, 4528–4532.
- Das, K.M., Sakamaki, S., Vecchi, M., and Diamond, B. (1987). The production and characterization of monoclonal antibodies to a human colonic antigen associated with ulcerative colitis: cellular localization of the antigen by using the monoclonal antibody. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *139*, 77–84.
- Davis, M.M. (1990). T cell receptor gene diversity and selection. *Annu. Rev. Biochem.* *59*, 475–496.
- De Dombal, F.T. (1968). Ulcerative colitis: definition, historical background, aetiology, diagnosis, natural history and local complications. *Postgrad. Med. J.* *44*, 684–692.
- Deem, R.L., Shanahan, F., and Targan, S.R. (1991). Triggered human mucosal T cells release tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma which kill human colonic epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* *83*, 79–84.
- De Winter, B.-Y., and De Man, J.-G. (2010). Interplay between inflammation, immune system and neuronal pathways: effect on gastrointestinal motility. *World J. Gastroenterol.* *16*, 5523–5535.
- Dibirdik, I., Langlie, M.C., Ledbetter, J.A., Tuel-Ahlgren, L., Obuz, V., Waddick, K.G., Gajl-Peczalska, K., Schieven, G.L., and Uckun, F.M. (1991). Engagement of interleukin-7 receptor stimulates tyrosine phosphorylation, phosphoinositide turnover, and clonal proliferation of human T-lineage acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* *78*, 564–570.
- Di Caro, V., D'Anneo, A., Phillips, B., Engman, C., Harnaha, J., Lakomy, R., Styche, A., Trucco, M., and Giannoukakis, N. (2011). Interleukin-7 matures suppressive CD127(+) forkhead box P3 (FoxP3)(+) T cells into CD127(-) CD25(high) FoxP3(+) regulatory T cells. *Clin. Exp. Immunol.* *165*, 60–76.
- Di Gennaro, A., and Haeggström, J.Z. (2014). Targeting leukotriene B4 in inflammation. *Expert Opin. Ther. Targets* *18*, 79–93.
- Dobbins, W.O. (1986). Human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gut* *27*, 972–985.
- Duerr, R.H., Targan, S.R., Landers, C.J., Sutherland, L.R., and Shanahan, F. (1991). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis. Comparison with other colitides/diarrheal illnesses. *Gastroenterology* *100*, 1590–1596.

- Eddleston, M., and Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54, 15–36.
- Ehrlein, H.J. (1981). Retroperistaltism and duodenogastric reflux in dogs. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 67, 29–32.
- Ekblad, E., Mei, Q., and Sundler, F. (2000). Innervation of the gastric mucosa. *Microsc. Res. Tech.* 48, 241–257.
- Ekblom, A., and Montgomery, S.M. (2004). Environmental risk factors (excluding tobacco and microorganisms): critical analysis of old and new hypotheses. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18, 497–508.
- Ekelund, M., and Ekblad, E. (2001). Intestinal adaptation in atrophic rat ileum is accompanied by supersensitivity to vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide and nitric oxide. *Scand. J. Gastroenterol.* 36, 251–257.
- Elmgreen, J., Wiik, A., Nielsen, H., and Nielsen, O.H. (1985). Demonstration of circulating immune complexes by the indirect leucocyte phagocytosis test in chronic inflammatory bowel disease. Relation to results of a standard complement consumption assay. *Acta Med. Scand.* 218, 73–78.
- Esposito, G., Capoccia, E., Turco, F., Palumbo, I., Lu, J., Steardo, A., Cuomo, R., Sarnelli, G., and Steardo, L. (2014). Palmitoylethanolamide improves colon inflammation through an enteric glia/toll like receptor 4-dependent PPAR- $\alpha$  activation. *Gut* 63, 1300–1312.
- Estall, J.L., and Drucker, D.J. (2006). Glucagon-like Peptide-2. *Annu. Rev. Nutr.* 26, 391–411.
- Fakhoury, M., Negrulj, R., Mooranian, A., and Al-Salami, H. (2014). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *J. Inflamm. Res.* 7, 113–120.
- Farahat K (1999). Rectocolite ulcérohémorragique : épidémiologie, physio-pathologie, diagnostic, histoire naturelle et stratégie thérapeutique.
- Fassett, R.T. (1987). Clinical significance of selective IgA deficiency. *Int Med Spec.*
- Feldmann, M. (1991a). Cytokine networks: do we understand them well enough to facilitate clinical benefits? *Eur. Cytokine Netw.* 2, 5–9.
- Feldmann, M. (1991b). Cytokine networks: do we understand them well enough to facilitate clinical benefits? *Eur. Cytokine Netw.* 2, 5–9.
- Ferens, D., Baell, J., Lessene, G., Smith, J.E., and Furness, J.B. (2007). Effects of modulators of Ca(2+)-activated, intermediate-conductance potassium channels on motility of the rat small intestine, in vivo. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 19, 383–389.
- Field, M. (2003). Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J. Clin. Invest.* 111, 931–943.

- Fiocchi, C., Tubbs, R.R., and Youngman, K.R. (1985). Human intestinal mucosal mononuclear cells exhibit lymphokine-activated killer cell activity. *Gastroenterology* 88, 625–637.
- Fontana, A., Fierz, W., and Wekerle, H. (1984). Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature* 307, 273–276.
- von Freeden-Jeffry, U., Davidson, N., Wiler, R., Fort, M., Burdach, S., and Murray, R. (1998). IL-7 deficiency prevents development of a non-T cell non-B cell-mediated colitis. *J Immunol* 161, 5673–5680.
- Frehn, L., Jansen, A., Bennek, E., Mandic, A.D., Temizel, I., Tischendorf, S., Verdier, J., Tacke, F., Streetz, K., Trautwein, C., et al. (2014). Distinct patterns of IgG and IgA against food and microbial antigens in serum and feces of patients with inflammatory bowel diseases. *PLoS One* 9, e106750.
- Fry, T.J., and Mackall, C.L. (2002). Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood* 99, 3892–3904.
- Fukushima, K., Masuda, T., Ohtani, H., Sasaki, I., Funayama, Y., Matsuno, S., and Nagura, H. (1991). Immunohistochemical characterization, distribution, and ultrastructure of lymphocytes bearing T-cell receptor gamma/delta in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 101, 670–678.
- Furness, J.B. (2000a). Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 87–96.
- Furness, J.B. (2000b). Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 87–96.
- Furness, J.B. (2012a). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 286–294.
- Furness, J.B. (2012b). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 286–294.
- Furness, J.B., Kunze, W.A., Bertrand, P.P., Clerc, N., and Bornstein, J.C. (1998). Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog. Neurobiol.* 54, 1–18.
- Furness, J.B., Clerc, N., Lomax, A.E., Bornstein, J.C., and Kunze, W.A. (2000). Shapes and projections of tertiary plexus neurons of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* 300, 383–387.
- Furness, J.B., Jones, C., Nurgali, K., and Clerc, N. (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.* 72, 143–164.
- Furness, J.B., Callaghan, B.P., Rivera, L.R., and Cho, H.-J. (2014). The Enteric Nervous System and Gastrointestinal Innervation: Integrated Local and Central Control. In *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease*, M. Lyte, and J.F. Cryan, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 39–71.

- Gabella, G. (1971). Glial cells in the myenteric plexus. *Z. Für Naturforschung Teil B Chem. Biochem. Biophys. Biol.* 26, 244–245.
- Gabella, G. (1972). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J. Anat.* 111, 69–97.
- Gabella, G. (1979). Innervation of the gastrointestinal tract. *Int. Rev. Cytol.* 59, 129–193.
- Galligan, J.J. (1998). Mechanisms of excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 23, 129–136.
- Gaya, D.R., Russell, R.K., Nimmo, E.R., and Satsangi, J. (2006). New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet Lond. Engl.* 367, 1271–1284.
- Geboes, K., Rutgeerts, P., Ectors, N., Mebis, J., Penninckx, F., Vantrappen, G., and Desmet, V.J. (1992). Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. *Gastroenterology* 103, 439–447.
- Geiselhart, L.A., Humphries, C.A., Gregorio, T.A., Mou, S., Subleski, J., and Komschlies, K.L. (2001). IL-7 administration alters the CD4:CD8 ratio, increases T cell numbers, and increases T cell function in the absence of activation. *J. Immunol. Baltim. Md* 166, 3019–3027.
- Gershon (1998a). The second brain.
- Gershon, M.D. (1998). V. Genes, lineages, and tissue interactions in the development of the enteric nervous system. *Am. J. Physiol.* 275, G869–G873.
- Gershon MD (1991). Enteric glia. *Glia*.
- de Geus, B., van den Enden, M., Coolen, C., Nagelkerken, L., van der Heijden, P., and Rozing, J. (1990). Phenotype of intraepithelial lymphocytes in euthymic and athymic mice: Implications for differentiation of cells bearing a CD3-associated  $\gamma\delta$  T cell receptor. *Eur. J. Immunol.* 20, 291–298.
- Gilead, L., Livni, N., Eliakim, R., Ligumsky, M., Fich, A., Okon, E., Rachmilewitz, D., and Razin, E. (1987). Human gastric mucosal mast cells are chondroitin sulphate E-containing mast cells. *Immunology* 62, 23–28.
- Gillen, C.D., Andrews, H.A., Prior, P., and Allan, R.N. (1994a). Crohn's disease and colorectal cancer. *Gut* 35, 651–655.
- Gillen, C.D., Walmsley, R.S., Prior, P., Andrews, H.A., and Allan, R.N. (1994b). Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* 35, 1590–1592.
- Goldsby RA (2000). *Immunology*. IV.
- Goodwin, R.G., Lupton, S., Schmierer, A., Hjerrild, K.J., Jerzy, R., Clevenger, W., Gillis, S., Cosman, D., and Namen, A.E. (1989). Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 302–306.

- Goodwin, R.G., Friend, D., Ziegler, S.F., Jerzy, R., Falk, B.A., Gimpel, S., Cosman, D., Dower, S.K., March, C.J., and Namen, A.E. (1990). Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell* 60, 941–951.
- Goodwin, R.G. (1992). In *Human cytokines : handbook for basic and clinical research* (B.B Aggarwal and J.V. Guterman).
- Görgün, G., van der Spek, J., Cosenza, L., Menevse, A., and Foss, F. (2002). Altered biological activity associated with C-terminal modifications of IL-7. *Cytokine* 20, 17–22.
- de Groat, W.C., Nadelhaft, I., Milne, R.J., Booth, A.M., Morgan, C., and Thor, K. (1981). Organization of the sacral parasympathetic reflex pathways to the urinary bladder and large intestine. *J. Auton. Nerv. Syst.* 3, 135–160.
- Groh, V., Porcelli, S., Fabbi, M., Lanier, L.L., Picker, L.J., Anderson, T., Warnke, R.A., Bhan, A.K., Strominger, J.L., and Brenner, M.B. (1989). Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J. Exp. Med.* 169, 1277–1294.
- Gulbransen, B.D., and Sharkey, K.A. (2012). Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 625–632.
- Guy-Grand, D., and Vassalli, P. (2002). Gut intraepithelial lymphocyte development. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 255–259.
- Guy-Grand, D., Cerf-Bensussan, N., Malissen, B., Malassis-Seris, M., Briottet, C., and Vassalli, P. (1991). Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 173, 471–481.
- Gwynne, R.M., Thomas, E.A., Goh, S.M., Sjövall, H., and Bornstein, J.C. (2004). Segmentation induced by intraluminal fatty acid in isolated guinea-pig duodenum and jejunum. *J. Physiol.* 556, 557–569.
- Halstensen, T.S., Mollnes, T.E., and Brandtzaeg, P. (1989). Persistent complement activation in submucosal blood vessels of active inflammatory bowel disease: immunohistochemical evidence. *Gastroenterology* 97, 10–19.
- Halstensen, T.S., Farstad, I.N., Scott, H., Fausa, O., and Brandtzaeg, P. (1990a). Intraepithelial TcR alpha/beta+ lymphocytes express CD45RO more often than the TcR gamma/delta+ counterparts in coeliac disease. *Immunology* 71, 460–466.
- Halstensen, T.S., Mollnes, T.E., Garred, P., Fausa, O., and Brandtzaeg, P. (1990b). Epithelial deposition of immunoglobulin G1 and activated complement (C3b and terminal complement complex) in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 98, 1264–1271.
- Hanani, M., and Reichenbach, A. (1994). Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 278, 153–160.
- Hansen, M.B. (2002). Small intestinal manometry. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 51, 541–556.

- Hansen, M.B. (2003). The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol. Toxicol.* 92, 105–113.
- Hasler, W.L. (2003). *gastroenterology* (Yamata, T.).
- He, Y.W., and Malek, T.R. (1996). Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *J. Exp. Med.* 184, 289–293.
- Heanue, T.A., and Pachnis, V. (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 466–479.
- Hendriks, R., Bornstein, J.C., and Furness, J.B. (1990). An electrophysiological study of the projections of putative sensory neurons within the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *Neurosci. Lett.* 110, 286–290.
- Henney, C.S. (1989). Interleukin 7: effects on early events in lymphopoiesis. *Immunol. Today* 10, 170–173.
- Hershberg, R., Eghtesady, P., Sydora, B., Brorson, K., Cheroutre, H., Modlin, R., and Kronenberg, M. (1990). Expression of the thymus leukemia antigen in mouse intestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9727–9731.
- Hirata, I., Berrebi, G., Austin, L.L., Keren, D.F., and Dobbins, W.O. (1986). Immunohistological characterization of intraepithelial and lamina propria lymphocytes in control ileum and colon and in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* 31, 593–603.
- Hirst, G.D., Holman, M.E., and Spence, I. (1974). Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *J. Physiol.* 236, 303–326.
- Hodgson, H.J., Potter, B.J., and Jewell, D.P. (1977a). Immune complexes in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 29, 187–196.
- Hodgson, H.J., Potter, B.J., and Jewell, D.P. (1977b). Humoral immune system in inflammatory bowel disease: I. Complement levels. *Gut* 18, 749–753.
- Hoff, S., Zeller, F., von Weyhern, C.W.H., Wegner, M., Schemann, M., Michel, K., and Rühl, A. (2008). Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J. Comp. Neurol.* 509, 356–371.
- Hopkins, D.A., Bieger, D., deVente, J., and Steinbusch, W.M. (1996). Vagal efferent projections: viscerotopy, neurochemistry and effects of vagotomy. *Prog. Brain Res.* 107, 79–96.
- Hosoda, K., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Baynash, A.G., Cheung, J.C., Giaid, A., and Yanagisawa, M. (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79, 1267–1276.
- Hoyle, C.H., and Burnstock, G. (1989). Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *J. Anat.* 166, 7–22.

- Ibba-Manneschi, L., Martini, M., Zecchi-Orlandini, S., and Fausone-Pellegrini, M.S. (1995). Structural organization of enteric nervous system in human colon. *Histol. Histopathol.* *10*, 17–25.
- Iborra, M., Bernuzzi, F., Invernizzi, P., and Danese, S. (2012). MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: crucial regulators in immune response. *Autoimmun. Rev.* *11*, 305–314.
- Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *147*, 258–267.
- James, S.P., Fiocchi, C., Graeff, A.S., and Strober, W. (1986). Phenotypic analysis of lamina propria lymphocytes. Predominance of helper-inducer and cytolytic T-cell phenotypes and deficiency of suppressor-inducer phenotypes in Crohn's disease and control patients. *Gastroenterology* *91*, 1483–1489.
- James, S.P. (1988a). Intestinal lymphocyte populations and mechanisms of cell-mediated immunity. *Immunol Clin North Am.*
- James, S.P. (1988b). Intestinal lymphocyte populations and mechanisms of cell-mediated immunity. *Immunol Clin North Am.*
- Jantchou, P., Morois, S., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.-C., and Carbonnel, F. (2010). Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: The E3N prospective study. *Am. J. Gastroenterol.* *105*, 2195–2201.
- Jarry, A., Cerf-bensussan, N., Brousse, N., Selz, F., and Guy-grand, D. (1990a). Subsets of CD3<sup>+</sup> (T cell receptor  $\alpha/\beta$  or  $\gamma/\delta$ ) and CD3<sup>-</sup> lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* *20*, 1097–1103.
- Jarry, A., Cerf-Bensussan, N., Brousse, N., Selz, F., and Guy-Grand, D. (1990b). Subsets of CD3<sup>+</sup> (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3<sup>-</sup> lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* *20*, 1097–1103.
- Jess, T., Winther, K.V., Munkholm, P., Langholz, E., and Binder, V. (2004). Intestinal and extra-intestinal cancer in Crohn's disease: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County, Denmark. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *19*, 287–293.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 671–682.
- Jiang, Y., Liu, M., and Gershon, M.D. (2003). Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev. Biol.* *258*, 364–384.
- Jonard, P.P., Rambaud, J.C., Dive, C., Vaerman, J.P., Galian, A., and Delacroix, D.L. (1984). Secretion of immunoglobulins and plasma proteins from the jejunal mucosa. Transport rate and origin of polymeric immunoglobulin A. *J. Clin. Invest.* *74*, 525–535.

- Jones, B.J., Brooke, G., Atkinson, K., and McTaggart, S.J. (2007). Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells. *Placenta* 28, 1174–1181.
- Joseph, N.M., He, S., Quintana, E., Kim, Y.-G., Núñez, G., and Morrison, S.J. (2011). Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. *J. Clin. Invest.* 121, 3398–3411.
- Kagnoff, M.F. (1975). Functional characteristics of Peyer's patch cells. III. Carrier priming of T cells by antigen feeding. *J. Exp. Med.* 142, 1425–1435.
- Kagnoff, M.F. (1977). Functional characteristics of Peyer's patch lymphoid cells. IV. Effect of antigen feeding on the frequency of antigen-specific B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 118, 992–997.
- Kagnoff, M.F. (1987). Immunology of the digestive system. *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* (Johnson, L.R.).
- Kagnoff, M.F., and Campbell, S. (1976). Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. Comparative ability of murine Peyer's patch and spleen cells to lyse lipopolysaccharide-coated and uncoated erythrocytes. *Gastroenterology* 70, 341–346.
- Kagnoff, M.F., Donaldson, R.M., and Trier, J.S. (1972). Organ culture of rabbit small intestine: prolonged in vitro steady state protein synthesis and secretion and secretory IgA secretion. *Gastroenterology* 63, 541–551.
- Kagnoff, M.F., Serfilippi, D., and Donaldson, R.M. (1973). In vitro kinetics of intestinal secretory IgA secretion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 110, 297–300.
- Kalla, R., Venham, N.T., Kennedy, N.A., Quintana, J.F., Nimmo, E.R., Buck, A.H., and Satsangi, J. (2015). MicroRNAs: new players in IBD. *Gut* 64, 504–517.
- Kanof, M.E., and Strober, W. (1989). Lymphokine-activated killer-cell cytotoxicity in the intestinal immune system. *Gastroenterology* 97, 222–224.
- Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M.B., and Fauci, A.S. (1986). Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* 163, 1037–1050.
- Kelsh, R.N. (2006). Sorting out Sox10 functions in neural crest development. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 28, 788–798.
- Kemler, B.J., and Alpert, E. (1980). Inflammatory bowel disease associated circulating immune complexes. *Gut* 21, 195–201.
- Keren, D.F., Holt, P.S., Collins, H.H., Gemski, P., and Formal, S.B. (1978). The role of Peyer's patches in the local immune response of rabbit ileum to live bacteria. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 120, 1892–1896.
- Kett, K., and Brandtzaeg, P. (1987). Local IgA subclass alterations in ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. *Gut* 28, 1013–1021.

- Kirchgessner, A.L., and Gershon, M.D. (1989). Identification of vagal efferent fibers and putative target neurons in the enteric nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 285, 38–53.
- Kirchgessner, A.L., and Gershon, M.D. (1990). Innervation of the pancreas by neurons in the gut. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 10, 1626–1642.
- Kirchgessner, A.L., Tamir, H., and Gershon, M.D. (1992). Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 235–248.
- Kirsche, W. (1984). [Ramón y Cajal's life-work and its changing evaluation. A contribution on the occasion of the 50th anniversary of his death]. *Z. Für Mikrosk.-Anat. Forsch.* 98, 641–658.
- Kirsner, J.B. (2001). Historical origins of current IBD concepts. *World J. Gastroenterol.* 7, 175–184.
- Klein, J.R., and Kagnoff, M.F. (1984). Nonspecific recruitment of cytotoxic effector cells in the intestinal mucosa of antigen-primed mice. *J. Exp. Med.* 160, 1931–1936.
- Knoflach, P., Vladutiu, A.O., Swierczynska, Z., Weiser, M.M., and Albin, B. (1986). Lack of circulating immune complexes in inflammatory bowel disease. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 80, 9–16.
- Kondo, M., Takeshita, T., Ishii, N., Nakamura, M., Watanabe, S., Arai, K., and Sugamura, K. (1993). Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science* 262, 1874–1877.
- Koretz, K., Momburg, F., Otto, H.F., and Möller, P. (1987). Sequential induction of MHC antigens on autochthonous cells of ileum affected by Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* 129, 493–502.
- Korte, A., Möricke, A., Beyermann, B., Köchling, J., Taube, T., Kebelmann-Betzing, C., Henze, G., and Seeger, K. (1999). Extensive alternative splicing of interleukin-7 in malignant hematopoietic cells: implication of distinct isoforms in modulating IL-7 activity. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 19, 495–503.
- Koshland, M.E. (1975). Structure and Function of the J Chain. *Adv. Immunol.* 20, 41–69.
- Koutroubakis, I.E., and Vlachonikolis, I.G. (2000). Appendectomy and the development of ulcerative colitis: results of a metaanalysis of published case-control studies. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 171–176.
- Koutroubakis, I.E., Vlachonikolis, I.G., and Kouroumalis, E.A. (2002). Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm. Bowel Dis.* 8, 277–286.
- Kremlev, S.G., Gaurnier-Hausser, A.L., Del Valle, L., Perez-Liz, G., Dimitrov, S., and Tuszynski, G. (2008). Angiocidin promotes pro-inflammatory cytokine production and antigen presentation in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 194, 132–142.

- Kruse, A., Merchant, M.J., Hallmann, R., and Butcher, E.C. (1999). Evidence of specialized leukocyte-vascular homing interactions at the maternal/fetal interface. *Eur. J. Immunol.* *29*, 1116–1126.
- Kühn, L.C., and Kraehenbuhl, J.P. (1979). Role of secretory component, a secreted glycoprotein, in the specific uptake of IgA dimer by epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *254*, 11072–11081.
- Kunze, W.A., and Furness, J.B. (1999). The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu. Rev. Physiol.* *61*, 117–142.
- Kunze, W.A., Furness, J.B., Bertrand, P.P., and Bornstein, J.C. (1998). Intracellular recording from myenteric neurons of the guinea-pig ileum that respond to stretch. *J. Physiol.* *506 (Pt 3)*, 827–842.
- Kvale, D., Brandtzaeg, P., and Løvhaug, D. (1988). Up-regulation of the expression of secretory component and HLA molecules in a human colonic cell line by tumour necrosis factor-alpha and gamma interferon. *Scand. J. Immunol.* *28*, 351–357.
- Lagercrantz, R., Perlmann, P., and Hammarström, S. (1971). Immunological studies in ulcerative colitis. V. Family studies. *Gastroenterology* *60*, 381–389.
- Lakatos, P.L., Szamosi, T., and Lakatos, L. (2007). Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J. Gastroenterol.* *13*, 6134–6139.
- Lake, A.M., Stitzel, A.E., Urmson, J.R., Walker, W.A., and Spitzer, R.E. (1979). Complement alterations in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *76*, 1374–1379.
- Laky, K., Lefrançois, L., Lingenheld, E.G., Ishikawa, H., Lewis, J.M., Olson, S., Suzuki, K., Tigelaar, R.E., and Puddington, L. (2000). Enterocyte expression of interleukin 7 induces development of gammadelta T cells and Peyer's patches. *J. Exp. Med.* *191*, 1569–1580.
- Lamm, M.E. (1979). Mode of induction of an IgA response in the breast and other secretory sites by oral antigen. (Ogra, P.L., and Dayton, D.).
- Lang, I.M. (2015). The Role of Central and Enteric Nervous Systems in the Control of the Retrograde Giant Contraction. *J. Neurogastroenterol. Motil.*
- Langholz, E. (2010). Current trends in inflammatory bowel disease: the natural history. *Ther. Adv. Gastroenterol.* *3*, 77–86.
- Laranjeira, C., Sandgren, K., Kessaris, N., Richardson, W., Potocnik, A., Vanden Berghe, P., and Pachnis, V. (2011). Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J. Clin. Invest.* *121*, 3412–3424.
- Lee T. D. G. (1988). Mast cells, eosinophils, and gastrointestinal hypersensitivity. *Immunol Allergy Clin North Am.*
- Lerebours, E., Savoye, G., and Guedon, C. (2003). [Epidemiology and natural history of chronic inflammatory bowel disease]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* *27*, S76–S80.

- Levy, L.C. (2009). Advances In Inflammatory Bowel Diseases. *Expert Rev. Gastroenterol. Amp Hepatol.* 3, 109–111.
- Li, R., Paul, A., Ko, K.W.S., Sheldon, M., Rich, B.E., Terashima, T., Dieker, C., Cormier, S., Li, L., Nour, E.A., et al. (2012). Interleukin-7 induces recruitment of monocytes/macrophages to endothelium. *Eur. Heart J.* 33, 3114–3123.
- Liu, J.Z., van Sommeren, S., Huang, H., Ng, S.C., Alberts, R., Takahashi, A., Ripke, S., Lee, J.C., Jostins, L., Shah, T., et al. (2015). Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat. Genet.* 47, 979–986.
- Liu, Y.A., Chung, Y.C., Pan, S.T., Shen, M.Y., Hou, Y.C., Peng, S.J., Pasricha, P.J., and Tang, S.C. (2013). 3-D imaging, illustration, and quantitation of enteric glial network in transparent human colon mucosa. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 25, e324–e338.
- Lomax, A.E., and Furness, J.B. (2000). Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res.* 302, 59–72.
- Lupton, S.D., Gimpel, S., Jerzy, R., Brunton, L.L., Hjerrild, K.A., Cosman, D., and Goodwin, R.G. (1990). Characterization of the human and murine IL-7 genes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 144, 3592–3601.
- Lynch, A.C., and Frizelle, F.A. (2006). Colorectal motility and defecation after spinal cord injury in humans. *Prog. Brain Res.* 152, 335–343.
- Lynch, M., Baker, E., Park, L.S., Sutherland, G.R., and Goodwin, R.G. (1992). The interleukin-7 receptor gene is at 5p13. *Hum. Genet.* 89, 566–568.
- MacDermott, R.P., and Nahm, M.H. (1987). Expression of human immunoglobulin G subclasses in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 93, 1127–1129.
- MacDermott, R.P., and Stenson, W.F. (1988). Alterations of the immune system in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Adv. Immunol.* 42, 285–328.
- MacDermott, R.P., Franklin, G.O., Jenkins, K.M., Kodner, I.J., Nash, G.S., and Weinrieb, I.J. (1980). Human intestinal mononuclear cells. I. Investigation of antibody-dependent, lectin-induced, and spontaneous cell-mediated cytotoxic capabilities. *Gastroenterology* 78, 47–56.
- MacDermott, R.P., Nash, G.S., Bertovich, M.J., Mohrman, R.F., Kodner, I.J., Delacroix, D.L., and Vaerman, J.P. (1986a). Altered patterns of secretion of monomeric IgA and IgA subclass 1 by intestinal mononuclear cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 91, 379–385.
- MacDermott, R.P., Kane, M.G., Steele, L.L., and Stenson, W.F. (1986b). Inhibition of cytotoxicity by sulfasalazine. I. Sulfasalazine inhibits spontaneous cell-mediated cytotoxicity by peripheral blood and intestinal mononuclear cells from control and inflammatory bowel disease patients. *Immunopharmacology* 11, 101–109.
- MacDermott, R.P. (1988). The role of the immune system in inflammatory bowel disease. *Immunol Allergy Clin North Am.*

- MacDonald, T.T., and Spencer, J. (1988). Evidence that activated mucosal T cells play a role in the pathogenesis of enteropathy in human small intestine. *J. Exp. Med.* *167*, 1341–1349.
- MacDonald, H.R., Schreyer, M., Howe, R.C., and Bron, C. (1990). Selective expression of CD8 alpha (Ly-2) subunit on activated thymic gamma/delta cells. *Eur. J. Immunol.* *20*, 927–930.
- MacEachern, S.J., Patel, B.A., McKay, D.M., and Sharkey, K.A. (2011). Nitric oxide regulation of colonic epithelial ion transport: a novel role for enteric glia in the myenteric plexus. *J. Physiol.* *589*, 3333–3348.
- Marteau, P., Daniel, F., Seksik, P., and Jian, R. (2004). Inflammatory bowel disease: what is new? *Endoscopy* *36*, 130–136.
- Matsuda, N.M., Miller, S.M., and Evora, P.R.B. (2009). The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clin. São Paulo Braz.* *64*, 1219–1224.
- Maudlej, N., and Hanani, M. (1992). Modulation of dye coupling among glial cells in the myenteric and submucosal plexuses of the guinea pig. *Brain Res.* *578*, 94–98.
- Mayer, L., Eisenhardt, D., Salomon, P., Bauer, W., Plous, R., and Piccinini, L. (1991). Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *100*, 3–12.
- Mazzuoli, G., and Schemann, M. (2009). Multifunctional rapidly adapting mechanosensitive enteric neurons (RAMEN) in the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *J. Physiol.* *587*, 4681–4694.
- McClain, J.L., Grubišić, V., Fried, D., Gomez-Suarez, R.A., Leininger, G.M., Sévigny, J., Parpura, V., and Gulbransen, B.D. (2014). Ca<sup>2+</sup> responses in enteric glia are mediated by connexin-43 hemichannels and modulate colonic transit in mice. *Gastroenterology* *146*, 497–507.e1.
- McDermott, M.R., and Bienenstock, J. (1979). Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *122*, 1892–1898.
- McElroy, C.A., Dohm, J.A., and Walsh, S.T.R. (2009). Structural and biophysical studies of the human IL-7/IL-7Ralpha complex. *Struct. Lond. Engl.* *17*, 54–65.
- McGovern, D.P.B., Kugathasan, S., and Cho, J.H. (2015). Genetics of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* *149*, 1163–1176.e2.
- McWilliams, M., Phillips-Quagliata, J.M., and Lamm, M.E. (1977). Mesenteric lymph node B lymphoblasts which home to the small intestine are precommitted to IgA synthesis. *J. Exp. Med.* *145*, 866–875.
- Mehler, M.F., Rozental, R., Dougherty, M., Spray, D.C., and Kessler, J.A. (1993). Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *Nature* *362*, 62–65.
- Mei, N., Condamin, M., and Boyer, A. (1980). The composition of the vagus nerve of the cat. *Cell Tissue Res.* *209*, 423–431.

- Meinl, E., Aloisi, F., Ertl, B., Weber, F., de Waal Malefyt, R., Wekerle, H., and Hohlfeld, R. (1994). Multiple sclerosis. Immunomodulatory effects of human astrocytes on T cells. *Brain J. Neurol.* *117 (Pt 6)*, 1323–1332.
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., and Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* *103*, 4619–4621.
- Mellander, A., Järbur, K., and Sjövall, H. (2000). Pressure and frequency dependent linkage between motility and epithelial secretion in human proximal small intestine. *Gut* *46*, 376–384.
- Mestecky, J. (1987). The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J. Clin. Immunol.* *7*, 265–276.
- Mestecky, J. (1988). Intestinal IgA system. *Immunol Allergy Clin North Am.*
- Mestecky, J. (1990). The common mucosal immune system in the human genital tract and mammary gland. (Mettler, L., and Billington, W.D.).
- Meuer, S.C., Dumann, H., Meyer zum Büschenfelde, K.H., and Köhler, H. (1989). Low-dose interleukin-2 induces systemic immune responses against HBsAg in immunodeficient non-responders to hepatitis B vaccination. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 15–18.
- Miceli, M.C., von Hoegen, P., and Parnes, J.R. (1991). Adhesion versus coreceptor function of CD4 and CD8: role of the cytoplasmic tail in coreceptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 2623–2627.
- Michaelson, M.D., Mehler, M.F., Xu, H., Gross, R.E., and Kessler, J.A. (1996). Interleukin-7 is trophic for embryonic neurons and is expressed in developing brain. *Dev. Biol.* *179*, 251–263.
- Miner, P.B. (1997). Factors influencing the relapse of patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* *92*, 1S – 4S.
- Molinié, F., Gower-Rousseau, C., Yzet, T., Merle, V., Grandbastien, B., Marti, R., Lerebours, E., Dupas, J.-L., Colombel, J.-F., Salomez, J.-L., et al. (2004). Opposite evolution in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut* *53*, 843–848.
- Moore, T.A., von Freeden-Jeffry, U., Murray, R., and Zlotnik, A. (1996). Inhibition of gamma delta T cell development and early thymocyte maturation in IL-7  $-/-$  mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *157*, 2366–2373.
- Moors, M., Vudattu, N.K., Abel, J., Krämer, U., Rane, L., Ulfig, N., Ceccatelli, S., Seyfert-Margolies, V., Fritsche, E., and Maeurer, M.J. (2010). Interleukin-7 (IL-7) and IL-7 splice variants affect differentiation of human neural progenitor cells. *Genes Immun.* *11*, 11–20.
- Mostov, K.E., Friedlander, M., and Blobel, G. (1984). The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains. *Nature* *308*, 37–43.

- Murakami, M., Ohta, T., and Ito, S. (2009). Lipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin-1beta from enteric glial cells. *J. Neurosci. Res.* *87*, 2095–2104.
- Musquer, N., Coquenlorge, S., Bourreille, A., Aubert, P., Matysiak-Budnik, T., des Varannes, S.B., Lauwers, G., Neunlist, M., and Coron, E. (2013). Probe-based confocal laser endomicroscopy: a new method for quantitative analysis of pit structure in healthy and Crohn's disease patients. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* *45*, 487–492.
- Nagahama, M., Semba, R., Tsuzuki, M., and Aoki, E. (2001). L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol. Signals Recept.* *10*, 336–340.
- Nagai, T., and Das, K.M. (1981). Demonstration of an assay for specific cytolytic antibody in sera from patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* *80*, 1507–1512.
- Namen, A.E., Lupton, S., Hjerrild, K., Wignall, J., Mochizuki, D.Y., Schmierer, A., Mosley, B., March, C.J., Urdal, D., and Gillis, S. (1988). Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* *333*, 571–573.
- Nasser, Y., Ho, W., and Sharkey, K.A. (2006a). Distribution of adrenergic receptors in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse, and rat. *J. Comp. Neurol.* *495*, 529–553.
- Nasser, Y., Fernandez, E., Keenan, C.M., Ho, W., Oland, L.D., Tibbles, L.A., Schemann, M., MacNaughton, W.K., Rühl, A., and Sharkey, K.A. (2006b). Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *291*, G912–G927.
- Nasser, Y., Keenan, C.M., Ma, A.C., McCafferty, D.-M., and Sharkey, K.A. (2007). Expression of a functional metabotropic glutamate receptor 5 on enteric glia is altered in states of inflammation. *Glia* *55*, 859–872.
- Natarajan, D., Marcos-Gutierrez, C., Pachnis, V., and de Graaff, E. (2002). Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 5151–5160.
- Neunlist, M., Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Rühl, A., Lardeux, B., Savidge, T., et al. (2007). Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *292*, G231–G241.
- Neunlist, M., Coquenlorge, S., Aubert, P., Duchalais-Dassonneville, E., des Varannes, S.B., Meurette, G., and Coron, E. (2011). Colonic endoscopic full-thickness biopsies: from the neuropathological analysis of the myenteric plexus to the functional study of neuromuscular transmission. *Gastrointest. Endosc.* *73*, 1029–1034.
- Newgreen, D., and Young, H.M. (2002). Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 2. *Pediatr. Dev. Pathol. Off. J. Soc. Pediatr. Pathol. Paediatr. Pathol. Soc.* *5*, 329–349.

- Nicola, N. A. (1994). *Guidebook to cytokines and their receptors*. (Oxford: Sambrooke & Tooze.).
- Nielsen, H., Binder, V., Daugharty, H., and Svehag, S.-E. (1978). Circulating immune complexes in ulcerative colitis. I. Correlation to disease activity. *Clin. Exp. Immunol.* *31*, 72–80.
- Nikceovich, K.M., Gordon, K.B., Tan, L., Hurst, S.D., Kroepfl, J.F., Gardinier, M., Barrett, T.A., and Miller, S.D. (1997). IFN-gamma-activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *158*, 614–621.
- Nishi and North (1973). *From the Neurophysiology Laboratory*.
- Noguchi, M., Nakamura, Y., Russell, S.M., Ziegler, S.F., Tsang, M., Cao, X., and Leonard, W.J. (1993a). Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* *262*, 1877–1880.
- Noguchi, M., Adelstein, S., Cao, X., and Leonard, W.J. (1993b). Characterization of the human interleukin-2 receptor gamma chain gene. *J. Biol. Chem.* *268*, 13601–13608.
- Okada, E., Yamazaki, M., Tanabe, M., Takeuchi, T., Nanno, M., Oshima, S., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Kanai, T., et al. (2005). IL-7 exacerbates chronic colitis with expansion of memory IL-7R<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> mucosal T cells in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *288*, G745–G754.
- Orloff, D.G., Frank, S.J., Robey, F.A., Weissman, A.M., and Klausner, R.D. (1989). Biochemical characterization of the eta chain of the T-cell receptor. A unique subunit related to zeta. *J. Biol. Chem.* *264*, 14812–14817.
- Palli, D., Trallori, G., Saieva, C., Tarantino, O., Edili, E., D’Albasio, G., Pacini, F., and Masala, G. (1998). General and cancer specific mortality of a population based cohort of patients with inflammatory bowel disease: the Florence Study. *Gut* *42*, 175–179.
- Papillon, F., and Rambert, H. (2014). *Le ventre, notre deuxième cerveau* (Tallandier).
- Pardoll, D.M., Fowlkes, B.J., Lew, A.M., Maloy, W.L., Weston, M.A., Bluestone, J.A., Schwartz, R.H., Coligan, J.E., and Kruisbeek, A.M. (1988). Thymus-dependent and thymus-independent developmental pathways for peripheral T cell receptor-gamma delta-bearing lymphocytes. *J. Immunol.* *140*, 4091–4096.
- Park, J.-H., Adoro, S., Guintier, T., Erman, B., Alag, A.S., Catalfamo, M., Kimura, M.Y., Cui, Y., Lucas, P.J., Gress, R.E., et al. (2010). Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat. Immunol.* *11*, 257–264.
- Parker, C.M., Cepek, K.L., Russell, G.J., Shaw, S.K., Posnett, D.N., Schwarting, R., and Brenner, M.B. (1992). A family of beta 7 integrins on human mucosal lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 1924–1928.

- Pavli, P., Woodhams, C.E., Doe, W.F., and Hume, D.A. (1990). Isolation and characterization of antigen-presenting dendritic cells from the mouse intestinal lamina propria. *Immunology* *70*, 40–47.
- Peters, M.G., Secrist, H., Anders, K.R., Nash, G.S., Rich, S.R., and MacDermott, R.P. (1989). Normal human intestinal B lymphocytes. Increased activation compared with peripheral blood. *J. Clin. Invest.* *83*, 1827–1833.
- Peyrin-Biroulet, L., Loftus, E.V., Colombel, J.-F., and Sandborn, W.J. (2010). The natural history of adult Crohn’s disease in population-based cohorts. *Am. J. Gastroenterol.* *105*, 289–297.
- Phillips, J.O., Everson, M.P., Moldoveanu, Z., Lue, C., and Mestecky, J. (1990). Synergistic effect of IL-4 and IFN-gamma on the expression of polymeric Ig receptor (secretory component) and IgA binding by human epithelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md* *145*, 1740–1744.
- Pigneur, B., Escher, J., Elawad, M., Lima, R., Buderus, S., Kierkus, J., Guariso, G., Canioni, D., Lambot, K., Talbotec, C., et al. (2013). Phenotypic characterization of very early-onset IBD due to mutations in the IL10, IL10 receptor alpha or beta gene: a survey of the Genius Working Group. *Inflamm. Bowel Dis.* *19*, 2820–2828.
- Piguet, P.F., Grau, G.E., Allet, B., and Vassalli, P. (1987). Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *J. Exp. Med.* *166*, 1280–1289.
- Pleiman, C.M., Gimpel, S.D., Park, L.S., Harada, H., Taniguchi, T., and Ziegler, S.F. (1991). Organization of the murine and human interleukin-7 receptor genes: two mRNAs generated by differential splicing and presence of a type I-interferon-inducible promoter. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 3052–3059.
- Pompolo, S., and Furness, J.B. (1993). Origins of synaptic inputs to calretinin immunoreactive neurons in the guinea-pig small intestine. *J. Neurocytol.* *22*, 531–546.
- Ponder, A., and Long, M.D. (2013). A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clin. Epidemiol.* *5*, 237–247.
- Porcelli, S., Brenner, M.B., and Band, H. (1991). Biology of the human gamma delta T-cell receptor. *Immunol. Rev.* *120*, 137–183.
- Porter, B.O., and Malek, T.R. (2000). Thymic and intestinal intraepithelial T lymphocyte development are each regulated by the gammac-dependent cytokines IL-2, IL-7, and IL-15. *Semin. Immunol.* *12*, 465–474.
- Poulsen, L.O., Elling, P., Sørensen, F.B., and Høedt-Rasmussen, K. (1986). HLA-DR expression and disease activity in ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* *21*, 364–368.
- Powell, J.J., Harvey, R.S., Ashwood, P., Wolstencroft, R., Gershwin, M.E., and Thompson, R.P. (2000). Immune potentiation of ultrafine dietary particles in normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. *J. Autoimmun.* *14*, 99–105.

- Puck, J.M., Deschênes, S.M., Porter, J.C., Dutra, A.S., Brown, C.J., Willard, H.F., and Henthorn, P.S. (1993). The interleukin-2 receptor gamma chain maps to Xq13.1 and is mutated in X-linked severe combined immunodeficiency, SCIDX1. *Hum. Mol. Genet.* *2*, 1099–1104.
- Ransohoff, R.M., and Tani, M. (1998). Do chemokines mediate leukocyte recruitment in post-traumatic CNS inflammation? *Trends Neurosci.* *21*, 154–159.
- Raybould, H.E. (2007). Mechanisms of CCK signaling from gut to brain. *Curr. Opin. Pharmacol.* *7*, 570–574.
- Reddix, R., Kuhawara, A., Wallace, L., and Cooke, H.J. (1994). Vasoactive intestinal polypeptide: a transmitter in submucous neurons mediating secretion in guinea pig distal colon. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *269*, 1124–1129.
- Rehfeld, J.F. (2004). A centenary of gastrointestinal endocrinology. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* *36*, 735–741.
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., and Gage, F.H. (1997). Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* *20*, 570–577.
- Riese, W., and Arrington, G.E. (1971). Edwin Clarke and C. D. O'Malley. The human brain and the spinal cord. A historical study illustrated by writings from antiquity to the twentieth century. Berkeley, Calif.: University of California Press, 1968, 926 pp. *J. Hist. Behav. Sci.* *7*, 205–206.
- Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Leitman, S., Chang, A.E., Ettinghausen, S.E., Matory, Y.L., Skibber, J.M., Shiloni, E., and Vetto, J.T. (1985). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* *313*, 1485–1492.
- Roth, R.I., Owen, R.L., Keren, D.F., and Volberding, P.A. (1985). Intestinal infection with *Mycobacterium avium* in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Histological and clinical comparison with Whipple's disease. *Dig. Dis. Sci.* *30*, 497–504.
- Rozental, R., Morales, M., Mehler, M.F., Urban, M., Kremer, M., Dermietzel, R., Kessler, J.A., and Spray, D.C. (1998). Changes in the properties of gap junctions during neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 1753–1762.
- Rühl, A., and Collins, S.M. (1995). Enterogial cells (EGC) are an integral part of the neuroimmune axis in the enteric nervous system (ENS). *Gastroenterology* *108*, A680.
- Rühl, A., Franzke, S., and Stremmel, W. (2001). IL-1beta and IL-10 have dual effects on enteric glial cell proliferation. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *13*, 89–94.
- Rühl, A., Nasser, Y., and Sharkey, K.A. (2004). Enteric glia. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *16 Suppl 1*, 44–49.
- Russel, M.G., Engels, L.G., Muris, J.W., Limonard, C.B., Volovics, A., Brummer, R.J., and Stockbrügger, R.W. (1998). Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease:

a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 243–249.

Russell, S.M., Keegan, A.D., Harada, N., Nakamura, Y., Noguchi, M., Leland, P., Friedmann, M.C., Miyajima, A., Puri, R.K., and Paul, W.E. (1993). Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* *262*, 1880–1883.

Saini, H.K., Griffiths-Jones, S., and Enright, A.J. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 17719–17724.

Salt, T.E., and Hill, R.G. (1983). Neurotransmitter candidates of somatosensory primary afferent fibres. *Neuroscience* *10*, 1083–1103.

de Saussure, P., and Bouhnik, Y. (2007). *Maladie de Crohn de l'adulte*. EMC - Gastro-Entérologie *2*, 1–18.

Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., and Sofroniew, M.V. (2007a). Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* *132*, 1344–1358.

Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., and Sofroniew, M.V. (2007b). Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* *132*, 1344–1358.

Saxon, A., Shanahan, F., Landers, C., Ganz, T., and Targan, S. (1990). A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* *86*, 202–210.

Schemann, M., Michel, K., Peters, S., Bischoff, S.C., and Neunlist, M. (2002). Cutting-edge technology. III. Imaging and the gastrointestinal tract: mapping the human enteric nervous system. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *282*, G919–G925.

Schieferdecker, H.L., Ullrich, R., Weiss-Breckwoldt, A.N., Schwarting, R., Stein, H., Riecken, E.O., and Zeitz, M. (1990). The HML-1 antigen of intestinal lymphocytes is an activation antigen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *144*, 2541–2549.

Schreiber, S., MacDermott, R.P., Raedler, A., Pinnau, R., Bertovich, M.J., and Nash, G.S. (1991). Increased activation of isolated intestinal lamina propria mononuclear cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *101*, 1020–1030.

Schubert, M.L., and Peura, D.A. (2008a). Control of gastric acid secretion in health and disease. *Gastroenterology* *134*, 1842–1860.

Schubert, M.L., and Peura, D.A. (2008b). Control of gastric acid secretion in health and disease. *Gastroenterology* *134*, 1842–1860.

Schwartz, L.B., Irani, A.M., Roller, K., Castells, M.C., and Schechter, N.M. (1987). Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *138*, 2611–2615.

Scullard, G.H., Pollard, R.B., Smith, J.L., Sacks, S.L., Gregory, P.B., Robinson, W.S., and Merigan, T.C. (1981). Antiviral treatment of chronic hepatitis B virus infection. I. Changes in

viral markers with interferon combined with adenine arabinoside. *J. Infect. Dis.* 143, 772–783.

Sedgwick, J.D., Mössner, R., Schwender, S., and ter Meulen, V. (1991). Major histocompatibility complex-expressing nonhematopoietic astroglial cells prime only CD8<sup>+</sup> T lymphocytes: astroglial cells as perpetuators but not initiators of CD4<sup>+</sup> T cell responses in the central nervous system. *J. Exp. Med.* 173, 1235–1246.

Selby, W.S., Janossy, G., Bofill, M., and Jewell, D.P. (1983a). Lymphocyte subpopulations in the human small intestine. The findings in normal mucosa and in the mucosa of patients with adult coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol.* 52, 219–228.

Selby, W.S., Janossy, G., Mason, D.Y., and Jewell, D.P. (1983b). Expression of HLA-DR antigens by colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* 53, 614–618.

Shalapour, S., Deiser, K., Kühn, A.A., Glauben, R., Krug, S.M., Fischer, A., Sercan, O., Chappaz, S., Bereswill, S., Heimesaat, M.M., et al. (2012). Interleukin-7 links T lymphocyte and intestinal epithelial cell homeostasis. *PloS One* 7, e31939.

Shanahan, F., Brogan, M., and Targan, S. (1987). Human mucosal cytotoxic effector cells. *Gastroenterology* 92, 1951–1957.

Sharde (1995). *Blood*.

Sharon, P., Ligumsky, M., Rachmilewitz, D., and Zor, U. (1978). Role of prostaglandins in ulcerative colitis. Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine. *Gastroenterology* 75, 638–640.

Shirazi-Beechey, S.P., Moran, A.W., Batchelor, D.J., Daly, K., and Al-Rammahi, M. (2011). Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport. *Proc. Nutr. Soc.* 70, 185–193.

Shorter, R.G., Cardoza, M., Huizenga, K.A., ReMine, S.G., and Spencer, R.J. (1969a). Further studies of in vitro cytotoxicity of lymphocytes for colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 57, 30–35.

Shorter, R.G., Cardoza, M., Spencer, R.J., and Huizenga, K.A. (1969b). Further Studies of in Vitro Cytotoxicity of Lymphocytes from Patients with Ulcerative and Granulomatous Colitis for Allogeneic Colonic Epithelial Cells, Including the Effects of Colectomy. *Gastroenterology* 56, 304–309.

Shorter, R.G., McGill, D.B., and Bahn, R.C. (1984). Cytotoxicity of mononuclear cells for autologous colonic epithelial cells in colonic diseases. *Gastroenterology* 86, 13–22.

Shrikant, P., and Benveniste, E.N. (1996). The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 157, 1819–1822.

Sigalet, D.L., Wallace, L.E., Holst, J.J., Martin, G.R., Kaji, T., Tanaka, H., and Sharkey, K.A. (2007). Enteric neural pathways mediate the anti-inflammatory actions of glucagon-like peptide 2. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G211–G221.

- Simonetta, F., Gestermann, N., Martinet, K.Z., Boniotto, M., Tissières, P., Seddon, B., and Bourgeois, C. (2012). Interleukin-7 Influences FOXP3+CD4+ Regulatory T Cells Peripheral Homeostasis. *PLoS ONE* 7, e36596.
- Sjövall, H., Abrahamsson, H., Westlander, G., Gillberg, R., Redfors, S., Jodal, M., and Lundgren, O. (1986). Intestinal fluid and electrolyte transport in man during reduced circulating blood volume. *Gut* 27, 913–918.
- Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638–647.
- Sollid, L.M., Kvale, D., Brandtzaeg, P., Markussen, G., and Thorsby, E. (1987). Interferon-gamma enhances expression of secretory component, the epithelial receptor for polymeric immunoglobulins. *J. Immunol. Baltim. Md* 138, 4303–4306.
- Soltis, R.D., Hasz, D., Morris, M.J., and Wilson, I.D. (1979). Evidence against the presence of circulating immune complexes in chronic inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 76, 1380–1385.
- Soos, J.M., Morrow, J., Ashley, T.A., Szente, B.E., Bikoff, E.K., and Zamvil, S.S. (1998). Astrocytes express elements of the class II endocytic pathway and process central nervous system autoantigen for presentation to encephalitogenic T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 161, 5959–5966.
- Spencer, N.J., and Smith, T.K. (2004). Mechanosensory S-neurons rather than AH-neurons appear to generate a rhythmic motor pattern in guinea-pig distal colon. *J. Physiol.* 558, 577–596.
- Spencer, J., Isaacson, P.G., Diss, T.C., and MacDonald, T.T. (1989). Expression of disulfide-linked and non-disulfide-linked forms of the T cell receptor gamma/delta heterodimer in human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 19, 1335–1338.
- Spencer, N.J., Dickson, E.J., Hennig, G.W., and Smith, T.K. (2006). Sensory elements within the circular muscle are essential for mechanotransduction of ongoing peristaltic reflex activity in guinea-pig distal colon. *J. Physiol.* 576, 519–531.
- Sprang, S. R. & Bazan, J. F. (1993). Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement. *Curr. Biol.*
- Steinkamp, M., Geerling, I., Seufferlein, T., von Boyen, G., Egger, B., Grossmann, J., Ludwig, L., Adler, G., and Reinshagen, M. (2003). Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 124, 1748–1757.
- Steinkamp, M., Gundel, H., Schulte, N., Spaniol, U., Pflueger, C., Zizer, E., and von Boyen, G.B.T. (2012). GDNF protects enteric glia from apoptosis: evidence for an autocrine loop. *BMC Gastroenterol.* 12, 6.
- Sternini, C., Anselmi, L., and Rozengurt, E. (2008). Enteroendocrine cells: a site of “taste” in gastrointestinal chemosensing. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 15, 73–78.

- Stevens, R., Oliver, M., Brogan, M., Heiserodt, J., and Targan, S. (1985). Defective generation of tetanus-specific antibody-producing B cells after in vivo immunization of Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Gastroenterology* 88, 1860–1866.
- Stoffels, B., Hupa, K.J., Snoek, S.A., van Bree, S., Stein, K., Schwandt, T., Vilz, T.O., Lysson, M., Veer, C.V., Kummer, M.P., et al. (2014). Postoperative ileus involves interleukin-1 receptor signaling in enteric glia. *Gastroenterology* 146, 176–187.e1.
- Stoolman, L.M. (1989). Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell* 56, 907–910.
- Strominger, J.L. (1989). Developmental biology of T cell receptors. *Science* 244, 943–950.
- Suda, T., Murray, R., Guidos, C., and Zlotnik, A. (1990). Growth-promoting activity of IL-1 alpha, IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in combination with IL-2, IL-4, or IL-7 on murine thymocytes. Differential effects on CD4/CD8 subsets and on CD3+/CD3- double-negative thymocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 144, 3039–3045.
- Swenson, O. (2002). Hirschsprung's disease: a review. *Pediatrics* 109, 914–918.
- Takahashi, F., and Das, K.M. (1985). Isolation and characterization of a colonic autoantigen specifically recognized by colon tissue-bound immunoglobulin G from idiopathic ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* 76, 311–318.
- Takahashi, F., Shah, H.S., Wise, L.S., and Das, K.M. (1990). Circulating antibodies against human colonic extract enriched with a 40 kDa protein in patients with ulcerative colitis. *Gut* 31, 1016–1020.
- Takeshita, T., Asao, H., Ohtani, K., Ishii, N., Kumaki, S., Tanaka, N., Munakata, H., Nakamura, M., and Sugamura, K. (1992). Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science* 257, 379–382.
- Ten Hove, T., The Olle, F., Berkhout, M., Bruggeman, J.P., Vyth-Dreese, F.A., Slors, J.F.M., Van Deventer, S.J.H., and Te Velde, A.A. (2004). Expression of CD45RB functionally distinguishes intestinal T lymphocytes in inflammatory bowel disease. *J. Leukoc. Biol.* 75, 1010–1015.
- Theis, M., and Giaume, C. (2012). Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res.* 1487, 88–98.
- Thomas, E.A., and Bornstein, J.C. (2003). Inhibitory cotransmission or after-hyperpolarizing potentials can regulate firing in recurrent networks with excitatory metabotropic transmission. *Neuroscience* 120, 333–351.
- Timmermans, J.P., Adriaensen, D., Cornelissen, W., and Scheuermann, D.W. (1997a). Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 118, 331–340.
- Timmermans, J.P., Adriaensen, D., Cornelissen, W., and Scheuermann, D.W. (1997b). Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous

system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* *118*, 331–340.

Totsuka, T., Kanai, T., Nemoto, Y., Makita, S., Okamoto, R., Tsuchiya, K., and Watanabe, M. (2007a). IL-7 Is essential for the development and the persistence of chronic colitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 4737–4748.

Totsuka, T., Kanai, T., Nemoto, Y., Makita, S., Okamoto, R., Tsuchiya, K., and Watanabe, M. (2007b). IL-7 Is essential for the development and the persistence of chronic colitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 4737–4748.

Totsuka, T., Kanai, T., Nemoto, Y., Makita, S., Okamoto, R., Tsuchiya, K., and Watanabe, M. (2007c). IL-7 Is Essential for the Development and the Persistence of Chronic Colitis. *J. Immunol.* *178*, 4737–4748.

Toumi, F., Neunlist, M., Cassagnau, E., Parois, S., Laboisse, C.L., Galmiche, J.-P., and Jarry, A. (2003). Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *15*, 239–242.

Trejdosiewicz, L.K., Smart, C.J., Oakes, D.J., Howdle, P.D., Malizia, G., Campana, D., and Boylston, A.W. (1989). Expression of T-cell receptors TcR1 (gamma/delta) and TcR2 (alpha/beta) in the human intestinal mucosa. *Immunology* *68*, 7–12.

Turco, F., Sarnelli, G., Cirillo, C., Palumbo, I., De Giorgi, F., D'Alessandro, A., Cammarota, M., Giuliano, M., and Cuomo, R. (2014a). Enteroglia-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. *Gut* *63*, 105–115.

Turco, F., Sarnelli, G., Cirillo, C., Palumbo, I., De Giorgi, F., D'Alessandro, A., Cammarota, M., Giuliano, M., and Cuomo, R. (2014b). Enteroglia-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. *Gut* *63*, 105–115.

Uckun, F.M., Tuel-Ahlgren, L., Obuz, V., Smith, R., Dibirdik, I., Hanson, M., Langlie, M.C., and Ledbetter, J.A. (1991a). Interleukin 7 receptor engagement stimulates tyrosine phosphorylation, inositol phospholipid turnover, proliferation, and selective differentiation to the CD4 lineage by human fetal thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 6323–6327.

Uckun, F.M., Dibirdik, I., Smith, R., Tuel-Ahlgren, L., Chandan-Langlie, M., Schieven, G.L., Waddick, K.G., Hanson, M., and Ledbetter, J.A. (1991b). Interleukin 7 receptor ligation stimulates tyrosine phosphorylation, inositol phospholipid turnover, and clonal proliferation of human B-cell precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 3589–3593.

Uhlig, H.H., Schwerd, T., Koletzko, S., Shah, N., Kammermeier, J., Elkadri, A., Ouahed, J., Wilson, D.C., Travis, S.P., Turner, D., et al. (2014). The Diagnostic Approach to Monogenic Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* *147*, 990–1007.e3.

Vallance, B.A., Blennerhassett, P.A., and Collins, S.M. (1997). Increased intestinal muscle contractility and worm expulsion in nematode-infected mice. *Am. J. Physiol.* *272*, G321–G327.

Van De Wiele, C.J., Marino, J.H., Murray, B.W., Vo, S.S., Whetsell, M.E., and Teague, T.K. (2004). Thymocytes between the beta-selection and positive selection checkpoints are

nonresponsive to IL-7 as assessed by STAT-5 phosphorylation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *172*, 4235–4244.

Van Landeghem, L., Chevalier, J., Mahé, M.M., Wedel, T., Urvil, P., Derkinderen, P., Savidge, T., and Neunlist, M. (2011). Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *300*, G976–G987.

Ventham, N.T., Kennedy, N.A., Nimmo, E.R., and Satsangi, J. (2013). Beyond Gene Discovery in Inflammatory Bowel Disease: The Emerging Role of Epigenetics. *Gastroenterology* *145*, 293–308.

Viney, J., MacDonald, T.T., and Spencer, J. (1990). Gamma/delta T cells in the gut epithelium. *Gut* *31*, 841–844.

Vudattu, N.K., Magalhaes, I., Hoehn, H., Pan, D., and Maeurer, M.J. (2009). Expression analysis and functional activity of interleukin-7 splice variants. *Genes Immun.* *10*, 132–140.

Waldmann, T.A. (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 595–601.

Walter, G.C., Phillips, R.J., Baronowsky, E.A., and Powley, T.L. (2009). Versatile, high-resolution anterograde labeling of vagal efferent projections with dextran amines. *J. Neurosci. Methods* *178*, 1–9.

Wang, L., Shi, J., van Ginkel, F.W., Lan, L., Niemeyer, G., Martin, D.R., Snyder, E.Y., and Cox, N.R. (2009). Neural stem/progenitor cells modulate immune responses by suppressing T lymphocytes with nitric oxide and prostaglandin E2. *Exp. Neurol.* *216*, 177–183.

Ward, S.M. (2000). Interstitial cells of Cajal in enteric neurotransmission. *Gut* *47 Suppl 4*, iv40–iv43; discussion iv52.

Watanabe, M., Ueno, Y., Yajima, T., Iwao, Y., Tsuchiya, M., Ishikawa, H., Aiso, S., Hibi, T., and Ishii, H. (1995). Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J. Clin. Invest.* *95*, 2945–2953.

Watanabe, M., Watanabe, N., Iwao, Y., Ogata, H., Kanai, T., Ueno, Y., Tsuchiya, M., Ishii, H., Aiso, S., Habu, S., et al. (1997). The serum factor from patients with ulcerative colitis that induces T cell proliferation in the mouse thymus is interleukin-7. *J. Clin. Immunol.* *17*, 282–292.

Watanabe, M., Ueno, Y., Yajima, T., Okamoto, S., Hayashi, T., Yamazaki, M., Iwao, Y., Ishii, H., Habu, S., Uehira, M., et al. (1998). Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J. Exp. Med.* *187*, 389–402.

Wedel, T., Roblick, U., Gleiss, J., Schiedeck, T., Bruch, H.P., Kühnel, W., and Krammer, H.J. (1999). Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus. *Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.* *181*, 327–337.

- Weidner, N., and Austen, K.F. (1990). Evidence for morphologic diversity of human mast cells. An ultrastructural study of mast cells from multiple body sites. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 63, 63–72.
- Weissman, A.M., Baniyash, M., Hou, D., Samelson, L.E., Burgess, W.H., and Klausner, R.D. (1988). Molecular cloning of the zeta chain of the T cell antigen receptor. *Science* 239, 1018–1021.
- Williams, R.C., and Gibbons, R.J. (1972). Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science* 177, 697–699.
- Willis, C.R., Seamons, A., Maxwell, J., Treuting, P.M., Nelson, L., Chen, G., Phelps, S., Smith, C.L., Brabb, T., Iritani, B.M., et al. (2012). Interleukin-7 receptor blockade suppresses adaptive and innate inflammatory responses in experimental colitis. *J Inflamm Lond* 9, 39.
- Wingate, D.L. (1981). Backwards and forwards with the migrating complex. *Dig. Dis. Sci.* 26, 641–666.
- Wood, J.D. (1999a). Neurotransmission at the interface of sympathetic and enteric divisions of the autonomic nervous system. *Chin. J. Physiol.* 42, 201–210.
- Wood, J.D. (1999b). Neurotransmission at the interface of sympathetic and enteric divisions of the autonomic nervous system. *Chin. J. Physiol.* 42, 201–210.
- Wood, J.D., and Mayer, C.J. (1978). Intracellular study of electrical activity of Auerbach's plexus in guinea-pig small intestine. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* 374, 265–275.
- Wright, E.M., and Loo, D.D.F. (2000). Coupling between Na<sup>+</sup>, Sugar, and Water Transport across the Intestine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 915, 54–66.
- Xavier, R.J., and Podolsky, D.K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448, 427–434.
- Xavier, R.J., and Rioux, J.D. (2008). Genome-wide association studies: a new window into immune-mediated diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 631–643.
- Yamada, K., Shimaoka, M., Nagayama, K., Hiroi, T., Kiyono, H., and Honda, T. (1997). Bacterial invasion induces interleukin-7 receptor expression in colonic epithelial cell line, T84. *Eur. J. Immunol.* 27, 3456–3460.
- Yamazaki, M., Yajima, T., Tanabe, M., Fukui, K., Okada, E., Okamoto, R., Oshima, S., Nakamura, T., Kanai, T., Uehira, M., et al. (2003). Mucosal T cells expressing high levels of IL-7 receptor are potential targets for treatment of chronic colitis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 171, 1556–1563.
- Yi, J.M., and Kim, T.O. (2015). Epigenetic Alterations in Inflammatory Bowel Disease and Cancer. *Intest. Res.* 13, 112–121.
- Young, R.L. (2011). Sensing via intestinal sweet taste pathways. *Front. Neurosci.* 5, 23.
- Young, H.M., and Newgreen, D. (2001). Enteric neural crest-derived cells: origin, identification, migration, and differentiation. *Anat. Rec.* 262, 1–15.

- Young, H.M., Bergner, A.J., and Müller, T. (2003a). Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J. Comp. Neurol.* *456*, 1–11.
- Young, H.M., Bergner, A.J., and Müller, T. (2003b). Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J. Comp. Neurol.* *456*, 1–11.
- Yu, Y.-B., and Li, Y.-Q. (2014). Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. *World J. Gastroenterol.* *20*, 11273–11280.
- Yu, Q., Park, J.-H., Doan, L.L., Erman, B., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2006). Cytokine signal transduction is suppressed in preselection double-positive thymocytes and restored by positive selection. *J. Exp. Med.* *203*, 165–175.
- Zeitz, M., Schieferdecker, H.L., Ullrich, R., Jahn, H.U., James, S.P., and Riecken, E.O. (1991). Phenotype and function of lamina propria T lymphocytes. *Immunol. Res.* *10*, 199–206.
- Zhang, Y.-Z., and Li, Y.-Y. (2014). Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* *20*, 91–99.
- Zhang, D.K., He, F.Q., Li, T.K., Pang, X.H., Cui, D.J., Xie, Q., Huang, X.L., and Gan, H.T. (2010). Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J. Pathol.* *222*, 213–222.
- (10:17:06 UTC). 1991 peters, palay, webster. the fine structure of the nervous system.
- (1983). AIDS with *Mycobacterium avium-intracellulare* lesions resembling those of Whipple's disease. *N. Engl. J. Med.* *309*, 1323–1325.
- (1989). Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J. Exp. Med.* *169*, 1277–1294.
- (1991). The V beta repertoire of mouse gut homodimeric alpha CD8+ intraepithelial T cell receptor alpha/beta + lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation. *J. Exp. Med.* *173*, 483–486.
- (2007a). Frontmatter. In *The Enteric Nervous System*, J.B.F. FAA, ed. (Blackwell Publishing), pp. i – xiii.
- (2007b). Frontmatter. In *The Enteric Nervous System*, J.B.F. FAA, ed. (Blackwell Publishing), pp. i – xiii.
- (2007c). Frontmatter. In *The Enteric Nervous System*, J.B.F. FAA, ed. (Blackwell Publishing), pp. i – xiii.
- (2012). *Hépatogastro- & Oncologie Digestive*.

# **PARTICIPATION À DES TRAVAUX TIERS**

**Article 4 : Le développement post-natal du réseau glial myentérique et sa modulation par le butyrate (soumis)**

Cossais François, Boudaud Marie, Kermarrec Laetitia, Chevalier Julien, Tony Durand, Isabelle Neveu, Philippe Naveilhan and Neunlist Michel\*

1     **Postnatal development of the myenteric glial network**  
2                     **and its modulation by butyrate.**

3     **Running Head:** Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

4     **Cossais François**<sup>1,4</sup>, **Boudaud Marie**<sup>1,4</sup>, **Kermarrec Laetitia**<sup>1,4</sup>, **Chevalier Julien**<sup>1,4</sup>,  
5     **Tony Durand**<sup>1,4</sup>, **Isabelle Neveu**<sup>1,4</sup>, **Philippe Naveilhan**<sup>1,4</sup> and **Neunlist Michel\***<sup>1,4</sup>.  
6

7     **Author contributions**

8     F.C., P.N. and M.N. conception and design of the study; F.C., M.B., K.L., J.C. and T.D.  
9     carried out the experiments; F.C., M.B., K.L., T.D. and P.N. analyzed data. F.C., I.N.  
10    P.N. and M.N. interpreted the results of experiments; F.C. prepared the figures; F.C.,  
11    I.N. P.N. and M.N. drafted, edited and revised the manuscript; All authors approved the  
12    final manuscript.

13    Affiliation

14

15    1 INSERM, U913, Nantes, F-44093, France

16    2 Université Nantes, Nantes, F-44093, France

17    3 CHU Nantes, Hôtel Dieu, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, F-44093, France

18    4 Centre de Recherche en Nutrition Humaine, Nantes, F-44093, France

19

20    **\*Corresponding author:**

21    Dr. Michel NEUNLIST

22    UMR INSERM U913

23    School of Medicine University of Nantes

24    1, rue Gaston Veil

25    44093 NANTES

26    Tel: +33 (0)2 40 41 29 50

27    Email : Michel.Neunlist@univ-nantes.fr

28

29

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

30 **Abstract**

31 The postnatal period is crucial for the development of gastrointestinal (GI) functions.  
32 The enteric nervous system is a key regulator of GI functions and increasing evidences  
33 indicate that 1) postnatal maturation of enteric neurons has an impact on the  
34 development of GI functions, and 2) microbiota-derived short-chain fatty acid can be  
35 involved in this maturation. Although enteric glial cells (EGC) are central regulators of  
36 GI functions, the postnatal evolution of their phenotype remains poorly defined. So, we  
37 characterized the postnatal evolution of EGC phenotype in the colon of rat pups and  
38 studied the impact of short-chain fatty acids on their maturation. We showed an  
39 increased expression of the glial markers, GFAP and S100 $\beta$ , during the first postnatal  
40 weeks. As demonstrated by immunohistochemistry, structured myenteric glial network  
41 was only observed at 36 days in the colon of rats. Butyrate inhibited EGC proliferation  
42 *in vivo* and *in vitro* but had no impact on glial marker expression. These results indicate  
43 that the EGC myenteric network continues to develop after birth, and luminal factors  
44 endogenously produced in the colon like butyrate may affect this development.

45 **Keywords:** enteric glial cells, butyrate, maturation, HDAC, MCT.

46 **Abbreviations list**

47 CNS, central nervous system; EGC, enteric glial cell; ENS, enteric nervous system;  
48 GPR, G-protein coupled receptor; GFAP, glial fibrillary acidic protein; HDAC, histone  
49 deacetylase; MCT, Monocarboxylate transporters; SCFA, short-chain fatty acids; TSA,  
50 trichostatin.

51

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

52

53 **Introduction**

54       The postnatal period is a critical time window during which major adaptive  
55 processes occur. Shortly after birth, the gut undergoes various physiological  
56 changes important for the acquisition of a functional gastrointestinal tract that  
57 guarantees optimal absorption of nutrients, efficient protection against pathogens and a  
58 good transit of food and secretions. These adaptive processes include modifications of  
59 intestinal permeability (25, 26) but also changes in motility patterns. Indeed, the first  
60 gastrointestinal motility patterns in the fetal mice do not require enteric neurons for their  
61 generation and neuronal control of the small intestine begins shortly before birth (26,  
62 28, 33). Changes in intestinal motility are associated with the development and  
63 maturation of the enteric nervous system and we recently showed that the postnatal  
64 development of intestinal motility in rats is related to the concomitant increase in the  
65 proportion of enteric cholinergic neurons (29, 33). Whereas neuronal genesis and  
66 maturation in the gastrointestinal tract have been quite well described, little is known  
67 about the postnatal development of the enteric glial cells (EGC). These glial cells are  
68 present in the myenteric and submucosal ganglia, along the nerve fibers that innerve the  
69 gut and in all the layers of the gut wall including muscle or epithelium (23). Like central  
70 astrocytes, they have an important role in modulating the neuronal circuitry (13, 23) and  
71 express glial markers such as glial fibrillary acid protein (GFAP) and the calcium-  
72 binding protein S100 $\beta$ . Evidence collected during the past ten years suggest a larger role  
73 of the EGC in the gastrointestinal tract. This includes neuroprotection (12), modulation  
74 of the enteric neuronal phenotype (1), regulation of the intestinal motility (5, 19), direct  
75 control of the epithelial cell properties and regulation of the intestinal epithelial barrier

3

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

76 functions (2, 22). These pleiotropic functions have been suggested to contribute to ENS  
77 and gut homeostasis (23).

78 As enteric neurons, the EGC arise from neural crest cell-derived progenitors  
79 which have entirely colonized the gut by embryonic day 14 (E14) in the mouse and by  
80 E16.5 in the rat (35). The differentiation of enteric neurons usually precedes the  
81 differentiation of EGC with an expression of the pan-neuronal protein, the ubiquitin  
82 hydrolase (HuC/D) starting at E12.5, whereas glial markers like S100 $\beta$  appear at E14.5  
83 and GFAP at E16.5 in the mouse duodenum (34). To define the subsequent events  
84 leading to the formation of mature glial network in the intestine, we decided to analyze  
85 the postnatal evolution of the myenteric glial network in the colon of rat pups. We also  
86 investigated the impact of extrinsic factors on the proliferation and differentiation of  
87 EGC as recent data suggested that environmental factors have an impact on the  
88 postnatal development of the ENS (9, 26, 32). Among those, luminal factors  
89 endogenously produced in the colon like microbiota-derived short-chain fatty acids  
90 (SCFA), was suggested to have a critical role. Resulting from the bacterial fermentation  
91 of dietary fiber and resistant starch, their concentration after birth progressively  
92 increases in the colon of human and rat (4, 24). In particular, we focused our work on  
93 the impact of butyrate as this SCFA was shown to enhance cholinergic phenotype of  
94 myenteric neurons and related neuromuscular functions (30, 32).

95 **Material and methods**

96 **Animal models**

97 Experiments were carried out in accordance with the recommendations and  
98 approval of the local Animal Care and Use Committee of Nantes (France). Primiparous  
99 timed-pregnant Sprague-Dawley female rats (Janvier Laboratories, Le Genest Saint Isle,  
100 France) were obtained at 13-14 days of gestation. Rats were accustomed to laboratory  
101 conditions for one week before delivery and individually housed in cages on a 12h:12h  
102 light/dark cycle with free access to water and food (UAR, Epinay-sur-orge, France).  
103 Mothers and their pups (10-16 per litters) were kept in the same conditions during the  
104 whole experiments. Day of birth was considered to be postnatal day 0 (P0). Rat pups  
105 aged from P1 to P14 were sacrificed by decapitation and by cervical dislocation at later  
106 stages.

107 **Administration of butyrate enemas**

108 Enemas of saline (NaCl 0.9 %, control) and sodium butyrate (2.5 mM, Sigma,  
109 Saint Quentin Fallavier, France) were performed daily in rat pups between 5 and 21  
110 days of life, as described earlier. For short term study, enemas of saline (NaCl 0.9 %,  
111 control) and sodium butyrate (2.5 mM, 10 mM and 40 mM) were performed at P6.  
112 Briefly, a 24-gauge cannula (Fine Science Tools, Vancouver, Canada) was introduced in  
113 the rectum up to 5 mm, and a volume of 20  $\mu$ l/g of animal weight was injected. Enemas  
114 were injected slowly (10 s per enema), the cannula was then removed, and pups were  
115 maintained muzzle down during 20 s.

116 **Enteric glial cell line**

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

117 JUG-2 EGC cell line (2) was used. EGC were cultured in Dulbecco's modified  
118 Eagle's medium (DMEM 4.5 g.l<sup>-1</sup> glucose; Life Technologies, Cergy-Pontoise, France)  
119 supplemented with 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Biowest, Nuaille,  
120 France), 50 IU.ml<sup>-1</sup> penicillin and 50 µg.ml<sup>-1</sup> streptomycin (Life Technologies). EGC  
121 were seeded at a density of 5000 cells per well in 96 well plates (Corning, Avon,  
122 France). The day after seeding, butyrate, acetate or propionate (500 µM, Sigma) or  
123 trichostatin (TSA, 0.25 µM, Sigma) was added to the culture medium and EGC were  
124 cultured for seven days (time at which control cells usually reached confluence).

125 **EGC primary cultures**

126 EGC primary cultures were derived from the colons of P14 and P36 rats. Briefly,  
127 longitudinal muscle/myenteric plexus associated with circular muscle layer were  
128 scarified with a scalpel and removed from the underlying mucosa with a pair of fine  
129 dissection forceps. The specimens were collected in GentleMACS tubes C (Miltenyi  
130 Biotec, Paris, France) containing 5 ml of a complete DMEM/F12 medium constituted of  
131 DMEM/F12 (1:1) supplemented with 10 % heat-inactivated FCS, 100 IU.ml<sup>-1</sup> penicillin,  
132 100 µg.ml<sup>-1</sup> streptomycin, 1.1 µg.ml<sup>-1</sup> amphotericin B, 20 µg.ml<sup>-1</sup> gentamicin, 6 mM  
133 glutamine, and 2.1 g.l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> (all from Life Technologies). 250 µl protease (stock  
134 solution: 5 g.l<sup>-1</sup>), 250 µl collagenase (stock solution: 20 g.l<sup>-1</sup>) and 400 µl bovine serum  
135 albumin (BSA; stock solution: 50 g.l<sup>-1</sup>) (Sigma) were added to each tube. For P36 EGC,  
136 the tubes were placed in a GentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec) and a mechanical  
137 dissociation procedure was performed (program m-brain 01-02). Next, the tubes were  
138 incubated under gentle agitation on a rocker at 37°C for 20 min for P36 EGC or 1 h for  
139 P14 EGC. For P36 EGC, an additional dissociation run was performed prior to the  
140 addition of 10 ml of DMEM/F12 to each preparation and centrifugation at 1500 rpm for

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

141 5 min. Pellets were washed once with ice-cold sterile Krebs solution and after  
142 centrifugation, they were resuspended in 10 ml of DMEM/F12 complete medium. The  
143 suspension was then transferred in Petri dishes (Ø 10 cm). For the isolation of ganglia  
144 and interganglionic strands, Petri dishes were placed under an inverted microscope and  
145 individual ganglia were picked up using a pipette fitted with a 200 µl sterile tip. Ten to  
146 20 ganglionic structures were then seeded in gelatin (0.5 % in phosphate buffered saline  
147 (PBS), Sigma) coated 24-well plates and cultured in DMEM/F12 complete medium for  
148 72 h at 37°C in a 5 % CO<sub>2</sub> incubator. The medium was then replaced with complete  
149 DMEM medium (DMEM 4.5 g.l-1glucose, supplemented with 10 % FCS, 2 mM  
150 glutamine, 50 IU.ml<sup>-1</sup> penicillin, 50 µg.ml<sup>-1</sup> streptomycin) and the cultures were  
151 maintained until confluence.

152 **Cell proliferation assay**

153 EGC were harvested with 1 % trypsin-EDTA (Life Technologies) and  
154 homogenized. Cells were counted in a blinded fashion using Malassez slides (VWR  
155 International, Strasbourg, France) and fluorescence-activated cell sorting (BD FACS,  
156 BD Bioscience, Erembodegem, Belgium). Cell death was estimated using Trypan blue  
157 assay and 7-aminoactinomycin D (BD Biosciences) incorporation using FACS analysis.

158 **Cell cycle assay**

159 JUG-2 cells were plated in a 24 well-plate at 50 000 cells per well and cultivated  
160 in complete DMEM medium for 24 hours. Then, the cells were treated or not with 500  
161 µM of butyrate or vehicle for 48 hours. Medium was then removed and, after one wash  
162 with PBS, 30 µL of trypsin were added per well. After 90 seconds of incubation at  
163 37°C, the trypsin reaction was stopped by adding 160 µl of medium containing 10%

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

164 FCS per well and the cells were transferred in a 96 conical-bottomed well plate. Plates  
165 were centrifuged to remove medium and, after one wash with PBS supplemented with  
166 2% FCS and 2 mM EDTA, 100  $\mu$ l of pre-warmed PBS supplemented with 0,1%  
167 saponine were added per well for soft permeabilization on ice for 5 minutes. Then plates  
168 were centrifuged to remove PBS -0,1% saponine and a mix of PBS supplemented with  
169 20  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> Ribonuclease A from bovine pancreas (Sigma-Aldrich) and 10  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>  
170 Propidium Iodure (PI) were added (100  $\mu$ L per well). Thirty minutes after PI treatment,  
171 fluorescence was measured with a LSRII U892 cytometer (BD Biosciences). Data were  
172 analyzed using FlowJo® software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

173 **Immunofluorescence staining**

174 *Cell Cultures.* The cells were fixed for 30 min at room temperature (RT) in 0.1 M  
175 PBS containing 4 % paraformaldehyde (4% PFA), then washed 3 times in PBS prior  
176 immunohistochemical staining. *Tissue preparation.* Segments of proximal (1 cm  
177 adjacent to the cæcum) and distal (1 cm, directly above the segment used in motility  
178 studies) colons were opened along the mesentery, pinned in Sylgard (Dow Corning,  
179 Midland, MI)-coated Petri dish, and fixed for 3 h at RT in 4 % PFA. The whole mounts  
180 of myenteric plexus obtained from the microdissection of mucosa and circular muscle,  
181 were first permeabilized for 3 h at RT with PBS containing 0.1 % sodium azide, 10 %  
182 donkey serum and 0.5 % Triton X-100. Immunostaining were performed by incubation  
183 of the specimens with primary antibodies for 16 h at 4°C, followed by three times  
184 washed in PBS. The nuclei were stained using DAPI (Sigma) and specimens were then  
185 incubated with the secondary antibodies for one hour. Primary antibodies were goat  
186 anti-Sox10 (1:200; sc-1732; Santa Cruz, MA), mouse anti-HuC/D (1:200; A21275; Life  
187 Technologies), rabbit anti-GFAP (1:1000; Z0334; Dakocytomation, Glostrup,

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

188 Denmark) and rabbit anti-S100 $\beta$  (1:10000; Z0311; Dako), rabbit anti-Ki67  
189 (1:500; Ab66155; Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-caspase3 (1:500; C8487;  
190 Sigma), rabbit anti-acetyl H3k9 (1:1000; Ab10812; Abcam). Secondary antibodies were  
191 anti-mouse Cy3 (carboxymethylindocyanine) (1:500; Jackson ImmunoResearch,  
192 Suffolk, UK), anti-goat Cy3 (1:500; Jackson ImmunoResearch), anti-rabbit FP488  
193 (1:200; Interchim). Specimens were viewed under an Olympus IX 50 fluorescence  
194 microscope fitted with adequate filter cubes. Pictures were acquired with a digital  
195 camera (model DP 71; Olympus, Rungis, France) coupled to the microscope. The  
196 numbers of Hu, Sox10 and Ki67 immunoreactive (IR) cells were counted in at least 20  
197 ganglia per condition.

198 **Calcium signaling**

199 The impact of ATP on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration was analyzed in EGC  
200 primary cultures at passage two. Twenty-four hours after seeding, cultures of EGC were  
201 washed three times with HBSS. Next, EGC were loaded with fluo-4-AM (final  
202 concentration 0.5  $\mu$ M; stock concentration in DMSO 1 mM, Life Technologies) for one  
203 hour at 37°C. EGC were then washed three more times with HBSS and observed using  
204 an epifluorescence microscope (Olympus IX 50). Five images from 5-6 independent  
205 cultures for each stages (P14 or P36) were acquired at 0.5 frame per second with a  
206 digital camera (Olympus DP 71) coupled to the microscope, ten seconds before and  
207 during 90 seconds after the addition of 1 mM ATP. Images were acquired under a  
208 magnification objective of 20x as AVI files. Movies were converted in jpeg image  
209 stacks using the VirtualDub software. Signal intensity was further quantified using the  
210 ImageJ software and 1) the variation of the maximum amplitude of the Ca<sup>2+</sup> response  
211 induced by ATP as compared to basal value (expressed in percentage), 2) half

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

212 maximum duration of the ATP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  response and 3) 10 % maximum duration  
213 of the ATP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  response were calculated.

214

215 **Real-time quantitative PCR**

216 Total RNA was extracted from rat colonic biopsies or EGC culture using the  
217 Nucleospin RNA II (Macherey Nagel, Hoerd, France). The cDNA were synthesized  
218 using the SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Saint-Aubin,  
219 France) according to the manufacturer's recommendations. Real-time quantitative PCR  
220 (qPCR) was performed. PCR amplifications were performed using the ABsolute Blue  
221 SYBR green fluorescein kit (ABgene, Courtaboeuf, France) according to the  
222 manufacturer's protocol and run on a MyIQ thermocycler (Biorad, Hercules, CA) or  
223 performed using FastSybr green mastermix kit (Applied Biosystem, California, USA)  
224 and run on a StepOne+ thermocycler (Applied Biosystem, California, USA). Expression  
225 of gene of interest was normalized to the expression of the ribosomal protein S6 gene  
226 (S6) which was measured in parallel as an internal control. Each qPCR reaction  
227 products was directly loaded onto non-denaturing 2 % agarose gels and visualized under  
228 UV transillumination and specificity of the primers was determined by sequencing the  
229 PCR products. The sequences of the primers used are listed in Table 1.

230 Total RNA were extracted from rat colonic biopsies or EGC culture using the  
231 Nucleospin RNA II (Macherey Nagel, Hoerd, France). cDNA were synthesized using  
232 the SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies) according to the  
233 manufacturer's recommendations. Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed.  
234 PCR amplifications were performed using the ABsolute Blue SYBR green fluorescein  
235 kit (ABgene, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol and run on

10

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

236 a MyIQ thermocycler (Biorad, Hercules, CA). Expression of gene of interest was  
237 normalized to the expression of the ribosomal protein S6 gene (S6) which was measured  
238 in parallel as an internal control. Each qPCR reaction products was directly loaded onto  
239 non-denaturing 2 % agarose gels and visualized under UV transillumination and  
240 specificity of the primers was determined by sequencing the PCR products.

241

242 **Western blot**

243 EGC line were harvested in RIPA buffer (Upstate-Millipore) containing 2 mM  
244 orthovanadate, phosphatase inhibitor cocktail II (Roche, Neuilly sur Seine, France) and  
245 a protease inhibitors cocktail (Roche). Tissues were lysed with “Precellys 24” tissue  
246 homogenizer (Bertin technologies, St Quentin-en-Yvelines, France) and proteins were  
247 extracted using the Nucleospin RNA/Prot kit (Macherey Nagel). Equal amounts of  
248 lysate were separated using the Life Technologies NuPage Novex Bis Tris MiniGels  
249 before electrophoretic transfer with the iBlot Dry Blotting System also from Life  
250 Technologies. Membranes were blocked for 1 h at 25°C in Tris-buffered saline (TBS)  
251 (100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5) with 5 % non-fat dry milk or BSA. Membranes  
252 were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies. Bound antibodies were  
253 detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies  
254 (Amersham, Les Ulis, France; diluted 1:5000) and visualized by enhanced  
255 chemiluminescent detection (ECL plus, Amersham). The relevant immunoreactive  
256 bands were quantified with laser-scanning densitometry and analyzed with NIH Image J  
257 software. To allow the comparison between different autoradiographic films, the density  
258 of the bands was expressed as a percentage of the average of controls (untreated).  
259 Antibodies were anti-GFAP (1:1000; Z0334; Dakocytomation), anti-S100 $\beta$  (1:1000;

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

260 Z0311; Dakocytomation), anti-Erk1/2 (#9102; Cell signaling), anti-phospho-Erk1/2  
261 (#9101; Cell signaling) and anti- $\beta$ -actin (1:5000; AC-15; Sigma).

262 **Statistical analysis**

263 Data were expressed as the means  $\pm$  SEM. The significance of differences was  
264 determined using Mann-Whitney U-test to compare two groups or Kruskal-Wallis test  
265 to compare more than two groups, followed by Dunn's multiple-comparison test.  
266 Differences were considered statistically significant for  $P < 0.05$ .

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

267 **Results**

268 **Characterization of myenteric EGC during the postnatal development of the rat**  
269 **colon.**

270 To study the postnatal maturation of EGC, the proximal and distal colons of rat  
271 pups were dissected at P1, P7, P14 and P21, and expression of two glial markers, GFAP  
272 and S100 $\beta$ , were analyzed by qPCR. Quantitative analyses revealed a time-dependent  
273 increase in the expression of both markers and at P36, the levels of GFAP and S100 $\beta$   
274 mRNAs were 9.1 and 5.0 fold higher than at P1, respectively (Table 1 and 2,  
275 respectively, and Fig. 1, A-B). As no significant difference was observed between the  
276 proximal and distal colons (Table 1 and 2), the next analyses were focused on the distal  
277 colon. We showed that the mRNA expression level of Sox10, another EGC marker, was  
278 also increased in the distal colon during the postnatal period, being 19.2 fold higher at  
279 P36 than at P1 (Fig. 1, C).

280 The progressive increase of GFAP and S100 $\beta$  expression during the postnatal  
281 period was confirmed at the protein levels by performing immunohistochemistry on the  
282 myenteric plexus of rat distal colon. At P1, the immunoreactivity against GFAP was  
283 very weak, making it impossible to clearly distinguish the EGC cell bodies. At P7, the  
284 labeling was stronger with the apparition of positive staining along the glial processes.  
285 At later time-point, the GFAP labeling further increased and at P36, a clear network of  
286 GFAP-positive cells were observed in the myenteric plexus (Fig. 1, D-G). Changes in  
287 cell expression were also observed for S100 $\beta$ . At P1, immunoreactivity against the  
288 S100 $\beta$  protein was clearly detected in the myenteric plexus of rat distal colon but the  
289 labeling was restricted to the cell nuclei (Fig. 1, H-K). At later stages such as P21,

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

290 S100 $\beta$  expression extended to the cytoplasm and at P36, immunopositive staining was  
291 mostly localized in the cell body.

292 A comparable evolution was found in primary EGC prepared from P14 and P36  
293 animals. As observed in freshly colons isolated at P14 and P36, S100 $\beta$  mRNA levels  
294 were not significantly different in P14 and P36 EGC, but the levels of GFAP mRNA  
295 was much higher (six-fold) in P36 EGC as compared to P14 EGC (Fig. 2, A and B).  
296 Phenotypic differences between P14 and P36 EGC were confirmed using a functional  
297 test that measures calcium flux in response to ATP. As shown in the figure 2, the  
298 amplitude of ATP-induced Ca<sup>2+</sup> transients was higher in P14 EGC as compared with  
299 P36 EGC (4.6 vs 3.6 A.U. respectively; Fig. 2, C) whereas half maximum or 10 %  
300 maximum duration was smaller (12 vs 15 s at 50 % of maximum intensity, 28 vs 37 s at  
301 10 % respectively; Fig. 2, D-E).

302 **Characterization and proliferation of the Sox10-IR cells in the postnatal myenteric**  
303 **plexus.**

304 The number and the proliferating status of Sox10-immunoreactive (IR) cells were  
305 analyzed in the myenteric plexus of the rat distal colon. At P1, the density was of  
306 25 000 Sox10-IR cells per 1000  $\mu$ m<sup>2</sup> but it progressively decreased to 12 000 Sox10-IR  
307 cells per 1000  $\mu$ m<sup>2</sup> at P36 (Fig. 3, A-D, N). Just after birth, only 78 % of the Sox10-IR  
308 cells were S100 $\beta$ -IR, however, this proportion increased up to 98 % at P7 (p=0.0002,  
309 n=8; Data not shown). To further characterize the Sox10-IR cells, double-  
310 immunohistochemical analyses were performed with antibodies directed against Sox10  
311 and HuC/D, a neuronal marker. No Hu-IR cells were Sox10-IR (Fig. 3, A-D), but we  
312 observed that at P1, Sox10-IR cells were distributed in close proximity to Hu-IR cells

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

313 organized as continuous rows (Fig. 3, A). At P7, the majority of Sox10-IR cells were  
314 located close to neurons which started to be organized as individual ganglia. Few  
315 Sox10-IR cells were dispersed between these ganglia (Fig. 3, B-D). As indicated in the  
316 figure 3, the ratio of Sox10-IR cells to Hu-IR cells increased progressively over time  
317 from 0.8 to 1.4 becoming statistically significant at P36 (Fig.3, M). To evaluate the  
318 proliferative activity of the Sox10-IR cells in the myenteric plexus during the first  
319 postnatal weeks, Sox10/Ki67 co-staining was performed (Fig. 3, E-L). At P1, 12% of  
320 Sox10-IR cells were Ki67-IR. This percentage was reduced to 2 % at P36 (Fig. 3, E-L  
321 and O). No Hu-IR cells were Ki67-IR, and no Caspase3-IR was observed in Sox10-IR  
322 cells at all stages analyzed (data not shown).

323 **Impact of butyrate on the proliferative activity and maturation of EGC in vivo.**

324 To evaluate the impact of SCFA administration on the proliferative activity and  
325 maturation of EGC, P5 rat pups were treated daily with 2.5 mM butyrate enemas and  
326 their myenteric plexus were collected at P7, P21 and P36. A three-fold decrease in the  
327 percentage of Sox10/Ki67 double positive cells was observed as early as P7 indicating  
328 an impact of the butyrate treatment on the proliferative activity of Sox10-IR cells (Fig.  
329 4, A-E). The daily administration of 2.5 mM butyrate in the colons from P5 did not  
330 modify the mRNA levels of GFAP and S100 $\beta$  at any time point studied (Table 1 and 2).  
331 To determine whether an acute administration of butyrate modulates the expression of  
332 these two glial markers, butyrate enemas were administrated to P6 rat pups at a  
333 concentration of 0, 2.5, 10 or 40 mM, and their effects were analyzed 24h later.  
334 Quantitative PCR and western blot analyses indicated no significant change in the  
335 expression of GFAP and S100 $\beta$  up to 40 mM of butyrate (Fig. 4, F-I).

336 **EGC respond to butyrate.**

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

337 To investigate the possibility of a direct effect of butyrate on EGC, expression of  
338 its receptors and transporters was analyzed in EGC cell line. Reverse Transcriptase-PCR  
339 analyses did not detect MTC4 and GPR43, but EGC clearly expressed the transporters  
340 MCT1 and MCT2, and the receptors, GPR41 and GPR109A (Fig. 5, A). As ERK  
341 phosphorylation is a major signaling pathway for SCFA receptors, the functionality of  
342 these receptors was tested by treating the EGC with 100  $\mu$ m, 500  $\mu$ m and 10 mM of  
343 butyrate for 5 min. Then, cell lysates were subjected to immunoblot analysis with an  
344 antibody that recognizes the dually but not the singly phosphorylated TEY motif of ERK1 and  
345 ERK2, which corresponds to the active form of ERK (P-ERK1/2). Butyrate strongly induced  
346 ERK phosphorylation as demonstrated by the presence of two dark bands in the treated  
347 samples while very faint bands were observed in control EGC (Fig. 5, B). All tested  
348 doses were effective on ERK phosphorylation, without affecting the signals  
349 corresponding to ERK1/2. MCT transporters increase the intracellular availability of  
350 butyrate, which in turn may control gene expression by inhibiting HDAC. To study such  
351 a possible mechanism in EGC, histone acetylation was analyzed by  
352 immunocytochemistry with an antibody directed against acetylated histone H3  
353 at lysine 9 (ac H3K9). Positive staining was observed in control and treated EGC, but  
354 nuclear mean fluorescence intensity was 37.5% higher after 24h of treatment with  
355 butyrate (Fig. 5, C-D).

356 **Butyrate inhibits the proliferation of EGC *in vitro*.**

357 To control that the decreased proliferative activity of Sox-10-IR cells *in vivo* was  
358 a direct effect of butyrate administration, cultures of EGC were treated with 500  $\mu$ m of  
359 the SCFA for seven days. Cell counting revealed a 61% decrease in the number of cells  
360 in the treated cultures as compared to control ones (Fig.6, L). A similar reduction was

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

361 obtained using trichostatin (TSA), an HDAC inhibitor. The decrease in cell number was  
362 associated with a lower number of proliferating cells as determined by Ki-67  
363 immunocytochemistry. Indeed, the percentage of Ki67-IR EGC was 67 % lower in the  
364 butyrate-treated cultures as compared to control ones (Fig. 6, A-D and K). This effect  
365 was specific as other short chain fatty acids, such as propionate or acetate, did not affect  
366 the number of EGC or the percentage of Ki67-IR cells (Fig. 6, E-H, K-L). On the other  
367 hand, incorporation of 7-aminoactinomycin D (7-AAD), a cell death marker, indicated  
368 no significant variation in the proportion of living cells between butyrate and non-  
369 treated EGC (95 % vs 98 % respectively, data not shown). The effect of butyrate on  
370 EGC was further investigated by analyzing its impact on cell cycle progression. As  
371 presented in the figure 6 (M-O), 48 hours of treatment with butyrate led to an increased  
372 accumulation of cells in G1-phase which was accompanied by a decreased number of  
373 EGC in S-phase. The number of EGC in G2-phase remained unchanged (Fig. 6, M, N  
374 and Q).

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

375 **Discussion**

376 In the present study, we characterized the postnatal development of the myenteric  
377 colonic glial network in the rat pups. Using Sox10 and Ki67 as markers, we showed a  
378 progressive reduction in the number of EGC or progenitors that proliferate in the distal  
379 colonic myenteric plexus of rat pups. Although Sox10 and S100 $\beta$  expression may vary  
380 in EGC, these markers are generally co-expressed in myenteric EGC and represent most  
381 reliable markers for these cell types (7, 27). At P1, 22% of the Sox10-IR cells were  
382 negative for the EGC marker, S100 $\beta$ , raising the possibility that not only EGC  
383 proliferate around birth but also glial progenitors. At later stages, the proliferative  
384 Sox10-IR cells were most probably EGC as 98% of these cells were also positive for  
385 S100 $\beta$  from P7. Proliferation of EGC under basal conditions was recently described in  
386 rodents (8, 16). *The rate of proliferation that we observed at five weeks is consistent*  
387 *with the one described in adult mice* (16).

388 Decreased proliferation in the colonic myenteric plexus during the postnatal  
389 development goes along with increased expression of the glial markers. At P1, S100 $\beta$   
390 and GFAP were hardly detected but their expression strongly increased during the first  
391 post-natal weeks. At P36, the glial markers are strongly expressed in the glial processes,  
392 revealing a glial network similar to those described in adult rodents. These results are  
393 consistent with data obtained in mouse where colonic expression of these markers was  
394 not observed before P0 (34). They also fit well with a recent elegant study showing that  
395 a specific population of EGC within the mucosa similarly develops after birth in a  
396 microbiota-dependent manner (17). *Postnatal increase of GFAP was also observed in*  
397 *the human small bowel, indicating that EGC postnatal maturation is a conserved*  
398 *feature in mammals* (18). The changes in glial marker expression were associated with

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

399 particular subcellular distribution. Around birth, the S100 $\beta$  protein was mainly detected  
400 in the nucleus. This feature is of interest as nuclear accumulation of S100 $\beta$  in  
401 oligodendrocyte progenitors has been correlated with cell cycle withdrawal and  
402 morphological differentiation (10). In addition, S100 $\beta$  was demonstrated to interact and  
403 activate p53, an essential regulator of cell proliferation (6). Taken together, this  
404 information suggests an active role of this calcium-binding protein in the development  
405 of the enteric glial network.

406 The subcellular distribution of GFAP in EGC also changes during the postnatal  
407 development. The increased GFAP expression parallels the EGC morphological  
408 changes and at P36, we observe a glial network with strong GFAP staining in the glial  
409 processes. A potential implication of GFAP in the glial modeling remains to be  
410 determined but here we show that primary EGC which have conserved the age-related  
411 changes in GFAP expression, present functional differences. Indeed, the long-lasting  
412 ATP-induced Ca<sup>2+</sup> responses in P36 EGC as compared to P14-derived cells, is even  
413 longer in adult primary EGC. These observations argue in favor of an age-dependent  
414 functional maturation of Ca<sup>2+</sup> signaling in EGC. As the expression of GFAP and S100 $\beta$   
415 is regulated in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner, changes in calcium signaling during the  
416 postnatal development could participate to the regulation of the EGC markers  
417 expression. Importantly, similar processes of glial cell maturation have been observed in  
418 the central nervous system (CNS). This includes increased GFAP and S100 $\beta$  expression  
419 during the postnatal brain development (20). Age-dependent changes in agonist-induced  
420 Ca<sup>2+</sup> response is also observed in astrocytes, leading to the hypothesis that neuroglial  
421 signaling in the adult brain is different from that observed in the developing brain (31).  
422 Whether similar differences occur in the developing and mature ENS remains to be

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

423 demonstrated, as well as the potential impact of enteric neurons on EGC maturation  
424 since the maturation of astrocytes in the CNS was shown to be intimately correlated to  
425 neuronal maturation and synapse formation.

426 In the present study, we also provide evidences that SCFA produced by gut  
427 microbiota may have an impact on ENS development though their effect on EGC.  
428 Using in vitro and in vivo approaches, we show that butyrate inhibit the proliferation of  
429 EGC. Cell accumulation in G1 phase suggest an anti-proliferative effect by  
430 preventing cell cycle entry into the S phase, as previously shown in glioma cell lines  
431 (15). No induction of cell death was observed upon treatment of EGC with 500µM  
432 butyrate. These observations contrast with data showing that the treatment of neonatal  
433 astrocytes with butyrate induced cell death (3), but the authors used larger concentration  
434 of butyrate (>1mM) and the cells were cultured without serum.

435 The precise mechanisms involved in the inhibitory effects of butyrate on the EGC  
436 remain to be clarified but the detection of GPR41, GPR109A, MCT1 and MCT2 in  
437 EGC raises the possibility of an action through the seven transmembrane G-coupled  
438 receptors or the butyrate transporters. Both possibilities were confirmed by signaling  
439 pathway analyses. Functional SCFA receptors in EGC were validated by the detection  
440 of the dually phosphorylated active forms of Erk-1 and Erk-2 in butyrate-treated cells  
441 whereas the functionality of SCFA transporters was confirmed by increased acetylation  
442 of the histone H3 in butyrate-treated EGC. Whether increased acetylation results from  
443 the inhibition of the HDAC activity as observed at high butyrate concentration, or  
444 involved the ATP citrate lyase (ACL)/histone acetyltransferase (HAT) as detected at  
445 low butyrate concentration (11) remains to be determined, but treatment with the HDAC  
446 inhibitor TSA similarly inhibited EGC proliferation and anti-proliferative effects of

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

447 butyrate have previously been associated with its HDAC inhibitor activity (11).  
448 Interestingly, similar changes in the levels of acetylation are involved in the butyrate-  
449 mediated regulation of ChAT expression in the ENS (30). Histone acetylation processes  
450 vary according to the SCFA concentration resulted in induction of ChAT expression  
451 and acetylation of the H3K9.

452 In addition to its impact on EGC proliferation, butyrate could have influenced  
453 EGC maturation as an increase of GFAP expression was described in butyrate-treated  
454 C6 rat glioma cells by Morita and coauthors (21). However, here we show that chronic  
455 treatment of rat pups with 2.5 mM butyrate or acute treatment with doses up to 40 mM  
456 butyrate has no effect on the expression of GFAP and S100 $\beta$ . These observations are in  
457 agreement with the results of Hirschfeld and Bressler (14) who show that butyrate has  
458 no impact on the GFAP expression in the C6 rat glioma cell line. Whether the butyrate  
459 impacts the maturation of EGC in the human colon remained to be controlled as a  
460 decrease in the expression of S100 $\beta$  and GFAP has been described in human-derived  
461 glioma cell lines following butyrate treatment (14), suggesting that species-specific  
462 differences may exist. Of interest with these findings is the recent study by Karaboudis  
463 showing that microbiota had a central role in favoring the development and maturation  
464 of mucosal EGC (17). Whether butyrate is involved in these effects remains to be  
465 determined.

466 Our present study confirms, and extends to the myenteric plexus, the profound  
467 early postnatal changes in enteric glial phenotype and its ability to be modulated by  
468 environmental factors such as butyrate. In view of the central role played by the EGC in  
469 gut health and disease, therapies aimed at enhancing the development of EGC during  
470 the postnatal period could be of interest in pathologies of the newborn with altered gut

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

471 functions. However, prior to such applications, deciphering the functional consequences  
472 of postnatal glial maturation represents an important research axis for future studies.

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

473 **Acknowledgements**

474 F.C. current address: f.cossais@anat.univ-kiel.de

475 **Grants**

476 François Cossais was supported by a grant from the SanTidge foundation and the  
477 Fondation pour la Recherche Médicale. The work was supported in part by grants from  
478 the SFNEP and the “Région Pays de la Loire”.

479 **Disclosures**

480 The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

481

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

482 **References**

- 483 1. **Aubé A-C, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F, Liblau**  
 484 **R, Galmiche JP, Neunlist M.** Changes in enteric neurone phenotype and  
 485 intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut*  
 486 55: 630–7, 2006.
- 487 2. **Bach-Ngohou K, Mahé MM, Aubert P, Abdo H, Boni S, Bourreille A, Denis**  
 488 **MG, Lardeux B, Neunlist M, Masson D.** Enteric glia modulate epithelial cell  
 489 proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J*  
 490 *Physiol* 588: 2533–44, 2010.
- 491 3. **Barca O, Seoane M, Ferré S, Prieto JM, Lema M, Señarís R, Arce VM.**  
 492 Mechanisms of interferon-beta-induced survival in fetal and neonatal primary  
 493 astrocytes. *Neuroimmunomodulation* 14: 39–45, 2007.
- 494 4. **Barrat E, Michel C, Poupeau G, David-Sochard A, Rival M, Pagniez A,**  
 495 **Champ M, Darmaun D.** Supplementation with galactooligosaccharides and  
 496 inulin increases bacterial translocation in artificially reared newborn rats. *Pediatr*  
 497 *Res* 64: 34–9, 2008.
- 498 5. **Bassotti G, Villanacci V.** Can “functional” constipation be considered as a form  
 499 of enteric neuro-gliopathy? *Glia* 59: 345–50, 2011.
- 500 6. **Baudier J, Delphin C, Grunwald D, Khochbin S.** Characterization of the tumor  
 501 suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100b-binding  
 502 protein. 89: 11627–11631, 1992.
- 503 7. **Boesmans W, Lasrado R, Vanden Berghe P, Pachnis V.** Heterogeneity and  
 504 phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia*  
 505 63: 229–41, 2015.
- 506 8. **Bradley JS, Parr EJ, Sharkey KA.** Effects of inflammation on cell proliferation  
 507 in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res* 289: 455–61,  
 508 1997.
- 509 9. **Collins J, Borojevic R, Verdu EF, Huizinga JD, Ratcliffe EM.** Intestinal  
 510 microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous  
 511 system. *Neurogastroenterol Motil* 26: 98–107, 2014.
- 512 10. **Deloulme JC, Raponi E, Gentil BJ, Bertacchi N, Marks A, Labourdette G,**  
 513 **Baudier J.** Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells  
 514 correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates  
 515 oligodendrocytes maturation. *Mol Cell Neurosci* 27: 453–65, 2004.

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

- 516 11. **Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ.** The  
517 Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation  
518 and cell proliferation. *Mol Cell* 48: 612–26, 2012.
- 519 12. **De Giorgio R, Giancola F, Boschetti E, Abdo H, Lardeux B, Neunlist M.**  
520 Enteric glia and neuroprotection: basic and clinical aspects. *Am J Physiol*  
521 *Gastrointest Liver Physiol* 303: G887–93, 2012.
- 522 13. **Gulbransen BD, Sharkey KA.** Novel functional roles for enteric glia in the  
523 gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9: 625–32, 2012.
- 524 14. **Hirschfeld A, Bressler J.** Effect of sodium butyrate on S-100 protein levels and  
525 the cAMP response. *J Cell Physiol* 133: 158–62, 1987.
- 526 15. **Ito N, Sawa H, Nagane M, Noguchi A, Hara M, Saito I.** Inhibitory effects of  
527 sodium butyrate on proliferation and invasiveness of human glioma cells.  
528 *Neurosurgery* 49: 430–6.
- 529 16. **Joseph NM, He S, Quintana E, Kim Y-G, Núñez G, Morrison SJ.** Enteric glia  
530 are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. *J Clin*  
531 *Invest* 121: 3398–411, 2011.
- 532 17. **Kabouridis PS, Lasrado R, McCallum S, Chng SH, Snippert HJ, Clevers H,**  
533 **Pettersson S, Pachnis V.** Microbiota controls the homeostasis of glial cells in  
534 the gut lamina propria. *Neuron* 85: 289–95, 2015.
- 535 18. **Khen N, Jaubert F, Sauvat F, Fourcade L, Jan D, Martinovic J, Vekemans**  
536 **M, Landais P, Brousse N, Leborgne M, Nihoul-Fékété C, Cerf-Bensussan N,**  
537 **Sarnacki S.** Fetal intestinal obstruction induces alteration of enteric nervous  
538 system development in human intestinal atresia. *Pediatr Res* 56: 975–80, 2004.
- 539 19. **McClain JL, Grubišić V, Fried D, Gomez-Suarez R a, Leininger GM,**  
540 **Sévigny J, Parpura V, Gulbransen BD.** Ca<sup>2+</sup> responses in enteric glia are  
541 mediated by connexin-43 hemichannels and modulate colonic transit in mice.  
542 *Gastroenterology* 146: 497–507.e1, 2014.
- 543 20. **Molofsky A V, Krenick R, Krenick R, Ullian EM, Ullian E, Tsai H, Deneen**  
544 **B, Richardson WD, Barres BA, Rowitch DH.** Astrocytes and disease: a  
545 neurodevelopmental perspective. *Genes Dev* 26: 891–907, 2012.
- 546 21. **Morita K, Gotohda T, Arimochi H, Lee M-S, Her S.** Histone deacetylase  
547 inhibitors promote neurosteroid-mediated cell differentiation and enhance  
548 serotonin-stimulated brain-derived neurotrophic factor gene expression in rat C6  
549 glioma cells. *J Neurosci Res* 87: 2608–14, 2009.
- 550 22. **Neunlist M, Van Landeghem L, Mahé MM, Derkinderen P, des Varannes**  
551 **SB, Rolli-Derkinderen M.** The digestive neuronal-glial-epithelial unit: a new  
552 actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10: 90–100, 2013.

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

- 553 23. **Neunlist M, Rolli-Derkinderen M, Latorre R, Van Landeghem L, Coron E,**  
554 **Derkinderen P, De Giorgio R.** Enteric glial cells: recent developments and  
555 future directions. *Gastroenterology* 147: 1230–7, 2014.
- 556 24. **Norin E, Midtvedt T, Björkstén B.** Development of faecal short-chain fatty  
557 acid pattern during the first year of life in estonian and swedish infants. *Microb*  
558 *Ecol Health Dis* 16: 8–12, 2004.
- 559 25. **Patel RM, Myers LS, Kurundkar AR, Maheshwari A, Nusrat A, Lin PW.**  
560 Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier  
561 function. *Am J Pathol* 180: 626–35, 2012.
- 562 26. **De Quelen F, Chevalier J, Rolli-Derkinderen M, Mourot J, Neunlist M,**  
563 **Boudry G.** N-3 Polyunsaturated Fatty Acids in the Maternal Diet Modify the  
564 Postnatal Development of Nervous Regulation of Intestinal Permeability in  
565 Piglets. *J Physiol* 589: 4341–4352, 2011.
- 566 27. **Rao M, Nelms BD, Dong L, Salinas-Rios V, Rutlin M, Gershon MD, Corfas**  
567 **G.** Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique  
568 population of glia in the mammalian nervous system. *Glia* (June 29, 2015). doi:  
569 10.1002/glia.22876.
- 570 28. **Roberts RR, Ellis M, Gwynne RM, Bergner AJ, Lewis MD, Beckett E a,**  
571 **Bornstein JC, Young HM.** The first intestinal motility patterns in fetal mice are  
572 not mediated by neurons or interstitial cells of Cajal. *J Physiol* 588: 1153–69,  
573 2010.
- 574 29. **Roberts RR, Murphy JF, Young HM, Bornstein JC.** Development of colonic  
575 motility in the neonatal mouse-studies using spatiotemporal maps. *Am J Physiol*  
576 *Gastrointest Liver Physiol* 292: G930–8, 2007.
- 577 30. **Soret R, Chevalier J, De Coppet P, Poupeau G, Derkinderen P, Segain JP,**  
578 **Neunlist M.** Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control  
579 gastrointestinal motility in rats. *Gastroenterology* 138: 1772–1782, 2010.
- 580 31. **Sun W, McConnell E, Pare J-F, Xu Q, Chen M, Peng W, Lovatt D, Han X,**  
581 **Smith Y, Nedergaard M.** Glutamate-Dependent Neuroglial Calcium Signaling  
582 Differs Between Young and Adult Brain. *Science (80- )* 339: 197–200, 2013.
- 583 32. **Suply E, de Vries P, Soret R, Cossais F, Neunlist M.** Butyrate enemas enhance  
584 both cholinergic and nitrergic phenotype of myenteric neurons and  
585 neuromuscular transmission in newborn rat colon. *Am J Physiol Gastrointest*  
586 *Liver Physiol* 302: G1373–1380, 2012.
- 587 33. **De Vries P, Soret R, Suply E, Heloury Y, Neunlist M.** Postnatal development  
588 of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular  
589 transmission in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299:  
590 G539–547, 2010.

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

- 591 34. **Young HM, Bergner AJ, Müller T.** Acquisition of neuronal and glial markers  
592 by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J Comp Neurol* 456: 1–11,  
593 2003.
- 594 35. **Young HM, Ciampoli D, Hsuan J, Canty AJ.** Expression of Ret-, p75(NTR)-,  
595 Phox2a-, Phox2b-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactivity by  
596 undifferentiated neural crest-derived cells and different classes of enteric neurons  
597 in the embryonic mouse gut. *Dev Dyn* 216: 137–52, 1999.
- 598
- 599

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

600 **Tables**

601

602 **Table 1: Real time PCR primers**

Gene	Forward primer (5'- 3')	Reverse primer (5'- 3')	Accession Number
RPS6	CAAGCTTATTCAGCGTCTTGTTACTCC	CCCTCGAGTCCTTCATTCTCTTGGC	NM_017160
S100 $\beta$	GAGCTGGAGAAGGCCATGG	CTAATCTCACTCATGTCAAAGAAGCTC	NM_013191
GFAP	CCTGGAACAGCAAAACAAGG	AGCCTCAGGTTGGTTTCATC	NM_017009
Sox10	GAACCTCGCTGCCTGTCCCAA	AGGGGCGCTTGTCCTCTCGT	NM_019193
GPR41	CGGCCCTACAATATGTCCC	AGGAGCTGATGAAAGTCGGC	NM_001108912.1
GPR43	CTGAACTCAACCGAGCAGGT	CCAACATGGGGCTGTGTGAG	NM_001005877.1
GPR109A	CACGGACATGATGACCCGAA	AGCAGAACAGGATGATGCC	NM_181476.1
MCT1	CGTTGATGGACCTCGTTGGA	CGATGATGAGGATCACGCCA	NM_012716.2
MCT2	CTGTGGGGCTCGTCACTATC	AACACGACTATCCCCTGAGC	NM_017302.2
MCT4	GGAGCGCTACAGTTTGAGGT	AAACTTTCGTTGCGTCCAGC	NM_030834.1

603

604

605

606

607

608

609

610

## Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

611

612 **Table 2: GFAP Expression in the colon of rat pups during the postnatal period.**

Age (postnatal days)	Distal colon control	Proximal colon control	Distal colon + butyrate (2.5 mM)	Proximal colon + butyrate (2.5 mM)
P1	1.0 ± 0.3 (n=11)	0.4 ± 0.1 (n=6)	N.A.	N.A.
P7	2.3 ± 0.4 (n=14)	1.7 ± 0.3 (n=8)	2.2 ± 0.6 (n=7)	1.9 ± 0.4 (n=7)
P14	5.1 ± 0.7 (n=14) *	2.7 ± 0.5 (n=8)	3.8 ± 0.8 (n=8)	3.5 ± 0.3 (n=8)
P21	8.8 ± 1.3 (n=14) *	7.7 ± 0.9 (n=8) *	7.1 ± 1.6 (n=8)	9.8 ± 2.3 (n=8)
P36	9.1 ± 1.7 (n=14) *	6.6 ± 1.3 (n=8) *	7.8 ± 1.3 (n=8)	8.4 ± 2.3 (n=8)

613 Mean GFAP/S6 relative mRNA expression ± SEM within the proximal and distal colon  
 614 of rat pups during the postnatal period, normalized to distal colonic expression at P1.  
 615 Significant differences to the relative expression at P1 (\*) are indicated (Kruskal-Wallis  
 616 test followed by Dunn's post hoc test;  $p < 0.05$ ). N.A.: Not Applicable.

617

618 **Table 3: S100 $\beta$  expression in the colon of rat pups during the postnatal period.**

Age (postnatal days)	Distal colon control	Proximal colon control	Distal colon + butyrate (2.5 mM)	Proximal colon + butyrate (2.5 mM)
P1	1.0 ± 0.1 (n=11)	1.5 ± 0.3 (n=6)	N.A.	N.A.
P7	4.9 ± 0.6 (n=14) *	5.9 ± 1.3 (n=8)	3.4 ± 0.7 (n=6)	4.3 ± 0.7 (n=7)
P14	6.6 ± 1.0 (n=14) *	8.3 ± 0.8 (n=7) *	6.0 ± 0.3 (n=7)	8.6 ± 1.2 (n=9)
P21	4.1 ± 0.6 (n=14) *	9.7 ± 2.2 (n=8) *	6.1 ± 2.3 (n=7)	5.5 ± 1.0 (n=8)
P36	5.0 ± 1.3 (n=14) *	7.3 ± 1.8 (n=8)	3.5 ± 0.6 (n=7)	6.5 ± 1.3 (n=9)

619 Mean S100 $\beta$ /S6 relative mRNA expression ± SEM within the whole thickness proximal  
 620 and distal colon of rat pups during the postnatal period, normalized to distal colonic  
 621 expression at P1. Significant differences to the relative expression at P1 (\*) are

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

622 indicated (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test;  $p < 0.05$ ). N.A.: Not

623 Applicable.

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

624 **Figure legends**

625 **Figure 1. Postnatal maturation of the enteric glial network in distal colonic**  
626 **myenteric plexus.** A-C: qPCR showing expression, relative to P1, of the glial markers  
627 GFAP (A), S100 $\beta$  (B) and Sox10 (C) during the postnatal period in full thickness distal  
628 colon biopsies of rat pups. Expression levels are normalized to S6 in all experiments.  
629 Asterisks (\*) indicate significant differences relative to expression at P1 (n=6-14;  
630 Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test;  $p < 0.05$ ). D-K: Whole mount  
631 preparations of myenteric plexus of rat pup distal colonic specimens at P1 (D, H), 7  
632 (E,I), 21 (F,J) and 36 (G,K). Expressions of the glial markers GFAP (D-G) and S100 $\beta$   
633 (H-K) were assessed. Scale bar = 50  $\mu$ m.

634 **Figure 2. Characterization of primary culture of EGC.** A-C: Expression of glial  
635 markers GFAP (A) and S100 $\beta$  (B) in primary culture of EGC isolated from P14 or P36  
636 animals, as determined by qPCR. Expression levels are normalized to S6 and to P14 in  
637 all experiments. C-E: Response of primary EGC to ATP (1mM). Maximum amplitude  
638 (C; arbitrary units) and duration at 50 % (D) and 10 % (E) of maximum intensity are  
639 represented. Asterisks (\*) indicate significant differences between P14 and P36 (A-C:  
640 n=7-10; D-F: n=25-30; Mann-Whitney U-test  $p < 0.05$ ).

641 **Figure 3. Postnatal evolution of Sox10-IR cell number in the myenteric plexus.** A-  
642 L: Whole mount preparations of myenteric plexus of rat pup distal colonic specimens at  
643 P1 (A, E, I), 7 (B, F, J), 21 (C, G, K) and 36 (D, H, L) stained for the glial marker  
644 Sox10 (red, nuclei) and the pan neuronal marker HuC/D (green; A-D).  
645 Immunohistochemical labelling for Sox10 (E-H) and corresponding expression of the  
646 proliferation marker Ki67 (I-L). Ki67-IR/Sox10-IR cells are marked by an arrowhead  
647 whereas Ki67-IR / Sox10 negative cells are marked by an arrow. Scale bar = 50  $\mu$ m. M-

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

648 O: Quantification of immunohistochemical staining showing the ratio of Sox10-IR cells  
649 to HuC/D-IR (M) and the number of Sox10-IR cells per 1000 $\mu\text{m}^2$  (N) in the myenteric  
650 plexus in the distal colon of rat pups. Proportion of proliferative EGC was determined  
651 by co-staining of Sox10 with the proliferative marker Ki67 (O). EGC proliferation  
652 decreased with time with the difference between P1 and P36 being statistically  
653 significant. Asterisks (\*) indicate significant differences relative to P1 (n=4-8; Kruskal-  
654 Wallis test followed by Dunn's post hoc test;  $p < 0.05$ ).

655 **Figure 4. Butyrate inhibits the proliferative activity of Sox10-IR cells during the**  
656 **postnatal period.** A-D: Whole mount preparations of myenteric plexus of rat pup distal  
657 colonic specimens at P7 stained for Sox10 (A, C) and Ki67 (B, D), in control conditions  
658 (A, B) or after butyrate administration (2.5 mM; C, D). Double positive cells are  
659 marked with an arrow. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . Butyrate enemas significantly decreased the  
660 proportion of Ki67-IR/Sox10-IR cells at P7 within the distal colon (E). Administration  
661 of butyrate (Bu) at 2.5, 10 or 40 mM for 24h had no impact on the expression of GFAP  
662 and S100 $\beta$  at the mRNA (F, H) or protein (G,I) levels in full-thickness biopsies of the  
663 distal colon as compared with control (0). RNA and protein expression levels were  
664 normalized to S6 and  $\beta$ -actin, respectively. Asterisks (\*) indicate significant differences  
665 relative to control (n=4-6; Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test;  $p <$   
666 0.05).

667 **Figure 5. EGC respond to butyrate.** A: The expression of transporters (MCT1,  
668 MCT2, MCT4) and receptors (GPR41, GPR43, GPR109A) of butyrate was analyzed in  
669 cultures of in EGC or in positive controls (Std) using RT-PCR. B: EGC were treated for  
670 5 min with 100 $\mu\text{M}$ , 500 $\mu\text{M}$  or 10mM. Cell lysates were subjected to immunoblot  
671 analysis using antibodies specific for the dually phosphorylated (active) forms of ERK1

Impact of butyrate on myenteric glial network maturation.

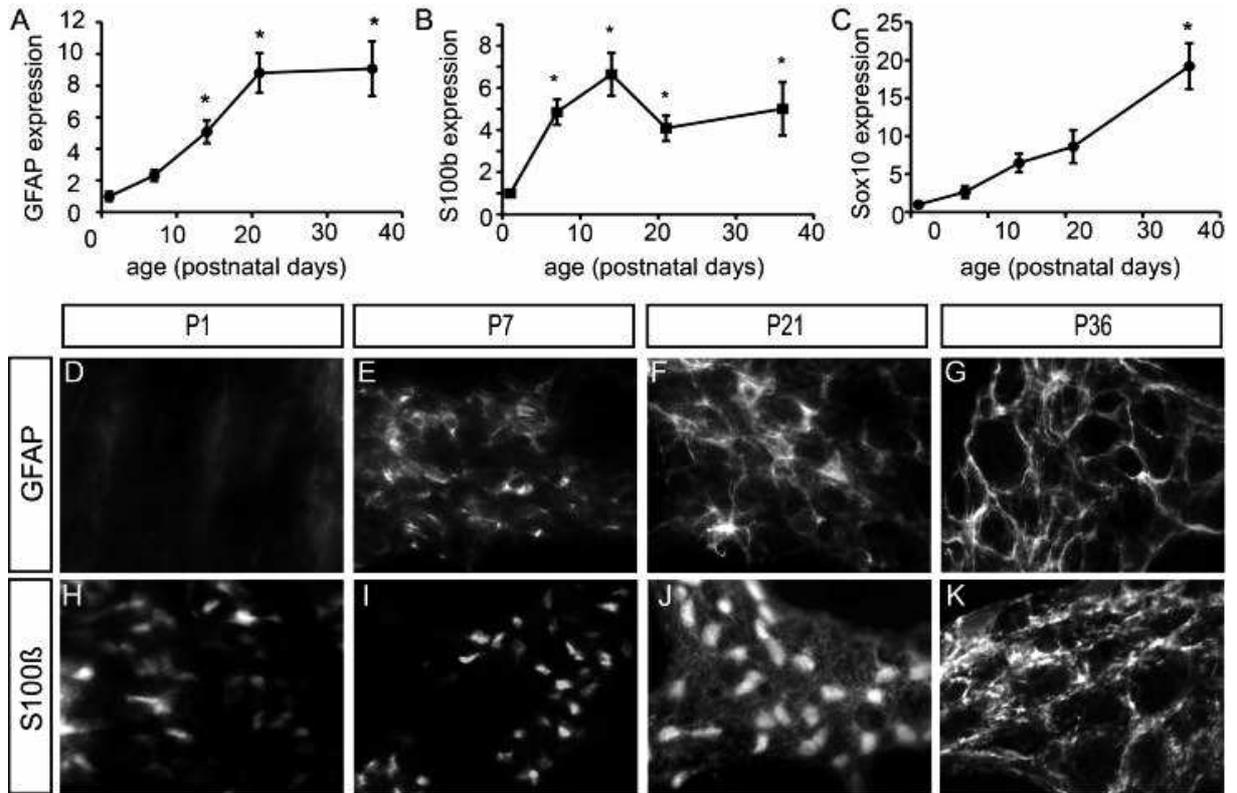
672 and ERK2 (P-ERK1/2), with anti-ERK (ERK1/2) antibodies and with anti-Actin  
673 antibodies. C: Immunohistochemistry on EGC *in vitro*; nuclei were stained with DAPI  
674 and with an antibody specific for the acetylated form of histone3 on Lysine K9 (ac  
675 H3K9) in control conditions or after treatment with butyrate for 24h (500  $\mu$ M). D:  
676 Fluorescence intensity for ac H3K9 was measured in EGC in control conditions (Ct) or  
677 after treatment with butyrate for 24h (But, 500 $\mu$ M). Asterisk (\*) indicates significant  
678 difference relative to Mock (n=6; Mann-Whitney U-test; p < 0.05).

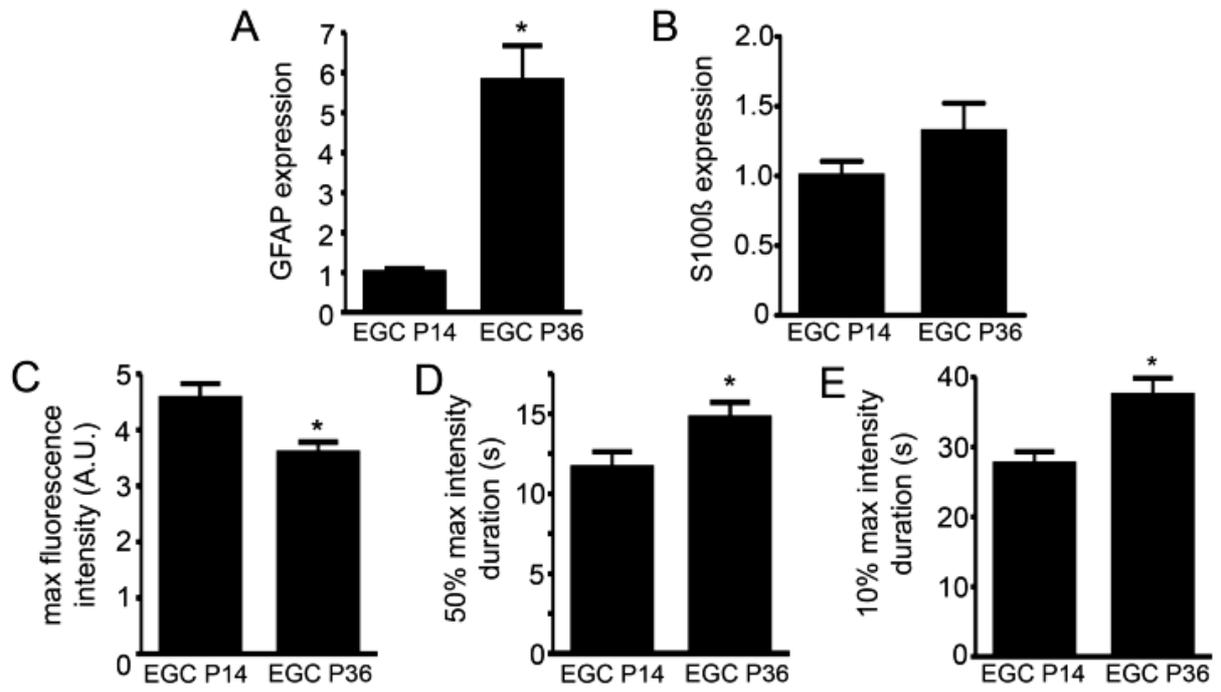
679 **Figure 6. Butyrate inhibits EGC proliferation *in vitro*.** A-J: Immunohistochemistry  
680 on EGC *in vitro*; nuclei were stained with DAPI (A, C, E, G, I) and for the proliferation  
681 marker Ki67 (B, D, F, H, J) in control conditions (A, B) or after butyrate (500  $\mu$ M) (C,  
682 D), acetate (E-F), propionate (G-H) or trichostatin (I, J) administration. Ki67-IR cells  
683 are marked by an arrow. Scale bar = 25  $\mu$ m. K-L: Proportion of Ki67-IR EGC (K) and  
684 EGC number (L) were determined in control conditions (Ct), or after treatment with  
685 butyrate (Bu), acetate (Ac), propionate (Pr) or trichostatin (TSA) after 7 days of culture.  
686 M-Q: Progression of EGC through the cell cycle was determined by measurement of  
687 Propidium iodure (PI) intensity in control conditions (M) or after treatment with 500 $\mu$ M  
688 butyrate for 48h (N). Corresponding percentages of the total cell population in G1-phase  
689 (O), S-phase (P) and G2/M-phase (Q) were determined in control conditions (Ct) and  
690 after treatment with butyrate (Bu). Asterisks (\*) indicate significant differences relative  
691 to control (Ct; n=5; Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test; p < 0.05).

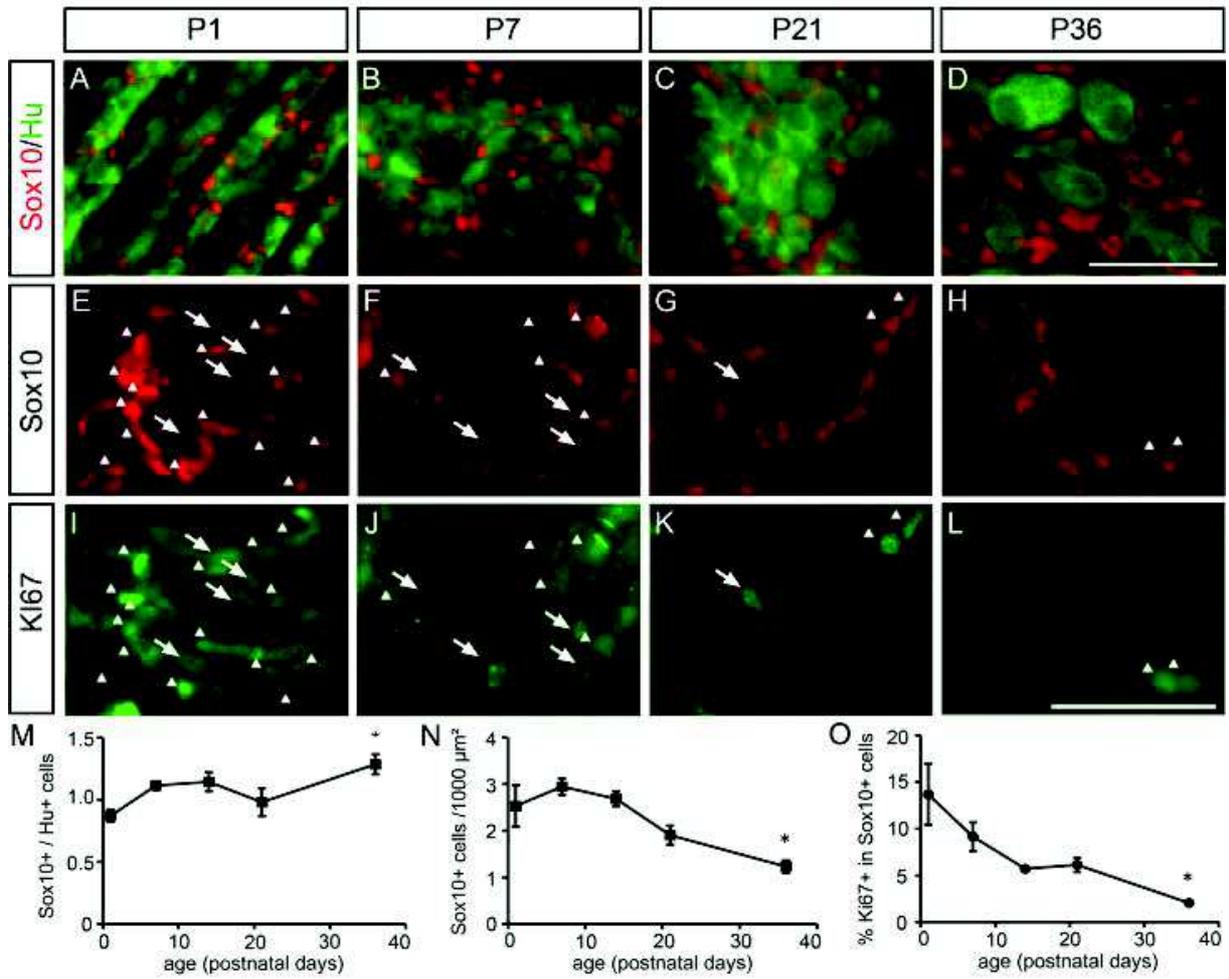
692

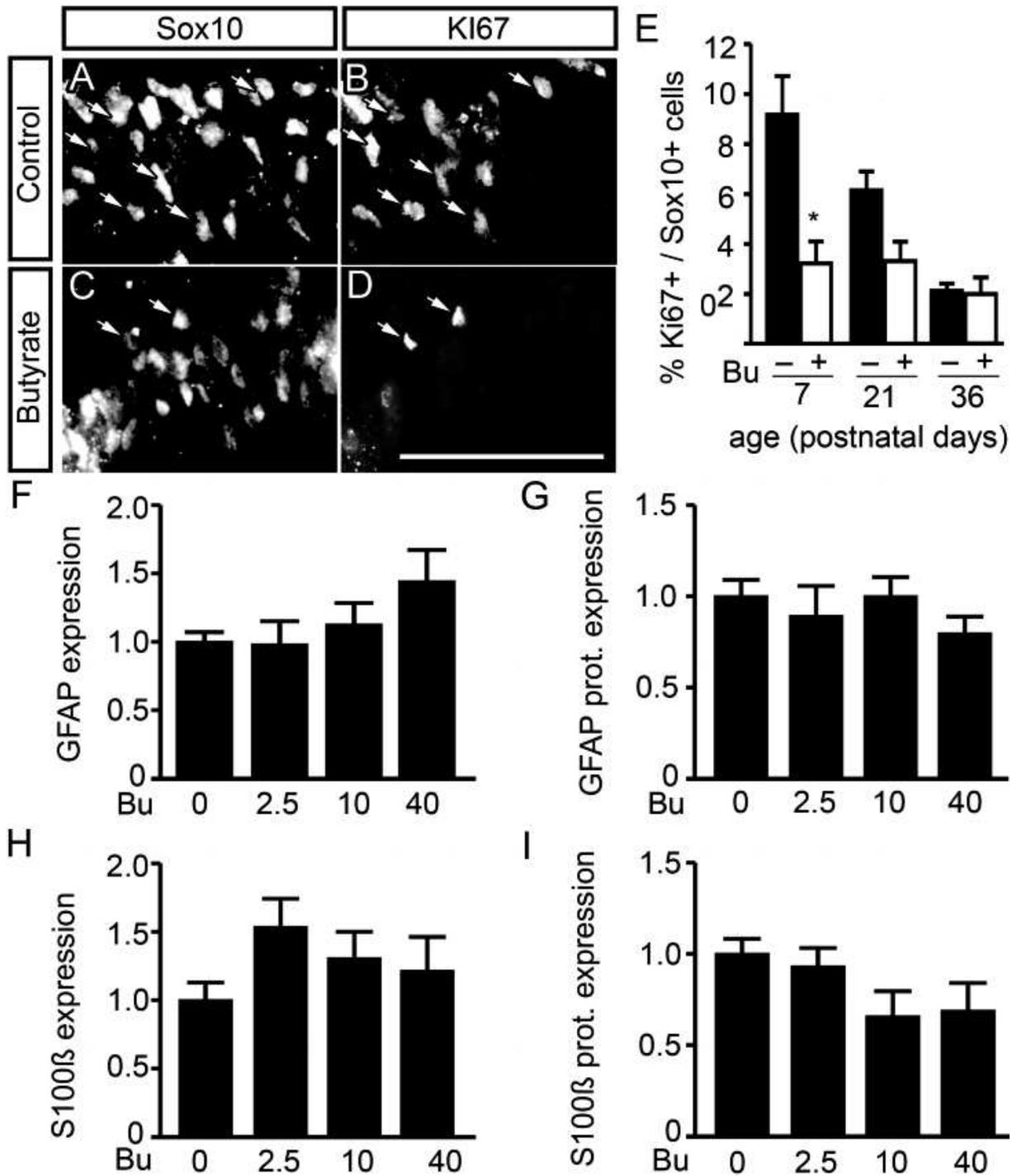
693

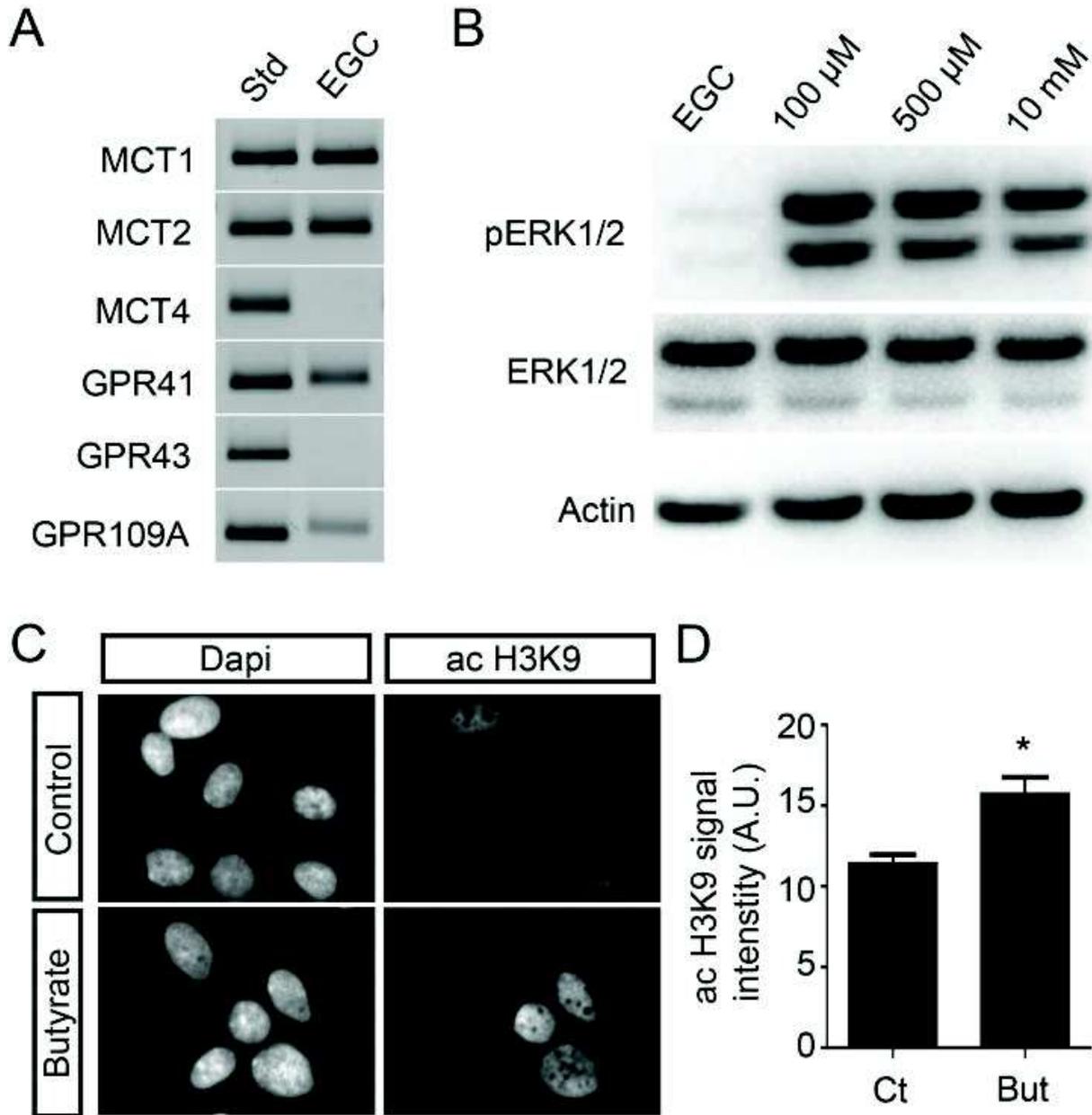
694

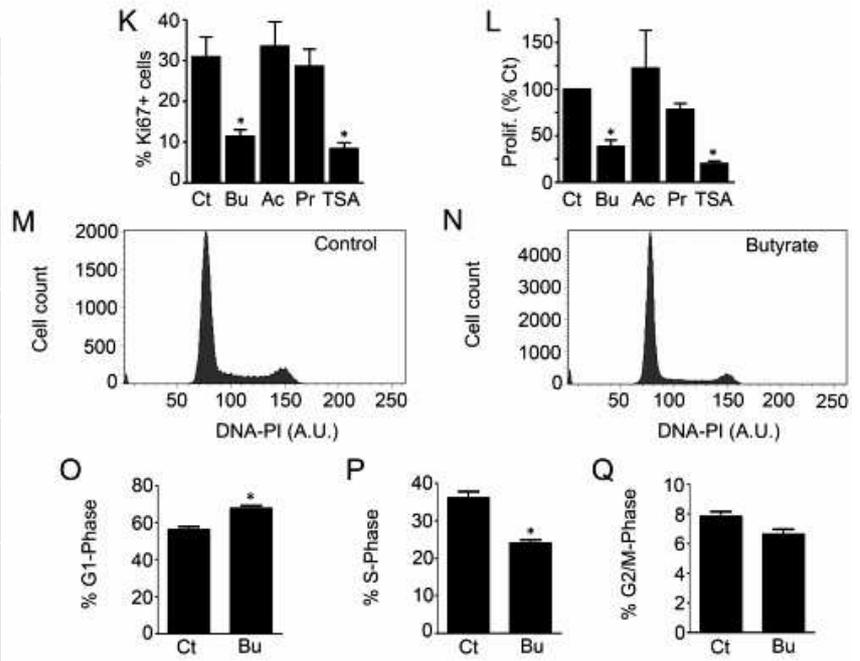
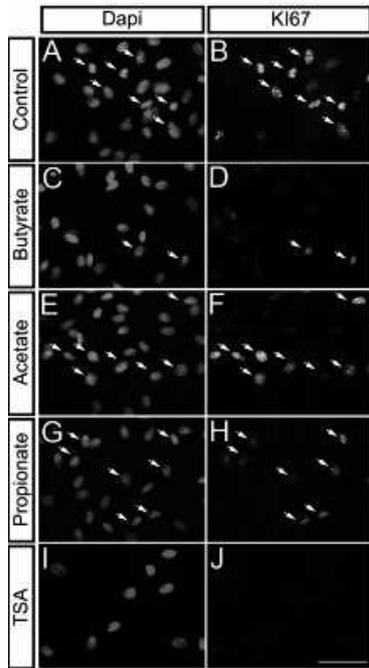












**Article 5 : Contrôle local de la réponse immunitaire de l'hôte par les cellules souches mésenchymateuses : perspectives pour la xénotransplantation intracérébrale fonctionnelle (publié)**

Xavier Levêque #, Elodie Mathieux #, Veronique Nerriere-Daguin, Reynald Thinard, Laetitia Kermarrec, Tony Durand, Thomas Haudebourg, Bernard Vanhove, Laurent Lescaudron, Isabelle Neveu, #, Philippe Naveilhan # \*.

## Local control of the host immune response performed with mesenchymal stem cells: perspectives for functional intracerebral xenotransplantation

Xavier Lévêque<sup>a, b, c, #</sup>, Elodie Mathieux<sup>a, b, c, #</sup>, Véronique Nerrière-Daguin<sup>a, b, c</sup>,  
Reynald Thinard<sup>a, b, c</sup>, Laetitia Kermarrec<sup>d</sup>, Tony Durand<sup>d</sup>, Thomas Haudebourg<sup>a, b, c</sup>,  
Bernard Vanhove<sup>a, b, c</sup>, Laurent Lescaudron<sup>a, b, c, e</sup>, Isabelle Neveu<sup>a, b, c, d, #</sup>,  
Philippe Naveilhan<sup>a, b, c, d, #</sup>\*

<sup>a</sup> INSERM, UMR 1064, Nantes, France

<sup>b</sup> CHU de Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, France

<sup>c</sup> Faculté de Médecine, Université de Nantes, LUNAM Université, Nantes, France

<sup>d</sup> INSERM, UMR 913, Nantes, France

<sup>e</sup> INSERM, UMR 791, Nantes, France

Received: February 17, 2014; Accepted: July 31, 2014

### Abstract

Foetal pig neuroblasts are interesting candidates as a cell source for transplantation, but xenotransplantation in the brain requires the development of adapted immunosuppressive treatments. As systemic administration of high doses of cyclosporine A has side effects and does not protect xenotransplants forever, we focused our work on local control of the host immune responses. We studied the advantage of cotransplanting syngenic mesenchymal stem cells (MSC) with porcine neuroblasts (pNb) in immunocompetent rat striata. Two groups of animals were transplanted, either with pNb alone or with both MSC and pNb. At day 63, no porcine neurons were detected in the striata that received only pNb, while four of six rats transplanted with both pNb and MSC exhibited healthy porcine neurons. Interestingly, 50% of the cotransplanted rats displayed healthy grafts with pNF70+ and TH+ neurons at 120 days post-transplantation. qPCR analyses revealed a general dwindling of pro- and anti-inflammatory cytokines in the striata that received the cotransplants. Motor recovery was also observed following the transplantation of pNb and MSC in a rat model of Parkinson's disease. Taken together, the present data indicate that the immunosuppressive properties of MSC are of great interest for the long-term survival of xenogeneic neurons in the brain.

**Keywords:** immunosuppression • rejection • mesenchymal stem cells • T cells • Parkinson • brain transplantation • survival • restorative strategies

### Introduction

Transplantation is a promising approach for nervous system repair in neurodegenerative disorders. Clinical studies have shown beneficial effects following the transplantation of embryonic ventral mesencephalic tissue into the brains of Parkinson's disease patients, but the absence of effects or the apparition of dyskinesia in some

patients has underlined the need for technical improvements. These include a better control of the host immune response, as alloimmunization to donor antigens has been observed following the transplantation of foetal neural cells into the brains of patients affected by Huntington's disease [1]. Alternative sources of transplantable cells have also to be found as the use of human foetal tissues raises ethical and logistical problems. In this perspective, we have been studying the possibility of using porcine embryonic ventral mesencephalic tissue [2–4]. Porcine foetal neurons have been shown to restore behavioural function in animal models of Parkinson's disease [5, 6] and some clinical trials have already been performed [7–9]. However, despite the particular immunological status of the brain, neuronal xenografts become the target of

#Equal contribution.

\*Correspondence to: Philippe NAVEILHAN,  
INSERM UMR 913, 1 place Alexis Ricordeau 01,  
Nantes Cedex 44 035, France.  
Tel.: +33 (0) 2 40 41 28 86  
E-mail: philippe.naveilhan@univ-nantes.fr

doi: 10.1111/jcmm.12414

© 2014 The Authors.

Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

a host immune response characterized by a massive infiltration of dendritic and T cells with a Th1 profile [3, 4]. Treatment with minocycline [10] or cyclosporine A significantly delays the rejection without inhibiting it. Interestingly, mesenchymal stem cells (MSC) showed spontaneous long-term survival following their transplantation into the brain of a xenogeneic host [11, 12]. This long-term survival is due not only to the low immunogenicity of MSC but also to their active immunosuppressive activity. Indeed, MSC can inhibit the maturation of dendritic cells and proliferation of T- and B cells [13, 14]. Interestingly, transplantation of MSC in animal models of stroke or multiple sclerosis revealed that these cells may have beneficial effects through their immune and trophic properties [15]. Consequently, we decided to take advantage of these properties to develop a local immunosuppressive strategy in the brain. Our results showed that MSC protect xenogeneic neural cells from cell rejection without affecting their functional properties.

## Materials and methods

### Animals

Porcine embryos were obtained from domestic Large White pigs 28 days after insemination (G28; Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, Nouzilly, France). Lewis 1A and Sprague–Dawley wild-type rats were purchased from Janvier CERJ (Le Genest saint Isle, France) and Charles River (L'Arbresle, France). The experiments were performed according to the French guidelines for the care and use of laboratory animals.

### Culture of rat MSC

Mesenchymal stem cells were obtained from the bone marrow of adult Lewis 1A rats as previously described [12, 16, 17]. The ends of femurs and tibias were cut, and bone marrow cells (BMC) were aspirated with a 25-gauge needle. To remove all the BMC, the bone canal was flushed with  $\alpha$ MEM medium (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) supplemented with 20% foetal calf serum (FCS; Gibco, Life technologies Ltd, Asint-Aubin, France), 100 U/ml penicillin (Sigma-Aldrich) and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Sigma-Aldrich). MSC were selected by an overnight incubation of the BMC onto uncoated plastic dishes. Plastic-adherent cells were then plated at a density of  $8 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> and split at 80% confluency. Full characterization of the cells was previously described [12, 17] and current analyses by flow cytometry indicate that over 95% of the cells were consistently positive for CD90 and negative for CD45. MSC were used at passage 4.

### Preparation of porcine neuroblasts

Foetuses at G28 were collected in Hank's balanced salt solution (GibcoBRL) after hysterectomy. Ventral mesencephalons were dissected under aseptic conditions and conserved in a hibernation medium at 4°C for up to 3 days. Just before transplantation, porcine neuroblasts (pNb) were prepared by mechanical and enzymatic dissociation as previously

described [2] and the cell suspension was adjusted to a concentration of  $\sim 2 \times 10^5$  cells/ $\mu$ l.

### Cell transplantation and surgical procedures

The transplantation was performed on male Lewis 1A rats weighing 250 g. Anaesthesia was performed with an intramuscular injection of 2% Rompun and 50 mg/ml ketamine (1 ml/kg) (PanPharma, Fougères, France). Anaesthetized rats were placed in a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). An amount of  $4 \times 10^5$  pNb,  $1 \times 10^5$  rat MSC or a mix of  $3 \times 10^5$  pNb/ $1 \times 10^5$  MSC was transplanted unilaterally into the striatum (in mm relative to bregma and surface of the dura mater): anterior: +0.7, lateral: –2.8, ventral: –6 and –5.6, incisor bar: –3.3. Injections were performed with a Hamilton syringe placed on an automated microinjector (Phymed, Paris, France) over a time period of 1 min. After a 4-min. delay period, the needle was gently removed, the piece of skull replaced and the skin sutured.

At 28, 35, 42, 63 and 120 days post-transplantation, animals were anaesthetized with an intramuscular injection of 2% Rompun/50 mg/ml ketamine (1 ml/kg) and transcardially perfused with 150 ml 0.9% NaCl, followed by 250 ml cold 4% paraformaldehyde in PBS. The brain was then removed from the skull and cryoprotected in two successive solutions of 15% (24 hrs) and 30% (48 hrs) sucrose in PBS at 4°C. The brains were then frozen in isopentane and stored at –80°C. For the molecular analysis, grafted striata were collected from unperfused animals and directly frozen in liquid nitrogen.

### 6-hydroxydopamine lesion

Lesion of nigral dopaminergic neurons was carried out by injecting, unilaterally, the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in the medial forebrain bundle. Briefly, rats were anaesthetized with an intramuscular injection of Rompun/ketamine (1 ml/kg) and placed in a stereotaxic frame (Stoelting). 6-OHDA (3  $\mu$ g/ $\mu$ l) was dissolved in 0.9% saline/0.1% ascorbic acid, and 4  $\mu$ l were unilaterally injected (0.33  $\mu$ l/min) at the following coordinates (in mm relative to bregma and surface of the dura mater): anterior: –4.4; lateral: –1.2; ventral: –7.8; tooth set bar: –2.3. Two weeks after the lesion, the animals were injected with the DA agonist, apomorphine (0.05 mg/kg, s.c.). Only the animals scoring more than 100 contralateral rotations during a 45-min. period were selected for cell transplantation, as this score corresponds to ~90% of dopaminergic loss on the side ipsilateral to the lesion (Fig. 5A). Four experimental groups were then constituted: (i) nontransplanted ( $n = 8$ ), or transplanted (ii) with pig neuroblasts ( $n = 8$ ), (iii) LEW 1A MSC ( $n = 8$ ), (iv) MSC plus pig neuroblasts ( $n = 13$ ). Cell transplantation was performed 1 month after the 6-OHDA lesion.

### Cylinder tests

Functional recovery of 6-OHDA-lesioned rats was followed by analysis of forelimb-use asymmetry every 15 days. Rats were placed in a glass cylinder and the number of wall contacts executed independently with the left and right forepaw was counted for each rat (cylinder test) [18]. At least 20 contacts were counted for each animal. Left (contralateral) paw use was expressed as a percentage of the total number of wall contacts, knowing that an unlesioned animal achieves a score of 50%.

### Total RNA preparation and qPCR analyses

To extract total RNA, cells were disrupted in 1 ml TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and homogenized using a syringe and needle for cells or using an ULTRA-TURRAX T25 (IKA, Staufen, Germany) for tissues according to the manufacturer's specifications.

Potential genomic DNA contamination was removed by treatment with Turbo™ DNase (Ambion Inc., Austin, TX, USA). RNA was quantified using an ND-1000 UV-Vis spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and RNA integrity was controlled on an agarose gel. cDNA was synthesized from 5 µg total RNA using the Moloney Murine Leukemia Virus reverse-transcriptase kit (Invitrogen) and diluted to a final concentration of 100 ng cDNA/µl.

Analyses of transcripts were performed with a GenAmp 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, Life technologies ltd, Saint-Aubin, France) using SYBR Green PCR core reagents (AB). Oligonucleotide sequences are indicated in Table 1. To minimize the amplification of porcine mRNA, primers were aligned against porcine mRNA sequences and selected as follows: at least, one of the two primers matched on less than nine nucleotides and/or the 3' end was free if the homology was greater than 50%. These conditions were not satisfied for Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) and transforming

growth factor-beta

(TGF-β). The PCR method and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> quantification method, after normalization to HPRT values, have been described previously. The mRNA expression level is defined as the fold change in mRNA levels in a given sample relative to levels in a calibrator (CB). The calibrator is the 1 × expression of each gene. The mRNA expression level is calculated as follows: mRNA expression level = 2<sup>-ΔΔCt</sup> where ΔΔCt = (Ct<sub>target</sub> - Ct<sub>HPRT</sub>)<sub>sample</sub> - (Ct<sub>target</sub> - Ct<sub>HPRT</sub>)<sub>CB</sub>. Specific amplifications were checked by amplicon melting curves.

### Immunohistochemical analyses

The frozen brains were sliced coronally into 16 µm sections using a cryostat (Leica, Nanterre, France). Parallel series of nine slides, each containing three brain sections, were prepared. The slides were stored at -80°C until further handling. After neutralization of endogenous peroxidase with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS (Sigma-Aldrich) for 10 min., the slides were incubated for 45 min. in 10% normal goat serum (Sigma-Aldrich) diluted in PBS-4% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) before an incubation with primary antibodies, as presented in Table 2, overnight at 4°C. After washing, slides were incubated for 1 hr at room temperature with biotinylated antimouse or anti-rabbit Abs (1:500 in PBS-4% BSA). Sections were then washed three times and exposed to avidin-biotinylated-peroxidase complex for 1 hr and revealed with the Vector very intense purple substrate or 3,3'-diaminobenzidine (Vector, Laboratories, Burlingame, CA, USA; ABC kit). After several washes in distilled water, slides were dehydrated and mounted using Eukitt (Labnord, Villeneuve d'Ascq, France).

Observations were performed with an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss, Marly le Roi, France). Images were acquired using a digital camera (AxioCam HRC, Zeiss) driven by AxioVision Release 4.2 software.

### Histological classification of the graft

Brain sections containing the graft were identified by staining one slide of each series with cresyl violet (CV). In the absence of an identifiable graft because of rejection, the needle track or scar was used to localize the injecting point. A minimum of three sections from the graft centre were stained with pNF70 and R73 antibodies to detect porcine neurons and T lymphocytes respectively. The graft status was assessed by two independent readers on blind-coded slides and classified using the following criteria. Healthy grafts: no sign of degeneration (CV<sup>+</sup>) and/or a clear expression of the porcine NF (NF70<sup>+</sup>), no (R73<sup>-</sup>) or rare (occasionally observed in one or more sections, but always in a much lower number than 10 cells per brain section, R73<sup>+/−</sup>) T cells inside the graft. Rejecting graft: clear expression of porcine NF (NF70<sup>+</sup>), very large number of T cells infiltrating the graft and/or the grafted striatum (R73<sup>+</sup>). Rejected: no porcine NF (NF70<sup>-</sup>), a very large number of R73<sup>+</sup> cells infiltrating the graft and/or the grafted striatum (R73<sup>+</sup>). Scar: no porcine NF, no T cells. This classification was chosen as it encompassed the five situations observed after the transplantation of pNB into the rat striatum [4, 10, 19].

### Efficiency of the 6-OHDA lesion

The efficiency of 6-OHDA lesion was controlled by analysing the percentage of dopaminergic loss in the substantia nigra compacta. The

**Table 1** Primers used in this study

Primers	Sequence	Rattus norvegicus accession
HPRT	Up CCTGGTCAAGCAGTACAGCC Lo TTCGCTGATGACACAACATGA	NM_012583
rCb	Up GTGAATGGGAAGGAGATCCG Lo CACTGATGTTCTGTGTGACAGGTT	AY228549.1
CD11b	Up TTGGAGTTGCCTGTGAAGTACG Lo TCGACAGACACTTGAGAGGTT	NM_012711.1
GFAP	Up CTAGCCCTGGACATCGAGATC Lo TCCTGCTTCGACTCCTTAAT GA	NM_017009.2
MCP1	Up CCACTCACCCTGCTGCTACTCAT Lo TTCTGATCTCACTTGGTTCTGGTC	NM_031530.1
rRANTES	Up GCATCCCTCACCGTCATCCT Lo TAGCTCATCTCCAAATAGTTGAT	NM_031116.3
IFN-γ	Up TGGATGCTATGGAAGGAAAGA Lo GATTCTGGTGACAGCTGGTG	NM_138880.2
rIL6	Up GCAAGAGACTTCCAGCCAGTT Lo CATGATGGCTGTTACATACATCA	NM_012589.2
rIL10	Up TGCTATGTTGCCTGCTTACTG Lo TCAATGCTCCTTGATTCTGG	NM_012854.2
rTGF-β	Up CTCACACCTGCACAGCTCC Lo ACGATCATGTTGGACAACCTGCT	NM_021578.2
rHD-1	Up CCACAGCTCGACAGCATGTC Lo GTTTCGCTCT ATCTCCTCTT CCA	NM_012580.2
INDS	Up GACCAAACCTGTGTGCTGGGA Lo TACTCTGAGGGCTGACACAAGG	NM_012611

Table 2 Antibodies used in this study

Specificity	Host	Clone	Dilution	Target cells	Origin
CD11b	Mouse	Ox42	Supernatant	Macrophages, microglial cells	1
Porcine NF70	Mouse	DP5	10 µg/ml	Porcine neurons	2
T-cell receptor α-β chain	Mouse	R73	Supernatant	T cells	1
TH	Rabbit	Polyclonal	0.1 µg/ml	Dopaminergic neurons	3
Mouse IgG (FITC)	Goat	Polyclonal	1.5 µg/ml		4
Mouse IgG (Biot)	Horse	Polyclonal	1 µg/ml		4
Rabbit IgG (FITC)	Donkey	Polyclonal	3 µg/ml		4
Rabbit IgG (Biot)	Goat	Polyclonal	2.2 µg/ml		4

1, European Collection of Cell Culture, Salisbury, UK; 2, Université Paris VII, Paris, F; 3, Pelfreeze, Rogers, AR, USA; 4, Jackson Immunoresearch, Cambridgeshire, UK.

number of TH-positive cells was counted at three different levels of the SNc using, as a reference point, the exit of the third nerve (200 µm rostral and caudal to this site). Cell counting was performed with the Mercator stereology software (Explora nova, La Rochelle, France). The percentage of loss was expressed as the number of TH<sup>+</sup> cells on the unlesioned side minus the number of TH<sup>+</sup> cells on the lesioned side, divided by the number TH<sup>+</sup> cells at the unlesioned side, and multiplied by 100. The results were analysed by two-way *anova*.

## Results

### MSC promote the long-term survival of porcine mesencephalic neuroblasts following their implantation into the striatum of immunocompetent rats

The immunosuppressive and neurotrophic activities of the MSC derived from the bone marrow of Lewis 1A rats prompted us to test their efficiencies to promote the survival of intracerebral xenotransplants. For this purpose, pNb were transplanted into the striata of Lewis 1A rats, with or without Lewis 1A rMSC and the experiments were designed to use the same total number of transplanted cells in all conditions. Survival of the graft was analysed at 28, 35, 42, 63 and 120 days post-transplantation, with a minimum of five rats for each time-point. The presence of porcine neurons in the rat striatum was controlled for using an antibody that specifically recognizes the porcine neurofilament 70 kD subunit (NF70<sup>+</sup>). Infiltration of the graft by T lymphocytes was investigated using R73, an antibody directed against the T-cell receptor. As illustrated in Figure 1, a combination of these two labellings provides a good evaluation of the graft status. At early stages, such as D28, pNb grafts were usually homogeneous with numerous NF70<sup>+</sup> cells and no T cells (NF70<sup>+</sup>/R73<sup>-</sup>, healthy graft). At intermediate stages, such as D35, pNb grafts were often heterogeneous. Porcine neurons were still present, but the graft was clearly infiltrated by R73<sup>+</sup> cells

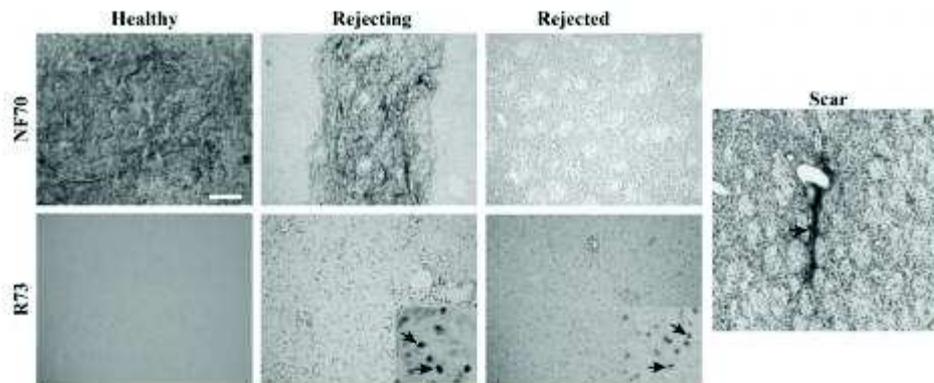
(NF70<sup>+</sup>/R73<sup>+</sup>, rejecting graft). At later stages, such as D42, NF70-positive labelling was no longer visible, but R73<sup>+</sup> cells were still present (NF70<sup>-</sup>/R73<sup>+</sup>, rejected graft). As indicated in Table 3, variations in this timing existed between animals, but the rejection process in Lewis 1A rats transplanted with pNb was systematically completed at D63. At this time, only a scar was observed (Scar). The presence of MSC significantly impaired this rejection process. Indeed, all the pNb/MSC grafts looked healthy at D35 and 50% of the rats transplanted with both pNb and rMSC exhibited healthy grafts at D120 (Table 3).

### Characterization of pNb-MSC cografts

In the rats transplanted with pNb, all the transplants exhibited NF70<sup>+</sup> cells at D28 (Fig. 2A and C). In contrast, no NF70<sup>+</sup> cells were detected in any of the cotransplants at D28 (Fig. 2B and D). NF70<sup>+</sup> cells were found in the cotransplants from D35, but only in two of six rats. This percentage increased with time, reaching 100% at D42 (Fig. 2B). Interestingly, TH<sup>+</sup> cells were detected in all grafts as soon as they became immunopositive for NF70. In rats transplanted with pNb, TH<sup>+</sup> cells were found in all transplants at D28. In rats cotransplanted with pNb and MSC, TH<sup>+</sup> cells were detected at D35, but only in the two animals that were immunopositive for NF70. At D63 and D120, all of the healthy cotransplants exhibited clear NF70<sup>+</sup> immunostaining and showed TH<sup>+</sup> cells (Fig. 2E–H). To evaluate the potential migration of the MSC in the brain, the experiment was performed with GFP-MSC [17]. Thirty-five days after the transplantation of pNb and GFP-MSC into the rat striatum, fluorescent MSC were only observed within the graft. No migration of transplanted MSC was detected (data not shown).

### Characterization of the host cellular immune response

To characterize the cellular immune response, immunohistochemistry was performed with antibodies directed against activated microglial



**Fig. 1** Histological assessment of pNb graft status using pNF70 and R73 antibodies. Healthy grafts exhibit no signs of degeneration, a clear NF70 immunostaining and no (–) or low (+/–) R73 cells (NF70<sup>+</sup>/R73<sup>–</sup>, Healthy). Rejecting grafts are invaded by numerous T cells (enlargement in the insert), but porcine neurons are still present and express pNF70 (NF70<sup>+</sup>/R73<sup>+</sup>, Rejecting). Rejected grafts are characterized by the disappearance of pNF70<sup>+</sup> cells, whereas R73<sup>+</sup> cells are still observed (enlargement in the insert) (NF70<sup>–</sup>/R73<sup>+</sup>). When the rejection process is complete, the T cells have totally disappeared and the graft has become a scar (Scar).

**Table 3** Graft survival in rats grafted with pNb or pNb+MSC

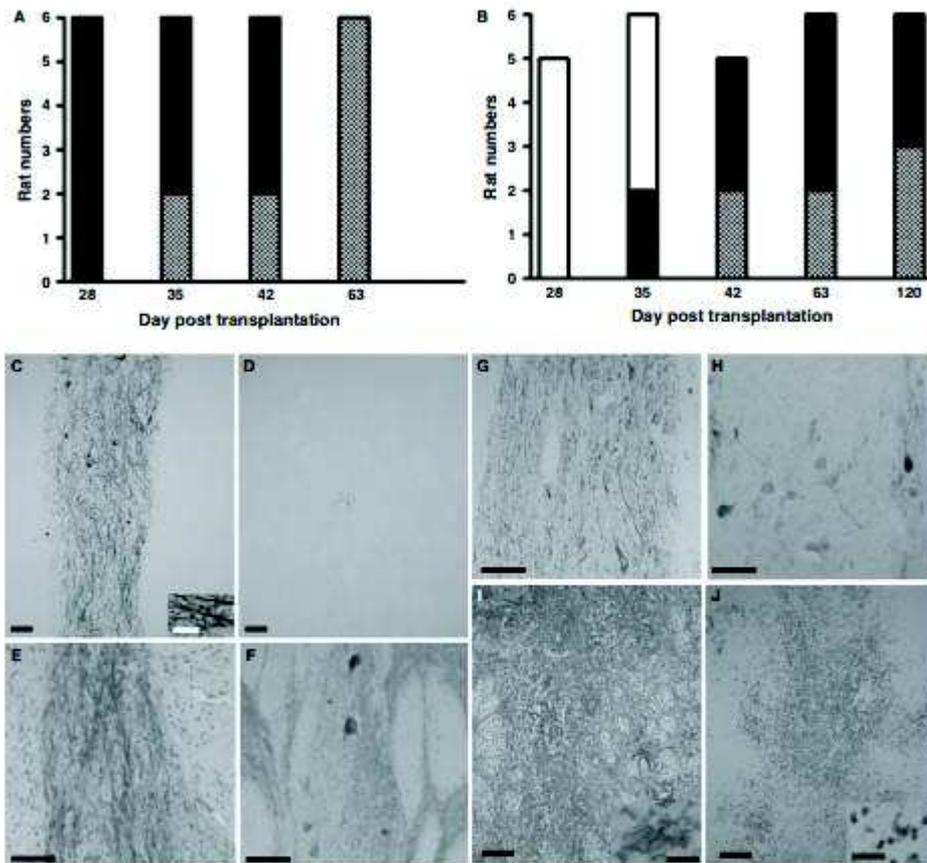
	D28		D35		D42		D63		D120
	–	+	–	+	–	+	–	+	+
MSC									
Number of rats	6	5	6	6	6	5	6	6	6
NF70 <sup>+</sup> /CV <sup>+</sup> /R73 <sup>–</sup>	4	5	1	6	2	1	0	2	3
NF70 <sup>+</sup> /R73 <sup>+/–</sup>	1	0	3	0	0	2	0	1	0
NF70 <sup>+</sup> /R73 <sup>+</sup>	1	0	1	0	2	0	0	1	0
NF70 <sup>–</sup> /R73 <sup>+</sup>	0	0	1	0	2	1	0	1	0
Scar	0	0	0	0	0	1	6	1	3

The graft status was assessed using cresyl violet, NF70 and R73 staining. CV<sup>+</sup>/R73<sup>–</sup> and NF70<sup>+</sup>/R73<sup>–</sup> are considered as healthy graft with no (–) or low (+/–) amount of R73 T cells, no sign of degeneration (CV<sup>+</sup>) and/or a clear expression of the porcine neurofilament in neurons (NF70<sup>+</sup>). NF70<sup>+</sup>/R73<sup>+</sup> and NF70<sup>–</sup>/R73<sup>+</sup> grafts are considered as rejecting and rejected graft respectively. Scar corresponds to the stage of almost complete disappearance of the graft. R73<sup>+/–</sup> corresponds to a brain with 1–10 T cells per section.

cells/macrophages (Ox42) and T cells (R73). As previously described, the transplantation of pNb into the striatum of adult immunocompetent rats induced a strong cellular response characterized by a massive infiltration of the graft by T cells and activated microglial cells between D28 and D42. In the rats cografied with MSC, infiltration of the graft by T cells (Fig. 2J) was never observed before D42 (Table 3), and at D120 50% of these animals exhibited healthy grafts without any T cells.

To evaluate the impact of MSC on inflammatory markers, the striata of rats transplanted with pNb or pNb+MSC were collected at 28, 35, 42 or 63 days post-transplantation for RNA analyses. Seven or eight animals were culled for each time-point in a given group. Striata

from six sham-operated rats were used to determine the basal levels (control). We first analysed the expression of C $\beta$  and CD11b as markers of T-cell infiltration and microglial cell activation respectively (Fig. 3). In rats transplanted with pNb, a sixfold and threefold increase in the levels of C $\beta$  and CD11b mRNA was observed at D35, respectively, as compared with the basal levels in control rats. At later stages, such as D42 or D63, C $\beta$  and CD11b mRNAs had returned to basal levels. In contrast, we did not observe significant increases in the levels of C $\beta$  and CD11b in the rats transplanted with both pNb and MSC at any of the stages analysed. To evaluate a potential impact of MSC on host reactive astrocytes, we analysed the expression of rat GFAP transcripts. The results showed an up-regulation of GFAP mRNA



**Fig. 2** Immunohistological analyses of the xenotransplants. (A–B) Numbers of rats grafted with pNb (A) or pNb and MSC (B), displaying an NF70-negative healthy graft (white bar), an NF70-positive graft (black bar) or a rejected graft (grey bar). (C–H) Representative micrograph of healthy grafts following the transplantation of pNb alone (C) or in the presence of MSC (D–H). At D28, NF70 immunostaining was observed in the pNb graft (C), whereas no NF70<sup>+</sup> cells were observed in the co-grafts (D). At later stages, such as D63 (E and F) and D120 (G and H), the co-grafts were strongly immunopositive for NF70 (E and G) and exhibited TH<sup>1</sup> cells (F and H). (I and J) Representative micrograph of a pNb-MSC co-graft undergoing rejection. The grafts were immunostained with OX42 (I) or R73 (J). Scale Bars: C–H, 50  $\mu$ m; I and J, 150  $\mu$ m; insert, 25  $\mu$ m.

at D28, preceding the peak of CD11b and C $\beta$ . The levels of GFAP transcripts further increased, reaching a 5.4-fold increase at D35 and remaining significantly increased at D42. In the rats transplanted with both pNb and MSC, a significant increase in the levels of GFAP mRNA was observed only at D35, and this increase was only 1.7-fold.

We next analysed the expression of chemokines and cytokines that might favour or inhibit the host immune response (Fig. 4). As reported in Figure 5, MCP1 and Rantes were significantly up-regulated

at D35 in pNb-grafted animals, and the up-regulation of these two chemokines was correlated with the peak expression of C $\beta$  and CD11b. We also found, at D28, an up-regulation of the pro-inflammatory cytokines, INF $\gamma$  and IL-6, which preceded the up-regulation at D35 of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$ . The levels of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) remained high up to D42 and then strongly decreased, whereas IL-6 returned to its basal level before a second up-regulation at D63. A high level of IL-10 was also observed from

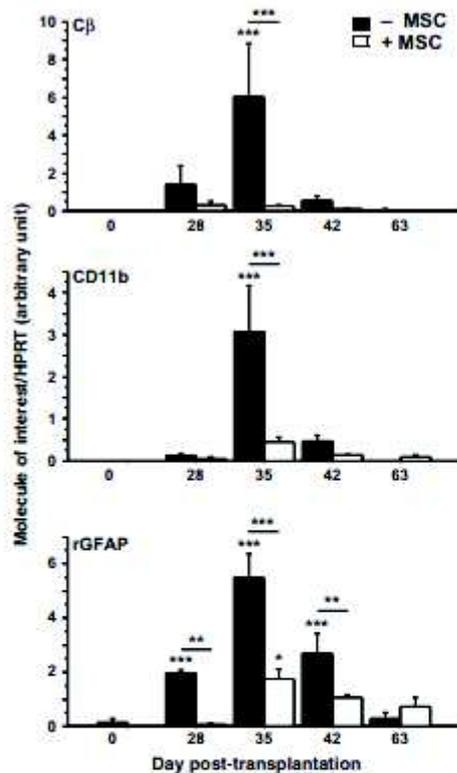


Fig. 3 Relative expression of C $\beta$ , CD11b and GFAP mRNAs in grafted animals. Total RNAs from striata grafted with pNb (-MSC), or pNb + MSC (+MSC), were collected at days 28, 35, 42, 63 ( $n = 7/8$  per group per day) and submitted to qPCR. D0 corresponded to ungrafted animals ( $n = 6$ ). Mean values  $\pm$  SEM are presented (ANOVA test, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

D35 to D63, whereas TGF- $\beta$  returned to its basal level as early as D42. Interestingly, we did not observe any of these regulations in the rats that received both pNb and MSC. The levels of MCP1 and RANTES (CCL5), as well as the levels of the four studied cytokines, were not significantly different from their basal levels in control animals at any of the time-points determined. To further characterize the immunomodulatory mechanism triggered by rat MSC in our experimental model, we analysed the expression of iNOS and HO1, two enzymes previously shown to be mediators of MSC function. As shown in Figure 4, the mRNAs of both of these enzymes were up-regulated in the striata of rats grafted with pNb, with the difference that HO1 expression increased between D28 and D42, whereas the level of iNOS

increased between D35 and D63. Interestingly, in the presence of MSC, the up-regulation of HO1 was not observed, whereas the up-regulation of iNOS mRNA still occurred.

### Effect of cografting on the motor behaviour of 6-OHDA-lesioned rats

To evaluate the functional impact of a pNb-*MSC* cotransplant, the cells were transplanted in a rat model of Parkinson's disease. Rats lesioned by unilateral injection of 6-OHDA were selected on the basis of their response to the dopaminergic agonist, apomorphine. Post-mortem analysis confirmed a minimum of 90% loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta ipsilateral to the lesion (Fig. 5A and C). Lesioned rats were transplanted with pNb, or pNb + *MSC* and motor recovery was assessed every 15 days using the cylinder test. Sham-operated rats were used as controls, but 6-OHDA-lesioned rats were also transplanted with  $1 \times 10^6$  rMSC to evaluate a potential impact of this amount of *MSC* on the motor behaviour. As shown in Figure 5B, no recovery was observed in the rats transplanted with *MSC* or pNb alone. In contrast, significant signs of motor improvement were observed at D90 and D105 in the group of rats that received both pNb and *MSC*. As the beneficial effect was no longer significant at D120, the rats were divided according to the presence or absence of transplant. At D120, the rats displayed either a scar (Fig. 5G) or a healthy transplant with NF70\* (Fig. 5E) and TH\* (Fig. 5F) cells. Intermediate stages were not observed. No activated microglial cells were observed in the control or pNb-*MSC*-transplanted rats. Inclusion of this parameter in the interpretation of the behavioural tests clearly showed significant recovery in rats displaying a healthy transplant (Fig. 5D). The rats that exhibited a healthy graft were those that presented the best performance in the cylinder test, whereas the performance of the rats that had rejected their graft was similar to that of the lesioned group that received vehicle (control). Motor recovery in 6-OHDA-lesioned rats was, therefore, correlated with the long-term survival of the pNb-*MSC* transplants.

### Discussion

Our present paper provides the first evidence that cotransplantation of syngeneic *MSC* with xenogeneic neuroblasts promotes the long-term survival of xenografted neurons and allows motor recovery in a rat model of Parkinson's disease. Behavioural improvement has previously been observed after the transplantation of pNb into the striatum of lesioned rats, but the animals were always treated with high doses of classic immunosuppressors [5, 20, 21]. Here, we show that pNb cotransplanted with rMSC can survive up to 120 days without systemic immunosuppression. This prolonged survival is most probably the result of an immunosuppressive activity, as the loss of xenografted neurons is because of a massive and sudden host immune response at 4–6 weeks [2, 4]. This observation is supported by the description of *MSC* as potent immunosuppressors, acting at different levels of the immune response [13, 14]. Human *MSC* alter the

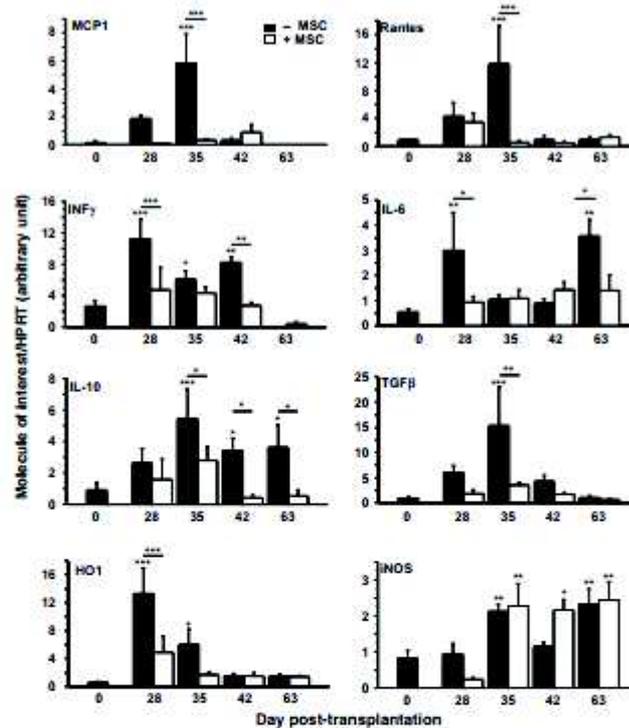
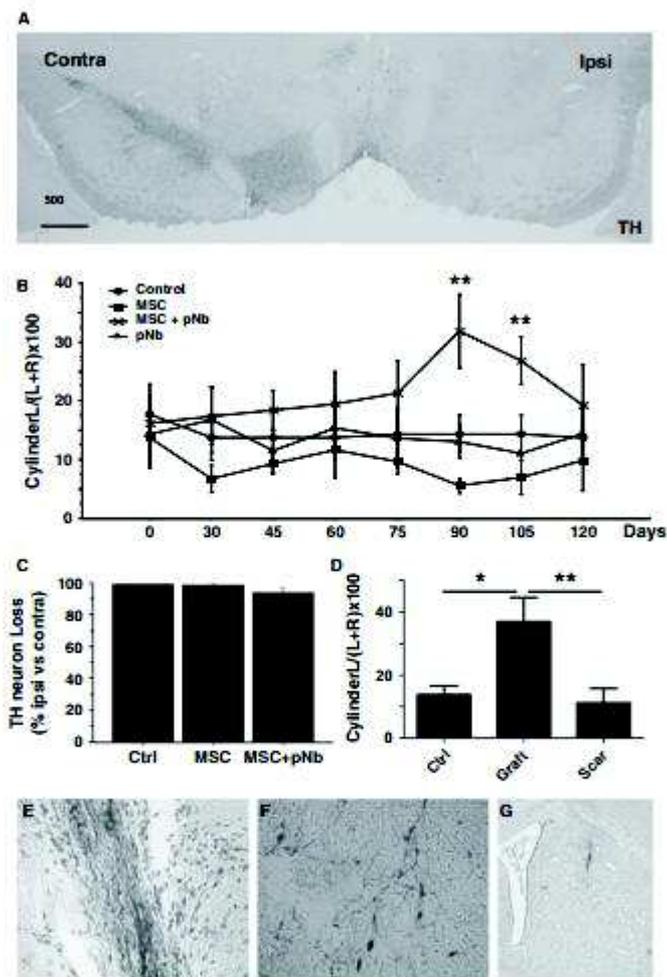


Fig. 4 Relative transcriptional expression of chemokines, cytokines and cytoprotective enzymes in grafted animals. Total RNAs prepared from the striata of rats transplanted with pNb (-MSC), or pNb + MSC (+MSC), were collected at days 28, 35, 42, 63 and submitted to qPCR ( $n = 7/8$  per group per day). D0 corresponds to untransplanted animals ( $n = 6$ ). Mean values  $\pm$  SEM are presented (ANOVA test, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

maturation of dendritic cells as well as their ability to present antigens to T cells, which is a key point of their activation [22]. They are also able to inhibit T-cell proliferation and to affect the differentiation of B cells into plasmacytes [23]. The MSC isolated from the bone marrow of Lewis 1A rats share similar immunosuppressive properties, as illustrated by their ability to inhibit the proliferation of *in vitro*-activated T cells and by the limited host immune response in pNb/ MSC-grafted rats. Indeed, numerous cellular and molecular events that are usually induced by the implantation of pNb in the rat brain are not observed or are strongly reduced in the presence of MSC. For instance, the accumulation of GFAP mRNA that precedes cell rejection in pNb-grafted rats is strongly reduced in co-grafted rats, suggesting an inhibition of astroglial activation. The absence of a significant increase in C3i and CD11b levels at the analysed time-points probably reflects a direct or indirect inhibitory effect of MSC on T lymphocyte and microglial cell activation. *In vitro* analyses raise the possibility of

an effect through the secretion of anti-inflammatory molecules such as TGF- $\beta$ 1 or IL10 [16]. However, *in vivo* analyses did not reveal up-regulation of such anti-inflammatory molecules. On the contrary, we observed a general abolition of pro- and anti-inflammatory signals. Indeed, MCP1, RANTES, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  and HO-1 remained at their basal levels in the striata of rats grafted with both pNb and MSC in contrast to their up-regulation at around D35 in the brains of pNb-grafted rats. Only one molecule was up-regulated in both groups: iNOS. This molecule might be implicated in the immunosuppressive effects of MSC through the production of NO. Indeed, Ren *et al.* revealed a major role of iNOS in the immunosuppressive properties of mouse MSC [24] and exacerbation of the EAE inflammatory response has been observed in mice deficient for iNOS [25]. The mechanism of action remains to be fully determined, but NO was reported to be a potent inhibitor of T-cell proliferation [26, 27] and leucocyte adhesion on the endothelial cell layer [28]. A local



**Fig. 5** Functional recovery of 6-OHDA-lesioned rats. Rats unilaterally lesioned with 6-OHDA were transplanted with MSC, pNb, pNb-MSC, or vehicle (Control), and tested for motor recovery. (A) TH neuronal loss in the substantia nigra. TH immunostaining showing the loss of TH<sup>+</sup> neurons in the substantia nigra ipsilateral (right) to the lesion. (B) Forelimb asymmetry was tested every 15 days with the cylinder test. Data are expressed as percentage of limb preference for the contralateral (left) forepaw.  $n = 8$  per group, except  $n = 13$  for the MSC + pNb group, mean value  $\pm$  SEM (ANOVA test,  $^{***}P < 0.01$ ). (C) The neuronal loss as a result of the 6-OHDA lesion was estimated by counting the numbers of TH<sup>+</sup> cells in the substantia nigra of rats transplanted with MSC, with MSC+pNb, or untransplanted rats. Mean values  $\pm$  SEM are presented. (D) Functional recovery according to the presence of transplant. Cylinder test scores at D120 were expressed according to the presence (Graft,  $n = 4$ ) or absence (Scar,  $n = 9$ ) of healthy graft in the rat striatum, and compared with the vehicle group (Ctrl,  $n = 8$ ). Mean values  $\pm$  SEM are presented (one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ). (E–G) At D120, transplanted rats exhibited either a healthy graft with NF70<sup>+</sup> (E, NF staining) and TH<sup>+</sup> (F, TH staining) neurons or a scar (G, cresyl violet staining).

overexpression of iNOS by MSC in the cograft might, therefore, favour the long-term survival of the intracerebral xenograft, but molecules other than NO are most probably implicated. Thus, further studies will be required to fully characterize the mechanisms by which MSC promote the long-term survival of xenografted pNb.

Neural stem/progenitor cells (NSPC) also display immunosuppressive properties and show prolonged survival in the brains of xenogenic hosts [19, 29]. As they can generate neurons, these cells are considered to be a potential cell source for restorative strategies, but, in fact, very few pNSPC differentiate spontaneously into dopaminergic neurons *in vivo* [19]. We, thus, considered combining the ability of ventral mesencephalic neuroblasts to generate dopaminergic neurons and the immunosuppressive properties of MSC. The long-term survival of these cotransplants in the brains of xenogenic hosts and their functional effects in a rat model of Parkinson's disease suggest that the intracerebral implantation of 100,000 MSC with 300,000 pNb might be a good basis to develop new restorative strategies with high efficiency

and low detrimental secondary effects. Characterization of the mechanisms by which locally implanted MSC contribute to motor recovery in immunocompetent rats should be of great help to optimize such strategies.

## Acknowledgements

We are grateful to Dr. P. Brachet and Dr. I. Anegón for their support. The work was supported by the "Association Française contre les Myopathies" (AFM) and the Centaure Foundation. XL and EM were supported by the Progreffe Foundation and by the "Fédération des Groupements de Parkinsoniens": CECAP.

## Disclosure

The authors indicate no potential conflicts of interest.

## References

- Kryskowiak P, Gaura V, Labalette M, et al. Alk1 immunisation to donor antigens and immune rejection following foetal neural grafts to the brain in patients with Huntington's disease. *PLoS ONE*. 2007; 2: e166.
- Rémy S, Casova C, Daguin-Nerrière V, et al. Different mechanisms mediate the rejection of porcine neurons and endothelial cells transplanted into the rat brain. *Xenotransplantation*. 2001; 8: 136–48.
- Melchior B, Rémy S, Nerrière-Daguin V, et al. Temporal analysis of cytokine gene expression during infiltration of porcine neuronal grafts implanted into the rat brain. *J Neurosci Res*. 2002; 68: 284–92.
- Michel DC, Nerrière-Daguin V, Josien R, et al. Dendritic cell recruitment following xenografting of pig fetal mesencephalic cells into the rat brain. *Exp Neurol*. 2006; 202: 78–84.
- Galpern WR, Burns LH, Deacon TW, et al. Xenotransplantation of porcine fetal ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease: functional recovery and graft morphology. *Exp Neurol*. 1996; 140: 1–13.
- Larsson LC, Widner H. Neural tissue xenografting. *Scand J Immunol*. 2000; 52: 249–56.
- Deacon T, Schumacher J, Dinmore J, et al. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat Med*. 1997; 3: 350–3.
- Fink JS, Schumacher JM, Elias SL, et al. Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant*. 2000; 9: 273–8.
- Schumacher JM, Elias SA, Palmer EP, et al. Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology*. 2000; 54: 1042–50.
- Michel-Monigadon D, Nerrière-Daguin V, Lériqgue X, et al. Minocycline promotes long-term survival of neuronal transplant in the brain by inhibiting late microglial activation and T-cell recruitment. *Transplantation*. 2010; 89: 816–23.
- Aizri SA, Stokes D, Augelli BJ, et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 3908–13.
- Rossignol J, Boyer C, Thirard R, et al. Mesenchymal stem cells induce a weak immune response in the rat striatum after allo or xenotransplantation. *J Cell Mol Med*. 2009; 13: 2547–58.
- Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol*. 2007; 28: 219–26.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 726–36.
- Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005; 106: 1755–61.
- Lescaudron L, Boyer C, Bonnamain V, et al. Assessing the potential clinical utility of transplantations of neural and mesenchymal stem cells for treating neurodegenerative diseases. *Methods Mol Biol*. 2012; 879: 147–64.
- Rémy S, Tesson L, Usal C, et al. New lines of GFP transgenic rats relevant for regenerative medicine and gene therapy. *Transgenic Res*. 2010; 19: 745–63.
- Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, et al. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*. 2000; 39: 777–87.
- Michel-Monigadon D, Bonnamain V, Nerrière-Daguin V, et al. Tropic and immunoregulatory properties of neural precursor cells: benefit for intracerebral transplantation. *Exp Neurol*. 2011; 230: 35–47.
- Huffaker TK, Boss BD, Morgan AS, et al. Xenografting of fetal pig ventral mesencephalon corrects motor asymmetry in the rat model of Parkinson's disease. *Exp Brain Res*. 1989; 77: 329–36.
- Larsson LC, Czech KA, Brundin P. Intrastriatal ventral mesencephalic xenografts of porcine tissue in rats: immune responses and functional effects. *Cell Transplant*. 2000; 9: 261–72.
- Maccario R, Moretta A, Cometa A, et al. Human mesenchymal stem cells and cyclosporin A exert a synergistic suppressive effect on *in vitro* activation of alloantigen-specific cytotoxic lymphocytes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005; 11: 1031–2.
- Carcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006; 107: 367–72.

24. Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008; 2: 141–50.
25. Fenyk-Melody JE, Garrison AE, Brunnert SR, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated in mice lacking the NOS2 gene. *J Immunol*. 1998; 160: 2940–6.
26. Albina JE, Abate JA, Henry WL Jr. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *J Immunol*. 1991; 147: 144–8.
27. Krenger W, Falzarano G, Delmonte J Jr, et al. Interferon-gamma suppresses T-cell proliferation to mitogen via the nitric oxide pathway during experimental acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1996; 88: 1113–21.
28. Kabes P, Kurose I, Granger DR. NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion but not P-selectin-dependent rolling in post-ischemic venules. *Am J Physiol*. 1994; 267: H601–7.
29. Bonnamain V, Mathieux E, Thineard R, et al. Expression of heme oxygenase-1 in neural stem/progenitor cells as a potential mechanism to evade host immune response. *Stem Cells*. 2012; 30: 2342–53.

# Thèse de Doctorat

Laëtitia KERMARREC

## *Etude des interactions entre le Système Nerveux Entérique et le Système Immunitaire en conditions physiologique et pathologique*

### Résumé

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont multifactorielles et la potentielle implication de l'interleukine 7 (IL-7) dans ces affections intestinales, nous a incités à étudier cette cytokine dans l'intestin de patients atteints de MICI. Une augmentation de l'IL-7 et de la sous-unité alpha de son récepteur (IL-7R $\alpha$ ) a été observée dans les zones inflammatoires de biopsies coliques prélevées chez des patients atteints de rectocolite hémorragique ou affectés par la maladie de Crohn. Cette augmentation pourrait affecter les cellules du système nerveux entérique car nous avons détecté une expression de l'IL-7 par les cellules gliales entériques (CGE) in vitro ainsi qu'une expression de l'IL-7R $\alpha$  dans les ganglions sous-muqueux. Une production d'IL-7 par les CGE a été confirmée in vivo chez le rat avec notamment la mise en évidence de différents variants d'épissage et d'isoformes qui présentent des spécificités d'expression au sein du plexus sous-muqueux. Les fonctions de ces différents isoformes produites par les CGE restent à déterminer mais une première série d'expérience nous a permis de montrer que les CGE pouvaient participer à l'homéostasie immunitaire du tractus gastro-intestinal en régulant l'activité des lymphocytes. En effet, des CGE humaines cultivées en présence de lymphocytes T activés inhibent leur prolifération et cette activité immunosuppressive est encore plus importante avec des CGE issues de patients atteints de la maladie de Crohn. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives quant aux rôles des CGE au sein de la paroi intestinale ainsi qu'aux mécanismes mis en jeu dans des pathologies de type MICI.

### Mots clés

Maladies inflammatoires chroniques intestinales, Système nerveux entérique, Système immunitaire, Cellules gliales entériques, Lymphocytes T, Interleukine 7

### Abstract

Inflammatory bowel diseases (IBD) are multifactorial and the potential implication of interleukin-7 (IL-7) in these inflammatory disorders prompts us to study this cytokine in the bowel of patients with IBD. An increase of IL-7 and of its alpha subunit receptor (IL-7R $\alpha$ ) was found in the inflammatory areas of colic biopsies from patients with ulcerative colitis (UC) or Crohn's disease (CD). This increase could affect cells of the enteric nervous system (ENS) as IL-7R $\alpha$  was detected in the submucosal ganglia. A role of IL-7 in the ENS was further suggested by the fact that human enteric glial cells (EGC) expressed this interleukine. These observations were confirmed in the rat with the identification of new IL-7 splicing variants and isoforms that exhibited specific expression within the submucosal ganglia. Functions of these IL-7 isoforms produced by EGC in vitro and in vivo remain to be determined but we showed that EGC could participate to the homeostasis of the gastrointestinal tract by regulating the activity of immune cells. Indeed, human EGC co-cultured with activated T lymphocytes inhibited their proliferation, and interestingly, this immunosuppressive effect was stronger with EGC derived from patients with CD. These results offer new perspectives about EGC functions within gut wall as well as mechanisms involved in pathologies like IBD.

### Key Words

Inflammatory bowel disease, Enteric nervous system, Immune system, Enteric glial cells, T lymphocytes, interleukin 7