

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**CONTROLE DES FONCTIONS DES CELLULES
EPITHELIALES INTESTINALES PAR LES
CELLULES GLIALES ENTERIQUES.**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : Biologie – Santé
Discipline : Biologie – Médecine – Santé
Spécialité : Biologie Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Laurianne Van Landeghem

Le 27 février 2009, devant le jury ci-dessous

Président

Pr Jean-Paul GALMICHE, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Nantes
Rapporteurs

Dr Michèle KEDINGER, Directeur de Recherches INSERM, Strasbourg

Dr Jean FIORAMONTI, Directeur de Recherches INRA, Toulouse

Examinateurs

Dr Muriel JACQUIER-SARLIN, Maître de Conférences des Universités, Grenoble

Pr Jean-Paul GALMICHE, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Nantes

Directeurs de thèse

Dr Michel NEUNLIST, Directeur de Recherches INSERM, Nantes

Pr Pascal DERKINDEREN, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Nantes

« We now know that there is a brain in the bowel, however inappropriate that concept might seem to be. The ugly gut is more intellectual than the heart and may have a greater capacity for “feeling”.

[...]

It is reasonable to ask why anyone should care that we all have a second brain where we least expected to have one. The answer, of course, is that we should care about our second brain for the same reasons we care about our first. Descartes may have said, “I think, therefore I am”, but he only said that because his gut let him. The brain in the bowel has got to work right or no one will have the luxury to think at all. No one thinks straight when his mind is focused on the toilet”

Michael Gershon, “The Second Brain”, 1999

SOMMAIRE

Liste des Abréviations.....	3
Introduction générale.....	4
Etude bibliographique	6
 1. La barrière épithéliale intestinale.....	6
1.1. Présentation générale de la barrière épithéliale intestinale	6
1.1.1. Organisation cellulaire de la barrière épithéliale intestinale	7
1.1.2. Les cellules spécialisées de la barrière épithéliale intestinale et fonctions associées	11
1.1.2.1. Les cellules souches épithéliales intestinales	12
1.1.2.2. Les entérocytes	15
1.1.2.3. Les cellules mucusécrétantes	15
1.1.2.4. Les cellules entéroendocrines.....	16
1.1.2.5. Les cellules de Paneth	16
1.1.3. Le maintien de la barrière épithéliale intestinale.....	17
1.1.3.1. Les interactions de type cellule-cellule.....	18
1.1.3.2. Les interactions de type cellule-matrice	20
1.2. L'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale.....	23
1.2.1. Le renouvellement de la barrière épithéliale intestinale	23
1.2.1.1. La prolifération des cellules épithéliales intestinales	23
1.2.1.2. La différenciation des cellules épithéliales intestinales.....	27
1.2.1.3. La mort des cellules épithéliales intestinales.....	30
1.2.2. La réparation de la barrière épithéliale intestinale	30
1.2.3. FAK: protéine majeure de la régulation de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale.....	33
1.2.3.1. Description de la structure moléculaire de FAK.....	33
1.2.3.2. Activation de FAK	35
1.2.3.3. Régulation de l'activation de FAK	36
1.2.3.4. Partenaires protéiques de FAK et conséquences fonctionnelles.....	37
1.2.3.5. FAK et le contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale	39
1.3. L'influence du microenvironnement cellulaire sur les fonctions de la barrière épithéliale intestinale	42
1.3.1. Les difficultés de l'étude de l'influence du microenvironnement cellulaire	44
1.3.2. Contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale par la matrice extracellulaire.....	45
1.3.3. Contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale par les myofibroblastes.....	50

SOMMAIRE

2. Le système nerveux entérique.....	53
2.1. Découverte du système nerveux entérique.....	53
2.2. Anatomie du système nerveux entérique	54
2.3. Ontogénèse du système nerveux entérique.....	56
2.4. Contrôle des fonctions du tube digestif par les neurones entériques.....	60
2.4.1. Morphologie et marqueurs des neurones entériques	60
2.4.2. Contrôle du péristaltisme.....	62
2.4.3. Contrôle de la sécrétion d'électrolytes et de mucus.....	67
2.4.4. Contrôle de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale	70
2.4.4.1. Contrôle de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale.....	70
2.4.4.2. Contrôle de la prolifération des cellules épithéliales intestinales par les neurones entériques.....	71
2.5. Les cellules gliales entériques.....	72
2.5.1. Présentation générale de la cellule gliale entérique	72
2.5.2. Marqueurs des cellules gliales entériques	77
2.5.3. Interactions neuro-gliales.....	78
2.5.4. Interactions glio-épithéliales	81
2.5.5. Lésions des cellules gliales entériques au cours des pathologies digestives et conséquences fonctionnelles	83
2.5.5.1. Atteinte des cellules gliales au cours des pathologies digestives	83
2.5.5.2. Conséquences fonctionnelles de lésions du réseau glial	86
Objectifs de l'étude et résultats	90
Article 1 : Les cellules gliales entériques inhibent la prolifération des cellules épithéliales intestinales en partie via la sécrétion de TGF-β1	92
Article 2 : Contrôle du transcriptome des cellules épithéliales intestinales par les cellules gliales entériques : impact sur les fonctions de la barrière épithéliale intestinale.....	96
Article 3 : Les cellules gliales entériques favorisent la réparation de la barrière épithéliale intestinale via l'activation de FAK et la libération de proEGF.....	100
Discussion et Conclusion.....	104
1. La cellule gliale entérique: acteur du microenvironnement cellulaire de la barrière épithéliale intestinale en physiologie.....	104
2. La cellule gliale entérique: un acteur impliqué dans les pathologies digestives? .	110
Conclusions générales et perspectives	113
Annexe : Interactions neuro-gliales dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Revue)	116
Références bibliographiques.....	117

LISTE DES ABREVIATIONS

5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
ACh	Acétylcholine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
BEI	Barrière épithéliale intestinale
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CCR	Cancers colorectaux
CEI	Cellules épithéliales intestinales
CGE	Cellules gliales entériques
CGRP	Calcitonin-gene related peptide
ChAT	Choline acétyltransferase
CIC	Cellules interstitielles de Cajal
CO	Monoxyde de carbone
DSS	Dextran sodium sulfate
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAK	Focal adhesion kinase
FRNK	FAK-related non kinase
GABA	Gamma amino butyric acid
GDNF	Glial-derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GSNO	S-nitrosoglutathione
HSV-TK	Herpes simplex virus-thymidine kinase
IL	Interleukines
IPAN	Intrinsic primary afferent neurons
MC	Milieu conditionné
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MMP	Matrix metalloprotéinases
NEC	Necrotizing enterocolitis
NGF	Neuronal growth factor
NO	Nitric Oxide
NOS	Nitric oxide synthase
RCH	Rectocolite hémorragique
RET	Résistance électrique transépithéliale
S-100β	S-100 calcium-binding protein beta
SII	Syndrome de l'intestin irritable
SNC	Système nerveux central
SNE	Système nerveux entérique
SP	Substance P
TFF	Trefoil Factor
TGF-β	Transforming growth factor beta
TNF	Tumor necrosis factor
TTX	Tétrodotoxine
VIP	Vasoactive intestinal peptide
ZO-1	Zonula Occludens-1

INTRODUCTION GENERALE

L'étude du contrôle nerveux des fonctions digestives, encore appelée neurogastroentérologie, est une science qui s'est considérablement développée ces 30 dernières années. En effet, les études réalisées ont permis de caractériser les différents types de neurones composant le système nerveux de l'intestin ou système nerveux entérique (SNE) grâce à la combinaison d'approches immunohistochimiques et fonctionnelles. En revanche, ces travaux ont largement négligé les cellules gliales entériques (CGE), équivalent des astrocytes du système nerveux central (SNC). Même si ces cellules ont été identifiées en 1899, elles ont principalement été considérées comme des cellules passives et de soutien des neurones. Ce n'est que récemment que les CGE ont suscité un regain d'intérêt, en particulier grâce aux travaux menés dans le cerveau sur les astrocytes. En effet, les astrocytes jouent un rôle majeur dans le contrôle, à la fois des fonctions neuronales, mais aussi dans la régulation des fonctions de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Aussi, au vu de cette constatation, une meilleure caractérisation des CGE et de leurs rôles fonctionnels s'impose.

Les travaux de neurogastroentérologie se sont principalement concentrés sur l'étude du rôle du SNE dans le contrôle des fonctions motrices et sécrétoires de l'intestin. Ce n'est que récemment que son rôle potentiel dans le contrôle d'autres fonctions de la barrière épithéliale intestinale (BEI) a été identifié. En particulier, des travaux ont montré que le SNE participait au maintien de l'homéostasie et aux processus de réparation de la BEI.

La BEI est un élément essentiel du tube digestif. Elle joue un rôle majeur dans le contrôle du passage de nutriments et empêche le passage de pathogènes tout en participant à l'acquisition de la tolérance immunitaire. D'autre part, outre le rôle clef de la BEI en physiologie, des altérations de la BEI sont également un paramètre majeur du développement de pathologies digestives ou extradigestives. Ces atteintes de la BEI combinent des

altérations de la perméabilité, des processus de prolifération ou d'adhésion des cellules épithéliales intestinales (CEI). Un concept émergent en physiologie et physiopathologie est que la régulation et la dysrégulation des fonctions de la BEI pourraient impliquer son microenvironnement, constitué de bactéries, de cellules endothéliales, de fibroblastes, de cellules immunitaires et notamment des cellules du SNE. Néanmoins, le rôle du SNE, et en particulier des CGE, dans le contrôle des fonctions de la BEI demeure peu connu.

Dans ce contexte général, l'objectif de ce travail de thèse était de caractériser l'impact des CGE sur deux processus clefs de la BEI, i.e. la prolifération des CEI et la réparation de la BEI.

Cette thèse est structurée autour de trois articles : un publié, un soumis et un autre en préparation. Ces articles sont précédés d'une étude bibliographique présentant le contexte général du contrôle de la BEI par les CGE. L'étude bibliographique est composée des thèmes suivants :

1. Description des fonctions cellulaires et des acteurs moléculaires impliqués dans l'homéostasie de la BEI
2. Contrôle des fonctions de la BEI par son microenvironnement cellulaire et moléculaire
3. Description du SNE et du contrôle des fonctions du tube digestif par les neurones entériques
4. Présentation des CGE et de leurs interactions fonctionnelles avec les neurones entériques et la BEI.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La barrière épithéliale intestinale

1.1. Présentation générale de la barrière épithéliale intestinale

Le tube digestif est tapissé d'un épithélium, depuis l'œsophage jusqu'au rectum, qui constitue une barrière physique entre l'organisme et son environnement extérieur. Chaque partie du tube digestif présente un épithélium spécialisé dans son organisation morphologique et dans les types de cellules épithéliales qui le composent. Ainsi, l'œsophage présente un épithélium pavimenteux stratifié ou malpighien non kératinisé assurant une fonction de protection contre la friction du bol alimentaire le long de la paroi œsophagienne. Cet épithélium, associé au chorion ou tissu conjonctif, forme une muqueuse qui présente de profonds replis au repos permettant une distension importante de la paroi lors du passage du bol alimentaire. Au niveau de l'estomac, la muqueuse est composée d'un épithélium simple prismatique et forme de nombreux replis longitudinaux permettant une grande distension après les repas. Cet épithélium est composé de cellules spécialisées dans la sécrétion de mucus protégeant la surface de la muqueuse de l'autodigestion due à l'acide chlorhydrique et à la pepsine libérés par les cellules des glandes gastriques sous-jacentes à l'épithélium. Dans cette étude, seul l'épithélium des parois intestinales et coliques, aussi appelé barrière épithéliale intestinale (BEI), sera étudié.

1.1.1. Organisation cellulaire de la barrière épithéliale intestinale

L'intestin est divisé en deux parties : l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et l'intestin distal ou gros intestin (caecum, colon droit, colon transverse, colon gauche et rectum). La valvule iléo-caecale de Bauhin sépare physiquement ces deux organes. La paroi du tube digestif est composée de 4 tuniques distinctes successives: la séreuse, la musculeuse, la sous-muqueuse et la muqueuse recouverte d'un épithélium spécialisé (Figure 1). L'intestin grêle est le lieu d'absorption des nutriments, des électrolytes, des vitamines et de l'eau. Au niveau du colon, les résidus du bol alimentaire non digestibles sont transformés en fèces par réabsorption de l'eau et de sels solubles. Ces fonctions distinctes assurées par l'intestin grêle et le colon sont notamment permises par des spécialisations morphologiques et cellulaires de l'épithélium de revêtement de ces deux parties du tube digestif (Figures 2 et 3).

Au niveau de l'intestin grêle, la muqueuse intestinale offre une surface d'échanges très importante avec la lumière intestinale qui favorise l'efficacité d'absorption des nutriments. Ceci est permis par 3 niveaux d'organisation de la muqueuse : les plis circulaires transversaux ou valvules conniventes de 1 cm de haut, les villosités intestinales de 0,5 à 1 mm de haut (Figure 2) et les microvillosités de la bordure en brosse des entérocytes de 1 à 2 μm de haut visibles en microscopie électronique (Figure 3). Au niveau du colon, la muqueuse est plane ponctuée d'invaginations cryptiques (Figure 2).

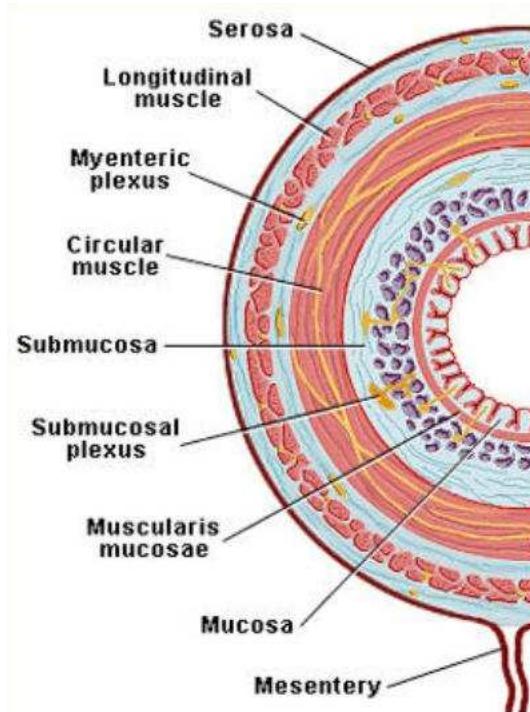


Figure 1: Schéma de la paroi intestinale

La paroi du tube digestif est composée de 4 tuniques distinctes successives: la séreuse (serosa), la musculeuse (longitudinal muscle ; circular muscle), la sous-muqueuse (submucosa) et la muqueuse (muscularis mucosae ; mucosa) recouverte d'un épithélium spécialisé. D'après Ginsburg, J.M. and Costoff, A (Section VI, Gastrointestinal Physiology in Essentials of Human Physiology edited by Nosek, T.M.).

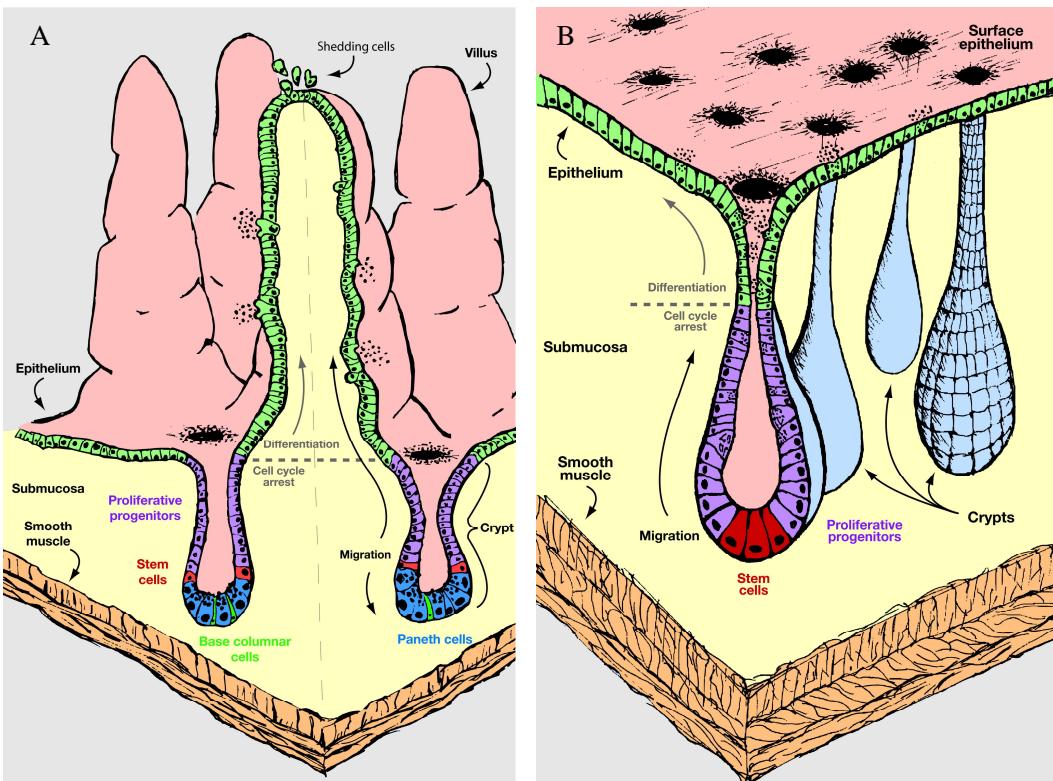


Figure 2 : Schémas simplifiés de l'organisation des épithéliums intestinal et colique

Dans l'intestin grêle (A), la muqueuse intestinale est organisée en une succession de cryptes et villosités. Dans le colon (B), la muqueuse est plane et ponctuée d'invaginations cryptiques. D'après Sancho et al, 2004.

La muqueuse intestinale est constituée de trois couches successives. Tout d'abord, la *muscularis mucosae* est composée de deux couches fines de muscles lisses, longitudinale externe et circulaire interne. Puis la *lamina propria*, aussi appelée chorion, est un tissu conjonctif riche en capillaires sanguins et lymphatiques, hébergeant de nombreux leucocytes et sur lequel repose la dernière couche, i.e. l'épithélium intestinal que l'on nommera dans cette étude barrière épithéliale intestinale (BEI).

La BEI est constituée d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEI) polarisées reposant sur une matrice ou lame basale. Il existe quatre types de CEI : les cellules absorbantes ou entérocytes, les cellules mucusécrétantes ou caliciformes à mucus, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth (Figure 3).

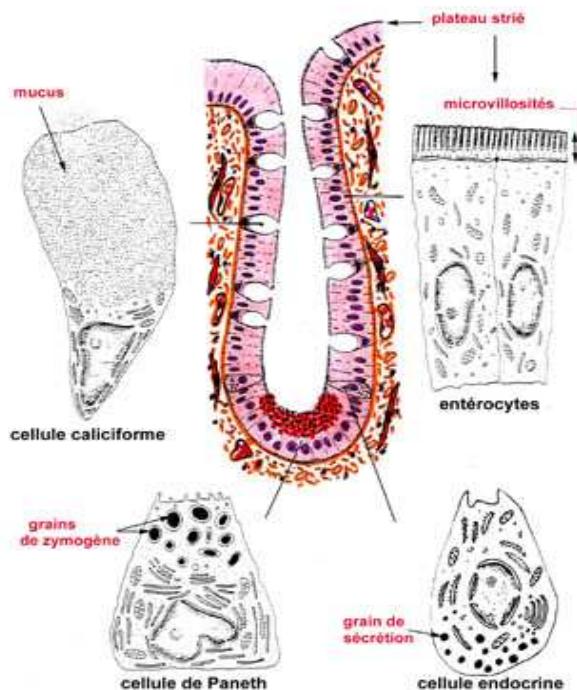


Figure 3 : Structure des cryptes intestinales et les quatre types de cellules épithéliales spécialisées retrouvées au niveau de la barrière épithéliale intestinale

La barrière épithéliale intestinale est composée de 4 types de cellules spécialisées : les cellules absorbantes ou entérocytes, les cellules mucusécrétantes ou caliciformes à mucus, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth. D'après N.Vacheret (UCB Lyon).

1.1.2. Les cellules spécialisées de la barrière épithéliale intestinale et fonctions associées

Les différents types de CEI sont issus de la différenciation des cellules souches intestinales présentes au fond des cryptes. Organisée en plusieurs compartiments le long des cryptes, la dynamique de renouvellement de la BEI est contrôlée par un équilibre entre les différents compartiments de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire programmée aboutissant à l'exfoliation des CEI (Potten, 1997; Potten, 1998) (Figure 4). Les cellules de Paneth se différencient en migrant vers le fond des cryptes. Les trois autres types cellulaires migrent vers le haut des cryptes selon l'axe cryptovillositaire lors de leur différenciation.

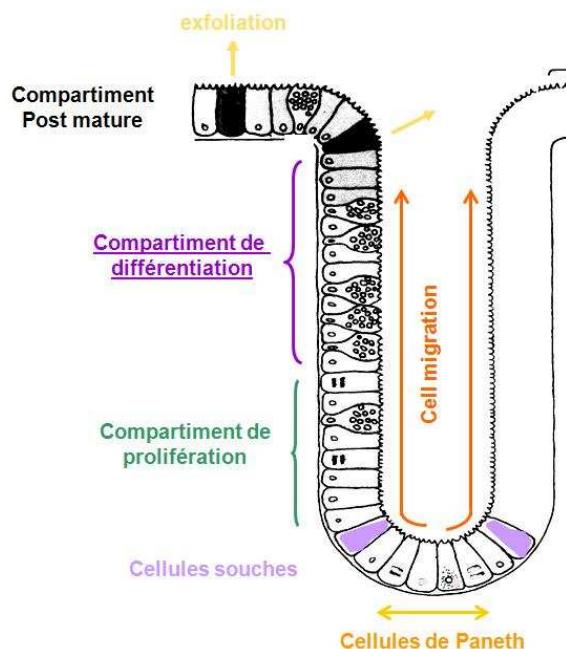


Figure 4 : Schéma simplifié des différents compartiments d'une crypte intestinale

La dynamique de renouvellement de la BEI est contrôlée par un équilibre entre les différents compartiments de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire programmée aboutissant à l'exfoliation des CEI. D'après Potten et al, 1997.

1.1.2.1. Les cellules souches épithéliales intestinales

L'identité exacte des cellules souches intestinales a été controversée depuis ces 30 dernières années et deux modèles sont principalement envisagés (Figure 5). Un premier modèle (« +4 position ») suggère que les cellules souches intestinales sont situées spécifiquement en position +4 au niveau de l'axe crypto-vilositaire ce qui implique que le fond des cryptes est exclusivement constitué de cellules de Paneth différenciées (Marshman et al., 2002). Le deuxième modèle appelé « stem cell zone » suggère que de petites cellules indifférenciées et en division (appelées « crypt base columnar cells ») situées entre les cellules de Paneth sont les réelles cellules souches intestinales (Figure 5).

Les cellules souches sont généralement étudiées avec des marqueurs de prolifération non spécifiques tels que Ki67 ou encore en mesurant l'incorporation de BrdU. D'autres marqueurs sont communément utilisés tels que Musashi-1 ou Sox-4. Récemment, Lgr5, gène cible de la voie des Wnt, ou encore l'oncogène Bmi ont été identifiés comme marqueurs des cellules souches intestinales supportant respectivement le modèle de la « stem cell zone » et celui de la position +4 (Barker et al., 2008; Sangiorgi and Capecchi, 2008).

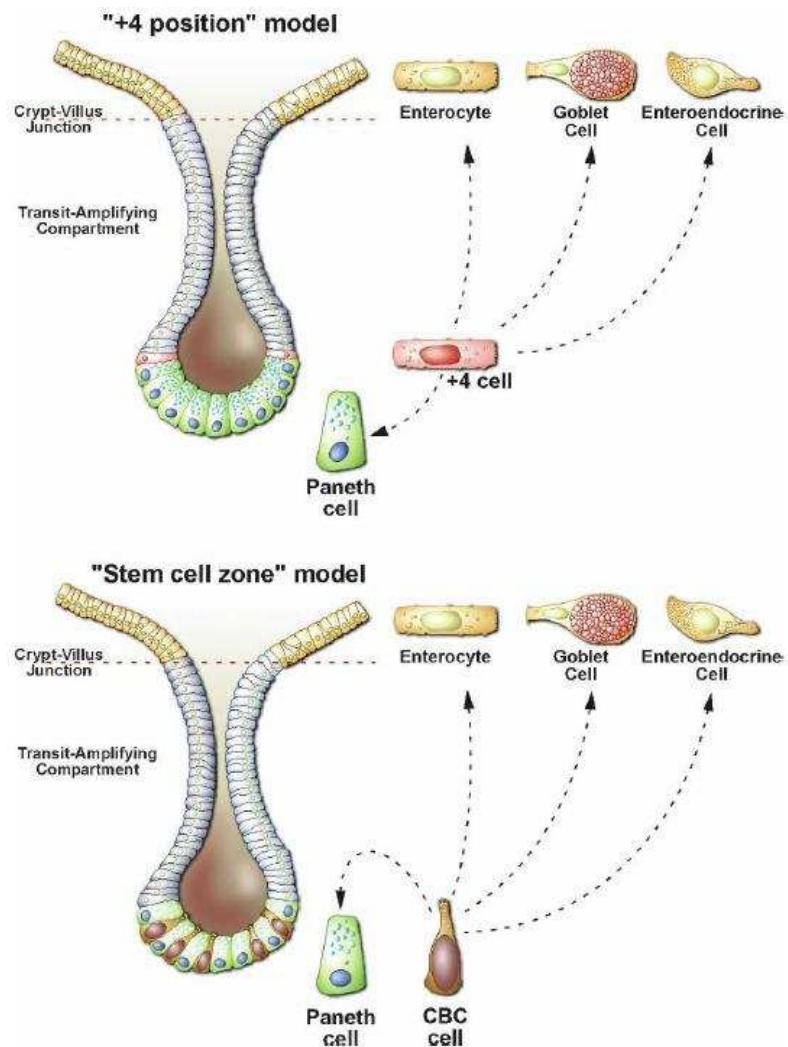


Figure 5 : Les deux modèles de lieu de résidence des cellules souches intestinales

Le modèle « +4 position » suggère que les cellules souches sont situées en position +4 au niveau de l'axe crypto-villositaire. Le modèle « Stem cell zone » suggère que les cellules CBC (crypt base columnar) situées entre les cellules de Paneth sont les cellules souches intestinales. D'après Barker et al, 2008.

Il existe une étape intermédiaire de différenciation entre cellules souches et cellules différencierées spécialisées qui n'est pas complètement décrite (Bjerknes and Cheng, 2006) (Figure 6). En effet, il semble que les cellules souches intestinales se différencient en cellules progénitrices qui, elles-mêmes, se différencieront en cellules spécialisées. Il existe 2 théories concernant ces cellules progénitrices (Figure 6). La première théorie est que les cellules souches donnent 3 sortes de cellules progénitrices bi-potentes qui se différencieront en entérocytes ou en cellules à activité sécrétoire (Figure 6 A). La deuxième théorie est que les cellules souches donnent des cellules progénitrices communes à toutes les cellules qui se différencieront soit 1/ en entérocytes, soit 2/ en une deuxième génération de cellules progénitrices communes aux lignées de CEI à activité sécrétoire (Figure 6 B).

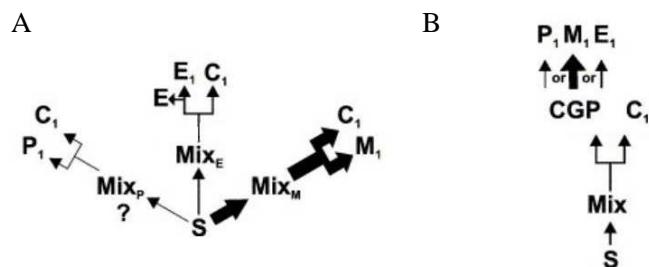


Figure 6 : Deux modèles du lignage cellulaire des 4 types de cellules épithéliales intestinales

Il existe 2 théories concernant les cellules progénitrices. **A.** La première théorie est que les cellules souches (S) donnent 3 sortes de cellules progénitrices bi-potentes (Mix_E , Mix_P et Mix_M) qui se différencieront en entérocytes (C_1 pour Columnar) ou en cellules à activité sécrétoire (Paneth P_1 , Endocrine E_1 ou Mucosécrétante M_1). **B.** La deuxième théorie est que les cellules souches (S) donnent des cellules progénitrices communes à toutes les cellules (Mix) qui se différencieront soit 1/ en entérocyte (C_1), soit 2/ en une deuxième génération de cellules progénitrices (CGP pour Common Granulocytic Progenitor) communes aux lignées de CEI à activité sécrétoire (Paneth P_1 , Endocrine E_1 ou Muccosécrétante M_1). D'après Bjerkness et al, 2006.

1.1.2.2. Les entérocytes

Les cellules absorbantes ou entérocytes sont présentes au sommet des villosités/cryptes et sont plus longues et plus nombreuses dans l'intestin grêle que dans le colon. A leur pôle apical, elles présentent des microvillosités qui constituent la bordure en brosse (Figure 3). Cette bordure en brosse est riche en glycoprotéines, dont notamment des enzymes digestives, et en glycolipides. Les enzymes digestives et les divers transporteurs exprimés au pôle apical varient entre l'intestin grêle et le colon. Ces villosités sont recouvertes du glycocalyx ayant principalement un rôle de protection de la BEI. Les entérocytes assurent l'absorption des nutriments issus de la dégradation des aliments ingérés par l'organisme, de l'eau et des électrolytes (Menard and Pothier, 1987).

1.1.2.3. Les cellules mucusécrétantes

Les cellules mucusécrétantes ou caliciformes sont rencontrées de façon croissante depuis le duodénum jusqu'au colon distal. Elles contiennent à leur pôle apical de très nombreuses granules contenant des mucines (Figure 3). Les mucines sont une famille de glycoprotéines de haut poids moléculaire qui peuvent être membranaires ou sécrétées. Les mucines sécrétées et libérées dans la lumière colique par exocytose déterminent les propriétés rhéologiques du mucus qui recouvre la BEI. Ce mucus joue un rôle de lubrificateur limitant les forces de frottements induits par le passage du bol alimentaire. Il protège également la muqueuse intestinale en jouant un rôle de barrière physique envers les potentiels pathogènes et les molécules de grande taille présentes dans la lumière, telles que des toxines ou des protéases, en raison de l'encombrement stérique créé par les chaînes oligosaccharidiques des

mucines. Le mucus est également une barrière de diffusion sélective envers les petites molécules ioniques grâce aux mucines chargées négativement (Allen et al., 1998).

1.1.2.4. Les cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines présentent à leur pôle basal des granules de sécrétion (Figure 3) et sont plus nombreuses dans l'intestin grêle par rapport au colon. La position et l'organisation de ces cellules permettent la libération du contenu de leurs granules de sécrétion directement au niveau de la *lamina propria*. Il existe 10 types de cellules entéroendocrines dans l'intestin différenciés par la nature des substances qu'elles libèrent. La cellule entéroendocrine prédominante présente tout au long de l'intestin est la cellule entérochromaffine qui libère la sérotonine (5-HT, 5-hydroxytryptamine). Les cellules entéroendocrines CCK, S, GIP, M et N sécrétant respectivement de la cholécystokinine, de la sécrétine et la 5-HT, du GIP (gastric inhibitory polypeptide), la motilin et la neurotensine sont présentes uniquement dans l'intestin grêle par opposition aux cellules L et D sécrétant respectivement le PYY (PP-like peptide with N-terminal tyrosine amide) et la somatostatine qui ont été localisées dans toutes les parties de l'intestin (Rindi et al., 2004).

1.1.2.5. Les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth sont situées au fond des cryptes de l'intestin grêle et renferment des granules de sécrétion à leur pôle apical (Figure 3). Elles sécrètent de nombreuses substances antimicrobiennes dans la lumière intestinale et jouent ainsi un rôle majeur dans l'immunité innée. Parmi les principales substances antimicrobiennes, on trouve la famille des

α -défensines qui comporte 6 membres chez l'homme et dont l'HD5 (human α -défensin) semble être exprimé de façon prédominante par rapport aux autres peptides. Les cellules de Paneth sécrètent également du lysozyme et la phospholipase-A2 (Wehkamp and Stange, 2006).

1.1.3. Le maintien de la barrière épithéliale intestinale

Au sein de la BEI, la CEI est en interaction avec ses cellules voisines et avec la lame basale de la matrice extracellulaire sur laquelle elle repose. Elle réalise ainsi des interactions de type cellule-cellule et cellule-matrice. Ces interactions sont médiées par des complexes protéiques qui relient les cytosquelettes de deux CEI entre elles ou avec les composants de la matrice (Figure 7).

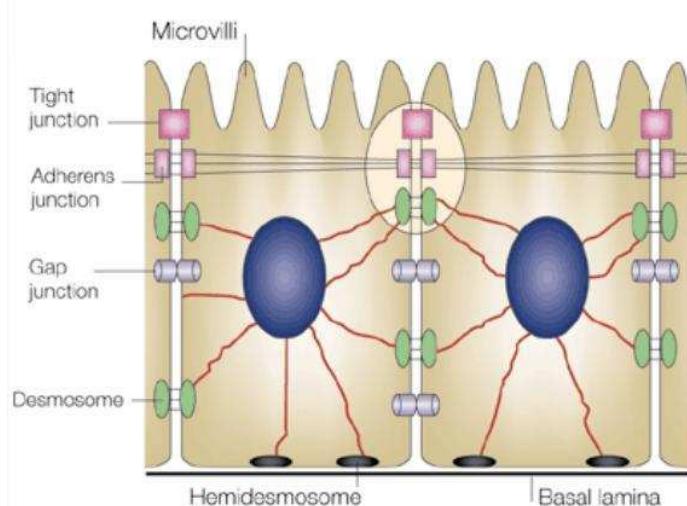


Figure 7 : Organisation du cytosquelette des cellules épithéliales intestinales

Les cellules épithéliales intestinales établissent des interactions de type cellule-cellule via les jonctions serrées (tight junctions), les jonctions adhérentes (adherens junctions) et les desmosomes ; et de type cellule-matrice via les adhésions focales (non représentées ici) et les hémidesmosomes. D'après Tsukita et al, 2001.

1.1.3.1. Les interactions de type cellule-cellule

Les interactions cellule-cellule sont réalisées par différents complexes multiprotéiques distincts parmi lesquels figurent les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes.

Au pôle apical de la BEI, se trouvent les **jonctions serrées** ou **tight junctions**. Ces jonctions sont formées par des complexes multiprotéiques associant des protéines transmembranaires formant le pore de la jonction et des protéines cytoplasmiques formant une plaque protéique connectée au cytosquelette d'actine (Figure 8). Les protéines transmembranaires sont constituées par la famille des claudines qui comprend 24 membres, l'occludine et la protéine JAM (Junction Adhesion Molecule). Ces protéines transmembranaires sont reliées au cytosquelette d'actine *via* les protéines Zonula Occludens (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) et la cinguline (Forster, 2008). La taille des pores formés par les jonctions serrées définit la perméabilité paracellulaire, i.e. le passage sélectif entre les CEI de molécules en fonction de leur taille et de leur charge (Tsukita et al., 2001).

Les **jonctions adhérentes** ou **zonula adherens** relient les CEI entre elles *via* des interactions homophiles Ca²⁺-dépendantes réalisées par la protéine transmembranaire E-cadhérine. La E-cadhérine est reliée par son domaine cytoplasmique aux protéines γ- (ou plakoglobine) ou β-caténine. Le complexe E-cadhérine/plakoglobine ou E-cadhérine/β-caténine est quant à lui relié au cytosquelette d'actine *via* les protéines cytoplasmiques α-caténine, l'α-actinine et la vinculine (Figure 9) (Ebnet, 2008; Nieset et al., 1997).

Il existe encore d'autres jonctions cellule-cellule telles que les **desmosomes**. Ces complexes protéiques relient les CEI par leur cytosquelette de filaments intermédiaires

composés de cytokératines. Ils permettent à la BEI de résister aux forces de pression et de tiraillement (Garrod et al., 2002).

Enfin, les **jonctions communicantes**, ou **gap junctions**, permettent aux CEI de communiquer entre elles par des signaux chimiques ou électriques. Ces jonctions forment des canaux ou nexus entre deux membranes cellulaires de CEI voisines qui peuvent être ouverts ou fermés selon l'état de phosphorylation des connexines, protéines transmembranaires et unités de structure des nexus (Prochnow and Dermietzel, 2008).

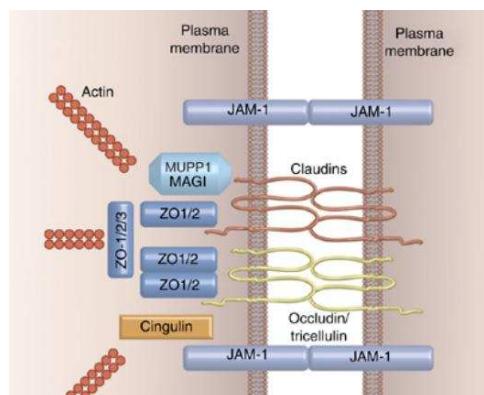


Figure 8 : Schéma simplifié de l'organisation moléculaire des jonctions serrées

Les jonctions serrées relient les cellules épithéliales intestinales entre elles via les protéines transmembranaires claudines, occludine et JAM (Junction Adhesion Molecule) qui sont reliées au cytosquelette d'actine via les protéines ZO (Zonula Adherens). D'après Niessen et al., 2007.

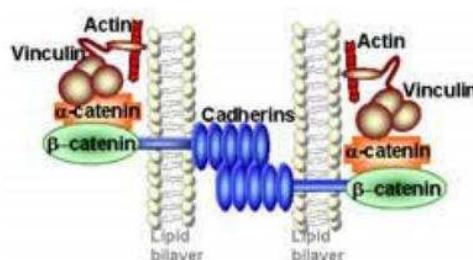


Figure 9 : Schéma simplifié de l'organisation moléculaire des jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes relient les cellules épithéliales intestinales entre elles via la protéine transmembranaire E-cadhéline reliée au cytosquelette d'actine via les protéines α-, β-, γ-caténines, α-actinine et vinculine. D'après DeMali, KA; University of Iowa.

1.1.3.2. Les interactions de type cellule-matrice

A leur pôle basolatéral, les CEI adhèrent et établissent des interactions fonctionnelles avec la matrice extracellulaire qui est constituée par un enchevêtrement complexe de macromolécules composé d'un ensemble de polysaccharides et de protéines.

Les polysaccharides sont des glycosaminoglycans (GAG) qui sont généralement reliés de façon covalente à une protéine pour former des protéoglycans tels que le perlecan. Les GAG, dont notamment l'acide hyaluronique, forment des mailles et constituent ainsi un gel qui permet à la matrice de résister aux forces de compression (Bishop et al., 2007; Toole, 2001).

Dans la composante protéique de la matrice, on distingue un premier groupe constitué par la famille des collagènes qui est essentiellement responsable de la structure de la matrice. Les **collagènes** adoptent trois configurations : les collagènes fibrillaires (type I, II, III, V et XI), les collagènes en feuillets (type IV, VIII et X) et les collagènes de liaison (type VI, VII, IX, XII et XIV) qui permettent des interactions avec d'autres composants de la matrice extracellulaire. Les fibres de collagène forment des structures qui résistent aux forces de tension (van der Rest and Garrone, 1991). Le second groupe, moins abondant, est constitué par la **fibronectine** et la **laminine** et est plutôt impliqué dans l'organisation de la structure de la matrice, i.e. formation d'une trame, et dans l'adhésion cellule-matrice. La fibronectine contribue à la fois à organiser la matrice et à favoriser l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. Constituée de deux sous-unités, elle forme un réseau fibrillaire et présente des sites d'interactions spécifiques avec d'une part les constituants moléculaires de la matrice extracellulaire et d'autre part les intégrines des CEI (Kaspar et al., 2006). La laminine est un complexe protéique flexible constitué de trois chaînes polypeptidiques α , β et γ dont il existe plusieurs isoformes, ce qui permet différentes combinaisons possibles, i.e. différentes

laminines. Seize laminines ont été ainsi identifiées. Les trois chaînes forment une croix asymétrique possédant plusieurs sites d'interaction avec les intégrines des CEI et avec les autres composants de la matrice extracellulaire (Tzu and Marinkovich, 2008).

La matrice extracellulaire de la BEI est constituée de deux couches. La lame basale située au pôle basal des cellules épithéliales est composée essentiellement d'un réseau de collagène IV, de laminine et de protéoglycane, mais aussi d'autres protéines comme la fibronectine ou la tenascine. La *reticular lamina*, sous jacente à la lame basale, est composée majoritairement de collagènes fibrillaires produits par les fibroblastes des tissus conjonctifs, mais aussi de fibronectine et de protéoglycane (Basson, 2003).

Les contacts entre la cellule et sa matrice sont assurés par les **intégrines**. Les intégrines sont des hétérodimères composés de deux sous-unités α et β associées de façon non covalente. Chaque sous-unité présente un grand domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un court domaine intra-cytoplasmique (Dedhar and Hannigan, 1996). Il existe plusieurs isoformes de ces sous-unités α et β permettant plusieurs combinaisons possibles et une spécificité de l'interaction entre une intégrine donnée et une composante moléculaire de la matrice. La liaison des intégrines à leurs ligands est dépendante de cations bivalents extracellulaires tels que le calcium ou le magnésium (Humphries, 1996; Shimaoka et al., 2002).

Au niveau des structures d'adhésion de la CEI avec sa matrice, appelées **adhésions focales**, les intégrines, liées par leur domaine extracellulaire à la matrice, sont rassemblées en amas ou clusters au niveau transmembranaire (Figure 10). Du côté intracellulaire, ces amas ponctuels d'intégrines recrutent plusieurs types de protéines qui servent d'intermédiaires de liaison avec le cytosquelette d'actine telles que la paxilline, la taline, la vinculine, FAK (Focal Adhesion Kinase) et l' α -actinine. Au niveau mécanistique, les intégrines activées et

regroupées en surface se lient à la paxilline et la taline qui recrutent FAK et la vinculine. FAK phosphoryle alors l'α-actinine qui se lie à la vinculine pour ainsi former la liaison avec les fibres de stress d'actine. La zyxine est une protéine se liant à l'α-actinine et aux fibres de stress dans les adhésions focales matures. Les protéines Src et p130Cas sont également recrutées au niveau des sites d'adhésion cellule-matrice (Mitra et al., 2005). Les adhésions focales sont donc formées par un groupe dynamique de protéines de régulation et de structure qui transduisent des signaux entre la matrice extracellulaire et l'intérieur de la cellule *via* l'activation des intégrines à la surface des cellules.

En dehors des adhésions focales, il existe d'autres structures où les intégrines sont impliquées dans l'adhésion des cellules épithéliales avec leur lame basale. Il s'agit des **hémi-desmosomes**. Dans ce cas particulier, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est liée aux filaments intermédiaires de cytokératine grâce à la plectine (Litjens et al., 2006).

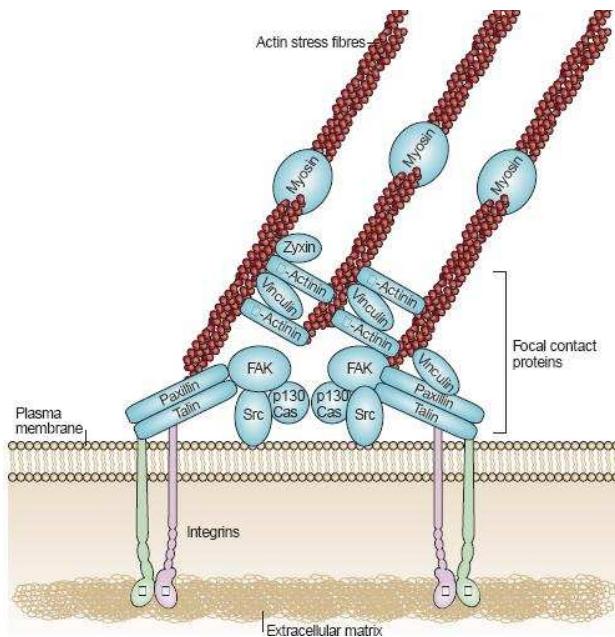


Figure 10 : Architecture moléculaire d'une adhésion focale

Au niveau des adhésions focales, le cytosquelette d'actine des cellules épithéliales intestinales est lié à la matrice extracellulaire via les intégrines, protéines transmembranaires, et de nombreuses protéines cytoplasmiques. D'après Mitra et al, 2005.

1.2. L'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale

Le maintien global de l'homéostasie de la BEI est assuré par un équilibre entre la prolifération et l'exfoliation des CEI ainsi que par la capacité réparatrice de la BEI.

1.2.1. Le renouvellement de la barrière épithéliale intestinale

L'épithélium est remplacé intégralement tous les 4-5 jours chez l'homme, ce qui nécessite la production d'environ 10 milliards de cellules par jour (Bullen et al., 2006; van der Flier and Clevers, 2008). Ce renouvellement résulte d'une régulation coordonnée de la prolifération cellulaire, de la différenciation et la migration le long des cryptes et enfin, de la mort cellulaire résultant en une exfoliation des CEI.

1.2.1.1. La prolifération des cellules épithéliales intestinales

La prolifération cellulaire résulte de la division cellulaire qui se déroule en 4 phases successives constituant le cycle cellulaire : la phase G1 (gap), la phase S (synthèse), la phase G2 (gap) et la phase M (mitose) (Figure 11).

La phase G1 est une étape critique pendant laquelle l'intégration des signaux environnementaux aboutit soit à l'entrée de la cellule dans le cycle de division cellulaire ou bien à l'entrée de la cellule en phase G0 ou phase quiescente où elle peut alors se différencier. Chaque étape du cycle cellulaire est contrôlée par des kinases dépendantes des cyclines (CDK) et des cyclines, qui se lient aux CDK et les activent (Figure 11). Lors de la phase G1, les cyclines D peuvent se lier aux CDK4 et 6. L'activation des CDK va conduire à

l'activation de facteur de transcription E2F qui permet la transcription de gènes codant pour des protéines nécessaires à la réPLICATION de l'ADN durant la phase S et à la progression du cycle cellulaire. L'activité des CDK est soumise à des contrôles négatifs *via* des interactions avec des protéines inhibitrices (CDKI) réparties en deux familles : la famille des INK₄ et celle des CIP/KIP. La progression de la cellule à travers les différentes phases du cycle cellulaire est déterminée par la présence ou non des régulateurs de l'activité des CDK, i.e. cyclines et CDKI.

Une voie clef contrôlant la prolifération des CEI est la voie **Wnt/β-caténine** (Figure 12). Les ligands Wnt sont des glycoprotéines sécrétées de manière paracrine par de nombreux types cellulaires. En l'absence de stimulation par des ligands Wnt, la protéine β-caténine est séquestrée par un complexe de dégradation multiprotéique contenant la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli), l'axine, GSK3β (Glycogen Synthase Kinase) et CK1 (Casein Kinase), phosphorylée et dégradée par le protéasome. En revanche, l'activation de la voie par la fixation d'un ligand Wnt au récepteur transmembranaire Fz (Frizzled) entraîne l'inhibition de la formation du complexe de dégradation macromoléculaire et la β-caténine s'accumule alors dans le cytoplasme sous sa forme stable non phosphorylée (Pinto and Clevers, 2005). La β-caténine est alors transloquée dans le noyau où elle s'associe au complexe transcriptionnel TCF4/ LEF (T-cell factor/lymphoid enhancing factor) induisant ainsi la transcription des gènes cibles de la voie Wnt tels que l'oncogène c-myc ou encore *BCL1* codant pour la cycline D1 (Tetsu and McCormick, 1999) entraînant une augmentation de la prolifération cellulaire (Pinto and Clevers, 2005).

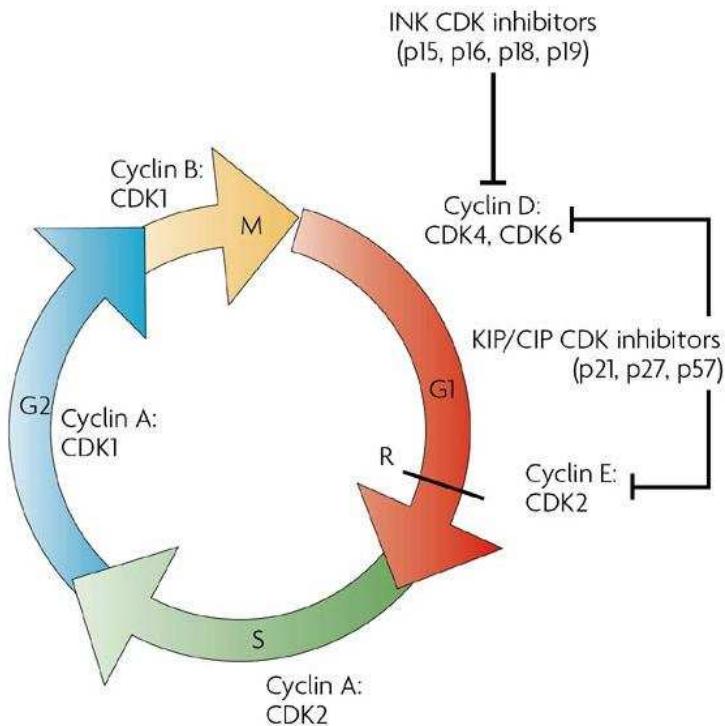


Figure 11 : Les différentes phases du cycle cellulaire et les principaux acteurs de sa régulation

Le cycle cellulaire est composé de quatre phases successives : G1 (Gap), S (correspondant à la réplication), G2 (Gap) et M (mitose). Il existe 2 étapes de contrôle du cycle cellulaire aux niveaux des transitions G1/S et G2/M. R correspond au point de restriction majeur du cycle au-delà duquel la cellule est définitivement engagée dans le cycle. Les CDK (cyclin-dependent kinase) sont activées par leur association avec les cyclines et induisent la progression du cycle cellulaire. L'activité des CDK est inhibée par des interactions avec les membres des 2 familles d'inhibiteurs des CDK (CDKI) : la famille des INK₄ et la famille des KIP/CIP. D'après Dehay and Kennedy, 2007.

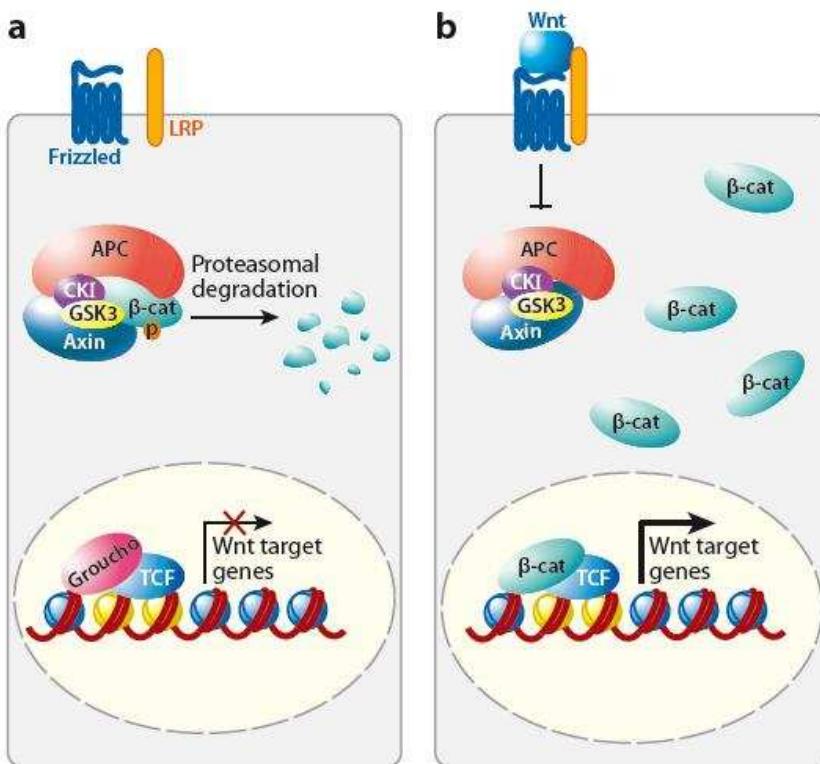


Figure 12 : La voie de signalisation Wnt- β -caténine

a. En absence de ligand Wnt, la β -caténine (β -cat) est séquestrée par un complexe de dégradation multiprotéique composé de la protéine APC (adenomatous polyposis coli), de la CKI (casein kinase I), de la GSK3 (glycogen synthase kinase 3) et de l'axine, par lequel elle est phosphorylée ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome. b. La fixation d'un ligand Wnt à son récepteur Frizzled et au co-récepteur LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein) entraîne l'inhibition de la formation du complexe de dégradation. La protéine β -caténine s'accumule dans le cytoplasme ce qui résulte en sa translocation dans le noyau où elle s'associe au complexe transcriptionnel TCF4/ LEF (T-cell factor/lymphoid enhancing factor) induisant ainsi la transcription des gènes cibles de la voie Wnt. D'après van der Flier, 2008

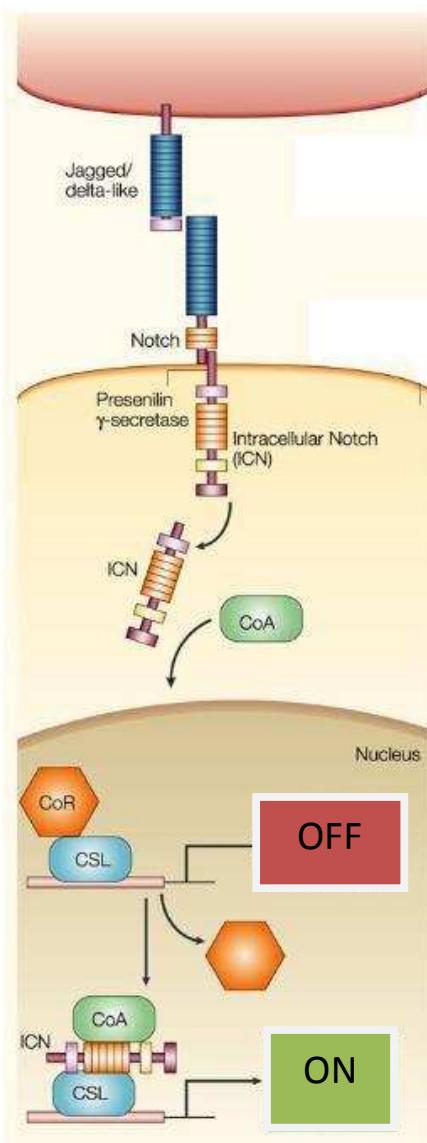
1.2.1.2. La différenciation des cellules épithéliales intestinales

La différenciation des CEI au cours de leur migration le long des cryptes est contrôlée de façon majeure par les voies de signalisation Wnt/ β -caténine et Notch.

En effet, des études *in vivo* ont montré le rôle essentiel de la voie **Wnt/ β -caténine** dans le devenir des CEI le long de l'axe crypto-vilositaire. En effet, dans un modèle de souris transgénique, l'expression de Dkk1 (Dickkopf-1), antagoniste des Wnt, provoque l'inhibition de la prolifération des CEI tout au long de l'intestin, une perte progressive de l'architecture glandulaire et des ulcérations de la muqueuse (Kuhnert et al., 2004; Pinto et al., 2003). De la même manière, chez des souris transgéniques, l'inactivation d'APC résulte en la repopulation des villi avec des cellules phénotypiquement comparables aux cellules des cryptes, présentant une accumulation nucléaire de β -caténine et incapables de migrer et de se différencier (Sansom et al., 2004). Par ailleurs, chez les souris APC $^{-/-}$, on observe également une augmentation du nombre de cellules se différenciant en cellules de Paneth (Figure 14) (Andreu et al., 2008). Enfin, l'invalidation tissu-spécifique du gène codant pour la β -caténine dans l'épithélium colique de souris entraîne une inhibition de la prolifération au niveau des cryptes et une différenciation prématuée des CEI concernant notamment le compartiment de prolifération comprenant les cellules souches (Fevr et al., 2007).

La voie de signalisation des **Notch** semble également jouer un rôle majeur dans la différenciation des CEI. L'interaction d'un ligand Notch avec un récepteur Notch induit le clivage du récepteur Notch et la libération du domaine intracellulaire Notch NICD (Notch intracellular domain) (Figure 13). Libre, NICD est ensuite transloqué dans le noyau activant la transcription des gènes cibles de la voie Notch dont fait partie la classe des Hes (Hairy/Enhancer of Split), et notamment Hes1. Les Hes sont des répresseurs d'autres facteurs de transcription appelés bHLH (basic helix-loop-helix) dont fait partie Math1. Lorsque les

facteurs de transcription bHLH sont déréprimés, ils induisent la différenciation des CEI (Figure 14) (van der Flier and Clevers, 2008). Les intestins d'embryons de souris Hes1 -/- présentent une augmentation de la proportion de cellules Paneth, mucusécrétantes et entéroendocrines associée à une diminution de la proportion d'entérocytes (Jensen et al., 2000; Suzuki et al., 2005). A l'inverse, l'épithélium intestinal de souris délétées pour le gène Math1 est uniquement composé d'entérocytes (Yang et al., 2001).



Il existe deux familles de ligands Notch : Jagged et Delta-like. Suite à l'interaction d'un ligand Notch avec un récepteur Notch, le récepteur Notch est clivé entraînant la libération du domaine intracellulaire Notch NICD (Notch intracellular domain) (ICN- Intracellular Notch). Le domaine NICD est ensuite transloqué dans le noyau où il interagit avec un co-activateur (CoA) et induit la transcription des gènes cibles de la voie Notch dont fait partie notamment la classe des Hes (Hairy/Enhancer of Split)).

D'après Zúñiga-Pflücker et al, 2004.

Figure 13: La voie de signalisation Notch

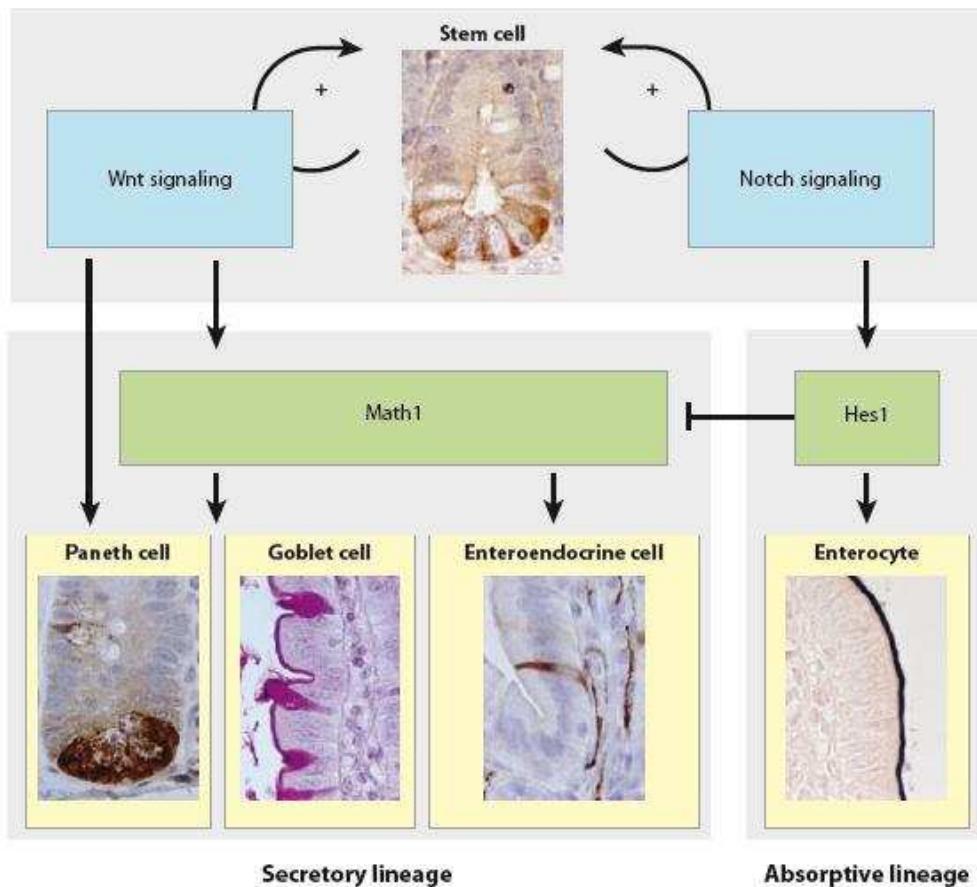


Figure 14 : Influence des voies Wnt et Notch sur la différenciation des CEI

Représentation schématique et simplifiée de l'influence des voies Notch et Wnt sur la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Le gène codant pour *Hes1* (*Hairy/Enhancer of Split 1*) est un gène cible de la voie Notch et régule la différenciation des entérocytes via la répression de *Math-1*. Le facteur de transcription *Math1* induit la différenciation des cellules de Paneth, des cellules mucosécrétantes et des cellules entéroendocrines. Enfin, l'activation de la voie Wnt induit la différenciation des cellules de Paneth. D'après van der Flier et al, 2008.

1.2.1.3. La mort des cellules épithéliales intestinales

Enfin, lorsqu'elles atteignent l'apex des villosités, les CEI entrent en **anoïkose** lors de l'exfoliation. L'anoïkose est une forme d'apoptose régulée principalement par les interactions cellule-matrice extracellulaires médiées par les intégrines. Par ailleurs, les CEI indifférencierées du fond de la crypte peuvent également entrer spontanément en apoptose afin d'éliminer les CEI endommagées ou défectueuses (Vachon, 2006). Il existe donc une régulation distincte de la survie des CEI selon leur état de différenciation qui est couplée à des gradients d'expression des homologues de Bcl-2 (Vachon et al., 2000), impliqués dans la régulation de l'apoptose, le long de l'axe crypto-villositaire (Vachon, 2006).

1.2.2. La réparation de la barrière épithéliale intestinale

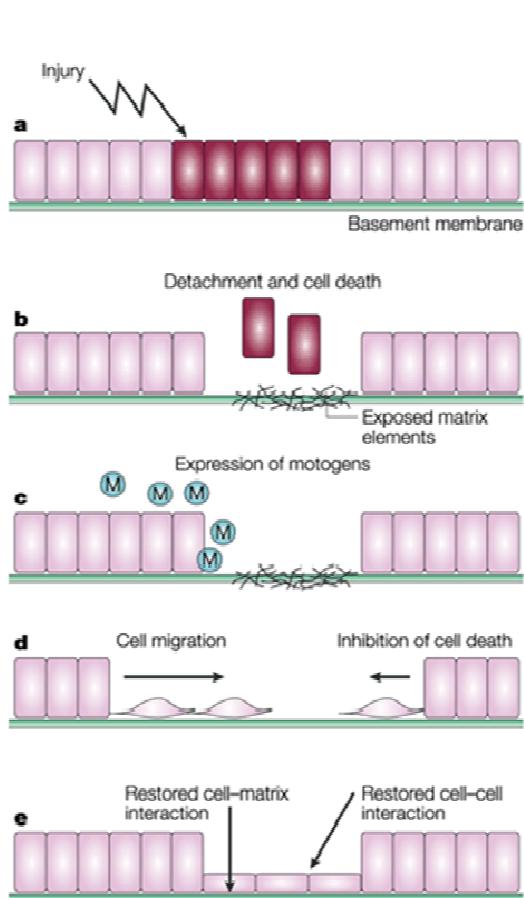
La BEI est en permanence soumise à des agressions physiques, telles que les déformations répétitives de la muqueuse dues au péristaltisme ou encore le passage du bol alimentaire, pouvant conduire à la formation de lésions « physiologiques » générant des défauts de continuité de la BEI (Chaturvedi et al., 2007). D'autre part, lors de conditions pathologiques, comme lors d'invasions par des pathogènes ou lors d'états inflammatoires chroniques, d'importantes desquamations de l'épithélium peuvent se produire et des processus de réparation importants de la BEI sont alors nécessaires pour assurer un retour à l'homéostasie. En effet, des défauts des processus de réparation peuvent conduire à la formation d'ulcérations de la muqueuse (Sturm and Dignass, 2008).

Le processus de réparation de la BEI est schématiquement constitué de trois étapes séquentielles qui, en réalité, se superposent chronologiquement *in vivo* (Sturm and Dignass, 2008). La première étape de la réparation de la muqueuse est appelée la **restitution épithéliale** (Figure 15). Elle consiste en la **migration** et l'**étalement** des cellules viables entourant la zone lésée pour aboutir à un rétablissement rapide de la continuité de la BEI (Lacy, 1988). La restitution épithéliale résulte directement de la **motilité** de la CEI et est admise comme étant indépendante des mécanismes de prolifération cellulaire (Mammen and Matthews, 2003). Par ailleurs, ce mécanisme précoce de réparation est un processus primordial mis en jeu quelles que soient la cause ou la sévérité de la lésion (Podolsky, 1999). Suite à la restitution épithéliale, s'en suivront en général les deux dernières étapes de la réparation de la muqueuse qui sont les processus de prolifération et de différenciation des CEI afin d'aboutir à une régénération de la continuité et des fonctions de la BEI (Sturm and Dignass, 2008).

Pour les cas de lésions sévères et profondes, la réparation de la paroi intestinale peut prendre plusieurs jours à plusieurs semaines et implique un remodelage de la matrice extracellulaire, de la sous-muqueuse et parfois même des couches inférieures. Ces étapes de réparation et de cicatrisation peuvent être altérées, par exemple lors de fibroses où est observé un excès de production de collagène et d'éléments de la matrice extracellulaire. Pour des lésions superficielles, la réparation de la BEI est plus rapide, de quelques heures à quelques jours selon la taille de la lésion (Podolsky, 1999).

Les processus de réparation peuvent être modulés par différents facteurs tels que des facteurs de croissance, des cytokines ou des polyamines (Blikslager et al., 2007; Sturm and Dignass, 2008). Parmi les molécules modulant les processus de réparation de la BEI, la famille des TFF (trefoil factor) (TFF1, TFF2 et TFF3) joue un rôle primordial. Les TFF sont de petites protéines résistantes aux protéases et sécrétées abondamment à la surface de la

muqueuse intestinale par les cellules mucosécrétantes (Taupin and Podolsky, 2003). *In vitro*, les TFF augmentent la restitution épithéliale (Dignass et al., 1994). *In vivo*, les TFF protègent la BEI en limitant la formation de lésions et en favorisant les processus de réparation (Babyatsky et al., 1996; Playford et al., 1996). Dans les souris déficientes en TFF, on observe une sensibilité accrue associée à une quasi absence de processus de réparation suite à l'induction de lésions par administration orale de DSS (Dextran Sodium Sulfate) (Mashimo et al., 1996).



- Une lésion localisée (injury) de la BEI reposant sur la matrice extracellulaire (basement membrane)*
- Entraîne le détachement et la mort des CEI (detachment and cell death) générant ainsi un défaut de continuité de la BEI et une exposition directe de la matrice (exposed matrix elements) au contenu luminal.*
- La matrice et les cellules adjacentes à la BEI libèrent des facteurs favorisant la restitution (M : motogens)*
- Qui entraînent l'étalement et la migration des cellules viables (cell migration) entourant la zone lésée et une inhibition de la mort des CEI (inhibition of cell death)*
- La restauration de la continuité de la BEI et de ses fonctions est permise par une restauration des jonctions cellule-cellule et cellule -matrice (restored cell-matrix and cell-cell interactions).*
(BEI) : barrière épithéliale intestinale ; (CEI) : cellule épithéliale intestinale. D'après Taupin et Podolsky, 2003

Figure 15 : Concepts fondamentaux de la restitution épithéliale

1.2.3. FAK: protéine majeure de la régulation de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale

FAK (Focal Adhesion Kinase) a été initialement décrite comme une protéine de 125 kDa, fortement phosphorylée sur tyrosine, dans des cellules embryonnaires de poulet transformées par v-Src (Schaller et al., 1992). Elle tient son nom de sa localisation privilégiée au niveau des adhésions focales (Hanks et al., 1992; Schaller et al., 1992). FAK est une protéine kinase exprimée de façon constitutive qui possède une activité catalytique soumise à une régulation complexe permise en partie par son architecture moléculaire élaborée. FAK est une protéine adaptatrice moléculaire (« scaffolding protein ») qui permet la modulation de la réponse de la CEI en fonction des stimuli environnementaux (McLean et al., 2005; Mitra et al., 2005).

1.2.3.1. Description de la structure moléculaire de FAK

FAK est encodée par le gène *PTK2* (Protéine Tyrosine Kinase) dont le locus situé sur le chromosome 8q24 humain est sujet à amplification dans les cellules cancéreuses humaines (Agochiya et al., 1999). La protéine FAK est une tyrosine kinase cytosolique de 1052 acides aminés d'environ 125 kDa qui comprend trois régions distinctes : un **domaine catalytique central**, un **domaine amino-terminal** (domaine FERM) ainsi qu'une **région carboxy-terminale** (domaine FAT) (Figure 16) (Hanks et al., 1992; Schaller et al., 1992).

L'extrémité N-terminale de FAK présente des similarités de séquence avec les domaines de type "bande 4.1", qui sont présents dans de nombreuses protéines dont particulièrement les protéines de la famille ERM (ezrine, radixine, moésine), et avec les

Janus kinases (JAK) correspondant au domaine appelé FERM (F pour protéine 4.1, E pour ezrine, R pour radixine, M pour moésine) (Girault et al., 1999). Ce domaine permet la liaison de FAK avec de nombreuses molécules dont particulièrement les domaines cytoplasmiques de récepteurs membranaires tels que le récepteur au PDGF (platelet-derived growth factor) ou le récepteur à l'EGF (epidermal growth factor) (Girault et al., 1998). D'autre part, si FAK est dépourvue de domaines SH2 ou SH3 (Src-Homology) qui sont des motifs protéiques reconnaissant et se liant respectivement à des séquences contenant des tyrosines phosphorylées ou riches en proline, la séquence de FAK contient néanmoins deux régions riches en proline (712-723, 867-882) à l'extrémité carboxy-terminale et plusieurs tyrosines susceptibles d'être phosphorylées et de lier des protéines contenant des domaines SH2 (Schaller et al., 1992).

Enfin, le domaine FAT (focal adhesion targeting) assure l'adressage de FAK vers les sites d'adhésions focales en offrant un site de liaison aux protéines associées aux intégrines telles que la paxilline et la taline (Hildebrand et al., 1993). De plus, le domaine FAT offre également un site de liaison à la protéine p190RhoGEF, activateur de Rho-A ou encore la protéine Grb2 (growth-factor-receptor-bound)(Mitra et al., 2005).

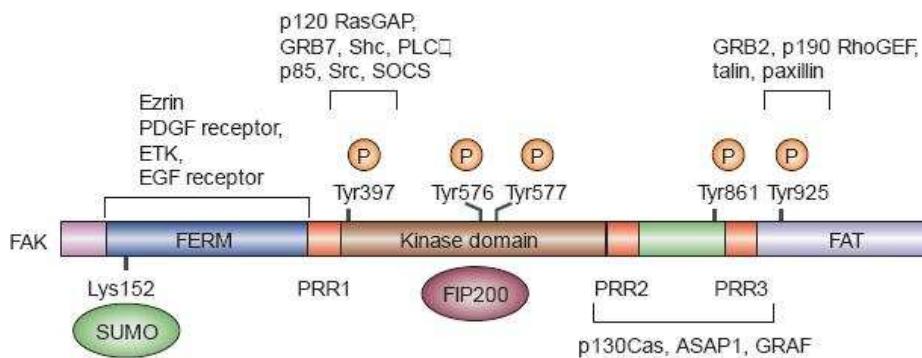


Figure 16 : Organisation des différents domaines moléculaires de FAK

La protéine FAK est composée de trois domaines distincts : le domaine FERM à l'extrémité N-terminale permettant une liaison avec notamment les domaines cytoplasmiques de récepteurs membranaires, un domaine catalytique central et le domaine FAT (focal adhesion targeting) à l'extrémité C-terminale assurant l'adressage de FAK aux sites d'adhésions focales et permettant également une liaison avec d'autres protéines telles que p190RhoGEF ou Grb2. La présence de régions riches en proline (PRR) ainsi que de nombreuses tyrosines susceptibles d'être phosphorylées permet à FAK d'offrir des sites de liaison à des protéines contenant des domaines SH2 ou SH3. D'après Mitra et al, *Nature*, 2005.

1.2.3.2. Activation de FAK

La phosphorylation sur tyrosine et l'activation de FAK ont été initialement décrites après la liaison des intégrines avec les éléments de la matrice extracellulaire. Après engagement des intégrines, c'est-à-dire après leur liaison avec la matrice, on observe une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine de protéines ayant une masse moléculaire de 115-130 kDa (Kornberg et al., 1991). Une de ces protéines a été identifiée comme étant la protéine kinase FAK dont la phosphorylation et l'activation sont donc induites par l'engagement des intégrines (Burridge et al., 1992; Kornberg et al., 1992). L'autophosphorylation de FAK sur la tyrosine 397 semble être l'étape initiale et indispensable. Cette tyrosine autophosphorylée fournit un excellent site de liaison pour le

domaine SH2 des tyrosine kinases de la famille Src, dont Src et Fyn (Cobb et al., 1994). Ces kinases phosphorylent à leur tour plusieurs tyrosines dans la séquence de FAK. Certaines d'entre elles (tyrosines 576 et 577) sont situées dans le domaine catalytique et leur phosphorylation est nécessaire à l'activation maximale de FAK (Calalb et al., 1995; Owen et al., 1999). Deux autres tyrosines, tyrosine 861 et tyrosine 921, sont phosphorylées par les kinases de la famille Src. Ces deux tyrosines, une fois phosphorylées, forment d'excellents sites d'arrimage pour les domaines SH3 et SH2 de p130Cas (crk associated substrate) et de Grb2 respectivement (Harte et al., 1996; Lim et al., 2004; Schlaepfer et al., 1994; Schlaepfer and Hunter, 1996). Par un système complexe de cascades de signalisation intracellulaires, la phosphorylation de ces deux résidus et la fixation de p130Cas et Grb2 entraînent des modifications de la localisation de FAK au niveau des sites d'adhésions focales et modulent la migration cellulaire (Mitra et al., 2005).

1.2.3.3. Régulation de l'activation de FAK

En dehors des intégrines, d'autres stimuli peuvent activer FAK comme les neuropeptides, l'activation des récepteurs couplés aux protéines G et les facteurs de croissance tels l'EGF et le TGF- β 1 (Kim and Kim, 2008; Lu et al., 2001; Rozengurt, 2007; Rozengurt et al., 2002; Thannickal et al., 2003; Wang et al., 2009). De plus, un mécanisme original de régulation de l'activité de FAK met en jeu la protéine FRNK (FAK-related non-kinase), qui correspond au domaine carboxy-terminal de FAK dépourvu de domaine catalytique. A la différence de FAK, exprimée de façon ubiquitaire, la région régulatrice du promoteur de FRNK contient des éléments de régulation spécifiques de tissus et notamment, les cellules intestinales et pulmonaires ont les taux d'expression d'ARNm de FRNK les plus importants (Nolan et al., 1999). Par sa partie terminale FAT, FRNK entre en compétition

avec FAK au sein des adhésions focales et limite ses interactions avec d'autres protéines régulant ainsi l'activation de FAK (Mortier et al., 2001). Par ailleurs, on sait également que l'activité catalytique de FAK peut être modulée par des modifications post-traductionnelles ou des mutations dans le domaine « activation loop » ou encore par des changements conformationnels comme ceux engendrés par des liaisons à d'autres protéines. Par exemple, FIP200 (FAK-Interacting Protein, 200kDa) est une protéine qui se lie au domaine kinase de FAK et qui l'inhibe (Abbi et al., 2002). D'autre part, FAK subit un épissage alternatif qui provoque une addition éventuelle d'acides-aminés supplémentaires autour de la position 397 conduisant à une modification de la cinétique d'activation de FAK (Toutant et al., 2002). Il est également à noter que l'activité de FAK peut être également modifiée par des PTP (Protéines-Tyrosine Phosphatases) (Chiarugi et al., 2003; Zeng et al., 2003). Enfin, la phosphorylation de FAK sur la tyrosine 397 est également reconnue par le domaine SH2 des protéines SOCS-1 et SOCS-3 (Suppressor Of Cytokine Signalling) dont la liaison à FAK initie sa dégradation en induisant son ubiquitylation (Liu et al., 2003).

1.2.3.4. Partenaires protéiques de FAK et conséquences fonctionnelles

Les tyrosines phosphorylées de FAK ainsi que ses régions riches en proline permettent l'interaction de FAK avec de nombreux partenaires protéiques contenant des domaines SH2 et SH3 respectivement et ainsi, l'activation de différentes cascades impliquées dans la régulation de diverses fonctions cellulaires. Une fois autophosphorylée, la tyrosine 397 de FAK est non seulement capable de lier les domaines SH2 de Src et Fyn, mais aussi ceux de la PI3-kinase (phosphatidylinositol 3-kinase), la phospholipase C- γ 1 et Grb7 (Chen et al., 1996; Cobb et al., 1994; Han and Guan, 1999; Zhang et al., 1999). La tyrosine 925, lorsqu'elle est phosphorylée, constitue un excellent site de fixation pour le domaine SH2 de la

protéine adaptatrice Grb2 et p190RhoGEF, un activateur de Rho-A (Hsia et al., 2003; Zhai et al., 2003). Les régions riches en proline s'associent avec les domaines SH3 de deux protéines adaptatrices apparentées p130Cas et HEF-1 et d'une protéine augmentant l'activité GTPasique de RhoA, appelée Graf (GTPase regulator associated with FAK) ainsi que de ASAP-1 (Hildebrand et al., 1996; Law et al., 1996; Liu et al., 2002; Polte and Hanks, 1995). Enfin, un certain nombre d'interactions protéiques n'est pas médié par les domaines SH2 ni SH3. L'extrémité N-terminale interagit notamment avec la région cytoplasmique des intégrines β tandis que l'extrémité C-terminale de FAK s'associe avec plusieurs protéines impliquées dans les adhésions focales telles que la paxilline, Hic-5 et la taline (Chen et al., 1995; Fujita et al., 1998; Hildebrand et al., 1995; Schaller et al., 1995).

De façon schématique, le recrutement de Graf, de Grb7 et de la PLC- γ va participer au remaniement du cytosquelette d'actine, engendrant ainsi un cycle de migration et d'adhésions cellulaires avec pour chaque étape un désassemblage et une réformation des adhésions focales (Cornillon et al., 2003; Shen and Guan, 2001). Le recrutement de p130Cas, Grb2 et de la PI3-kinase va participer à l'activation en cascade de plusieurs voies de signalisation intracellulaires dépendantes notamment de ERK, Rac et JNK permettant *in fine* de réguler plusieurs processus vitaux pour la cellule tels que la survie, la prolifération et la migration cellulaire *via* l'activation de facteurs de transcription (Cornillon et al., 2003; Cox et al., 2006).

À travers les différentes interactions protéiques que FAK entretient avec ces différents partenaires, FAK est donc impliquée dans les fonctions de prolifération, de différenciation, d'adhésion, de mort mais également de motilité cellulaire où elle joue tout particulièrement un rôle majeur. Plusieurs arguments expérimentaux viennent renforcer le rôle clef de FAK dans la motilité cellulaire (i) les cellules déficitaires en FAK, liées à la fibronectine, ont une forte diminution de leur capacité migratoire et cette capacité dépend de

la phosphorylation des tyrosines 397, 576 et 577. Ces résultats sont bien démontrés pour des lignées fibroblastiques dérivées de cellules embryonnaires invalidées pour le gène FAK (Owen et al., 1999) ; (ii) l'augmentation de l'expression de FRNK bloque la migration alors que l'augmentation de l'expression de FAK favorise la migration (Sieg et al., 1999) ; (iii) enfin, la mutation au niveau du site de liaison de FAK à la famille Src, Grb7, PI3-kinase ou à p130Cas limite la migration. Si FAK est de nouveau exprimée correctement, une migration normale est alors de nouveau observée (Cary et al., 1998).

1.2.3.5. FAK et le contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale

1.2.3.5.1. FAK et le renouvellement de la barrière épithéliale intestinale

Plusieurs travaux suggèrent que FAK joue un rôle majeur dans la transduction des signaux environnementaux contrôlant la prolifération, la différenciation et la mort des CEI. Ainsi, FAK régule directement l'augmentation de la prolifération induite par des déformations cycliques de la BEI. En effet, des déformations répétitives de la BEI stimulent la prolifération des CEI (Basson et al., 1996a) *via* deux voies indépendantes. Dans ces deux voies, la phosphorylation de FAK sur la tyrosine 576 entraîne l'activation de ERK1/2 qui aboutit à une augmentation de la prolifération des CEI. En revanche, en amont de la phosphorylation de FAK sur la tyrosine 576, plusieurs cascades semblent être mises en jeu et médiées par des voies dépendantes ou indépendantes de l'activation de Src et de Rac1 (Chaturvedi et al., 2007; Li et al., 2001). De plus, lors de la différenciation des cellules Caco-2, on observe une augmentation de l'expression de FAK parallèlement à une diminution de son activation (Gauthier et al., 2001; Levy et al., 1998). Enfin, FAK joue également un rôle

dans le contrôle de l'apoptose des CEI. En effet, dans une lignée de CEI de rat, une surexpression de FAK induit une résistance à l'apoptose induite par un traitement au TNF- α /CHX (tumor necrotizing factor /cycloheximide) *via* l'activation de NF- κ B (Nuclear Factor) (Zhang et al., 2006). De plus, l'inhibition de FAK entraîne l'anoïkose des CEI qui, selon le stade de différenciation des CEI, fait intervenir des voies Src-, MEK/Erk-, et PI3K/Akt-dépendantes (CEI non différencierées) ou PI3K/Akt-dépendante (CEI différencierées) (Bouchard et al., 2007).

1.2.3.5.2. FAK et la réparation de la barrière épithéliale intestinale

L'étalement et la migration des CEI sont directement régulés par l'activité et l'expression de FAK. En effet, l'expression et la phosphorylation de FAK sont augmentées dans les cellules en migration par rapport aux cellules statiques (Hines et al., 2000; Liu et al., 1998). De plus, le dominant négatif de FAK, FRNK (FAK Related Non Kinase), inhibe la migration des CEI dans un modèle *in vitro* de lésions de la BEI induites mécaniquement (Yu et al., 2000). Enfin, des déformations cycliques de la BEI stimulent la migration des CEI *via* une voie dépendante de l'activité de FAK (Chaturvedi et al., 2008).

Par ailleurs, le support matriciel semble jouer un rôle majeur sur le contrôle de la motilité des CEI médié par FAK. Ainsi, dans les cellules Caco-2, l'expression de FAK augmente lorsque les CEI sont cultivées sur collagène I ou sur laminine par rapport à un support plastique (Yu et al., 2000). De plus, la régulation de l'expression et de la phosphorylation de FAK dans des CEI en migration semble radicalement différer en fonction du type de matrice des CEI, i.e. protéines de la matrice extracellulaire (collagène, laminine, fibronectine) vs. plastique. En d'autres termes, il est observé une diminution de l'expression

et de la phosphorylation de FAK dans des CEI en migration cultivées sur collagène, laminine, fibronectine vs. CEI statiques, tandis qu'il est observé une augmentation de l'expression et de la phosphorylation de FAK dans des CEI en migration cultivées sur support plastique vs. CEI statiques (Basson et al., 2006; Yu et al., 2000).

Cependant, quel que soit le type de matrice utilisé, le rapport FAK phosphorylée sur FAK totale est augmenté dans les CEI en migration par rapport aux CEI statiques, ce qui suggère qu'une augmentation de l'activité catalytique de FAK est associée à la migration des CEI (Yu et al., 2000). De la même façon, le traitement par siRNA dirigés contre FAK entraîne une augmentation de la migration des IEC-6 cultivées sur collagen I. Mais, cette augmentation de la migration des CEI est également associée à une augmentation du ratio FAK phosphorylée sur FAK totale. Ce résultat suggère que l'activation accrue de FAK, probablement mise en jeu pour compenser le silencing imposé par les siRNA, permet la migration des CEI (Basson et al., 2006).

1.3. L'influence du microenvironnement cellulaire sur les fonctions de

la barrière épithéliale intestinale

Au cours des dernières décennies, il est apparu de plus en plus clair que le microenvironnement de la BEI joue un rôle fondamental dans la régulation de ses fonctions et notamment de son homéostasie. En effet, la BEI est environnée à la fois par le contenu luminal, riche en éléments nutritionnels et en bactéries, et également par un compartiment « intérieur » constitué de plusieurs types de cellules dont la diversité cellulaire est quasi identique à celle retrouvée dans l'ensemble du corps humain. En effet, à proximité immédiate de la BEI et communiquant avec celle-ci *via* des voies paracrines, se trouvent, entre autres, des (myo)fibroblastes, des cellules immunitaires, des cellules musculaires, des cellules endothéliales et des cellules nerveuses (Figure 17).

A ce jour, l'impact direct de ces constituants cellulaires sur l'homéostasie de la BEI en situation physiologique a été peu étudié sauf concernant l'impact de son microenvironnement « immédiat », i.e. de la matrice extracellulaire. Une des raisons de cette absence de données sera brièvement abordée dans le paragraphe suivant. D'autre part, par volonté de concision et de précision, seuls les rôles de la matrice extracellulaire et des myofibroblastes dans la régulation des fonctions de la BEI seront étudiés. Le rôle des autres composantes du microenvironnement ne sera donc pas abordé comme par exemple celui de la flore commensale qui est néanmoins fondamental à la fois lors du développement mais aussi dans le maintien de l'homéostasie de la BEI (Ismail and Hooper, 2005).

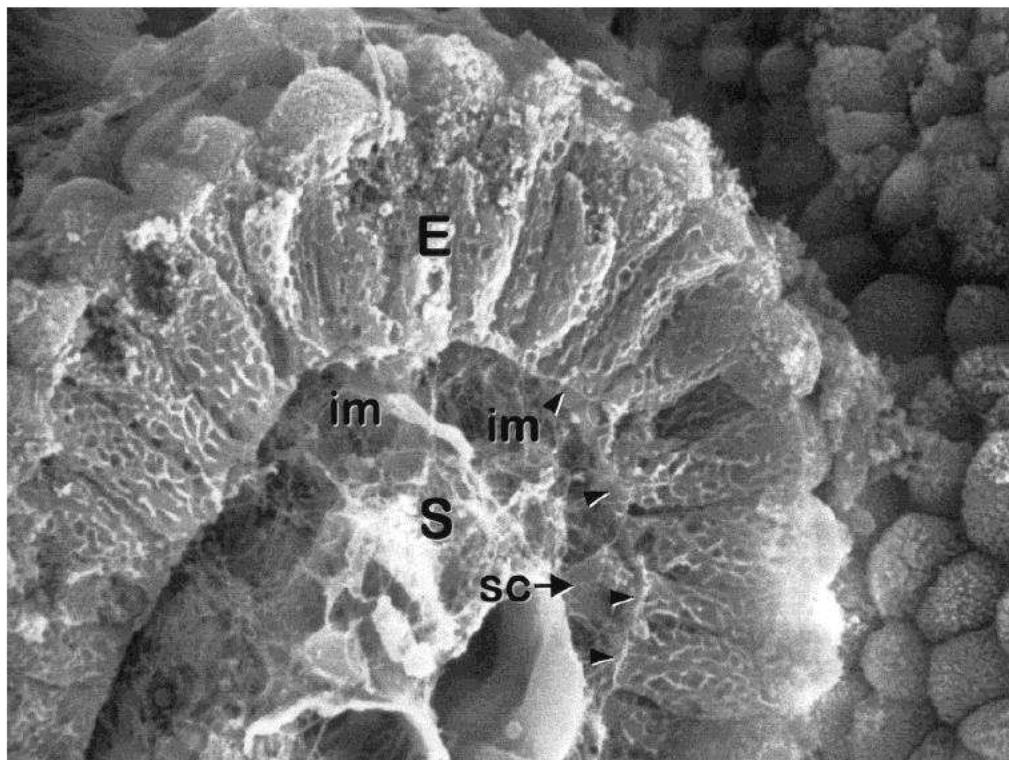


Figure 17 : Le microenvironnement cellulaire et moléculaire des CEI

Photo en microscopie électronique d'un villus de l'intestin grêle (embryonnaire) en coupe longitudinale. La BEI (E) est environnée par le stroma (S) ou lamina propriae constituée d'une matrice interstitielle complexe (im), composée de collagènes fibrillaires et non fibrillaires, de protéoglycans et de glycoprotéines, et contenant de nombreux types cellulaires (sc pour stromal cells) dont des cellules mésenchymateuses, des cellules musculaires et des cellules endothéliales. A l'interface des deux tissus se trouve une couche fine et continue qui constitue la matrice extracellulaire spécialisée, la lame basale (tête de flèches). Grossissement x 2,200. D'après Lussier et al, 2000.

1.3.1. Les difficultés de l'étude de l'influence du microenvironnement cellulaire

Le problème posé lors de l'étude du rôle spécifique d'un type cellulaire particulier dans le contrôle des fonctions de la BEI *in vivo* est dû principalement à la difficulté à activer ou inhiber spécifiquement le type cellulaire en question. Cette constatation est particulièrement vraie pour les cellules non excitables. Les techniques modernes de génie génétique, et plus particulièrement le développement récent de modèles de délétion/expression conditionnelle de molécules d'intérêt dans un type cellulaire spécifique, ont permis des avancées importantes. Néanmoins, il est difficile d'identifier des marqueurs spécifiques et uniques d'un type cellulaire donné. De façon alternative, certains modèles « pharmacologiques » permettent la délétion d'un type cellulaire spécifique *via* le traitement des animaux avec des agents pharmacologiques altérant de manière spécifique le métabolisme de la cellule visée. Cependant, il est peu probable qu'une substance synthétique agisse de façon spécifique sur un seul type cellulaire et n'ait aucun effet sur les autres cellules de l'organisme. D'autre part, l'ablation totale d'un type cellulaire ou de l'expression d'une molécule clef rend souvent l'étude difficile car elle peut s'accompagner de déséquilibres fonctionnels majeurs voire être létale. Les modèles permettant une destruction modérée d'un type cellulaire semblent être une bonne alternative.

Aussi, un grand nombre de modèles permettant d'étudier les interactions entre la BEI et son environnement reposent sur des modèles *in vitro* de culture et de co-culture (Figure 18). Ils présentent l'avantage d'étudier directement l'influence du type cellulaire ou du facteur d'intérêt sur la BEI. Néanmoins, ils ont l'inconvénient de ne pas reproduire l'environnement de la BEI dans son intégralité et donc, de ne pas reproduire véritablement les effets « réels » observés *in vivo*.

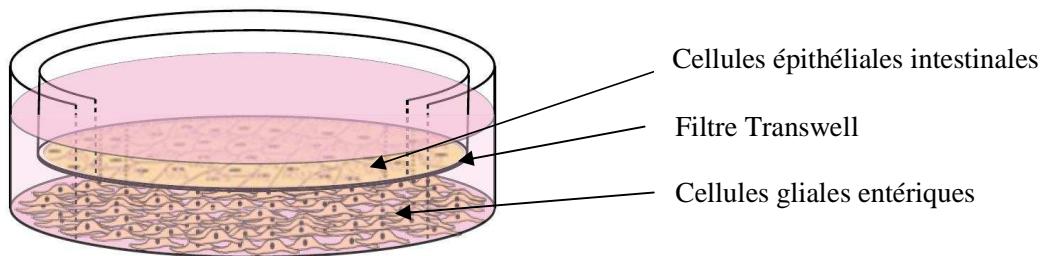


Figure 18 : Modèle de co-culture sur filtre Transwell

Le modèle de co-culture sur filtre Transwell est un modèle de culture cellulaire où des cellules, par exemple des cellules épithéliales intestinales, sont cultivées sur filtres et mises en présence d'un autre type cellulaire, par exemple des cellules gliales entériques. Les deux types cellulaires n'établissent pas de contact et le filtre présente une porosité de 0,40µm de diamètre. Seule une communication de type paracrine est donc permise entre les deux espèces cellulaires.

1.3.2. Contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale par la matrice extracellulaire

Autrefois considérée comme un support amorphe, il est désormais clair que la matrice extracellulaire des CEI est une structure dynamique hautement organisée et régulant les fonctions de la BEI (Figure 19). Les CEI reposent sur une lame basale composée de collagène IV, de laminines mais aussi de fibronectine et d'autres protéoglycans (Tableau 1). Les protéines de la matrice et les intégrines sont exprimées de façon différentielle durant le développement de l'intestin et le long de l'axe crypto-villositaire, permettant ainsi à la fois une modification de composition de la matrice mais aussi du récepteur associé. Ces gradients et modifications d'expression de composants de la matrice jouent un rôle majeur dans la régulation des fonctions contrôlant le renouvellement de la BEI (Basson, 2003).

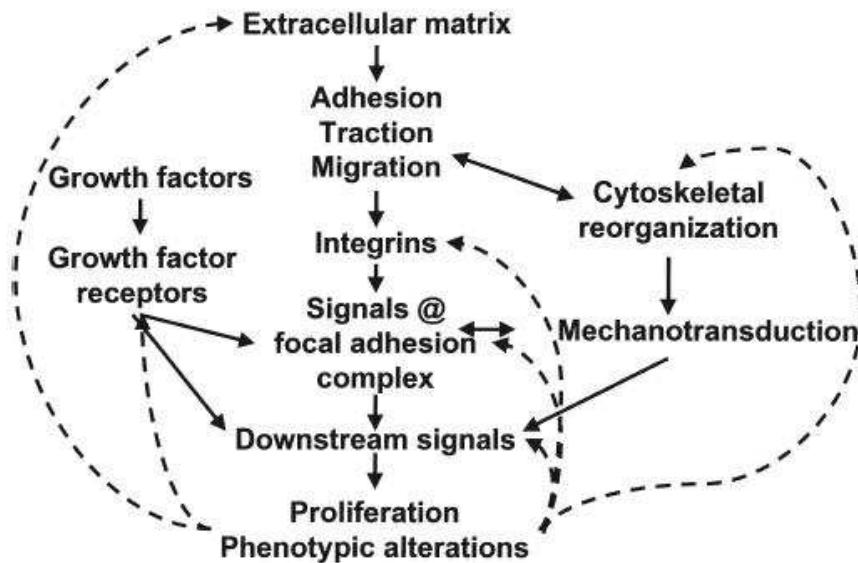


Figure 19 : Influence de la matrice extracellulaire sur les fonctions des CEI

Les interactions cellule-matrice au niveau des sites d'adhésion, dont notamment les adhésions focales (*focal adhesion complex*), permettent l'adhésion de la cellule à sa matrice (*extracellular matrix*) mais sont également soumises à des forces mécaniques dans des cellules motiles ou statiques. Ces interactions engendrent la transduction de signaux au niveau des adhésions focales via les intégrines (*integrins*) et entraînent la réorganisation du cytosquelette de la CEI (*cytoskeletal reorganization*), résultant en un mécanisme de mécanotransduction encore peu décrit. Ces évènements interagissent pour générer des signaux en aval (*downstream signals*) qui contrôlent la prolifération et le phénotype cellulaire (*proliferation and phenotypic alterations*). Certains facteurs (*growth factors*) activent leur propre cascade et interagissent également avec les signaux générés par les interactions de la cellule avec sa matrice. Enfin, les changements phénotypiques induits peuvent entraîner des modifications d'expression/activité et d'organisation intracellulaire des protéines impliquées dans les interactions cellule-matrice mais aussi d'expression/sécrétion de protéines de la matrice ou de MMP (metallomatrix-proteinases) (boucle de rétrocontrôle en pointillés). D'après Basson et al, 2003

Molécules de la lame basaleCollagène de type IV¹Laminin-1^{1,2}Laminin-2^{1,2}Laminin-5²Laminin-10^{1,2}

Entactine/nidogène

Heparan sulfate protéoglycans

Molécules associées à la lame basaleFibronectine^{1,2}Ténascine-C^{1,2}SPARC/BM40/Ostéonectine¹Ostéopontine^{1,2}Décorine^{1,2}

¹ Exprimé différenciellement durant le développement² Exprimé différenciellement le long de l'axe crypto-villositaire

Tableau 1 : Les composants de la matrice extracellulaire des cellules épithéliales intestinales

D'après Lussier et al, 2000 et Mahoney et al, 2008.

Dans ce contexte, parmi les composants de la lame basale, les laminines sont des acteurs majeurs dans le contrôle du devenir des CEI le long de l'axe crypto-villositaire (Kedinger et al., 1998). Quatre isoformes de laminines sont majoritairement présentes dans l'intestin : la laminine-1 composée des sous-unités $\alpha 1\beta 1\gamma 1$, la laminine-2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$), la laminine-5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) et la laminine-10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$) (Turck et al., 2005). Dans l'intestin adulte humain, la sous-unité $\alpha 1$ est exprimée selon un gradient décroissant depuis le haut des villosités jusqu'en bas de la crypte. La sous-unité $\alpha 2$ est, quant à elle, présente uniquement dans le fond des cryptes (Beaulieu and Vachon, 1994; Simon-Assmann et al., 1994). L'expression de la laminine-5 est associée au compartiment de migration et de différenciation des CEI (Leivo et al., 1996). La sous-unité $\alpha 5$, composante de la laminine-10, est exprimée

de manière plus importante au niveau des villi (Kedinger et al., 1998; Mahoney et al., 2008).

Une étude récente a comparé la capacité des 4 isoformes de laminine présentes dans l'intestin à moduler l'adhésion, la prolifération et la différenciation des CEI. En utilisant la lignée Caco-2/TC7 cultivée sur un support coaté avec les différentes isoformes de laminine, ces travaux montrent que la laminine-1 est un puissant inducteur de la différenciation des CEI tandis que les autres isoformes stimulent l'adhésion et la prolifération (Turck et al., 2005).

Différentes études semblent suggérer un rôle pour la laminine-5 dans le contrôle de la migration des CEI (Kedinger et al., 1998). Une étude récente a également mis en évidence que la laminine-5 induisait la formation de jonctions adhérentes dans la lignée HT29 (Chartier et al., 2006). Les signaux provenant de la composition de la matrice sont transduits au niveau des intégrines induisant des changements phénotypiques *via* la stimulation de gènes tels que le facteur de transcription *Cdx-2* contrôlant l'expression de marqueurs de la différenciation des CEI (Kedinger et al., 1998). Ainsi, la différenciation des cellules Caco-2/15 implique la transcription de gènes contrôlant la différenciation des CEI *via* l'activation de CDX2 et des voies p38-dépendantes. En effet, la fixation de CDX2 au promoteur de la sucrase-isomaltase est bloquée par l'inhibiteur de p38 ce qui entraîne une diminution de son activité transcriptionnelle et une diminution de la différenciation des CEI (Houde et al., 2001).

Le collagène IV est exprimé de manière uniforme le long de l'axe cryptovillositaire (Beaulieu, 1992). De nombreuses études ont montré que le collagène IV induit la différenciation des CEI (Basson et al., 1996b) et augmente l'étalement et la migration des CEI *via* des voies Src-dépendantes (Sanders and Basson, 2004; Sanders and Basson, 2008).

Les forces physiques telles que les déformations de la paroi intestinale, les forces de tiraillement ou les forces de pression dues au péristaltisme ou encore au passage du bol alimentaire modulent les fonctions des CEI et, plus particulièrement, stimulent la

prolifération et la motilité des CEI (Chaturvedi et al., 2008; Chaturvedi et al., 2007). Dans ce contexte, la matrice extracellulaire est un acteur majeur dans la transduction du signal s'effectuant notamment au niveau des lieux d'adhésion de la cellule à sa matrice *via* les intégrines (Geiger et al., 2001).

Lors d'une lésion de la BEI associée à une dénudation de la matrice extracellulaire, les CEI sont au contact de la matrice interstitielle dont la composition diffère de la lame basale. En effet, la matrice interstitielle est composée majoritairement de collagènes fibrillaires (types I et III essentiellement), de fibronectine et de nombreux protéoglycans (Basson, 2003). Il a été montré que la fibronectine, également exprimée au niveau de la lame basale selon un gradient crypto-villositaire, module l'adhésion des CEI à leur matrice et favorise la restitution épithéliale (Goke et al., 1996; Kolachala et al., 2007). De plus, la culture de Caco-2 sur collagène I augmente la motilité des CEI et diminue leur différenciation par rapport à un support coqué collagène IV ou laminine. Le collagène I stimule également la prolifération des CEI par rapport à des supports plastiques ou coatés à la laminine ou au collagène IV (Basson et al., 1996b). Il est essentiel de remarquer que la matrice extracellulaire régule les fonctions des CEI qui sont elles-mêmes en partie responsables de sa production et de sa dégradation, fonctions qu'elles partagent avec les cellules mésenchymateuses de leur microenvironnement (Basson, 2003; Kedinger et al., 1998).

Enfin la matrice extracellulaire est aussi une source de stockage de différents facteurs tels que le TGF- β 1 (transforming growth factor), le FGF (fibroblast growth factor) ou encore le HGF (hepatocyte growth factor) qui peuvent être liés aux protéines de la matrice (D'Amore, 1990; Taipale and Keski-Oja, 1996). Ainsi, ces facteurs représentent un pool de facteurs qui peuvent être libérés en basal par les cellules du microenvironnement mais aussi lors de conditions pathologiques où l'on observe une augmentation de la libération

d'enzymes clivant les protéines de la matrice. Ceci provoque donc la libération et l'activation des facteurs piégés dans les mailles de la matrice extracellulaire. Ainsi, par exemple, la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β entraîne la sécrétion de PGE₂ (prostaglandine E₂) par les cellules endothéliales (Guo et al., 2006). Une récente étude a montré que la PGE₂ induit alors l'angiogénèse en activant la MT1-MMP (membrane-type 1 matrix metalloproteinase) qui induit la libération de TGF- β 1 de la matrice extracellulaire, où il est maintenu à l'état latent, en clivant sa liaison à LTBP-1 (latent TGF-beta binding proteins) (Alfranca et al., 2008; Tatti et al., 2008).

1.3.3. Contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale par les myofibroblastes

Au sein de la *lamina propriae* ou chorion, se trouvent également des cellules mésenchymateuses telles que les fibroblastes et les myofibroblastes. Les myofibroblastes expriment l' α -smooth muscle actin (α -SMA) et sont organisés en denses syncytiums tridimensionnels au sein de la *lamina propriae* reliant ainsi les péricytes, les fibroblastes sous-épithéliaux, les CEI et les cellules musculaires lisses de la *muscularis mucosae*. Ils produisent et sécrètent des molécules de la matrice extracellulaire telles que le collagène, mais aussi des facteurs de croissance tels que le FGF, le TGF- α ou le KGF (keratinocyte growth factor) ou encore des MMP (matrix metalloproteinases) (Powell et al., 1999). De plus, des études proposent que les myofibroblastes présentent un phénotype différent selon les régions intestinales. Il a ainsi été montré que le HGF est exprimé majoritairement par les myofibroblastes du colon proximal par rapport aux fibroblastes d'autres régions de l'intestin. De la même façon, le TGF- β 1 est plus exprimé dans l'iléon distal (Plateroti et al., 1998).

De nombreuses études ont montré que les fibroblastes/myofibroblastes sous-épithéliaux jouent un rôle majeur dans la régulation des fonctions de la BEI. D'une manière générale, les fibroblastes et les myofibroblastes induisent la prolifération et la différenciation des CEI et favorisent la réparation de la BEI (Chen et al., 2005; Halttunen et al., 1996; McKaig et al., 1999).

Tout d'abord, au cours du développement de l'intestin, il a été montré que les myofibroblastes jouent un rôle majeur dans la morphogenèse cryptovillositaire de la muqueuse intestinale et en particulier, *via* l'expression de la protéine épimorphine qui est impliquée dans la morphogenèse épithéliale. Ainsi, il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que la diminution de l'expression de l'épimorphine dans les myofibroblastes induit une altération de la morphologie des CEI et de la structure des cryptes/villi. Ce contrôle de la morphogenèse de la muqueuse intestinale semble être médié en partie par la libération de Bmp4 (Bone morphogenetic protein 4) par les myofibroblastes (Fritsch et al., 2002). D'autre part, chez les souris epimorphin -/-, il existe une augmentation de la prolifération des cellules de la crypte (Wang et al., 2006).

Le contrôle de la prolifération épithéliale par les fibroblastes fait intervenir des voies paracrines associées à différents médiateurs solubles. En effet, le surnageant de myofibroblastes augmente la prolifération des cellules HT29 (Chen et al., 2005). De plus, des myofibroblastes, issus de cultures primaires ou de la lignée 18Co et traités à la PGE₂, induisent une augmentation de la prolifération des CEI *via* la libération d'Amphireguline et de HGF (Shao et al., 2006). Par ailleurs, l'existence d'une régulation du phénotype des myofibroblastes de manière région-dépendante dans l'intestin pourrait expliquer pourquoi, *in vitro* et *in vivo*, les myofibroblastes, activés par le GLP2 (Glucagon-like Peptide 2), induisent la prolifération des CEI d'origine colique mais pas des CEI provenant de l'intestin grêle (Bulut et al., 2008; Orskov et al., 2005). D'autre part, certaines études remettent en question

l'effet pro-prolifératif des myofibroblastes sur les CEI. En effet, dans un modèle *in vitro* de réparation de la BEI, le surnageant de culture de myofibroblastes entraîne une diminution de la prolifération des IEC-6 (McKaig et al., 1999). De plus, le surnageant de fibroblastes intestinaux provenant de différentes régions de l'intestin inhibe la prolifération de la lignée intestinale endocrine de souris STC-1 (Ratineau et al., 1997).

Outre leur implication dans le contrôle de la prolifération des CEI, les fibroblastes contrôlent également la différenciation des CEI. En effet, *in vitro*, les fibroblastes induisent la différenciation des T84 *via* la sécrétion de TGF- β (Halattunen et al., 1996). Par ailleurs, de manière analogue au contrôle des propriétés mitogéniques des CEI, les fibroblastes modulent différemment le profil d'expression des peptides hormonaux dans les cellules endocrines STC-1 selon la région intestinale dont ils sont issus (Ratineau et al., 1997).

Enfin, en sécrétant divers facteurs motogéniques tels que des membres de la famille des EGF mais aussi des MMP, les (myo)fibroblastes favorisent la migration cellulaire et la restitution épithéliale (Powell et al., 2005; Powell et al., 1999). En particulier, une étude *in vitro* a directement montré que le surnageant de culture primaire de myofibroblastes coliques humains augmente la réparation de monocouches de CEI T84 et IEC-6 *via* la sécrétion de TGF- β 3 (McKaig et al., 1999). Dans une autre étude, des myofibroblastes traités à la PGE₂, induisent également une augmentation de la migration des CEI *via* la libération d'Amphiregulin et de HGF (Shao et al., 2006). Par ailleurs, l'effet des myofibroblastes sur la migration semble lui aussi être région-dépendant puisque le surnageant de CCD-18Co traités au GLP2 induit une augmentation de la migration cellulaire des IEC-18 mais pas des Caco-2. Dans cette étude, les médiateurs VEGF (vascular endothelium growth factor) et TGF- β 1 ont été décrits comme responsables des effets pro-migratoires des myofibroblastes sur les CEI (Bulut et al., 2008).

2. Le système nerveux entérique

2.1. Découverte du système nerveux entérique

En 1899, Bayliss et Sterling publient les premiers travaux décrivant le rôle fonctionnel du système nerveux entérique (SNE). Chez des chiens anesthésiés, en isolant des anses intestinales et en y exerçant une pression du côté luminal, ils observent que le mouvement du contenu luminal s'accompagne d'une contraction dans le sens oral et d'une relaxation dans le sens anal. Ils montrent que les contractions péristaltiques sont des réflexes coordonnés induits par une stimulation mécanique de l'intestin et conduits par le système nerveux local (i.e. intrinsèque) indépendamment du système nerveux périphérique. Ils définissent alors la « loi de l'intestin » : « Local stimulation of the gut produces excitation above and inhibition below the excited spot. These effects are dependent on the activity of the local nervous mechanism. » (Bayliss and Starling, 1899). Dans cette loi, ils identifient le plexus d'Auerbach comme la structure nerveuse responsable du réflexe péristaltique.

Cinquante ans auparavant, G. Meissner (1857) et L. Auerbach (1864) avaient décrit la présence de neurones dans la paroi intestinale (Timmermans et al., 1997). Puis, R. Y. Cajal a établi l'existence de plusieurs types neuronaux intestinaux, en réalisant des marquages argentiques. A. S. Dogiel (1899) a réalisé la classification de ces différents types neuronaux selon leur microarchitecture (Furness et al., 2004b). Enfin, J. N. Langley, en cartographiant le système nerveux autonome dans les années 1920, a initié la compréhension des caractéristiques neurochimiques du SNE.

Identifié comme troisième composante du système nerveux autonome, le SNE a cependant été longtemps considéré comme un simple relais post-ganglionnaire du système nerveux parasympathique. Les travaux scientifiques menés depuis ces quarante dernières années ont indéniablement démontré que le SNE est un système nerveux intégratif et indépendant du SNC. Néanmoins, malgré l'autonomie fonctionnelle du contrôle des fonctions digestives par le SNE, le tube digestif est également contrôlé par une innervation extrinsèque d'origine sympathique et parasympathique. (Grundy et al., 2006).

2.2. Anatomie du système nerveux entérique

Le SNE s'organise en différents plexus localisés dans la paroi du tube digestif (Figure 20). Il est composé principalement de 2 plexus majeurs organisés en ganglions, le plexus myentérique ou d'Auerbach et le plexus sous-muqueux ou de Meissner, ainsi que de 2 plexus ne présentant pas de structure ganglionnaire, le plexus de la muscularis mucosae et le plexus muqueux (Wedel et al., 1999). Le plexus myentérique est localisé entre la couche musculaire lisse longitudinale et la couche musculaire lisse circulaire et est présent depuis l'œsophage jusqu'au rectum. Le plexus sous muqueux est situé sous la muqueuse et n'est présent que dans l'intestin. Ces plexus diffèrent entre eux par leur topographie, leur morphologie et le phénotype neurochimique de leurs neurones. Notamment, le plexus myentérique présente une densité de neurones plus importante que le plexus sous-muqueux (Furness, 2000; Timmermans et al., 1997; Wedel et al., 1999).

D'autre part, le nombre et l'organisation des plexus du SNE varient selon les espèces reflétant une adaptation du SNE lors de l'évolution des espèces. Chez le cobaye, il n'existe qu'un seul plexus sous-muqueux tandis que chez le porc, on distingue 2 plexus sous-

muqueux : le plexus de Meissner, localisé dans la sous-muqueuse proche de la couche muscularis mucosae et le plexus de Schabadasch, reposant sur la couche musculaire lisse circulaire. Chez l'homme, on distingue un 3^e plexus sous-muqueux, le plexus intermédiaire, localisé entre le plexus de Meissner et le plexus de Schabadasch (Timmermans et al., 1997; Wedel et al., 1999).

Le plexus sous-muqueux contrôle principalement les fonctions de la muqueuse intestinale tandis que le plexus myentérique régule principalement les fonctions de motricité du tube digestif. Cependant, des communications étroites existent entre les plexus permettant de contrôler les fonctions de sécrétion et de motricité (Cooke et al., 1993). Le SNE forme également des projections vers les ganglions cœliaques et mésentériques (Szurszewski et al., 2002) et innervé également d'autres organes tels que le pancréas (Anglade et al., 1987; Kirchgessner et al., 1992a) et la vésicule biliaire (Mawe and Gershon, 1989).

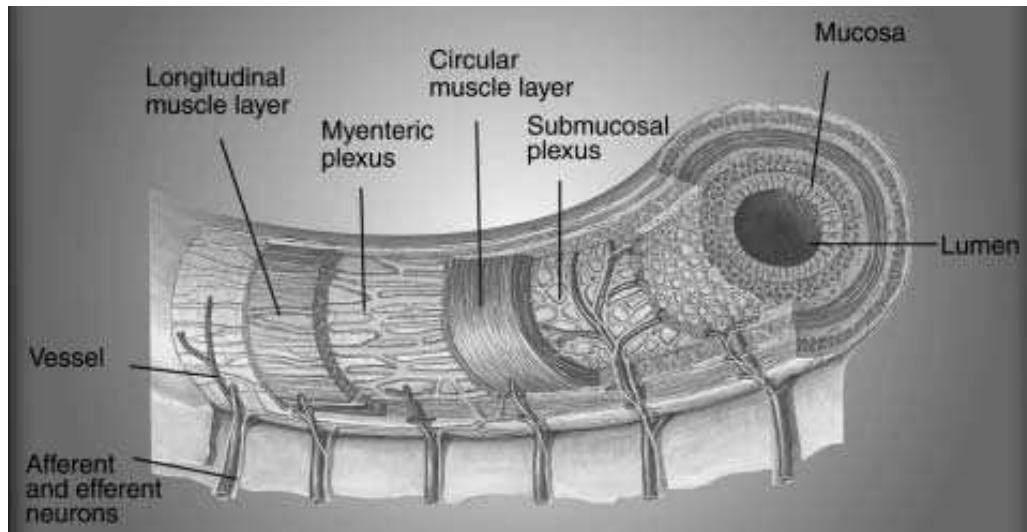


Figure 20 : Innervation du tube digestif par le système nerveux entérique

Le système nerveux entérique est constitué principalement de deux plexus : le plexus myentérique (myenteric plexus) situé entre la couche musculaire lisse longitudinale (longitudinal muscle layer) et la couche musculaire lisse circulaire (circular muscle layer); et le plexus sous-muqueux (submucosal plexus) situé sous la muqueuse (mucosa). D'après Hansen et al, 2003.

2.3. Ontogénèse du système nerveux entérique

Les cellules du SNE dérivent des cellules des segments vagal, sacré et rostro-troncal de la crête neurale (Figure 21) (Gershon, 1998). Les cellules de la crête neurale vagale envahissent l'intestin antérieur à 9 jours chez l'embryon de souris et à 4 semaines de gestation chez l'homme. Elles migrent ensuite dans le sens rostro-caudal pour coloniser de façon séquentielle l'intestin antérieur (œsophage, estomac et duodénum), puis l'intestin moyen (intestin grêle, colon transverse et appendice), et enfin l'intestin postérieur (colon transverse, colon distal, sigmoïde et rectum). Les cellules du segment rostro-troncal participent à la colonisation de l'œsophage et de la partie supérieure de l'estomac. Enfin, les cellules du segment sacré commencent leur migration plus tardivement dans le sens caudo-rostral pour coloniser le colon. La colonisation intestinale par les cellules de la crête neurale est achevée à 15 jours chez l'embryon de souris et à 7 semaines de gestation chez l'homme (Heanue and Pachnis, 2007).

Lors du développement du SNE, la communication entre les cellules précurseurs et l'expression et l'intervention séquentielle de différents facteurs et récepteurs influencent la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices du SNE (Heanue and Pachnis, 2007). En particulier, le facteur GDNF (Glial-Derived Neurotrophic Factor) et ses récepteurs Ret et GFR α 1 sont des acteurs majeurs dans le développement du SNE. En effet, dans les animaux transgéniques mutés pour ces 3 gènes, une absence de ganglion entérique est observée à partir de l'estomac (Cacalano et al., 1998; Moore et al., 1996; Pichel et al., 1996; Sanchez et al., 1996; Schuchardt et al., 1994; Shepherd et al., 2001; Shepherd et al., 2004). De plus, il a été montré que lors du développement, le GDNF était exprimé par les cellules du mésenchyme du tube digestif selon un gradient de concentration rostro-caudal en amont du front de migration des cellules de la crête neurale (Natarajan et al., 2002; Young et al., 2001),

suggérant un rôle chémoattractif du GDNF, guidant ainsi les cellules précurseurs lors de leur migration. L'endothelin-3 (EDN-3), son récepteur EDNRB et l'enzyme responsable de l'activation de l'EDN-3, ECE-1 (Endothelin-Converting Enzyme-1) jouent également un rôle clef dans le développement du SNE. En effet, des souris arborant des mutations pour leurs gènes respectifs présentent une absence de ganglions entériques au niveau du colon distal (Baynash et al., 1994; Hosoda et al., 1994; Yanagisawa et al., 1998). De la même manière que le GDNF, EDN-3 est exprimée par les cellules du mésoderme de l'intestin moyen et postérieur (Barlow et al., 2003), suggérant également un rôle de la voie de signalisation EDN-3 dans le contrôle de la migration des cellules de la crête neurale (Heanue and Pachnis, 2007). De plus, le nombre de cellules de la crête neurale est diminué chez des souris muté sur le gène EDN-3 (Bondurand et al., 2006) et leur différenciation est inhibée par la présence de l'EDN-3 (Nagy and Goldstein, 2006; Wu et al., 1999), suggérant que la voie de signalisation EDN-3 maintient le pouvoir mitogène des cellules de la crête neurale en inhibant leur différenciation.

De plus, des mutations dans les gènes codant pour le GDNF, Ret, l'EDN-3, EDNRB et ECE-1 ont été identifiées chez des patients atteints de la maladie de Hirschsprung, pathologie digestive caractérisée par une absence de ganglions entériques dans le colon distal (Heanue and Pachnis, 2007).

La différenciation des cellules de la crête neurale en neurones entériques ou en cellules gliales entériques (CGE) commence dès le début de leur migration (Heanue and Pachnis, 2007). Contrairement au système nerveux central, pendant leur différenciation, les cellules précurseurs du SNE continuent à proliférer et expriment des marqueurs généraux neuronaux (Hu) ou gliaux (S-100 β) (Young et al., 2005). Différents facteurs de transcription tels que Mash1 et Sox10 contrôlent de manière spécifique la différenciation des cellules du SNE. Ainsi, le facteur de transcription Mash1 est impliqué dans la différenciation des

neurones sérotoninergiques (Blaugrund et al., 1996) et Sox10 dans la différenciation des CGE (Kelsh, 2006). Enfin, différents types de neurones sont générés séquentiellement durant la différenciation des cellules de la crête neurale, les neurones nitrergiques et sérotoninergiques se développant de manière précoce par opposition aux neurones cholinergiques et ceux exprimant la CGRP (Calcitonin-gene related peptide) (Burns et al., 2004). Dans le même contexte, les CGE expriment de façon précoce le marqueur glial S-100 β comparativement à la GFAP (glial fibrillary acidic protein), qui n'est exprimée que plus tardivement (Young et al., 2005).

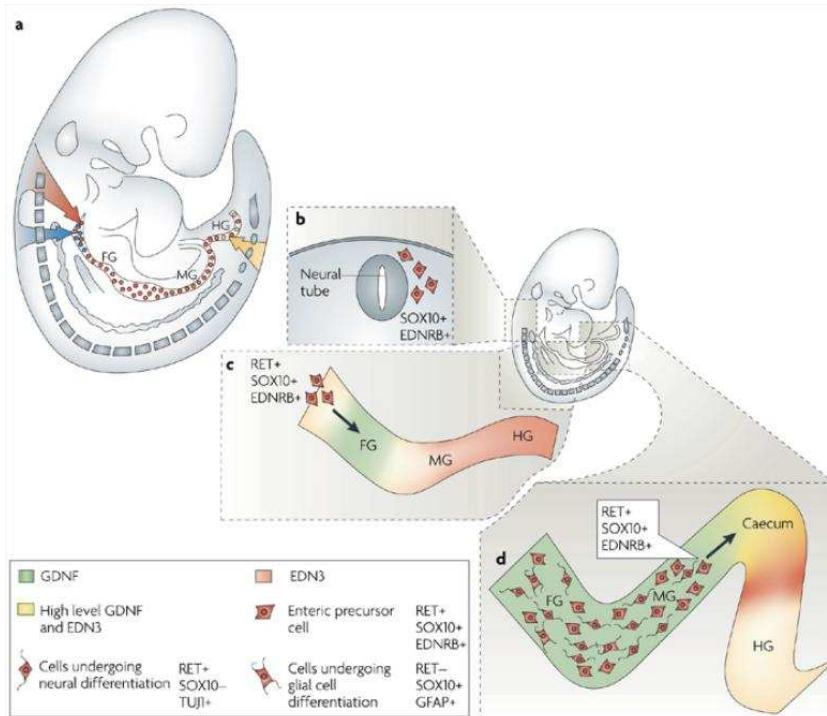


Figure 21 : Ontogénèse du système nerveux entérique

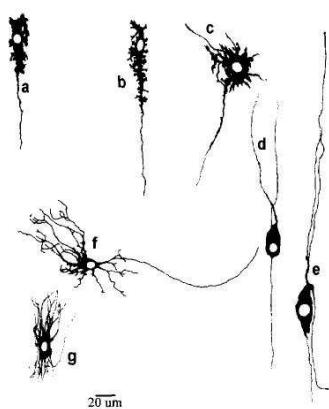
(a). Chez l'embryon de souris, vers le 9^e jour, les cellules de la crête neurale du segment vagal (flèche rouge) envahissent la partie supérieure de l'intestin et migrent dans le sens rostro-caudal afin de coloniser de façon séquentielle l'intestin antérieur (FG), l'intestin moyen (MG) et l'intestin postérieur (HG) (pointillés rouges). Les cellules de la crête neurale de la partie du segment vagal la plus caudale proviennent d'une région qui se superpose avec les cellules de la crête neurale de la partie du segment rostro-troncal la plus antérieure (flèche bleue). Ces cellules participent à la colonisation de l'œsophage et de la partie supérieure de l'estomac. Les cellules du segment sacré (flèche jaune) commencent leur migration plus tardivement (E13,5) dans le sens caudo-rostral pour coloniser le colon (pointillés jaunes). (b). Les cellules de la crête neurale vagale expriment Sox-10 et EDNRB lorsqu'elles émigrent du tube neural. (c). Vers le 9^e jour, les cellules dérivées de la crête neurale expriment Ret. Dans le mésenchyme intestinal, le ligand de Ret GDNF est fortement exprimé dans l'estomac (vert) et le ligand de l'EDNRB EDN3 est exprimé dans l'intestin moyen et l'intestin postérieur (rose). (d). Lors de leur migration (E11), les cellules dérivées de la crête neurale rencontrent de hauts niveaux d'expression de GDNF et d'EDN3 dans le caecum (high level GDNF and EDN3) (jaune). Les cellules en aval du front de migration commencent progressivement à se différencier (cells undergoing neural/ glial cell differentiation). Vers E11,5, GDNF et EDN3 sont exprimés dans la partie distale de la partie intestinale inférieure (non illustrée). D'après Heanue et al, 2007.

2.4. Contrôle des fonctions du tube digestif par les neurones entériques

2.4.1. Morphologie et marqueurs des neurones entériques

Avec plus de 100 millions de neurones, le SNE présente un nombre de neurones équivalent au nombre de neurones de la moelle épinière. On classe généralement les neurones entériques selon leur morphologie, leurs propriétés électrophysiologiques et leur codage neurochimique.

La classification des neurones entériques selon leur morphologie a été initiée par les travaux de Dogiel de 1899 (Figure 22) (Timmermans et al., 1997). La classification de Dogiel, complétée par les travaux de Stach et de Furness, a permis de classer les neurones de type I à VII et neurones géants (Furness et al., 1988; Timmermans et al., 1997). La majorité des neurones entériques sont de type I à III (Hansen, 2003). Les neurones de type I présentent un seul axone et de multiples dendrites courtes et lamellaires. Les neurones de type II possèdent plusieurs axones et n'ont pas de dendrites. Enfin, les neurones de type III sont uniaxonaux et présentent de longues dendrites.



Principaux types morphologiques de neurones entériques de l'intestin grêle chez le cobaye selon la classification de Dogiel. a-c : neurones de type I, uniaxonaux multidendritiques (courtes et lamellaires) ; d-e : neurones de type II, adendritiques multiaxonaux ; f : neurones de type III, uniaxonaux et multidendritiques (longues) ; g : neurones filamenteux. D'après Timmermans et al, 1977.

Figure 22: Classification de Dogiel

Les propriétés électrophysiologiques des neurones définissent leur comportement lors de stimuli électriques associé à la régulation de la libération de neuromédiateurs (quantité et type de neuromédiateurs) à l'interface neuro-neuronale ou neuro-effectrice. On identifie deux grandes classes de neurones : les neurones S (Synaptiques) et les neurones AH (After Hyperpolarization) (Hirst et al., 1974). Les neurones de type S correspondent à des neurones recevant des signaux provenant d'autres neurones *via* des synapses. Ces neurones sont de type I selon la classification de Dogiel. Les neurones AH sont caractérisés par des potentiels d'action insensibles à la tétrodotoxine (TTX) et suivis d'une hyperpolarisation tardive. Ces neurones ont une morphologie de Dogiel de type II (Furness et al., 2004a). En termes de réponse, le neurone stimulé va générer un potentiel d'action qui résulte de l'intégration des stimuli électriques et chimiques en une somme de potentiels postsynaptiques excitateurs rapides ou lents et de potentiels postsynaptiques inhibiteurs.

Les neurones entériques synthétisent et sécrètent des substances chimiques variées qui leur permettent de communiquer entre eux et avec leurs cellules cibles effectrices. Plus de 30 neuromédiateurs ont été répertoriés dans le SNE et jusqu'à 11 substances différentes ont été identifiées dans un même neurone (Tableau 2) (Furness, 2000). Ces substances sont de petites molécules telles que la 5-HT, l'acétylcholine ou l'ATP, des peptides comme le VIP (vasointestinal peptide) ou encore des gaz tels que le monoxyde d'azote (NO). De nombreuses études associant des techniques d'immunohistochimie, de traçage neuronal couplées à des études fonctionnelles et pharmacologiques ont permis de corrélérer le codage neurochimique du neurone avec sa fonction.

Le SNE est un système intégratif et est donc composé de neurones sensitifs, d'interneurones et de neurones moteurs.

Fonction	codage neurochimique
IPAN	ChAT, Calb, CGRP, SP
Interneurones descendants	ChAT, Calret, ENK, SP
Interneurones descendants	5-HT, ChAT, DYN, GRP, NOS, somatostatin, VIP
Neurones moteurs excitateurs	ChAT, Calret, ENK, SP
Neurones moteurs inhibiteurs	DYN, ENK, GRP, NOS, VIP
Neurones sécrétomoteurs	ChAT, CCK, CGRP, DYN, NPY, somatostatin, VIP

Tableau 2 : Diversité du codage neurochimique des neurones entériques

Abréviations : 5-HT : sérotonine (5-hydroxytryptamine) ; ChAT : choline acétyltransférase ; Calb : calbindine ; Calret : calrétiline ; CGRP : calcitonin gene-related peptide ; DYN : dynorphine ; ENK : enképhalines ; GRP : gastrin releasing peptide ; IPAN : intrinsic primary afferent neurons ; NOS : nitric oxide synthase ; SP : substance P ; NPY : neuropeptide Y ; VIP : vasoactive intestinal peptide. D'après Hansen et al, 2003.

2.4.2. Contrôle du péristaltisme

Mis en évidence par Bayliss et Sterling (Bayliss and Starling, 1899), le péristaltisme intestinal est une fonction majeure du tube digestif. Il s'agit d'un réflexe activant un circuit nerveux aboutissant à une relaxation du côté anal et une contraction du côté oral du stimulus. Répété de manière séquentielle le long d'un segment intestinal, ce réflexe permet la progression du bol alimentaire dans l'intestin.

Le réflexe péristaltique peut être initié par un stimulus au niveau de la muqueuse intestinale. Ce stimulus peut être mécanique, tel que la distension mécanique ou le frottement de la muqueuse dus au passage du bol alimentaire, ou chimique, comme la présence d'acides gras, de carbohydrates, une diminution de pH ou encore une hyperosmolarité. Ce stimulus active les cellules entérochromaffines. Ces cellules contiennent de la 5-HT et sont présentes dans toutes les régions de l'intestin constituant la plus importante population cellulaire épithéliale endocrine (Ahlman and Nilsson, 2001). Les cellules entérochromaffines activées

libèrent de la 5-HT qui va ensuite activer les terminaisons nerveuses des neurones primaires afférents intrinsèques ou IPAN (intrinsic primary afferent neurons) présentes dans la muqueuse intestinale (Figure 23) (Furness, 2000).

Les IPAN présentent une morphologie de Dogiel de type II et un comportement électrophysiologique de type AH (Furness, 2000). Il a été montré qu'un stimulus chimique ou mécanique appliqué au niveau de la muqueuse active les IPAN sous-muqueux et myentériques et qu'une distension de l'intestin active les IPAN myentériques (Bertrand et al., 1997; Kirchgessner et al., 1996; Kirchgessner et al., 1992b). De plus, les IPAN sont connectés sur toute la circonférence et la longueur du tube digestif afin de coordonner l'activité motrice de l'intestin (Furness et al., 1998). Les IPAN expriment les neuromédiateurs ACh (acétylcholine), calbindine, SP (susbtance P) et la CGRP (calcitonin gene-related peptide) (Furness, 2000; Wolf et al., 2007).

Les IPAN établissent des connexions avec des interneurones qui présentent majoritairement une morphologie de Dogiel de type I chez l'homme et un comportement électrophysiologique de type S ou AH (Figure 23) (Brehmer, 2006; Hansen, 2003). Dans l'intestin de cobaye, il a été décrit un seul type d'interneurone ascendant, i.e. qui projette vers le côté oral du tube digestif, et trois types d'interneurones descendants, i.e. qui projettent vers le côté anal (Furness, 2000). Les interneurones ascendants sont immunoréactifs pour la ChAT (choline acétyltransférase), les takykinines, l'enkephaline et la calrétinine (Brookes et al., 1997). Les interneurones ascendants communiquent entre eux *via* l'ACh et les récepteurs nicotiniques nAChR tandis qu'ils communiquent avec les neurones moteurs excitateurs *via* des voies cholinergiques et takykinergiques (Bornstein et al., 2004). Parmi les trois classes d'interneurones descendants, les interneurones de phénotype neurochimique ChAT/NOS (nitric oxyde synthase)/VIP sont impliqués dans le réflexe péristaltique et les interneurones ChAT/somatostatin prennent part à la conduction des complexes myoélectriques migrants

dans l'intestin grêle (Furness, 2000). Le troisième groupe de phénotype neurochimique ChAT/5-HT contrôle les réflexes sécréto-moteurs (Furness, 2000). La communication entre les interneurones descendants et les neurones moteurs inhibiteurs est médiée par des voies purinergiques (ATP et son récepteur P2X) et cholinergiques (Galligan et al., 2000).

Les neurones moteurs ascendants et descendants représentent les derniers acteurs du circuit neuronal qui contrôle le réflexe péristaltique (Figure 23). Ces neurones présentent majoritairement une morphologie de Dogiel de type I et un comportement électrophysiologique de type S (Brehmer, 2006). Les neurones moteurs ascendants sont excitateurs et leur activation provoque une contraction du muscle par opposition aux neurones moteurs descendants qui sont inhibiteurs et dont l'activation conduit à une relaxation de muscle. Chez l'homme, les neurones moteurs ascendants sont majoritairement cholinergiques. Chez le cobaye, les neurones moteurs ascendants expriment aussi la ChAT mais également des takykinines, l'enképhaline et la calretinin (Furness, 2000). Les neurones moteurs inhibiteurs expriment la NOS dans la plupart des espèces (Furness, 2000). Néanmoins, la réponse inhibitrice du réflexe péristaltique est également médiée par l'ATP, le VIP, le PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) et le CO (monoxyde de carbone) (Furness, 2000).

Dans le tractus gastrointestinal, il n'existe pas de jonction identique à la plaque motrice de la jonction neuromusculaire du muscle strié. En effet, ces « jonctions » neuromusculaires digestives comportent un troisième acteur cellulaire majeur. Il s'agit des cellules interstitielles de Cajal (CIC) (Ward and Sanders, 2006). Les CIC jouent un rôle de pacemakers intestinaux. En effet, localisées entre le muscle circulaire et le muscle longitudinal au niveau du plexus myentérique, les CIC génèrent spontanément et propagent des ondes lentes tout au long de l'intestin (Sanders et al., 2006). Les CIC forment des gap junctions entre elles et avec les cellules du muscle lisse par lesquelles elles transmettent les

signaux électriques qu'elles génèrent (Ward and Sanders, 2006; Ward et al., 2004). Par ailleurs, les CIC sont innervées par les neurones entériques et expriment différents récepteurs aux neuromédiateurs tels que des récepteurs muscariniques, des récepteurs aux neurokinines et au VIP, suggérant qu'elles participent directement à la transmission du signal neuronal vers les cellules musculaires (Ward et al., 2004). Cette hypothèse est renforcée par l'observation que la stimulation des neurones moteurs entériques induit une augmentation de GMP cyclique dans les CIC (Shuttleworth et al., 1993). D'autre part, dans des modèles transgéniques déficients en CIC, la stimulation électrique des neurones cholinergiques n'entraîne pas de réponse contractile alors que la sensibilité du muscle à l'ACh n'est pas modifiée (Ward et al., 2004).

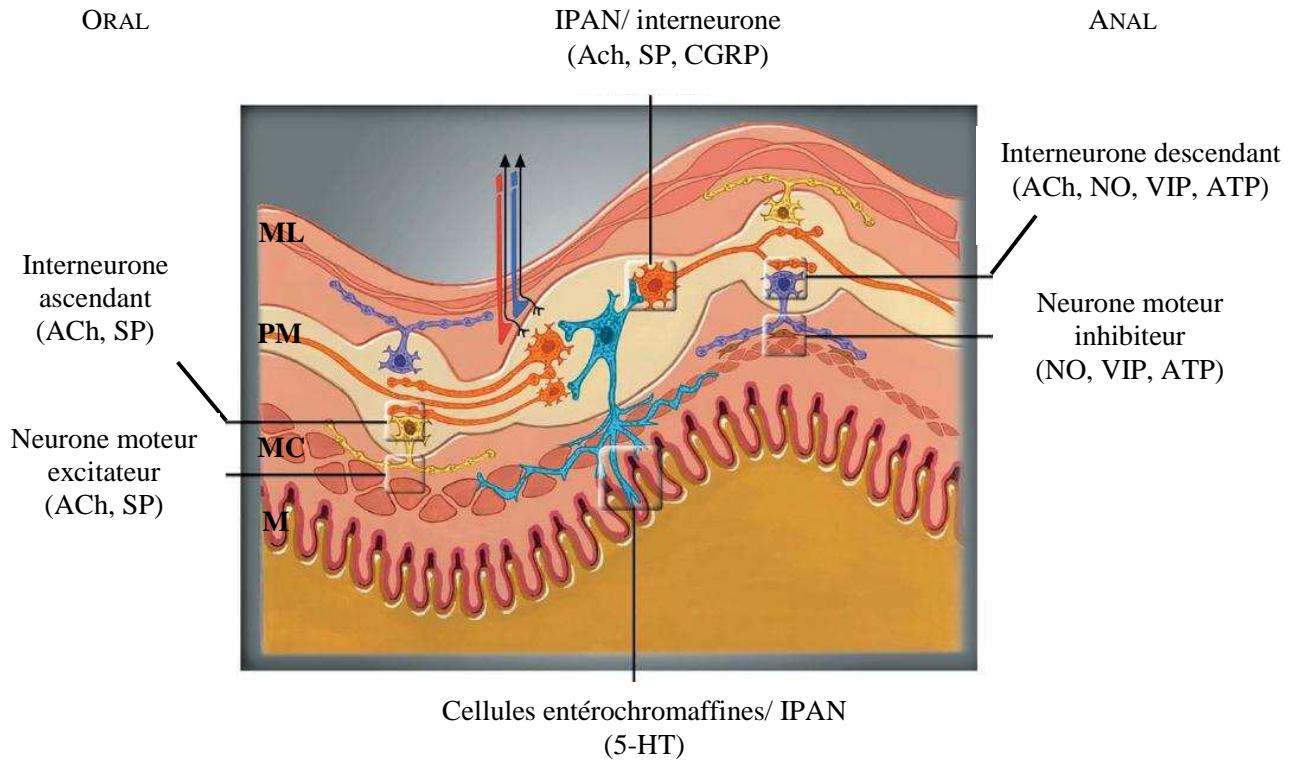


Figure 23 : Schéma des voies nerveuses intrinsèques impliquées dans le réflexe péristaltique

Suite à une stimulation au niveau de la muqueuse, la 5-HT (5-hydroxytryptamine – sérotonine) est libérée par les cellules entérochromaffines et active les IPAN (intrinsec primary afferent neurons). Les IPAN libèrent alors l'ACh (acétylcholine), la SP (substance P) et la CGRP (calcitonin gene-related peptide) qui activent les interneurones ascendants et descendants. Les interneurones ascendants activés vont libérer de l'ACh et de la SP au niveau de la jonction neuromusculaire, ce qui provoque la contraction du muscle. Par ailleurs, les interneurones descendants activés vont libérer de l'Ach, du NO (nitric oxide), du VIP (vasoactive intestinal peptide) et de l'ATP et ainsi activer les neurones moteurs inhibiteurs qui, en libérant du NO, du VIP et de l'ATP, provoquent une relaxation musculaire. Nota Bene : les cellules interstitielles de Cajal ne sont pas représentées ici. Ce réflexe est répété de manière séquentielle le long d'un segment intestinal et permet la progression du bol alimentaire dans l'intestin. (M) : muqueuse ; (MC) : muscle circulaire ; (PM) : plexus myénotrique ; (ML) : muscle longitudinal. D'après Hansen *et al*, 2003.

2.4.3. Contrôle de la sécrétion d'électrolytes et de mucus

Parallèlement à l'induction d'un réflexe péristaltique, les divers stimuli appliqués au niveau de la muqueuse décrits précédemment induisent également la sécrétion d'électrolytes par les cellules de la BEI *via* l'activation d'un réflexe nerveux médié par le plexus sous-muqueux (Figure 24).

Les cellules entérochromaffines jouent ici aussi un rôle majeur dans l'activation de cet arc réflexe en amorçant la réponse sécrétrice *via* la libération de 5-HT (Kim et al., 2001a; Kim et al., 2001b). L'ATP semble également jouer un rôle majeur dans l'initiation du réflexe neurosécréteur. En effet, suite à un stimulus mécanique, les CEI ou les cellules de la lignée BON, lignée humaine ayant une origine entérochromaffique, libèrent de l'ATP (Cooke et al., 2003; Wynn et al., 2003). L'ATP ainsi libéré va, à la fois, stimuler directement la sécrétion d'ions chlores par les CEI ou amplifier la sécrétion de 5-HT par les cellules entérochromaffines (Guo et al., 1997; Xue et al., 2007).

La libération de 5-HT va aboutir à la stimulation de différentes voies afférentes selon la nature du stimulus. En effet, dans le cas d'un frottement mécanique appliqué sur la muqueuse, le réflexe est initié par la libération de 5-HT et les voies afférentes extrinsèques ne sont pas impliquées dans l'initiation du réflexe sécrétomoteur, i.e. seuls les IPAN du sous muqueux projetant vers la muqueuse sont mis en cause (Cooke et al., 1997a; Cooke et al., 1997b). En revanche, lors d'une distension de la muqueuse, les voies afférentes extrinsèques sont impliquées et l'initiation du réflexe sécrétomoteur ne fait pas intervenir la 5-HT. En effet, chez le cobaye, la distension de la muqueuse colique induit une sécrétion d'électrolytes qui est partiellement bloquée par une déafférentation à la capsaicine. De plus, suite à la déafférentation, un traitement au gadolinium inhibe la sécrétion hydroélectrique suggérant

que la distension de la muqueuse active des récepteurs mécanosensibles présents sur les IPAN (Weber et al., 2001).

L'arc réflexe sécrétomoteur ainsi initié par les différentes voies afférentes va ensuite se poursuivre par l'activation d'interneurones qui vont stimuler les neurones sécrétomoteurs sous-muqueux. Il a été montré chez le cobaye que la distribution des neurones sécrétomoteurs était polarisée. En effet, les neurones sécrétomoteurs ascendants sont cholinergiques tandis que les neurones sécrétomoteurs descendants sont VIPergiques (Neunlist et al., 1998). L'activation des neurones sécrétomoteurs va donc entraîner la libération de VIP et/ou d'Ach aux jonctions neuro-épithéliales. La fixation du VIP et de l'ACh aux récepteurs VPAC-1 et muscarinique, respectivement entraîne la libération d'ions chlores par la CEI *via* une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire et une voie calcium-dépendante (Anderson et al., 2003; Hirota and McKay, 2006).

Le réflexe sécrétomoteur est réalisé majoritairement par les neurones du plexus sous-muqueux. Toutefois, il existe également des neurones sécrétomoteurs cholinergiques et VIPergiques dans le plexus myentérique qui projettent vers la muqueuse. De plus, les connexions nerveuses fonctionnelles existantes entre les deux plexus suggèrent une coordination entre les réflexes péristaltique et sécrétomoteur (Costa et al., 2000).

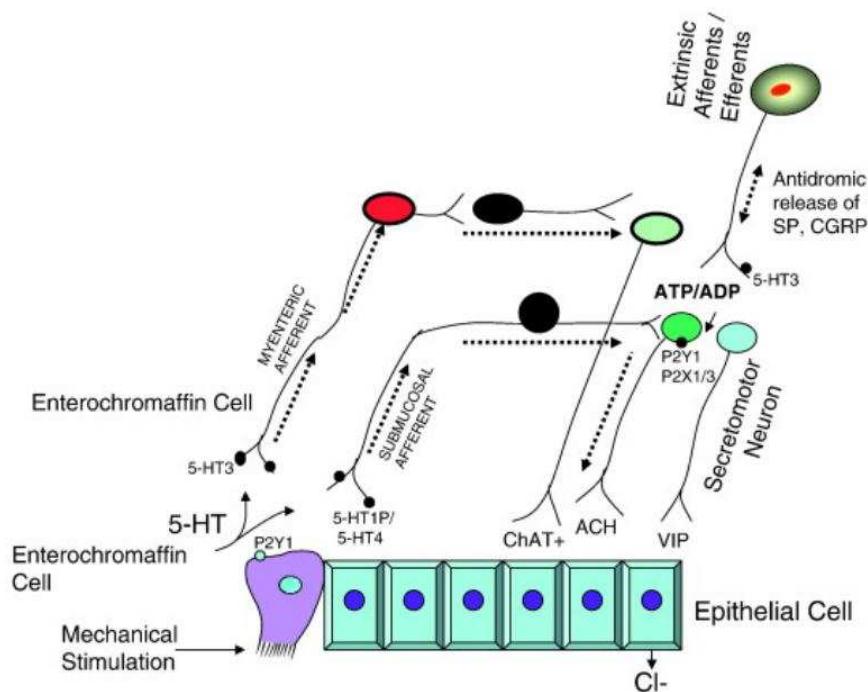


Figure 24 : Schéma simplifié du réflexe sécrétomoteur

Suite à une stimulation mécanique au niveau de la muqueuse, les cellules entérochromaffines (enterochromaffin cells) libèrent de la 5-HT (5-hydroxytryptamine – sérotonine) activant l'arc réflexe sécrétomoteur. Lors d'un frottement mécanique appliqué sur la muqueuse, seuls les IPAN (intrinsic primary afferent neurons) du sous muqueux sont impliqués par opposition à une distension de la muqueuse qui fait intervenir les voies afférentes extrinsèques (extrinsic afferents). Les neurones sécrétomoteurs (secretomotor neurons) ascendants sont cholinergiques tandis que les neurones sécrétomoteurs (secretomotor neurons) descendants sont VIPergiques. La libération du VIP (vasoactive intestinal peptide) et de l'ACh (acétylcholine) par les neurones sécrétomoteurs (secretomotor neurons) entraîne la libération d'ions chlores par les cellules épithéliales intestinales (epithelial cell). D'après Xue et al, 2007.

Parallèlement au contrôle du flux d'ions chlores à travers la BEI, les neurones du plexus sous-muqueux régulent l'absorption d'ions sodium. En effet, une stimulation électrique des neurones du plexus sous-muqueux entraîne une diminution de l'absorption d'ions sodium (Hayashi et al., 2003; Kuwahara and Radowicz-Cooke, 1988).

Outre la régulation des flux ioniques au travers de la BEI, les neurones entériques modulent également la sécrétion de mucus (Phillips et al., 1984). Chez le rat, le VIP stimule la libération de mucines par la muqueuse colique et cette stimulation est bloquée par le TTX. Les segments coliques étant isolés, le contrôle nerveux impliqué dans l'induction de la sécrétion de mucus par le VIP est donc médié par le SNE, intact dans les segments étudiés (Plaisancie et al., 1998). D'autre part, des neuromédiateurs présents dans le SNE tels que la bombésine, la substance P ou encore le VIP induisent la sécrétion de TFF-3 par l'épithélium colique (Moro et al., 2001). Enfin, le SNE régule également l'absorption d'acides aminés par la BEI. En particulier, la CGRP, contenue dans les neurones du SNE et dans les fibres nerveuses du système extrinsèque, diminue l'absorption au niveau de la muqueuse jéjunale d'alanine, de proline et de taurine (Barada et al., 2000).

2.4.4. Contrôle de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale

2.4.4.1. Contrôle de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale

Le rôle des neurones entériques dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire et transcellulaire reste encore peu connu. Néanmoins, des travaux récents suggèrent que, de manière analogue au péristaltisme, il existe un contrôle nerveux régulant la perméabilité de la BEI. En effet, une étude menée sur un segment de muqueuse/sous-muqueuse de jéjunum de porcelet a montré que la TTX induit une augmentation du flux d'inuline à travers la muqueuse, suggérant que les neurones entériques sous-muqueux régulent la perméabilité

intestinale (Hayden and Carey, 2000). Grâce à un modèle de co-culture de sous-muqueuse humaine et d'une monocouche de CEI, le rôle direct de SNE sur la régulation de la perméabilité de la BEI a été mis en évidence. En effet, la stimulation électrique des neurones du plexus sous-muqueux entraîne une diminution de la perméabilité, mesurée par l'évaluation du flux de Dextran-FITC ou de l'inuline-FITC à travers la monocouche épithéliale, associée à une augmentation de l'expression de ZO-1 dans les cellules épithéliales (Neunlist et al., 2003). Un traitement à la TTX et l'ajout d'un antagoniste du récepteur au VIP bloque l'effet de la stimulation électrique, qui est en revanche reproduit par l'ajout de VIP (Blais et al., 1997; Neunlist et al., 2003). De plus, il a été confirmé *in vivo* que le VIP diminue la perméabilité duodénale contrairement à la neurokinine A qui produit l'effet inverse (Hallgren et al., 1998). En parallèle, un traitement au carbachol, agoniste de l'ACh, entraîne une augmentation du flux de [³H]-mannitol à travers une monocouche de CEI (Blais et al., 1997). Enfin des travaux récents ont aussi montré que les neurones entériques régulent la perméabilité transcellulaire de la BEI. En particulier, ces travaux montrent que l'ACh induit une augmentation de la perméabilité transcellulaire de la BEI (Cameron and Perdue, 2007).

2.4.4.2. Contrôle de la prolifération des cellules épithéliales intestinales par les neurones entériques

Les neurones entériques jouent également un rôle important dans le contrôle de la prolifération des CEI. En effet, une étude *in vivo* a montré que les effets trophiques du GLP-2 sur les cellules de la BEI sont médiés par le SNE. En effet, les neurones entériques expriment le récepteur du GLP-2 dont l'ajout induit l'expression neuronale de c-fos, marqueur d'activation neuronale. De plus, les effets trophiques du GLP-2 sont bloqués par la TTX (Bjerknes and Cheng, 2001). D'autre part, à l'aide d'un modèle de co-culture de sous-

muqueuse humaine contenant le plexus sous-muqueux et d'une lignée de cellules épithéliales coliques humaines (HT29 clone 16E), il a été montré que l'activation par stimulation électrique des neurones entériques maintient l'organisation monocouche de la BEI et diminue la prolifération des CEI. Par ailleurs, ces effets anti-prolifératifs sont médiés par une voie VIPergique (Toumi et al., 2003).

Enfin, différents neuromédiateurs peuvent également contrôler la prolifération et la migration des CEI. Aussi, il a été montré que l'analogue de la somatostatine inhibe la prolifération et la migration des CEI (Pawlakowski et al., 1993; Thompson et al., 1993). L'ADP et l'ATP inhibent la prolifération des CEI mais augmentent la restitution épithéliale dans une modèle de réparation *in vitro* utilisant la lignée de CEI non-transformées IEC-6 (Dignass et al., 1998).

2.5. Les cellules gliales entériques

2.5.1. Présentation générale de la cellule gliale entérique

Les cellules gliales entériques (CGE) sont constituées d'un type cellulaire unique dérivé des cellules de la crête neurale (voir chapitre 2.3). De part leurs origines et propriétés, elles présentent de nombreuses similitudes avec les cellules de Schwann non myélinisantes (Cabarrocas et al., 2003). Les cellules gliales périphériques ou cellules de Schwann sont aussi issues des cellules de la crête neurale mais se différencient en cellules de Schwann myélinisantes et non myélinisantes (Woodhoo and Sommer, 2008). Dans le SNC, on distingue trois types de cellules gliales organisés en deux familles selon leur origine. D'une part, la macroglie, dérivant de cellules souches neurales, donne les astrocytes (équivalent des CGE) et les oligodendrocytes (cellules myélinisantes) (Levison et al., 2003). D'autre part, la

microglie, d'origine hématopoïétique, est considérée comme les macrophages résidents du cerveau (Vilhardt, 2005).

Comme les astrocytes du SNC, les CGE sont de petites cellules en forme étoilée entourant les corps des neurones des ganglions et les fibres interganglionnaires (figure 26). Une seule CGE entoure plusieurs neurones entériques (Gershon and Rothman, 1991), tout comme les astrocytes centraux qui peuvent entourer 4 à 8 soma neuronaux et entre 300 et 600 dendrites (Halassa et al., 2007). D'autre part, les CGE forment aussi un véritable syncytium fonctionnel car elles peuvent communiquer entre elles *via* des gap junctions de façon similaire aux astrocytes (Maudlej and Hanani, 1992). La densité des CGE varie en fonction de l'espèce animale et de leur localisation, i.e. plexus sous-muqueux vs. plexus myentérique (Hoff et al., 2008). Ainsi, chez le cobaye, le rapport nombre de CGE/nombre de neurones entériques est de 0,8-1,0 dans le plexus sous-muqueux vs. 1,7 dans le plexus myentérique. Chez l'homme, le rapport nombre de CGE/nombre de neurones est de 1,3-1,9 dans le plexus sous-muqueux vs. 5,9-7,0 le plexus myentérique (Hoff et al., 2008). D'autre part, dans tous les cas, le rapport nombre de CGE/nombre de neurones entériques semble augmenter d'après cette étude selon un axe phylogénétique.

Les CGE forment de nombreuses extensions dont l'organisation et la longueur varient selon leur emplacement. En effet, dans le plexus myentérique de l'intestin grêle de cobaye, les CGE au sein des ganglions présentent de courtes extensions ramifiées de façon irrégulière, tandis que les CGE des fibres interganglionnaires forment de longues extensions parallèles aux fibres nerveuses et peu ramifiées. Au niveau des zones de transition entre ganglions et fibres nerveuses, les CGE présentent à la fois de longs et de courts prolongements plus ou moins ramifiés (Gabella, 1981; Hanani and Reichenbach, 1994). L'ensemble des CGE forme un réseau glial dense localisé au niveau des ganglions des 2 principaux plexus du SNE, i.e. plexus sous-muqueux et myentérique mais aussi dans tous les

plexus « secondaires » (Figure 25) (Bjorklund et al., 1984; Gershon and Rothman, 1991). Par ailleurs, il convient de noter que les CGE sont également présentes au niveau du mésentère le long des fibres nerveuses du système extrinsèque (Gershon and Rothman, 1991).

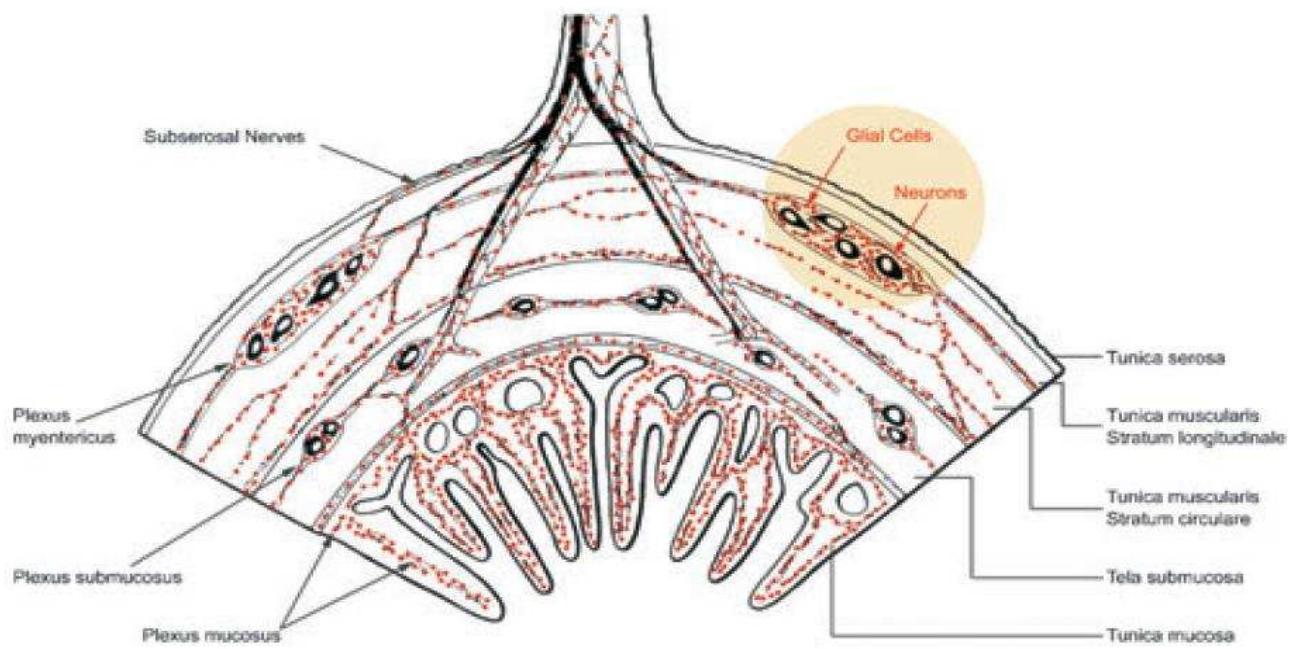


Figure 25 : Distribution du réseau de CGE dans le tube digestif

L'ensemble des CGE (glial cells) forme un réseau glial dense (pointillés rouges) localisé au niveau des ganglions des 2 principaux plexus du système nerveux entérique, i.e. plexus sous-muqueux (submucosus) et myentérique (myentericus) mais aussi dans tous les plexus « secondaires ». D'après Ruhl et al, 2005.

Outre leur proximité avec les neurones (Figure 26), les CGE forment un réseau dense situé à proximité d'autres types cellulaires présents dans leur microenvironnement (Figure 27). Notamment, le réseau glial entoure les vaisseaux sanguins de la paroi digestive (Figure 27 B) (Gershon and Bursztajn, 1978; Hanani and Reichenbach, 1994). De plus, les cryptes intestinales sont également entourées par un réseau dense de CGE (Neunlist et al., 2007) (Figure 27 A). Cette proximité étroite, de l'ordre du μm rend possible une communication paracrine bidirectionnelle entre les CGE et les cellules de leur microenvironnement (figure 28). En outre, cette organisation fonctionnelle entre les CGE et les cellules de leur microenvironnement ressemble fortement à l'organisation des astrocytes dans le SNC.

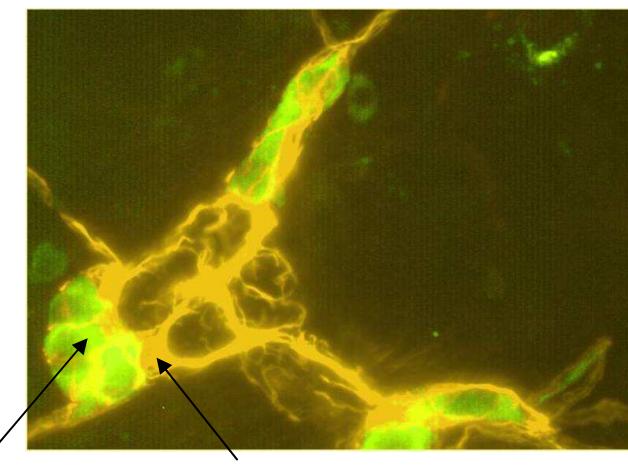


Figure 26 : Les cellules gliales entourent les neurones entériques

Photographie en microscopie à fluorescence (grossissement x400). Les corps des neurones cholinergiques sont visualisés avec un anticorps dirigé contre la ChAT (choline acétyltransférase) (en vert ; FITC) et les CGE sont visualisées avec un anticorps dirigé contre la GFAP (en orange ; Cy3). (INSERM U913).

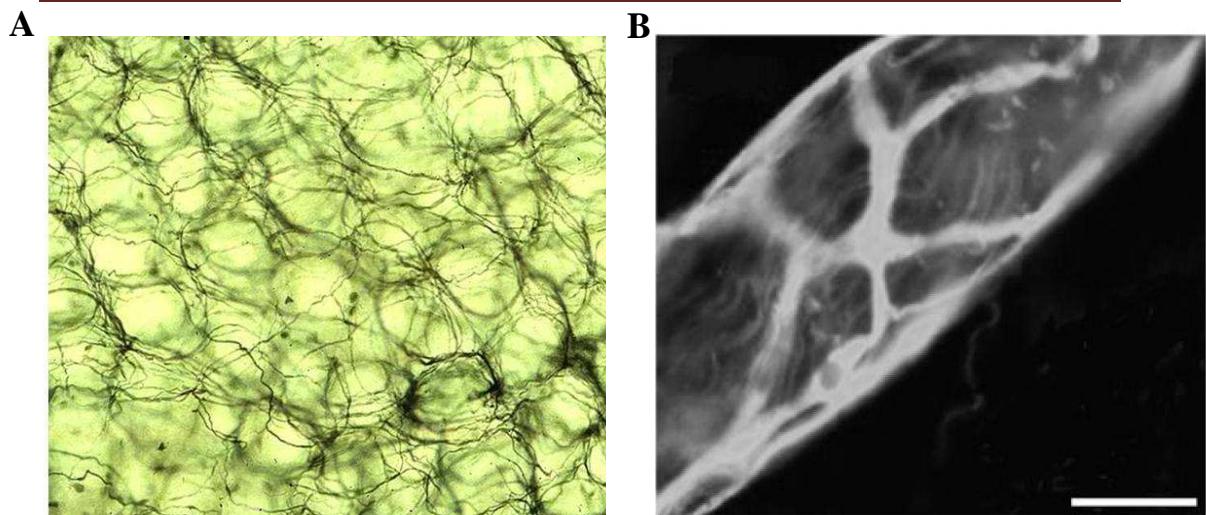


Figure 27 : Les cellules gliales entériques forment un réseau dense entourant les vaisseaux sanguins de la paroi intestinale et les cryptes

A. Photographie en microscopie à fluorescence d'une muqueuse colique humaine marquée avec un anticorps dirigé contre S-100 β . Grossissement x100. (INSERM U913) **B.** Photographie en microscopie à fluorescence à partir d'une dissection de plexus sous-muqueux de l'intestin grêle chez l'homme marqué avec un anticorps dirigé contre S-100 β . Barre échelle 40 μ m. D'après Ruhl et al, 2005.

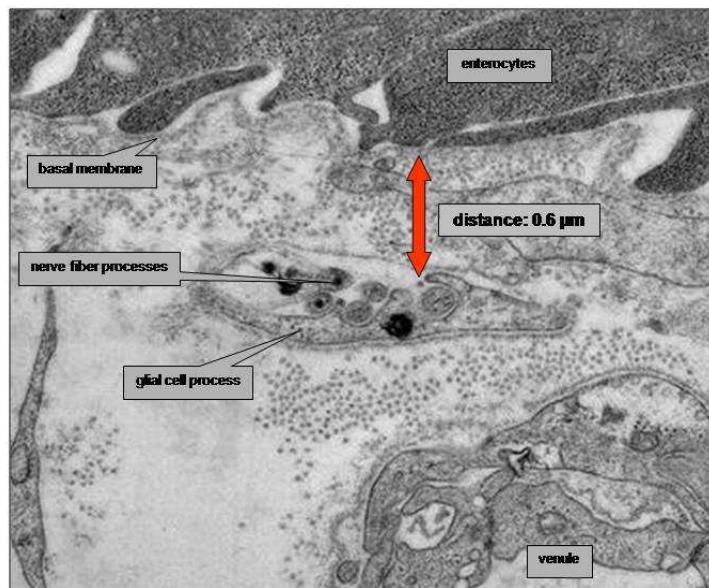


Figure 28 : Les composants cellulaires du microenvironnement des CGE

Les CGE sont à proximité directe des cellules de leur microenvironnement (de l'ordre du μ m), rendant possible une communication paracrine bidirectionnelle. Photographie en microscopie électronique. Grossissement x20 000. (INSERM U913).

2.5.2. Marqueurs des cellules gliales entériques

Les CGE expriment différents marqueurs communs avec les astrocytes. Elles expriment la vimentine et la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), deux protéines des filaments intermédiaires (Jessen and Mirsky, 1983). Alors que la vimentine est également exprimée dans les myofibroblastes sous-épithéliaux, la GFAP est spécifique des CGE (Andoh et al., 2002; Ruhl, 2005). Néanmoins, toutes les CGE n'expriment pas la GFAP dont la fonction précise reste inconnue (von Boyen et al., 2004). En revanche, toutes les CGE expriment la protéine S-100 β (calcium binding protein) qui est une protéine cytoplasmique jouant un rôle dans la régulation du cytosquelette ainsi que dans l'homéostasie calcique (Ferri et al., 1982; Heizmann, 2002). Sox-10, qui est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des CGE, est aussi considéré comme un marqueur général des CGE (Hoff et al., 2008). Enfin, les CGE expriment spécifiquement d'autres « marqueurs » tels que la glutamine synthétase, l'arginine ou l'antigène de surface Ran-2 (Rat neural antigen) (Jessen and Mirsky, 1983; Jessen and Mirsky, 1985; Nagahama et al., 2001). La glutamine synthétase et Ran-2 permettent de différencier les CGE des cellules de Schwann non myélinisantes qui expriment peu la glutamine synthétase et n'expriment pas Ran-2 mais Ran-1 (Cabarrocas et al., 2003; Kato et al., 1990).

2.5.3. Interactions neuro-gliales

Longtemps considérées comme des cellules passives ayant une simple fonction de support structural des neurones, de nombreux travaux ont montré qu'en réalité, les CGE jouent un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie du SNE et sont sensibles aux signaux nerveux. Cette évolution conceptuelle est à mettre en parallèle avec celle qui a lieu depuis une dizaine d'années dans le SNC où les astrocytes jouent un rôle primordial dans des processus aussi importants que la synaptogénèse, la transmission et la plasticité neuronale ainsi que la survie neuronale (Haydon and Carmignoto, 2006; Volterra and Meldolesi, 2005)

2.5.3.1. Rôle de soutien des ganglions entériques

L'organisation du réseau glial autour des ganglions et des fibres nerveuses suggère que les CGE jouent un rôle essentiel dans le maintien de la structure du réseau neuronal grâce à leur morphologie et leur richesse en filaments intermédiaires (Gabella, 1981). De plus, les CGE jouent vraisemblablement un rôle actif et majeur dans les réarrangements structuraux du réseau nerveux imposés par les contraintes mécaniques existant au niveau du tube digestif.

2.5.3.2. Régulation de l'environnement synaptique

En exprimant différentes molécules impliquées dans le transport ou la dégradation de neuromédiateurs, les CGE pourraient réguler la disponibilité de neuromédiateurs au sein des ganglions entériques. En effet, les CGE dans les plexus sous-muqueux et myentérique de rat expriment l'ecto-nucleotidase NTPDase2 (ecto-nucleoside triphosphate

diphosphohydrolase), qui permet de contrôler la concentration extracellulaire en ATP et en ADP (Braun et al., 2004). De manière intéressante, l'expression de canaux potassiques voltage-dépendants par les CGE pourrait leur permettre de réguler la concentration extracellulaire d'ions K⁺, dont l'accumulation peut affecter l'activité neuronale (Hanani et al., 2000). De plus, les CGE expriment GAT2 (γ -aminobutyric acid (GABA) transporter) indiquant que les CGE pourraient également réguler la concentration extracellulaire de GABA (Fletcher et al., 2002). Enfin, les CGE expriment le transporteur de dipeptides PEPT-2 qui pourrait être impliqué dans le transport et la purge du microenvironnement neuronal de produits de dégradation des neurotransmetteurs (Ruhl et al., 2005).

2.5.3.3. Source de facteurs pour les neurones

Les CGE expriment et sécrètent différents facteurs participant au maintien de l'homéostasie du SNE et à l'activité neuronale. En effet, les CGE sécrètent des facteurs tels que le GDNF, le NGF (nerve growth factor), l'IL-6 (interleukine) ou encore la neurotrophin-3 pouvant être impliqués dans le développement du SNE, la croissance, la survie et la différenciation neuronale (Bar et al., 1997; Carlson et al., 1999; Fujita et al., 2009; Hoehner et al., 1996; Ruhl et al., 2001a; von Boyen et al., 2006; Wang et al., 2007b). Par ailleurs, le rôle crucial des CGE dans la survie des neurones a été également montré directement dans une étude récente. Dans un modèle *in vitro* de cultures primaires de SNE de rat, la destruction spécifique des CGE diminue la survie des neurones entériques même en l'absence de stress oxydant (Abdo et al, 2009, en révision). D'autre part, les CGE pourraient aussi moduler la synthèse de différents neuromédiateurs. Ainsi, les CGE sont les seules cellules de l'environnement du SNE à exprimer la glutamine synthase et pourraient constituer le réservoir de glutamine utilisé par les neurones lors de la synthèse de glutamate ou de GABA.

(Jessen and Mirsky, 1983). D'autre part, la L-Arginine nécessaire à la synthèse de NO par les neurones est exclusivement présente dans les CGE (Nagahama et al., 2001).

2.5.3.4. Modulation de l'activité gliale par des stimuli mécaniques ou d'origine neuronale

Quelques études ont permis de montrer que l'activité des CGE peut être modulée par des stimulations mécaniques ou par des médiateurs neuronaux, sans que néanmoins l'impact fonctionnel de cette activation soit connu. Ainsi, chez le cobaye, une stimulation mécanique de la paroi colique entraîne une induction de c-fos dans les CGE (Sharkey et al., 1999). De plus, une étude récente montre également *in vitro* que la stimulation mécanique de cultures primaires de CGE de cobaye génère une augmentation du calcium intracellulaire qui se transmet à l'ensemble des CGE *via* les gap junctions présentes entre elles (Zhang et al., 2003). D'autre part, une stimulation des voies vagales efférentes induit l'expression de c-fos dans les CGE du plexus myentérique gastrique de rat (Miampamba et al., 2001). De plus, une étude récente a identifié la présence de récepteurs adrénnergiques α_2a dans les CGE suggérant un contrôle de l'activité des CGE par le système nerveux sympathique (Nasser et al., 2006b). Enfin, différents neuromédiateurs sont capables d'induire des flux calciques dans les CGE. Ainsi, l'ATP augmente la concentration intracellulaire de calcium dans des CGE issues de cultures primaires de plexus myentérique de cobaye *via* des voies PKC dépendantes (Sarosi et al., 1998), probablement *via* l'activation des récepteurs purinergiques P2X₇ et P2Y₂ exprimés par les CGE (Kimball and Mulholland, 1996; Vanderwinden et al., 2003). De manière intéressante, l'activation du SNE induit une activation des CGE *via* des récepteurs P2Y₄ (Sharkey and Glubransen, 2009, *in press*). Par ailleurs, la concentration calcique

intracellulaire des CGE est également augmentée par la 5-HT et la bradykinine (Kimball and Mulholland, 1996).

2.5.4. Interactions glio-épithéliales

Outre leurs relations privilégiées avec les neurones entériques, de récentes études suggèrent que les CGE entretiennent également de fortes interactions fonctionnelles avec les cellules de la BEI. Ces interactions CGE/BEI semblent être similaires aux interactions que les astrocytes entretiennent avec les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, plusieurs études ont montré *in vitro* et *in vivo* que les astrocytes induisent les fonctions de la BHE (Beck et al., 1984; Janzer and Raff, 1987). *In vivo*, la destruction spécifique des astrocytes entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire associée à une modification de l'expression et de la localisation cellulaire des protéines occludine, claudine-5 et ZO-1 (Willis et al., 2004a; Willis et al., 2004b). De plus, *in vitro*, les astrocytes induisent une augmentation de la RET (résistance électrique transépithéliale), une diminution de la perméabilité paracellulaire ainsi qu'une augmentation de l'expression d'occludine et de sa localisation au niveau des jonctions serrées dans les cellules endothéliales (Garcia et al., 2004; Rubin et al., 1991; Wolburg et al., 1994). De plus, les astrocytes inhibent la prolifération des cellules endothéliales et induisent également une augmentation de la différenciation des cellules endothéliales qui se traduit par une augmentation de l'activité γ -GT (gamma-glutamyl transferase) dans ces cellules (Garcia et al., 2004).

Le rôle des CGE dans le contrôle des fonctions de la BEI reste encore peu connu. Cependant, des preuves du rôle majeur des CGE dans le maintien de l'homéostasie de la BEI sont apparues il y a près de 10 ans. En effet, dans un modèle murin transgénique, des lésions

spécifiques des CGE entraînent des altérations majeures de l'intégrité de la BEI (Bush et al., 1998). Ces travaux ont été récemment confirmés par des études *in vitro* qui montrent que les CGE contrôlent de manière directe la perméabilité paracellulaire de la BEI. En effet, la co-culture de Caco-2 en présence de CGE induit une diminution de la perméabilité paracellulaire de la monocouche de CEI et une augmentation de la RET associée à une augmentation de l'expression de la protéine ZO-1 dans les cellules Caco-2. Ces effets des CGE sur la perméabilité de la BEI sont médiés par la libération de GSNO (S-nitrosoglutathion) par les CGE (Savidge et al., 2007). D'autre part, le contrôle de la prolifération des CEI par les CGE a été directement montré dans ce travail de thèse dans un modèle de co-culture où l'on observe que les CGE inhibent la prolifération des CEI *via* la libération de TGF- β 1 (Neunlist et al., 2007).

Enfin, même si leur implication dans le contrôle glial de la BEI n'a pas été formellement démontrée, certains médiateurs identifiés dans les CGE, mais aussi présents dans d'autres types cellulaires, peuvent contrôler l'homéostasie de la BEI. Ainsi, le GDNF possède des propriétés anti-apoptotiques dans les lignées épithéliales coliques HT-29 et SW480 lors de l'induction de l'apoptose par le TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) (Steinkamp et al., 2003). De plus, S-100 β diminue la perméabilité paracellulaire intestinale de biopsies coliques humaines montées en chambre de Ussing (Neunlist et al., 2008). L'IL-6, qui est également sécrété par les CGE (Ruhl et al., 2001a), diminue la perméabilité paracellulaire de la BEI (Wang et al., 2007a). Enfin, l'arginine et la glutamine régulent de manière positive la prolifération, la migration et la survie des CEI et ont également des effets bénéfiques sur la réparation de la BEI (Marc Rhoads and Wu, 2009).

2.5.5. Lésions des cellules gliales entériques au cours des pathologies digestives et conséquences fonctionnelles

2.5.5.1. Atteinte des cellules gliales au cours des pathologies digestives

Un nombre croissant d'études réalisées au cours de ces dernières années a permis de mettre en évidence l'existence de lésions des CGE au cours de nombreuses pathologies digestives, aussi bien motrices qu'inflammatoires (Tableau 3). Ces travaux sont dans leur grande majorité des études descriptives caractérisant l'expression de marqueurs gliaux. En revanche, l'implication fonctionnelle de ces lésions dans l'étiologie ou la physiopathologie des différentes maladies reste largement inconnue.

Au cours de certaines pathologies de la motricité intestinale, on observe une altération du réseau glial souvent caractérisée par une diminution de ses marqueurs spécifiques GFAP ou S-100 β (Bassotti et al., 2007a; Neunlist et al., 2008). Ainsi, au cours de diverticulose colique ou de constipation sévère, une diminution de l'expression de S-100 β a été rapportée (Bassotti et al., 2005; Bassotti et al., 2006). De façon intéressante, dans le cas de la constipation intractable, dans le plexus myentérique, l'atteinte gliale est spécifique car ni la population neuronale ni la population des CIC ne sont affectées (Bassotti et al., 2007b). D'autre part, deux études récentes ont aussi mis en évidence une perte de CGE au cours de pathologies motrices coliques d'origine infectieuse. En effet, une perte importante des CGE a été rapportée chez des patients atteints de mégacolon au cours de la maladie de Chagas, due à l'infection par le parasite *Trypanosoma cruzi* (da Silveira et al., 2009). Par ailleurs, une étude récente a également mis en évidence l'existence d'une perte gliale importante dans le syndrome de pseudo-obstruction intestinale chronique (POIC) et, de façon intéressante, la présence de JC virus (un membre de la famille des polymavirus) a été retrouvée

spécifiquement dans 70% des patients atteints du syndrome de POIC mais dans aucun contrôle (Selgrad et al., 2009).

Au cours des pathologies inflammatoires, les altérations des CGE sont importantes mais varient en fonctions des pathologies. Ainsi, au cours de pathologies inflammatoires comme la maladie de Crohn ou dans le cas de l'entérocolite nécrosante (NEC), on observe en général une perte de marqueurs de CGE (Cornet et al., 2001; Wedel et al., 1998). Dans la maladie de Crohn, cette perte de marqueurs gliaux (GFAP ou S-100 β) est observée dans les zones non inflammatoires (Cornet et al., 2001; Villanacci et al., 2008). En revanche, dans la rectocolite hémorragique (RCH), on observe une augmentation de l'expression de la GFAP et de S-100 β et en particulier dans les zones inflammatoires (Cornet et al., 2001; Villanacci et al., 2008). De manière intéressante, une étude a récemment montré une augmentation significative de l'expression et de la sécrétion de S-100 β au cours de la phase active de la maladie cœliaque (Esposito et al., 2007). Par ailleurs, *in vitro*, les médiateurs inflammatoires semblent réguler l'expression des marqueurs gliaux. En effet, l'ajout de TNF- α , IL-1 β ou de LPS (lypopolysaccharide) induit l'expression de GFAP *in vitro* dans des cultures primaires de CGE de rat (von Boyen et al., 2004). Enfin, au cours de la maladie de Crohn, les CGE expriment des antigènes du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II et des contacts directs existent entre les lymphocytes et le réseau glial positif pour l'expression du CMH II (Geboes et al., 1992), suggérant que les CGE pourraient être cellules présentatrices d'antigènes. Dans ce contexte, la capacité des CGE à être infectées préférentiellement par *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, un agent infectieux incriminé dans la maladie de Crohn (Chamberlin et al., 2001), renforce leur rôle hypothétique dans l'étiologie de la maladie de Crohn (Sechi et al., 2007).

Pathologie	Altération des cellules gliales entériques
Cancers colorectaux	Diminution de l'expression de S-100 β dans les zones tumorales et en marge de la tumeur
Maladie de Crohn	Diminution de l'expression de la GFAP et de S-100 β dans les zones non-inflammatoires
Rectocolite hémorragique	Augmentation de l'expression de GFAP et de S-100 β dans les zones inflammatoires
Entérocolite nécrosante	Diminution de l'expression de la GFAP
Maladie coeliaque	Augmentation de l'expression de S-100 β
Atrésie	Diminution de l'expression de la GFAP
Constipation sévère	Diminution de l'expression de S-100 β

Tableau 3 : Caractérisation du réseau glial lors de pathologies intestinales

(GFAP): Glial Fibrillary Acidic Protein. D'après Savidge *et al*, 2007 ; Neunlist *et al*, 2008 ; Esposito *et al*, 2007 ; Villanacci *et al*, 2008.

2.5.5.2. Conséquences fonctionnelles de lésions du réseau glial

L'impact fonctionnel de lésions du réseau de CGE et, en particulier, d'une perte de CGE, reste inconnu à ce jour. Néanmoins, le développement et l'analyse fonctionnelle de modèles murins d'altération des CGE ont permis de mieux appréhender l'impact de telles lésions.

2.5.5.2.1. Modèles d'étude *in vivo*

Divers modèles de lésions des CGE ont été développés et sont génétiques ou toxiques. Le premier modèle développé par l'équipe de Sofroniew consiste à faire exprimer la thymidine kinase du virus de l'Herpes Simplex (HSV-TK) sous contrôle du promoteur de la GFAP. L'injection de ganciclovir entraîne la mort des cellules GFAP positives chez l'animal due à la transformation du ganciclovir par la thymidine kinase en analogues de bases puriques toxiques. Vers le 11^e jour de traitement au ganciclovir, ces souris développent une jéjuno-iléite qui est fatale vers le 19^e jour. Au niveau du jéjunum et de l'iléon, les souris transgéniques présentent une destruction sévère du réseau de CGE et une altération morphologique des CGE restantes, détectables dès le 7^e jour de traitement au ganciclovir (Savidge et al., 2007). En revanche, aucune atteinte des astrocytes du SNC n'est observable chez les souris traitées (Bush et al., 1998).

Un autre modèle a récemment été mis au point par l'équipe de Liblau et permet de réaliser une ablation modérée de CGE dans des animaux transgéniques (Aube et al., 2006). Ce modèle a été initialement développé à partir d'un autre modèle murin de destruction des CGE, double transgénique (Cornet et al., 2001). Dans ce modèle double transgénique, des

souris exprimant l'hémagglutinine (HA) sous le contrôle du promoteur de la GFAP sont croisées avec des souris exprimant à la surface des lymphocytes un récepteur spécifique de l'HA. Chez ces souris doubles transgéniques, la destruction totale des CGE par réaction autoimmune médiée par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques entraîne une mort des souris vers le 4^e jour associée à entérocolite fulminante (Cornet et al., 2001). Le modèle adapté de ce double transgénique consiste en l'injection d'une quantité définie de lymphocytes T CD8⁺ dirigés contre l'HA dans des souris transgéniques exprimant l'HA sous le contrôle du promoteur de la GFAP. Le contrôle de la quantité injectée de lymphocytes T CD8⁺ dirigés contre l'HA entraîne alors la possibilité de détruire de façon modérée le réseau glial sans aucun signe d'inflammation (Aube et al., 2006).

Enfin, plus récemment, le groupe de Sharkey a développé un modèle toxique basé sur l'utilisation du fluorocitrate, un gliotoxique (Nasser et al., 2006a). Le fluorocitrate n'induit pas de perte de CGE mais conduit à une inhibition du métabolisme des CGE, en inhibant l'aconitase, une enzyme majeure du cycle de Krebs et a été décrit comme pénétrant préférentiellement dans les astrocytes du SNC (Hassel et al., 1992). Dans ce modèle, l'injection en intrapéritonéal de fluorocitrate pendant 7 jours n'entraîne pas de modification du nombre ni de la morphologie des CGE. L'effet spécifique du fluorocitrate sur le métabolisme des CGE a été caractérisé par une diminution de l'uptake de dipeptides dans les CGE et une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 dans les CGE spécifiquement (Nasser et al., 2006a).

2.5.5.2.2. Conséquences fonctionnelles des altérations du réseau glial

En analysant ces modèles, des atteintes de trois caractéristiques fonctionnelles majeures du tube digestif ont été décrites : des atteintes du SNE, de la motricité digestive et des fonctions de la BEI

D'une part, une ablation modérée des CGE conduit à une modification du phénotype du SNE caractérisée par une diminution de la proportion de neurones nitrergiques dans le plexus myentérique et une perte de neurones VIPergiques dans le plexus sous-muqueux par rapport aux contrôles (Aube et al., 2006). Par ailleurs, une ablation totale des CGE induit une importante neurodégénérescence dans le SNE (Bush et al., 1998). En revanche, le modèle utilisant le fluorocitrate comme gliotoxique n'a pas mis en évidence de modifications du phénotype des neurones entériques. Cependant, contrairement aux autres modèles, aucune perte de CGE n'est observée (Nasser et al., 2006a).

D'autre part, des atteintes de la motricité intestinale sont observées après lésions des CGE et en l'absence d'inflammation intestinale. Ainsi, des lésions des CGE conduisent à un ralentissement du transit intestinal (Aube et al., 2006; Nasser et al., 2006a) et aussi de la vidange gastrique (Aube et al., 2006) sans modifier le transit colique (Nasser et al., 2006a). Ces effets sur la motricité intestinale induits par des lésions du réseau glial ont été montrés comme étant dus en partie à une diminution de la réponse nitrergique (Aube et al., 2006) alors que dans le modèle au fluorocitrate, l'origine des effets sur la motricité (effets directs ou indirects) reste à identifier (Nasser et al., 2006a).

Enfin, ces modèles ont également permis de montrer que des atteintes des CGE conduisent à d'importantes lésions de la BEI. Ainsi, une ablation sévère des CGE conduit à une augmentation initiale de la perméabilité paracellulaire suivie du développement d'une

inflammation intestinale (Savidge et al., 2007). De façon intéressante, des lésions des CGE induisent de façon précoce une augmentation de la perméabilité vasculaire dans la muqueuse (Aube et al., 2006; Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001). Ces résultats ont aussi été renforcés par l'étude de Aubé et al, montrant qu'une destruction modérée des CGE, en absence d'inflammation, conduisait également à une augmentation *in vivo* de la perméabilité et à une vasodilatation modérée dans la muqueuse (Aube et al., 2006).

Ainsi, des lésions *in vivo* des CGE altèrent de manière simultanée un nombre important de fonctions digestives et semblent conforter le rôle central des CGE dans le contrôle de l'homéostasie digestive.

OBJECTIFS DE L'ETUDE ET RESULTATS

Au regard des données de la littérature mettant en évidence le rôle clef du microenvironnement cellulaire de la barrière épithéliale intestinale (BEI) dans le contrôle de ses fonctions, le but principal de cette thèse était d'établir les bases scientifiques d'un tel contrôle par les cellules gliales entériques (CGE), constituant majeur du système nerveux entérique (SNE).

Il s'agissait donc de :

- 1/ Caractériser le contrôle des fonctions des cellules épithéliales intestinales (CEI) par les CGE
- 2/ Décrire les mécanismes et les voies de signalisation cellulaires mis en jeu
- 3/ Identifier les médiateurs gliaux responsables de ces effets

Ce travail de thèse est présenté sous la forme de trois articles (un publié, un soumis et un en préparation) ainsi que d'une revue (publiée et en annexe de la thèse). Ce travail a chronologiquement été initié par l'étude du contrôle de la prolifération des CEI par les CGE (présentée dans l'article 1) déjà amorcée par notre groupe lors du début de cette thèse. Dans ce contexte, ce travail de thèse a plus particulièrement contribué à caractériser l'implication du TGF- β 1 dans les effets anti-prolifératifs des CGE sur les CEI ainsi qu'à décrire les atteintes du réseau de CGE au cours de cancers colorectaux. L'étude présentée dans la revue (en annexe de la thèse), complémentaire au premier article, visait à compléter les données du premier article en identifiant un second médiateur glial impliqué dans le contrôle de la

OBJECTIFS DE L'ETUDE

prolifération des CEI par les CGE, en décrivant le mécanisme cellulaire impliqué ainsi qu'en caractérisant le réseau de CGE dans les cancers colorectaux par étude transcriptomique. Le deuxième article présente les résultats d'une étude par puce à ADN visant à caractériser l'impact des CGE sur le transcriptome des CEI. Ce travail avait pour but d'identifier les principales fonctions des CEI modulées par les CGE ainsi que les voies de signalisation impliquées. Les études fonctionnelles présentées dans cet article cherchaient à vérifier la validité de notre analyse des données d'expression. Enfin, dans le troisième article, nous avons voulu caractériser les effets des CGE sur les processus de réparation de la BEI. En particulier, nous avons cherché à décrire les mécanismes cellulaires et les voies de signalisation mises en jeu ainsi qu'à identifier le(s) médiateur(s) glial(ux) responsable(s) des effets observés.

Les trois études sont présentées successivement et sont précédées par un résumé en français. L'ensemble de ce travail sera discuté de façon globale dans le chapitre suivant.

ARTICLE 1 :**LES CELLULES GLIALES ENTERIQUES INHIBENT LA PROLIFERATION DES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES EN PARTIE VIA LA SECRETION DE TGF- β 1**

La barrière épithéliale intestinale (BEI) est composée d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEI) polarisées en perpétuel renouvellement et maintenues les unes aux autres par des jonctions serrées. Des études récentes ont montré que le microenvironnement cellulaire de la BEI dont, en particulier, le système nerveux entérique (SNE) pourrait réguler les fonctions de la BEI telles que la prolifération des CEI et la perméabilité de la BEI (Neunlist et al., 2003; Toumi et al., 2003). Les cellules gliales entériques (CGE) sont une composante cellulaire majeure du SNE mais leur rôle dans le contrôle des fonctions de la BEI reste inconnu. Aussi, le but de cette étude était de caractériser l'effet des CGE sur la prolifération des CEI *in vitro* et *in vivo*.

Dans un premier temps, nous avons voulu caractériser l'impact de la destruction sélective des CGE sur la prolifération des CEI *in vivo*. A l'aide d'un modèle murin transgénique exprimant le gène de la thymidine kinase du virus Herpes Simplex (HSV-TK) sous le contrôle du promoteur GFAP, nous avons mesuré l'incorporation de [3 H] -thymidine au sein des CEI suite à l'injection de ganciclovir entraînant l'ablation spécifique des CGE. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet direct des CGE sur les CEI en utilisant un modèle *in vitro* où les CEI (lignée humaine Caco-2) étaient cultivées en phase proliférative sur filtres Transwell en présence de CGE (lignée de rat CRL2690) cultivées au fond des puits. Ce modèle autorisait uniquement une communication paracrine entre les deux types

cellulaires. La prolifération des CEI a été évaluée par incorporation de [³H] -thymidine dans les Caco-2 et par comptage sur lame de Malassez. La viabilité des CEI a également été évaluée en cytométrie en flux par marquage annexin-V/IP (Iodure de Propidium). Dans ce même modèle, nous avons également évalué l'impact des CGE sur la RET (résistance électrique transépithéliale) et sur l'aire de la surface cellulaire des CEI. Par ailleurs, l'effet des CGE sur la prolifération des CEI a été également évalué à l'aide de différentes lignées de CEI dont des lignées non transformées (lignées humaines HT29, HT29 Cl.16E, T84 et lignée non transformée de rat IEC-6). D'autre part, la spécificité des effets des CGE a été attestée en étudiant l'effet de fibroblastes (lignée humaine CCD18-Co) sur la prolifération des CEI. Enfin, afin de compléter l'étude de l'implication éventuelle des CGE dans le contrôle de la prolifération et de l'étendre à la pathologie humaine, nous avons caractérisé le réseau glial dans des segments coliques sains ou issus d'adénocarcinomes humains par marquage immunohistochimique avec le marqueur spécifique des CGE S-100 β .

In vivo, l'ablation sélective des CGE entraînait une augmentation de l'incorporation de [³H] -thymidine associée à une hyperplasie des cryptes. *In vitro*, les filtres de CEI étaient plus rapidement recouverts lorsque les CEI étaient cultivées en présence de CGE par rapport au contrôle, i.e. CEI cultivées seules. Cet effet des CGE sur la vitesse de recouvrement du filtre par les CEI était associé une augmentation de la RET, reproduite par le surnageant de culture des CGE. De plus, les CGE induisaient une augmentation significative de l'aire cellulaire des CEI qui n'était pas associée à une hypertrophie cellulaire. De manière surprenante, le nombre de CEI par filtre et l'incorporation de [³H] -thymidine dans les CEI étaient significativement diminués lorsque les CEI étaient cultivées avec les CGE par rapport aux CEI cultivées seules. L'inhibition de prolifération des CEI induite par les CGE était reproduite dans 4 lignées de CEI humaines et dans une lignée de CEI non-transformée de rat.

A l'inverse, lorsque les CEI étaient cultivées avec une lignée de fibroblastes humains intestinaux, on observait une augmentation du nombre de cellules par filtre ainsi qu'une augmentation de l'incorporation de [³H] -thymidine dans les CEI. Enfin, les études de cytométrie en flux ont montré que les CGE ne modifiaient pas la viabilité des CEI. Des résultats complémentaires à cette étude (présentés dans la revue en annexe) ont permis de montrer que l'inhibition de la prolifération des CEI induite par les CGE était due en partie à un blocage des CEI en phase G0/G1 du cycle cellulaire.

Nous avons ensuite montré que le TGF- β 1 était exprimé et sécrété par les CGE et que l'ajout de TGF- β 1 diminuait le nombre de CEI par filtre. Enfin, un anticorps bloquant anti-TGF- β 1 inhibait partiellement les effets des CGE sur le nombre de CEI par filtre. Des résultats complémentaires de cette étude (présentés dans la revue en annexe) ont également permis de montrer que la protéine S-100 β , protéine sécrétée par les CGE, diminuait également le nombre de CEI par filtre.

Enfin, l'étude immunohistochimique du marqueur glial S-100 β sur des segments sains et tumoraux montre une altération du réseau glial lors de cancers colorectaux. Dans la revue présentée en annexe, l'étude par PCR quantitative de l'expression de S-100 β montre une diminution significative de l'expression de S-100 β dans les zones coliques tumorales ainsi que dans les zones situées en berge de la tumeur, i.e. macroscopiquement saines et à proximité directe de la zone tumorale.

En conclusion, nos travaux ont mis en évidence que les CGE possèdent un effet inhibiteur majeur sur la prolifération des CEI associé à l'induction d'un blocage des CEI en phase G0/G1 du cycle cellulaire et à une augmentation de l'aire de la surface cellulaire favorisant une inhibition de contact. Par ailleurs, nous avons également identifié le TGF- β 1 et

RESULTATS

S-100 β comme étant partiellement responsables des propriétés anti-prolifératives des CGE. Enfin, nos travaux suggèrent que des altérations du réseau glial pourraient favoriser les processus de carcinogénèse.

Ce travail a été publié en 2007 dans *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology* et en 2008 dans *Journal of Internal Medicine* (voir Annexe - Revue).

M. Neunlist, P. Aubert, S. Bonnaud, L. Van Landeghem, E. Coron, T. Wedel, P.

Naveilhan, A. Ruhl, B. Lardeux, T. Savidge, F. Paris and J. P. Galmiche

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292:231-241, 2007. First published Jan 19, 2006;

doi:10.1152/ajpgi.00276.2005

You might find this additional information useful...

This article cites 26 articles, 11 of which you can access free at:

<http://ajpgi.physiology.org/cgi/content/full/292/1/G231#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajpgi.physiology.org/cgi/content/full/292/1/G231>

Additional material and information about *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpgi>

This information is current as of June 6, 2008 .

Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF- β_1 -dependent pathway

M. Neunlist,^{1*} P. Aubert,^{1*} S. Bonnaud,² L. Van Landeghem,¹ E. Coron,¹ T. Wedel,³
P. Naveilhan,⁴ A. Ruhl,⁵ B. Lardeux,¹ T. Savidge,⁶ F. Paris,² and J. P. Galmiche¹

¹INSERM U539, IMAD, University of Nantes, 44035 Nantes, France; ²INSERM U601, 44093 Nantes, France;

³Department of Anatomy, University of Luebeck, Luebeck, Germany; ⁴INSERM U643, 44093 Nantes, France;

⁵Technical University Munich, Department of Human Biology, Freising, Germany;

⁶Department of Gastroenterology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas

Submitted 16 June 2005; accepted in final form 14 January 2006

Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Landeghem LV, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Ruhl A, Lardeux B, Savidge T, Paris F, Galmiche JP. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF- β_1 -dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G231–G241, 2007. First published January 19, 2006; doi:10.1152/ajpgi.00276.2005.—Although recent studies have shown that enteric neurons control intestinal barrier function, the role of enteric glial cells (EGCs) in this control remains unknown. Therefore, our goal was to characterize the role of EGCs in the control of intestinal epithelial cell proliferation using an *in vivo* transgenic and an *in vitro* coculture model. Assessment of intestinal epithelial cell proliferation after ablation of EGCs in transgenic mice demonstrated a significant increase in crypt cell hyperplasia. Furthermore, mucosal glial network (assessed by immunohistochemical detection of S-100 β) is altered in colon adenocarcinoma compared with control tissue. In an *in vitro* coculture model of subconfluent Caco-2 cells seeded onto Transwell filters with EGCs, Caco-2 cell density and [3 H]thymidine incorporation were significantly lower than in control (Caco-2 cultured alone). Flow cytometry analysis showed that EGCs had no effect on Caco-2 cell viability. EGCs induced a significant increase in Caco-2 cell surface area without any sign of cellular hypertrophy. These effects by EGCs were also seen in various transformed or nontransformed intestinal epithelial cell lines. Furthermore, TGF- β_1 mRNA was expressed, and TGF- β_1 was secreted by EGCs. Exogenously added TGF- β_1 reproduced partly the EGC-mediated effects on cell density and surface area. In addition, EGC effects on Caco-2 cell density were significantly reduced by a neutralizing TGF- β antibody. In conclusion, EGCs have profound anti-proliferative effects on intestinal epithelial cells. Functional alterations in EGCs may therefore modify intestinal barrier functions and be involved in pathologies such as cancer or inflammatory bowel diseases.

colon cancer; enteric nervous system

ENTERIC GLIAL CELLS (EGCs) are the most abundant cell type in the enteric nervous system (ENS). EGCs outnumber enteric neurons by a factor of four and share common markers and properties with astrocytes of the central nervous system (CNS) (7, 22). The majority of studies have mainly characterized EGC morphological and electrophysiological properties (7, 13, 22). In particular, EGCs express proteins such as glial fibrillary acidic protein, the calcium-binding protein S-100 β , and vimentin. EGCs ensheath enteric ganglia and are considered supportive and nutritive components of enteric neurons. EGCs

respond by changes in intracellular calcium levels or expression of activation markers such as c-Fos to various mediators released by enteric neurons or by immune cells (22). However, the direct role of EGCs in the control of gastrointestinal function is presently largely unknown.

A major function of the gastrointestinal tract is to control the passage of nutrients and fluids while preventing passage of microorganisms and toxic or noxious agents. This function is regulated by the intestinal epithelial barrier, which is located at the interface of the body and the luminal environment. This barrier is formed by an epithelial cell monolayer that lines the lumen. The epithelium undergoes rapid and constant turnover. Interactions between intestinal epithelial cells and the subepithelial cellular components of the mucosa play a key role in the control of intestinal barrier function under physiological and pathological conditions. It is well known that pericycral myofibroblasts, which form a sheet underlying the intestinal epithelium, can modulate intestinal epithelial cell proliferation and differentiation, increase barrier resistance, and modulate secretory responses of the epithelium to various agonists such as acetylcholine or prostaglandins (4, 12).

Recent studies have shown that the ENS, a major constituent of the mucosa, can also modulate intestinal barrier functions. The ENS is an integrative neuronal network localized along the gut. It is composed of two major ganglionated plexuses: the submucosal plexus and the myenteric plexus located within the intermuscular space. The mucosal layer also contains delicate nerve networks known as the mucosal plexus, which extends within the lamina muscularis mucosae and lamina propria mucosae beneath the epithelial lining.

Studies have shown that enteric neurons can regulate intestinal barrier functions. In particular, activation of human submucosal neurons decrease paracellular permeability (20) and intestinal epithelial cell proliferation (27). However, the role of EGCs in the control of intestinal barrier function is presently unknown.

Recent *in vivo* studies have also suggested that EGCs could indeed be involved in the maintenance of the intestinal barrier. Indeed, ablation of EGCs in mice using chemical or immune-mediated methods leads to intestinal inflammation, associated with an initial alteration of mucosal (6) and vascular integrity (8). However, whether the alterations of the intestinal barrier was a consequence of intestinal inflammation, an effect of

* M. Neunlist and P. Aubert contributed equally to this study.

Address for reprint requests and other correspondence: M. Neunlist, INSERM U 539, Hôpital Hôtel Dieu, 1, place Alexis Ricordeau, 44035 Nantes, France (e-mail: michel.neunlist@univ-nantes.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

EGC ablation on enteric neurons, or a direct consequence of EGC ablation on intestinal barrier integrity is presently unknown.

Therefore, we used a noncontact coculture system to explore the role of EGCs in the control of a major function of intestinal barrier, i.e., intestinal epithelial cell proliferation. We show that EGCs inhibit intestinal cell proliferation and concomitantly increase the cell surface of intestinal epithelial cell. Furthermore, we identified TGF- β_1 as a mediator secreted by EGC to be involved in the inhibition of cell proliferation.

MATERIALS AND METHODS

Immunohistochemical and Electron Microscopic Detection of Enteric Glia in Human Mucosa

Fragments of human adenocarcinoma and "healthy" control tissue taken at 10 cm from the tumor were obtained from patients undergoing surgery for colon carcinoma ($n = 5$ patients). According to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Human Tissues, these were considered as "residual tissues" and were not relevant to pathological diagnosis.

The tunica muscularis with adhering serosal fat was removed, with the submucosal and mucosal layers remaining in place. After fixation in PBS-buffered 4% paraformaldehyde (pH 7.4) at 4°C overnight and dehydration in graded alcohols, paraffin-embedded specimens were cut (4 μm) perpendicular to the gut axis. Sections were preincubated with 10% normal goat serum (Dakopatts, X-970) diluted in PBS-0.5% Triton X-100 (Sigma) for 30 min followed by incubation with polyclonal rabbit anti-S-100 β (1:400, Dako) diluted in PBS-10% goat serum-0.5% Triton X-100 for 24 h at room temperature. After sections were rinsed in PBS, sections were incubated for 2 h in a buffer solution containing an anti-rabbit antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate (1:200, Jackson ImmunoResearch). The slides were rinsed in PBS, mounted, and viewed with an Axiophot (Zeiss) equipped with an adequate filter system.

For whole-mount immunohistochemistry, specimens were stretched and pinned flat on wax-based Petri dishes before fixation to achieve optimal spacing of the remaining intestinal layers. After treatment with PBS-0.05% thimerosal (Sigma) overnight and 0.1% NaCNBH₃ for 30 min, whole mounts of both the mucosal and submucosal layers were prepared by use of watchmaker's forceps under stereomicroscopic control. Whole mounts were treated with 10% normal goat serum diluted in PBS-0.5% Triton X-100 for 1 h followed by incubation with polyclonal rabbit anti-S-100 β (1:400) diluted in PBS-10% goat serum-0.5% Triton X-100 for 48 h at room temperature. After extensive rinsings in PBS, whole mounts were incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:200; Jackson ImmunoResearch) for 2 h, rinsed in PBS, and incubated with the avidin-biotin complex (Vectastain ABC Elite kit; Vector, Burlingame, CA) conjugated with horseradish peroxidase according to the instructions of the supplier. Peroxidase activity was detected with the chromogen 4-chloro-1-naphthol, resulting in a dark-blue reaction product. Whole mounts were rinsed in PBS, placed on slides, covered with Aquatex (Merck), and examined with an Axiophot microscope.

For transmission electron microscopy, small samples (~ 5 mm border length) of the mucosal-submucosal tissue layer were immediately fixed by immersion in 0.1 M cacodylate buffer containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde at pH 7.4 for 24 h. The specimens were postfixed in 1% OsO₄ and stained en bloc with 2% uranylacetate. After dehydration in graded alcohols, the specimens were embedded in Araldite. Semi-thin sections were stained with methylene blue and azure II to visualize the regions of interest, in particular the enterocyte lining and the lamina propria mucosae. Ultrathin sections were cut and stained with lead citrate and examined with a transmission electron microscope (Phillips, EM 109). The

findings were recorded both by conventional films (Agfa) and a digital image system (analySIS; Soft Imaging System, Münster, Germany).

Enteric Glial Cells

Nontransformed or transformed EGCs were generated as previously described (23). EGC cultures were isolated and purified from enzymatically dissociated preparations of rat longitudinal muscle-myenteric plexus. EGCs were cultured in DMEM (4.5 g/l glucose; GIBCO, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (GIBCO), 50 IU/ml penicillin, and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (GIBCO). EGCs were seeded at a concentration of 50,000 cells/cm² in 12-wells plates (Corning, Avon, France). Cells were grown to confluence (3 days).

To assess the paracrine effect of EGCs on proliferation of intestinal epithelial cells, EGCs were cultured for 48 h after they reached confluence. Cell culture supernatants were collected and centrifuged at 1,000 g for 10 min to remove accidentally transferred cells and stored at -20°C until use as a conditioned medium.

Intestinal Epithelial and Fibroblast Cell Lines

Experiments were performed with four different human intestinal epithelial cell lines with distinct phenotypes. Cells were seeded onto porous filters (12-well Transwell Clear, 0.40- μm porosity; Corning). The Caco-2 cell line (EATCC, Port Down, UK) was cultured in DMEM (4.5 g/l glucose) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM glutamine (GIBCO), 50 IU/ml penicillin, and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. The T84 cell line (EATCC) was cultured in DMEM-F12 (1:1; GIBCO) supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 50 IU/ml penicillin and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. The HT-29 and the mucus-secreting HT-29-Cl.16E cell lines were cultured in DMEM (4.5 g/l glucose) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 50 IU/ml penicillin, and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. The nontransformed rat small intestinal epithelial cell line IEC-6 (EATCC) was maintained in DMEM (4.5 g/l glucose) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin. CCD 18Co cells (normal human colon fibroblasts; ATCC) were cultured in MEM (GIBCO) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM nonessential amino acid (GIBCO), 50 IU/ml penicillin, and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and seeded at a density of 50,000 cells/cm². All epithelial cell lines were seeded at a density of 65,000 cells/cm², except T84 cells, which were seeded at a density of 180,000 cells/cm².

Coculture Model

One day after epithelial cells were seeded onto Transwell filters, filters were cultured in the presence of EGCs seeded in the bottom of the 12-well plates. Components of the coculture model were cultured with the culture medium for epithelial cells. Half of the culture medium was changed daily.

The resistance of the epithelial monolayer was measured with an EVOM resistance meter (World Precision Instruments) and calculated by subtracting the electrical resistance of a blank insert from the measured value.

Animal Model

Transgenic mice expressing the thymidine kinase gene of the herpes simplex virus (HSV-TK) from the mouse glial fibrillary acidic protein promoter were used in this study (6). The *in vivo* ganciclovir (GCV) procedure was approved by an independent IACUC committee. Subcutaneous injection of GCV was performed for 7 days in transgenic and nontransgenic mice as previously described (6). Exposure to GCV in transgenic but not in nontransgenic mice caused a significant disruption of the enteric glial network (6). After 14 days of initiating GCV treatment, mice were injected intraperitoneally with 37 kBq of [methyl^3H]thymidine (Amersham) per gram body weight 90

min before the ileum was collected (at ~11:00 AM so as to avoid circadian variation). Tissues were fixed in 10% phosphate-buffered formal saline (pH 7.2) for 24 h and embedded in paraffin using conventional methods. Paraffin sections (5 μ m thick) were rehydrated through graded levels of alcohol and were processed for autoradiography by Ilford K2 photographic emulsion (Amersham). Slides were developed after a 3 wk-exposure in the dark at 4°C. Finally, all slides were counterstained with hematoxylin (Sigma) and mounted in Ral-mount (Merck). Scoring of intestinal proliferation (>3 silver grains recorded over a blue nucleus) was performed with CRYPTS software as described previously (25) on a minimum of 20 crypt columns per sample using a Nikon $\times 100$ oil-immersion objective.

Cell Growth Studies

Cell counting. Epithelial cells were cocultured for various periods of time, harvested with 1% trypsin-EDTA (GIBCO), and homogenized in their respective epithelial cell culture medium. The resulting cell suspensions were counted in a blind fashion with the use of Malassez slides (VWR International, Strasbourg, France).

[3 H]thymidine incorporation. After various times in coculture in the presence or absence of EGC, Caco-2 monolayers were incubated alone with DMEM containing [3 H]thymidine (0.5 μ Ci/well) for 12 h. Cells were then removed from the filter with trypsin and harvested by a Titertek cell harvester (Flow Laboratories, Rickmansworth, UK) on a glass fiber filter (Wallac-Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). The resulting filters were dried and incubated with Betaplate scintillation liquid (Wallac-Perkin Elmer), and beta radioactivity was counted by use of a scintillation spectrometer (Wallac-Perkin Elmer). [3 H]thymidine incorporation for each culture duration in the presence or absence of EGC was analyzed with the Microbeta Windows Workstation software (Wallac-Perkin Elmer) and was normalized to the level of [3 H]thymidine incorporation measured in Caco-2 cultured alone during the first day.

Protein, DNA, and RNA quantitation. Cell protein and nucleic acids were precipitated in 10% cold TCA for 1 h. DNA and RNA concentrations were determined after hydrolysis with 5% TCA (90°C for 20 min) using the orcinol colorimetric assay for RNA (16) and the diphenylamine reaction for DNA determination (5). Protein content in the insoluble fraction was quantified after acid hydrolysis. Proteins were dissolved in 1 M NaOH and quantified with the Bradford protein assay (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France) and BSA (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) as standard. Protein, DNA, and RNA concentrations were expressed as micrograms per well, and protein-to-DNA and RNA-to-DNA ratios were calculated for each coculture condition.

Two-Color Flow Cytometry Analysis of Cell Viability Using Annexin V and Propidium Iodide Staining

After 2–3 days in culture in the presence or absence of EGCs, Caco-2 Transwell filters were washed with 0.1 M PBS before harvesting of Caco-2 cells with trypsin. Cell suspension was then pooled with the supernatant and centrifuged for 10 min at 1,000 g. After centrifugation, the pellet was washed twice with PBS and resuspended in 100 μ l of the staining solution of the annexin V-FITC and propidium iodide (PI) staining kit (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). After a 30-min incubation at room temperature, the percentage of cells undergoing apoptosis was determined by two-color flow cytometry using a FACScalibur (BD Biosciences). Results (annexin V- or PI-positive or -negative cells) were expressed as percent of total cells.

Morphological and Immunohistochemical Analysis

After coculture, filter-grown cells were fixed for 1 h in PBS containing 4% paraformaldehyde at room temperature. ZO-1, a tight-junction-associated protein, was used to determine the apical cell

surface area and detected by immunofluorescence. Filters were preincubated for 30 min in PBS-4% horse serum (Sigma)-0.5% Triton X-100 (Sigma). Monolayers were then exposed to a monoclonal mouse anti-ZO-1 antibody, diluted in PBS-horse serum-Triton X-100 (1:500; Zymed, San Francisco, CA), for 1 h at room temperature and washed with PBS. Monolayers were then incubated for 30 min in a buffer solution containing an anti-mouse antibody conjugated to carboxymethylindocyanine (1:500; Beckman Coulter, Roissy, France). Monolayers were mounted and viewed with an Olympus IX 50 (Olympus, Rungis, France) connected to a black and white video camera (model 4910, Cohu). Apical cell surface area was measured with DP-Soft software (Olympus). An average of 456 ± 13 epithelial cells were analyzed for each experimental condition.

RT-PCR Analysis of TGF- β_1 mRNA Levels in EGC

Extraction of total RNA from EGC cells was performed with TriReagent (Euromedex, Mundolsheim, France) according to the manufacturer's instructions. For reverse transcription, RNA (1 μ g) was mixed with 0.5 μ g of random hexamer primers (Amersham, Orsay, France), transcription buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT; GIBCO), dNTPs (10 mM each, GIBCO), and RNasin (50 units; Promega, Charbonnieres, France) to synthesize single-stranded cDNA using the Superscript II reverse transcriptase kit (GIBCO) according to manufacturer's instructions in a total volume of 20 μ l. Incubation was performed at 42°C for 60 min. PCR amplifications were performed with Goldstar red *Taq* DNA polymerase (Eurogentec, Angers, France). The cycling conditions were as follows: denaturation for 5 min at 95°C, amplification for 30 cycles, with denaturation for 5 s at 95°C, annealing for 30 s at 55°C, and extension for 45 s at 72°C. The following primers were used as previously described (15): TGF- β_1 all isoforms (forward: 5'-TACAT-TGACTTTAGGAAGGA-3'; reverse: 5'-ATCATGTTGGACAAC-TCTCC-3'), PCR product size of 252 bp; TGF- β_1 (forward: 5'-CAAAGACATCACACACAGTA-3'; reverse: 5'-GGTGTGAGGCCCTTCAGG-3'), PCR product size of 448 bp; β -actin (forward: 5'-CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG-3'; reverse: 5'-GGAG-CAATGATCTTGATCTTC-3'), PCR product size of 201 bp.

After addition of 5 μ l of loading buffer (6 \times ; Sigma) and 1 μ l of Syber green (1:1,000; Roche Diagnostics, Meylan, France), PCR products were loaded onto a 1.5% agarose gel (Eurobio, Ulis, France) and separated by electrophoresis. DNA size markers were run in parallel to validate the predicted sizes of the amplified bands (100-bp DNA ladder; GIBCO). PCR products were visualized with use of the Gel Doc 2000 system (Bio-Rad, Paris, France) and analyzed with Quantity One software (Bio-Rad).

Pharmacological Tools

Rat TGF- β_1 levels were determined by ELISA kit (Diaclone, Besançon, France). Immunoneutralization of TGF- β_1 was achieved with a pan-specific TGF- β antibody (R&D Systems, Lille, France).

Statistics

Data are expressed as means \pm SE when normally distributed or as the median (25–75%) when nonnormally distributed. A paired or unpaired *t*-test, a Mann-Whitney test, and one-way ANOVA followed by a Bonferroni *t*-test or two-way ANOVA on repeated measures were performed to compare different populations. Differences were considered as significant for $P < 0.05$.

RESULTS

Mucosal Expression of S-100 β in Healthy Areas and in Human Colonic Adenocarcinoma

Immunohistochemical analysis of human colonic mucosa revealed a prominent honeycomb-like latticework of S-100 β -

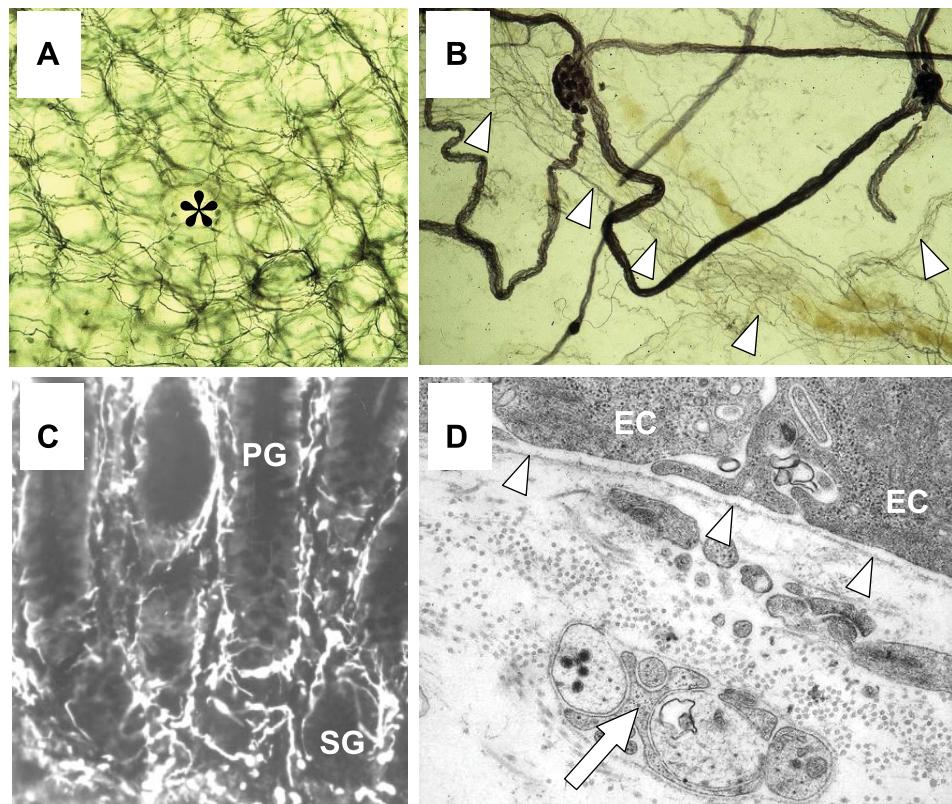


Fig. 1. Enteric glial cells (EGCs) are closely related to enterocytes. S-100 β -immunoreactive EGCs form dense networks around epithelial crypts (asterisk) (*A*; $\times 100$ magnification) and along the crypt axis (*C*; $\times 200$ magnification), resembling the periglandular (PG) and subglandular (SG) portions of the mucosal nerve plexus. The electron micrograph (*D*; $\times 20,000$ magnification) confirms the close proximity of EGCs (arrow) ensheathing mucosal nerve fibers to enterocytes (EC). Note the short distance ($\sim 1.2 \mu\text{m}$) between the epithelial basal lamina (arrowheads) and EGCs. Glial cells also form part of the perivascular nerve plexus (arrowheads) adjacent to mucosal blood vessels ramifying within the lamina propria mucosae (*B*; $\times 100$ magnification).

immunoreactive EGCs surrounding the colonic epithelial crypts (Fig. 1A) and present all along the crypt axis (Fig. 1C). These glial cell networks extended throughout the lamina propria mucosae, forming part of the subglandular and periglandular portions of the mucosal plexus directly located beneath the epithelial lining. In addition, strong S-100 β immunoreactivity was observed in elongated cells accompanying mucosal blood vessels (Fig. 1B), indicating the presence of glial cells ensheathing nerve fibers of the perivascular nerve network. Transmission electron microscopy studies revealed a close topographic proximity between EGC associated with mucosal nerve fibers and the basal lamina of intestinal epithelial cells (Fig. 1D). Distance between EGC and enterocytes ranged between 0.5 and 2 μm .

Immunohistochemical studies were performed in colonic adenocarcinoma and revealed severe alterations in the mucosal glial network compared with control (taken at distance from the tumor), ranging from altered to complete loss of the glial network (Fig. 2).

In Vivo Ablation of EGCs Increases Intestinal Cell Proliferation and Induces Crypt Hypertrophy

To characterize the role of glial cells on intestinal epithelial cell proliferation, glial cells were specifically ablated in a transgenic mice model previously developed by Bush et al. (6). After glial cell ablation by GCV in transgenic mice, the mean [^3H]thymidine labeling index in the intestinal crypts was significantly increased by 51% ($n = 4$) compared with control mice (Fig. 3). In addition, analysis of the distribution of [^3H]thymidine-labeled cells along the crypt-axis revealed 1) that at a given crypt cell position the proliferation index was

increased and 2) that labeled cells were distributed further up in the crypt in transgenic animals compared with controls.

EGCs Increase the “Sealing” of the Filters With Caco-2 Cells

To study the direct effects of EGCs on intestinal epithelial cells, a coculture model was used. After seeding procedures, subconfluent Caco-2 cells cultured alone (control) initially formed clusters of cells. For several days, we observed spaced islands of growing cells (Fig. 4, *A* and *C*). In contrast, rapid and drastic changes were observed when Caco-2 cells were cocultured with EGC. Indeed, in the presence of EGC, filter-grown Caco-2 cells did not form large multicellular clusters as observed when cultured alone; instead, the entire filter covered rapidly and uniformly within 2–3 days after seeding (Fig. 4, *B* and *D*). After 6 days in culture, the filter was uniformly covered under both experimental conditions (Fig. 4, *E* and *F*). These observations were correlated with changes in filter resistance. In the presence of EGCs, a significant and time-dependent increase in the resistance of Caco-2 monolayer was measured compared with that observed in control samples (Fig. 4G). Furthermore, incubation of Caco-2 cells with the conditioned medium from EGC cultures reproduced the effect of coculture with EGCs (Fig. 4G).

Effect of EGCs on Caco-2 Cell Proliferation

We aimed to characterize whether EGCs altered Caco-2 cell density. Under control conditions, Caco-2 cell density increased significantly over time and reached $(1.21 \pm 0.29) \times 10^6$ cells/filter after 6 days in culture. In contrast, in the

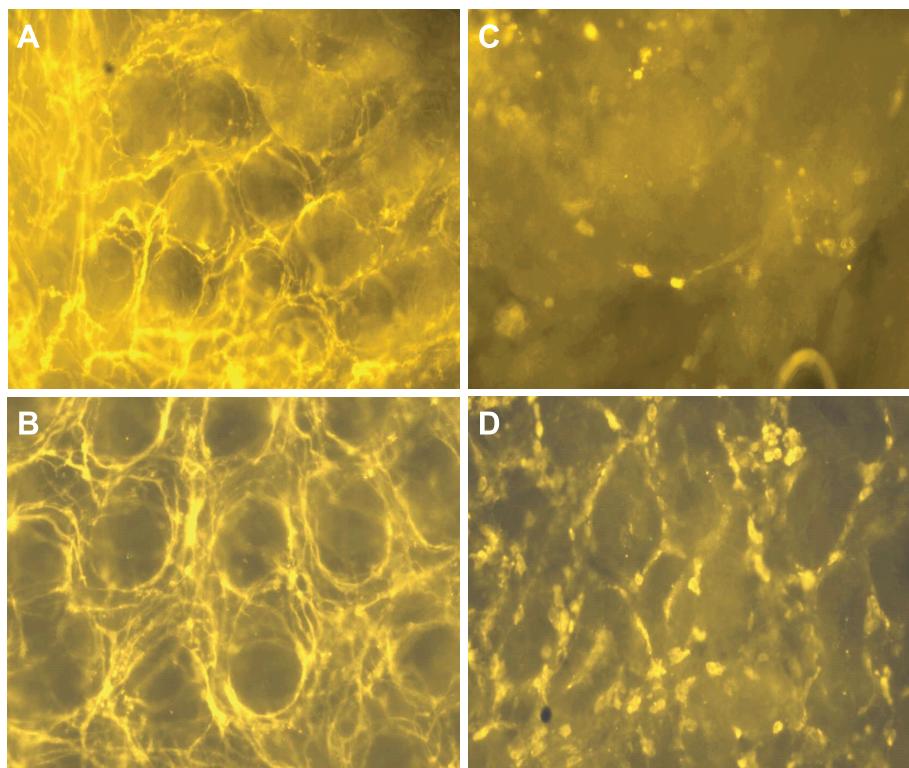


Fig. 2. EGC network is altered in human colonic adenocarcinoma. S-100 β -immunoreactive EGCs form dense networks around epithelial crypts in tissue distant from the tumor (*A* and *B*). In contrast, in colonic adenocarcinoma, alterations of the EGC network range from altered cell morphology (*D*) to total loss of S-100 β immunoreactivity (*C*). *A* and *C* were taken from one patient and *B* and *D* were taken from another. Magnification = $\times 200$.

presence of EGCs, after an initial increase in Caco-2 cell density during the first 48 h, cell density remained constant for up to 6 days in coculture (Fig. 5*A*). Under control conditions, Caco-2 cell density was significantly higher after 3 days compared with Caco-2 cells cultured in the presence of EGC [(3.8 ± 0.5) $\times 10^5$ vs. (2.2 ± 0.3) $\times 10^5$ cells/filter; $P < 0.05$; $n = 4$]. In addition, incubation of Caco-2 cells with EGC-conditioned medium significantly decreased the Caco-2 cell density compared with control and with a similar time course as with EGCs (data not shown). After 6 days of culture in the presence of EGC-conditioned medium, Caco-2 cell density was significantly decreased compared with that in control condition [(7.2 ± 1.6) $\times 10^5$ vs. (12.1 ± 3.0) $\times 10^5$ cells/filter; $P < 0.05$; $n = 4$].

These results were confirmed by assessing [^3H]thymidine incorporation. As shown in Fig. 5*B*, [^3H]thymidine incorpora-

tion in Caco-2 cells increased significantly over time under control conditions. In contrast, no significant change in [^3H]thymidine incorporation was observed in Caco-2 cells when cultured in the presence of EGCs. Furthermore, after 48 and 72 h in culture, [^3H]thymidine incorporation was significantly lower when Caco-2 cells were cultured with EGCs than when they were cultured alone (Fig. 5*B*).

To determine whether changes in cell density were associated with intestinal epithelial cell death, we assessed the effect of EGCs on the viability of Caco-2 cells by two-color flow cytometry analysis after annexin V and PI staining. The vast majority of Caco-2 cells (>90%) cultured or not with EGCs were PI and annexin V negative (Fig. 6), suggesting that Caco-2 cell viability was not affected by EGC. In addition, there was no difference in the percentage of dead cells observed under the different experimental conditions (Fig. 6).

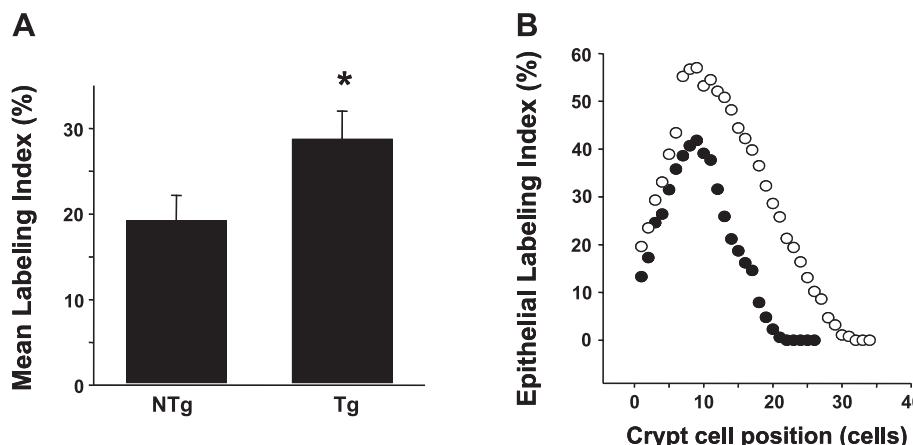


Fig. 3. In vivo ablation of EGCs increases intestinal epithelial cell proliferation. *A*: EGC ablation in transgenic mice induced a significant increase in the number of [^3H]thymidine-labeled epithelial cells compared with control nontransgenic littermates ($n = 4$; $P \leq 0.05$). *B*: in transgenic mice (\circ), the proportion of [^3H]thymidine-labeled cells was increased along the crypt axis compared with control (\bullet). In addition, besides increased thymidine incorporation, crypt cell hyperplasia was also observed ($n = 4$ mice).

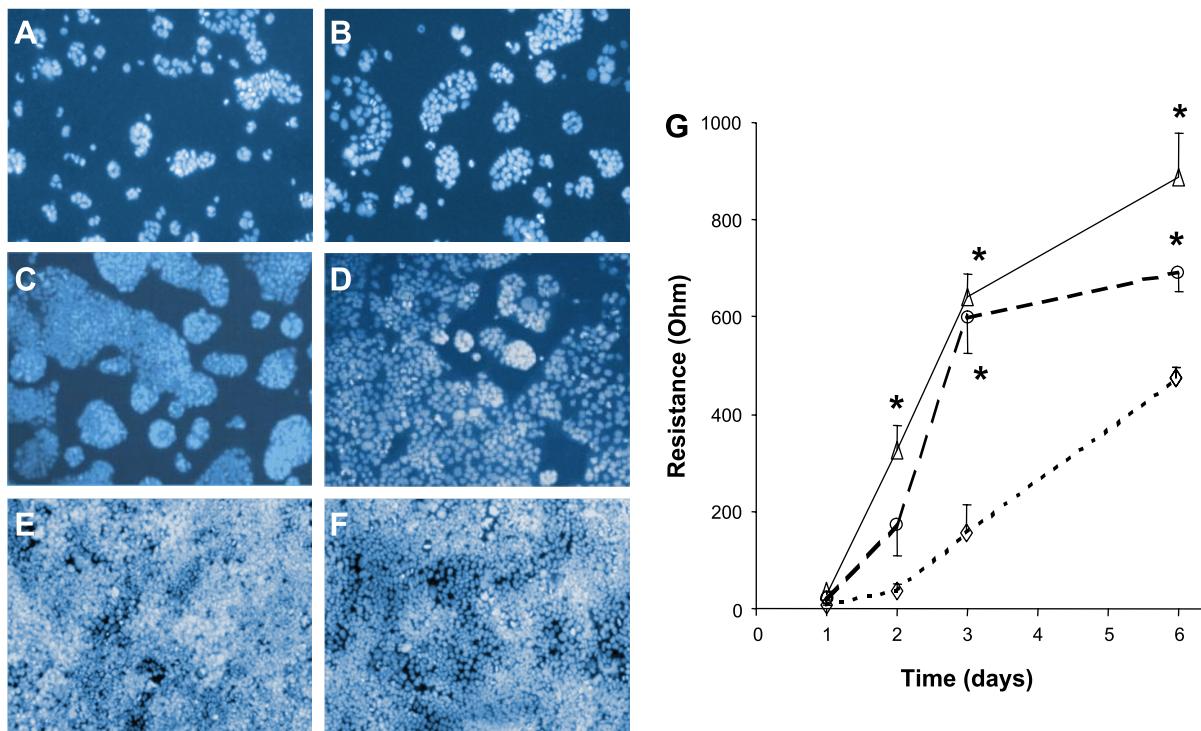


Fig. 4. EGCs increase the “sealing” of filter with Caco-2 cells. In the presence of EGCs, the filter was sealed with Caco-2 cells more rapidly (*B*: day 1; *D*: day 2; *F*: day 6) than under control conditions (*A*: day 1; *C*: day 2; *E*: day 6). This effect was correlated with a greater time-dependent increase in Caco-2 filter resistance (*G*) in the presence of EGC (Δ) than under control conditions (\diamond). The effect of the EGC on filter resistance was also observed with EGC-conditioned medium (\circ). Values are means \pm SE; $n = 4$ independent experiments. * $P < 0.05$ compared with control values (one-way repeated-measures ANOVA).

Effects of EGCs on the Surface Area of Caco-2 Cells

To explain the simultaneous increase in the sealing of the monolayer and decrease in density of Caco-2 cells in coculture with EGCs, the effect of EGCs on the surface area of Caco-2 cells was investigated. The apical surface area of individual epithelial cells was assessed by measuring the area of cells labeled with an antibody directed against ZO-1 (Fig. 7, *A* and *B*). The surface area of Caco-2 cells was 2.2 times greater when Caco-2 cells were cocultured with EGC than under control conditions (Fig. 7, *A–C*).

These morphological changes may be associated with cellular hypertrophy, where the total amounts of protein and RNA are increased. To verify this hypothesis, we measured the total protein, RNA, and DNA contents of Caco-2 cells grown in control conditions or in the presence of EGC. As illustrated in Fig. 7*D*, RNA/DNA and protein/DNA were not modified in Caco-2 cells after coculture with EGCs compared with control, showing an absence of cellular hypertrophy.

Effect of EGCs on Cell Density in Other Intestinal Epithelial Cell Lines

To determine whether EGCs are able to decrease cell density in other types of intestinal epithelial cells, we characterized their effect in other transformed and nontransformed intestinal epithelial cell lines. After 6 days in coculture, a significant decrease in cell density (ranging between 72 and 66%) was observed in all transformed cell lines tested (T84, HT-29, and HT-29-Cl.16E) when cultured with EGCs compared with control cultures without EGCs (Fig. 8, *A–C*). Similarly, coculture with EGCs decreased cell density in cultures of nontrans-

formed rat epithelium-derived IEC-6 cells by 76% compared with control (Fig. 8*D*).

Specificity of the Effects of EGCs on Caco-2 Cells: Effects of Intestinal Fibroblasts

To test whether the anti-proliferative effect of EGCs was specific for EGCs, we investigated the effects of intestinal pericycral myofibroblasts, another major constituent of the intestinal mucosa. In contrast to the effects observed with EGCs, after 6 days in culture, Caco-2 cell density slightly increased, although not significantly, when cultured in the presence of human intestinal fibroblasts (CCD 18Co) as in control conditions (Fig. 9*A*). In addition, after coculture with intestinal fibroblasts, [³H]thymidine incorporation in Caco-2 cells was increased compared with control values after 3 days in culture (Fig. 9*B*).

Involvement of TGF- β on EGC-Mediated Effects

TGF- β is known to significantly inhibit intestinal cell proliferation by inducing cell cycle arrest. We wanted to verify whether EGCs were a source of TGF- β , which may partly account for the effect of EGC on cell proliferation.

TGF- β_1 mRNA was found to be expressed in EGCs cultured alone or in the presence of Caco-2 cells (Fig. 10*A*). Furthermore, as assessed by ELISA, TGF- β_1 was secreted by EGCs in the culture medium of EGCs when cultured alone or cocultured with Caco-2 cells (6.7 ± 3.2 and 8.8 ± 1.3 ng/ml, respectively; $P = 0.2$; $n = 4$) (Fig. 10*B*). TGF- β_1 levels in Caco-2 cell culture were below the detection limit of the kit.

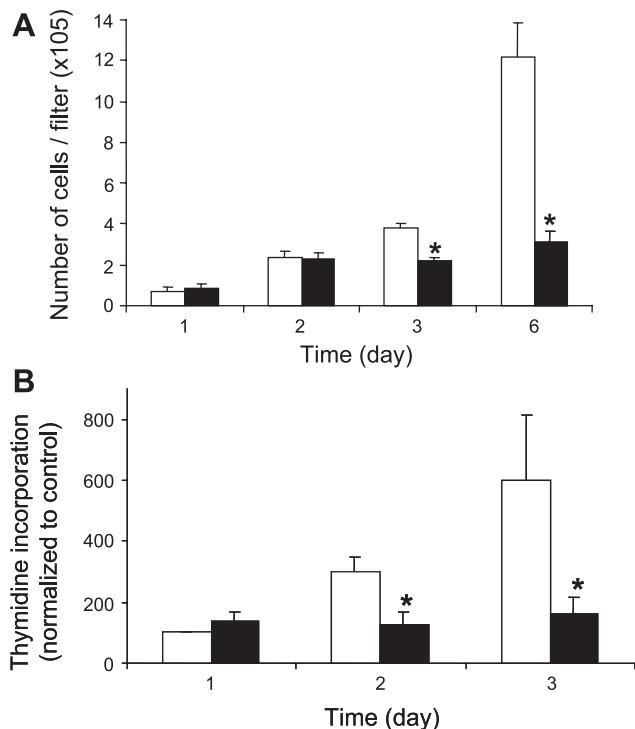


Fig. 5. EGCs decrease cell density and [³H]thymidine incorporation in Caco-2 cells. *A*: in the absence of EGCs (open bars), Caco-2 cell density increased over time. In contrast, after an initial increase, Caco-2 cell density remained constant after 2 days in the presence of EGCs (filled bars). Caco-2 cell density was significantly lower in coculture with EGC after 3 and 6 days of culture. Values are means \pm SE; $n = 4$. * $P < 0.02$ compared with control values (2-way ANOVA on repeated measures followed by Bonferroni *t*-test). *B*: in the absence of EGC (open bars), [³H]thymidine incorporation in Caco-2 cells increased in a time-dependent manner. In contrast, after an initial increase, [³H]thymidine incorporation in Caco-2 remained constant after 2 days in the presence of EGC (filled bars). Furthermore, on days 2 and 3, [³H]thymidine incorporation was significantly lower in Caco-2 cells cultured with EGC than in control Caco-2 cells. Values are means \pm SE; $n = 4$. * $P < 0.05$ (2-way ANOVA on repeated measures followed by Bonferroni *t*-test compared with control values).

TGF- β_1 was also shown to induce a dose-dependent decrease in Caco-2 cell density, leading to a maximum 20% decrease in cell density (Fig. 10C). When Caco-2 cells and EGCs were cocultured, incubation of the basolateral medium with an anti-TGF- β -neutralizing antibody (10 μ g/ml) significantly increased the number of Caco-2 cells. Cell density increased by $38 \pm 15\%$ ($n = 4$; $P < 0.05$) compared with that in the absence of blocking antibody (Fig. 10D). Addition of the neutralizing antibody to control cultures did not affect the total cell density [(7.5 ± 0.4) $\times 10^5$ to 10^6 vs. ($7.6 \cdot 10^5 \pm 0.4$) $\times 10^5$ cells/filter; $P = 0.89$; $n = 5$]. Finally, TGF- β (10 ng/ml) significantly increased the surface area of Caco-2 cells compared with that of Caco-2 cells cultured alone (177 ± 2 vs. $119 \pm 1 \mu\text{m}^2$; $n = 4$; $P < 0.001$), reproducing in part the effect of EGC.

Additional experiments also revealed that TGF- β_1 significantly reduced cell proliferation in other intestinal epithelial cell lines tested. Indeed, incubation of IEC-6 and T84 with 10 ng/ml of TGF- β_1 significantly reduced cell number by 14% ($n = 9$; $P < 0.05$) and 11% ($n = 5$; $P < 0.05$), respectively compared with control.

DISCUSSION

This study combining both *in vivo* and *in vitro* models demonstrates that EGCs have strong antiproliferative effects on intestinal epithelial cells. In addition, *in vitro* studies showed that EGCs increase the apical surface area of intestinal epithelial cell in the absence of cellular hypertrophy. Furthermore, TGF- β_1 was identified as a factor synthesized by EGCs and shown to mediate at least partly the effects of EGCs. Finally, the decreased EGC network observed in colorectal tumors could favor cell proliferation or invasion.

Previous studies have reported in various species (guinea pigs, mice, rats, or humans) that EGCs are abundantly distributed within enteric ganglia and also form dense networks within the intestinal mucosa (7, 11, 14, 18). Our study is in agreement with these previous observations and reveals that, in human healthy colonic mucosa, a dense network of S-100 β -positive EGCs is present along the crypt axis (Fig. 1). The close contact revealed by the electron microscopic study between EGCs (which ensheath enteric nerves) and epithelial cells strongly suggests that these cell types could interact through a diffusible factor.

A major finding of this study is that EGCs significantly inhibit intestinal epithelial cell proliferation *in vivo* and *in vitro*. In *in vivo*, ablation of glial cells leads to an increase in thymidine incorporation in epithelial cells, indicating an increase in epithelial cell proliferation. However, one cannot exclude that this increase in cell proliferation was associated in response to the intestinal inflammation that occurs in this model (6). Direct evidence of EGC control of cell proliferation is further provided by the *in vitro* study. Indeed, to characterize direct interactions between EGCs and intestinal epithelial cells, we used a coculture model. Rat EGCs were used because no methods for the isolation and long-term culture of human EGCs are currently available. Although our results need further confirmation in humans, interspecies differences are unlikely to be involved because rats EGC had similar effects on human and rat intestinal epithelial cell lines. We also showed that EGCs exert their action probably through a paracrine mechanism. Indeed, no cell-to-cell contact exists in our model, and the effects of EGCs were reproduced with conditioned EGC culture medium. Furthermore, coculture of EGCs with transformed (HT-29, Caco-2, T84) or nontransformed (IEC-6) intestinal epithelial cell lines suggests that EGCs play a role in the inhibition of primary intestinal epithelial cell proliferation. The profound inhibitory role of EGCs on intestinal epithelial cell proliferation is to oppose the role of another major constituent of intestinal mucosa, i.e., intestinal fibroblasts. Indeed, intestinal fibroblasts have been shown to promote intestinal cell proliferation predominantly through the release hepatocyte growth factor (12).

An important finding of our study is that we identified TGF- β_1 as being synthesized and released by EGCs and mediating in part the effects of EGCs on epithelial cell proliferation and cell surface. The phenotypical characteristics of EGCs have been poorly studied, although it is presently admitted that they synthesize factors similar to those produced by astrocytes of the CNS such as glial-derived neurotrophic factors (2), L-arginine (19), and IL-6 (21). Our study shows that, similarly to CNS astrocytes, EGCs can also synthesize TGF- β_1 . In the CNS, TGF- β_1 secreted by astrocytes plays a key role

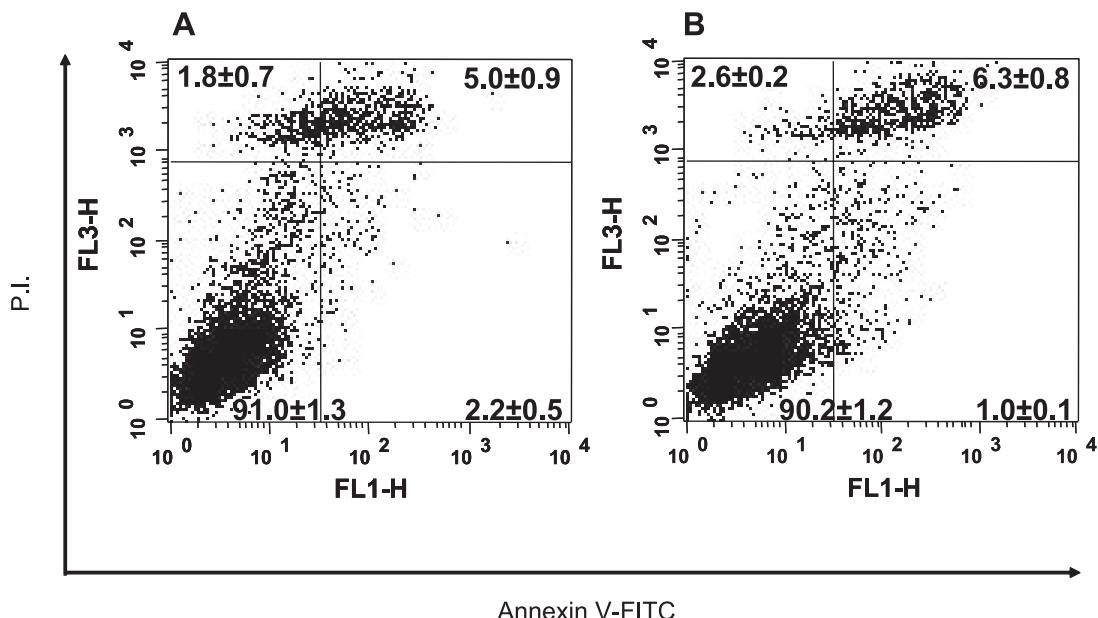


Fig. 6. Effects of EGC on Caco-2 cell survival. Two-color flow cytometry analysis revealed that EGCs did not modify annexin V-propidium iodide (PI) uptake by Caco-2 cells (1 representative experiment is shown). A total of 10^4 cells were analyzed per experiment. Percentages (3 independent experiments) appear in each quadrant. EGCs (B) did not modify viability of Caco-2 cells compared with control (A), as the majority of Caco-2 cells were not labeled with annexin V or PI. Values are means \pm SE.

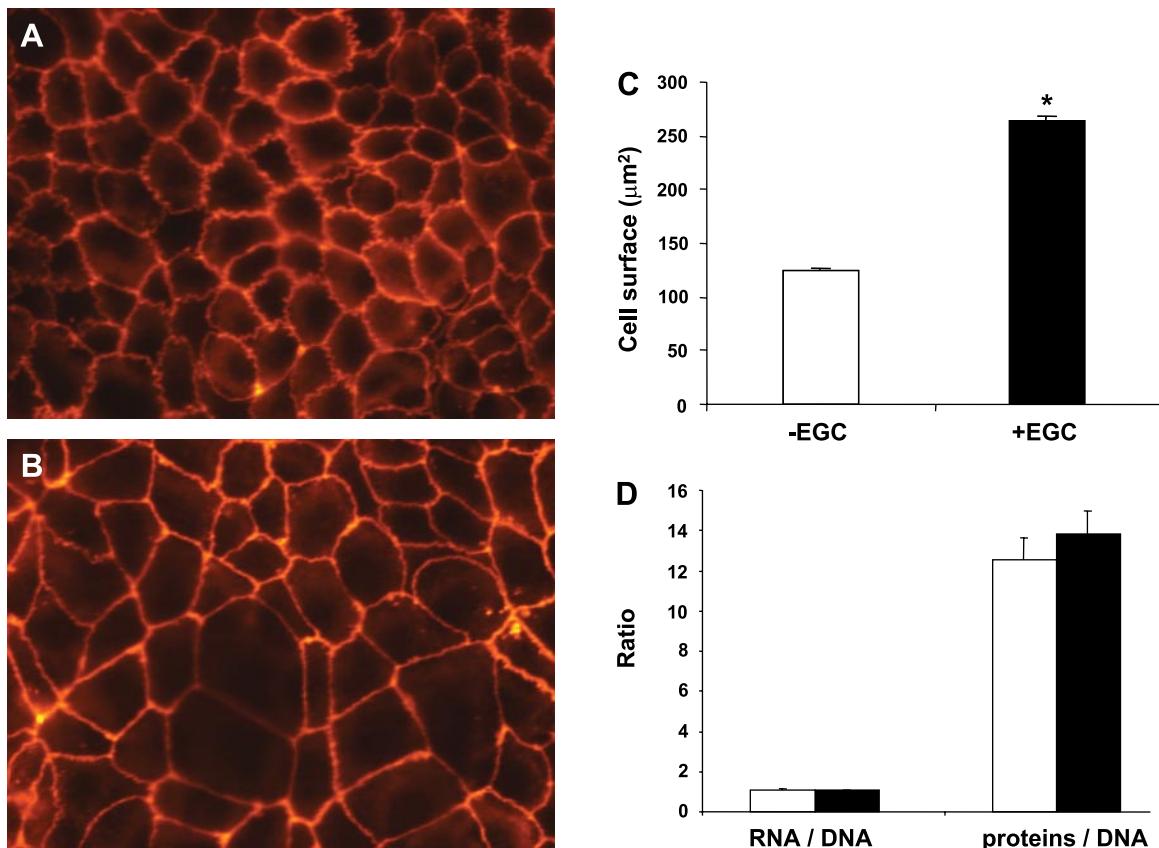


Fig. 7. EGCs increase cell surface area but do not induce Caco-2 cell hypertrophy. Caco-2 cell surface area (measured with ZO-1 as a marker of the apical cell perimeter) was smaller when these cells were cultured alone (A) than when they were cocultured with EGCs (B). Magnification = $\times 200$. C: quantitative analysis of 4 independent experiments (means \pm SE). * $P < 0.001$ (paired *t*-test). D: Caco-2 cells cultured in the presence (filled bars) or absence (open bars) of EGCs had similar RNA-to-DNA and protein-to-DNA ratios (means \pm SE; $n = 3$ independent experiments).

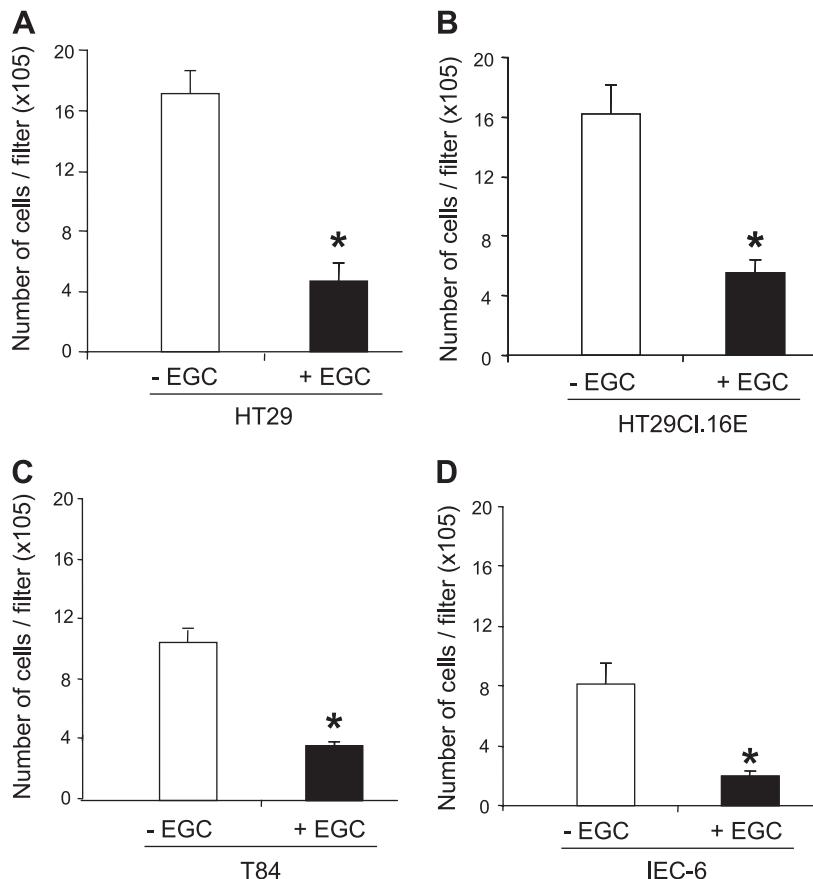


Fig. 8. EGCs decrease cell density in various intestinal epithelial cell lines. EGCs induced a significant decrease in the cell density with various human transformed intestinal epithelial cell lines HT-29 (A), HT-29-Cl.16E (B), and T84 (C). EGCs induced similar effects in the rat nontransformed intestinal epithelial cell line IEC-6 (D). Values are mean \pm SE; $n = 4-6$ independent experiments. * $P < 0.005$ (paired t -test).

in neuronal homeostasis and, in particular, has a neuroprotective role (9, 26). However, the role of TGF- β_1 in the control of the homeostasis of the ENS remains unknown, although it is tempting to speculate that TGF- β_1 released by EGC acts as a regulator of enteric neuronal survival, as ablation of EGCs leads to enteric neuronal degeneration (6).

The anti-proliferative effect of TGF- β_1 released by EGCs is consistent with the key role played by TGF- β_1 in the control of intestinal epithelial cell proliferation. It has been widely demonstrated that TGF- β_1 inhibits epithelial cell proliferation (3, 16) while stimulating epithelial cell migration (10). In accordance with these findings, our data show that TGF- β_1 inhibits proliferation of intestinal epithelial cells in a dose-dependent manner. Interestingly, TGF- β_1 levels present in EGC-condi-

tioned medium induces a decrease in the Caco-2 cell density equivalent to the increase in Caco-2 cell density induced by EGCs in the presence of the neutralizing TGF- β_1 antibody. The molecular mechanisms responsible for the inhibition of epithelial cell proliferation were not investigated. However, it is well known that TGF- β_1 induces a significant inhibition of intestinal cell proliferation by promoting cell cycle arrest (24). This effect is either due to a downregulation of the levels and/or activities of G₁/S cyclins and cyclin-dependent kinases or to an upregulation of the level and/or activities of cyclin-dependent kinase inhibitors (24). Various intracellular pathways, such as MAPK pathways, the phosphatidylinositol 3-kinase cascade, or small G proteins such as RhoA or Rac, can be directly activated by TGF- β . Activation of the latter pathways,

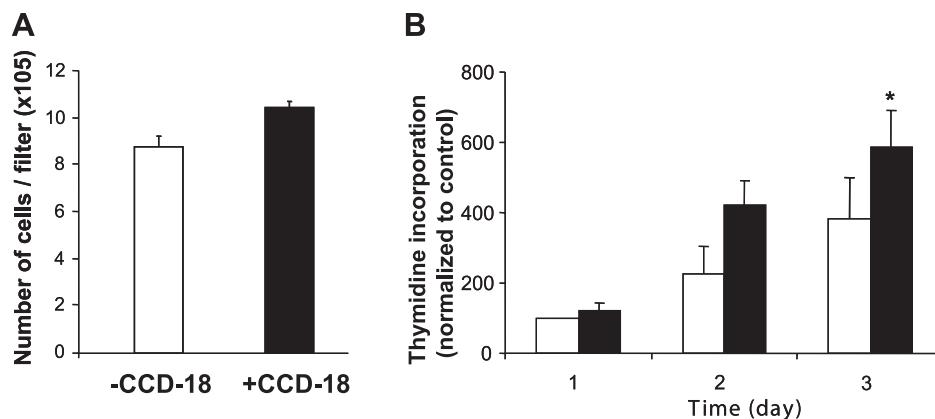


Fig. 9. Human intestinal fibroblasts increase Caco-2 cell proliferation. A: human intestinal fibroblasts (CCD 18Co) induced a slight increase in the cell density of Caco-2 cells after 6 days in coculture compared with control (mean \pm SE; $n = 4$); $P = 0.08$ (paired t -test). B: in the absence (open bars) or presence of fibroblasts (filled bars), [³H]thymidine incorporation in Caco-2 cells increased over time. After 3 days in culture, [³H]thymidine incorporation in Caco-2 cells was greater in the presence of human fibroblasts than in control (mean \pm SE; $n = 4$); * $P < 0.05$ compared with control value (2-way ANOVA on repeated measures followed by Bonferroni t -test).

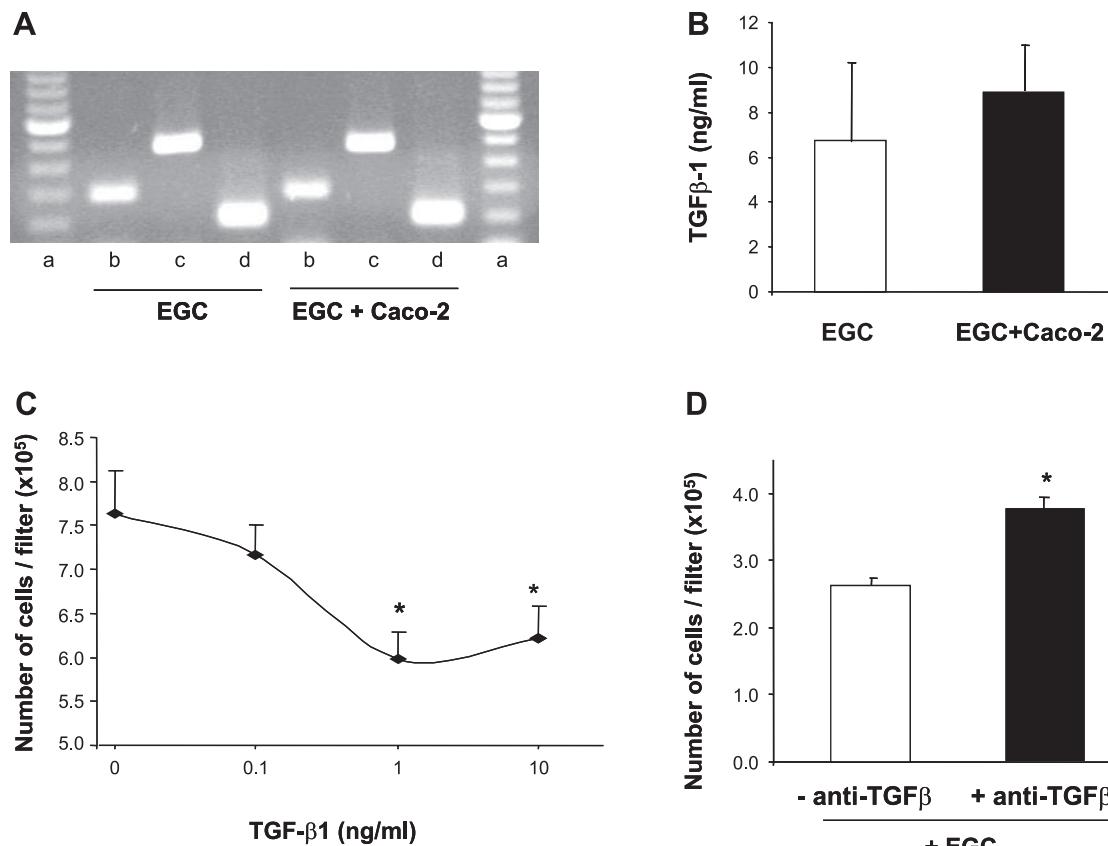


Fig. 10. Expression of TGF- β 1 in EGCs and its role in the control of Caco-2 cell proliferation in coculture. A: semi-quantitative RT-PCR was used to detect TGF- β 1 in EGCs using a primer against all TGF- β isoforms (lane b) and against the TGF- β 1 isoform (lane c) in EGCs cultured alone or cultured in the presence of Caco-2; β -actin (lane d) and size markers (lane a) were also detected. B: TGF- β 1 was detected in the supernatant of EGC cultured alone (open bar) or in the presence of Caco-2 (filled bar). Values are means \pm SE; $n = 4$. C: addition of TGF- β 1 to Caco-2 cells cultured alone decreased the cell density after 6 days in culture in a dose-dependent manner. Values are means \pm SE; $n = 6$ independent experiments. * $P < 0.05$ compared with control values (repeated-measures 1-way ANOVA). D: addition of the neutralizing anti-TGF- β 1 antibody to EGC cocultured with Caco-2 cells (filled bar) significantly increased Caco-2 cell density compared with that observed in control Caco-2 cells cocultured with EGC (open bar). Values are means \pm SE; $n = 4$. * $P = 0.003$ (paired *t*-test).

which have been shown to be involved in the control of cytoskeletal filament assembly, may be partly involved in the increase in cell surface induced by TGF- β 1.

Because TGF- β 1 accounts for \sim 12–30% of the effects of EGC on intestinal epithelial cell proliferation (depending on the cell line studied) and cell surface, other major factors secreted by EGCs that may mediate these effects remain to be identified. In particular, factors secreted by EGCs that act on the intestinal epithelial cytoskeleton may contribute to increased cell surface area of epithelial cells. This increase in cell surface may be sufficient to induce cell contact-mediated cell cycle arrest. Such a mechanism may be compatible with our model because, before changes in cell number, i.e., during the first 48 h of culture, changes in the cell surface already occurred (unpublished data).

Our study supports the role of EGCs as a major cellular component of the gut involved in the control of the intestinal barrier homeostasis. Our results support *in vivo* findings that showed that controlled immune-mediated glial cell alteration increases intestinal paracellular permeability (1) and that full ablation of EGCs leads to the disruption of the intestinal barrier (5).

Another potentially important finding of this study is the alterations in the enteric glial network (identified with S-100 β)

observed in colon carcinoma. Indeed, although one cannot presently determine whether altered glial cells are involved in tumorigenesis, the absence of enteric glia in tumors could favor cellular proliferation and/or invasion. The cellular nature of the tumor microenvironment has been shown to have a profound impact on tumor development. Therefore, besides fibroblasts or endothelial or immune cells, EGCs could be regarded in the future as an important component regulating the tumoral environment.

In conclusion, our results reinforce the emerging concept that the ENS and, in particular, EGCs are major regulators of intestinal barrier functions and homeostasis. In particular, neuronal and glial components of the ENS could be seen as acting in concert with other components of the mucosa, such as fibroblasts, to finely tune intestinal epithelial cell proliferation and to contribute to the maintenance of the intestinal barrier integrity. In addition, functional alterations in EGCs could be involved in various intestinal pathologies affecting intestinal barrier functions such as cancer or intestinal inflammatory bowel diseases. Identification of other glial cell factors involved in the control of intestinal cell proliferation could therefore be of future great therapeutic interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the surgery and pathology teams of the University Hospital of Nantes for valuable contributions to this work.

GRANTS

Part of this work was supported by a grant from the Crohn's and Colitis Foundation of America (T. Savidge).

REFERENCES

- Aube AC, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F, Liblau R, Galmiche JP, Neunlist M. Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mice model of enteric glia disruption. *Gut* 55: 630–637, 2006.
- Bar KJ, Facer P, Williams NS, Tam PK, Anand P. Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* 112: 1381–1385, 1997.
- Barnard JA, Beauchamp RD, Coffey RJ, Moses HL. Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1578–1582, 1989.
- Beltinger J, McKaig BC, Makh S, Stack WA, Hawkey CJ, Mahida YR. Human colonic subepithelial myofibroblasts modulate transepithelial resistance and secretory response. *Am J Physiol Cell Physiol* 277: C271–C279, 1999.
- Burton K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 62: 315–323, 1956.
- Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. Fulminant jeuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93: 189–201, 1998.
- Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41: 81–93, 2003.
- Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassmann H, Desreumaux P, Liblau RS. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13306–13311, 2001.
- Dhandapani KM, Hadman M, De Sevilla L, Wade MF, Mahesh VB, Brann DW. Astrocyte protection of neurons: role of transforming growth factor-beta signaling via a c-Jun/AP-1 protective pathway. *J Biol Chem* 278: 43329–43339, 2003.
- Dignass AU, Podolsky DK. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor β . *Gastroenterology* 105: 1323–1332, 1993.
- Ferri GL, Sabani A, Abelli L, Polak JM, Dahl D, Portier MM. Neuronal intermediate filaments in rat dorsal root ganglia: differential distribution of peripherin and neurofilament protein immunoreactivity and effect of capsaicin. *Brain Res* 515: 331–335, 1990.
- Goke M, Kanai M, Podolsky DK. Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 274: G809–G818, 1998.
- Hanani M, Francke M, Hartig W, Grosche J, Reichenbach A, Panneke T. Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278: G644–G651, 2000.
- Kobayashi S, Suzuki M, Endo T, Tsuji S, Daniel EE. Framework of the enteric nerve plexuses: an immunocytochemical study in the guinea pig jejunum using an antiserum to S-100 protein. *Arch Histol Jpn* 49: 159–188, 1986.
- Koh SW. Ciliary neurotrophic factor released by corneal endothelium surviving oxidative stress ex vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 2887–2896, 2002.
- Koyama SY, Podolsky DK. Differential expression of transforming growth factors α and β in rat intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 83: 1768–1773, 1989.
- Lin RI, Schjeide OA. Micro estimation of RNA by the cupric ion catalyzed orcinol reaction. *Anal Biochem* 27: 473–483, 1969.
- Mestres P, Diener M, Rummel W. Histo- and immunocytochemical characterization of the neurons of the mucosal plexus in the rat colon. *Acta Anat (Basel)* 143: 268–274, 1992.
- Nagahama M, Semba R, Tsuzuki M, Aoki E. L-Arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol Signals Recept* 10: 336–340, 2001.
- Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisson CL, Galmiche JP, Jarry A. Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G1028–G1036, 2003.
- Ruhl A, Franzke S, Collins SM, Stremmel W. Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G1163–G1171, 2001.
- Ruhl A, Nasser Y, Sharkey KA. Enteric glia. *Neurogastroenterol Motil* 16, Suppl 1: 44–49, 2004.
- Ruhl A, Trotter J, Stremmel W. Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglial cell lines from the myenteric plexus of adult rat. *Neurogastroenterol Motil* 13: 95–106, 2001.
- Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF- β -induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* 35: 83–92, 2004.
- Shmakov AN, Morey AL, Ferguson DJ, Fleming KA, O'Brien JA, Savidge TC. Conventional patterns of human intestinal proliferation in a severe-combined immunodeficient xenograft model. *Differentiation* 59: 321–330, 1995.
- Sortino MA, Chisari M, Merlo S, Vancheri C, Caruso M, Nicoletti F, Canonico PL, Copani A. Glia mediates the neuroprotective action of estradiol on β -amyloid-induced neuronal death. *Endocrinology* 145: 5080–5086, 2004.
- Toumi F, Neunlist M, Cassagnau E, Parois S, Laboisson CL, Galmiche JP, Jarry A. Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol Motil* 15: 239–242, 2003.

ARTICLE 2 :

CONTROLE DU TRANSCRIPTOME DES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES PAR LES CELLULES GLIALES ENTERIQUES : IMPACT SUR LES FONCTIONS DE LA BARRIERE EPITHELIALE INTESTINALE

De récents travaux ont présenté les cellules gliales entériques (CGE) comme étant des régulateurs clefs des fonctions des cellules épithéliales intestinales (CEI) assurant le maintien de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale (BEI). Ainsi, il a été montré que les CGE inhibaient la prolifération des CEI *via* la sécrétion de TGF- β 1 et diminuaient la perméabilité intestinale *via* la libération de GSNO (S-nitrosoglutathion) (Neunlist et al., 2007; Savidge et al., 2007). Néanmoins, les acteurs moléculaires impliqués dans le contrôle des fonctions de la BEI par les CGE et l'implication potentielle des CGE dans le contrôle d'autres fonctions de la BEI restent largement inconnus. Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons décidé de réaliser une étude par puces à ADN afin d'identifier l'impact des CGE sur le transcriptome des CEI.

Afin d'identifier les potentielles modifications du transcriptome des CEI induites par les CGE, nous avons comparé les transcriptomes de CEI (lignée Caco-2) cultivées en phase proliférative seules ou en présence de CGE (lignée CRL2690) pendant 8 et 24 heures. Après extraction, amplification et marquage, les transcrits des différentes conditions ont été hybridés sur les microarrays contre un pool contrôle correspondant à différents répliquats du temps t=0 heure. Nous avons utilisé une puce à ADN initialement dédiée à l'étude du transcriptome de la lignée Caco-2 qui a ensuite été enrichie par de nombreux marqueurs identifiés comme signatures moléculaires de divers cancers (Cancérochip, plateforme

transcriptomique Ouest Genopole, Nantes). Grâce aux outils bioinformatiques Genepix et Genespring, nous avons identifié les gènes différentiellement exprimés dans les CEI cultivées en présence de CGE.

Le clustering hiérarchique de l'ensemble des données brutes montrait une modification du transcriptome des CEI au long des 24 heures de culture en condition contrôle reflétant certainement l'impact de la prolifération et la différenciation des CEI sur leur transcriptome. De plus, il existait une modification majeure du profil d'expression génique entre les CEI cultivées seules ou en présence de CGE à 24 heures.

L'analyse Genespring nous a permis d'identifier 116 gènes différentiellement exprimés dans les CEI cultivées pendant 24 heures en présence de CGE par rapport au contrôle, i.e. CEI cultivées seules. L'analyse de ces 116 gènes suggère que les CGE régulent principalement les fonctions des CEI suivantes : prolifération, mort, différenciation, motilité et adhésion cellulaire. Notre analyse a été renforcée par l'utilisation du logiciel Ingenuity qui, en intégrant les 116 gènes identifiés dans des réseaux fonctionnels propres aux bases de données du logiciel, a identifié les mêmes fonctions cellulaires que celles citées ci-dessus. Par ailleurs, des études par PCR quantitative ont permis de valider une partie des données d'expression.

Nous avons ensuite analysé les gènes identifiés par Genespring par rapport aux données de la littérature spécifiquement relatives aux fonctions des cellules épithéliales. Ainsi, concernant les gènes régulant les mécanismes d'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice, nous avons montré que les CGE augmentaient, dans les CEI, l'expression de 7 gènes impliqués dans des mécanismes favorisant l'adhésion et diminuaient l'expression de 2 gènes codant pour des protéines connues pour diminuer les propriétés d'adhésion des CEI. Nos

résultats ont été ensuite validés par des études fonctionnelles. En particulier, nous avons montré *in vitro* que les CGE augmentaient l'adhésion globale des CEI, i.e. adhésion cellule-cellule et adhésion cellule-matrice. Puis, à l'aide d'un test d'adhésion cellule-matrice, nous avons montré que les CGE induisaient une augmentation de l'adhésion des CEI à leur matrice.

Notre analyse a également montré que les CGE semblaient favoriser la différenciation et la motilité des CEI. En effet, les CGE induisaient une augmentation de l'expression de 6 gènes associés à une induction de la différenciation cellulaire et diminuaient l'expression de 3 gènes impliqués dans des mécanismes diminuant la différenciation cellulaire. D'une façon similaire, les CGE induisaient l'expression de gènes codant pour des protéines favorisant la motilité des CEI.

Enfin, les résultats de notre analyse montrent que les CGE régulent des gènes majeurs du contrôle de la prolifération des CEI avec une tendance nette vers un effet inhibiteur des CGE sur la prolifération des CEI. D'autre part, les CGE modulent également l'expression de divers gènes impliqués dans la régulation de la mort des CEI mais aucune tendance claire n'est ressortie de notre analyse. En outre, les CGE régulent également l'expression de gènes impliqués dans différentes voies métaboliques des CEI dont en particulier celles du métabolisme des protéines et des lipides.

Cette étude a permis de montrer que les CGE avaient un impact majeur sur le transcriptome des CEI. En particulier, les CGE induisent un shift du transcriptome des CEI vers une augmentation de la différenciation et de l'adhésion des CEI tout en régulant la prolifération et la mort des CEI. Ces travaux renforcent également le concept que les CGE

RESULTATS

jouent un rôle protecteur clef dans le maintien de l'homéostasie de la BEI en induisant ses fonctions de barrière.

Regulation of Intestinal Epithelial Cells transcriptome by Enteric Glial Cells: impact on Intestinal Epithelial Barrier functions

Laurianne Van Landeghem^{1,2,3}, Maxime Mahé^{1,2,3}, Jean Léger^{2,4}, Isabelle Guisle^{2,4}, Raluca Teusan^{2,4}, Rémi Houlgatte^{2,4}, Michel Neunlist^{1,2,3*}

Address : ¹INSERM, U913, Nantes, F-44000 France; ²Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44000 France; ³CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, F-44000 France ; ⁴PT transcriptome, Ouest génopole, INSERM, U915, Institut du Thorax, Nantes, F-44000 France

Email : Laurianne Van Landeghem - laurianne.van-landeghem@univ-nantes.fr; Maxime Mahé - maxime.mahe1@etu.univ-nantes.fr; Philippe Aubert - philippe.aubert@univ-nantes.fr; Jean Léger - jean.leger@nantes.inserm.fr; Isabelle Guisle - isabelle.guisle@nantes.inserm.fr; Rémi Houlgatte - remi.houlgatte@nantes.inserm.fr; Raluca Teusan - raluca.teusan@nantes.inserm.fr; Pascal Derkinderen - pascal.derkinderen@chu-nantes.fr; Michel Neunlist* - michel.neunlist@univ-nantes.fr

*Corresponding author

Abstract

Background: Emerging evidences suggest that enteric glial cells (EGC), a major constituent of the enteric nervous system (ENS), are a key regulator of intestinal epithelial barrier (IEB) functions. Indeed EGC inhibit intestinal epithelial cells (IEC) proliferation and increase IEB paracellular permeability. However, the role of EGC on other important barrier functions and the signalling pathways involved in their effects remain currently unknown. To achieve this goal, we aimed at identifying the impact of EGC upon IEC transcriptome by performing microarray studies.

Results: EGC induced significant changes in gene expression profiling of proliferating IEC after 24 hours of co-culture. 116 genes were identified as differentially expressed (70 upregulated and 46 downregulated) in IEC cultured with EGC compared with IEC cultured alone. By performing functional analysis of the 116 identified genes using Ingenuity Pathway Analysis, we showed that EGC induced a significant regulation of genes favouring both cell-to-cell and cell-to-matrix adhesion as well as cell differentiation. Consistently, functional studies showed that EGC induced a significant increase in cell adhesion. EGC also regulated genes involved in cell motility towards an enhancement of cell motility. In addition, EGC profoundly modulated expression of genes involved in cell proliferation and cell survival although no clear functional trend could be identified. Finally, important genes involved in lipid and protein metabolism of epithelial cells were shown to be differentially regulated by EGC.

Conclusion: This study reinforces the emerging concept that EGC have major protective effects upon IEB barrier. EGC have a profound impact upon IEC transcriptome and induce a shift in IEC phenotype towards an increased cell adhesion and cell differentiation. This concept needs to be further validated both under physiological and pathophysiological conditions.

Background

The intestinal epithelial barrier (IEB) is the first fence between the organism and the luminal environment. It plays a dual role in allowing the passage of nutrients and electrolytes and preventing the passage of pathogens. The maintenance of its homeostasis is of outmost importance for the survival of the organism. The IEB is formed by a monolayer of specialized intestinal epithelial cells (IEC) under constant renewal and maintained together *via* different cell-to-cell and cell-to-matrix interactions. The IEB is part of a complex network of specialized cell types constituting its microenvironment such as immune cells, sub epithelial fibroblasts, endothelial cells or luminal bacteria. Emerging evidences suggest that under physiological conditions, the IEB functions are actively regulated by its cellular microenvironnement [1-3]. For instance, myofibroblasts have been shown to enhance epithelial cell proliferation and intestinal epithelial restitution [4]. In addition, the microbiota has been shown to control both the maturation and the maintenance of the IEB [5].

The enteric nervous system (ENS) is also a major constituent of the IEB. Indeed IEB and, in particular, the proliferative compartment of the crypts is densely innervated by nerve fibres originating mainly from the submucosal plexus. Besides controlling secretory processes, recent data have shown that activation of enteric neurons can reduce IEC proliferation and also reduce barrier permeability, in particular *via* the release of VIP (vasoactive intestinal peptide) [6, 7]. Enteric neurons innervating the IEB are also closely associated with enteric glial cells (EGC), the major constituent of the ENS.

For many years, EGC have been considered as mainly passive and structural cells supporting neurons and ganglions. However, this concept has been lately revisited mainly in view of the role played by astrocytes in the central nervous system (CNS) [8-10]. Indeed besides controlling and regulating neuronal functions, increasing evidences suggest that EGC could be major regulator of IEB functions, similarly to astrocytes controlling blood brain barrier functions [9]. Supporting this concept, recent

data have demonstrated that EGC can profoundly inhibit IEC proliferation, in part *via* the liberation of TGF- β 1 [11]. In addition, EGC decrease also IEB paracellular permeability *via* the release of S-nitrosoglutathione (GSNO) [12]. Furthermore, *in vivo* lesions of EGC network increase paracellular permeability and IEC proliferation, and at term, lead to major lethal intestinal inflammation [12-14]. However, the role of EGC in the control of other major IEC functions such as cell differentiation, cell-to-cell or cell-to-matrix adhesion as well as the associated regulatory pathways remain largely unknown.

Therefore, in our study, we combined transcriptomic studies as well as functional studies to determine the impact of EGC on the regulation of major genes and functions involved in IEB homeostasis. Microarray approach was used to identify EGC-induced modifications in gene expression profiling of proliferating Caco-2. The identified genes and related functional pathways are consistent with the concept that EGC are a major constituent of the IEB microenvironment favouring barrier protection.

Results and Discussion

Enteric glial cells modulate intestinal epithelial cells transcriptome

Microarray experiments

We performed microarray analysis of Caco-2 cells cultured alone or in presence of enteric glial cells (EGC) for 8 hours and 24 hours using oligonucleotide chips (Cancerochips) developed at West genopole transcriptome core facility of Nantes. These chips contain around 7,000 genes and are dedicated to Caco-2 cell line gene expression studies as well as to gene expression signature studies of multiple tumours.

Hierarchical one-way clustering of the whole data showed the impact of the time of culture and the presence of EGC on the transcriptional profiling of IEC, i.e. Caco-2 cells (Figure 1). We observed changes in IEC transcriptome over the 24 hours of culture in control condition. At 8

hours, differences in transcriptome profiling already existed in control condition as compared to t=0. In general, the observed changes in differentially expressed genes between t=0 and t=8 hours in control conditions were increased in the same way of regulation when reaching t=24 hours (Figure 1). These changes might be due to the growth and differentiation of the proliferating IEC over the 24 hours of culture. We observed no major differences in gene expression profiling between IEC cultured alone and IEC cultured in presence of EGC at 8 hours of culture. In contrast, at 24 hours, EGC presence led to consistent and major changes in IEC gene expression profiling (Figure 1).

Gene expression profiling modulated by EGC

Using Genespring, we aimed at identifying statistically differentially expressed genes between Caco-2 cells cultured alone or in presence of EGC. After 8h of culture, no significant difference in gene expression profiling was found between IEC cultured alone (control condition) or in presence of EGC ("glia" condition). However, after 24 hours of culture, we identified 116 genes differentially expressed between control and EGC conditions in using two different parametric statistics tests. Volcano plot test was performed to identify differentially expressed genes with more than 2 fold difference and with a p-value inferior or equal to 0.05. Student's t-test with ANOVA and Benjamini and Hochberg false discovery rate multiple testing correction were also used to determine the differentially expressed genes between control and glia conditions with a p-value inferior or equal to 0.05. Among the 116 differentially expressed genes, 46 genes were down-regulated and 70 were up-regulated in IEC cultured with EGC as compared to control (Table 1-2). Quantitative PCR was also performed on various genes to validate the microarray results. In particular, results showed an EGC-induced increase of *CDH1*, *FN1*, *LAMA5*, *PPARG* and *PTK2* expression in IEC, similarly to data obtained with microarrays (Figure 2).

Validation of Genespring analyses by hierarchical clustering

Hierarchical two-way clustering was performed to further confirm that the 116 genes differentially regulated by EGC and identified with Genespring presented gene expression profiling specific of EGC regulation and thus, whether they could discriminate the different experimental conditions (Figure 3).

The clustering showed high levels of gene expression regulation between control and EGC conditions at t=24 hours. Furthermore, most of the 116 identified genes already exhibited a slight difference in expression profiling between control and EGC conditions at 8 hours. These results indicate that EGC effects on IEC genes identified as differentially expressed at 24 hours have probably started as early as at 8 hours, even the modifications were not statistically significant.

The first bifurcation of this cluster separated two replicates of t=0 condition and one replicate of control condition at t=8 hours from all other conditions (Figure 3). This first bifurcation of the samples dendrogramm does not seem to be consistent with the experimental design, as other replicates of t=0 and control condition at t=8 hours are lost among other replicates in the other branch of the main bifurcation. Errors in biological or experimental reproducibility might explain this observation.

However, the second-order bifurcation of the dendrogramm separated all the EGC condition at t=24 hours samples associated with one replicate of EGC condition at t=8 hours from the remaining samples. The left branch of the second-order bifurcation contained samples of control and EGC conditions analysed at t=0 and t=8h which were anarchically organized in terms of branch distances. However, these samples were clearly separated from all control conditions at t=24 hours (Figure 3). These observations confirm that 1) no major changes existed between control and EGC conditions at t=8 hours and 2) that the 24 hour-culture impacted on IEC gene expression profiling, likely reflecting differentiation of IEC over the time of culture. Interestingly and importantly, the right branch of the second-order bifurcation contained all samples of the EGC condition at

t=24 hours and one replicate of the EGC condition at t=8 hours. All samples of EGC condition at t=24 hours were grouped under the same bifurcation and were all grouped at the same distance from each other (Figure 3). This specific organisation of EGC conditions at t=24 hours in the dendrogramm strongly support the fact that the expression of the 116 identified genes are modulated specifically by EGC in IEC at 24 hours.

EGC regulate IEC functions

Gene network interactions

Biological interactions among the 116 genes of the gene set provided by Genespring analysis were identified using Ingenuity Pathways Analysis. Among the 116 genes differentially expressed, Ingenuity identified 92 genes contributing to a total of 10 functional networks (Table 3). Each of the networks 1-6 contained at least 14 genes that were associated with cell-to-cell signalling and interaction, cellular growth and proliferation, cell morphology, cellular movement, cell death and cell cycle. The 116 genes were also classified into Ingenuity cellular and molecular pathways as well as into Ingenuity signalling pathways (Table 4 and 5). All the functions described above and identified by building functional networks among our gene set were found in 25 cellular and molecular functions obtained with Ingenuity (Table 4). Moreover these 6 functions were among the 10 first functions presenting the highest score (Table 4). Finally, the signalling pathways identified by the Ingenuity analysis of our gene set were also relevant to those 6 functions (Table 5). The limit of Ingenuity analysis for our study is that it is not restricted to one specific organ or cell, so that all the results of Ingenuity analysis could not be transposed directly to the regulation of IEC functions by EGC. We therefore performed an “epithelial” specific analysis of the major functions identified with Ingenuity.

Cell-to cell and cell-to-matrix interaction

EGC regulated the expression of numerous genes involved in the control of IEC adhesive processes. In particular, EGC up-regulated the expression of all 7 genes with pro-adhesive functions and down-regulated all 2 genes with anti adhesive properties, found to be differentially expressed by EGC in IEC (Table 6 A). These genes are crucially involved in the control of cell-to-cell and cell-to-matrix adhesion.

First, EGC concomitantly increased the expression of *CDH-1*, which encodes E-cadherin, and decreases the expression of *CDK5R1*. E Cadherin is the major component of the adherent junction complexes and level of E-Cadherin in IEC is to be correlated to junction adhesion complexes formation between IEC [15, 16]. Further confirming a pro-adhesive influence of EGC on IEC is the EGC-induced down-regulation of *CDK5R1* expression. Indeed, *CDK5R1* encodes p35, a regulator of CDK-5 (cyclin-dependent kinase), which induces the degradation of E-cadherin precursor [17]. In addition, EGC also up-regulates *IQGAP2* expression in IEC. This gene encodes for a protein member of IQGAP family that interacts with several molecules controlling cytoskeleton organization, cell adhesion and cell motility such as *CDC42* and *Rac* [18]. Interestingly, *IQGAP2* has been shown to mediate E-Cadherin-based cell-to-cell adhesion during development [19]. All these results suggest that EGC would enhance cell to cell adhesion in IEC.

Our data also demonstrate that EGC modulate the expression of genes that are involved in cell-to-matrix interactions. First, EGC increased expression of several genes encoding proteins of the extracellular matrix such as *LAMA5*, *LAMAC1* and *FN1*. *LAMA5* and *LAMAC1* encode respectively for laminin $\alpha 5$ and $\gamma 1$ chains which together with laminin $\beta 1$ chain compose laminin-10 [20]. Laminin-10 has been shown to be the most adhesive substratum of laminin isoforms when studying abilities of laminin-2,-5 and -10 in modulating Caco-2 cells adhesion [21]. Furthermore, EGC up-regulated *FN1* expression, encoding the fibronectin protein. Interestingly, FN has recently been shown to enhances Caco-2 cell attachment and wound healing [22]. Interestingly, EGC down-regulated

KLK14 expression, which encodes KLK (kallikrein) 14, an extracellular serine protease which has been shown to cleave and digest various extracellular matrix proteins such as collagen IV, laminin and fibronectin [23]. In addition, EGC also up-regulated *PTK2* expression in IEC which may result in increased expression of FAK protein, a major regulator of focal adhesions turnover and maturation [24]. Finally, EGC induced an up-regulation of *KRT8* expression whose increased expression has recently been shown to cause enhanced adhesion of human breast tumour cells to their extracellular matrix [25].

In conclusion, our data suggest that EGC regulation of IEC transcriptome leads to an increase in cell adhesion. In order to functionally validate this hypothesis, we performed *in vitro* experiments using established adhesion assays. Under these conditions, we first showed that IEC global adhesion was increased after 24h of culture with EGC as compared to control (Figure 4A). We next confirmed whether these effects were in part associated with an increase in cell-to-matrix adhesion as the majority of the EGC-mediated regulated genes in IEC appeared to favour cell-to-matrix adhesion. Indeed, cell-to-matrix adhesion assays revealed that EGC significantly increased IEC adhesion to the filter as compared to control (Figure 4B).

Cell differentiation

EGC also regulated the expression of numerous genes involved in the differentiation of IEC. In particular, EGC up-regulated the expression of 6 genes enhancing differentiation and down-regulated 3 genes known to inhibit IEC differentiation (Table 6 B).

EGC induced an up-regulation of the expression of pro-differentiative genes or gene associated with enhanced IEC differentiation such as *PPARG*, *LAMA5*, *PTK2*, *CDH-1*, *DCTN2* and *DYNLT3*. Indeed, PPAR γ , encoding the well-described nuclear receptor superfamily member peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) has been shown to regulate IEC differentiation and its expression has been positively correlated with level of differentiation of Caco-2 and HT29 cells [26, 27]. Moreover, a

diminution of laminin- α 5 in a murine model resulted in a transformation from a small intestinal to a colonic mucosal architecture, suggesting that laminin- α 5 has a crucial role in establishing and maintaining the architecture of the small intestine [28]. In addition, it has already been shown that the differentiation of Caco-2 cells was accompanied by an increase in FAK expression [29]. In addition, E-cadherin, whose corresponding gene *CDH-1* is up-regulated by EGC, has been largely demonstrated as being involved in the establishment of a differentiated phenotype for IEC. Notably, E-cadherin has been described to be less expressed at the bottom of the crypts where IEC are undifferentiated [15, 30, 31]. The down-regulation by EGC of *CDK5R1* expression, leading to enhance level of E-Cadherin (see previous paragraph), might also further enhance EGC-induced cell differentiation. EGC also increased *DCTN2* and *DYNLT3* expression, two genes encoding a subunit of dynein (p50 or dynamin) and dynein light chain rp3, respectively. Both are involved in post-Golgi movement of vesicles towards apical surface of differentiated enterocytes [32-34], and could therefore reflect an increased differentiation of IEC induced by EGC. Intriguingly, although differentiation of the Caco-2 cell line has been shown to be correlated with a down-regulation in fibronectin expression [35], EGC induced an up-regulation in *FN1* expression in IEC in our study.

EGC decreased the expression of genes which encode for protein implicated in anti-differentiative pathways such as *E2F1*, *BAG1* and *CDK5R1* (discussed above). Indeed, *E2F1* is a gene encoding a protein member of the E2F family of transcription factors and has been shown to be down-regulated in confluent HIEC and differentiated enterocytes [36]. *BAG1*, encoding for a Bcl-2 non-homologous associated molecule, has also been shown to present a decreasing gradient of expression from the base of the crypts to the apex of the villi, suggesting that a down-regulation of *BAG1* might reflect a differentiation state of IEC.[37].

In conclusion, based on our analysis, EGC-mediated regulation of IEC transcriptome appears to strongly favour IEC differentiation.

Cell motility

EGC regulate in IEC the expression of genes encoding proteins that are known to play a role in IEC motility (Table 6 C). In particular, EGC induced an increase in *FNI* expression in IEC. *FNI* has been demonstrated as a major actor in promoting cell migration of IEC and sub-epithelial fibroblasts, thus favouring epithelial wound healing [38, 39]. Interestingly, EGC induced a down-regulation in *LSP1* expression in IEC. *LSP1* gene encodes for LSP1, a cytoplasmic actin-binding protein, whose overexpression in melanoma cells has been described to inhibit cell motility [40]. EGC-induced up-regulation of *PTK2* expression also supports a role of EGC in promoting IEC motility. Indeed, increased FAK protein level promoted epithelial restitution *via* an increased IEC migration [41, 42]. Similarly, the increased PPAR γ expression could enhance cell motility as inhibitors of PPAR γ inhibit cell migration in colonic epithelial cells [43-45].

Cell proliferation

Interestingly, EGC differentially regulated in IEC the expression of genes involved in cell proliferation as compared to control (Table 6 D). Indeed, EGC appeared to modulate the expression of anti-proliferative and pro-proliferative genes toward a dominant anti-proliferative effect (Table 6 D).

Indeed, the expression of major anti-proliferative and pro-proliferative genes was found to be up-regulated and down-regulated, respectively, by EGC. In particular, *PPARG*, *TXNIP* and *BTG1* expressions in IEC were up-regulated by EGC. PPAR γ activation has been described both *in vivo* and *in vitro* to inhibit intestinal epithelial cell proliferation [46, 47] and to induce a G1 phase cell cycle arrest [26]. Furthermore, *TXNIP* encodes the thioredoxin-interacting protein, a negative regulator of thioredoxin. Thioredoxin is an important growth-promoting factor of IEC [48]. Moreover, *TXNIP* has also recently been suggested to be a tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma [49] and interestingly, *TXNIP* expression is decreased in colorectal cancer and ulcerative colitis [50]. Similarly, *BTG1* has been shown to negatively regulate cell

proliferation and to present a maximal expression during G0/G1 phases of the cell cycle in fibroblasts [51]. Further reinforcing the anti-proliferative effects of EGC is the EGC-induced down-regulation of the expression of pro-proliferative genes such as *E2F1*, *FGFR2* and *PPIL1*. *E2F1* is a gene encoding a protein member of the E2F family of transcription factors that regulate cell cycle progression by modulating expression of proteins required for the G1/S transition. It has been well described that growth stimulatory signals leads to active E2F1 accumulation and S-phase entry [52, 53]. *FGFR2* encodes a member of the FGF receptor family with high affinity for KGF which is a major actor in the mesenchymal stimulation of epithelial cell proliferation [54, 55]. Finally, *PPIL1*, which encodes a cyclophilin-related protein, PPIL1 (peptidyl prolyl isomerase-like protein), implicated in spliceosome activation, has recently been described to be overexpressed in colon tumors and *PPIL1* silencing led to an inhibition of colon cancer cell growth [56, 57].

These global anti-proliferative effects of EGC upon IEC have to be associated with the EGC-induced modulation of genes which would tend to be pro-proliferative, although these are clearly in reduced number. For instance, EGC increase *MKI67* expression, which encodes the proliferation marker Ki-67. Indeed, Ki-67 is increasingly expressed during the cell cycle phases [58], excepted in G0 or in cells just escaping from G0 [59]. Its function is still unclear but knock-down for ki-67 in cancerous cells lead to an inhibition of proliferation mainly *via* an induction of apoptosis [60, 61]. Interestingly, EGC reduced the expression of *TP53RK* and *SFRP4* in IEC that encode proteins involved in anti-proliferative pathways. *TP53RK* encodes PRPK which is a short kinase that phosphorylates p53, enhancing its transcriptional activity [62] and suppressing cell cycle transition G1/S [63]. *SFRP4* encodes the protein sFRP4 (Secreted frizzled-related protein), which is an inhibitor of the Wnt-signaling cascade through binding and sequestering Wnt ligand and thus, has been shown to decrease cell proliferation in many cell lines [64-66].

Taken together, these data suggest that EGC tend to shift IEC transcriptome toward an anti-proliferative phenotype. These results could lead to the identification of specific targets

responsible for the anti proliferative effects of EGC previously reported [11]. In addition, this global effect is supported further by the observation that EGC inhibit cell proliferation in part by inducing a cell cycle arrest in G0/G1 phase [10].

Cell survival

Interestingly, EGC differentially regulated in IEC the expression of genes involved in cell death as compared to control. Indeed EGC appeared to modulate the expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic genes toward a dominant pro-apoptotic effect (Table 6 E).

Indeed, expressions of pro-apoptotic and anti-apoptotic genes were found to be up-regulated and down-regulated, respectively, by EGC. In particular, *BNIP3* and *CASP4* expression in IEC were upregulated by EGC. *CASP4*, coding for the caspase-4 pro-apoptotic protein has been shown to induce cell death [67, 68], so as *BNIP3* which encodes for a pro-apoptotic protein member of Bcl-2 family [69, 70]. Conversely, *ASAHI-1*, *GPX2* and *BAG-1* were down-regulated by EGC. *BAG-1* encodes for a known anti-apoptotic protein implicated in Bcl-2 signalling pathway [71, 72]. *ASAHI-1* encodes acid ceramidase, an enzyme that catabolises ceramide into sphingosine by deacylation. Overexpression of acid ceramidase in cells confer on them an increased resistance to cell death induced by various factors such as TNF or anti-cancerous drugs [73, 74]. Finally, *GPX2* encodes a member of the glutathione peroxidase (GPX) family and is a selenoprotein and a glutathione peroxidase. *GPX2* is expressed in IEC [75] and *GPX2* inhibited oxidative stress-induced apoptosis in the human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 [76].

These global pro-apoptotic effects of EGC upon IEC have to be considered also in view of the EGC-mediated regulation of genes which would tend to be anti-apoptotic, although these are in reduced number. In particular, EGC up-regulated the expression of *TUBB3* is a gene encoding the class III isotype of β-tubulin. Silencing of class III β-tubulin by siRNA reverted anti-cancer agent-resistant cells to a sensitive phenotype and promoted apoptosis [77, 78]. Conversely, EGC

inhibited the expression of *CARD12* which encodes the CARD12 protein, a member of the CED4/Apaf-1 family and known to induce apoptosis when expressed in cells [79, 80].

EGC-induced regulation of genes involved in cell death in IEC has probably no clear consequences on IEC survival. This is consistent with a previous study showing that EGC did not modify IEC survival [11].

Conclusion

The present study described the impact of EGC upon the transcriptome of proliferating Caco-2 cells in a validated non contact co-culture model of EGC and IEC [11, 12]. The results obtained confirmed the known role of EGC in the control of some IEB functions and, more interestingly, extended their role in the control of novel major IEB and IEC functions. This study further reinforced the emerging concept that EGC are an important component of the IEB environment with major protective effects. Indeed, the major pathways regulated by EGC in IEC identified with microarrays lead to enhanced cell adhesion and differentiation, increased cell motility, which thus could favour repair and reduced cell proliferation.

An important result of this study is the putative identification of genes involved in the anti-proliferative effects of EGC. Indeed, EGC have been shown to have potent anti-proliferative effects upon IEC. Interestingly, these effects were associated with an induction of a cell cycle blockade in the G0/G1 phase [10] but were not associated with significant cell death [11]. These results are globally confirmed, as there was no clear trend in the EGC-induced modulation of genes controlling cell survival in IEC but a trend toward a regulation of the expression of genes involved in anti-proliferative pathways.

A major finding of our study is that EGC regulated the expression of genes involved in cell adhesion and differentiation toward a global increase of IEC adhesive properties. These results can be analysed in view of the known effects of EGC upon IEB. Indeed, *in vitro* studies have shown that EGC increase IEB resistance and decrease IEB paracellular permeability [12].

In the present study, we also demonstrate that EGC could increase global IEB adhesion, in part by increasing cell-to-matrix adhesion. These results are in agreement with *in vivo* data showing that selective lesions of EGC lead to increased paracellular permeability and major IEB breakdown associated with the development of intestinal inflammation. However, the role of the molecular actors involved in these processes such as fibronectin, laminin or cytokeratin remains to be investigated. Interestingly, EGC might also favour barrier integrity by increasing its resistance to inflammatory stress either by its ability to down-regulate inflammatory genes such as *CARD12* or by increasing IEC production of anti-inflammatory mediators such as *VIP* [81].

Another important finding of this study is the observation that EGC might regulate IEC metabolism. In particular, EGC up-regulate genes involved in lipid metabolism such as *AADAC*, *MGLL* or *APOH*, encoding respectively the arylacetamide deacetylase, monoglyceride lipase (MGL) and Apolipoprotein H [82-84]. Interestingly, inhibitors of MGL which is a serine hydrolase that converts 2-arachidonoylglycerol, a ligand of cannabinoid receptors, to fatty acids and glycerol, increased gut transit time [85] but its impact on IEB functions remain unknown. EGC modulate also the expression of genes involved in protein metabolism such as *CTSH* that encodes cathepsin H, a lysosomal cysteine proteinase [86]. In addition, EGC increased also the expression of genes involved in arginine metabolic pathway that are *SLC7A7* and *ASS*, which encode respectively for the cationic amino acid transporter y(+)LAT1 and the argininosuccinate synthetase, enzyme catalyzing the penultimate step of the arginine biosynthetic pathways. The functional impact of EGC upon IEC metabolism need to be investigated in future studies.

Regulation of IEB functions by EGC occurs mainly *via* paracrine pathways. Indeed, the majority of EGC effects upon IEB functions are reproduced by glial-derived conditioned medium. In addition, various mediators have been identified as being involved in the control of cell proliferation or paracellular permeability. Our study supports the role of mediators such as TGF- β 1 as a regulator of gene pathways modulated by EGC in IEC. Indeed, TGF- β 1 has

been shown to increase the expression of FAK [42], TGFI [87] or VIP [88]. In addition, EGC have been shown to produce IL-6 [89]. Interestingly, IL-6 has recently been identified as a key molecule involved in IEB barrier protection *via* increasing both cytokeratin 8 and cytokeratin 18 proteins expression [90], whose mRNA expression were induced by EGC in IEC in our study. In this context, knowledge of genes modulated by EGC could direct future efforts aimed at identifying novel glial mediators involved in EGC control of IEB functions.

Collectively, our data support the concept that EGC plays a key protective role upon IEB homeostasis by reinforcing global barrier functions. In addition, it also set the basis for an emerging concept of a role of glial lesions and EGC functions defects in the development of pathologies with altered barrier functions such as IBD, increasing susceptibility to pathogens aggression or even to the development of colorectal cancer.

Methods

Cell culture

CRL2690 (ATCC), a transformed EGC line isolated from adult rat myenteric plexus, was cultured in DMEM (4.5 g/L glucose; Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2mM glutamine (Gibco), 50 IU/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin. EGC were seeded at a concentration of 30 000 cells/mL in 6- and 12-well plates (Corning, Avon, France). EGC were cultured for an additional 24 hours after having reached confluence prior co-culture with IEC. Caco-2 cells (ATCC), isolated from a human colonic adenocarcinoma, were cultured in DMEM (4.5 g/L glucose; Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2mM glutamine (Gibco), 50 IU/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin and were seeded at a concentration of 140 000 cells/mL onto porous Transwell filters (6-well and 12-well Transwell clear, 0.40 μ m porosity, Corning). Caco-2 cells were processed for experiment 1 day after their seeding. To characterize EGC impact onto IEC transcriptome and functions, IEC seeded onto filters were cultured in presence of EGC seeded at the bottom of the 6-well or 12-well plates.

Microarray experiments

Transcriptomic analysis was performed with a microarray of around 7,000 genes expressed in Caco-2 cells or identified as molecular signatures of various tumours; these so called “Cancerchips” are available from West genopole transcriptome core facility of Nantes. The Cancerchips were made from a set of relevant 6,864 genes (probes) and were composed of 20,592 spots of oligonucleotides (50-mers) preferentially and/or differentially expressed in Caco-2 cells and in various tumours. Three replicates of each gene were spotted on to Cancerchips, which allowed detailed statistical studies of the reproducibility of the hybridization experiments.

Total RNA was extracted from Caco-2 cells cultured on 6-well filters alone or in presence of EGC at t=0, 8 and 24 hours. Each condition was performed in 4 replicates allowing detailed statistical studies of the reproducibility of the cell culture experiments. RNA extraction was performed with RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendation.

The protocols used for subsequent amplification and labelling were described in the DNA chips platform protocols. Each individual sample was compared to a reference pool consisting of Caco-2 cells transcripts of the four replicates extracted at t=0 hour. Total RNA (0.5 μ g) was amplified and labelled using the Amino Allyl MessageAmp II aRNA Amplification kit (Ambion) and CyDye Post Labelling Reactive Dyes (Amersham). After reverse transcription to synthesize first strand cDNA, second strand cDNA was subsequently synthesized following the manufacturer's protocol. *In vitro* transcription was then achieved in order to amplify the initial transcripts quantity, concomitantly with aminoallyl-dUTP incorporation to perform labelling with cyanins (Cy5 for the reference sample and Cy3 for individual samples). After washing, the chips were scanned on a scanner (Scanexpress- Perkin Elmer).

Data analysis

After acquisition, the scanned images were analyzed using GenePix Pro v5.1 software (Axon). Raw signal intensity data were normalized using the MADSCAN *lowess fitness* method. In order to identify differentially expressed genes, ratios were statistically analyzed using Genespring v7.0 (Agilent). Analyses were performed with data from chips presenting satisfying reproducibility. After lowess normalization, different strategies of statistical analyses were used to identify differentially expressed genes. Filtering of values was performed on gene spot quality and on gene expression level. Student's t-test (p-value cutoff 0.05; Benjamini and Hochberg false discovery rate multiple testing correction) and Volcano Plot (Fold difference 2; p-value cutoff 0.05) were used to isolate genes regulated by EGC in IEC.

Hierarchical clustering was performed after normalization on medians of the ratio values of the t=0 hour-condition samples. Hierarchical clustering analyses were performed using Gene Cluster (NCI National facility). The so called hierarchical two-way clustering experiments were performed on conditions and on genes whereas hierarchical one-way clustering analyses were performed on genes only. Among the 116 genes identified with Genespring analysis, 17 of them did not present reliable values at t=0 hour. Thus, these 17 genes were excluded from hierarchical clustering analyses. As a consequence, clustering data of these 116 genes only involve 99 genes.

RT-quantitative PCR

Extraction of total RNA from Caco-2 cells cultured alone or in presence of EGC for 24 hours was performed with RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. For reverse transcription, 1 μ g of purified total RNA was denatured and subsequently processed for reverse transcription using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. PCR amplifications were performed using the Absolute Blue SYBR green fluorescein kit (ABgene) according to the

manufacturer's protocol and run on MyiQ thermocycler (Biorad).

PTK2 Accession #: NM_153831/NM_005607

Forward primer:

5'- GAGATCCTGTCTCCAGTCTAC-3'

Reverse primer:

5'- TGCACCTGCTATTTTAGTTG-3'

FNI Accession #: NM_054034

Forward primer:

5'-GCAGGCTCAGCAAATGGTCAG-3'

Reverse primer:

5'-AGGTAGGTCCGCTCCACTG-3'

LAMA5 Accession #: NM_005560

Forward primer:

5'-CCCACCGAGGACCTTACTGC-3'

Reverse primer:

5'-GGTGTGCCTTGTGCTGTTGG-3'

CDH1 Accession #: NM_004360

Forward primer:

5'-GACCAGGACTATGACTACTTGAACG-3'

Reverse primer:

5'-ATCTGCAAGGTGCTGGGTGAACCTT-3'

PPARG Accession #:

NM_138712/NM_005037/NM_138711/NM_015869

Forward primer:

5'-TTGCTGTCATTATTCTCAGTGGA-3'

Reverse primer:

5'-GAGGACTCAGGGTGGTCAG-3'

S6 Accession #: NM_001010

Forward primer:

5'-TGGCAAGATGATCCCAATGA-3'

Reverse primer:

5'-AGCTTCTTGGGACACCTGCT-3'

Adhesion experiments

Global adhesion assay

IEC adhesion was estimated by performing a "global adhesion assay" that evaluated total IEC adhesion to their environment, i.e. adhesion to neighboring IEC and adhesion to matrix. IEC were cultivated on filters (12-well Transwell clear, 0.40 µm porosity, Corning) alone or in presence of EGC for 24 hours. IEC were then trypsinized with 0.01% trypsin-EDTA free (Sigma) allowing gentle trypsinization for 30 minutes at 37°C. Non-adherent IEC were harvested and counted in a blind fashion using Malassez slides (VWR international). IEC remaining adhered on filters were trypsinized

with 2.5% trypsin with EDTA (Gibco), harvested and counted. Results are expressed in percentage of remaining adherent IEC normalized to the total number of counted IEC (i.e., adherent IEC and non-adherent IEC). Only series were the percentage of IEC total adhesion in control condition was comprised between 20 and 70 % were analyzed.

Cell-to-matrix adhesion assay

IEC were cultivated on filters (12-well Transwell clear, 0.40 µm porosity, Corning) alone or in presence of EGC for 24 hours. IEC were then trypsinized for 10 minutes with a 2.5% trypsin-EDTA (Gibco). Trypsin was neutralized with IEC culture medium (see above). IEC were subsequently reseeded on filters and incubated for 3 hours at 37°C. Time of incubation has been defined to allow 50% of seeded IEC to adhere to filters in control condition. Following incubation, unseeded cells were harvested and counted in a blind fashion using Malassez slides (VWR international). IEC that had adhered on filters were trypsinized and counted. Results are expressed in percentage of adherent IEC normalized to the total number of counted IEC (i.e., adherent IEC and non-adherent IEC). Only series were the percentage of IEC total adhesion in control condition was comprised between 20 and 70 % were analyzed.

References

1. Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC: **Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005, **289**(1):G2-7.
2. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB: **Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts.** *Am J Physiol* 1999, **277**(2 Pt 1):C183-201.
3. Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J: **Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa.** *Physiol Rev* 2007, **87**(2):545-564.
4. Shao J, Sheng GG, Mifflin RC, Powell DW, Sheng H: **Roles of myofibroblasts in prostaglandin E2-stimulated intestinal epithelial proliferation and angiogenesis.** *Cancer Res* 2006, **66**(2):846-855.

5. Penna FJ, Peret LA, Vieira LQ, Nicoli JR: **Probiotics and mucosal barrier in children.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008, **11**(5):640-644.
6. Toumi F, Neunlist M, Cassagnau E, Parois S, Laboisse CL, Galmiche JP, Jarry A: **Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model.** *Neurogastroenterol Motil* 2003, **15**(3):239-242.
7. Xue J, Askwith C, Javed NH, Cooke HJ: **Autonomic nervous system and secretion across the intestinal mucosal surface.** *Auton Neurosci* 2007, **133**(1):55-63.
8. Ruhl A: **Glial cells in the gut.** *Neurogastroenterol Motil* 2005, **17**(6):777-790.
9. Savidge TC, Sofroniew MV, Neunlist M: **Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain.** *Lab Invest* 2007, **87**(8):731-736.
10. Neunlist M, Van Landeghem L, Bourreille A, Savidge T: **Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease.** *J Intern Med* 2008, **263**(6):577-583.
11. Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Ruhl A, Lardeux B, Savidge T et al: **Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, **292**(1):G231-241.
12. Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, Hurst R, Sofroniew MV: **Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione.** *Gastroenterology* 2007, **132**(4):1344-1358.
13. Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV: **Fulminant jejunio-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice.** *Cell* 1998, **93**(2):189-201.
14. Aube AC, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F, Liblau R, Galmiche JP, Neunlist M: **Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption.** *Gut* 2006, **55**(5):630-637.
15. Esccaffit F, Perreault N, Jean D, Francoeur C, Herring E, Rancourt C, Rivard N, Vachon PH, Pare F, Boucher MP et al: **Repressed E-cadherin expression in the lower crypt of human small intestine: a cell marker of functional relevance.** *Exp Cell Res* 2005, **302**(2):206-220.
16. Pecina-Slaus N: **Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells.** *Cancer Cell Int* 2003, **3**(1):17.
17. Lin S, Wang J, Ye Z, Ip NY, Lin SC: **CDK5 activator p35 downregulates E-cadherin precursor independently of CDK5.** *FEBS Lett* 2008, **582**(8):1197-1202.
18. Briggs MW, Sacks DB: **IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation.** *EMBO Rep* 2003, **4**(6):571-574.
19. Natale DR, Watson AJ: **Rac-1 and IQGAP are potential regulators of E-cadherin-catenin interactions during murine preimplantation development.** *Gene Expr Patterns* 2002, **2**(1-2):17-22.
20. Tzu J, Marinkovich MP: **Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins.** *Int J Biochem Cell Biol* 2008, **40**(2):199-214.
21. Turck N, Gross I, Gendry P, Stutzmann J, Freund JN, Kedinger M, Simon-Assmann P, Launay JF: **Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells.** *Exp Cell Res* 2005, **303**(2):494-503.
22. Kolachala VL, Bajaj R, Wang L, Yan Y, Ritzenthaler JD, Gewirtz AT, Roman J, Merlin D, Sitaraman SV: **Epithelial-derived fibronectin expression, signaling, and function in intestinal inflammation.** *J Biol Chem* 2007, **282**(45):32965-32973.
23. Borgono CA, Michael IP, Shaw JL, Luo LY, Ghosh MC, Soosaipillai A, Grass L, Katsaros D, Diamandis EP: **Expression and functional characterization of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14.** *J Biol Chem* 2007, **282**(4):2405-2422.
24. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD: **Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**(1):56-68.
25. Liu F, Chen Z, Wang J, Shao X, Cui Z, Yang C, Zhu Z, Xiong D: **Overexpression of cell surface cytokeratin 8 in multidrug-resistant MCF-7/MX cells enhances cell adhesion to the extracellular matrix.** *Neoplasia* 2008, **10**(11):1275-1284.
26. Chen L, Bush CR, Necela BM, Su W, Yanagisawa M, Anastasiadis PZ, Fields AP, Thompson EA: **RS5444, a novel PPARgamma agonist, regulates aspects of the differentiated phenotype in nontransformed intestinal epithelial cells.** *Mol Cell Endocrinol* 2006, **251**(1-2):17-32.
27. Lefebvre M, Paulweber B, Fajas L, Woods J, McCrary C, Colombel JF, Najib J, Fruchart JC, Datz C, Vidal H et al: **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells.** *J Endocrinol* 1999, **162**(3):331-340.
28. Mahoney ZX, Stappenbeck TS, Miner JH: **Laminin alpha 5 influences the architecture of the mouse small intestine mucosa.** *J Cell Sci* 2008, **121**(Pt 15):2493-2502.

29. Levy P, Robin H, Kornprobst M, Capeau J, Cherqui G: **Enterocytic differentiation of the human Caco-2 cell line correlates with alterations in integrin signaling.** *J Cell Physiol* 1998, **177**(4):618-627.
30. Takeichi M: **Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator.** *Science* 1991, **251**(5000):1451-1455.
31. Laprise P, Chailler P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ, Rivard N: **Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation.** *J Biol Chem* 2002, **277**(10):8226-8234.
32. Ku NO, Zhou X, Toivola DM, Omary MB: **The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease.** *Am J Physiol* 1999, **277**(6 Pt 1):G1108-1137.
33. Fath KR, Trimbur GM, Burgess DR: **Molecular motors are differentially distributed on Golgi membranes from polarized epithelial cells.** *J Cell Biol* 1994, **126**(3):661-675.
34. Tai AW, Chuang JZ, Sung CH: **Cytoplasmic dynein regulation by subunit heterogeneity and its role in apical transport.** *J Cell Biol* 2001, **153**(7):1499-1509.
35. Vachon PH, Simoneau A, Herring-Gillam FE, Beaulieu JF: **Cellular fibronectin expression is down-regulated at the mRNA level in differentiating human intestinal epithelial cells.** *Exp Cell Res* 1995, **216**(1):30-34.
36. Deschenes C, Alvarez L, Lizotte ME, Vezina A, Rivard N: **The nucleocytoplasmic shuttling of E2F4 is involved in the regulation of human intestinal epithelial cell proliferation and differentiation.** *J Cell Physiol* 2004, **199**(2):262-273.
37. Vachon PH, Cardin E, Harnois C, Reed JC, Vezina A: **Early establishment of epithelial apoptosis in the developing human small intestine.** *Int J Dev Biol* 2000, **44**(8):891-898.
38. Leeb SN, Vogl D, Grossmann J, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, Gelbmann CM: **Autocrine fibronectin-induced migration of human colonic fibroblasts.** *Am J Gastroenterol* 2004, **99**(2):335-340.
39. Goke M, Zuk A, Podolsky DK: **Regulation and function of extracellular matrix intestinal epithelial restitution in vitro.** *Am J Physiol* 1996, **271**(5 Pt 1):G729-740.
40. Howard TH, Hartwig J, Cunningham C: **Lymphocyte-specific protein 1 expression in eukaryotic cells reproduces the morphologic and motile abnormality of NAD 47/89 neutrophils.** *Blood* 1998, **91**(12):4786-4795.
41. Hines OJ, Ryder N, Chu J, McFadden D: **Lysophosphatidic acid stimulates intestinal restitution via cytoskeletal activation and remodeling.** *J Surg Res* 2000, **92**(1):23-28.
42. Walsh MF, Ampasala DR, Hatfield J, Vander Heide R, Suer S, Rishi AK, Basson MD: **Transforming growth factor-beta stimulates intestinal epithelial focal adhesion kinase synthesis via Smad- and p38-dependent mechanisms.** *Am J Pathol* 2008, **173**(2):385-399.
43. Nakajima A, Tomimoto A, Fujita K, Sugiyama M, Takahashi H, Ikeda I, Hosono K, Endo H, Yoneda K, Iida H et al: **Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity suppresses pancreatic cancer cell motility.** *Cancer Sci* 2008, **99**(10):1892-1900.
44. Kim KR, Choi HN, Lee HJ, Baek HA, Park HS, Jang KY, Chung MJ, Moon WS: **A peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist induces vimentin cleavage and inhibits invasion in high-grade hepatocellular carcinoma.** *Oncol Rep* 2007, **18**(4):825-832.
45. Schaefer KL, Takahashi H, Morales VM, Harris G, Barton S, Osawa E, Nakajima A, Saubermann LJ: **PPARgamma inhibitors reduce tubulin protein levels by a PPARgamma, PPARdelta and proteasome-independent mechanism, resulting in cell cycle arrest, apoptosis and reduced metastasis of colorectal carcinoma cells.** *Int J Cancer* 2007, **120**(3):702-713.
46. Fujisawa T, Nakajima A, Fujisawa N, Takahashi H, Ikeda I, Tomimoto A, Yonemitsu K, Nakajima N, Kudo C, Wada K et al: **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) suppresses colonic epithelial cell turnover and colon carcinogenesis through inhibition of the beta-catenin/T cell factor (TCF) pathway.** *J Pharmacol Sci* 2008, **106**(4):627-638.
47. Matthiessen MW, Pedersen G, Albrektsen T, Adamsen S, Fleckner J, Brynskov J: **Peroxisome proliferator-activated receptor expression and activation in normal human colonic epithelial cells and tubular adenomas.** *Scand J Gastroenterol* 2005, **40**(2):198-205.
48. Takaishi S, Sawada M, Seno H, Kayahara T, Morita-Fujisawa Y, Fukuzawa H, Chiba T: **Growth promoting effect of thioredoxin on intestinal epithelial cells.** *Dig Dis Sci* 2003, **48**(2):379-385.
49. Sheth SS, Bodnar JS, Ghazalpour A, Thippavong CK, Tsutsumi S, Tward AD, Demant P, Kodama T, Aburatani H, Lusis AJ: **Hepatocellular carcinoma in Txnip-deficient mice.** *Oncogene* 2006, **25**(25):3528-3536.
50. Takahashi Y, Masuda H, Ishii Y, Nishida Y, Kobayashi M, Asai S: **Decreased expression of thioredoxin interacting protein mRNA in inflamed colonic mucosa in patients with ulcerative colitis.** *Oncol Rep* 2007, **18**(3):531-535.
51. Rouault JP, Rimokh R, Tessa C, Paranhos G, Ffrench M, Duret L, Garoccio M, Germain D,

- Samarut J, Magaud JP: **BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes.** *Embo J* 1992, **11**(4):1663-1670.
52. Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR: **Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase.** *Nature* 1993, **365**(6444):349-352.
53. Mann DJ, Jones NC: **E2F-1 but not E2F-4 can overcome p16-induced G1 cell-cycle arrest.** *Curr Biol* 1996, **6**(4):474-483.
54. Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA: **Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**(3):802-806.
55. Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA: **Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth.** *Science* 1989, **245**(4919):752-755.
56. Xu C, Zhang J, Huang X, Sun J, Xu Y, Tang Y, Wu J, Shi Y, Huang Q, Zhang Q: **Solution structure of human peptidyl prolyl isomerase-like protein 1 and insights into its interaction with SKIP.** *J Biol Chem* 2006, **281**(23):15900-15908.
57. Obama K, Kato T, Hasegawa S, Satoh S, Nakamura Y, Furukawa Y: **Overexpression of peptidyl-prolyl isomerase-like 1 is associated with the growth of colon cancer cells.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**(1):70-76.
58. Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Duchrow M: **Proliferation marker pKi-67 affects the cell cycle in a self-regulated manner.** *J Cell Biochem* 2002, **87**(3):334-341.
59. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H: **Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.** *J Immunol* 1984, **133**(4):1710-1715.
60. Zheng JN, Ma TX, Cao JY, Sun XQ, Chen JC, Li W, Wen RM, Sun YF, Pei DS: **Knockdown of Ki-67 by small interfering RNA leads to inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human renal carcinoma cells.** *Life Sci* 2006, **78**(7):724-729.
61. Wang R, Luo D, Ma X, Yang W, Chen R, Liu Y, Meng L, Zhou J, Xu G, Lu YP et al: **Antisense Ki-67 cDNA transfection reverses the tumorigenicity and induces apoptosis in human breast cancer cells.** *Cancer Invest* 2008, **26**(8):830-835.
62. Abe Y, Matsumoto S, Wei S, Nezu K, Miyoshi A, Kito K, Ueda N, Shigemoto K, Hitsumoto Y, Nikawa J et al: **Cloning and characterization of a p53-related protein kinase expressed in interleukin-2-activated cytotoxic T-cells, epithelial tumor cell lines, and the testes.** *J Biol Chem* 2001, **276**(47):44003-44011.
63. Abe Y, Takeuchi T, Imai Y, Murase R, Kamei Y, Fujibuchi T, Matsumoto S, Ueda N, Ogasawara M, Shigemoto K et al: **A Small Ras-like protein Ray/Rab1c modulates the p53-regulating activity of PRPK.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **344**(1):377-385.
64. Horvath LG, Henshall SM, Kench JG, Saunders DN, Lee CS, Golovsky D, Brenner PC, O'Neill GF, Kooneer R, Stricker PD et al: **Membranous expression of secreted frizzled-related protein 4 predicts for good prognosis in localized prostate cancer and inhibits PC3 cellular proliferation in vitro.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(2):615-625.
65. Horvath LG, Lelliott JE, Kench JG, Lee CS, Williams ED, Saunders DN, Grygiel JJ, Sutherland RL, Henshall SM: **Secreted frizzled-related protein 4 inhibits proliferation and metastatic potential in prostate cancer.** *Prostate* 2007, **67**(10):1081-1090.
66. Carmon KS, Loose DS: **Secreted frizzled-related protein 4 regulates two Wnt7a signaling pathways and inhibits proliferation in endometrial cancer cells.** *Mol Cancer Res* 2008, **6**(6):1017-1028.
67. Lin R, Sun Y, Li C, Xie C, Wang S: **Identification of differentially expressed genes in human lymphoblastoid cells exposed to irradiation and suppression of radiation-induced apoptosis with antisense oligonucleotides against caspase-4.** *Oligonucleotides* 2007, **17**(3):314-326.
68. Martin CA, Panja A: **Cytokine regulation of human intestinal primary epithelial cell susceptibility to Fas-mediated apoptosis.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002, **282**(1):G92-G104.
69. Ray R, Chen G, Vande Velde C, Cizeau J, Park JH, Reed JC, Gietz RD, Greenberg AH: **BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites.** *J Biol Chem* 2000, **275**(2):1439-1448.
70. Crowley-Weber CL, Payne CM, Gleason-Guzman M, Watts GS, Futscher B, Waltmire CN, Crowley C, Dvorakova K, Bernstein C, Craven M et al: **Development and molecular characterization of HCT-116 cell lines resistant to the tumor promoter and multiple stress-inducer, deoxycholate.** *Carcinogenesis* 2002, **23**(12):2063-2080.
71. Tang SC: **BAG-1, an anti-apoptotic tumour marker.** *IUBMB Life* 2002, **53**(2):99-105.
72. Clemo NK, Arhel NJ, Barnes JD, Baker J, Moorgren M, Packham GK, Paraskeva C, Williams AC: **The role of the retinoblastoma protein (Rb) in the nuclear localization of BAG-1: implications for colorectal tumour cell**

- survival.** *Biochem Soc Trans* 2005, **33**(Pt 4):676-678.
73. Saad AF, Meacham WD, Bai A, Anelli V, Elojeimy S, Mahdy AE, Turner LS, Cheng J, Bielawska A, Bielawski J *et al*: **The functional effects of acid ceramidase overexpression in prostate cancer progression and resistance to chemotherapy.** *Cancer Biol Ther* 2007, **6**(9):1455-1460.
74. Strelow A, Bernardo K, Adam-Klages S, Linke T, Sandhoff K, Kronke M, Adam D: **Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor-induced cell death.** *J Exp Med* 2000, **192**(5):601-612.
75. Florian S, Wingler K, Schmehl K, Jacobasch G, Kreuzer OJ, Meyerhof W, Brigelius-Flohe R: **Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue.** *Free Radic Res* 2001, **35**(6):655-663.
76. Yan W, Chen X: **GPX2, a direct target of p63, inhibits oxidative stress-induced apoptosis in a p53-dependent manner.** *J Biol Chem* 2006, **281**(12):7856-7862.
77. Mhaidat NM, Thorne RF, de Bock CE, Zhang XD, Hersey P: **Melanoma cell sensitivity to Docetaxel-induced apoptosis is determined by class III beta-tubulin levels.** *FEBS Lett* 2008, **582**(2):267-272.
78. Kavallaris M, Burkhardt CA, Horwitz SB: **Antisense oligonucleotides to class III beta-tubulin sensitize drug-resistant cells to Taxol.** *Br J Cancer* 1999, **80**(7):1020-1025.
79. Geddes BJ, Wang L, Huang WJ, Lavellee M, Manji GA, Brown M, Jurman M, Cao J, Morgenstern J, Merriam S *et al*: **Human CARD12 is a novel CED4/Apaf-1 family member that induces apoptosis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **284**(1):77-82.
80. Lu C, Wang A, Wang L, Dorsch M, Ocain TD, Xu Y: **Nucleotide binding to CARD12 and its role in CARD12-mediated caspase-1 activation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **331**(4):1114-1119.
81. Gonzalez-Rey E, Delgado M: **Role of vasoactive intestinal peptide in inflammation and autoimmunity.** *Curr Opin Investig Drugs* 2005, **6**(11):1116-1123.
82. Trickett JI, Patel DD, Knight BL, Saggesson ED, Gibbons GF, Pease RJ: **Characterization of the rodent genes for arylacetamide deacetylase, a putative microsomal lipase, and evidence for transcriptional regulation.** *J Biol Chem* 2001, **276**(43):39522-39532.
83. Nakaya Y, Schaefer EJ, Brewer HB, Jr.: **Activation of human post heparin lipoprotein lipase by apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I).** *Biochem Biophys Res Commun* 1980, **95**(3):1168-1172.
84. Ho SY, Delgado L, Storch J: **Monoacylglycerol metabolism in human intestinal Caco-2 cells: evidence for metabolic compartmentation and hydrolysis.** *J Biol Chem* 2002, **277**(3):1816-1823.
85. Duncan M, Thomas AD, Cluny NL, Patel A, Patel KD, Lutz B, Piomelli D, Alexander SP, Sharkey KA: **Distribution and function of monoacylglycerol lipase in the gastrointestinal tract.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008, **295**(6):G1255-1265.
86. Bohley P, Seglen PO: **Proteases and proteolysis in the lysosome.** *Experientia* 1992, **48**(2):151-157.
87. Thapa N, Lee BH, Kim IS: **TGFBIp/betaig-h3 protein: a versatile matrix molecule induced by TGF-beta.** *Int J Biochem Cell Biol* 2007, **39**(12):2183-2194.
88. Pitts RL, Wang S, Jones EA, Symes AJ: **Transforming growth factor-beta and ciliary neurotrophic factor synergistically induce vasoactive intestinal peptide gene expression through the cooperation of Smad, STAT, and AP-1 sites.** *J Biol Chem* 2001, **276**(23):19966-19973.
89. Ruhl A, Franzke S, Collins SM, Stremmel W: **Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001, **280**(6):G1163-1171.
90. Wang L, Srinivasan S, Theiss AL, Merlin D, Sitaraman SV: **Interleukin-6 induces keratin expression in intestinal epithelial cells: potential role of keratin-8 in interleukin-6-induced barrier function alterations.** *J Biol Chem* 2007, **282**(11):8219-8227.

Table legends

Table 1. Up-regulated genes in IEC by EGC. Genes were identified as differentially expressed with Genespring. The percentage of increase of expression for each individual gene was calculated with the median of values obtained from the four individual microarrays for the condition with EGC at t=24 hours normalized to the median of values obtained for the condition without EGC at t=24 hours.

Table 2. Down-regulated genes in IEC by EGC. Genes were identified as differentially expressed with Genespring. The percentage of decrease of expression for each individual gene was calculated with the median of values obtained from the four individual microarrays for the condition with EGC at t=24 hours normalized to the median of values obtained for the condition without EGC at t=24 hours.

Table 3. Lists of differentially expressed genes involved in functional networks regulated in IEC by EGC. The expression data of the 116 genes identified following Genespring analysis were processed with Ingenuity software to generate biological networks. Ten networks were identified with 6 of them presenting a score superior than 20. The score displayed here is the rounded negative base-ten logarithm of a p-value that measures the likelihood of genes in a given network occurring by random chance. Fischer's exact test was used to calculate the p-value determining the probability that each network assigned to that data set is due to chance alone. A network score of 20 would have approximately a 10^{-20} chance of occurring randomly. To build networks, the application queries the Ingenuity Pathways Knowledge Base for physical and functional interactions between focus genes and all other genes (and gene products) stored in the knowledge base.

Table 4. Lists of differentially expressed genes involved in cellular and molecular functions regulated in IEC by EGC. The expression data of the 116 genes identified following Genespring analysis were processed with Ingenuity software to determine the cellular and molecular functions modulated by EGC in IEC. Twenty-five cellular and molecular functions were identified with 17 of them presenting a score superior than 2. The score displayed here is the rounded negative base-ten logarithm of a p-value that measures the likelihood of genes in a given function occurring by random chance.

Table 5. Lists of differentially expressed genes involved in signalling pathways regulated in IEC by EGC. Signalling pathways analysis identified the pathways from the Ingenuity Pathways Analysis library of pathways that were most significant to the data set, i.e. the 116 genes identified with Genespring. The ratio displayed here represents the number of genes from the data set that map to the pathway divided by the total number of genes that map to the studied pathway.

Table 6. IEC functions modulated by EGC and genes involved. Lists of genes whose expressions are modified by EGC and their implications in IEC functions. (A): cell adhesion; (B): cell differentiation; (C): cell motility; (D): cell proliferation; (E): cell death.

Figure legends

Figure 1. Hierarchical one-way clustering of expression data. Four individual microarrays were used per condition. Hierarchical one-way clustering was performed on genes using Gene Cluster. Each ratio was normalized to the median of the t=0 hour-condition values of the corresponding gene. Each column represents an individual array (T0: t=0 hour condition samples; T8control: t=8 hours of culture without EGC; T8glie: t=8 hours of culture in presence of EGC; T24control: t=24 hours of culture without EGC; T24glie: t=24 hours of culture in presence of EGC). Each line represents one individual gene. The clustering shows the impact of culturing time on gene expression profiling in Caco-2 cells. The EGC-induced modulation of IEC transcriptome is highly visible at t=24 hours.

Figure 2. EGC modulate IEC transcriptome. Real-time quantitative PCR studies on *CDH1* (n=5), *FNI* (n=7), *LAMA5* (n=6), *PPARG* (n=5) and *PTK2* (n=5) gene expression in IEC cultured for 24 hours alone (- EGC) or in presence of EGC (+ EGC) confirmed that EGC induced a significant increase in the level of expression of these genes ($p<0.05$; Mann-Whitney test).

Figure 3. Hierarchical two-way clustering of the 116 identified genes expression data. Four individual microarrays were used per condition. Hierarchical two-way clustering was performed on conditions and on the 116 genes identified as differentially expressed with Genespring. Each ratio was normalized to the median of the t=0 hour-condition values of the corresponding gene. Each column represents an individual array (T0: t=0 hour condition samples; T8control: t=8 hours of culture without EGC; T8glie: t=8 hours of culture in presence of EGC; T24control: t=24 hours of culture without EGC; T24glie: t=24 hours of culture in presence of EGC). Each line represents one individual gene. The clustering reveals clusters of genes with similar pattern of expression among the different conditions. The cluster also shows the distance between the five conditions demonstrating major changes induced by the culture with EGC at t=24hours.

Figure 4. EGC induced an increase in IEC adhesion. (A): EGC induced a significant increase in IEC total adhesion (i.e. without discriminating cell-to-matrix and cell-to-cell adhesion) after 24 hours of co-culture in presence of EGC (+ EGC) as compared to control (- EGC) ($n=5$; $p=0.008$; Mann-Whitney test). (B): IEC were significantly more attached to their matrix when they were cultured for 24 hours with EGC (+ EGC) as compared to control (- EGC) ($n=13$; $p<0.001$; Mann-Whitney test).

Table 1.

Gene Symbol	Genbank	Description	% up-regulation (/control)
TXNIP	NM_006472	thioredoxin interacting protein	217.60
ANKRD1	NM_014391	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	169.22
FN1	U42593	fibronectin 1	152.16
TUBB3	NM_006086	tubulin, beta 3	149.94
MGLL	AJ270950	monoglyceride lipase	135.97
METTL7A	NM_014033	methyltransferase like 7A	132.96
PKN2	NM_006256	protein kinase N2	128.33
	XM_166201	synonyms: KIAA0056, MGC104671; Homo sapiens KIAA0056 protein (hCAP-D3), mRNA.	
EPB41L2	NM_001431	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	110.50
AASS	AJ007714	amino adipate-semialdehyde synthase	110.15
ACTG2	NM_001615	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	102.56
B4GALT5	NM_004776	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5	102.38
SNX2	NM_003100	sorting nexin 2	102.38
VIP	NM_003381	vasoactive intestinal peptide	102.33
EIF4A2	NM_001967	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	102.14
	NM_019027	RNA-binding protein	101.66
POLR3F	NM_006466	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide F, 39 kDa	94.46
PNRC1	NM_006813	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	93.24
NPPB	NM_002521	natriuretic peptide precursor B	83.97
	BC017857	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4690793, with apparent retained intron.	
KRT8	NM_002273	keratin 8	81.96
SAT1	NM_002970	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1	80.24
ASS1	NM_000050	argininosuccinate synthetase 1	76.73
S100A11P	NM_021039		75.22
SLC7A7	NM_003982	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system), member 7	72.31
HAGH	NM_005326	hydroxyacylglutathione hydrolase	69.54
BNIP3L	AF536326	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	69.19
	AF195968	PRR5-ARHGAP8 fusion	68.01
BNIP3	NM_004052	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	67.84
IL18	NM_001562	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	67.14
RDM1	BC038301	RAD52 motif 1	67.11
FAM107B	NM_031453	family with sequence similarity 107, member B	65.70
PLAC8	NM_016619	placenta-specific 8	63.77
SMARCA1	NM_139035	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	63.72
PLOD2	NM_000935	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	62.87
TMSB4Y	NM_004202	thymosin, beta 4, Y-linked	62.77
SCPEP1	NM_021626	serine carboxypeptidase 1	60.96
LAMA5	NM_005560	laminin, alpha 5	60.53
LAMC1	NM_002293	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	59.89
METAP1	BC030054	methionyl aminopeptidase 1	59.55
IQGAP2	NM_006633	IQ motif containing GTPase activating protein 2	58.98
C1orf43	NM_015449	chromosome 1 open reading frame 43	56.86
CASP4	NM_001225	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	55.71
BTG1	NM_001731	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	54.63
SLC2A1	K03195	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	54.34
DCTN2	NM_006400	dynactin 2 (p50)	52.68
TOP2A	NM_001067	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	52.42
KRT18	NM_000224	keratin 18	51.16
LAMC1	M55210	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	50.37
PRC1	BC005140	protein regulator of cytokinesis 1	50.13
IMPDH2	NM_000884	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2	49.46
	AF202922	LRP16 protein	48.20
PLD3	NM_012268	phospholipase D family, member 3	46.99
RNF4	NM_002938	ring finger protein 4	44.88
	AC060225	Homo sapiens 3 BAC RP11-23J16 complete sequence.	
SMARCA1	NM_003069	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	41.18
DYNLT3	NM_006520	dynein, light chain, Tctex-type 3	40.06
PPARG	NM_015869	peroxisome proliferative activated receptor, gamma	38.92
GLRX	AF069668	glutaredoxin (thioltransferase)	37.78
PTK2	53831;NM_0	PTK2 protein tyrosine kinase 2	37.72
CDH1	NM_004360	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	36.87
RNASE4	NM_002937	ribonuclease, RNase A family, 4	31.40
CTSH	NM_004390	cathepsin H	29.45
MKI67	NM_002417	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	29.28
EIF2A	NM_032025	eukaryotic translation initiation factor 2A, 65kDa	26.54
TGFBI	BC000097	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	25.95
MLLT3	NM_004529	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3	
APOBEC3B	NM_004900	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	22.42
ADD3	NM_019903	adducin 3 (gamma)	20.82
FTH1	NM_002032	ferritin, heavy polypeptide 1	15.97

Table 2.

Gene Symbol	Genbank	Description	% down-regulation (/control)
CARD12	AF376061	caspase recruitment domain family, member 12	83.43
KLK14	NM_022046	kallikrein 14	62.46
FGFR2	NM_022970	fibroblast growth factor receptor 2	57.12
BDP1	NM_018429	B double prime 1, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor IIIB	56.58
SFRP4	NM_003014	secreted frizzled-related protein 4	55.26
C6	NM_000065	complement component 6	54.78
PRKCD	NM_006254	protein kinase C, delta	54.67
	XM_066534	Homo sapiens diacylglycerol kinase, kappa (DGKK), mRNA.	52.44
C20orf133	NM_001033086	chromosome 20 open reading frame 133	52.36
PRKCQ	NM_006257	protein kinase C, theta	50.50
CDK5R1	NM_003885	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	50.42
RPP40	NM_006638	ribonuclease P 40kDa subunit	47.41
SLC30A1	AF323590	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	46.22
TIMM8A	NM_004085	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A (yeast)	41.07
EBNA1BP2	NM_006824	EBNA1 binding protein 2	36.39
ITGAE	NM_002208	integrin, alpha E (antigen CD103, human mucosal lymphocyte antigen 1; alpha polypeptide)	36.17
NOL1	NM_006170	nucleolar protein 1, 120kDa	33.86
C6orf66	NM_014165	chromosome 6 open reading frame 66	33.81
NOL5A	NM_006392	nucleolar protein 5A (56kDa with KKE/D repeat)	33.30
BAG1	U46917	BCL2-associated athanogene	32.19
	AF123534	nucleolar protein NOP5/NOP58	32.14
ASAHI	AK025211	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1	29.98
TINAGL1	AF236150	tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	29.62
AADAC	NM_001086	arylacetamide deacetylase (esterase)	29.48
HSPA14	AF112210	heat shock 70kDa protein 14	29.34
PSMC6	NM_002806	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6	29.31
HNRPD1	D89678	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	28.40
SAMHD1	NM_015474	SAM domain and HD domain 1	28.12
TP53RK	NM_033550	TP53 regulating kinase	26.99
MARK2	NM_004954	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2	26.41
CCR9	NM_031200	chemokine (C-C motif) receptor 9	24.74
RGL1	NM_015149	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	24.20
E2F1	NM_005225	E2F transcription factor 1	23.90
PSMC1	NM_002802	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 1	23.75
IMP3	NM_018285	IMP3, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast)	23.48
RNU3IP2	BC023662	RNA, U3 small nucleolar interacting protein 2	23.41
SMAD3	NM_005902	SMAD, mothers against DPP homolog 3 (Drosophila)	21.49
GPX2	NM_002083	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	21.27
LSP1	NM_002339	lymphocyte-specific protein 1	21.21
FGG	NM_021870	fibrinogen gamma chain	18.37
C20orf94	NM_001009608	chromosome 20 open reading frame 94	16.04
PPIL1	NM_016059	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 1	14.74
HOXB2	NM_002145	homeobox B2	13.91
APOH	NM_000042	apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)	13.17
PRSS23	NM_007173	protease, serine, 23	10.41
IARS2	NM_018060	isoleucine-tRNA synthetase 2, mitochondrial	10.02

Table 3

Ingenuity® top functions	Genes list	Score
Cell-To-Cell Signaling and Interaction Cell Morphology Tissue Development	CDH1, FN1, ITGAE, KRT8, KRT18, MGLL, NPPB, PKN2, PPARG, PRKCD, PSMC1, PSMC6, PTK2, SAT, SMAD3, TGFB1, VIP	26
Cellular Growth and Proliferation Cancer Gene Expression	B4GALT5, BAG1, BNIP3 (includes EG:664), CCR9, DCTN2, EBNA1BP2, HCAP-D3, LSP1, MLLT3, PNRC1, PPIL1, PRC1, RNF4, SAT, SLC30A1, TP53RK	24
Cell Morphology Cellular Development Cardiovascular System Development and Function	AASS, ACTG2, BNIP3L, BTG1, CTSH, DYNLT3, EIF4A2, GLRX, MKI67, PLOD2, RNASE4, SLC2A1, SLC7A7, TXNIP	20
Cellular Movement Hematological System Development and Function Immune Response	APOBEC3B, ASAHI1, C6, FTH1, IL18, IQGAP2, LAMA5, LAMC1, NOL5A, NOP5/NOP58, PLD3, PRKCQ, PRSS23, SCPEP1	20
Cell Death Cancer Gastrointestinal Disease	APOH, ASS, BDP1, BTG1, CARD12, CASP4, E2F1, FGFR2, FGG, NOL1, RGL1, SMARCA1, SNX2, TOP2A	20
Cell Cycle Gastrointestinal Disease Developmental Disorder	ADD3, ANKRD1, CDK5R1, EPB41L2, GPX2, HNRPDL, HOXB2, IMPDH2, MARK2, PKN2, PLAC8, POLR3F, SFRP4, TUBB3	20
RNA Post-Transcriptional Modification	IMP3	2
RNA Post-Transcriptional Modification	EIF2A	2
Protein Trafficking Cellular Compromise Auditory and Vestibular System Development and Function	TIMM8A	1
RNA Post-Transcriptional Modification RNA Damage and Repair	RPP40	1

Table 4.

Ingenuity® cellular and molecular functions	genes list	score
RNA Post-Transcriptional Modification	NOP5/NOP58, NOL5A, EBNA1BP2, RNU3IP2, IMP3	5.17
Cell Death	GPX2, SAT, PRKCD, B4GALT5, TXNIP, TOP2A, CDH1, PKN2, ASAHI, LSP1, BNIP3L, NPPB, CDK5R1, ANKRD1, VIP, CASP4, GLRX, FGFR2, KRT18, BAG1, PRKCQ, BTG1, PPARG, C6ORF66, SLC2A1, CARD12, SMAD3, FTH1, LAMA5, PTK2, IL18, MLLT3, FN1, PLAC8, KRT8, TGFB1, BNIP3, E2F1, SFRP4	4.85
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	APOH, PRKCD, SMAD3, CDH1, PKN2, LAMA5, PTK2, VIP, IL18, FN1, FGG, KRT8, KRT18, BAG1, ITGAE, LAMC1, PPARG, TGFB1, E2F1	3.92
Cellular Development	SMAD3, PRKCD, CDH1, LAMA5, VIP, PTK2, IL18, CDK5R1, FGFR2, FN1, PLAC8, PRKCQ, LAMC1, PPARG, E2F1	3.92
Cell Morphology	SMAD3, PRKCD, CDH1, LAMA5, LSP1, DCTN2, VIP, IL18, PTK2, CDK5R1, FN1, KRT8, KRT18, PPARG, TGFB1, E2F1	3.88
Cellular Assembly and Organization	APOH, PRKCD, SMAD3, TOP2A, CDH1, DCTN2, EBNA1BP2, NPPB, PTK2, CDK5R1, HCAP-D3, FN1, FGG, KRT8, KRT18, MARK2, LAMC1, PPARG, BNIP3, E2F1	3.88
Carbohydrate Metabolism	FN1, B4GALT5, NPPB, PTK2, IL18	3.11
Cellular Movement	HOXB2, CCR9, C6, B4GALT5, SMAD3, PRKCD, MGLL, CDH1, LSP1, LAMA5, DCTN2, NPPB, CDK5R1, VIP, PTK2, IL18, FN1, BAG1, ITGAE, PPARG, TGFB1	3.08
Cellular Growth and Proliferation	SAT, PRKCD, TXNIP, SMAD3, CDH1, FTH1, LAMA5, SLC30A1, EBNA1BP2, VIP, IL18, PTK2, MLLT3, FGFR2, FN1, PLAC8, BAG1, PRKCQ, BTG1, LAMC1, PPARG, BNIP3, E2F1, SFRP4	3.05
Cell Cycle	HCAP-D3, FN1, TXNIP, PRKCD, TOP2A, DCTN2, PPARG, EBNA1BP2, E2F1, VIP	2.57
Molecular Transport	FGFR2, SAT, FN1, PRKCD, MGLL, BAG1, FTH1, PPARG, NPPB, PTK2, VIP, IL18	2.45
Nucleic Acid Metabolism	SAT, BAG1, NPPB, VIP	2.45
Small Molecule Biochemistry	APOH, SAT, PRKCD, B4GALT5, MGLL, FTH1, ASAHI, NPPB, PTK2, IL18, VIP, ASS, GLRX, FGFR2, FN1, BAG1, PPARG	2.45
Cellular Function and Maintenance	CCR9, SMAD3, CDH1, SLC30A1, PTK2, IL18, CDK5R1, FN1, FGG, KRT18, ITGAE, PPARG, BNIP3	2.25
DNA Replication, Recombination, and Repair	HCAP-D3, FN1, SMAD3, PRKCD, TOP2A, FTH1, DCTN2, EBNA1BP2	2.17
Gene Expression	APOH, SMAD3, PRKCD, CDH1, PKN2, VIP, IL18, FN1, BAG1, PRKCQ, RNF4, PPARG, E2F1	2.13
Cell Signaling	ASS, FN1, PRKCD, PPARG	2.02
Amino Acid Metabolism	ASS, FTH1	1.94
Cellular Compromise	PRKCD, KRT18, TIMM8A, PPARG, E2F1	1.94
Drug Metabolism	GLRX, FTH1, NPPB, IL18, VIP	1.94
Lipid Metabolism	FGFR2, APOH, SAT, FN1, MGLL, ASAHI, PPARG, NPPB, VIP	1.94
Post-Translational Modification	PRKCD, BAG1, PRKCQ	1.94
Protein Folding	BAG1	1.94
Protein Synthesis	BAG1, IL18	1.94
Vitamin and Mineral Metabolism	FGFR2, FTH1, PPARG	1.94

Table 5.

Ingenuity© Signalling Pathway	Genes	Ratio
Circadian Rhythm Signaling	VIP	0.046
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	SMAD3, E2F1	0.041
Integrin Signaling	ACTG2, FN1, LAMA5, LAMC1, PTK2	0.03
Actin Cytoskeleton Signaling	TMSB4Y, FGFR2, FN1, ITGAE, IQGAP2, PTK2	0.029
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	TOP2A	0.029
VEGF Signaling	ACTG2, PTK2	0.029
Complement and Coagulation Cascades	FGG, C6	0.028
Amyloid Processing	CDK5R1	0.028
ERK/MAPK Signaling	PRKCD, PPARG, PTK2	0.024
Wnt/β-catenin Signaling	CDH1, MARK2, SFRP4	0.022
FGF Signaling	FGFR2	0.018
Chemokine Signaling	PTK2	0.018
TGF-β Signaling	SMAD3	0.016
Protein Ubiquitination Pathway	PSMC6, PSMC1, BAG1	0.016
PPAR Signaling	PPARG	0.015
IGF-1 Signaling	PTK2	0.015
Apoptosis Signaling	PRKCQ	0.015
Neuregulin Signaling	CDK5R1	0.015
PTEN Signaling	PTK2	0.014
Fc Epsilon RI Signaling	PRKCD	0.014
T Cell Receptor Signaling	PRKCQ	0.014
Xenobiotic Metabolism Signaling	PRKCD, PRKCQ	0.010
NF-κB Signaling	PRKCQ	0.009
B Cell Receptor Signaling	PRKCQ	0.009
Ephrin Receptor Signaling	PTK2	0.009
Leukocyte Extravasation Signaling	PTK2	0.008
Huntington's Disease Signaling	CDK5R1	0.007
Axonal Guidance Signaling	PTK2	0.004

Table 6.

A	Pro-adhesive		Anti-adhesive	
Gene Symbol	Regulation of gene expression by EGC	Gene Symbol	Regulation of gene expression by EGC	
CDH1	up-regulated	CDK5R1	down-regulated	
IQGAP2	up-regulated	KLK14	down-regulated	
LAMA5	up-regulated			
LAMC1	up-regulated			
FN1	up-regulated			
PTK2	up-regulated			
KRT8	up-regulated			

B	Pro-differentiative		Anti-differentiative	
Gene Symbol	Regulation of gene expression by EGC	Gene Symbol	Regulation of gene expression by EGC	
CDH1	up-regulated	E2F1	down-regulated	
PPARG	up-regulated	BAG1	down-regulated	
LAMA5	up-regulated	CDK5R1	down-regulated	
PTK2	up-regulated	FN1	up-regulated	
DCTN2	up-regulated			
DYNLT3	up-regulated			

C	Pro-motility		Anti-motility	
Gene Symbol	Regulation of gene expression by EGC	Gene Symbol	Regulation of gene expression by EGC	
PPARG	up-regulated	LSP1	down-regulated	
FN1	up-regulated			
PTK2	up-regulated			

D	Pro-proliferative		Anti-proliferative	
Gene Symbol	Regulation of gene expression by EGC	Gene Symbol	Regulation of gene expression by EGC	
E2F1	down-regulated	TXNIP	up-regulated	
FGFR2	down-regulated	BTG1	up-regulated	
PPIL1	down-regulated	TP53RK	down-regulated	
MKI67	up-regulated	SFRP4	down-regulated	

E	Pro-apoptotic		Anti-apoptotic	
Gene Symbol	Regulation of gene expression by EGC	Gene Symbol	Regulation of gene expression by EGC	
BNIP3	up-regulated	BAG1	down-regulated	
CASP4	up-regulated	ASAHI	down-regulated	
CARD12	down-regulated	GPX2	down-regulated	
		TUBB3	up-regulated	

Figure 1.

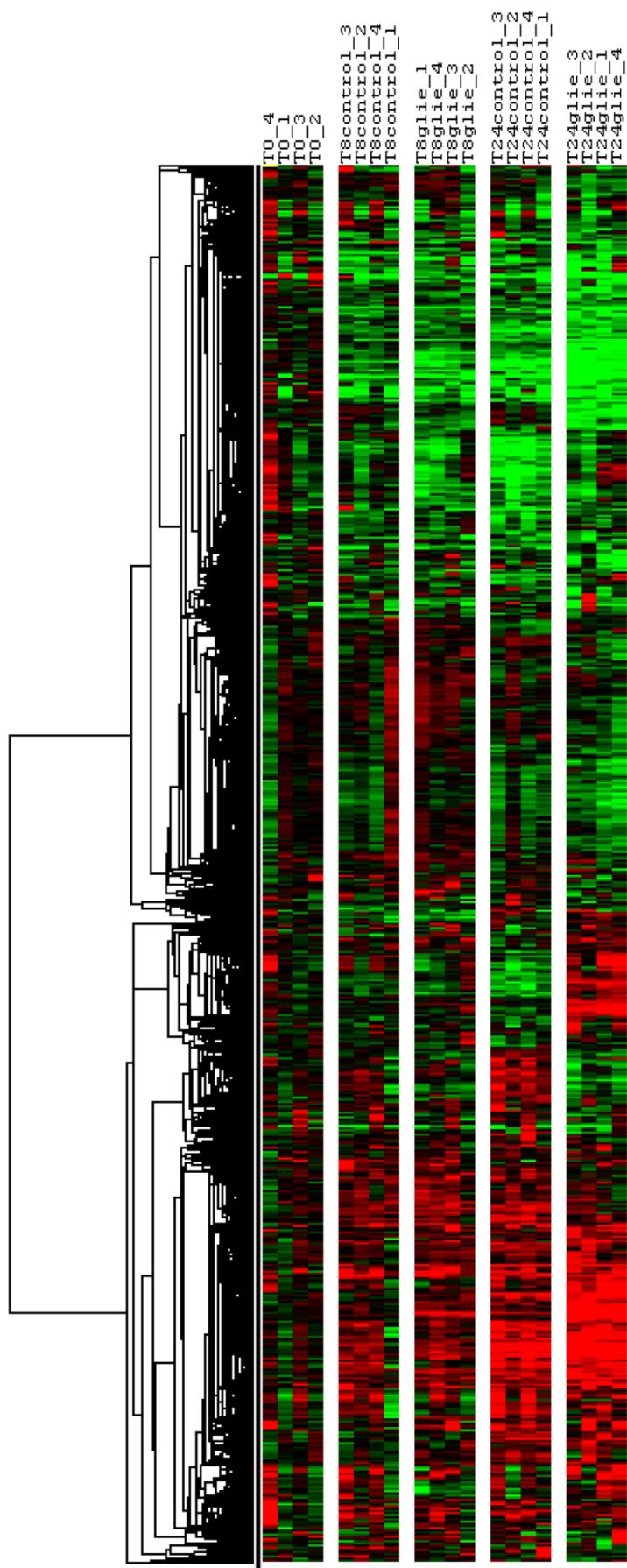


Figure 2

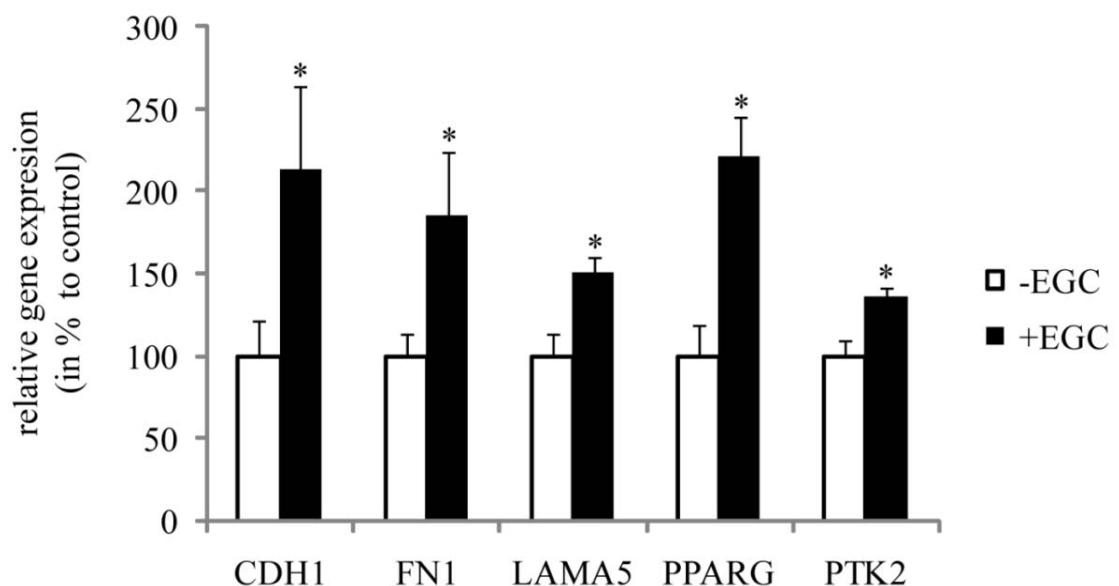


Figure 3.

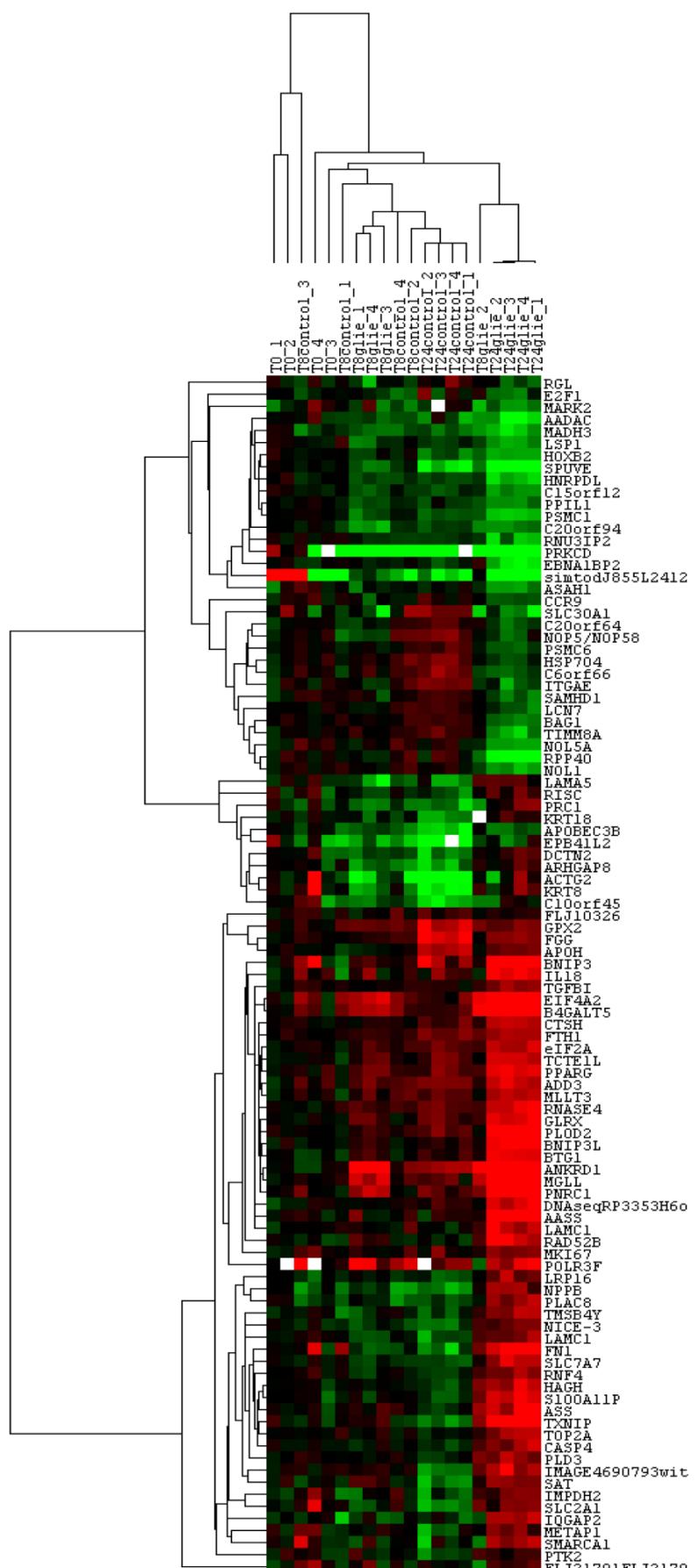
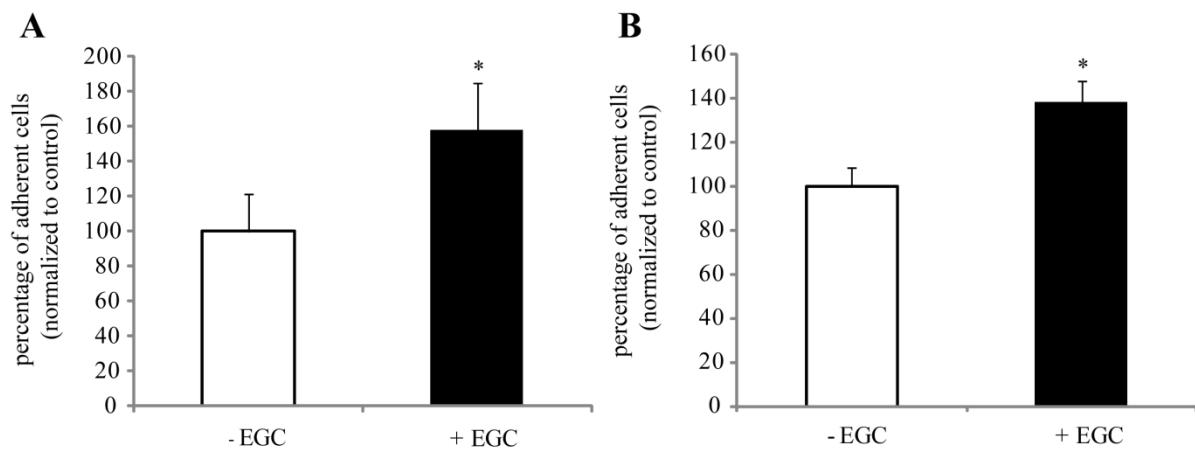


Figure 4



ARTICLE 3 :

LES CELLULES GLIALES ENTERIQUES FAVORISENT LA REPARATION DE LA BARRIERE EPITHELIALE INTESTINALE VIA L'ACTIVATION DE FAK ET LA LIBERATION DE PROEGF

La barrière épithéliale intestinale (BEI) est soumise à de nombreuses agressions en conditions physiologiques telles que les déformations de la paroi digestive liées au péristaltisme ou encore lors du passage du bol alimentaire. Les mécanismes de réparation de la BEI permettent d'assurer la continuité physique et le maintien des fonctions de la BEI, assurant ainsi la conservation de l'homéostasie intestinale. De récentes études montrent que les cellules gliales entériques (CGE) contrôlent d'importantes fonctions de la BEI. En effet, les CGE inhibent la prolifération des cellules épithéliales intestinales (CEI) et diminuent la perméabilité de la BEI (Neunlist et al., 2007; Savidge et al., 2007). Cependant, le rôle des CGE dans les processus de réparation de la BEI n'a pas été étudié. Le but de cette étude était donc de caractériser l'impact des CGE sur les processus de réparation de la BEI, de décrire dans les CEI les mécanismes et voies de signalisation cellulaires impliqués et d'identifier le(s) potentiel(s) médiateur(s) glial(ux) impliqué(s).

Tout d'abord, nous avons caractérisé les effets des CGE (lignée CRL2690) sur la réparation de la BEI *in vitro*. Dans ce modèle, les CEI (lignée Caco-2) étaient cultivées sur filtre Transwell pendant 15 jours post-confluence afin de permettre la différenciation de la monocouche épithéliale attestée par la mesure de la RET (résistance électrique transépithéliale). Des lésions circulaires étaient induites mécaniquement à l'aide d'une pipette munie d'un cône dans la monocouche de CEI. L'effet des CGE a été caractérisé en cultivant

RESULTATS

les monocouches altérées seules, en présence de CGE ou de milieu conditionné (MC) de CGE. La réparation était évaluée en mesurant l'aire de la surface des lésions et la RET de la monocouche. L'aire de la surface des CEI présentes dans les 5 premières couches cellulaires entourant chaque lésion a été évaluée. L'effet direct des CGE et de MC de CGE sur l'étalement de CEI cultivées en phase proliférative a été évalué. Enfin, l'effet d'une lignée non-transformée de CGE (JUG2), isolée dans notre laboratoire à partir de cultures primaires de système nerveux entérique de rat, sur les fonctions de réparation de la BEI et d'étalement des CEI a été caractérisé.

Nous avons ainsi montré que les CGE augmentaient la réparation des lésions de la BEI en mettant en évidence une augmentation de la vitesse de recouvrement des lésions associée à une augmentation de la RET des monocouches. Cet effet était reproduit par la lignée JUG2 ainsi que par le MC de CGE. L'aire de la surface cellulaire des CEI présentes aux abords des lésions était significativement augmentée dans les monocouches cultivées en présence de CGE comparées aux monocouches cultivées seules. Enfin, les CGE induisaient une augmentation majeure de l'étalement des CEI en phase proliférative reproduite par le MC de CGE et la lignée non-transformée JUG-2. Ces résultats montrent donc que les CGE augmentent la restitution épithéliale en partie *via* une induction de l'étalement des CEI.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à identifier les voies de signalisation mises jeu dans les CEI et responsables des effets des CGE sur la restitution épithéliale. Considérant le rôle majeur de la protéine kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) dans la régulation de la motilité des CEI, nous avons étudié l'implication de FAK dans l'induction gliale de la restitution épithéliale. Nous avons tout d'abord montré par Western blot que la phosphorylation de FAK sur la tyrosine 397, site d'autophosphorylation initiant l'activation de FAK, était augmentée dans les CEI cultivées en présence de CGE par rapport aux

contrôles, i.e. CEI cultivées seules. Nous avons ensuite évalué l'effet d'un inhibiteur de l'activation de FAK, PP2 (pyrazolopyrimidine-2) sur l'augmentation de la restitution épithéliale et de l'étalement des CEI induite par le MC des CGE. L'ajout de PP2 au MC des CGE inhibait l'augmentation de la réparation des lésions et de l'étalement des CEI. Nous avons validé ces résultats en utilisant FRNK (FAK-related non kinase), le dominant négatif de FAK. L'effet des CGE sur l'étalement des CEI était inhibé dans les cellules transfectées avec FRNK. Parallèlement à l'augmentation de l'activité de FAK, l'expression de l'ARNm et de la protéine FAK était également augmentée dans les CEI cultivées en présence de CGE ou de MC de CGE. L'infection de CEI par des particules lentivirales FAK-shRNA inhibait l'effet des CGE sur l'étalement des CEI. Ces résultats démontrent que les CGE induisent la restitution épithéliale et l'étalement cellulaire *via* l'augmentation de l'expression et de l'activité de FAK.

Ces résultats suggèrent donc que les CGE régulent l'expression de FAK dans les CEI. Nous avons validé cette observation chez l'homme, *ex vivo*, en identifiant une corrélation positive entre l'expression de l'ARNm du marqueur glial S-100 β et de FAK dans des biopsies de muqueuse colique humaine. De plus, dans un modèle murin transgénique, nous avons aussi montré que l'ablation sélective des CGE entraînait une diminution de l'expression de l'ARNm de FAK dans les fragments iléo-jéjunaux.

Finalement, dans une dernière partie, nous avons cherché à identifier le(s) médiateur(s) glial(ux) sécrété(s) responsable(s) de l'induction de la restitution épithéliale et de l'étalement cellulaire. Nous avons en premier lieu montré que les effets des CGE sur l'étalement des CEI et la restitution épithéliale étaient médiés par une voie EGFR-dépendante (Epidermal Growth Factor Receptor). En effet, l'addition d'un anticorps bloquant anti-EGFR au MC des CGE inhibait l'induction de la restitution épithéliale et de l'étalement des CEI. De

plus, l'ajout d'un anticorps neutralisant de l'EGF (Epidermal Growth Factor) au MC des CGE bloquait également l'induction de l'étalement des CEI. De façon intéressante, l'ajout d'un inhibiteur général des MMPs (GM6001) entraînait également une inhibition de l'effet du MC des CGE sur l'étalement des CEI, suggérant la présence d'une forme précurseur du médiateur recherché. Le proEGF, forme précurseur de l'EGF, induisait une augmentation de la restitution épithéliale ainsi que de l'étalement des CEI. Cette induction de l'étalement des CEI médiée par le proEGF était inhibée par l'addition de GM6001. L'EGF reproduisait également l'effet des CGE sur la restitution et l'étalement des CEI.

Enfin, nous avons montré que l'ARNm de l'EGF était exprimé dans les CGE. Au niveau protéique, le proEGF a été détecté dans les lysats cellulaires de CGE et dans le MC des CGE, contrairement à l'EGF qui n'était pas détecté.

En conclusion, ce travail a permis d'identifier une nouvelle fonction des CGE dans le contrôle de la BEI. En effet, les CGE favorisent la réparation de la BEI en induisant la restitution épithéliale *via* l'augmentation de l'étalement des CEI. Le contrôle glial de la réparation de la BEI fait intervenir des voies dépendantes de l'activité et de l'expression de FAK, cible majeure des CGE dans les CEI. Par ailleurs, la voie EGFR-dépendante est également impliquée dans la réponse des CEI aux CGE. Enfin, un des résultats majeurs de ce travail est l'identification du proEGF comme étant un médiateur libéré par les CGE et induisant la restitution épithéliale. Cette étude suggère aussi qu'une altération du réseau glial pourrait jouer un rôle dans des pathologies intestinales associées à des altérations des processus de réparation de la barrière telles que les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) ou encore lors de cancers colorectaux (CCR).

PERIPHERAL GLIA PROMOTES EPITHELIAL WOUND HEALING VIA ACTIVATION OF FAK AND RELEASE OF PROEGF

**Laurianne Van Landeghem^{1,2,3}, Julien Chevalier^{1,2,3}, Tor Savidge⁴, Pascal Derkinderen^{1,2,3},
Michel Neunlist^{1,2,3}**

From **INSERM U913¹, Université de Nantes- Faculté de Médecine², CHU Nantes- Institut des
Maladies de l'Appareil Digestif³
Nantes, 44000, France**

**University of Texas Medical Branch, Department of Gastroenterology & Hepatology⁴,
Galveston, TX 77555, USA**

Running Head: Enteric glia promotes intestinal wound healing

**Address correspondence to: Michel NEUNLIST, PhD, INSERM U913, CHU Hôtel Dieu, 1, place
Alexis Ricordeau, 44035 Nantes, France. Tel: +33(0)240087515. Fax: +33(0)240087506. E-mail:
Michel.neunlist@univ-nantes.fr**

Wound repair of the intestinal mucosa is crucial for the maintenance of the intestinal epithelial barrier (IEB) and gut homeostasis. Peripheral enteric glial cells (EGC) play a major role in regulating various IEB functions but their role in IEB repair processes is unknown. Using a mechanical-induced injury model of IEB, we first showed that epithelial restitution was significantly increased by EGC or EGC-conditioned medium (EGC-CM). The EGC-induced restitution was associated with a significant increase in intestinal epithelial cell (IEC) spreading. Using of chemical inhibitors, dominant-negative mutants and shRNA, we showed that EGC effects upon IEB restitution and cell spreading were mediated by FAK-dependent pathways. Furthermore, *in vivo* deletion of EGC in mice reduced mucosal FAK mRNA expression. Finally, we identified proEGF as a glial-derived mediator enhancing IEB restitution via an EGFR-dependent pathway. In conclusion, our data suggest that EGC are a crucial novel cellular regulator of IEB repair processes.

In complex and highly organized organisms, local cellular microenvironments are crucial for the appropriate development and functions of specialized tissues. These microenvironments are generated and maintained by cellular permeability barriers, such as blood brain barrier (BBB), or the intestinal epithelial barrier (IEB). Maintenance of the integrity of these barriers is of outmost importance in maintaining bodily functions.

Wound healing or mucosal healing is a cellular mechanism that preserves the structural and functional integrity of the IEB. Wound

repair of the intestinal mucosa is comprised of three processes that include epithelial restitution, cell proliferation and differentiation (1). Although these three processes overlap *in vivo* (1), it is well known that the most rapid cellular event following tissue injury is epithelial restitution (2). Epithelial restitution is a mechanism that restores mucosal continuity by redistributing cells via cell spreading and migration on the underlying matrix (2).

Focal Adhesion Kinase (FAK) is an upstream regulator of several different pathways controlling cell motility, cell proliferation and cell survival. FAK represents, along with proline-rich kinase-2 (PYK2), the FAK-family of non-receptor protein tyrosine kinases. One mode of FAK regulation that has been well described is its autophosphorylation on tyrosine 397 following integrin clustering. FAK phosphorylation on tyrosine 397 promotes Src binding, resulting in conformational activation of the FAK-Src signaling complex. The FAK/Src signaling complex then recruits or phosphorylates several regulatory proteins involved in cell adhesion, motility, growth and survival (3,4).

Several studies have shown that the gut cellular microenvironment can influence epithelial restitution of the IEB. For example, neutrophils play a major role in promoting wound repair (5). Intestinal subepithelial myofibroblasts can also promote epithelial restitution via the release of growth factors, matrix molecules and activation of metallo-matrix proteinases (MMPs) (6,7). Interestingly, it has been also suggested that extrinsic primary afferent neurons could promote intestinal mucosal repair as calcitonin-gene-related peptide (CGRP), a neurotransmitter released by primary

afferent neurons, enhances epithelial restitution via activation of mast cells (8,9).

Another major cellular component of the IEB microenvironment is the enteric nervous system (ENS). The ENS is composed of enteric neurons and glial cells (EGC) organized into an integrative neuronal network localized all along the gastrointestinal (GI) tract. Although its role in the control of GI motility is well known, emerging data suggest that the ENS can also be a major regulator of IEB functions. In particular, enteric neurons can directly inhibit IEC proliferation via the liberation of vasoactive intestinal peptide (VIP) (10). Moreover, VIPergic neuronal pathways have been shown to reduce IEB paracellular permeability, possibly by increasing zonula occludens-1 (ZO-1) expression in IEC (11).

Besides the role of neurons in the control of IEB functions, special consideration has been recently given to EGC. Indeed, EGC, which outnumber enteric neurons by a factor of 4 to 10, share common markers and properties with astrocytes of the central nervous system (CNS) (12,13), which are known to promote BBB functions (14). Furthermore, recent studies have shown that EGC are involved in the maintenance of the IEB functions. Indeed, *in vivo* specific ablation of EGC in transgenic mice leads to dramatic IEB alterations (15) associated with increased IEB permeability even in absence of intestinal inflammation (16,17). Furthermore, EGC inhibit IEC proliferation via the release of TGF- β 1 (18) and decrease IEB permeability via the secretion of S-nitrosoglutathione (GSNO) (17). Nevertheless, whether EGC also control epithelial restitution and the putative mediator(s) involved remain currently unknown.

Therefore, in the present study, we aimed to characterize the role of EGC in the regulation of epithelial restitution, the cellular mechanisms and the glial factor(s) involved by using a non-contact co-culture model system. We have demonstrated that EGC promote epithelial restitution following a mechanical-induced injury by increasing cell spreading. We have also shown that EGC enhance IEB wound healing via the liberation of proEGF and the activation of FAK-dependent pathways in IEC.

Experimental Procedures

Cell cultures and reagents- Two different EGC lines were used: CRL2690 (ATCC) and JUG2

(INSERM U913). JUG2 cell line was obtained from ENS primary culture derived from rat embryonic intestine (19). After 13 days of culture, primary cultures were trypsinized and seeded in serum-containing media after differential centrifugation. Following 7 days of culture, isolated areas of morphological glial cells-like were trypsinized using cloning cylinder and seeded in culture flask in serum-containing media. After 1 month, the cells were immunoreactive for glial but not for neuronal or myofibroblast markers. EGC lines and Caco-2 cells (ATCC) were cultured in DMEM (4.5 g/L glucose; Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS (Abcys), 2mM glutamine (Invitrogen), 50 IU/mL penicillin (Invitrogen) and 50 μ g/mL streptomycin (Invitrogen). EGC were cultured for 24 hours after confluence prior to studying their effects on epithelial restitution and spreading. EGC-CM was obtained from collecting and centrifugating EGC supernatants. Caco-2 cells were seeded onto porous Transwell filters (6-well and 12-well Transwell clear, 0.40 μ m porosity, Corning). For wound healing experiments, Caco-2 cells were seeded onto 6-well filters at 286000cells/mL and cultured for 15 days after reaching confluence prior to wounding. For cell spreading, Caco-2 cells were seeded onto 12-well filters at 140000cells/mL and processed for experiments 1 day after their seeding. Caco-2 cells seeded on filters were cultured in presence of EGC seeded at the bottom of 6-well or 12-well plates or in presence of either EGC-CM, PP2 (Calbiochem), GM6001 (Millipore), EGFR blocking antibody (Calbiochem), EGF blocking antibody (R&D Systems), hEGF (Sigma), rEGF (R&D Systems), hproEGF (R&D Systems).

Plasmid transfection- Caco-2 cells were transfected with FRNK plasmid construct fused with GFP (FRNK/GFP; kindly provided by Dr. Hervé Enslen), or with the empty vector as a control (mock/GFP). IEC were transfected on 6-well filters once reaching 30-40% confluence using Lipofectamine LTX and Reagent Plus system (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol using 3 μ g/well of DNA equally distributed between the apical and basolateral compartments for 6 hours. Cell spreading experiments were carried out 24 hours later. For cell spreading analysis, GFP-positive cells transfected with FRNK/GFP were assumed to express FRNK and results were opposed to the

results obtained with mock/GFP-transfected cells.

Lentiviral shRNA PTK2 infection of Caco-2 cells- In order to silence FAK gene, also called PTK2, expression, 2.5×10^4 Caco-2 cells were plated onto 6 wells plate and grown for 24 hours with complete culture medium. Cells were washed twice with PBS 30 minutes prior the infection. 2.5×10^4 PTK2 shRNA lentiviral particles (SHVRS- NM_005607, Sigma) were added in each well and cells were then incubated for 24 hours. Five different clones of PTK2 shRNA and a non-specific target shRNA control were tested. Solution containing viral particles was removed and replaced by fresh complete medium. Caco-2 cells were trypsinized 5 days post infection and plated in culture flasks. Cells were next selected by adding 50 µg/mL puromycin (Sigma) to the culture medium. PTK2 expression levels in the different clones were measured by Western blot. Only the results obtained with cells derived from the clone presenting 50% of PTK2 expression silencing are reported in the present study.

Wound healing experiments- Caco-2 monolayers were subjected to an induction of a small uniform circular wound using a tip attached to a 0.5-10 µL pipette. The tip was applied gently to the monolayer and suction was applied with the pipette. Each hole was photographed at 0 and 24 hours post wounding using a phase contrast microscope (Axiovert 200M; Zeiss; objective lense: A-plan x5/0.12). Images were taken using a digital camera (Axiocam MRm; Zeiss) connected to a PC equipped with Axiovision (Zeiss). Wounded area surfaces were evaluated using DP-Soft software (Olympus). Taking into consideration the variability of the initial wounded zones areas, epithelial restitution was calculated as the percentage of remaining wounded zone area as follows: $100 - [100 \times (\text{Initial wounded zone surface} - \text{Final wounded zone surface}) / \text{Initial wounded zone surface}]$. The monolayers were placed into experimental conditions 24 hours before wounding. After replacement of half of medium volume, monolayers were wounded and cultured for 24 additional hours. TER of monolayers was measured with an EVOM resistance meter (World Precision Instruments) and calculated by subtracting the electrical resistance of a blank insert, i.e. naked filter, from the measured value.

Time-laps videos were taken using a microscope (Leica DMI6000; Leica

Microsystems; objective lense: HCX FN plan x5/0.12) at 37°C – CO_2 5% in the culture medium described above. Images were taken with a camera (Coolsnap HQ2; Photometrics) and Metamorph software (Molecular Devices). The images stacks were compiled using Metamorph.

Cell spreading experiments- Caco-2 cells were seeded onto Transwell filters at low density. Cell migration through filters was not allowed by the filter porosity. After 24 hours of culture, filters-grown cells were fixed and processed for an immunohistochemical staining to detect ZO-1 used here to determine the apical cell surface area as described in Neunlist et al., 2007. Monolayers were mounted and viewed with a fluorescence microscope (BX 51; Olympus; CY3; objective lense: UP plan FL x40/0.75) connected to a video camera (DP50, Olympus). Apical cell surface area was measured with DP-Soft software (Olympus). An average of 321.1 ± 12.5 IEC surface area was analyzed for each experimental condition.

Time-laps videos were taken using a microscope (Leica DMI6000; Leica Microsystems; objective lense: N Plan x10/0.25) at 37°C – CO_2 5% in the culture medium described above. Images were taken with a camera (Coolsnap HQ2; Photometrics) and Metamorph software (Molecular Devices). The images stacks were compiled using Metamorph.

Transgenic mice model- 12-week-old GFAP-HSVtk transgenic mice were used after genotyping a tail biopsy specimen by PCR analysis as described by Bush et al., 1998 (15). For conditional ablation of EGC, ganciclovir (Hoffman-LaRoche,) was administered subcutaneously at a rate of 100 mg/kg/day using mini-osmotic pumps (Alzet, Durect Corp) for 7 days. Intestinal tissues were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . All procedures were performed with Institutional Animal Care and Use Committee approval and in accordance with the National Institutes of Health guidelines for use of live animals.

Human colonic biopsies specimens- Mucosal biopsies were taken from 6 patients (aged 64-86 years) with colonic adenocarcinoma, at distance from the tumor in a macroscopically healthy area during flexible sigmoidoscopy or colonoscopy. Biopsies were placed in RNA extraction buffer (Qiagen) and immediately stored at -80°C . Patients gave their informed consent to take part

in the study and all procedures were performed with Institutional Approval.

RT-qPCR studies- Extraction of total RNA was performed with RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. 1 μ g of purified total RNA was processed for reverse transcription using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. FAK mRNA expression study in Caco-2 cells after 24 hours of culture in presence of EGC or EGC-CM was carried out on a Rotor-Gene thermocycler (Ozyme). PCR amplifications were performed using Platinum Taq Polymerase kit (Invitrogen) combined with the use of SYBR green (Sigma). FAK mRNA expression study in ileo-jejunal fragments of transgenic mice was achieved by using a MyiQ thermocycler (Biorad). PCR amplifications were performed using the Absolute Blue SYBR green fluorescein kit (ABgene).

Western Blot studies- Caco-2 cells cultured for 24 hours with/without EGC or EGC were lysed either with RIPA (Millipore) completed with proteases inhibitor tablets (Complete, Roche) or processed for Triton-X fractionation. For Triton-X fractionation, cells were lysed with Triton-Lysis-Buffer (1% Triton X-100, 0.3M sucrose, 25mM HEPES, 100mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgCl₂) containing proteases inhibitor (Complete, Roche), serine/threonine phosphatases inhibitors (Sigma) and 2mM NaVO₄. After agitation, insoluble material was removed by centrifugation and supernatant was defined as the Triton-X-soluble fraction (protocol adapted from Fouquet et al., 2004 (20)). The pellet was extracted with a SDS-Lysis-Buffer (20mM Tris-HCl, 2.5mM EDTA, 1% SDS, 0.5 μ g/mL DNaseI) completed with proteases/phosphatases inhibitor and NaVO₄. Triton-X-insoluble fraction was obtained after agitation and removal of insoluble material by centrifugation. Samples were processed for electrophoresis using NuPAGE MES SDS Buffer Kit (Invitrogen) and separated on 4-12% Bis-Tris Gels (NuPAGE, Invitrogen). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes. After blocking, blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBS with 5% non-fat dry milk for FAK (clone 4.47, 1:1000, Upstate), FAKc20 (1:200, Santa Cruz), Cyclophilin-A (1:5000, Abcys), RPS6 (1:1000; Bethyl), rEGF (16 μ g/ml, R&D Systems) or in TBS with 4% BSA and 0.1% Tween20 for FAK

phosphospecific antibody (phosphorylated Y397-FAK) (1:1000; Biosource). Immunoblots were probed with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) and visualized by chemiluminescence (ECL plus, Amersham). Quantitative analysis was performed by measuring band densities with ImageJ.

Statistics- Data were expressed as the mean \pm SEM. A paired or unpaired t-test, a Mann-Whitney test, a one-way analysis of variance (ANOVA) or two-way ANOVA on repeated measures were performed to compare different groups. Differences were considered as significant for a p-value inferior to 0.05.

Online Supplemental Material- Video 1 shows the EGC-CM-mediated increase in epithelial restitution in mechanical-injured Caco-2 cells monolayers. Video 2 shows an increase in cell spreading when proliferative Caco-2 cells are cultured with EGC-CM.

RESULTS

Enteric glial cells promote epithelial restitution by increasing intestinal epithelial cell spreading.

EGC increase intestinal epithelial wound healing in vitro. Epithelial restitution in injured Caco-2 intestinal epithelial monolayers was evaluated by measuring the wounded area after 24 hours of incubation with or without EGC and comparing it to the corresponding initial wounded area. Wounded areas were significantly reduced when the IEC monolayers were cultured with EGC as compared to controls (IEC monolayers cultured alone) ($19.2\% \pm 1.1$ vs. $31.7\% \pm 1.8$, respectively; n=7; p=0.003) (Figs. 1A & B and Video 1). In addition, the increase of monolayers transepithelial electrical resistance (TER) was significantly greater when IEC were cultured in the presence of EGC as compared to controls ($257.6\% \pm 41.3$ vs. $100.0\% \pm 20.3$, respectively; n=7; p=0.007) (Fig. 1C). These results were reproduced using another non-transformed EGC line (JUG2) (Figs. 1D & E) as well as another IEC line (T84) (unpublished data). In addition, the EGC-induced increase of epithelial restitution and resistance recovery were reproduced by EGC-CM (Figs. 1B & C). These results suggest that EGC can increase epithelial wound repair via the secretion of one or more soluble factors.

EGC promote epithelial restitution by increasing IEC spreading. We next sought to

determine whether EGC effects on epithelial restitution were associated with an increase in IEC spreading. Under control conditions, a significant increase of IEC spreading was recorded in the first 3 circumferential cell layers surrounding the wounded zone as compared to the fifth cell layer (Fig. 2A). EGC or EGC-CM significantly increased IEC surface areas of the first 3 circumferential cell layers as compared to controls (i.e. IEC monolayers cultured alone) (Fig. 2A).

To confirm that EGC promoted IEC spreading, the direct effect of EGC on IEC spreading was studied using Caco-2 cells seeded at low density. After 24 hours of incubation, EGC significantly increased Caco-2 cell spreading as compared to controls ($220.9\% \pm 9.2$ vs. $100.0\% \pm 2.2$, respectively; n=4; p≤0.001) (Figs. 2B & C and Video 2). This result was also reproduced by EGC-CM (Fig. 2C) or using JUG2 (Fig. 2D).

Enteric Glial Cells promote epithelial wound healing via activation of FAK-dependent signaling pathways.

FAK is a major regulator of epithelial wound healing. We therefore studied whether EGC promote IEB wound repair by activating FAK-dependent pathways.

EGC increase epithelial wound repair by increasing FAK activity in IEC.

Firstly, we demonstrated that EGC induced a significant increase in Y397-FAK phosphorylation in Triton-X-soluble as well as insoluble IEC lysate fractions (Fig. 3A). We then evaluated the effects of the inhibition of FAK activity on both EGC-induced epithelial restitution and IEC spreading using PP2, a pharmacological inhibitor of Src-mediated activation of FAK. When combined with EGC-CM, PP2 inhibited EGC-CM effects on epithelial restitution as compared to control (i.e. treatment with EGC-CM alone) ($31.6\% \pm 16.1$ vs. $100.0\% \pm 11.4$, respectively; n=6; p=0.006). Consistently, the effects of EGC-CM on IEC spreading were also significantly inhibited in presence of PP2 (Fig. 3B). To further study the role of FAK activity in EGC-mediated cell spreading, we performed experiments using Caco-2 cells transfected with the dominant-negative construct of FAK, FRNK (FAK-related non kinase) fused to GFP. Under these conditions, EGC-induced cell spreading was significantly reduced in FRNK/GFP-positive cells as compared to control cells, i.e.

mock/GFP-positive cells ($64.1\% \pm 7.5$ vs. $94.2\% \pm 9.2$, respectively; n=5; p=0.035) (Fig. 3C).

EGC control epithelial restitution via the regulation of FAK expression

→ *EGC increase IEC spreading by increasing FAK expression in vitro.* We next aimed at determining whether EGC-mediated wound healing was associated with a regulation of FAK expression. We first showed that the presence of EGC significantly increased FAK protein level in both Triton-X-soluble and insoluble IEC lysate fractions as compared to control (Fig. 4A). This increase in FAK protein level was associated with a significant increase in FAK mRNA expression (Fig. 4B). Furthermore, this result was reproduced by EGC-CM (Fig. 4B). Next, the involvement of FAK in the EGC effects on IEC spreading was evaluated by using Caco-2 cells infected with FAK shRNA lentiviral particles. The silencing of FAK expression markedly reduced the EGC-CM-mediated induction of IEC spreading compared to non-specific target shRNA transfected cells ($74.0\% \pm 4.5$ vs. $94.7\% \pm 4.8$, respectively; n=4; p=0.013) (Fig. 4C).

→ *EGC control FAK expression in vivo.* In order to further validate the EGC-mediated control of FAK expression, we studied FAK mRNA expression in intestinal segments of EGC-genetically deleted mice. In transgenic mice intestine, we showed a significant decreased FAK mRNA expression compared to their non-transgenic littermates ($70.9\% \pm 5.0$ (n=7) vs. $100.0\% \pm 10.6$ (n=5), respectively; p=0.021) (Fig. 4D). We next sought to determine in human colonic mucosal biopsies whether there was a correlation between EGC (using S-100 β , a protein specifically expressed in glial cells) and FAK expression. We found a significant positive correlation between the expressions of FAK mRNA and S-100 β mRNA (Fig. 4E).

Enteric glial cells promote wound healing via the activation of EGFR-dependent pathways and the secretion of proEGF.

The involvement of EGF (Epidermal Growth Factor) / EGFR (Epidermal Growth Factor receptor) pathways has been shown to be involved in the induction of cell motility in various epithelial cell lines.

Inhibition of EGFR and neutralization of EGF inhibit EGC-CM effects on epithelial restitution. We therefore first studied whether EGFR pathway was involved in the IEC response to EGC. Addition of an EGFR blocking

antibody to EGC-CM significantly inhibited the EGC-CM-mediated effects on epithelial restitution (Fig. 5A) and on IEC spreading (Fig. 5B). Furthermore, addition of an EGF blocking antibody to EGC-CM led to the inhibition of EGC-CM effects on IEC spreading (Fig. 6A). Interestingly, addition of a broad spectrum inhibitor of MMPs (GM6001) to EGC-CM significantly decreased the induction of cell spreading induced by EGC-CM (Fig. 6A), suggesting the presence of EGF precursor forms in EGC-CM. Consistently, treatment of IEC with the high molecular mass form of EGF, i.e. proEGF, led to a significant increase in epithelial restitution and IEC spreading (Figs. 6B & C). The increase in IEC spreading induced by proEGF was significantly reduced by 33.1% ± 1.8 (n=4; p<0.001) in presence of GM6001 as compared to control. Finally, human and rat EGF induced a significant increase in epithelial restitution (Fig. 6B), as well as a significant increase in IEC spreading (Fig. 6C).

Enteric glial cells secrete proEGF. Finally, we determined whether proEGF was synthesized and secreted by EGC. We showed that EGF mRNA was expressed in EGC (Fig. 7A). ProEGF, but not the 6kD-form of EGF, was detected by immunoblotting in both EGC lysates as well as in EGC-CM (Fig. 7B).

DISCUSSION

The present study reports major findings concerning the role of EGC in the control of IEB functions. EGC promoted epithelial restitution by increasing IEC spreading, leading to a rapid restoration of the epithelium lining continuity and TER. The EGC-induced epithelial wound healing was dependent of a regulation of both FAK expression and activity in IEC. Furthermore, we identified proEGF as a major soluble glial mediator responsible for the EGC-induced increase of epithelial wound repair.

This study strengthens the concept that the IEB is regulated by its immediate microenvironment, and that, in particular, this may also be influenced by EGC. Indeed, EGC and fibroblasts, two cell components of the IEB microenvironment, were shown to have opposite effects on IEC proliferation through the release of TGF- β 1 and HGF (Hepatocyte Growth Factor), respectively (18,21). Here we have demonstrated similar effects of EGC and HGF on intestinal epithelial restitution (22). In view of

our results, it is tempting to speculate that EGC and fibroblasts could co-operate to regulate wound repair processes with both cell types favoring restitution and EGC controlling the fibroblast-induced increase of IEC proliferation. Although our results were obtained with a model of co-culture using rat EGC and human IEC, previous studies have shown that EGC inhibit both human and rat IEC proliferation (18). Furthermore, rat and human mediators reproduced EGC effects on intestinal epithelial restitution.

The EGC-induced increase in epithelial restitution was clearly associated with an elevated IEC spreading. Epithelial restitution is commonly studied by assessment of cell migration rate. Even if it is admitted that IEC spreading is a cellular process of epithelial restitution, this study gives to the best of our knowledge the first quantitative assessment of the major role of IEC spreading in mucosal repair. This EGC-induced increase in wound repair does probably not involve an increase of IEC proliferation. Indeed, after 24 hours of co-culture with EGC, the number of IEC was not significantly different from controls (i.e. without EGC) (18) and EGC induced a cell cycle arrest in G0/G1 phase in IEC (23). In addition, these results are consistent with the observation that cell migration and cell spreading are the only cellular mechanisms that occur during wound repair processes at this early stage of healing, prior to initiation of cell proliferation and differentiation (2,24).

Another major finding of our study was the observation that EGC effects on IEB restitution and IEC spreading were mediated by both FAK activity- and FAK expression-dependent pathways. These results are in agreement with studies showing that increased FAK expression in IEC favors restitution (25). Interestingly, increased FAK expression was detected near the border of human gastric and colonic ulcers (26). This observation further supports the putative intestinal wound repair role for EGC *in vivo* as 1) there exists a positive correlation between a glial marker and FAK expressions in human colonic biopsies, 2) EGC deletion leads to a decrease in FAK expression in transgenic mice, and 3) EGC ablation is associated with major mucosal ulcerations (15). However, we cannot rule out that the variations of FAK mRNA expression might also result in part from an EGC-mediated control of FAK expression in other cell types

present in the mucosa or from the loss of EGC themselves. In parallel, EGC increased FAK phosphorylation on Tyrosine 397 independently of its expression. Increased FAK phosphorylation has generally been associated with increased IEC motility, although some studies report increased cell migration of Caco-2 and IEC-6 with siRNA-induced decrease of the total amount of phosphorylated FAK (27). In particular, the inhibition of Src-induced activation of FAK in IEC or the transfection of IEC with FRNK leads to reduced cell motility in a similar fashion to the results that we present herein (28-30). Furthermore, environmental factors such as mechanical strain or mediators such as EGF, polyamine or arginine, which all favor intestinal epithelial wound healing, act via FAK-dependent pathways (28,31-34). The dual control of EGC on both FAK expression and phosphorylation could allow EGC to have short-term, as well as long-term effects on IEC functions.

Besides their involvement in wound healing, EGC effects on FAK phosphorylation and expression in IEC could also be responsible for the glial control of other IEB functions. In particular, FAK has been shown to be involved in the regulation of processes such as IEC anoikis, survival and differentiation (35-39). However, it remains unknown whether EGC can modulate these functions via FAK-dependent pathways.

Another important finding of our study is the identification of proEGF as a glial mediator responsible for the EGC-induced epithelial restitution. Indeed, EGF and EGFR blocking antibodies inhibited the EGC-induced increase in epithelial restitution, whereas proEGF partly reproduced the EGC effects and was detected in EGC-CM.

Although EGC have been shown to secrete various factors (NGF (Nerve Growth Factor), GSNO, TGF β -1), this is the first demonstration of a glial proEGF secretion (17,18,40). Other studies have already suggested the expression and the release of EGF by CNS astrocytes based on mRNA detection and the use of blocking antibodies (41,42). However, to the best of our knowledge, EGF or proEGF protein has never been directly detected in astrocytes or in their conditioned-medium, although multiple forms of EGF were detected in the CNS (43). Although the mature 6kD form of EGF has been reported in the gut (44), proEGF has never been detected

in the GI tract. However, other tissues, such as kidney, appear to contain primarily the large precursor of EGF (45). Similarly, we were able to detect a high molecular mass form of EGF, i.e. proEGF, but not the 6kD-form of EGF in EGC lysates or EGC-CM. This suggests that EGC may not release EGF in its 6kD form, or that it is released at levels below the detection levels of our assay. The mechanisms involved in the release of soluble forms of proEGF by EGC were not the focus of this study. However, in other organs, such as in the kidney, the release of proEGF has been shown to be mediated via the shedding of its membrane-anchored precursor. Whether such mechanisms occur in EGC is currently unknown.

One of the most important findings of this study is that the effects of EGC on epithelial restitution are mediated by the glial release of proEGF. Whether proEGF itself or its mature form is responsible for these effects is currently not fully determined in our study. However, proEGF might directly activate EGFR as previously shown (45,46). Besides, in our study, the effects of proEGF could also be mediated by cleaved forms of proEGF resulting from its enzymatic processing as it has been previously shown in rat kidney (47). Such maturation of proEGF could occur 1) at the level of epithelial cell surface via MMPs activity-dependent pathways, or 2) in the extracellular medium via secreted MMPs by EGC or IEC. These hypotheses are reinforced in our study as an MMPs inhibitor reduced the effects of both EGC-CM and proEGF on IEC spreading.

The EGC-induced epithelial restitution was mediated by EGFR-dependent pathways, probably resulting from EGFR activation by proEGF or its matured form. These results are in agreement with a major role for EGFR in intestinal epithelial wound repair processes. Indeed, the activation of EGFR by its ligands leads to increased IEB wound repair and IEC spreading (48-51). Furthermore, EGFR-mediated cell motility was also shown to involve FAK-dependent pathways (34,52,53).

Finally, the glial secretion of low activity proEGF (as compared to EGF; our study) could have physiopathological relevance. Indeed, the availability of a pool of factors, having the ability to actively repair the barrier, is of interest when major wound healing processes are needed. In particular, during inflammatory or infectious insults of IEB, the EGC-derived pool of proEGF

could be activated by the concomitant release of MMPs, which would process the low activity proEGF into high activity EGF and therefore stimulate wound repair. A similar mechanism has been suggested by Maréchal et al. (1999) (54). In particular, they proposed that soluble proEGF presents in the aqueous flow originating from the lacrimal gland could mature into the 6kD form of EGF only when it reaches the ocular surface, taking into account that the enzyme able to process proEGF into EGF is present in tears at elevated levels in some corneal diseases.

Recent studies now indicate that EGC act as major regulators of IEB functions and are essential for the maintenance of gut integrity. Our study further reinforces this concept by showing that EGC directly enhance IEB wound repair and identifies proEGF as a major mediator involved in these effects. Finally, this study also supports the concept that defects in EGC functions could contribute towards pathologies with altered repair processes such as digestive cancer or inflammatory bowel diseases.

REFERENCES

1. Sturm, A., and Dignass, A. U. (2008) *World J Gastroenterol* **14**, 348-353
2. Okamoto, R., and Watanabe, M. (2005) *Dig Dis Sci* **50 Suppl 1**, S34-38
3. Mitra, S. K., Hanson, D. A., and Schlaepfer, D. D. (2005) *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 56-68
4. Parsons, J. T. (2003) *J Cell Sci* **116**, 1409-1416
5. Blikslager, A. T., Moeser, A. J., Gookin, J. L., Jones, S. L., and Odle, J. (2007) *Physiol Rev* **87**, 545-564
6. Powell, D. W., Adegboyega, P. A., Di Mari, J. F., and Mifflin, R. C. (2005) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G2-7
7. Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., Saada, J. I., and West, A. B. (1999) *Am J Physiol* **277**, C183-201
8. Reinshagen, M., Patel, A., Sottili, M., Nast, C., Davis, W., Mueller, K., and Eysselein, V. (1994) *Gastroenterology* **106**, 1208-1214
9. Bulut, K., Felderbauer, P., Deters, S., Hoeck, K., Schmidt-Choudhury, A., Schmidt, W. E., and Hoffmann, P. (2008) *Int J Colorectal Dis* **23**, 535-541
10. Toumi, F., Neunlist, M., Cassagnau, E., Parois, S., Laboisse, C. L., Galmiche, J. P., and Jarry, A. (2003) *Neurogastroenterol Motil* **15**, 239-242
11. Neunlist, M., Toumi, F., Oreschkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Laboisse, C. L., Galmiche, J. P., and Jarry, A. (2003) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G1028-1036
12. Ruhl, A., Nasser, Y., and Sharkey, K. A. (2004) *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**, 44-49
13. Savidge, T. C., Sofroniew, M. V., and Neunlist, M. (2007) *Lab Invest* **87**, 731-736
14. Abbott, N. J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006) *Nat Rev Neurosci* **7**, 41-53
15. 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) *Cell* **93**, 189-201
16. Aube, A. C., Cabarrocas, J., Bauer, J., Philippe, D., Aubert, P., Doulay, F., Liblau, R., Galmiche, J. P., and Neunlist, M. (2006) *Gut* **55**, 630-637
17. Savidge, T. C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., and Sofroniew, M. V. (2007) *Gastroenterology* **132**, 1344-1358
18. Neunlist, M., Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Ruhl, A., Lardeux, B., Savidge, T., Paris, F., and Galmiche, J. P. (2007) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G231-241
19. Chevalier, J., Derkinderen, P., Gomes, P., Thinard, R., Naveilhan, P., Vanden Berghe, P., and Neunlist, M. (2008) *J Physiol* **586**, 1963-1975
20. Fouquet, S., Lugo-Martinez, V. H., Faussat, A. M., Renaud, F., Cardot, P., Chambaz, J., Pincon-Raymond, M., and Thenet, S. (2004) *J Biol Chem* **279**, 43061-43069
21. Goke, M., Kanai, M., and Podolsky, D. K. (1998) *Am J Physiol* **274**, G809-818

22. Dignass, A. U., Lynch-Devaney, K., and Podolsky, D. K. (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **202**, 701-709
23. Neunlist, M., Van Landeghem, L., Bourreille, A., and Savidge, T. (2008) *J Intern Med* **263**, 577-583
24. Mammen, J. M., and Matthews, J. B. (2003) *Crit Care Med* **31**, S532-537
25. Hines, O. J., Ryder, N., Chu, J., and McFadden, D. (2000) *J Surg Res* **92**, 23-28
26. Walsh, M. F., Ampasala, D. R., Hatfield, J., Vander Heide, R., Suer, S., Rishi, A. K., and Basson, M. D. (2008) *Am J Pathol* **173**, 385-399
27. Basson, M. D., Sanders, M. A., Gomez, R., Hatfield, J., Vanderheide, R., Thamilselvan, V., Zhang, J., and Walsh, M. F. (2006) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G491-499
28. Chaturvedi, L. S., Gayer, C. P., Marsh, H. M., and Basson, M. D. (2008) *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C1350-1361
29. Sanders, M. A., and Basson, M. D. (2004) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G547-557
30. Yu, C. F., Sanders, M. A., and Basson, M. D. (2000) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**, G952-966
31. Ray, R. M., Viar, M. J., McCormack, S. A., and Johnson, L. R. (2001) *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C475-485
32. Rhoads, J. M., Chen, W., Gookin, J., Wu, G. Y., Fu, Q., Blikslager, A. T., Rippe, R. A., Argenzio, R. A., Cance, W. G., Weaver, E. M., and Romer, L. H. (2004) *Gut* **53**, 514-522
33. Zhang, J., Owen, C. R., Sanders, M. A., Turner, J. R., and Basson, M. D. (2006) *Gastroenterology* **131**, 1179-1189
34. Pai, R., Szabo, I. L., Giap, A. Q., Kawanaka, H., and Tarnawski, A. S. (2001) *Life Sci* **69**, 3055-3071
35. Bouchard, V., Demers, M. J., Thibodeau, S., Laquerre, V., Fujita, N., Tsuruo, T., Beaulieu, J. F., Gauthier, R., Vezina, A., Villeneuve, L., and Vachon, P. H. (2007) *J Cell Physiol* **212**, 717-728
36. Harnois, C., Demers, M. J., Bouchard, V., Vallee, K., Gagne, D., Fujita, N., Tsuruo, T., Vezina, A., Beaulieu, J. F., Cote, A., and Vachon, P. H. (2004) *J Cell Physiol* **198**, 209-222
37. Zhang, H. M., Keledjian, K. M., Rao, J. N., Zou, T., Liu, L., Marasa, B. S., Wang, S. R., Ru, L., Strauch, E. D., and Wang, J. Y. (2006) *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C1310-1320
38. Levy, P., Robin, H., Kornprobst, M., Capeau, J., and Cherqui, G. (1998) *J Cell Physiol* **177**, 618-627
39. Playford, M. P., Vadali, K., Cai, X., Burridge, K., and Schaller, M. D. (2008) *Exp Cell Res*
40. von Boyen, G. B., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schafer, K. H., Adler, G., and Kirsch, J. (2006) *J Neuroendocrinol* **18**, 820-825
41. Wagner, B., Natarajan, A., Grunaug, S., Kroismayr, R., Wagner, E. F., and Sibilia, M. (2006) *Embo J* **25**, 752-762
42. Gomes, F. C., Maia, C. G., de Menezes, J. R., and Neto, V. M. (1999) *Glia* **25**, 247-255
43. Schaudies, R. P., Christian, E. L., and Savage, C. R., Jr. (1989) *J Biol Chem* **264**, 10447-10450
44. Kasselberg, A. G., Orth, D. N., Gray, M. E., and Stahlman, M. T. (1985) *J Histochem Cytochem* **33**, 315-322
45. Breyer, J. A., and Cohen, S. (1990) *J Biol Chem* **265**, 16564-16570
46. Mroczkowski, B., Reich, M., Chen, K., Bell, G. I., and Cohen, S. (1989) *Mol Cell Biol* **9**, 2771-2778
47. Le Gall, S. M., Meneton, P., Mauduit, P., and Dreux, C. (2004) *Regul Pept* **122**, 119-129
48. Polk, D. B. (1998) *Gastroenterology* **114**, 493-502
49. Wilson, A. J., and Gibson, P. R. (1999) *Exp Cell Res* **250**, 187-196
50. Tetreault, M. P., Chailler, P., Beaulieu, J. F., Rivard, N., and Menard, D. (2008) *J Cell Biochem*
51. Egger, B., Buchler, M. W., Lakshmanan, J., Moore, P., and Eysselein, V. E. (2000) *Scand J Gastroenterol* **35**, 1181-1187
52. Kim, S. H., and Kim, S. H. (2008) *Cell Biochem Funct* **26**, 539-547

53. Sieg, D. J., Hauck, C. R., Ilic, D., Klingbeil, C. K., Schaefer, E., Damsky, C. H., and
Schlaepfer, D. D. (2000) *Nat Cell Biol* **2**, 249-256
54. Marechal, H., Jammes, H., Rossignol, B., and Mauduit, P. (1999) *Am J Physiol* **276**, C734-
746

FOOTNOTES

The authors are grateful to Dr Hervé Enslen for his advice and for providing the FRNK-GFP construct, the IFR26 Imaging Facility and especially Philippe Hulin for his precious help in the video time laps acquiring and montage. They also thank Philippe Aubert, Maxime Mahé and Samuel Ardois for their invaluable technical help. This work was supported by a grant from INCa Appel d'Offre Libre 2007. Dr. Tor Savidge work was funded by a grant from Eli Broad Medical Foundation. Laurianne Van Landeghem was supported by a grant MRT.

The abbreviations used are: BBB, Blood Brain Barrier; CGRP, calcitonin-gene-related peptide; CNS, Central Nervous System; EGC, Enteric Glial Cells; EGC-CM, Enteric Glial Cell-Conditioned Medium; EGF, Epidermal Growth Factor; EGFR, Epidermal Growth Factor receptor; ENS, Enteric Nervous System; FAK, Focal Adhesion Kinase; FRNK, FAK-related Non Kinase; GFP, Green Fluorescent Protein; GI, Gastrointestinal; GSNO, S-nitrosoglutathione; HGF, Hepatocyte Growth Factor; IEB, Intestinal Epithelial Barrier; MMPs, Metallo-Matrix Proteinases; NGF, Nerve Growth Factor; PP2, Pyrozolopyrimidine 2; PYK2, Proline-rich Kinase-2; TER, Transepithelial Electrical Resistance; TGF- β 1, Transforming Growth Factor- beta 1; VIP, Vasointestinal Peptide; Y397-FAK, Tyrosine 397 Focal Adhesion Kinase; ZO-1, Zonula Occludens-1.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. *EGC promote intestinal epithelial wound repair.* (A) After mechanical-induced injury, wounded surface areas of IEC monolayers were significantly smaller after 24 hours of culture with EGC as compared to controls (i.e. monolayers cultured alone) (scale bar: 200 μ m). (B) Quantitative analysis showed that EGC or EGC-conditioned medium (EGC-CM) significantly reduced wounded surface areas as compared to control (n=7; p<0.001; t-test and n=11; p=0.002; paired t-test, respectively). (C) EGC and EGC-CM induced a significant increase in transepithelial electrical resistance (TER) recovery, assessed by measuring the slope of TER over time. The data are presented in percentage after normalization to controls (n=7; p=0.003; t-test and n=6; p=0.014; paired t-test, respectively). A non-transformed EGC line (JUG2) also increased epithelial restitution (D; n=3; p<0.05; t-test) and TER recovery (E; n=3; p<0.05; t-test).

Fig. 2. *EGC increase IEC spreading.* (A) *Left panel.* The cell surface areas of the first five circumferential cell layers surrounding the wounded areas (scale bar: 200 μ m) were evaluated after staining for ZO-1 as a marker of apical perimeter. *Right panel.* Under control conditions (-EGC), IEC surface areas were increased in the first 3 circumferential cell layers as compared to the fifth cell layer. EGC and EGC-conditioned medium (EGC-CM) induced a significant increase in IEC spreading in the first 3 cell layers as compared to control (i.e. -EGC) (n=3; p<0.05; two-way repeated measures ANOVA). (B) Photomicrograph of Caco-2 cells stained with ZO-1 antibody revealed a significant increase of cell surface area induced by EGC (+EGC) as compared to control (i.e. -EGC) (scale bar: 50 μ m). (C) Quantitative analysis of IEC surface areas showed a significant increase in cell surface area induced by EGC and EGC-CM compared to control (i.e. -EGC) (n=4; p<0.001; t-test and n=3; p=0.009; paired t-test, respectively). (D) The non-transformed glial cell line JUG2 induced a significant increase in IEC cell surface area (n=4; p<0.05; t-test).

Fig. 3. *EGC increase epithelial restitution in activating FAK activity-dependent pathways.* (A) Triton-X-soluble (*left panel*) and insoluble (*right panel*) fractions of IEC, cultured in the presence or in the absence of EGC (+EGC and -EGC respectively) were subjected to immunoblotting with an antibody against the phosphorylated form of FAK Tyr-397, the FAK autophosphorylation site (Y397-

FAK). After stripping, membranes were reprobed with anti-FAK antibody and anti-cyclophylin A or anti-RPS6 antibodies. The presence of EGC induced a significant increase in FAK autophosphorylation as compared to IEC cultured alone ($n=4$; $p<0.05$, Mann and Whitney test). **(B)** IEC were pretreated for 1 hour with $5\mu\text{M}$ PP2 prior to addition of EGC-conditioned medium (EGC-CM). In presence of PP2, the effects of EGC-CM on cell spreading were significantly reduced ($n=4$; $p=0.008$; paired t-test; scale bar: $50\mu\text{m}$). **(C)** IEC transfection with FRNK-GFP (FRNK/GFP Caco-2) inhibited EGC effects on IEC spreading whereas IEC transfection with the mock-GFP plasmid (mock/GFP Caco-2) had no effect on EGC-mediated induction of IEC spreading (scale bar: $50\mu\text{m}$). The induction of IEC spreading by EGC (arrow) was significantly reduced in FRNK-GFP positive cells (arrowheads) compared to mock-GFP positive cells ($n=5$; $p=0.007$; t-test).

Fig. 4. *EGC control epithelial restitution via the regulation of FAK expression.* **(A)** Triton-X-soluble (*left panel*) and insoluble (*right panel*) fractions of IEC, cultured in the presence or in the absence of EGC (+EGC and –EGC respectively) were subjected to immunoblotting with anti-FAK antibody. After stripping, membranes were reprobed with anti-cyclophylin A or anti-RPS6 antibodies. The presence of EGC induced a significant increase in FAK expression in both fractions as compared to control (i.e. –EGC) ($n=4$; $p<0.05$, Mann and Whitney test). **(B)** Quantitative PCR analysis reported a significant increase of FAK mRNA expression in IEC cultured with EGC or EGC-conditioned medium (EGC-CM) ($n=5$; $p=0.006$, t-test and $n=5$; $p=0.008$, paired t-test, respectively). **(C)** *Upper panel.* Infection of IEC with FAK shRNA lentiviral particles (FAK shRNA) significantly decreased FAK protein expression as compared to IEC infected with non-specific target shRNA lentiviral particles (control shRNA) and non-infected IEC (control). *Middle and lower panels.* Infection of IEC with FAK shRNA lentiviral particles (FAK shRNA) significantly inhibited EGC-CM effects on IEC spreading as compared to IEC infected with non-specific target shRNA lentiviral particles (control shRNA) (scale bar: $50\mu\text{m}$) ($n=4$; $p=0.013$; paired t-test). **(D)** Quantitative PCR analysis showed that *in vivo* ablation of EGC reduces the expression of FAK mRNA expression in small intestine fragments of transgenic animals (Tg) as compared to controls (NTg) ($n=7$; $p=0.021$; t-test). **(E)** Quantitative PCR analysis of human colonic mucosal biopsies revealed a positive correlation between FAK and S-100 β mRNA expressions ($n=6$; $p=0.018$; linear regression).

Fig. 5. *EGC promote intestinal epithelial wound repair via EGFR-dependent pathways.* **(A)** Addition of an EGFR neutralizing antibody (anti-hEGFR, $2\mu\text{g}/\text{mL}$) to EGC-conditioned medium (EGC-CM) significantly blocked the increase of epithelial restitution induced by EGC-CM. The EGFR blocking antibody was added 30 minutes prior to the addition of EGC-CM. Results are presented in percentage of increase of epithelial restitution induced by EGC-CM in presence or absence of $2\mu\text{g}/\text{mL}$ EGFR blocking antibody ($n=3$; $p=0.007$; paired t-test). **(B)** EGC-mediated increase in IEC spreading was significantly decreased by the addition of an EGFR neutralizing antibody (anti-hEGFR, $2\mu\text{g}/\text{mL}$) to EGC-CM ($n=4$; $p=0.009$; paired t-test; scale bar: $50\mu\text{m}$).

Fig. 6. *EGF neutralizing antibody and MMPs inhibitor decrease the induction of IEC spreading by EGC-CM.* **(A)** IEC and EGC-conditioned medium (EGC-CM) were preincubated with EGF neutralizing antibody ($16\mu\text{g}/\text{mL}$) or the broad spectrum MMPs inhibitor, GM6001 ($10\mu\text{M}$), 30-45 minutes prior to the addition of EGC-CM. Both, EGF blocking antibody and GM6001 reduced the EGC-CM-mediated induction of IEC spreading. Results are expressed in percentage of induction of cell spreading by EGC-CM. ($n=3$; $p=0.011$; paired t-test and $n=3$; $p=0.038$; paired t-test, respectively; scale bar: $50\mu\text{m}$). **(B)** Human proEGF ($100\text{ng}/\text{mL}$), human EGF ($1\text{ng}/\text{mL}$) and rat EGF ($20\text{ng}/\text{mL}$) induced an increase in epithelial restitution. The results are presented in percentage after normalization to the wounded surface area at $t=0\text{hour}$ ($n=3$; $p=0.001$, $p=0.01$ and $p=0.008$; t-test; respectively). **(C)** IEC spreading was significantly increased by incubation with human proEGF ($100\text{ng}/\text{mL}$), human EGF ($1\text{ng}/\text{mL}$) and rat EGF ($20\text{ng}/\text{mL}$) ($n=4$; $p<0.001$, $p=0.029$, $p<0.001$; t-test, respectively).

Fig. 7. *EGC secrete proEGF.* (A) PCR studies showed EGF mRNA expression in EGC. (B) Western blot experiments revealed the presence of proEGF in EGC lysates and EGC-conditioned medium (EGC-CM) but not in Caco-2-CM (IEC-CM).

Figure 1

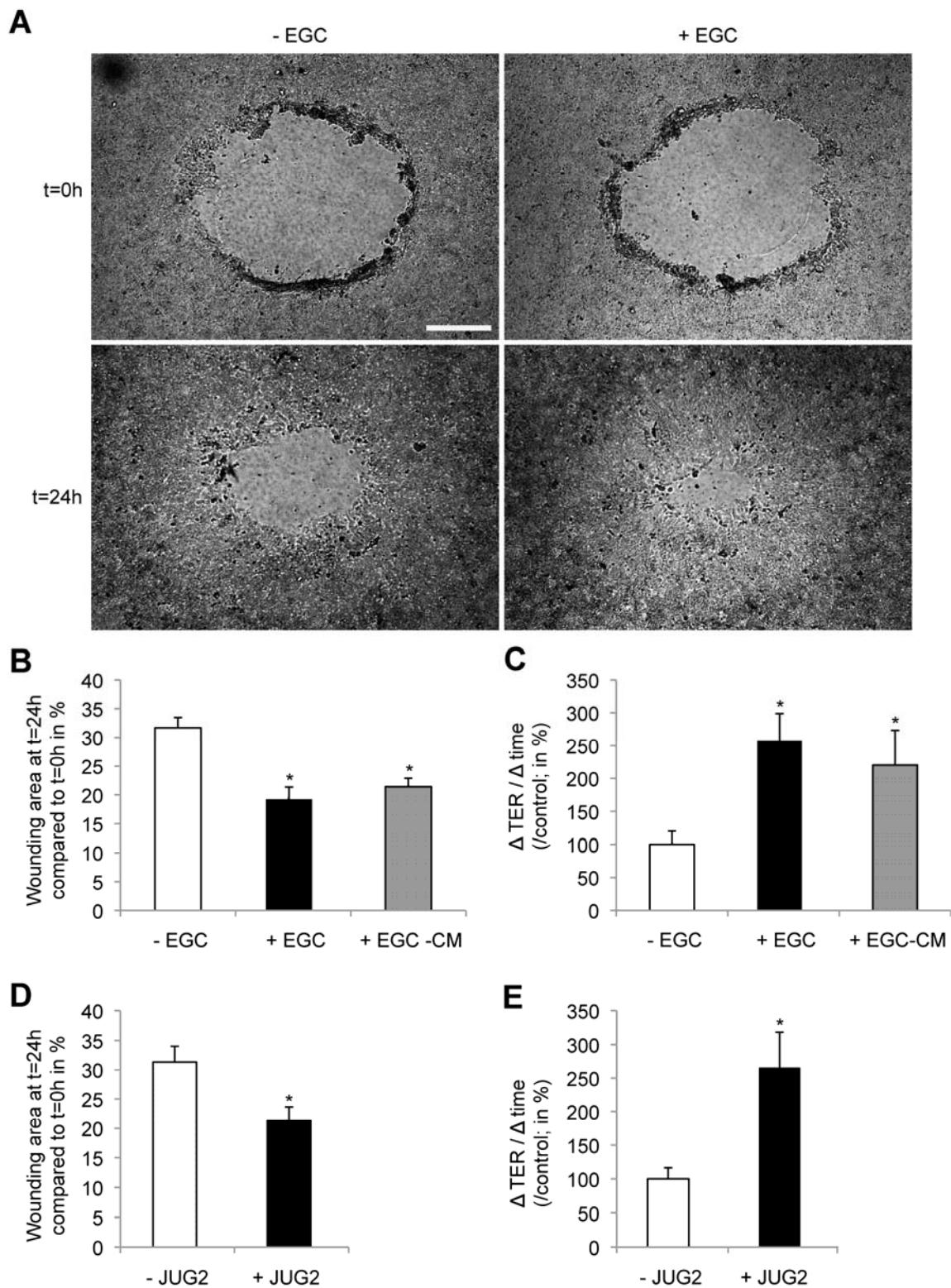


Figure 2

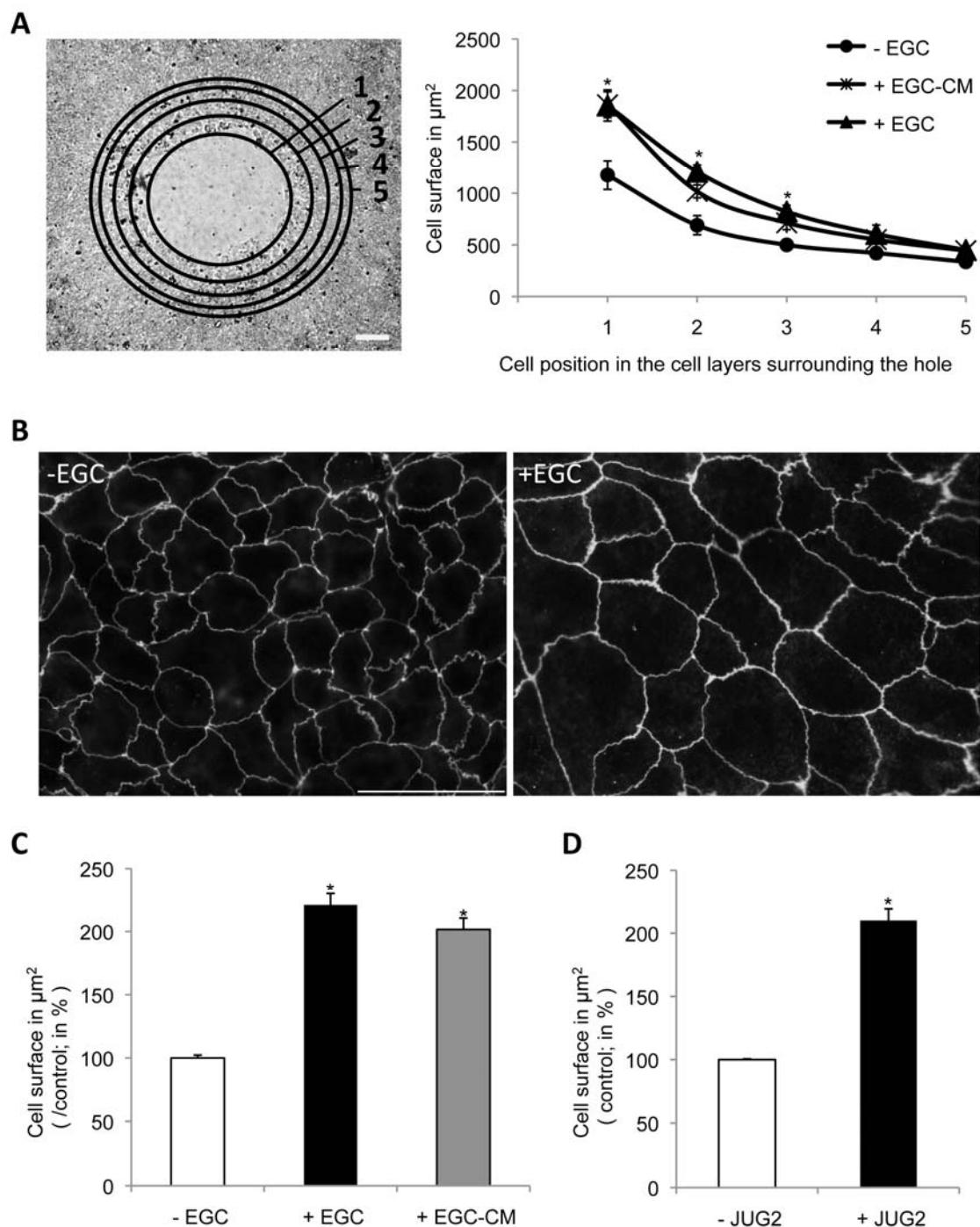


Figure 3

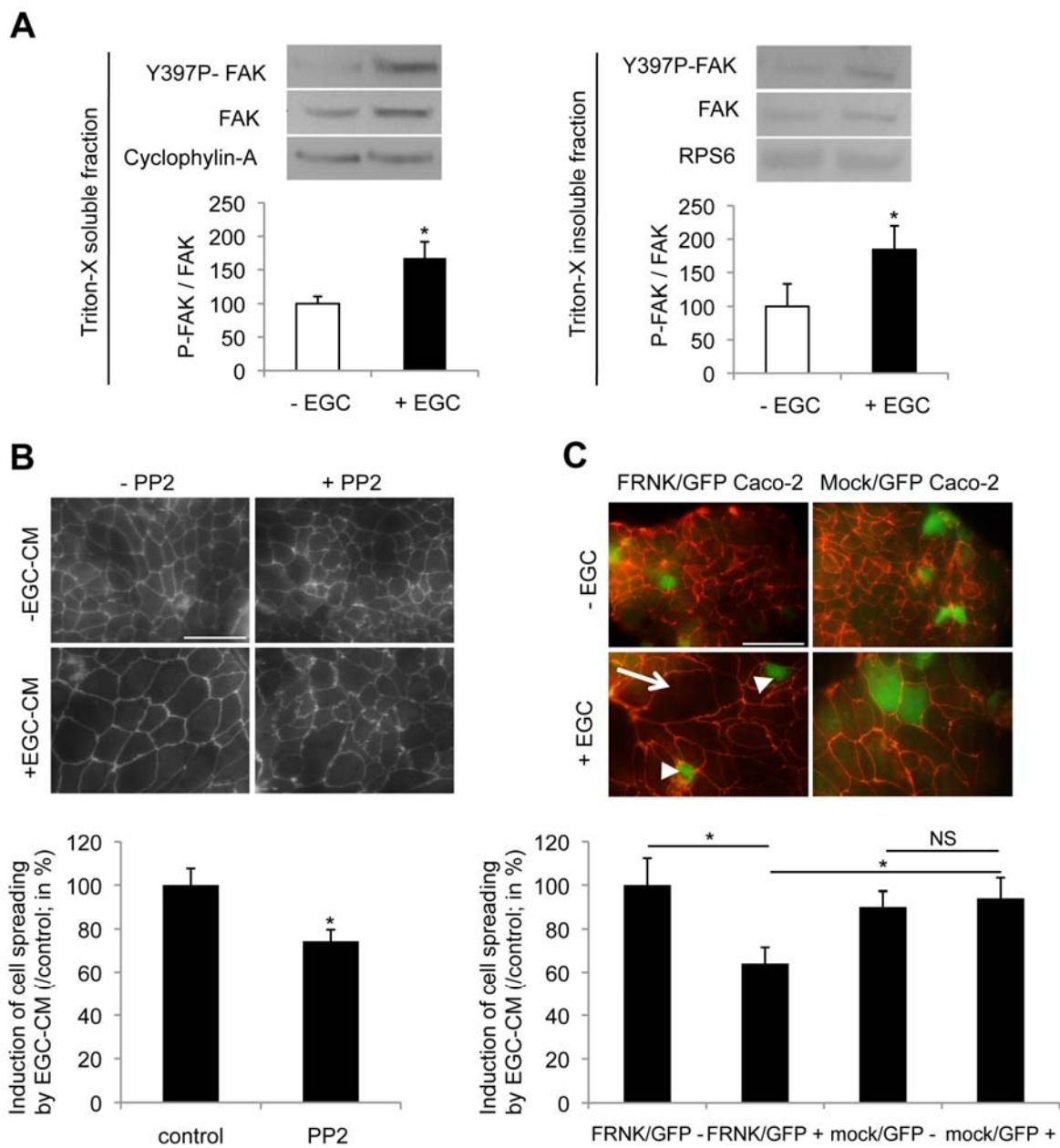


Figure 4

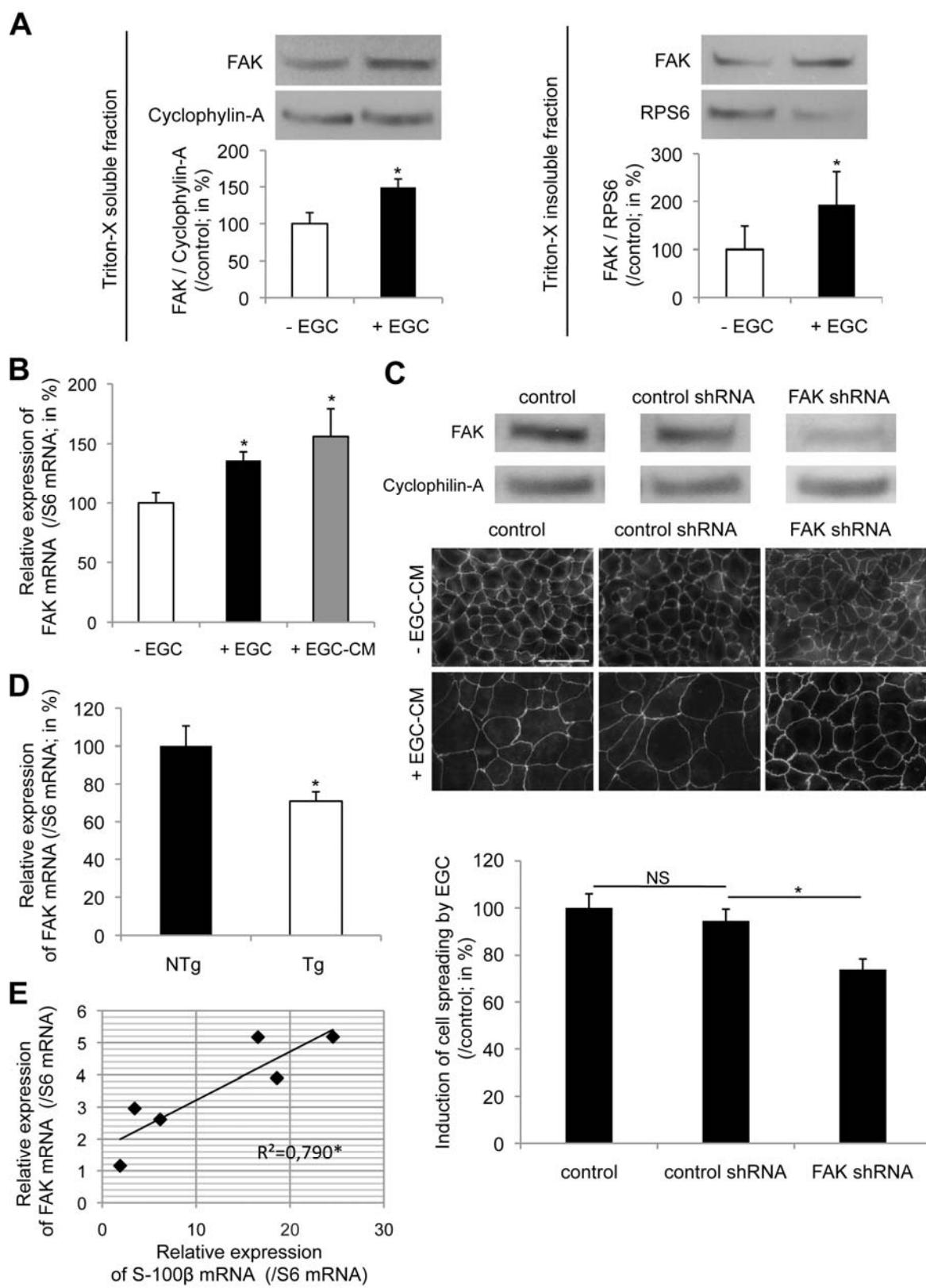


Figure 5

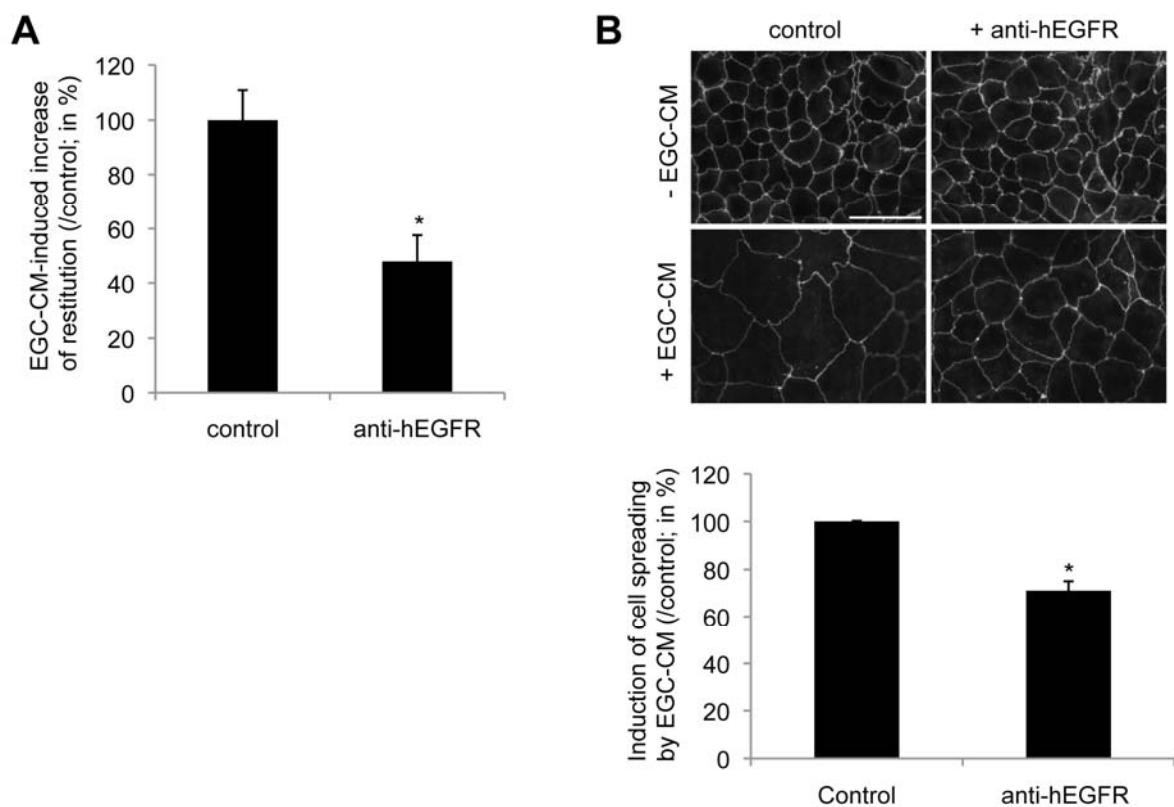
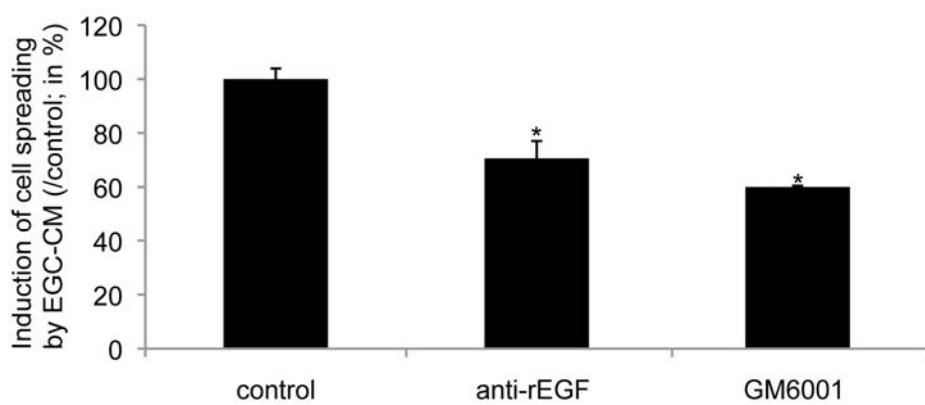
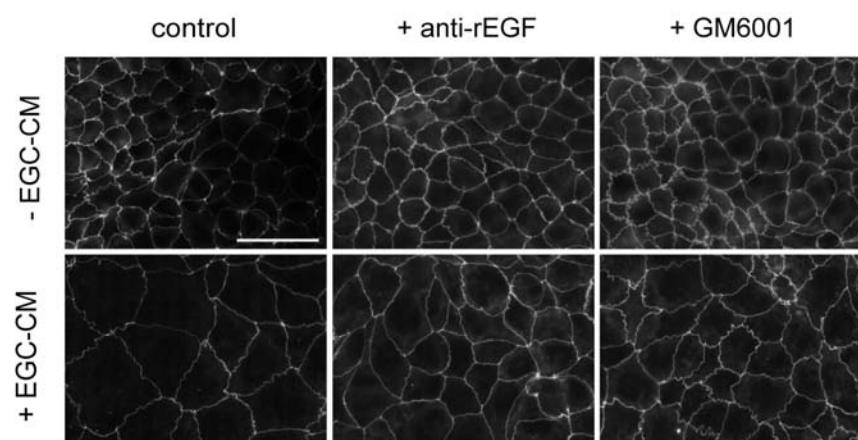
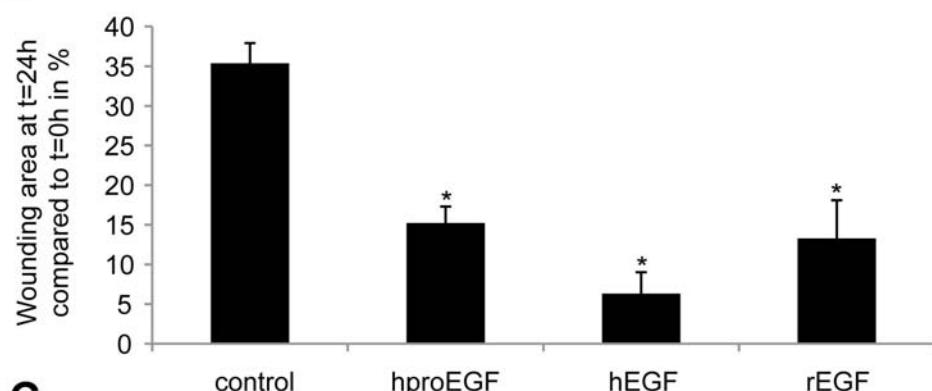


Figure 6

A



B



C

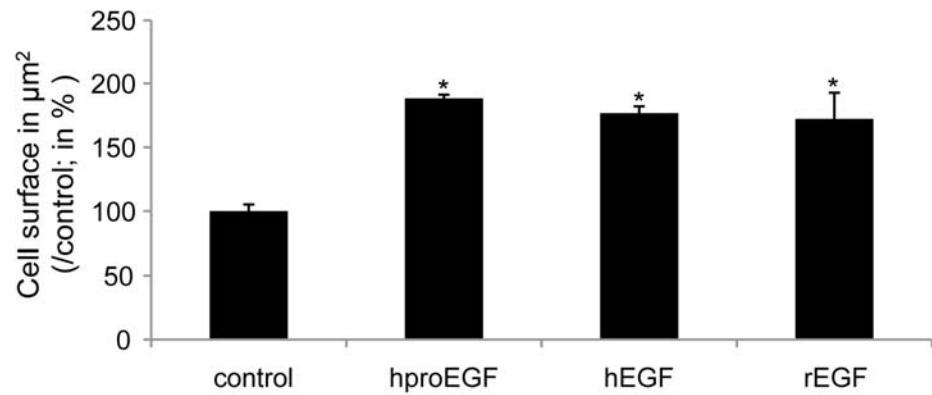
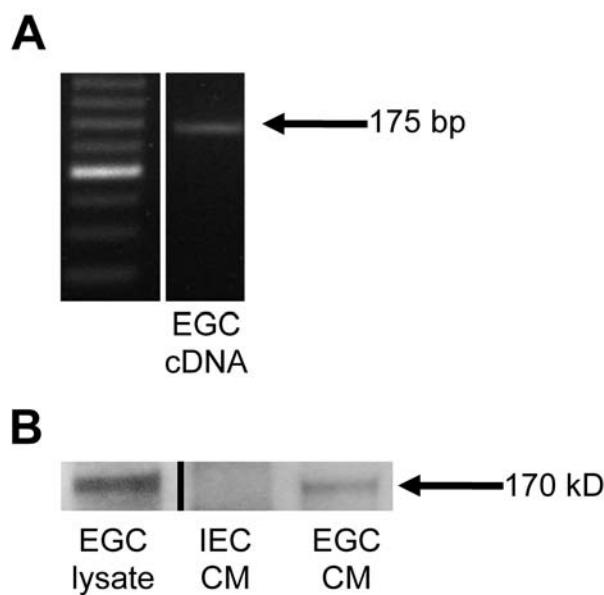


Figure 7



SUPPLEMENTAL DATA

Video 1. Video 1 shows wound healing of Caco-2 monolayers following mechanical-induced injury in absence (*left video*) or in presence (*right video*) of EGC-conditioned medium. The IEC monolayers were cultured onto transwell filters. The video was recorded for the first 24 hours following injury. Images were acquired every 20 minutes and are displayed at a rate of 3 frames/s. The lower panel illustrates the evolution over time of the wounded surface area in absence (blue) or presence (red) of EGC-conditioned medium.

Video 2. Video 2 shows cell spreading of proliferative Caco-2 cells in absence (*left video*) or in presence (*right video*) of EGC-conditioned medium. Caco-2 cells were cultured onto transwell filters. The video was recorded for 24 hours. Images were acquired every 10 minutes and are displayed at a rate of 7 frames/s.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Ces travaux de thèse, combinant des approches expérimentales *in vitro* et *in vivo* ainsi que des approches transcriptomiques, ont permis de renforcer le concept du rôle majeur joué par les cellules gliales entériques (CGE) dans l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale (BEI). Ils permettent plus particulièrement de fonder une base scientifique à l'existence d'une véritable unité neuro-glio-épithéliale dans le tube digestif, probablement très similaire à l'unité neuro-glio-endothéliale de la barrière hémato-encéphalique (BHE). D'un point de vue fonctionnel, nos résultats tendent à démontrer que les CGE ont un effet bénéfique et protecteur sur la BEI en contrôlant la prolifération des cellules épithéliales intestinales (CEI), en favorisant la différenciation et l'adhésion des CEI ainsi qu'en activant les processus de réparation de la BEI après une lésion.

1. La cellule gliale entérique: acteur du microenvironnement cellulaire de la barrière épithéliale intestinale en physiologie

Nos travaux ont permis de montrer une inhibition majeure de la prolifération des CEI par les CGE et d'identifier deux médiateurs gliaux impliqués, le TGF- β 1 et S-100 β . Cet effet anti-prolifératif est associé à une augmentation de la taille des CEI (partiellement induite par le TGF- β 1) ainsi qu'à un blocage des CEI en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Au vu de ces données, nous pouvons émettre l'hypothèse de l'existence d'un double contrôle de la prolifération des CEI assuré à la fois par une inhibition de contact entre les CEI induite par un/des médiateur(s) restant à identifier et aussi par une action anti-proliférative directe du

TGF- β 1 ou d'autres médiateurs, effets déjà décrits dans les CEI (Beauchamp et al., 1996; Ko et al., 1998). Néanmoins, il est également possible que ces deux contrôles négatifs sur la prolifération des CEI aient pour mécanisme d'action commun l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1, comme il a déjà été montré dans la lignée épithéliale Mv1Lu (Wu et al., 1996). Par ailleurs, l'effet anti-prolifératif des CGE n'est pas associé à une induction de la mort des CEI médiee par les CGE. L'ensemble de ces résultats est renforcé par les données de l'étude transcriptomique qui montrent, d'une façon globale, une absence d'effet des CGE sur la mort des CEI ainsi qu'un effet inhibiteur sur la prolifération.

Une autre fonction majeure régulée par les CGE que nous avons identifiée dans nos travaux est la réparation de la BEI. En effet, nous avons montré que, dans un modèle de lésions de la BEI, les CGE favorisent la réparation de la BEI, en partie *via* une augmentation de l'étalement des CEI. De plus, l'impact des CGE sur la migration des CEI reste à caractériser car, au vu de leurs effets sur la régulation de gènes contrôlant la motilité des CEI, il n'est pas à exclure que les CGE pourraient induire la migration des CEI. Il est intéressant de noter que l'augmentation de la réparation induite par les CGE s'accompagne d'une augmentation de l'adhésion et de la différenciation des CEI. En effet, des travaux récents de notre groupe, initiés suite à l'étude transcriptomique réalisée au cours de cette thèse, montrent une augmentation induite par les CGE de l'expression de l'ARNm de la sucrase-isomaltase et de l'alkaline-phosphatase dans les CEI (Bach-Ngohou et al, 2009, en préparation). Cette régulation des fonctions des CEI renforce l'effet bénéfique global des CGE dans les processus de réparation de la BEI. De plus, ces effets des CGE sur les CEI pourraient également inhiber la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) observée lors de l'acquisition de propriétés invasives et migratoires par les cellules épithéliales transformées. Cette dernière hypothèse est particulièrement renforcée par le fait que les CGE augmentent l'expression de l'ARNm de la E-cadhérine dans les CEI et diminuent l'expression de

l'ARNm d'une protéine induisant la dégradation de son précurseur (p35) (Etienne-Manneville, 2008; Huber et al., 2005). De façon intrigante, une perte de marqueurs gliaux rapportée dans cette thèse et observée dans des tumeurs coliques et à distance de celles-ci pourrait incriminer les CGE dans les processus de carcinogenèse.

Nos résultats montrent également que le rôle bénéfique des CGE sur l'homéostasie de la BEI se traduit par un renforcement global des propriétés d'adhésion de la BEI. D'une part, nous observons une augmentation de l'adhésion cellule-matrice induite par les CGE *in vitro* associée à une up-régulation de gènes-candidats responsables de ces effets tels que *KRT8/18*, *FN1*, *LAMA5* ou *LAMC1*. D'autre part, les CGE pourraient aussi renforcer la BEI en modulant les protéines régulant les jonctions cellule-cellule. En effet, il a récemment été montré que les CGE induisaient les fonctions de barrière en augmentant l'expression de la protéine ZO-1 et en diminuant la perméabilité intestinale (Savidge et al., 2007). D'autre part, nos études transcriptomiques suggèrent que ce renforcement pourrait aussi avoir lieu *via* une up-régulation de l'expression d'une protéine clef des jonctions adhérentes, i.e. la E-cadhérite. Néanmoins, ces effets restent à être confirmés, en particulier au vu des travaux réalisés par Savidge et al. qui ne montrent pas d'augmentation de l'expression de la E-cadhérite par les CGE (Savidge et al., 2007). Cette différence pourrait être due à une différence de conditions expérimentales. En effet, l'étude en question a été menée sur des cellules confluentes et différencierées tandis que nous avons caractérisé l'impact des CGE sur le transcriptome de CEI en prolifération. En effet, des travaux en cours montrent que l'impact des CGE sur les CEI est dépendant de l'état de différenciation des CEI. Ainsi, l'augmentation de l'ARNm de la E-cadhérite induite par les CGE a lieu uniquement dans des CEI en phase proliférative et non pas dans des CEI confluentes (Bach-Ngohou et al, 2009, en préparation).

D'une manière globale, la conséquence fonctionnelle des effets des CGE sur la BEI pourrait également se traduire par une protection de la BEI face à une agression par un

pathogène à la fois 1) en augmentant la résistance globale de la BEI aux lésions induites par le pathogène et 2) en favorisant les processus de réparation suite à une agression éventuelle. Cette hypothèse est renforcée par des travaux en cours au laboratoire montrant que les CGE protègent de l'agression de la BEI par *Shigella flexneri* (Flamant et al., 2009, en préparation). Enfin, l'étude transcriptomique suggère également que les CGE pourraient avoir un impact majeur sur le métabolisme des CGE et en particulier, celui des lipides et des protéines.

Notre étude transcriptomique a également montré que les CGE régulent l'expression de certaines molécules clefs dans les CEI qui ont précédemment été impliquées dans le contrôle de différentes fonctions de la BEI. En particulier, l'up-régulation de l'expression et l'activation de la protéine FAK par les CGE pourraient jouer un rôle central dans les mécanismes de réparation de la BEI induits par les CGE. Ces résultats sont en accord avec d'autres études ayant montré que FAK était un acteur clef des processus de réparation de la BEI (Hines et al., 2000; Yu et al., 2000). En outre, FAK pourrait aussi contrôler d'autres fonctions de la BEI régulées par les CGE telles que la prolifération ou la différenciation des CEI. En effet, l'expression et/ou l'activité FAK sont régulées lors de la différenciation entérocytaire et lors de la prolifération des CEI induite par des déformations répétitives de la BEI (Chaturvedi et al., 2007; Levy et al., 1998). De façon intéressante, les CGE sont aussi capables d'induire dans les CEI l'expression de PPAR γ (Peroxisome proliferator activated receptor) qui semble agir de concert avec l'activation de FAK pour contrôler les fonctions de la BEI. L'existence d'interactions entre PPAR γ et FAK reste à identifier ainsi que d'autres facteurs pouvant intégrer les signaux provenant des CGE et contrôler les fonctions de la BEI.

Nos travaux ont aussi permis d'identifier de nouveaux médiateurs gliaux impliqués dans le contrôle des fonctions de la barrière. Notamment, ils décrivent pour la première fois la présence de la forme précurseur de l'EGF au niveau de l'intestin. De plus, même si l'activité biologique du précurseur a déjà été montrée sur la prolifération de kératinocytes

(Breyer and Cohen, 1990), cette étude montre que le proEGF induit la motilité des CEI ainsi que la restitution épithéliale. Par ailleurs, la sécrétion gliale de proEGF, dont l'effet sur la restitution est plus faible que celui de l'EGF aux mêmes concentrations, pourrait être d'un intérêt majeur lors de conditions pathologiques. En particulier, lors de processus inflammatoires, le pool de précurseur à l'EGF sécrété par les CGE pourrait être activé par l'augmentation de la sécrétion de MMP, entraînant le clivage du proEGF en EGF, ce qui favoriserait ainsi de façon majeure la réparation de la BEI. Un tel mécanisme a déjà été proposé au niveau de la cornée où l'on observe une augmentation de la concentration en enzymes responsables du clivage du proEGF en EGF et présentes dans les larmes, lors de certaines maladies de la cornée (Marechal et al., 1999). Ainsi, le proEGF contenu dans le fluide provenant des glandes lacrimales pourrait être activé *via* son clivage enzymatique et ainsi induire des processus de réparation au niveau de la cornée. Par ailleurs, l'impact des médiateurs identifiés dans cette étude dans le contrôle d'autres fonctions régulées par les CGE telles que les fonctions des neurones entériques ou des cellules endothéliales reste à caractériser. De manière intéressante, nos travaux dans leur globalité suggèrent qu'il existe une certaine spécificité entre les médiateurs gliaux et les fonctions de la BEI qu'ils régulent. Ainsi, seuls le TGF- β 1 et S-100 β , par opposition au GSNO ou au proEGF, inhibent la prolifération cellulaire. D'autre part, le GSNO et S-100 β , mais pas le TGF- β 1 ni le NGF, diminuent la perméabilité paracellulaire. Enfin, le proEGF, mais pas le TGF- β 1, favorise la réparation de la BEI. Cette diversité et cette spécificité de médiateurs synthétisés par les CGE pourraient permettre de moduler finement et globalement les fonctions de la BEI. Par ailleurs, le développement de modèles *in vivo* invalidés pour l'expression des gènes codant pour ces médiateurs de façon inductible et cellule-spécifique permettrait d'étudier l'impact et d'évaluer l'importance respective du contrôle de ces médiateurs gliaux sur les fonctions de la BEI.

Même si nos résultats obtenus *in vitro* semblent être globalement confirmés par des données obtenues *in vivo*, ils doivent être pris avec précaution avant d'être extrapolés *in vivo*. En effet, les évidences *in vivo* ne sont qu'indirectes car elles ont été obtenues 1) en induisant des lésions gliales et en déterminant l'impact de ces lésions sur les paramètres étudiés (prolifération cellulaire et perméabilité) ou 2) en corrélant l'expression de marqueurs gliaux (supposée attester la quantité de CGE) à d'autres marqueurs (FAK). Cette situation résulte principalement de l'impossibilité expérimentale actuelle d'activer directement les CGE afin de déterminer leur rôle fonctionnel, contrairement aux neurones qui peuvent être spécifiquement activés électriquement. D'autre part, un élément à considérer avec précaution est le fait que de nombreuses données présentées dans ce travail proviennent de modèle de co-culture CGE/CEI. Les cellules gliales sont d'origine de rat et sont cultivées avec des CEI d'origine humaine. D'autre part, les lignées de CEI sont des lignées cancéreuses présentant différentes altérations dans leurs propriétés génomiques et fonctionnelles par rapport à des cellules non cancéreuses. Néanmoins, nous avons montré, concernant la régulation de la prolifération, que les effets des CGE (issues d'une lignée de rat) sur les CEI étaient identiques en utilisant des lignées de cellules épithéliales non transformées de rat.

Nos travaux ont donc permis de montrer que les CGE étaient capables de moduler directement et de manière importante les fonctions de la BEI. Néanmoins, *in vivo*, outre cette régulation directe, les CGE pourraient aussi agir en modulant les différents acteurs du microenvironnement de la BEI. En effet, les CGE pourraient aussi contrôler les fonctions des neurones entériques (en termes de contrôle de leur phénotype ou de leur survie), mais aussi agir sur les cellules endothéliales, les fibroblastes ou les cellules immunitaires. En effet, cette hypothèse est renforcée par le fait que certains médiateurs libérés par les CGE ont des propriétés immunomodulatrices et régulatrices des fibroblastes (Simmons et al., 2002).

2. La cellule gliale entérique: un acteur impliqué dans les pathologies digestives?

Comme précédemment décrits, nos résultats démontrent le rôle clef des CGE dans le contrôle et le maintien de l'homéostasie de la BEI. Néanmoins, au vu du rôle central joué par la BEI au cours des pathologies digestives, les CGE pourraient aussi contribuer de manière importante aux processus physiopathologiques au cours de pathologies digestives. En effet, de nombreuses pathologies digestives sont caractérisées par des altérations de la BEI incluant des augmentations de la perméabilité paracellulaire ou transcellulaire (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) ou dans le syndrome de l'intestin irritable (SII), en passant par des altérations des processus de prolifération dans les cancers colorectaux et/ou aussi des processus de réparation de la BEI dans les MICI (Laukoetter et al., 2008; Mankertz and Schulzke, 2007; Piche et al., 2009). De manière intéressante, l'ensemble de ces pathologies est aussi caractérisé par la présence d'une inflammation intestinale et peut être classé en pathologies inflammatoires de bas grade (SII) ou de haut grade (MICI).

Dans ce contexte, nos travaux combinés à ceux de la littérature suggèrent que des atteintes des CGE pourraient directement participer aux lésions de la BEI. En effet, l'induction *in vivo* de lésions des CGE reproduit partiellement certaines atteintes de la BEI précédemment décrites. Ainsi, l'atteinte des CGE induit une augmentation de la perméabilité de la BEI (Aube et al., 2006; Savidge et al., 2007) qui conduit au développement d'une jéjuno-iléite fulminante (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001). De manière intéressante, l'ablation de la glie induit également une hyperprolifération des CEI, caractérisée en particulier par une hyperplasie des cryptes, mais les parts respectives de l'inflammation ou de

la perte du réseau glial dans ces processus ne sont pas définies. Par ailleurs, notre étude a montré une altération du réseau des CGE à distance de la tumeur suggérant que cette perte de CGE pourrait favoriser les processus de carcinogénèse.

Des lésions des CGE sont aussi observées dans des pathologies humaines présentant des atteintes de la BEI, même si pour l'instant les résultats restent difficiles à intégrer dans un schéma physiopathologique clair. Néanmoins, on observe une diminution de l'expression de marqueurs des CGE dans les zones non inflammatoires intestinales au cours de la maladie de Crohn (Cornet et al., 2001). Cette perte d'expression de S-100 β et de GFAP pourrait être associée avec une perte de CGE et ainsi, être en partie responsable de la perméabilité paracellulaire accrue dans ces zones (Ma, 1997). Il reste à déterminer si de telles lésions existent chez des apparentés sains de patients présentant une augmentation de la perméabilité pour renforcer le rôle causal de la perte gliale sur l'altération de la perméabilité intestinale (Soderholm et al., 1999). De plus, la perte de CGE dans la maladie de Crohn pourrait également ralentir les processus de réparation de la BEI et ainsi contribuer au processus de rechute dans la maladie de Crohn.

De manière surprenante, une augmentation de l'expression d'un des marqueurs gliaux est observée au cours de la RCH (rectocolite hémorragique) ou dans la maladie de Chagas pouvant refléter dans ce cas une réponse adaptatrice des CGE à leur environnement inflammatoire (Cornet et al., 2001; da Silveira et al., 2009). En effet, des études ont montré que différentes cytokines pro-inflammatoires induisent une modification du phénotype des CGE, caractérisée par une augmentation de la proportion de CGE GFAP immunoréactives (von Boyen et al., 2004). Il demeure débattu si cette augmentation de l'expression de la GFAP est associée ou non à une augmentation de la prolifération des CGE. En effet, *in vivo*, l'induction d'une inflammation intestinale entraîne une augmentation de la prolifération des CGE qui est reproduite *in vitro* par l'IL-10 à forte concentration (Bradley et al., 1997; Ruhl et

al., 2001b). En revanche, l'IL-1 β induit une augmentation de l'expression de la GFAP sans induire de prolifération des CGE voire en l'inhibant à de fortes concentrations (Ruhl et al., 2001b; von Boyen et al., 2004) .

L'impact fonctionnel de la réponse gliale à un environnement inflammatoire, encore appelée glie réactive, reste encore peu connu. Néanmoins, des études tendent à conforter un rôle protecteur des CGE sur la BEI en conditions inflammatoires. En effet, les CGE sécrètent des facteurs possédant un effet anti-inflammatoire sur la BEI tels que la neurotrophin-3 et le NGF, dont l'expression est augmentée en conditions inflammatoires (Hoehner et al., 1996; Reinshagen et al., 2000; von Boyen et al., 2006). De plus, la sécrétion d'IL-6 par les CGE (Ruhl et al., 2001a), stimulée en conditions inflammatoires, pourrait avoir un effet protecteur sur les fonctions de la BEI (Wang et al., 2007a) . Cette réponse gliale peut être mise en perspective avec les données obtenues récemment sur la glie réactive dans le SNC. Longtemps considérée comme néfaste, il apparaît de plus en plus clair que la glie réactive possède des propriétés bénéfiques majeures lors de lésions du SNC en favorisant les phénomènes de réparation (Bush et al., 1999; Sofroniew, 2005). Néanmoins, il reste à définir si la glie réactive favorise les processus de réparation de la BEI et quel est son rôle dans le contrôle de la prolifération des CEI.

Nos travaux suggèrent donc un rôle important des CGE non seulement en physiologie digestive mais aussi au cours de pathologies digestives et plus particulièrement dans celles associées à des atteintes de la BEI. En particulier, il conviendrait à l'avenir d'examiner plus précisément le rôle des CGE dans le développement de pathologies telles que le SII ou les MICI ainsi que lors de cancers colorectaux. Ces cellules constituent probablement une nouvelle cible thérapeutique dans la prise en charge de ces pathologies. En particulier, le renforcement de leurs capacités protectrices (par des approches nutritionnelles) ou l'identification de nouveaux facteurs gliaux ouvrent des perspectives intéressantes.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse associé aux travaux récents d'autres équipes a permis de renforcer le concept émergeant selon lequel les cellules gliales entériques (CGE) jouent un rôle protecteur majeur sur la barrière épithéliale intestinale (BEI). Plus particulièrement, nous avons montré que les CGE inhibaient *in vitro* et *in vivo* la prolifération de cellules épithéliales intestinales (CEI) normales et tumorales, en partie *via* la sécrétion de TGF- β 1. Nous avons également montré que les CGE augmentaient la réparation de la BEI *via* l'induction de l'étalement des CEI médiée en partie par des voies FAK- et EGFR-dépendantes et par la sécrétion de proEGF par les CGE. Des études transcriptomiques ont permis d'identifier des cibles moléculaires potentiellement impliquées dans ces effets ainsi que d'autres fonctions potentiellement régulées par les CGE telles que l'adhésion ou la différenciation des CEI. Elles ont également suggéré un rôle joué par les CGE dans le contrôle des voies métaboliques des CEI. L'ensemble de nos données confèrent donc un rôle central aux CGE dans la régulation des fonctions impliquées dans le maintien de l'homéostasie de la BEI. En outre, ces travaux s'inscrivent dans un concept émergeant permettant d'établir un véritable parallélisme à la fois organisationnel et probablement aussi fonctionnel entre les CGE et les astrocytes centraux dans le contrôle de la BEI et de la BHE (barrière hémato-encéphalique), respectivement (Figure 29).

En outre, nos travaux permettent aussi de renforcer l'importance du rôle du microenvironnement cellulaire de la BEI dans le contrôle de ses fonctions et d'identifier un nouvel acteur, i.e. les CGE. La capacité des CGE à réguler la BEI est probablement directe mais passe aussi vraisemblablement par une modulation des cellules de son environnement, en particulier des neurones entériques dont le rôle dans le contrôle de la BEI a d'ores et déjà

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

été établi. Néanmoins, comparativement aux neurones, les CGE pourraient présenter l'avantage de réguler la BEI de manière constitutive, contrairement aux neurones qui régulent la BEI de manière inductible, i.e. *via* leur activation. Aussi, cette régulation confère probablement un rôle plus « important » aux CGE qu'aux neurones dans la régulation des fonctions de la BEI.

Ce travail ouvre également des perspectives d'études du rôle des CGE dans différentes pathologies inflammatoires du tube digestif présentant des atteintes des fonctions de la BEI telles que le SII, les MICI et aussi dans les processus de carcinogénèse colorectale. En particulier, une meilleure compréhension de la réponse des CGE à un environnement inflammatoire et son impact sur leur contrôle de la BEI permettra de mieux appréhender son rôle en physiopathologie digestive. En outre, de part les similitudes avec les astrocytes du SNC régulant la BHE, l'étude des interactions CGE/ CEI pourrait être étendue aux interactions CGE/ cellules endothéliales, en particulier dans le contrôle de l'angiogénèse. Enfin, cette étude identifie les CGE comme nouvelle cible thérapeutique, en particulier comme une source d'agents à la fois préventifs visant à renforcer la BEI et aussi curatifs visant à favoriser les processus de réparation de la BEI.

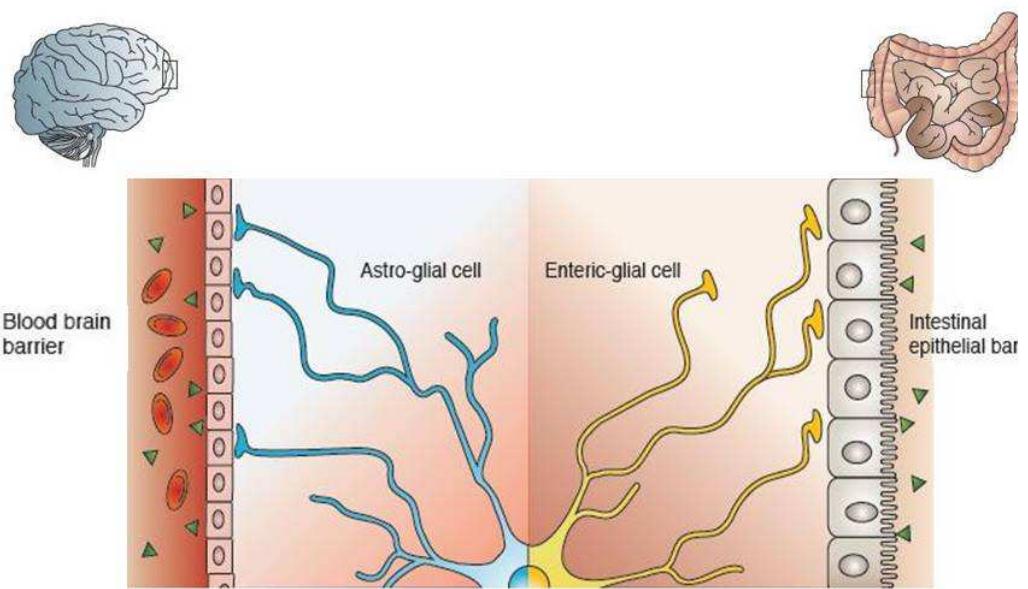


Figure 29 : La cellule gliale entérique : l'astrocyte de l'intestin

Il existe un concept émergeant établissant un parallèle à la fois organisationnel et fonctionnel entre les cellules gliales entériques et les astrocytes centraux dans le contrôle de la barrière épithéliale intestinale et de la barrière hémato-encéphalique, respectivement.
D'après Savidge et al, 2007.

ANNEXE :

**INTERACTIONS NEURO-GLIALES DANS LES MALADIES
INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN (REVUE)**

Cette revue a été publiée en 2008 dans *Journal of Internal Medicine*.

Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease

■ M. Neunlist^{1,2,3}, L. Van Landeghem^{1,2,3}, A. Bourreille^{1,2,3} & T. Savidge⁴

From the ¹INSERM, U913, Nantes, France; ²Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France; ³CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France; and ⁴Department of Gastroenterology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

Abstract. Neunlist M, Van Landeghem L, Bourreille A, Savidge T (INSERM, U913, Université de Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France; and University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA). Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease (Review). *J Intern Med* 2008; **263**: 577–583.

Inflammatory bowel disease (IBD) is a multifactorial disease in which environmental, immune and genetic factors are involved in the pathogenesis. Although biological therapies (antibodies anti-tumour necrosis factor- α or anti-integrin) have considerably improved the symptoms and quality of life of IBD patients, some drawbacks have emerged limiting their long-term use. In addition, prevention of relapses and treatment of resistant ulcers remains a clinical challenge. In this context, a better understanding of the patho-

physiology of IBD and the development of novel therapeutic intervention would benefit from further basic and preclinical research into the role of the cellular microenvironment and the interaction between its cellular constituents. In this context, the role of the enteric nervous system (ENS) in the regulation of the intestinal epithelial barrier (IEB) and the gut immune response has fuelled an increased interest in the last few years. Recent advances, summarized in this review, have highlighted the ENS as playing a key role in the control of IEB functions and gut immune homeostasis, and that alterations of the ENS could be directly associated in the development of IBD and its associated symptoms.

Keywords: Crohn's disease, inflammation, neuroscience, physiology, ulcerative colitis.

Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a multifactorial disease in which environmental, immune and genetic factors are involved in the pathogenesis. IBD mainly manifests as two clinical diseases, ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Over the years research into the control of the immune response in IBD has led to the development of biological therapies such as antibodies anti-tumour necrosis factor- α (TNF- α) or anti-integrin. These treatments have considerably improved the symptoms and quality of life of IBD patients. However, some drawbacks during these treatments have emerged such as increased risk of developing infectious diseases or cancer limiting their long-term use. In addition, groups of patients are still resistant to these treatments and many patients,

initially responders, develop progressive resistance or intolerance. Besides the considerable development of biological therapy, the prevention of relapses still remains a major clinical challenge.

Several lines of evidence suggest that besides genetic factors associated with a dysregulation of the immune response (mutation in Card15/Nod2, DLG5 or OCTN1 genes), alterations of intestinal epithelial barrier (IEB) permeability play an important role in IBD [1]. The IEB consists of a monolayer of proliferating and differentiating intestinal epithelial cells held together by adherent and tight junctions. Tight junctions control paracellular permeability and cell polarity [2]. They are composed of transmembrane proteins (occludin, claudins, junctional adherent molecules) connected to the cytoskeleton via a complex of

multiple proteins [Zonula Occludens (ZO)-1, ZO-2]. Concerning IBD, an increase in intestinal permeability is often observed prior to relapse of CD [3] and prior to ileal inflammation [4]. Increased intestinal permeability also occurs in asymptomatic first-degree relatives of CD patients [5]. In an animal model of CD (SAMP mouse), inflammation occurred after an elevation in small intestine permeability following weaning [6]. Furthermore, during inflammation, further barrier dysfunction can be induced by cytokines such as interferon- γ and TNF- α . Besides changes in tight junction integrity, other parameters of the IEB are altered during IBD, such as defects in wound healing and/or increased electrolyte secretion. Finally, IBD patients are also at increased risk of developing colorectal cancer. Therefore, approaches aimed at reinforcing or re-establishing IEB functions could be of interest both in the prevention of relapses, and in the treatment of IBD-associated barrier dysfunction.

In this context, a better understanding of the pathophysiology of IBD and methods of therapeutic intervention would benefit from further basic and preclinical research into the role of the cellular microenvironment and the interactions between its constituents. In this context, the role of the enteric nervous system (ENS) in the regulation of the IEB and the gut immune response has fuelled an increased interest in the last few years. Recent advances have highlighted the ENS as playing a key role in the control of IEB functions and gut immune homeostasis, and that alterations of the ENS could

be directly associated in the development of IBD and its associated symptoms.

The enteric nervous system

The ENS is an integrated neuronal network containing over 100 millions of neurones and four to ten times more glial cells (as many as in the spinal cord) distributed along the entire gastrointestinal (GI) tract [7] (Fig. 1a). The ENS is organized in a submucosal plexus (or Meissner's plexus) located between the mucosa and the circular muscle, and a myenteric plexus (or Auerbach's plexus) located between the circular and longitudinal muscle layers [8]. In contrast to the innervation of other organs, the ENS is able to control GI functions independently of the central nervous system (CNS). This control is mediated via the release of neuronal and/or glial factors targeting different cellular constituents of the gut (muscle, epithelial, endothelial or immune cells) (Fig. 1b,c). Detection of environmental stimuli (e.g. mechanical, chemical, nutritional or bacterial) by enteric neurones induces activation of neuronal reflexes controlling motility and secretory responses. Schematically, neurones of the submucosal plexus are involved in the control of mucosal functions whilst the myenteric neurones regulate motor functions. Besides neurones, enteric glial cells (EGC) can also directly or indirectly (via their modulation of neuronal functions) control GI functions [9, 10]. These cells have morphological characteristics and express markers (glial fibrillary acidic protein (GFAP), S-100 β) identical to astrocytes

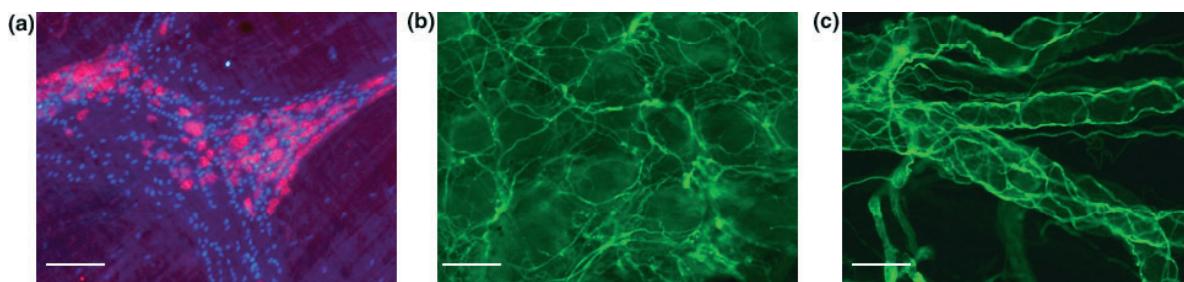


Fig. 1 Expression of neuroglial markers in the enteric nervous system. Enteric glial cells (identified with Sox-10 antibody; blue) outnumber enteric neurones (identified with Hu antibody; red) in the myenteric plexus of monkeys (a; scale bar: 100 μ m). Enteric glial cells (identified with S-100 β antibody) densely innervate the crypts of the human colon (b) and ensheathe human colonic blood vessels (c; scale bar: 25 μ m).

of the CNS. By analogy with their counterparts in the brain, EGC are probably major regulators of barrier and neuronal functions in the gut.

The ENS and control of barrier functions

Besides the well-known role of enteric neurones in controlling electrolyte secretion/absorption, they also play a key role in the control of intestinal paracellular permeability and cell proliferation. In particular, activation of enteric neurones decreases paracellular permeability, via the liberation of vasoactive intestinal peptide (VIP). This effect upon permeability is concomitant with a neuronally induced increase in ZO-1 mRNA and protein expression in intestinal epithelial cells [11]. Besides VIP, another major enteric neuromediator, acetylcholine (Ach), increases paracellular permeability [12], setting the basis for a fine ‘tuning’ of the IEB permeability by the ENS. Less is known about the neuronal control of transcellular

permeability, although Ach has been shown to increase transcellular permeability [13]. Interestingly, liberation of VIP by enteric neurones was also shown to inhibit intestinal epithelial cell proliferation and to maintain IEB integrity [14].

Besides neurones, EGC control IEB functions following a similar paradigm than central astrocytes in relation to the blood–brain barrier [9]. Indeed, ablation of EGC induces an increase in intestinal vascular permeability and also an increase in IEB paracellular permeability prior to signs of inflammation [15–18]. Furthermore, *in vitro* data of co-culture models of EGC with intestinal epithelial cell lines have shown that EGC decrease IEB permeability (Fig. 2c) in part via the liberation of a recently identified glial factor, GSNO (*S*-nitrosoglutathione), and the regulation of ZO-1 and occludin expression [18]. Moreover, EGC were able to strongly inhibit intestinal epithelial cell proliferation in part by their release of transforming

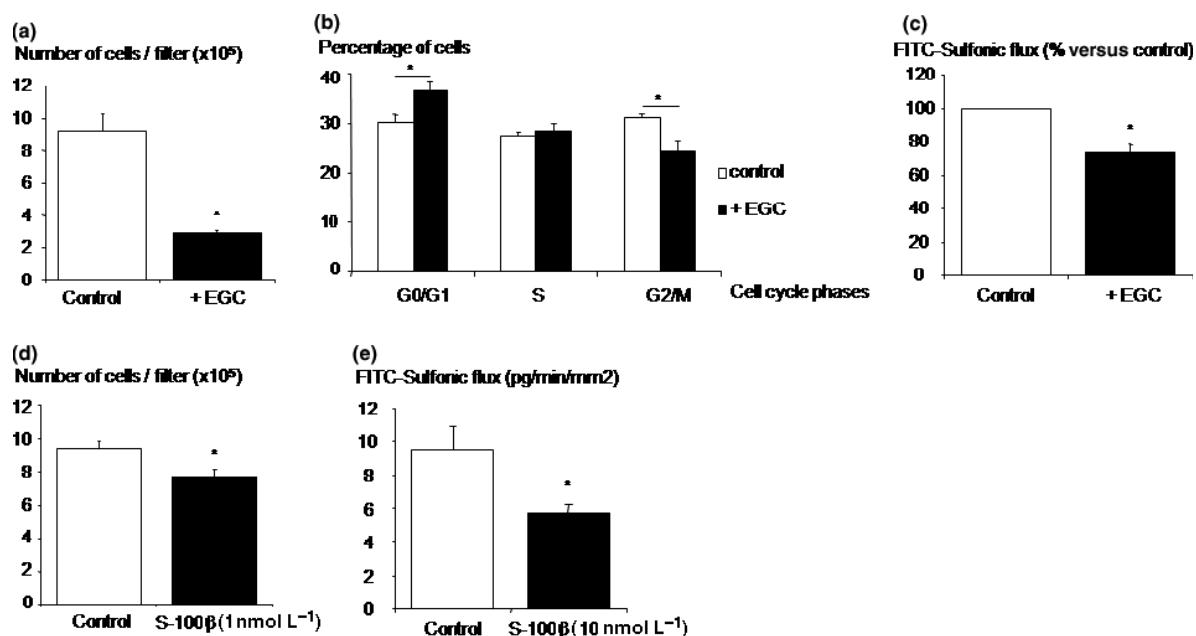


Fig. 2 Noncontact coculture of enteric glial cells (EGC) with nonconfluent intestinal epithelial cells (IEC; Caco-2) induces a significant decrease in IEC cell number (a) mediated in part via a G0/G1 cell cycle arrest ($n = 6$; $P < 0.05$) (b). Effects of EGC upon IEC are reproduced in part by S100 β (1 nmol L⁻¹), which significantly reduces IEC cell number (d). Noncontact coculture of EGC with confluent IEC reduces paracellular permeability as assessed by measuring the FITC-sulphonic acid flux across the monolayer (c). In human colonic biopsies, S100 β (10 nmol L⁻¹) significantly reduced FITC-sulphonic acid flux compared to control ($n = 5$; $P < 0.05$) (e).

growth factor β -1 (TGF β -1) [19]. Interestingly, ablation of EGC *in vivo* leads to an increased uptake of thymidine in intestinal epithelial cells and crypt hyperplasia [19]. Antiproliferative effects of EGC could be mediated by a combined effect on stimulation of cell spreading [19] that would induce cell contact-mediated inhibition of proliferation and/or cell cycle arrest in G0/G1 phase (Fig. 2a,b). Glial mediators such as S-100 β (Fig. 2d,e) or others remaining to be identified could also be involved in the effects of EGC upon barrier functions. All these data highlight the potential key role of EGC in the control of IEB functions.

The ENS and control of the gut immune system

Increasing interest in the neuronal control of intestinal inflammation has recently emerged in particular following the demonstration of vagal anti-inflammatory pathways [20–22]. A rapid neuronal control of intestinal inflammation could regulate frequently occurring small mucosal damage, sparing the larger challenges for the immune system.

Recently, the anti-inflammatory effects of the cholinergic vagal pathways have been demonstrated in the gut. In particular, vagotomy and cholinergic antagonist worsen inflammation in animal models of colitis [22, 23]. Furthermore, direct vagal stimulation significantly promotes the recovery of postoperative ileus, in part via its anti-inflammatory effects [22]. Interestingly, nicotine has also been shown to be beneficial in subgroups of patients with UC but not in CD [23, 24, 25]. In this context, the stimulation of vagal pathways via pacemakers or via nutritional factors such as dietary fat [26] could be a novel and interesting therapeutic approach during intestinal inflammation. In contrast to vagal pathways, the role of sympathetic pathways in the control of gut immune response remains largely unknown, although their activation could have pro-inflammatory effects. Indeed, noradrenaline favours migration of immune cells [27]. In addition, a case report has shown that activation of SNS induced relapse in a patient with UC. Only pharmacological doses of noradrenaline via β -receptor have anti-inflammatory effects [27].

The immunomodulatory role of the ENS remains to be fully established, although the ENS is probably involved in the vagal-mediated anti-inflammatory effects by being its 'final arm'. However, besides Ach, other enteric neuromediators have been shown to control gut immune response. Of particular interest, VIP has been shown to reduce the clinical and histopathologic severity of trinitrobenzene sulphonate-induced colitis, abrogating diarrhoea, and macroscopic and microscopic intestinal inflammation. The effects of VIP were associated with a down-regulation of the inflammatory response [28]. By contrast, Substance P (SP) has pro-inflammatory effects. Indeed, SP increases secretion of pro-inflammatory cytokines by macrophages or mast cells [29] and gut inflammation is reduced by neurokinin receptor antagonists [30]. Finally, enteric neurones themselves can directly secrete inflammatory mediators such as IL-8 which was shown to potentiate mucosal IL-8 secretion in response to mucosal challenge with toxin B of *Clostridium difficile* [31].

A similar role could also be played by EGC as they respond to intestinal inflammation by (i) proliferating [32] and (ii) producing inflammatory cytokines such as IL-6 [33]. Conversely, EGC could also inhibit inflammation as they secrete mediators such as nerve growth factor and neurotrophin-3 which have anti-inflammatory properties in animal models of colitis [34, 35].

In conclusion, recent data suggest that the gut immune system is under the control of a neuro-glial regulation. If altered, these pathways may not be able to respond adequately to challenges facing the gut. It remains to be determined whether these pathways, controlling gut immune homeostasis in health, could also be altered during chronic inflammation and would therefore be unable to play their appropriate regulatory role.

Alterations of the ENS in IBD

In view of the role of the ENS in regulating gut homeostasis, alterations of the ENS could participate in the initiation/perpetuation of the disease and its

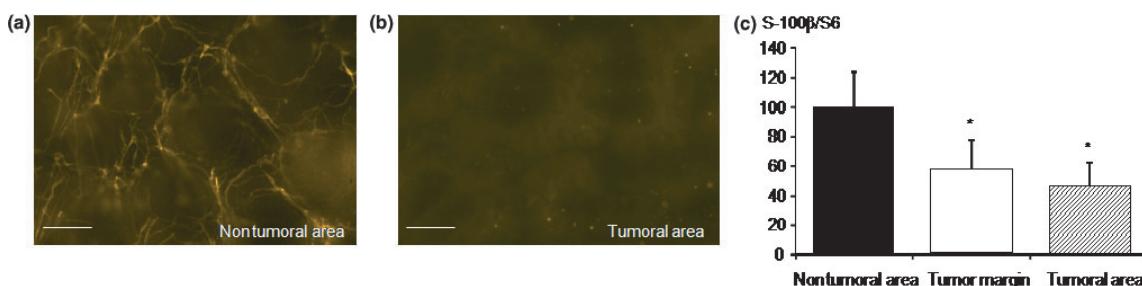


Fig. 3 Expression of enteric glial cell (EGC) marker S-100 β is reduced in human colonic mucosa in the tumour (b; scale bar: 100 μ m) compared with mucosa distant from the tumour (a; scale bar: 100 μ m). In addition, S-100 β mRNA expression in human colonic biopsies was significantly lower in the tumour and at the tumour margin (in macroscopically healthy area) compared with the nontumoral area (c).

associated symptoms. Alterations of the ENS during IBD have been nicely reviewed in great detail by different authors [36, 37]. However, it is currently difficult to integrate these changes along the pathogenic evolution of IBD and also their functional consequences as the observations depend on the analytical methods, the animal models or the pathologies studied. However, a global picture emerges where three major groups of ENS alterations are present simultaneously or separately in the pathogenesis of IBD: changes in electrophysiological properties of neurones, in their neurochemical coding and in their survival. Inflammation and inflammatory mediators increase neuronal and synaptic activity leading to hyperactivation of gut functions observed in IBD such as diarrhoea, increased motility and vasodilatation. Changes in the neurochemical phenotype (i.e. neuromediator content) observed in various inflammatory conditions can also be directly involved in altered gut functions. For instance, increase in mediators such as VIP observed in CD [38] could be seen as an adaptive response of the ENS to control intestinal inflammation, re-establish intestinal barrier functions and increase neuroprotection. Conversely, the increase in SP observed in UC [39] could directly participate in the inflammatory response, increase intestinal permeability and motility observed in these patients. Finally, neurodegeneration has been shown to occur in IBD, in particular in CD [40]. Interestingly, whether repair of the ENS is associated with neuronal renewal remains a challenging concept, especially as progenitor-like cells have been identified in the ENS [41].

Changes in EGC observed in IBD could also be a major link between the alterations in neuronal functions described above. Indeed, EGC have been shown to control (by analogy with their central counterpart, i.e. the astrocytes) enteric neuronal functions which are altered in IBD. Studies have also shown that EGC markers such as S-100 β and GFAP are differentially altered in CD and UC, with a decrease in EGC density during CD and a gliosis-like phenomenon in UC [15]. In particular, alterations of EGC have been shown to be responsible for increased barrier permeability, increased intestinal proliferation and neurochemical plasticity [9]. Interestingly, altered expression of EGC markers such as S-100 β has also been shown in colonic adenocarcinoma (Fig. 3a–c) in which inflammatory processes could play a major role, suggesting that these cells could also be involved in carcinogenesis.

Perspectives and conclusion

In the context of a multifactorial pathology such as IBD, the role of the ENS remains to be fully determined. However, although it might not be a major player in the acute inflammatory phase, the emerging role of enteric neurones and glial cells as a physiological reinforcers of the IEB might be of interest as a source of novel molecules aiming at preventing relapses or increasing IEB repair. Conversely, alterations of the regulatory mechanisms of the ENS by pathogens or by inflammation could be involved in the pathogenesis and symptoms of IBD. Therefore,

approaches aiming at preventing these enteric neuropathies might also be of therapeutical interest.

Conflict of interest statement

No conflict of interest was declared.

Acknowledgements

Due to space constraints, the authors apologize to those who were not cited. The authors also want to thank all the past and present laboratory members for their contribution. T.S. is supported by grants from the Crohn's and Colitis Foundation, and The Eli and Edythe L. Broad Foundation, Procter & Gamble. M.N., L.V.L. and A.B. are supported by INSERM, INCa. L.V.L. is a recipient of a grant of the Ministère de la Recherche et de la Technologie.

References

- Arrieta MC, Bistritz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 2006; 55: 1512–20.
- Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22: 207–35.
- Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Waldhoer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 1993; 341: 1437–9.
- Söderholm JD, Peterson KH, Olaison G *et al.* Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* 1999; 117: 65–72.
- Buhner S, Buning C, Genschel J *et al.* Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 2006; 55: 342–7.
- Olson TS, Reuter BK, Scott KG *et al.* The primary defect in experimental ileitis originates from a nonhematopoietic source. *J Exp Med* 2006; 203: 541–52.
- Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16(Suppl. 1): 55–9.
- Grundy D, Al-Chaer ED, Aziz Q *et al.* Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology* 2006; 130: 1391–411.
- Savidge TC, Sofroniew MV, Neunlist M. Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. *Lab Invest* 2007; 87: 731–6.
- Bassotti G, Villanacci V, Antonelli E, Morelli A, Salerni B. Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? *Lab Invest* 2007; 87: 628–32.
- Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T *et al.* Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G1028–36.
- Greenwood B, Mantle M. Mucin and protein release in the rabbit jejunum: effects of bethanechol and vagal nerve stimulation. *Gastroenterology* 1992; 103: 496–505.
- Cameron HL, Perdue MH. Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 47–56.
- Toumi F, Neunlist M, Cassagnau E *et al.* Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 239–42.
- Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J *et al.* Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13306–11.
- Bush TG, Savidge TC, Freeman TC *et al.* Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 1998; 93: 189–201.
- Aubé AC, Cabarrocas J, Bauer J *et al.* Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 2006; 55: 630–7.
- Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C *et al.* Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 2007; 132: 1344–58.
- Neunlist M, Aubert P, Bonnaffaud S *et al.* Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G231–41.
- Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Clin Invest* 2007; 117: 289–96.
- The FO, Boeckxstaens GE, Snoek SA *et al.* Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 2007; 133: 1219–28.
- Ghia JE, Blennerhassett P, Kumar-Ondiveeran H, Verdu EF, Collins SM. The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* 2006; 131: 1122–30.
- Ghia JE, Blennerhassett P, El-Sharkawy RT, Collins SM. The protective effect of the vagus nerve in a murine model of chronic relapsing colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G711–8.
- Pullan RD, Rhodes J, Ganesh S *et al.* Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med* 1994; 330: 811–5.
- Sandborn WJ, Tremaine WJ, Offord KP *et al.* Transdermal nicotine for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1997; 126: 364–71.
- Luyer MD, Greve JW, Hadfoune M, Jacobs JA, Dejong CH, Buurman WA. Nutritional stimulation of cholecystokinin receptors inhibits inflammation via the vagus nerve. *J Exp Med* 2005; 202: 1023–9.
- Straub RH, Wiest R, Strauch UG, Harle P, Scholmerich J. The role of the sympathetic nervous system in intestinal inflammation. *Gut* 2006; 55: 1640–9.

- 28 Abad C, Gomariz RP, Waschek JA. Neuropeptide mimetics and antagonists in the treatment of inflammatory disease: focus on VIP and PACAP. *Curr Top Med Chem* 2006; 6: 151–63.
- 29 Guo CJ, Lai JP, Luo HM, Douglas SD, Ho WZ. Substance P up-regulates macrophage inflammatory protein-1beta expression in human T lymphocytes. *J Neuroimmunol* 2002; 131: 160–7.
- 30 Weinstock JV, Blum A, Metwali A, Elliott D, Bunnett N, Arsenescu R. Substance P regulates Th1-type colitis in IL-10 knockout mice. *J Immunol* 2003; 171: 3762–7.
- 31 Tixier E, Lalanne F, Just I, Galmiche JP, Neunlist M. Human mucosa/submucosa interactions during intestinal inflammation: involvement of the enteric nervous system in interleukin-8 secretion. *Cell Microbiol* 2005; 7: 1798–810.
- 32 Bradley JS Jr, Parr EJ, Sharkey KA. Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res* 1997; 289: 455–61.
- 33 Rühl A, Franzke S, Collins SM, Stremmel W. Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G1163–71.
- 34 Reinshagen M, Rohm H, Steinkamp M *et al*. Protective role of neurotrophins in experimental inflammation of the rat gut. *Gastroenterology* 2000; 119: 368–76.
- 35 Von Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, Schäfer KH, Adler G, Kirsch J. Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines. *J Neuroendocrinol* 2006; 18: 820–5.
- 36 De Giorgio R, Guerrini S, Barbara G *et al*. Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system. *Gastroenterology* 2004; 126: 1872–83.
- 37 Lomax AE, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA. Effects of gastrointestinal inflammation on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits. *Auton Neurosci* 2006; 126–127: 250–7.
- 38 Schneider J, Jehle EC, Starlinger MJ *et al*. Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil* 2001; 13: 255–64.
- 39 Neunlist M, Aubert P, Toquet C *et al*. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 2003; 52: 84–90.
- 40 Geboes K, Collins S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol Motil* 1998; 10: 189–202.
- 41 Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* 2002; 35: 657–69.

Correspondence: Michel Neunlist PhD, INSERM U913 and Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, 1, place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France.

(fax:+33 (0) 240 087506; e-mail: michel.neunlist@univ-nantes.fr).■

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbi, S., Ueda, H., Zheng, C., Cooper, L. A., Zhao, J., Christopher, R. and Guan, J. L.** (2002). Regulation of focal adhesion kinase by a novel protein inhibitor FIP200. *Mol Biol Cell* **13**, 3178-91.
- Agochiya, M., Brunton, V. G., Owens, D. W., Parkinson, E. K., Paraskeva, C., Keith, W. N. and Frame, M. C.** (1999). Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene* **18**, 5646-53.
- Ahlman, H. and Nilsson.** (2001). The gut as the largest endocrine organ in the body. *Ann Oncol* **12 Suppl 2**, S63-8.
- Alfranca, A., Lopez-Oliva, J. M., Genis, L., Lopez-Maderuelo, D., Mirones, I., Salvado, D., Quesada, A. J., Arroyo, A. G. and Redondo, J. M.** (2008). PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGFbeta/Alk5 signaling pathway. *Blood* **112**, 1120-8.
- Allen, A., Hutton, D. A. and Pearson, J. P.** (1998). The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. *Int J Biochem Cell Biol* **30**, 797-801.
- Anderson, C. M., Mendoza, M. E., Kennedy, D. J., Raldua, D. and Thwaites, D. T.** (2003). Inhibition of intestinal dipeptide transport by the neuropeptide VIP is an anti-absorptive effect via the VPAC1 receptor in a human enterocyte-like cell line (Caco-2). *Br J Pharmacol* **138**, 564-73.
- Andoh, A., Fujino, S., Okuno, T., Fujiyama, Y. and Bamba, T.** (2002). Intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* **37 Suppl 14**, 33-7.
- Andreu, P., Peignon, G., Slomianny, C., Taketo, M. M., Colnot, S., Robine, S., Lamarque, D., Laurent-Puig, P., Perret, C. and Romagnolo, B.** (2008). A genetic study of the role of the Wnt/beta-catenin signalling in Paneth cell differentiation. *Dev Biol* **324**, 288-96.
- Anglade, P., Michel, C. and Roze, C.** (1987). Intrinsic nerves of the pancreas after celiac and superior mesenteric ganglionectomy in rats: a morphologic study of acetylcholinesterase activity and catecholamine histofluorescence. *Pancreas* **2**, 568-77.
- Aube, A. C., Cabarrocas, J., Bauer, J., Philippe, D., Aubert, P., Doulay, F., Liblau, R., Galmiche, J. P. and Neunlist, M.** (2006). Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* **55**, 630-7.
- Babyatsky, M. W., deBeaumont, M., Thim, L. and Podolsky, D. K.** (1996). Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats. *Gastroenterology* **110**, 489-97.
- Bar, K. J., Facer, P., Williams, N. S., Tam, P. K. and Anand, P.** (1997). Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* **112**, 1381-5.
- Barada, K. A., Saade, N. E., Atweh, S. F., Khoury, C. I. and Nassar, C. F.** (2000). Calcitonin gene-related peptide regulates amino acid absorption across rat jejunum. *Regul Pept* **90**, 39-45.
- Barker, N., van de Wetering, M. and Clevers, H.** (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev* **22**, 1856-64.
- Barlow, A., de Graaff, E. and Pachnis, V.** (2003). Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. *Neuron* **40**, 905-16.

- Basson, M. D.** (2003). Invited research review: Cell-matrix interactions in the gut epithelium. *Surgery* **133**, 263-7.
- Basson, M. D., Li, G. D., Hong, F., Han, O. and Sumpio, B. E.** (1996a). Amplitude-dependent modulation of brush border enzymes and proliferation by cyclic strain in human intestinal Caco-2 monolayers. *J Cell Physiol* **168**, 476-88.
- Basson, M. D., Sanders, M. A., Gomez, R., Hatfield, J., Vanderheide, R., Thamilselvan, V., Zhang, J. and Walsh, M. F.** (2006). Focal adhesion kinase protein levels in gut epithelial motility. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G491-9.
- Basson, M. D., Turowski, G. and Emenaker, N. J.** (1996b). Regulation of human (Caco-2) intestinal epithelial cell differentiation by extracellular matrix proteins. *Exp Cell Res* **225**, 301-5.
- Bassotti, G., Battaglia, E., Bellone, G., Dughera, L., Fisogni, S., Zambelli, C., Morelli, A., Mioli, P., Emanuelli, G. and Villanacci, V.** (2005). Interstitial cells of Cajal, enteric nerves, and glial cells in colonic diverticular disease. *J Clin Pathol* **58**, 973-7.
- Bassotti, G., Villanacci, V., Fisogni, S., Rossi, E., Baronio, P., Clerici, C., Maurer, C. A., Cathomas, G. and Antonelli, E.** (2007a). Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: introducing the neuro-gliopathies. *World J Gastroenterol* **13**, 4035-41.
- Bassotti, G., Villanacci, V., Maurer, C. A., Fisogni, S., Di Fabio, F., Cadei, M., Morelli, A., Panagiotis, T., Cathomas, G. and Salerni, B.** (2006). The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation. *Gut* **55**, 41-6.
- Bassotti, G., Villanacci, V., Nascimbeni, R., Asteria, C. R., Fisogni, S., Nesi, G., Legrenzi, L., Mariano, M., Tonelli, F., Morelli, A. et al.** (2007b). Colonic neuropathological aspects in patients with intractable constipation due to obstructed defecation. *Mod Pathol* **20**, 367-74.
- Bayliss, W. M. and Starling, E. H.** (1899). The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol* **24**, 99-143.
- Baynash, A. G., Hosoda, K., Giard, A., Richardson, J. A., Emoto, N., Hammer, R. E. and Yanagisawa, M.** (1994). Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* **79**, 1277-85.
- Beauchamp, R. D., Sheng, H. M., Shao, J. Y., Thompson, E. A. and Ko, T. C.** (1996). Intestinal cell cycle regulations. Interactions of cyclin D1, Cdk4, and p21Cip1. *Ann Surg* **223**, 620-7; discussion 627-8.
- Beaulieu, J. F.** (1992). Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine. *J Cell Sci* **102** (Pt 3), 427-36.
- Beaulieu, J. F. and Vachon, P. H.** (1994). Reciprocal expression of laminin A-chain isoforms along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Gastroenterology* **106**, 829-39.
- Beck, D. W., Vinters, H. V., Hart, M. N. and Cancilla, P. A.** (1984). Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier. *J Neuropathol Exp Neurol* **43**, 219-24.
- Bertrand, P. P., Kunze, W. A., Bornstein, J. C., Furness, J. B. and Smith, M. L.** (1997). Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am J Physiol* **273**, G422-35.
- Bishop, J. R., Schuksz, M. and Esko, J. D.** (2007). Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **446**, 1030-7.
- Bjerknes, M. and Cheng, H.** (2001). Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12497-502.
- Bjerknes, M. and Cheng, H.** (2006). Neurogenin 3 and the enteroendocrine cell lineage in the adult mouse small intestinal epithelium. *Dev Biol* **300**, 722-35.

- Bjorklund, H., Dahl, D. and Seiger, A.** (1984). Neurofilament and glial fibrillary acid protein-related immunoreactivity in rodent enteric nervous system. *Neuroscience* **12**, 277-87.
- Blais, A., Aymard, P. and Lacour, B.** (1997). Paracellular calcium transport across Caco-2 and HT29 cell monolayers. *Pflugers Arch* **434**, 300-5.
- 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. *Development* **122**, 309-20.
- Blikslager, A. T., Moeser, A. J., Gookin, J. L., Jones, S. L. and Odle, J.** (2007). Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev* **87**, 545-64.
- Bondurand, N., Natarajan, D., Barlow, A., Thapar, N. and Pachnis, V.** (2006). Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Development* **133**, 2075-86.
- Bornstein, J. C., Costa, M. and Grider, J. R.** (2004). Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**, 34-8.
- Bouchard, V., Demers, M. J., Thibodeau, S., Laquerre, V., Fujita, N., Tsuruo, T., Beaulieu, J. F., Gauthier, R., Vezina, A., Villeneuve, L. et al.** (2007). Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways. *J Cell Physiol* **212**, 717-28.
- Bradley, J. S., Jr., 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**, 455-61.
- Braun, N., Sevigny, J., Robson, S. C., Hammer, K., Hanani, M. and Zimmermann, H.** (2004). Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system. *Glia* **45**, 124-32.
- Brehmer, A.** (2006). Structure of enteric neurons. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **186**, 1-91.
- Breyer, J. A. and Cohen, S.** (1990). The epidermal growth factor precursor isolated from murine kidney membranes. Chemical characterization and biological properties. *J Biol Chem* **265**, 16564-70.
- Brookes, S. J., Meedeniya, A. C., Jobling, P. and Costa, M.** (1997). Orally projecting interneurones in the guinea-pig small intestine. *J Physiol* **505 (Pt 2)**, 473-91.
- Bullen, T. F., Forrest, S., Campbell, F., Dodson, A. R., Hershman, M. J., Pritchard, D. M., Turner, J. R., Montrose, M. H. and Watson, A. J.** (2006). Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. *Lab Invest* **86**, 1052-63.
- Bulut, K., Pennartz, C., Felderbauer, P., Meier, J. J., Banasch, M., Bulut, D., Schmitz, F., Schmidt, W. E. and Hoffmann, P.** (2008). Glucagon like peptide-2 induces intestinal restitution through VEGF release from subepithelial myofibroblasts. *Eur J Pharmacol* **578**, 279-85.
- Burns, A. J., Pasricha, P. J. and Young, H. M.** (2004). Enteric neural crest-derived cells and neural stem cells: biology and therapeutic potential. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**, 3-7.
- Burridge, K., Turner, C. E. and Romer, L. H.** (1992). Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol* **119**, 893-903.
- Bush, T. G., Puvanachandra, N., Horner, C. H., Polito, A., Ostenfeld, T., Svendsen, C. N., Mucke, L., Johnson, M. H. and Sofroniew, M. V.** (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* **23**, 297-308.

- 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.
- Cabarrocas, J., Savidge, T. C. and Liblau, R. S.** (2003). Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* **41**, 81-93.
- Cacalano, G., Farinas, I., Wang, L. C., Hagler, K., Forgie, A., Moore, M., Armanini, M., Phillips, H., Ryan, A. M., Reichardt, L. F. et al.** (1998). GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. *Neuron* **21**, 53-62.
- Calalb, M. B., Polte, T. R. and Hanks, S. K.** (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* **15**, 954-63.
- Cameron, H. L. and Perdue, M. H.** (2007). Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterol Motil* **19**, 47-56.
- Carlson, N. G., Wieggel, W. A., Chen, J., Bacchi, A., Rogers, S. W. and Gahring, L. C.** (1999). Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J Immunol* **163**, 3963-8.
- Cary, L. A., Han, D. C., Polte, T. R., Hanks, S. K. and Guan, J. L.** (1998). Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Cell Biol* **140**, 211-21.
- Chamberlin, W., Graham, D. Y., Hulten, K., El-Zimaity, H. M., Schwartz, M. R., Naser, S., Shafran, I. and El-Zaatari, F. A.** (2001). Review article: Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* **15**, 337-46.
- Chartier, N. T., Laine, M., Gout, S., Pawlak, G., Marie, C. A., Matos, P., Block, M. R. and Jacquier-Sarlin, M. R.** (2006). Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. *J Cell Sci* **119**, 31-46.
- Chaturvedi, L. S., Gayer, C. P., Marsh, H. M. and Basson, M. D.** (2008). Repetitive deformation activates Src-independent FAK-dependent ERK motogenic signals in human Caco-2 intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C1350-61.
- Chaturvedi, L. S., Marsh, H. M., Shang, X., Zheng, Y. and Basson, M. D.** (2007). Repetitive deformation activates focal adhesion kinase and ERK mitogenic signals in human Caco-2 intestinal epithelial cells through Src and Rac1. *J Biol Chem* **282**, 14-28.
- Chen, A. L., Soman, K. V., Rychahou, P. G., Luxon, B. A. and Evers, B. M.** (2005). Proteomic analysis of colonic myofibroblasts and effect on colon cancer cell proliferation. *Surgery* **138**, 382-90.
- Chen, H. C., Appeddu, P. A., Isoda, H. and Guan, J. L.** (1996). Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **271**, 26329-34.
- Chen, H. C., Appeddu, P. A., Parsons, J. T., Hildebrand, J. D., Schaller, M. D. and Guan, J. L.** (1995). Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem* **270**, 16995-9.
- Chiarugi, P., Pani, G., Giannoni, E., Taddei, L., Colavitti, R., Raugei, G., Symons, M., Borrello, S., Galeotti, T. and Ramponi, G.** (2003). Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. *J Cell Biol* **161**, 933-44.
- Cobb, B. S., Schaller, M. D., Leu, T. H. and Parsons, J. T.** (1994). Stable association of pp60src and pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK. *Mol Cell Biol* **14**, 147-55.

- Cooke, H. J., Sidhu, M., Fox, P., Wang, Y. Z. and Zimmermann, E. M.** (1997a). Substance P as a mediator of colonic secretory reflexes. *Am J Physiol* **272**, G238-45.
- Cooke, H. J., Sidhu, M. and Wang, Y. Z.** (1997b). Activation of 5-HT1P receptors on submucosal afferents subsequently triggers VIP neurons and chloride secretion in the guinea-pig colon. *J Auton Nerv Syst* **66**, 105-10.
- Cooke, H. J., Wang, Y. Z. and Rogers, R.** (1993). Coordination of Cl⁻ secretion and contraction by a histamine H2-receptor agonist in guinea pig distal colon. *Am J Physiol* **265**, G973-8.
- Cooke, H. J., Wunderlich, J. and Christofi, F. L.** (2003). "The force be with you": ATP in gut mechanosensory transduction. *News Physiol Sci* **18**, 43-9.
- 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**, 13306-11.
- Cornillon, J., Campos, L. and Guyotat, D.** (2003). [Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]. *Med Sci (Paris)* **19**, 743-52.
- Costa, M., Brookes, S. J. and Hennig, G. W.** (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* **47 Suppl 4**, iv15-9; discussion iv26.
- Cox, B. D., Natarajan, M., Stettner, M. R. and Gladson, C. L.** (2006). New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. *J Cell Biochem* **99**, 35-52.
- D'Amore, P. A.** (1990). Modes of FGF release in vivo and in vitro. *Cancer Metastasis Rev* **9**, 227-38.
- da Silveira, A. B., Freitas, M. A., de Oliveira, E. C., Neto, S. G., Luquetti, A. O., Furness, J. B., Correa-Oliveira, R. and Reis, D.** (2009). Glial fibrillary acidic protein and S-100 colocalization in the enteroglial cells in dilated and nondilated portions of colon from chagasic patients. *Hum Pathol* **40**, 244-51.
- Dedhar, S. and Hannigan, G. E.** (1996). Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 657-69.
- Dignass, A., Lynch-Devaney, K., Kindon, H., Thim, L. and Podolsky, D. K.** (1994). Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J Clin Invest* **94**, 376-83.
- Dignass, A. U., Becker, A., Spiegler, S. and Goebell, H.** (1998). Adenine nucleotides modulate epithelial wound healing in vitro. *Eur J Clin Invest* **28**, 554-61.
- Ebnet, K.** (2008). Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochem Cell Biol* **130**, 1-20.
- Esposito, G., Cirillo, C., Sarnelli, G., De Filippis, D., D'Armiento, F. P., Rocco, A., Nardone, G., Petruzzelli, R., Grosso, M., Izzo, P. et al.** (2007). Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease. *Gastroenterology* **133**, 918-25.
- Etienne-Manneville, S.** (2008). Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene* **27**, 6970-80.
- Ferri, G. L., Probert, L., Cocchia, D., Michetti, F., Marangos, P. J. and Polak, J. M.** (1982). Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature* **297**, 409-10.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D. and Huelsken, J.** (2007). Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol* **27**, 7551-9.
- Fletcher, E. L., Clark, M. J. and Furness, J. B.** (2002). Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus. *Cell Tissue Res* **308**, 339-46.

- Forster, C.** (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* **130**, 55-70.
- Fritsch, C., Swietlicki, E. A., Lefebvre, O., Kedinger, M., Iordanov, H., Levin, M. S. and Rubin, D. C.** (2002). Epimorphin expression in intestinal myofibroblasts induces epithelial morphogenesis. *J Clin Invest* **110**, 1629-41.
- Fujita, H., Kamiguchi, K., Cho, D., Shibanuma, M., Morimoto, C. and Tachibana, K.** (1998). Interaction of Hic-5, A senescence-related protein, with focal adhesion kinase. *J Biol Chem* **273**, 26516-21.
- Fujita, T., Tozaki-Saitoh, H. and Inoue, K.** (2009). P2Y1 receptor signaling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6 release in hippocampal cultures. *Glia* **57**, 244-57.
- Furness, J. B.** (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* **81**, 87-96.
- Furness, J. B., Bornstein, J. C. and Trussell, D. C.** (1988). Shapes of nerve cells in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine revealed by the intracellular injection of dye. *Cell Tissue Res* **254**, 561-71.
- Furness, J. B., Jones, C., Nurgali, K. and Clerc, N.** (2004a). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol* **72**, 143-64.
- 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., Robbins, H. L., Xiao, J., Stebbing, M. J. and Nurgali, K.** (2004b). Projections and chemistry of Dogiel type II neurons in the mouse colon. *Cell Tissue Res* **317**, 1-12.
- Gabella, G.** (1981). Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience* **6**, 425-36.
- Galligan, J. J., LePard, K. J., Schneider, D. A. and Zhou, X.** (2000). Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* **81**, 97-103.
- Garcia, C. M., Darland, D. C., Massingham, L. J. and D'Amore, P. A.** (2004). Endothelial cell-astrocyte interactions and TGF beta are required for induction of blood-neural barrier properties. *Brain Res Dev Brain Res* **152**, 25-38.
- Garrod, D. R., Merritt, A. J. and Nie, Z.** (2002). Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 537-45.
- Gauthier, R., Harnois, C., Drolet, J. F., Reed, J. C., Vezina, A. and Vachon, P. H.** (2001). Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C1540-54.
- 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**, 439-47.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. and Yamada, K. M.** (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 793-805.
- Gershon, M. D.** (1998). V. Genes, lineages, and tissue interactions in the development of the enteric nervous system. *Am J Physiol* **275**, G869-73.
- Gershon, M. D. and Bursztajn, S.** (1978). Properties of the enteric nervous system: limitation of access of intravascular macromolecules to the myenteric plexus and muscularis externa. *J Comp Neurol* **180**, 467-88.
- Gershon, M. D. and Rothman, T. P.** (1991). Enteric glia. *Glia* **4**, 195-204.
- Girault, J. A., Labesse, G., Mornon, J. P. and Callebaut, I.** (1998). Janus kinases and focal adhesion kinases play in the 4.1 band: a superfamily of band 4.1 domains important for cell structure and signal transduction. *Mol Med* **4**, 751-69.

- Girault, J. A., Labesse, G., Mornon, J. P. and Callebaut, I.** (1999). The N-termini of FAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains. *Trends Biochem Sci* **24**, 54-7.
- Goke, M., Zuk, A. and Podolsky, D. K.** (1996). Regulation and function of extracellular matrix intestinal epithelial restitution in vitro. *Am J Physiol* **271**, G729-40.
- Grundy, D., Al-Chaer, E. D., Aziz, Q., Collins, S. M., Ke, M., Tache, Y. and Wood, J. D.** (2006). Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology* **130**, 1391-411.
- Guo, J. Y., Huo, H. R., Zhao, B. S., Liu, H. B., Li, L. F., Guo, S. Y. and Jiang, T. L.** (2006). Effect of 3-Phenyl-2-Propene-1-ol on PGE2 release from rat cerebral microvascular endothelial cells stimulated by IL-1beta. *Am J Chin Med* **34**, 685-93.
- Guo, X., Merlin, D., Harvey, R. D., Laboisson, C. and Hopfer, U.** (1997). Pharmacological evidence that calcium is not required for P2-receptor-stimulated Cl⁻ secretion in HT29-Cl.16E. *J Membr Biol* **155**, 239-46.
- Halassa, M. M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J. H. and Haydon, P. G.** (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci* **27**, 6473-7.
- Hallgren, A., Flemstrom, G. and Nylander, O.** (1998). Interaction between neurokinin A, VIP, prostanooids, and enteric nerves in regulation of duodenal function. *Am J Physiol* **275**, G95-103.
- Halttunen, T., Marttinen, A., Rantala, I., Kainulainen, H. and Maki, M.** (1996). Fibroblasts and transforming growth factor beta induce organization and differentiation of T84 human epithelial cells. *Gastroenterology* **111**, 1252-62.
- Han, D. C. and Guan, J. L.** (1999). Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration. *J Biol Chem* **274**, 24425-30.
- Hanani, M., Francke, M., Hartig, W., Grosche, J., Reichenbach, A. and Pannicke, T.** (2000). Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**, G644-51.
- 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**, 153-60.
- Hanks, S. K., Calab, M. B., Harper, M. C. and Patel, S. K.** (1992). Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8487-91.
- Hansen, M. B.** (2003). The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol Toxicol* **92**, 105-13.
- Harte, M. T., Hildebrand, J. D., Burnham, M. R., Bouton, A. H. and Parsons, J. T.** (1996). p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. *J Biol Chem* **271**, 13649-55.
- Hassel, B., Paulsen, R. E., Johnsen, A. and Fonnum, F.** (1992). Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res* **576**, 120-4.
- Hayashi, H., Suzuki, T., Yamamoto, T. and Suzuki, Y.** (2003). Cholinergic inhibition of electrogenic sodium absorption in the guinea pig distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**, G617-28.
- Hayden, U. L. and Carey, H. V.** (2000). Neural control of intestinal ion transport and paracellular permeability is altered by nutritional status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**, R1589-94.
- Haydon, P. G. and Carmignoto, G.** (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* **86**, 1009-31.
- Heaney, 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**, 466-79.

- Heizmann, C. W.** (2002). The multifunctional S100 protein family. *Methods Mol Biol* **172**, 69-80.
- Hildebrand, J. D., Schaller, M. D. and Parsons, J. T.** (1993). Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *J Cell Biol* **123**, 993-1005.
- Hildebrand, J. D., Schaller, M. D. and Parsons, J. T.** (1995). Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Biol Cell* **6**, 637-47.
- Hildebrand, J. D., Taylor, J. M. and Parsons, J. T.** (1996). An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* **16**, 3169-78.
- Hines, O. J., Ryder, N., Chu, J. and McFadden, D.** (2000). Lysophosphatidic acid stimulates intestinal restitution via cytoskeletal activation and remodeling. *J Surg Res* **92**, 23-8.
- Hirota, C. L. and McKay, D. M.** (2006). Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. *Br J Pharmacol* **149**, 463-79.
- 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.
- Hoehner, J. C., Wester, T., Pahlman, S. and Olsen, L.** (1996). Localization of neurotrophins and their high-affinity receptors during human enteric nervous system development. *Gastroenterology* **110**, 756-67.
- Hoff, S., Zeller, F., von Weyhern, C. W., Wegner, M., Schemann, M., Michel, K. and Ruhl, 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**, 356-71.
- Hosoda, K., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Baynash, A. G., Cheung, J. C., Giard, 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**, 1267-76.
- Houde, M., Laprise, P., Jean, D., Blais, M., Asselin, C. and Rivard, N.** (2001). Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J Biol Chem* **276**, 21885-94.
- Hsia, D. A., Mitra, S. K., Hauck, C. R., Streblow, D. N., Nelson, J. A., Ilic, D., Huang, S., Li, E., Nemerow, G. R., Leng, J. et al.** (2003). Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol* **160**, 753-67.
- Huber, M. A., Kraut, N. and Beug, H.** (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 548-58.
- Humphries, M. J.** (1996). Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 632-40.
- Ismail, A. S. and Hooper, L. V.** (2005). Epithelial cells and their neighbors. IV. Bacterial contributions to intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G779-84.
- Janzer, R. C. and Raff, M. C.** (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* **325**, 253-7.
- Jensen, J., Pedersen, E. E., Galante, P., Hald, J., Heller, R. S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P. and Madsen, O. D.** (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* **24**, 36-44.
- Jessen, K. R. and Mirsky, R.** (1983). Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J Neurosci* **3**, 2206-18.
- Jessen, K. R. and Mirsky, R.** (1985). Glial fibrillary acidic polypeptides in peripheral glia. Molecular weight, heterogeneity and distribution. *J Neuroimmunol* **8**, 377-93.

- Kaspar, M., Zardi, L. and Neri, D.** (2006). Fibronectin as target for tumor therapy. *Int J Cancer* **118**, 1331-9.
- Kato, H., Yamamoto, T., Yamamoto, H., Ohi, R., So, N. and Iwasaki, Y.** (1990). Immunocytochemical characterization of supporting cells in the enteric nervous system in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* **25**, 514-9.
- Kedinger, M., Lefebvre, O., Duluc, I., Freund, J. N. and Simon-Assmann, P.** (1998). Cellular and molecular partners involved in gut morphogenesis and differentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**, 847-56.
- Kelsh, R. N.** (2006). Sorting out Sox10 functions in neural crest development. *Bioessays* **28**, 788-98.
- Kim, M., Cooke, H. J., Javed, N. H., Carey, H. V., Christofi, F. and Raybould, H. E.** (2001a). D-glucose releases 5-hydroxytryptamine from human BON cells as a model of enterochromaffin cells. *Gastroenterology* **121**, 1400-6.
- Kim, M., Javed, N. H., Yu, J. G., Christofi, F. and Cooke, H. J.** (2001b). Mechanical stimulation activates Galphaq signaling pathways and 5-hydroxytryptamine release from human carcinoid BON cells. *J Clin Invest* **108**, 1051-9.
- Kim, S. H. and Kim, S. H.** (2008). Antagonistic effect of EGF on FAK phosphorylation/dephosphorylation in a cell. *Cell Biochem Funct* **26**, 539-47.
- Kimball, B. C. and Mulholland, M. W.** (1996). Enteric glia exhibit P2U receptors that increase cytosolic calcium by a phospholipase C-dependent mechanism. *J Neurochem* **66**, 604-12.
- Kirchgessner, A. L., Adlersberg, M. A. and Gershon, M. D.** (1992a). Colonization of the developing pancreas by neural precursors from the bowel. *Dev Dyn* **194**, 142-54.
- Kirchgessner, A. L., Liu, M. T. and Gershon, M. D.** (1996). In situ identification and visualization of neurons that mediate enteric and enteropancreatic reflexes. *J Comp Neurol* **371**, 270-86.
- Kirchgessner, A. L., Tamir, H. and Gershon, M. D.** (1992b). 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* **12**, 235-48.
- Ko, T. C., Yu, W., Sakai, T., Sheng, H., Shao, J., Beauchamp, R. D. and Thompson, E. A.** (1998). TGF-beta1 effects on proliferation of rat intestinal epithelial cells are due to inhibition of cyclin D1 expression. *Oncogene* **16**, 3445-54.
- Kolachala, V. L., Bajaj, R., Wang, L., Yan, Y., Ritzenthaler, J. D., Gewirtz, A. T., Roman, J., Merlin, D. and Sitaraman, S. V.** (2007). Epithelial-derived fibronectin expression, signaling, and function in intestinal inflammation. *J Biol Chem* **282**, 32965-73.
- Kornberg, L., Earp, H. S., Parsons, J. T., Schaller, M. and Juliano, R. L.** (1992). Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J Biol Chem* **267**, 23439-42.
- Kornberg, L. J., Earp, H. S., Turner, C. E., Prockop, C. and Juliano, R. L.** (1991). Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8392-6.
- Kuhnert, F., Davis, C. R., Wang, H. T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R. and Kuo, C. J.** (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 266-71.
- Kuwahara, A. and Radowicz-Cooke, H. J.** (1988). Epithelial transport in guinea-pig proximal colon: influence of enteric neurones. *J Physiol* **395**, 271-84.
- Lacy, E. R.** (1988). Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. *J Clin Gastroenterol* **10 Suppl 1**, S72-7.
- Laukoetter, M. G., Nava, P. and Nusrat, A.** (2008). Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **14**, 401-7.

- Law, S. F., Estojak, J., Wang, B., Mysliwiec, T., Kruh, G. and Golemis, E. A.** (1996). Human enhancer of filamentation 1, a novel p130cas-like docking protein, associates with focal adhesion kinase and induces pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**, 3327-37.
- Leivo, I., Tani, T., Laitinen, L., Bruns, R., Kivilaakso, E., Lehto, V. P., Burgeson, R. E. and Virtanen, I.** (1996). Anchoring complex components laminin-5 and type VII collagen in intestine: association with migrating and differentiating enterocytes. *J Histochem Cytochem* **44**, 1267-77.
- Levison, S. W., Druckman, S. K., Young, G. M. and Basu, A.** (2003). Neural stem cells in the subventricular zone are a source of astrocytes and oligodendrocytes, but not microglia. *Dev Neurosci* **25**, 184-96.
- Levy, P., Robin, H., Kornprobst, M., Capeau, J. and Cherqui, G.** (1998). Enterocytic differentiation of the human Caco-2 cell line correlates with alterations in integrin signaling. *J Cell Physiol* **177**, 618-27.
- Li, W., Duzgun, A., Sumpio, B. E. and Basson, M. D.** (2001). Integrin and FAK-mediated MAPK activation is required for cyclic strain mitogenic effects in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**, G75-87.
- Lim, Y., Han, I., Jeon, J., Park, H., Bahk, Y. Y. and Oh, E. S.** (2004). Phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861 is crucial for Ras transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* **279**, 29060-5.
- Litjens, S. H., de Pereda, J. M. and Sonnenberg, A.** (2006). Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends Cell Biol* **16**, 376-83.
- Liu, E., Cote, J. F. and Vuori, K.** (2003). Negative regulation of FAK signaling by SOCS proteins. *Embo J* **22**, 5036-46.
- Liu, Y., Loijens, J. C., Martin, K. H., Karginov, A. V. and Parsons, J. T.** (2002). The association of ASAP1, an ADP ribosylation factor-GTPase activating protein, with focal adhesion kinase contributes to the process of focal adhesion assembly. *Mol Biol Cell* **13**, 2147-56.
- Liu, Y. W., Sanders, M. A. and Basson, M. D.** (1998). Human Caco-2 intestinal epithelial motility is associated with tyrosine kinase and cytoskeletal focal adhesion kinase signals. *J Surg Res* **77**, 112-8.
- Lu, Z., Jiang, G., Blume-Jensen, P. and Hunter, T.** (2001). Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* **21**, 4016-31.
- Ma, T. Y.** (1997). Intestinal epithelial barrier dysfunction in Crohn's disease. *Proc Soc Exp Biol Med* **214**, 318-27.
- Mahoney, Z. X., Stappenbeck, T. S. and Miner, J. H.** (2008). Laminin alpha 5 influences the architecture of the mouse small intestine mucosa. *J Cell Sci* **121**, 2493-502.
- Mammen, J. M. and Matthews, J. B.** (2003). Mucosal repair in the gastrointestinal tract. *Crit Care Med* **31**, S532-7.
- Mankertz, J. and Schulzke, J. D.** (2007). Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol* **23**, 379-83.
- Marc Rhoads, J. and Wu, G.** (2009). Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. *Amino Acids*.
- Marechal, H., Jammes, H., Rossignol, B. and Mauduit, P.** (1999). EGF precursor mRNA and membrane-associated EGF precursor protein in rat exorbital lacrimal gland. *Am J Physiol* **276**, C734-46.
- Marshman, E., Booth, C. and Potten, C. S.** (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* **24**, 91-8.

- Mashimo, H., Wu, D. C., Podolsky, D. K. and Fishman, M. C.** (1996). Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* **274**, 262-5.
- 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**, 94-8.
- Mawe, G. M. and Gershon, M. D.** (1989). Structure, afferent innervation, and transmitter content of ganglia of the guinea pig gallbladder: relationship to the enteric nervous system. *J Comp Neurol* **283**, 374-90.
- McKaign, B. C., Makh, S. S., Hawkey, C. J., Podolsky, D. K. and Mahida, Y. R.** (1999). Normal human colonic subepithelial myofibroblasts enhance epithelial migration (restitution) via TGF-beta3. *Am J Physiol* **276**, G1087-93.
- McLean, G. W., Carragher, N. O., Avizienyte, E., Evans, J., Brunton, V. G. and Frame, M. C.** (2005). The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* **5**, 505-15.
- Menard, D. and Pothier, P.** (1987). Differential distribution of digestive enzymes in isolated epithelial cells from developing human fetal small intestine and colon. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **6**, 509-16.
- Miampamba, M., Yang, H., Sharkey, K. A. and Tache, Y.** (2001). Intracisternal TRH analog induces Fos expression in gastric myenteric neurons and glia in conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**, G979-91.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A. and Schlaepfer, D. D.** (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 56-68.
- Moore, M. W., Klein, R. D., Farinas, I., Sauer, H., Armanini, M., Phillips, H., Reichardt, L. F., Ryan, A. M., Carver-Moore, K. and Rosenthal, A.** (1996). Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* **382**, 76-9.
- Moro, F., Levenez, F., Durual, S., Plaisancie, P., Thim, L., Giraud, A. S. and Cuber, J. C.** (2001). Secretion of the trefoil factor TFF3 from the isolated vascularly perfused rat colon. *Regul Pept* **101**, 35-41.
- Mortier, E., Cornelissen, F., van Hove, C., Dillen, L. and Richardson, A.** (2001). The focal adhesion targeting sequence is the major inhibitory moiety of Fak-related non-kinase. *Cell Signal* **13**, 901-9.
- 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**, 336-40.
- Nagy, N. and Goldstein, A. M.** (2006). Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Dev Biol* **293**, 203-17.
- Nasser, Y., Fernandez, E., Keenan, C. M., Ho, W., Oland, L. D., Tibbles, L. A., Schemann, M., MacNaughton, W. K., Ruhl, A. and Sharkey, K. A.** (2006a). Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G912-27.
- Nasser, Y., Ho, W. and Sharkey, K. A.** (2006b). Distribution of adrenergic receptors in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse, and rat. *J Comp Neurol* **495**, 529-53.
- 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. *Development* **129**, 5151-60.
- Neunlist, M., Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Ruhl, 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**, G231-41.

- Neunlist, M., Frieling, T., Rupprecht, C. and Schemann, M.** (1998). Polarized enteric submucosal circuits involved in secretory responses of the guinea-pig proximal colon. *J Physiol* **506** (Pt 2), 539-50.
- Neunlist, M., Toumi, F., Oreschkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Laboisse, C. L., Galmiche, J. P. and Jarry, A.** (2003). Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G1028-36.
- Neunlist, M., Van Landeghem, L., Bourreille, A. and Savidge, T.** (2008). Neuroglial crosstalk in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* **263**, 577-83.
- Nieset, J. E., Redfield, A. R., Jin, F., Knudsen, K. A., Johnson, K. R. and Wheelock, M. J.** (1997). Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. *J Cell Sci* **110** (Pt 8), 1013-22.
- Nolan, K., Lacoste, J. and Parsons, J. T.** (1999). Regulated expression of focal adhesion kinase-related nonkinase, the autonomously expressed C-terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* **19**, 6120-9.
- Orskov, C., Hartmann, B., Poulsen, S. S., Thulesen, J., Hare, K. J. and Holst, J. J.** (2005). GLP-2 stimulates colonic growth via KGF, released by subepithelial myofibroblasts with GLP-2 receptors. *Regul Pept* **124**, 105-12.
- Owen, J. D., Ruest, P. J., Fry, D. W. and Hanks, S. K.** (1999). Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol* **19**, 4806-18.
- Pawlowski, M., Zerek-Melen, G., Winczyk, K., Stepien, H., Lachowicz, A. and Janecka, A.** (1993). Comparison of the antiproliferative effects of colon mitosis inhibitor, thyroliberin and the somatostatin analog octreotide on rat colonic mucosal epithelial cells. *Cytobios* **73**, 25-30.
- Phillips, T. E., Phillips, T. H. and Neutra, M. R.** (1984). Regulation of intestinal goblet cell secretion. IV. Electrical field stimulation in vitro. *Am J Physiol* **247**, G682-7.
- Piche, T., Barbara, G., Aubert, P., Bruley des Varannes, S., Dainese, R., Nano, J. L., Cremon, C., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Galmiche, J. P. et al.** (2009). Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* **58**, 196-201.
- Pichel, J. G., Shen, L., Sheng, H. Z., Granholm, A. C., Drago, J., Grinberg, A., Lee, E. J., Huang, S. P., Saarma, M., Hoffer, B. J. et al.** (1996). Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* **382**, 73-6.
- Pinto, D. and Clevers, H.** (2005). Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res* **306**, 357-63.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H. and Clevers, H.** (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* **17**, 1709-13.
- Plaisancie, P., Barcelo, A., Moro, F., Claustre, J., Chayvialle, J. A. and Cuber, J. C.** (1998). Effects of neurotransmitters, gut hormones, and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon. *Am J Physiol* **275**, G1073-84.
- Plateroti, M., Rubin, D. C., Duluc, I., Singh, R., Foltzer-Jourdainne, C., Freund, J. N. and Kedinger, M.** (1998). Subepithelial fibroblast cell lines from different levels of gut axis display regional characteristics. *Am J Physiol* **274**, G945-54.
- Playford, R. J., Marchbank, T., Goodlad, R. A., Chinery, R. A., Poulsom, R. and Hanby, A. M.** (1996). Transgenic mice that overexpress the human trefoil peptide pS2 have an increased resistance to intestinal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2137-42.
- Podolsky, D. K.** (1999). Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am J Physiol* **277**, G495-9.

- Polte, T. R. and Hanks, S. K.** (1995). Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10678-82.
- Potten, C. S.** (1997). Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am J Physiol* **273**, G253-7.
- Potten, C. S.** (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**, 821-30.
- Powell, D. W., Adegboyega, P. A., Di Mari, J. F. and Mifflin, R. C.** (2005). Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G2-7.
- Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., Saada, J. I. and West, A. B.** (1999). Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* **277**, C183-201.
- Prochnow, N. and Dermietzel, R.** (2008). Connexons and cell adhesion: a romantic phase. *Histochem Cell Biol* **130**, 71-7.
- Ratineau, C., Plateroti, M., Dumortier, J., Blanc, M., Kedinger, M., Chayvialle, J. A. and Roche, C.** (1997). Intestinal-type fibroblasts selectively influence proliferation rate and peptide synthesis in the murine entero-endocrine cell line STC-1. *Differentiation* **62**, 139-47.
- Reinshagen, M., Rohm, H., Steinkamp, M., Lieb, K., Geerling, I., Von Herbay, A., Flamig, G., Eysselein, V. E. and Adler, G.** (2000). Protective role of neurotrophins in experimental inflammation of the rat gut. *Gastroenterology* **119**, 368-76.
- Rindi, G., Leiter, A. B., Kopin, A. S., Bordi, C. and Solcia, E.** (2004). The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Ann N Y Acad Sci* **1014**, 1-12.
- Rozengurt, E.** (2007). Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* **213**, 589-602.
- Rozengurt, E., Guha, S. and Sinnott-Smith, J.** (2002). Gastrointestinal peptide signalling in health and disease. *Eur J Surg Suppl*, 23-38.
- Rubin, L. L., Hall, D. E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H. C., Janatpour, M., Liaw, C. W., Manning, K., Morales, J. et al.** (1991). A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* **115**, 1725-35.
- Ruhl, A.** (2005). Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil* **17**, 777-90.
- Ruhl, A., Franzke, S., Collins, S. M. and Stremmel, W.** (2001a). Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**, G1163-71.
- Ruhl, A., Franzke, S. and Stremmel, W.** (2001b). IL-1beta and IL-10 have dual effects on enteric glial cell proliferation. *Neurogastroenterol Motil* **13**, 89-94.
- Ruhl, A., Hoppe, S., Frey, I., Daniel, H. and Schemann, M.** (2005). Functional expression of the peptide transporter PEPT2 in the mammalian enteric nervous system. *J Comp Neurol* **490**, 1-11.
- Sanchez, M. P., Silos-Santiago, I., Frisen, J., He, B., Lira, S. A. and Barbacid, M.** (1996). Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* **382**, 70-3.
- Sanders, K. M., Koh, S. D. and Ward, S. M.** (2006). Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol* **68**, 307-43.
- Sanders, M. A. and Basson, M. D.** (2004). Collagen IV regulates Caco-2 migration and ERK activation via alpha1beta1- and alpha2beta1-integrin-dependent Src kinase activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G547-57.
- Sanders, M. A. and Basson, M. D.** (2008). Collagen IV regulates Caco-2 cell spreading and p130Cas phosphorylation by FAK-dependent and FAK-independent pathways. *Biol Chem* **389**, 47-55.

- Sangiorgi, E. and Capecchi, M. R.** (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* **40**, 915-20.
- Sansom, O. J., Reed, K. R., Hayes, A. J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I. P., Battle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I. S. et al.** (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* **18**, 1385-90.
- Sarosi, G. A., Barnhart, D. C., Turner, D. J. and Mulholland, M. W.** (1998). Capacitative Ca²⁺ entry in enteric glia induced by thapsigargin and extracellular ATP. *Am J Physiol* **275**, G550-5.
- Savidge, T. C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R. and Sofroniew, M. V.** (2007). Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* **132**, 1344-58.
- Schaller, M. D., Borgman, C. A., Cobb, B. S., Vines, R. R., Reynolds, A. B. and Parsons, J. T.** (1992). pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5192-6.
- Schaller, M. D., Otey, C. A., Hildebrand, J. D. and Parsons, J. T.** (1995). Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* **130**, 1181-7.
- Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T. and van der Geer, P.** (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **372**, 786-91.
- Schlaepfer, D. D. and Hunter, T.** (1996). Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* **16**, 5623-33.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Bloemberg, L., Costantini, F. and Pachnis, V.** (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* **367**, 380-3.
- Sechi, L. A., Ruehl, A., Ahmed, N., Usai, D., Paccagnini, D., Felis, G. E. and Zanetti, S.** (2007). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infects and multiplies in enteric glial cells. *World J Gastroenterol* **13**, 5731-5.
- Selgrad, M., De Giorgio, R., Fini, L., Cogliandro, R. F., Williams, S., Stanghellini, V., Barbara, G., Tonini, M., Corinaldesi, R., Genta, R. M. et al.** (2009). JC virus infects the enteric glia of patients with chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction. *Gut* **58**, 25-32.
- Shao, J., Sheng, G. G., Mifflin, R. C., Powell, D. W. and Sheng, H.** (2006). Roles of myofibroblasts in prostaglandin E2-stimulated intestinal epithelial proliferation and angiogenesis. *Cancer Res* **66**, 846-55.
- Sharkey, K. A., Parr, E. J. and Keenan, C. M.** (1999). Immediate-early gene expression in the inferior mesenteric ganglion and colonic myenteric plexus of the guinea pig. *J Neurosci* **19**, 2755-64.
- Shen, T. L. and Guan, J. L.** (2001). Differential regulation of cell migration and cell cycle progression by FAK complexes with Src, PI3K, Grb7 and Grb2 in focal contacts. *FEBS Lett* **499**, 176-81.
- Shepherd, I. T., Beattie, C. E. and Raible, D. W.** (2001). Functional analysis of zebrafish GDNF. *Dev Biol* **231**, 420-35.
- Shepherd, I. T., Pietsch, J., Elworthy, S., Kelsh, R. N. and Raible, D. W.** (2004). Roles for GFRalpha1 receptors in zebrafish enteric nervous system development. *Development* **131**, 241-9.
- Shimaoka, M., Takagi, J. and Springer, T. A.** (2002). Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**, 485-516.

- Shuttleworth, C. W., Xue, C., Ward, S. M., de Vente, J. and Sanders, K. M.** (1993). Immunohistochemical localization of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate in the canine proximal colon: responses to nitric oxide and electrical stimulation of enteric inhibitory neurons. *Neuroscience* **56**, 513-22.
- Sieg, D. J., Hauck, C. R. and Schlaepfer, D. D.** (1999). Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci* **112** (Pt 16), 2677-91.
- Simmons, J. G., Pucilowska, J. B., Keku, T. O. and Lund, P. K.** (2002). IGF-I and TGF-beta1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**, G809-18.
- Simon-Assmann, P., Duclos, B., Orian-Rousseau, V., Arnold, C., Mathelin, C., Engvall, E. and Kedinger, M.** (1994). Differential expression of laminin isoforms and alpha 6-beta 4 integrin subunits in the developing human and mouse intestine. *Dev Dyn* **201**, 71-85.
- Soderholm, J. D., Olaison, G., Lindberg, E., Hannestad, U., Vindels, A., Tysk, C., Jarnerot, G. and Sjodahl, R.** (1999). Different intestinal permeability patterns in relatives and spouses of patients with Crohn's disease: an inherited defect in mucosal defence? *Gut* **44**, 96-100.
- Sofroniew, M. V.** (2005). Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* **11**, 400-7.
- 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**, 1748-57.
- Sturm, A. and Dignass, A. U.** (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **14**, 348-53.
- Suzuki, K., Fukui, H., Kayahara, T., Sawada, M., Seno, H., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H. and Chiba, T.** (2005). Hes1-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 348-52.
- Szurszewski, J. H., Ermilov, L. G. and Miller, S. M.** (2002). Prevertebral ganglia and intestinofugal afferent neurones. *Gut* **51 Suppl 1**, i6-10.
- Taipale, J. and Keski-Oja, J.** (1996). Hepatocyte growth factor releases epithelial and endothelial cells from growth arrest induced by transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem* **271**, 4342-8.
- Tatti, O., Vehvilainen, P., Lehti, K. and Keski-Oja, J.** (2008). MT1-MMP releases latent TGF-beta1 from endothelial cell extracellular matrix via proteolytic processing of LTBP-1. *Exp Cell Res* **314**, 2501-14.
- Taupin, D. and Podolsky, D. K.** (2003). Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 721-32.
- Tetsu, O. and McCormick, F.** (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**, 422-6.
- Thannickal, V. J., Lee, D. Y., White, E. S., Cui, Z., Larios, J. M., Chacon, R., Horowitz, J. C., Day, R. M. and Thomas, P. E.** (2003). Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem* **278**, 12384-9.
- Thompson, J. S., Nguyen, B. L. and Harty, R. F.** (1993). Somatostatin analogue inhibits intestinal regeneration. *Arch Surg* **128**, 385-9.
- Timmermans, J. P., Adriaensen, D., Cornelissen, W. and Scheuermann, D. W.** (1997). 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**, 331-40.
- Toole, B. P.** (2001). Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 79-87.

- 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* **15**, 239-42.
- Toutant, M., Costa, A., Studler, J. M., Kadare, G., Carnaud, M. and Girault, J. A.** (2002). Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. *Mol Cell Biol* **22**, 7731-43.
- Tsukita, S., Furuse, M. and Itoh, M.** (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 285-93.
- Turck, N., Gross, I., Gendry, P., Stutzmann, J., Freund, J. N., Kedinger, M., Simon-Assmann, P. and Launay, J. F.** (2005). Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* **303**, 494-503.
- Tzu, J. and Marinkovich, M. P.** (2008). Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 199-214.
- Vachon, P. H.** (2006). [Cell survival: differences and differentiation]. *Med Sci (Paris)* **22**, 423-9.
- Vachon, P. H., Cardin, E., Harnois, C., Reed, J. C. and Vezina, A.** (2000). Early establishment of epithelial apoptosis in the developing human small intestine. *Int J Dev Biol* **44**, 891-8.
- van der Flier, L. G. and Clevers, H.** (2008). Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu Rev Physiol*.
- van der Rest, M. and Garrone, R.** (1991). Collagen family of proteins. *Faseb J* **5**, 2814-23.
- Vanderwinden, J. M., Timmermans, J. P. and Schiffmann, S. N.** (2003). Glial cells, but not interstitial cells, express P2X7, an ionotropic purinergic receptor, in rat gastrointestinal musculature. *Cell Tissue Res* **312**, 149-54.
- Vilhardt, F.** (2005). Microglia: phagocyte and glia cell. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 17-21.
- Villanacci, V., Bassotti, G., Nascimbeni, R., Antonelli, E., Cadei, M., Fisogni, S., Salerni, B. and Geboes, K.** (2008). Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterol Motil* **20**, 1009-16.
- Volterra, A. and Meldolesi, J.** (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* **6**, 626-40.
- von Boyen, G. B., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schafer, K. H., Adler, G. and Kirsch, J.** (2004). Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* **53**, 222-8.
- von Boyen, G. B., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schafer, K. H., Adler, G. and Kirsch, J.** (2006). Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines. *J Neuroendocrinol* **18**, 820-5.
- Wang, L., Srinivasan, S., Theiss, A. L., Merlin, D. and Sitaraman, S. V.** (2007a). Interleukin-6 induces keratin expression in intestinal epithelial cells: potential role of keratin-8 in interleukin-6-induced barrier function alterations. *J Biol Chem* **282**, 8219-27.
- Wang, S. E., Xiang, B., Zent, R., Quaranta, V., Pozzi, A. and Arteaga, C. L.** (2009). Transforming growth factor beta induces clustering of HER2 and integrins by activating Src-focal adhesion kinase and receptor association to the cytoskeleton. *Cancer Res* **69**, 475-82.
- Wang, X. C., Qiu, Y. H. and Peng, Y. P.** (2007b). Interleukin-6 protects cerebellar granule neurons from NMDA-induced neurotoxicity. *Sheng Li Xue Bao* **59**, 150-156.
- Wang, Y., Wang, L., Iordanov, H., Swietlicki, E. A., Zheng, Q., Jiang, S., Tang, Y., Levin, M. S. and Rubin, D. C.** (2006). Epimorphin(-/-) mice have increased intestinal

- growth, decreased susceptibility to dextran sodium sulfate colitis, and impaired spermatogenesis. *J Clin Invest* **116**, 1535-46.
- Ward, S. M. and Sanders, K. M.** (2006). Involvement of intramuscular interstitial cells of Cajal in neuroeffector transmission in the gastrointestinal tract. *J Physiol* **576**, 675-82.
- Ward, S. M., Sanders, K. M. and Hirst, G. D.** (2004). Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**, 112-7.
- Weber, E., Neunlist, M., Schemann, M. and Frieling, T.** (2001). Neural components of distension-evoked secretory responses in the guinea-pig distal colon. *J Physiol* **536**, 741-51.
- Wedel, T., Krammer, H. J., Kuhnel, W. and Sigge, W.** (1998). Alterations of the enteric nervous system in neonatal necrotizing enterocolitis revealed by whole-mount immunohistochemistry. *Pediatr Pathol Lab Med* **18**, 57-70.
- Wedel, T., Roblick, U., Gleiss, J., Schiedeck, T., Bruch, H. P., Kuhnel, 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* **181**, 327-37.
- Wehkamp, J. and Stange, E. F.** (2006). Paneth cells and the innate immune response. *Curr Opin Gastroenterol* **22**, 644-50.
- Willis, C. L., Leach, L., Clarke, G. J., Nolan, C. C. and Ray, D. E.** (2004a). Reversible disruption of tight junction complexes in the rat blood-brain barrier, following transitory focal astrocyte loss. *Glia* **48**, 1-13.
- Willis, C. L., Nolan, C. C., Reith, S. N., Lister, T., Prior, M. J., Guerin, C. J., Mavroudis, G. and Ray, D. E.** (2004b). Focal astrocyte loss is followed by microvascular damage, with subsequent repair of the blood-brain barrier in the apparent absence of direct astrocytic contact. *Glia* **45**, 325-37.
- Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauss, B., Schmid, E. M., Ocalan, M., Farrell, C. and Risau, W.** (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* **107 (Pt 5)**, 1347-57.
- Wolf, M., Schrodil, F., Neuhuber, W. and Brehmer, A.** (2007). Calcitonin gene-related peptide: a marker for putative primary afferent neurons in the pig small intestinal myenteric plexus? *Anat Rec (Hoboken)* **290**, 1273-9.
- Woodhoo, A. and Sommer, L.** (2008). Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia* **56**, 1481-90.
- Wu, F., Buckley, S., Bui, K. C., Yee, A., Wu, H. Y., Liu, J. and Warburton, D.** (1996). Cell cycle arrest in G0/G1 phase by contact inhibition and TGF-beta 1 in mink Mv1Lu lung epithelial cells. *Am J Physiol* **270**, L879-88.
- Wu, J. J., Chen, J. X., Rothman, T. P. and Gershon, M. D.** (1999). Inhibition of in vitro enteric neuronal development by endothelin-3: mediation by endothelin B receptors. *Development* **126**, 1161-73.
- Wynn, G., Rong, W., Xiang, Z. and Burnstock, G.** (2003). Purinergic mechanisms contribute to mechanosensory transduction in the rat colorectum. *Gastroenterology* **125**, 1398-409.
- Xue, J., Askwith, C., Javed, N. H. and Cooke, H. J.** (2007). Autonomic nervous system and secretion across the intestinal mucosal surface. *Auton Neurosci* **133**, 55-63.
- Yanagisawa, H., Yanagisawa, M., Kapur, R. P., Richardson, J. A., Williams, S. C., Clouthier, D. E., de Wit, D., Emoto, N. and Hammer, R. E.** (1998). Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development* **125**, 825-36.

- Yang, Q., Bermingham, N. A., Finegold, M. J. and Zoghbi, H. Y.** (2001). Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* **294**, 2155-8.
- Young, H. M., Hearn, C. J., Farlie, P. G., Canty, A. J., Thomas, P. Q. and Newgreen, D. F.** (2001). GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells. *Dev Biol* **229**, 503-16.
- Young, H. M., Turner, K. N. and Bergner, A. J.** (2005). The location and phenotype of proliferating neural-crest-derived cells in the developing mouse gut. *Cell Tissue Res* **320**, 1-9.
- Yu, C. F., Sanders, M. A. and Basson, M. D.** (2000). Human caco-2 motility redistributes FAK and paxillin and activates p38 MAPK in a matrix-dependent manner. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**, G952-66.
- Zeng, L., Si, X., Yu, W. P., Le, H. T., Ng, K. P., Teng, R. M., Ryan, K., Wang, D. Z., Ponniah, S. and Pallen, C. J.** (2003). PTP alpha regulates integrin-stimulated FAK autophosphorylation and cytoskeletal rearrangement in cell spreading and migration. *J Cell Biol* **160**, 137-46.
- Zhai, J., Lin, H., Nie, Z., Wu, J., Canete-Soler, R., Schlaepfer, W. W. and Schlaepfer, D. D.** (2003). Direct interaction of focal adhesion kinase with p190RhoGEF. *J Biol Chem* **278**, 24865-73.
- Zhang, H. M., Keledjian, K. M., Rao, J. N., Zou, T., Liu, L., Marasa, B. S., Wang, S. R., Ru, L., Strauch, E. D. and Wang, J. Y.** (2006). Induced focal adhesion kinase expression suppresses apoptosis by activating NF-kappaB signaling in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C1310-20.
- Zhang, W., Segura, B. J., Lin, T. R., Hu, Y. and Mulholland, M. W.** (2003). Intercellular calcium waves in cultured enteric glia from neonatal guinea pig. *Glia* **42**, 252-62.
- Zhang, X., Chattopadhyay, A., Ji, Q. S., Owen, J. D., Ruest, P. J., Carpenter, G. and Hanks, S. K.** (1999). Focal adhesion kinase promotes phospholipase C-gamma1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9021-6.

« La physiologie, l'analyse des idées et la morale,

ne sont que les trois branches d'une seule et même science,

qui peut s'appeler, à juste titre,

la science de l'homme. »

Pierre-Jean-Georges Cabanis

CONTROLE DES FONCTIONS DES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES PAR LES CELLULES GLIALES ENTERIQUES.

Résumé : Les cellules gliales entériques (CGE) représentent une composante majeure du système nerveux entérique et font partie du microenvironnement cellulaire de la barrière épithéliale intestinale (BEI). La BEI est constituée d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEI) en perpétuel renouvellement. A ce jour, le rôle des CGE dans le maintien et la réparation de la BEI reste peu connu. Aussi, ce travail de thèse visait, en combinant des approches *in vitro* et *in vivo*, transcriptomiques et fonctionnelles, à identifier les principales fonctions de la BEI régulées par les CGE. Nous avons montré par microarray que les CGE modifiaient les fonctions impliquées dans la motilité, la morphologie, l'adhésion et la prolifération des CEI. Nous avons ensuite montré que les CGE inhibaient la prolifération des CEI *via* la libération de TGF- β 1 (Transforming Growth Factor). De plus, en utilisant un modèle *in vitro* de réparation de la BEI, nous avons montré que les CGE augmentaient la restitution épithéliale en augmentant l'étalement des CEI *via* la libération de proEGF (Epidermal Growth Factor). Ces effets réparateurs étaient médiés par une augmentation de l'activité et de l'expression de FAK (Focal Adhesion Kinase) dans les CEI et *via* une voie EGFR-dépendante. Enfin, ce travail a décrit des altérations du réseau glial dans les cancers colorectaux (CCR). Nos travaux démontrent le rôle majeur des CGE dans le contrôle des fonctions des CEI et suggèrent également que des dysfonctions des CGE pourraient être impliquées dans des pathologies intestinales présentant des lésions de la BEI telles que les CCR ou les maladies inflammatoires chroniques intestinales.

Mots-clés : système nerveux entérique, cellules gliales entériques, barrière épithéliale intestinale, prolifération cellulaire, restitution épithéliale, TGF- β 1, proEGF, FAK.

CONTROL OF INTESTINAL EPITHELIAL CELL FUNCTIONS BY ENTERIC GLIAL CELLS.

Abstract : Enteric glial cells (EGC) represent a major cellular component of the enteric nervous system and are part of the cellular microenvironment of the intestinal epithelial barrier (IEB). The IEB is composed of a monolayer of intestinal epithelial cells (IEC) under constant renewal. The role of EGC in the maintenance and repair of IEB remains currently largely unknown. Thus, this study combining transcriptomic and functional *in vivo* and *in vitro* studies aimed at identifying major IEB functions regulated by EGC. Using microarrays, we have first demonstrated that EGC modulated IEC functions involved in cell motility, morphology, adhesion and proliferation. We have then shown that EGC inhibited IEC proliferation *via* the release of TGF- β 1 (Transforming Growth Factor). We next demonstrated using an *in vitro* model of IEB wound repair that EGC induced an increase in epithelial restitution in part by increasing IEC spreading *via* the release by EGC of proEGF (Epidermal Growth Factor). The effects of EGC upon IEB restitution were mediated by an increase in both activity and expression of FAK (Focal Adhesion Kinase) in IEC and *via* an EGFR-dependent pathway. Finally, this study also described glial network alterations in colorectal cancer (CRC). In conclusion, our data indicate that EGC are major regulators of IEC functions and suggest that putative defects in glial functions may contribute towards intestinal pathologies with altered repair processes such as CRC or inflammatory bowel disease.

Key words : enteric nervous system, enteric glial cells, intestinal epithelial barrier, cell proliferation, epithelial restitution, TGF- β 1, proEGF, FAK.

Laurianne Van Landeghem

INSERM U913, IMAD, CHU Hotel Dieu, 1, place Alexis Ricordeau, 44035 Nantes