

UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR MEDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

Année 2014

N°19

Impact de l'inflammation intestinale sur la plasticité fonctionnelle des neurones et des cellules gliales entériques : exemple de la maladie de Crohn

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie-Médecine-Santé
Spécialité : Biochimie, Biologie cellulaire et moléculaire, Physiologie et Nutrition

Présentée et soutenue publiquement par

Sabrina COQUENLORGE-GALLON

Le 28 octobre 2014, devant le jury ci-dessous

Président :	Pr Marc DENIS, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Nantes
Rapporteurs :	Pr Philippe DUCROTTE, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Rouen Dr Nicolas CENAC, Chargé de Recherche, Inserm UMR1043, CNRS UMR5282, Toulouse
Examineurs :	Dr Jean-Pierre MOTHET, Directeur de Recherche CNRS, CRN2M UMR7286, Marseille
Directeur de thèse :	<i>Dr Michel NEUNLIST, Directeur de Recherche INSERM, Inserm UMR913, Nantes</i>
Co-encadrant de thèse :	<i>Dr Malvyne Rolli-Derkinderen, Chargée de Recherche CNRS, Inserm UMR913, Nantes</i>

Remerciements

Mes premiers remerciements vont au Dr Michel Neunlist qui m'a accueillie au sein de l'unité U913 depuis mon Master1. Merci pour la confiance et l'autonomie que vous m'avez accordé, ainsi que pour vos conseils scientifiques.

Je tiens à remercier le Dr Malvyne Rolli-Derkinderen pour son encadrement. Merci pour ta disponibilité, ta patience et ton écoute. Merci d'avoir partagé tes connaissances et ta joie de vivre en espérant que l'encadrement de cette thèse restera un bon souvenir.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres de mon jury de soutenance. Merci au Pr Philippe Ducrotte et au Dr Nicolas Cenac d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail de thèse en tant que rapporteur. Merci également au Pr Marc Denis et au Dr Jean-Pierre Mothet d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier les services de Gastro-entérologie, de Chirurgie digestive et d'Anatomie pathologique pour leur précieuse collaboration. Merci aux Prs Emmanuel Coron et Guillaume Meurette pour m'avoir permis de participer aux études endoscopiques et chirurgicales sur les modèles porcins ainsi qu'au Pr Arnaud Boureille pour l'aide qu'il a apporté à ce travail sur les MICI.

Je remercie chaleureusement le Dr Bernard Lardeux pour ses conseils scientifiques, sa disponibilité et sa sympathie. Merci pour votre implication dans la valorisation et la vulgarisation de la recherche scientifique, pour ce temps précieux partagé entre fête de la science, passeport recherche, destination labo et autres évènements. Vous manquerez à l'unité !

Merci à toi Ludmilla! Toi qui m'as fait découvrir le monde de la recherche lors de mon premier stage et maintenant me voilà docteur en partie grâce à toi (*ou à cause de toi?*☺)! Merci pour ton soutien, ta bonne humeur et tes conseils avisés autant que pour ces repas et soirées ciné depuis la licence ! et c'est pas fini...

Remerciements

Merci à toute l'équipe U913 ! J'espère que je n'oublierai personne à commencer par François. Merci pour ta bonne humeur, tes conseils et ton soutien, toujours d'actualité même depuis l'Allemagne ! Merci pour ce bureau partagé pendant plus de 2 ans et merci d'avoir toujours eu tous ces gâteaux et friandises au chocolat pour qu'on garde le moral !

Merci aux anciens : Raphaël, Maxime, Mandy, Rodolphe, Etienne, Sébastien, Maddalena, Charlotte, Justine, Claire... Merci pour tous ces moments partagés au labo ou en soirées. Merci pour vos conseils, votre joie de vivre et votre humour !

Merci aux actuels : Emilie (avec qui j'ai commencé) pour ces débats scientifiques ou non ; Thomas pour tes blagues et nos nombreuses discussions plus ou moins sérieuses ; Nicoletta pour cet accent italien au parfum des vacances et ta gentillesse ; Laetitia pour ton soutien et ta folie ; et Tiphaine, que je connais depuis moins longtemps, merci pour ta sympathie et tes conseils cuisine/resto ! Merci à tous les thésards pour votre bonne humeur et tous ces échanges en particulier pendant les pauses Nesquik !!! Merci aussi à : Pascal, Philippe, Isabelle, Hélène, Sophie, Laurianne (merci pour tes conseils, ton talent pour faire les trous sur filtres et ton franc-parler !), Jérémy, Pierre-Antoine (le manouche !), Camille (contente que le projet se poursuive avec toi ! bon courage pour la suite !), Marie, les deux Anne-Gaëlle, Lucille, Arnaud, Simon, Pierre-Etienne, Violaine, Elena, Anna-Christina...

Sans oublier évidemment les ITAs, merci pour votre aide ! Merci à Phil' et Jul', les Mac Gyver du labo ! Merci les gars pour votre aide, vos astuces et ces bonnes soirées devenues rares ! Julie, merci pour ton aide pour les cellules gliales et ta gentillesse ! Tony, merci pour tes chansons et ton humour ! Catherine, Sylvie, Nadia et Marie, merci pour votre bonne humeur !

Merci à tous pour avoir permis que ces années, riches en émotions, se passent dans un cadre de travail plus qu'agréable. Bonne continuation et bienvenus aux derniers arrivants... je pars râler ailleurs !

Enfin, le meilleur pour la fin. Je tiens à remercier chaleureusement ma famille, mes parents, mon frère, pour leurs encouragements pendant toutes mes études. Je remercie surtout Freddy (mon mari depuis peu !!) pour son soutien sans faille tout au long de ce parcours, à qui j'ai fait vivre un enfer et sans qui cette thèse n'aurait peut être pas vu le jour !!! Merci également à tous mes amis pour leur présence et pour avoir réussi à me changer les idées. Merci à ceux qui n'ont jamais rien compris à ce que je faisais et merci à mes amis thésards pour nos échanges enthousiastes et leur soutien compréhensif pendant les moments de galère et de doute. On a réussi !!!!

Liste des publications et conférences	1
Liste des abréviations	4
Introduction générale	6
Etude bibliographique	9
I. Organisation générale du tube digestif	9
I.1 La barrière épithéliale intestinale	10
I.1.1 Généralités sur l'épithélium digestif	10
I.1.2 Organisation de la barrière épithéliale intestinale	11
I.1.3 Les cellules de la barrière épithéliale intestinale	12
I.1.3.1 Les cellules souches épithéliales intestinales	13
I.1.3.2 Les entérocytes	14
I.1.3.3 Les cellules mucosécrétantes ou de Goblet	14
I.1.3.4 Les cellules entéroendocrines	15
I.1.3.5 Les cellules de Paneth	15
I.1.3.6. Les cellules M ou « Microfold »	16
I.1.3.7 Les cellules Cup	16
I.1.3.8 Les cellules Tuft	16
I.1.4 L'homéostasie de la barrière épithéliale	17
I.1.4.1 La prolifération des cellules épithéliales intestinales	18
I.1.4.2 La différenciation des cellules épithéliales intestinales	19
I.1.4.3 La mort des cellules épithéliales intestinales	21
I.1.4.4 La réparation de la barrière épithéliale intestinale	22
I.1.5 Les fonctions des entérocytes	23
I.1.5.1 Activité sécrétoire des entérocytes	23
I.1.5.2 Le maintien de la barrière épithéliale intestinale	24
I.1.5.3 Perméabilité de la barrière épithéliale intestinale	27
I.1.5.4 Rôle des cellules épithéliales intestinales dans les réponses immunitaires innées et adaptatives	32
I.1.5.5 Influence des cellules épithéliales intestinales sur les neurones	34
I.1.6. Régulation de la barrière épithéliale intestinale	34
II. Le système nerveux entérique	39
II.1 Généralités sur le système nerveux entérique	39
II.1.1 Découverte du système nerveux entérique	39
II.1.2 Organisation du système nerveux entérique	39
II.1.2.1 Composition du système nerveux entérique	39
II.1.2.2 Innervation extrinsèque du système nerveux entérique: l'axe cerveau-intestin	41
II.1.3 Ontogenèse du système nerveux entérique	44
II.1.3.1 Colonisation du tube digestif par les cellules de la crête neurale	44

II.1.3.2	Contrôle génétique du développement du système nerveux entérique	47
II.1.3.3	Maturation du système nerveux entérique et modifications liées à l'âge	48
II.2	Les neurones entériques	49
II.2.1	Présentation générale des neurones entériques	49
II.2.1.1	Classification des neurones selon leur morphologie	49
II.2.1.2	Classification des neurones selon leurs propriétés électrophysiologiques	50
II.2.1.3	Classification des neurones selon leurs propriétés fonctionnelles	50
II.2.2.	Rôle des neurones entériques sur les fonctions gastro-intestinales	53
II.2.2.1	Contrôle de la motricité digestive	53
II.2.2.2	Contrôle du flux sanguin intestinal	56
II.2.2.3	Contrôle de la sécrétion intestinale	56
II.2.2.4.	Contrôle de l'absorption intestinale	58
II.2.2.5	Contrôle de la prolifération des cellules épithéliales	58
II.2.2.4	Contrôle de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale	59
II.2.3	Régulation des neurones entériques	59
II.3	Les cellules gliales entériques	60
II.3.1	Présentation générale des cellules gliales entériques	60
II.3.1.1	Découverte des cellules gliales entériques.....	60
II.3.1.2	Développement des cellules gliales entériques.....	62
II.3.1.3	Morphologie et marqueurs des cellules gliales entériques.....	63
II.3.2	Rôle des cellules gliales entériques sur les fonctions digestives	66
II.3.2.1	Elément de support	67
II.3.2.2	Contrôle de la neurotransmission	68
II.3.2.3	Contrôle de la survie	69
II.3.2.4	Contrôle de la barrière épithéliale intestinale.....	70
II.3.2.5	Homologie avec les astrocytes centraux	74
II.3.3.	Régulation des cellules gliales entériques.....	75
II.3.3.1.	Modulation de l'activité des cellules gliales entériques par des stimuli mécaniques et neuronaux	75
II.3.3.2.	Microenvironnement glial	75
III.	L'inflammation intestinale	76
III.1	Caractéristiques générales de l'inflammation	76
III.1.1	Les médiateurs cellulaires de l'inflammation.....	77
III.1.2.	Les Pattern Recognition Receptors.....	79
III.1.3	Les médiateurs humoraux de l'inflammation	84
III.1.3.1	Les cytokines	85
III.1.3.2	Les prostaglandines	88
III.1.3.3	Les acides hydroxyeicosatetraenoïques	106

III.2 L'inflammation pathologique : l'exemple des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI)	107
III.2.1 Caractéristiques générales des MICI	108
III.2.1.1 Historique	108
III.2.1.2 Définition	108
III.2.1.3 Signes cliniques et complications	108
III.2.1.4 Diagnostic	109
III.2.1.5 Epidémiologie	110
III.2.1.6. Physiopathologie des MICI	112
III.2.1.7. Stratégie thérapeutique des MICI.....	123
III.2.2 Les médiateurs cellulaires de l'inflammation en condition pathologique.....	128
III.2.2.1. Réactions immunitaires	128
III.2.2.2 Atteintes de la barrière épithéliale au cours de l'inflammation intestinale.....	129
III.2.3 Les PRRs en pathologie inflammatoire.....	138
III.2.4 Les cytokines en pathologie inflammatoire	141
III.2.5 La voie des prostaglandines et du 15-HETE en pathologie inflammatoire	144
III.3 La neuro-inflammation.....	150
III.3.1 Les neurones entériques, cibles de l'inflammation intestinale	150
III.3.2 Les neurones entériques, acteurs de l'inflammation intestinale.....	152
III.4 La glio-inflammation.....	154
III.4.1 Les modèles d'étude des cellules gliales entériques.....	155
III.4.2 Les cellules gliales entériques, cibles de l'inflammation intestinale.....	157
III.4.3 Les cellules gliales entériques, actrices de l'inflammation intestinale	158
Objectifs de l'étude	160
Résultats.....	162
Article 1: L'activation du système nerveux entérique module la réponse neuronale induite par le LPS.....	162
Article 2: Les cellules gliales entériques produisent du 15-HETE pour réguler les propriétés de l'épithélium intestinal : dérégulation au cours de la maladie de Crohn. .	192
Article 3: Un défaut de L-PGDS dans les cellules gliales entériques de patients atteints de la maladie de Crohn réduit les capacités de réparation de la barrière épithéliale intestinale.....	222
Discussion	252
Conclusion.....	264
Annexes	268
Annexe 1 : Méthodes d'étude de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale.....	268
Annexe 2 : "Colonic endoscopic full-thickness biopsies : from neuropathological analysis of the myenteric plexus to the functional study of neuromuscular transmission.".....	270
Annexe 3 : "Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum : results from a porcine model."	276
Annexe 4 : "Probe-based confocal laser endomicroscopy : A new method for quantitative analysis of pit structure in healthy and Crohn's disease patients."	284
Annexe 5 : "Characterization of human, mouse and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells."	289

Liste des publications et conférences

Publications :

-articles présentés dans la thèse et en soumission :

S. Coquenlorge, E. Duchalais, J. Chevalier, F. Cossais, M. Rolli-Derkinderen, M. Neunlist. (2014) **Modulation of LPS-induced neuronal response by activation in the enteric nervous system**. Accepté dans Journal of Neuroinflammation.

S. Coquenlorge, L. Van Landeghem, J. Jaulin, N. Cenac, C. Pochard, M. Neunlist and M. Rolli-Derkinderen. (2014) **L-PGDS lack in enteric glial cells from Crohn's disease patients restricts intestinal epithelial barrier healing**. En préparation

C. Pochard*, S. Coquenlorge*, J. Jaulin, T. Durand, N. Cenac, N. Vergnolle, M. Neunlist, M. Rolli-Derkinderen. **Enteric glial cells produce 15-HETE to regulate intestinal epithelial properties: dysregulation in Crohn's disease**. En préparation (*co-auteurs)

-articles en annexes et publiés :

R. Soret, S. Coquenlorge, F. Cossais, G. Meurette, M. Rolli-Derkinderen, M. Neunlist. (2013) **Characterization of human, mouse and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells**. Neurogastroenterol Motil doi: 10.1111/nmo.12200.

N. Musquer, S. Coquenlorge, A. Bourreille, P. Aubert, T. Matysiak-Budnik, S. Bruley des Varannes, G. Lauwers, M. Neunlist, E. Coron. (2013) **Probe-based confocal laser endomicroscopy: a new method for quantitative analysis of pit structure in healthy and Crohn's disease patients**. Digestive and Liver Disease DLD-12-677R2.

G. Meurette, C. Blanchard, E. Duchalais Dassonneville, S. Coquenlorge, P. Aubert, M. Wong, P.A. Lehur, M. Neunlist. (2012) **Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum: results from a porcine model**. Neurogastroenterology and motility 24(3):267-73.

M. Neunlist, S. Coquenlorge, P. Aubert, E. Duchalais-Dassonneville, S. Bruley des Varannes, G. Meurette, E. Coron. (2011) **Colonic endoscopic full-thickness biopsies: from the neuropathological analysis of the myenteric plexus to the functional study of neuromuscular transmission**. GIE 73(5):1029-34.

Communications orales (présentateur*):

S. Coquenlorge*, Nicolas Cenac, Mandy Biraud, Julie Jaulin, Nathalie Vergnolle, Michel Neunlist and Malvyne Rolli-Derkinderen. **Enteric glial cells from Crohn's disease patients have altered function on intestinal epithelial barrier: toward the identification of novel essential lipidic gliomediators**. GFNG, Grenoble, 20-21 Juin 2013.

S. Coquenlorge, J. Chevalier, E. Duchalais, F. Cossais, M. Rolli-Derkinderen* and M. Neunlist. **Activation of the enteric nervous system inhibits TNF α but potentiates IL6 productions induced by LPS**. Colloque Cytokines et Chimiokines, Le Croisic, 14-16 Mai 2012.

Liste des publications et conférences

S. Coquenlorge*, J. Chevalier, E. Duchalais, F. Cossais, M. Rolli-Derkinderen and M. Neunlist. **Activation of the enteric nervous system inhibits TNF α but potentiates IL6 productions induced by LPS.** GFNG, Clermont-Ferrand, 14-15 Juin 2012.

S. Coquenlorge*, J. Chevalier, E. Duchalais, F. Cossais, M. Rolli-Derkinderen and M. Neunlist. **Neuroimmunomodulation de l'inflammation digestive par le système nerveux entérique.** Colloque IMAD, Nantes, 8 Juin 2012.

N. Musquer*, S. Coquenlorge, A. Bourreille, P. Aubert, S. Bruley des Varannes, JP. Galmiche, G. Lauwers, M. Neunlist, E. Coron. **Analyse morphologique et fonctionnelle quantitative de la muqueuse colique par endomicroscopie confocale.** JFHOD, Paris, 2012 and Endoscopy 2012; 44 - A005747fr.

N. Musquer*, S. Coquenlorge, A. Bourreille, S. Bruley des Varannes, M. Neunlist, E. Coron. **Probe-based confocal laser endomicroscopy for quantitative morphological and functional assesement of colonic mucosa.** UEGW, Stockholm, Suède, 22-26 Octobre 2011.

S. Coquenlorge*, J. Chevalier, E. Duchalais, F. Cossais, C. Blanchard, M. Rolli-Derkinderen and M. Neunlist. **Enteric nervous system activity inhibits TNF α production through p38/SAPK2 activation of AMP-dependent kinase.** GFNG, Nice, 16-17 Juin 2011

G. Meurette*, E. Duchalais-Dassonneville, S. Coquenlorge, P. Aubert, A. Bourreille, E. Coron, M. Neunlist. **Renforcement de la barrière épithéliale digestive par la neurostimulation sacrée dans un modèle préclinique porcin : une nouvelle perspective thérapeutique dans les pathologies inflammatoires digestives ?** JFHOD, Paris, 24-27 Mars 2011

Posters:

S. Coquenlorge, N. Cenac, M. Biraud, J. Jaulin, N. Vergnolle, M. Neunlist, M. Rolli-Derkinderen. **Enteric glial cells from Crohn's Disease patients misproduce 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 : defect in intestinal epithelial barrier resistance.** FNM, Guangzhou, Chine, 5-7 Septembre 2014 and UEGW, Vienne, Autriche, 18-22 Octobre 2014.

S. Coquenlorge, C. Pochard, J. Jaulin, T. Durand, N. Cenac, N. Vergnolle, M. Neunlist, M. Rolli-Derkinderen. **Enteric glial cells produce 15-HETE to regulate intestinal epithelial properties : dysregulation in Crohn's disease.** FNM, Guangzhou, Chine, 5-7 Septembre 2014 and UEGW, Vienne, Autriche, 18-22 Octobre 2014.

S. Coquenlorge, N. Cenac, M. Biraud, J. Jaulin, N. Vergnolle, M. Neunlist and M. Rolli-Derkinderen. **Enteric glial cells from Crohn's disease patients have altered function on intestinal epithelial barrier: toward the identification of novel essential lipidic gliomediators.** UEGW, Berlin, Allemagne, 12-16 Octobre 2013.

S. Coquenlorge, J. Chevalier, E. Duchalais, F. Cossais, C. Blanchard, M. Rolli-Derkinderen, M. Neunlist. **Enteric nervous system activity inhibits TNF α but potentiates IL6 productions induced by LPS in a ERK and AMPK dependent manner.** NGM, Bologne, Italie, 6-8 Septembre 2012.

Liste des publications et conférences

T. Clairembault*, S. Coquenlorge*, B. Lardeux, J. Jaulin, M. Biraud, M. Neunlist, M. Rolli-Derkinderen. **Enteric glial cells from patients with Crohn's disease misreact to inflammation and induce intestinal epithelial cell permeability.** NGM, Bologne, Italie, 6-8 Septembre 2012.

S. Coquenlorge, J. Chevalier, E. Duchalais, F. Cossais, M. Rolli-Derkinderen, M. Neunlist. **L'activité du système nerveux entérique inhibe la production de TNF α : implication des MAPKinases et de l'AMPkinase.** JFHOD, Paris, 15-18 Mars 2012.

J. Chevalier, S. Coquenlorge, E. Duchalais, R. Soret, M. Neunlist, M. Rolli-Derkinderen. **Rôle des cellules gliales entériques dans l'inflammation intestinale : la régulation de la production d'IL6 implique l'AMPkinase.** JFHOD, Paris, 15-18 Mars 2012.

S. Coquenlorge, J. Chevalier, E. Duchalais, F. Cossais, C. Blanchard, M. Rolli-Derkinderen, M. Neunlist. **Enteric nervous system activity inhibits TNF α production through p38/SAPK2 activation of AMP-dependent kinase.** UEGW, Stockholm, Suède, 22-26 Octobre 2011.

J. Chevalier, S. Coquenlorge, E. Duchalais, R. Soret, M. Neunlist, M. Rolli-Derkinderen. **Enteric glial cells participate in IL6 production through AMPK-dependent pathway.** UEGW, Stockholm, Suède, 22-26 Octobre 2011.

C. Blanchard Louis, S. Coquenlorge, P. Aubert, J. Chevalier, E. Duchalais, G. Meurette, M. Neunlist. **In vivo activation of sacral nerve enhances rectal barrier resistance in a porcine model.** UEGW, Stockholm, Suède, 22-26 Octobre 2011.

M. Neunlist, S. Coquenlorge, P. Aubert, E. Duchalais-Dassonneville, S. Bruley des Varannes, G. Meurette, E. Coron. **Colonic endoscopic full-thickness biopsies: from the neuropathological analysis of the myenteric plexus to the functional study of neuromuscular transmission.** Poster of Distinction during Digestive Disease Week, Chicago, 7-10 Mai, 2011.

N. Musquer, S. Coquenlorge, A. Bourreille, J.P. Galmiche, M. Neunlist, E. Coron. **Quantitative morphological and functional assesement of colonic mucosa using probe-based confocal laser endomicroscopy.** Poster presentation during Digestive Disease Week, Chicago, 7-10 Mai, 2011.

Liste des abréviations

9 α ,11 β PGF ₂	9-alpha, 11beta-prostaglandine F ₂ (ou 11 β PGF ₂ α)
15-dPGJ ₂	15-déoxy- Δ 12,14-prostaglandine J ₂
15-HETE	15-Hydroxyeicosatetraenoic acid
5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
AA	Acide arachidonique
ACh	Acétylcholine
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AMPK	5' adenosine monophosphate-activated protein kinase
AP-1	Activator protein-1
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BEI	Barrière épithéliale intestinale
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BMP	Bone morphogenetic protein
CEI	Cellules épithéliales intestinales
CGE	Cellules gliales entériques
CIC	Cellules interstitielles de Cajal
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX	Cyclooxygénase
DSS	Dextran sodium sulfate
EGF	Endothelial growth factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAK	Focal adhesion kinase
GCL	Glutamate cysteine ligase
GDNF	Glial derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GSH	Glutathion réduit
GSNO	S- nitrosoglutathion
H-PGDS	Prostaglandine D synthase hématopoïétique
IFN γ	Interféron gamma
IL	Interleukine
L-PGDS	Prostaglandine D synthase lipocaline
LOX	Lipoxygénase
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MC	Maladie de Crohn
MICI	Maladies inflammatoires chroniques intestinales
MLC	Myosin light-chain
n-3	Oméga-3
n-6	Oméga-6
NFkB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

Liste des abréviations

NGF	Nerve growth factor
NLR	NOD –like receptor
NO	Nitric oxide
Nrf2	Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PG	Prostaglandine
PGD ₂	Prostaglandine D2
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PRR	Pattern recognition receptor
RCH	Rectocolite hémorragique
S100 β	S100 calcium-binding protein beta
SNC	Système nerveux central
SNE	Système nerveux entérique
SP	Substance P
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TD	Tube digestif
TER	Transepithelial resistance
TGF β	Transforming growth factor beta
TLR	Toll-like receptor
TNBS	2, 4, 6-Trinitrobenzenesulfonic acid
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TTX	Tétradotoxine
VIP	Vasoactive intestinal peptide
ZO	Zonula occludens

Introduction générale

Ces dernières années ont été marquées par un regain d'intérêt scientifique pour le rôle central joué par le tube digestif, non seulement dans la santé humaine en général, mais aussi pour son implication directe dans un nombre croissant de pathologies chroniques. Cette évolution de la place du tube digestif dans la recherche biomédicale s'est produite sous l'impulsion des découvertes récentes ayant permis d'identifier le rôle clé joué par le microbiote intestinal dans un grand nombre de pathologies intestinales et extra-intestinales.

Le tube digestif est un acteur central dans la survie de tout organisme de part son rôle d'absorption de nutriments et d'électrolytes, mais ce n'est pas exhaustif. En parallèle, il assure aussi une fonction de protection face aux stressors environnementaux (mécaniques, chimiques, pathogènes) auxquels il est quotidiennement exposé. L'ensemble de ces fonctions est assuré par une coordination étroite entre les fonctions motrices, vasculaires, immunitaires et les fonctions de la barrière épithéliale intestinale (BEI), dont le rôle est particulièrement important.

En effet, le maintien de l'homéostasie de la BEI est central au bon fonctionnement du tube digestif en particulier et de l'organisme en général. La BEI est située à l'interface entre le milieu « extérieur » et le milieu « intérieur ». Cette monocouche de cellules épithéliales intestinales en constant renouvellement, assure le passage de l'eau, des électrolytes et des nutriments et en même temps la protection contre les pathogènes luminaux. Des dysfonctions de la BEI, en particulier des défauts de perméabilité ou de réparation, jouent ou pourraient jouer un rôle important dans la physiopathologie voire même dans l'étiologie de nombreuses pathologies intestinales (maladies inflammatoires chroniques intestinales, syndrome de l'intestin irritable) ou extra-intestinales (obésité, diabète, maladies psychiatriques ou neurodégénératives). Par exemple, au cours des MICI, une augmentation de la perméabilité de la BEI a été rapportée avant les rechutes chez les patients ou chez les personnes apparentées non malades. D'autre part, l'efficacité de la réparation de la muqueuse est un facteur prédictif du maintien en rémission. L'homéostasie de la BEI est assurée par les interactions entre les cellules épithéliales intestinales (dont les cellules souches) et les constituants de son microenvironnement direct tels que les cellules mésenchymateuses, les cellules immunitaires ou encore le microbiote intestinal. **Des études récentes ont permis d'identifier le système nerveux entérique (SNE) comme un nouvel acteur clé impliqué dans l'homéostasie mais aussi dans les dysfonctions de la BEI.**

Introduction générale

Le SNE est un système nerveux intégratif situé sur l'ensemble du tube digestif et constitué de neurones et de cellules gliales entériques (CGE). Le rôle du SNE dans le contrôle de la motricité a été largement décrit et bien caractérisé au cours de ces 40 dernières années. Ce n'est que plus récemment que l'implication centrale des neurones entériques et des CGE dans le maintien des fonctions de la BEI a été mise en évidence, permettant de démontrer l'existence d'une véritable unité neuro-glio épithéliale intestinale réminiscente de l'unité neuro-glio-endothéliale du système nerveux central. Dans ce contexte, il a été démontré que les CGE jouent un rôle particulièrement important dans le maintien de l'intégrité de la BEI en diminuant la perméabilité paracellulaire, en inhibant la prolifération des cellules épithéliales intestinales et aussi en favorisant la réparation de la BEI. **Bien que de nombreuses fonctions de la BEI régulées par les CGE soient altérées dans les MICI, il reste à déterminer si les CGE pourraient directement contribuer à ces dysfonctions.** D'autre part, un nombre croissant d'études suggèrent que le SNE pourrait directement contribuer à l'inflammation intestinale au cours de stress infectieux ou inflammatoire chroniques. **Néanmoins, à ce jour la capacité du SNE à synthétiser des cytokines clés comme le TNF- α , cible thérapeutique majeure dans les MICI, reste à identifier.**

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse étaient doubles. Ils visaient d'une part, à caractériser *in vitro* la capacité du SNE et de ses constituants cellulaires (neurones, CGE) à produire du TNF- α en réponse à un stress infectieux et inflammatoire et à identifier les principales voies de signalisation impliquées dans cette régulation. D'autre part, le deuxième objectif de ce travail visait à caractériser et comparer par rapport à des témoins 1) le phénotype des CGE au cours de la maladie de Crohn, 2) leur rôle dans le contrôle des fonctions de la BEI et 3) l'identité de médiateurs gliaux (en particulier des acides gras polyinsaturés) et des mécanismes responsables des effets observés.

Les études ont été effectuées grâce à l'utilisation ou au développement de différents modèles expérimentaux: cultures primaires de SNE issues d'intestins d'embryons de rat E.15, des cultures primaires de CGE embryonnaires ou adultes de rat, cultures primaires de CGE humaines obtenues à partir de pièces de résection chirurgicale colique de patients atteints de cancer (CGE contrôle) ou de la maladie de Crohn (CGE pathologiques) et d'un modèle de co-culture de cellules épithéliales intestinales (Caco-2) en présence de CGE.

Introduction générale

A l'aide de ces différents modèles et en combinant des approches de biochimie, biologie moléculaire et immunohistochimie, nous avons ainsi:

1) montré que les neurones entériques, en réponse au LPS, produisaient du TNF- α via des voies ERK et AMPK et que l'activation neuronale inhibait cette synthèse. De plus, cette production de TNF- α induisait une augmentation de l'expression du TLR-2 et une inhibition de la sécrétion d'IL-6 (Publication 1)

2) caractérisé les CGE des patients atteints de la maladie de Crohn par l'étude de l'expression des marqueurs gliaux et la production de médiateurs gliaux connus (IL-6, TGF β , GSH, EGF).

3) montré une dérégulation du contrôle de la perméabilité paracellulaire induite par les CGE pathologiques (issues de patients atteints de la maladie de Crohn) qui serait liée à une dysrégulation de la production de 15-HETE, qui en condition physiologique augmente l'expression de ZO-1 via une voie dépendante de l'AMPK.

4) mis en évidence que les CGE pathologiques, contrairement aux CGE contrôle, diminuaient les capacités d'étalement, de prolifération des CEI, de résistance de la BEI et de réparation épithéliale. Ces défauts seraient liés à un défaut d'expression de la L-PGDS et une diminution de production de dérivés de la PGD₂, la 15dPGJ₂ et le 11 α PGF₂ α notamment via une voie PPAR γ -dépendante.

Ces travaux ont donné lieu à trois articles, un récemment accepté et deux en préparation, présentés dans cette thèse. L'étude bibliographique qui les précède vise à présenter :

- les caractéristiques de la BEI et la régulation de son homéostasie
- une description de la structure et des fonctions du SNE
- les caractéristiques générales de l'inflammation avec l'exemple des MICI
- les atteintes de la BEI au cours de l'inflammation intestinale et celles du SNE, acteur et cible de l'inflammation.

Etude bibliographique

I. Organisation générale du tube digestif

L'appareil digestif est composé d'un ensemble d'organes comprenant la cavité buccale, le tube digestif (TD) ainsi que des glandes annexes. Long d'environ 8 mètres, le TD comprend successivement le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon) et le côlon (caecum, côlon droit ou ascendant, côlon transverse, côlon gauche ou descendant, côlon sigmoïde, rectum) se terminant par l'anus, l'intestin grêle et le côlon étant séparés par la valvule iléo-caecale de Bauhin. Les glandes annexes regroupent les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire et le pancréas reliés au TD par des canaux spécifiques. D'un point de vue histologique, les organes du TD possèdent une organisation commune avec une paroi constituée de quatre couches distinctes (*Figure 1*):

-la muqueuse qui borde la lumière intestinale est formée de la barrière épithéliale intestinale (BEI) et de la lamina propria. La BEI est une monocouche de cellules épithéliales polarisées reposant sur la lame basale. La lamina propria ou chorion est un tissu conjonctif riche en capillaires sanguins et lymphatiques, contenant de nombreux follicules lymphoïdes. Elle est séparée de la sous-muqueuse par la *muscularis mucosae* composée de deux fines couches de fibres musculaires lisses, la circulaire interne et la longitudinale externe.

-la sous-muqueuse est une couche de tissu conjonctif lâche contenant les plexus sous-muqueux (plexus de Meissner) et des vaisseaux sanguins et lymphatiques.

-la musculeuse est constituée d'une couche de fibres musculaires lisses interne et d'une couche longitudinale externe avec entre les deux, le plexus myentérique (plexus d'Auerbach).

-la tunique externe aux extrémités du tube digestif, est un tissu conjonctif lâche appelé adventice et pour le reste, il s'agit d'un tissu conjonctif tapissé d'un épithélium simple appelé séreuse.

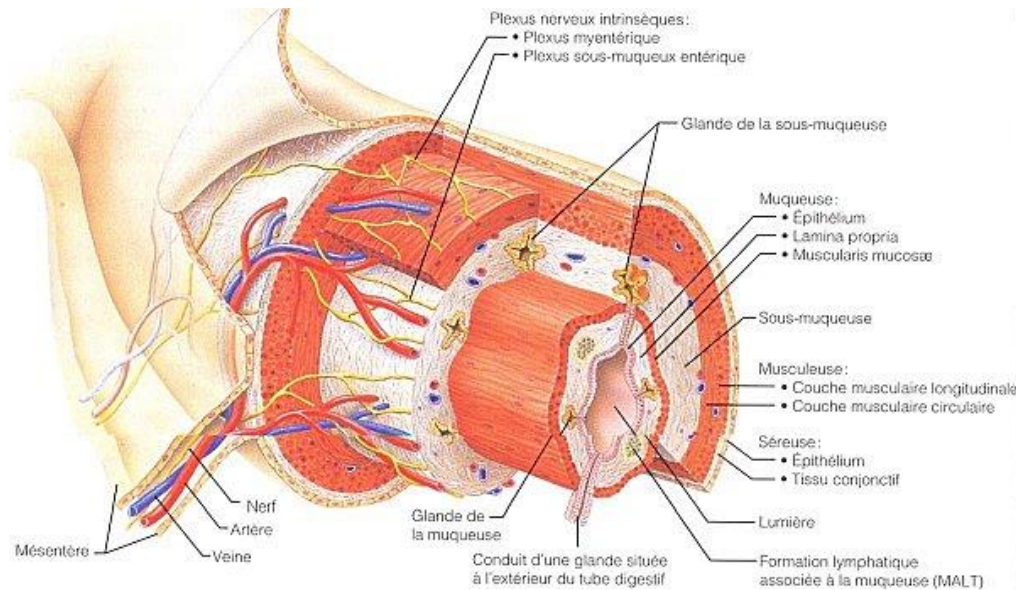


Figure 1 : Représentation schématique de la paroi du tube digestif.

La paroi du tube digestif est composée de quatre couches distinctes, de l'intérieur vers l'extérieur, la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse (tunique externe). D'après Marieb, 1993.

I.1 La barrière épithéliale intestinale

I.1.1 Généralités sur l'épithélium digestif

De l'œsophage jusqu'au rectum, le tube digestif est tapissé d'un épithélium qui constitue l'interface entre le milieu « extérieur », l'environnement et le milieu « intérieur », l'organisme. Pour chaque partie du tube digestif, cette barrière physique possède une organisation et des types cellulaires spécialisés. L'œsophage présente un épithélium pavimenteux stratifié ou malpighien non kératinisé, qui protège la paroi des frictions du bol alimentaire. Cet épithélium associé à la lamina propria constitue une muqueuse avec de profonds replis pour permettre une distension importante. Au niveau de l'estomac, il s'agit d'un épithélium unistratifié composé de cellules mucosécrétantes afin de former un film protecteur contre l'acidité gastrique. Les profondes invaginations dans la lamina propria permettent également une grande distension après les repas. Dans cette étude, seul l'épithélium intestinal et colique, appelé BEI, sera détaillé. Cette barrière dynamique doit assurer deux rôles : permettre l'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes et empêcher le passage de substances pathogènes (virus, toxines, bactéries).

I.1.2 Organisation de la barrière épithéliale intestinale

L'intestin grêle est le lieu d'absorption des nutriments, de l'eau, des électrolytes et des vitamines tandis qu'au niveau du côlon, les résidus non digestibles du bol alimentaire sont transformés en fécès grâce à la réabsorption de l'eau et de sels solubles. Ces fonctions distinctes sont permises par un épithélium spécialisé sur le plan morphologique et cellulaire (Figure 2). La muqueuse de l'intestin grêle offre une surface d'échanges très importante entre la lumière intestinale et le milieu intérieur qui augmente l'efficacité d'absorption des nutriments et ce grâce à trois niveaux d'organisation : les plis circulaires transversaux ou valvules conniventes d'1 cm de haut, les villosités de 0,5 à 1 mm de haut et les microvillosités de la bordure en brosse de 1 à 2 μm de haut (Figures 2A et 3). Au niveau du côlon, la muqueuse est plane et ponctuée d'invaginations cryptiques (Figure 2B).

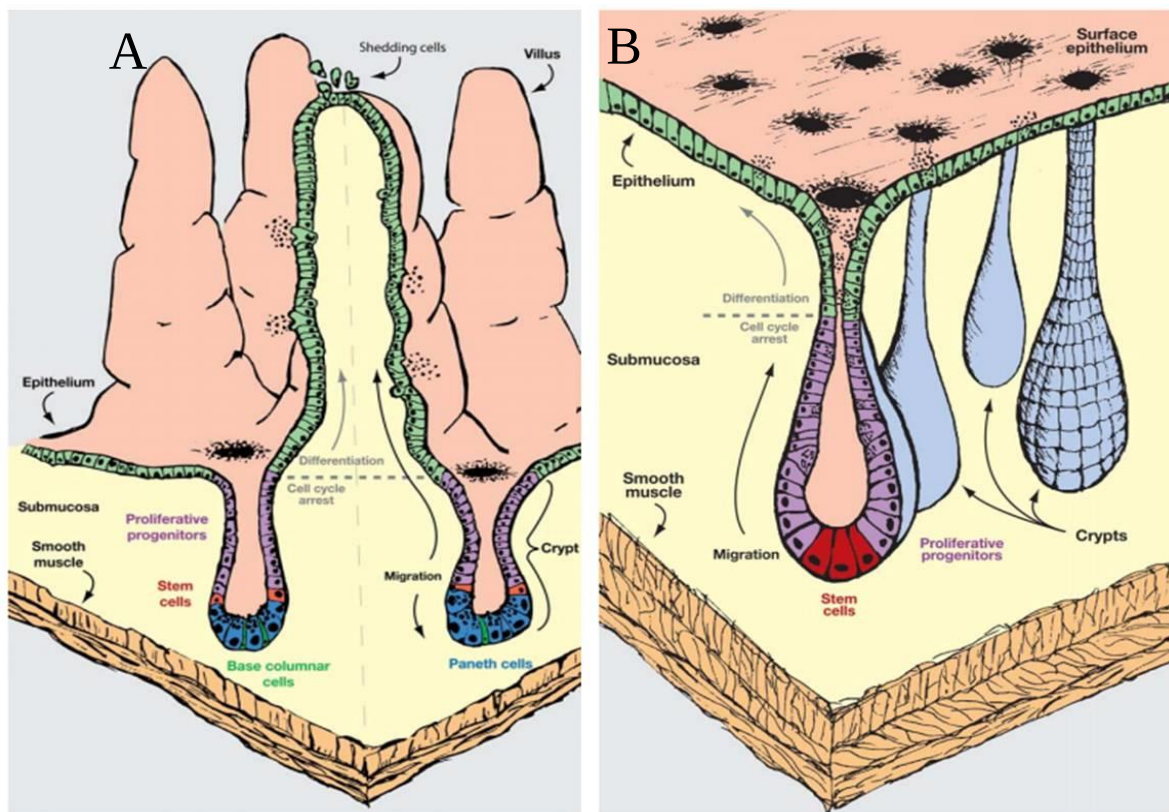


Figure 2: Schémas de l'organisation des épithéliums intestinal et colique.
Organisation de la muqueuse intestinale (A) et colique (B). D'après Sancho et al., 2004

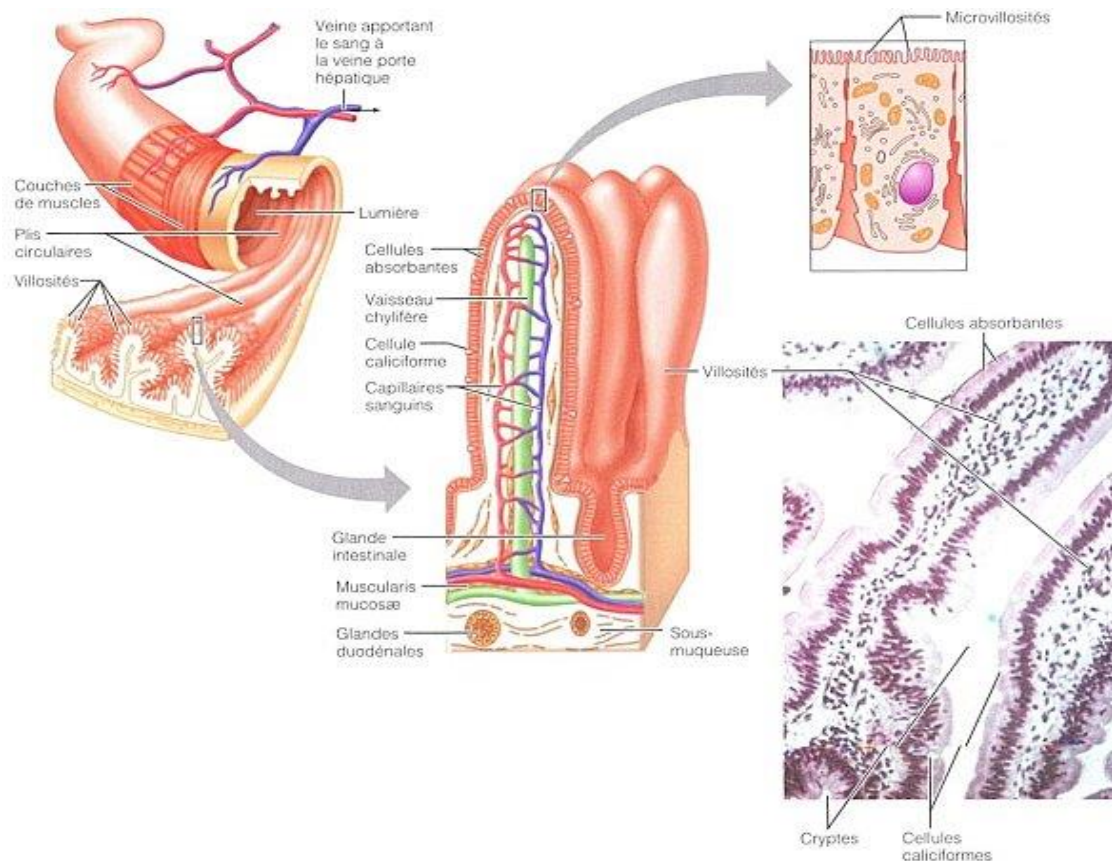


Figure 3 : Représentation schématique de la paroi de l'intestin grêle.

Les valvules conniventes, les villosités intestinales et les microvillosités augmentent la surface d'échanges entre le milieu « extérieur » et le milieu « intérieur ».

I.1.3 Les cellules de la barrière épithéliale intestinale

La BEI est constituée d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEI) polarisées reposant sur une lame basale. A l'heure actuelle, sept types de CEI dérivées des cellules souches ont été identifiés : les cellules absorbantes ou entérocytes, les cellules mucosécrétantes ou calciformes appelées aussi cellules de Goblet, les cellules entéroendocrines, les cellules de Paneth, les cellules « Cup », les cellules « Tuft » et les cellules M (Figure 4) (Crosnier et al., 2006; Gerbe et al., 2011; Goto and Kiyono, 2012).

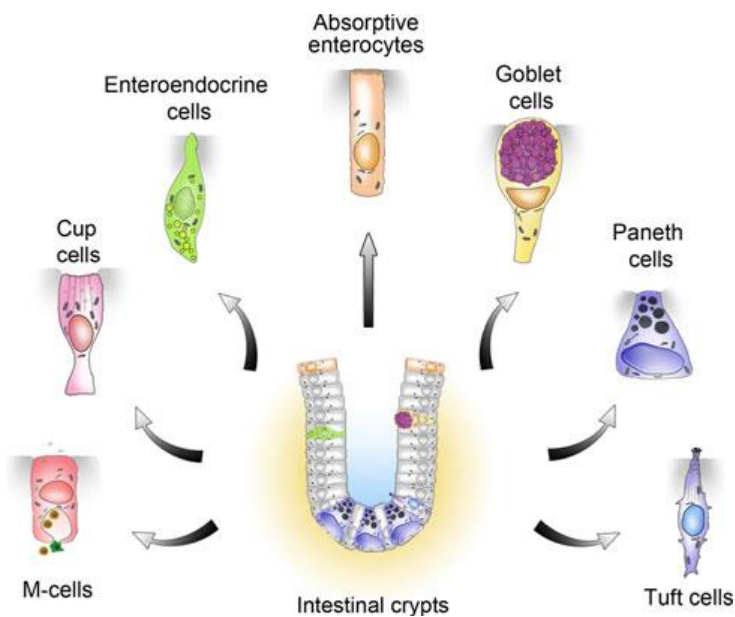


Figure 4 : Représentation de la structure des cryptes intestinales et des types de cellules épithéliales spécialisées obtenues à partir des cellules souches.

Les cellules souches épithéliales *Lgr5* situées à la base des cryptes, sont à l'origine des nombreux types de cellules épithéliales, les entérocytes, les cellules calciformes, les cellules entéroendocrines, les cellules de Paneth, les cellules « Cup », « Tuft » et M. D'après Gerbe et al., 2011.

I.1.3.1 Les cellules souches épithéliales intestinales

L'identité des cellules souches épithéliales intestinales a été controversée et a laissé place à deux modèles. Le premier est le modèle « +4 », plus récemment identifié par la présence du gène *Bmi*. Il suggère que les cellules souches sont situées en position +4 par rapport à l'axe crypto-villositaire, ce qui implique que le fond des cryptes est constitué de cellules de Paneth différenciées (Marshman et al., 2002). Le second modèle « stem cell zone » suggère que les cellules souches sont de petites cellules indifférenciées et en division, les « crypt base columnar cells » (CBC), situées entre les cellules de Paneth (Barker et al., 2008) et identifiées par la présence du gène *Lgr5* (Figure 5). Une étude de Yui et al a montré le potentiel des cellules CBC à réparer des dommages épithéliaux (Yui et al., 2012). En effet, ils ont démontré qu'il était possible d'isoler des cellules souches coliques *Lgr5*⁺, de les cultiver, de les expandre pour former des organoïdes et de les transplanter dans des souris ayant une colite induite par le dextran sodium sulfate (DSS). Ces cellules forment alors de nouvelles cryptes fonctionnelles qui semblent venir combler les lésions de la BEI. Ces cellules souches pourraient être une nouvelle stratégie régénérative pour des patients atteints de pathologies présentant un défaut de la BEI notamment les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI).

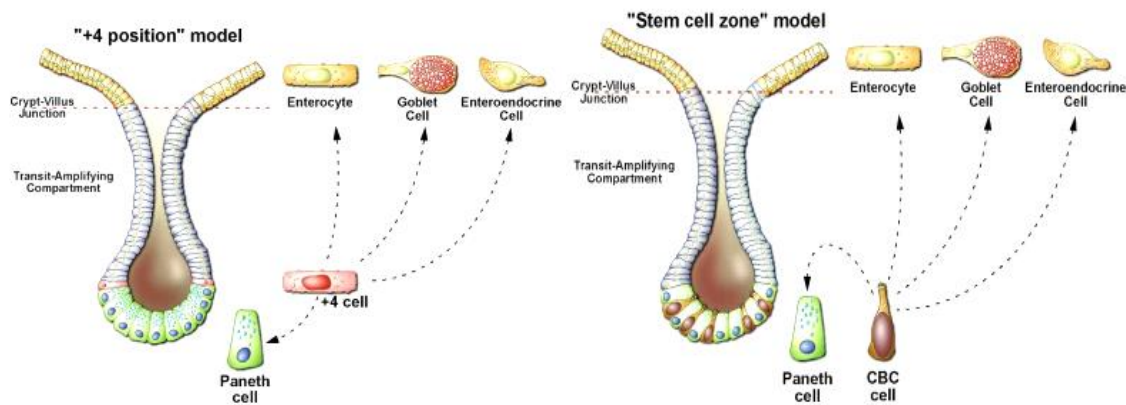


Figure 5 : Deux modèles de localisation des cellules souches intestinales.

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

Entre les cellules souches et les cellules différenciées, il existe un stade intermédiaire où les cellules souches se différencient en progéniteurs qui deviendront des cellules spécialisées. La première théorie est que les cellules souches donnent trois sortes de progéniteurs qui se différencient en entérocytes ou en cellules à activité sécrétoire. La seconde théorie est que les cellules souches donnent une première lignée de progéniteurs communs qui se différencient soit en entérocytes soit en une deuxième génération de progéniteurs des CEI à activité sécrétoire (Bjerknes and Cheng, 2006).

I.1.3.2 Les entérocytes

Les cellules absorbantes ou entérocytes représentent 80 % des CEI. Elles sont situées tout le long des villosités et au sommet des cryptes, et sont plus longues et plus nombreuses dans l'intestin grêle que dans le côlon. A leur pôle apical, ces cellules présentent une bordure en brosse grâce aux microvillosités recouvertes de glycocalyx, riche en glycoprotéines et glycolipides, jouant un rôle protecteur et contenant des enzymes nécessaires à la digestion et au transport des nutriments (Patsos and Corfield, 2009). Les enzymes et les différents transporteurs exprimés au pôle apical varient entre l'intestin grêle et le côlon. Les entérocytes ont pour fonction principale l'absorption des nutriments issus de la dégradation des aliments, de l'eau et des électrolytes (Ménard and Pothier, 1987).

I.1.3.3 Les cellules mucosécrétantes ou de Goblet

Les cellules calciformes ou de Goblet sont des cellules mucosécrétantes représentant environ 15 % des CEI. Elles sont présentes dans les cryptes et rares dans les villosités. Elles

sont retrouvées en quantité croissante du duodénum au côlon distal. Ces cellules possèdent à leur pôle apical des granules contenant des mucines, glycoprotéines membranaires ou sécrétées. Les mucines sécrétées et libérées par exocytose déterminent les propriétés du mucus qui recouvre la BEI (Booth and Potten, 2000; Madara and Trier, 1982). En lubrifiant l'épithélium, le mucus le protège des frottements du bol alimentaire et constitue une barrière physique de défense contre les pathogènes (toxines) et molécules de grande taille (protéases) présents dans la lumière. Enfin, la charge négative des mucines confère au mucus une propriété de barrière de diffusion sélective pour le passage de petites molécules ioniques (Allen et al., 1998).

I.1.3.4 Les cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines sont moins nombreuses que les autres types cellulaires et sont localisées principalement dans les glandes et à la base des villosités. Elles présentent à leur pôle basal des granules de sécrétion dont le contenu est libéré au niveau de la lamina propria. Dans l'intestin, il existe plus de 10 types de cellules entéroendocrines selon les substances qu'elles libèrent. Le type majoritaire est la cellule entérochromaffine qui est présente tout au long de l'intestin et libère de la sérotonine (5-hydroxytryptamine ; 5-HT). Les cellules CCK, S, GIP, M et N sécrètent respectivement la cholécystokinine, la sécrétine, le gastric inhibitory peptide, la motiline et la neurotensine et sont présentes uniquement dans l'intestin grêle. Les cellules L et D, localisées tout au long de l'intestin, sécrètent respectivement le PYY (peptide tyrosine tyrosine ou PP-like peptide) et la somatostatine (Rindi et al., 2004). Enfin, il existe des cellules entéroendocrines capables de sécréter la gastrine, l'entéroglucagon, la substance P (SP) ou le vasoactive intestinal peptide (VIP).

I.1.3.5 Les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth situées au fond des cryptes, se renouvellent beaucoup moins vite, tous les deux mois environ. Elles présentent des granules de sécrétion à leur pôle apical leur permettant de libérer des substances anti-microbiennes dans la lumière intestinale jouant un rôle majeur dans l'immunité innée (Baumgart and Carding, 2007; Bevins and Salzman, 2011; Jäger et al., 2013). Parmi ces substances, la famille des α -défensines, aussi produites

par les neutrophiles, comporte six membres chez l'homme dont l'HD5 exprimée de façon prédominante. Les β -défensines, produites par de nombreux types de CEI, ont une expression inductible sauf HBD1 (human β -defensin 1). Les défensines sont actives contre les bactéries et certaines sont aussi chimioattractantes (Yang, 1999; Yang et al., 2002). Les cellules de Paneth sécrètent aussi le lysozyme C (hydrolyse des peptidoglycanes de la paroi bactérienne), la phospholipase-A2 (sPLA2 ; hydrolyse les esters des acides gras de la membrane des bactéries) et la lectine de type C ou REG3 α (aussi appelée HIP/PAP chez l'homme) (Lasserre et al., 1999; Wehkamp and Stange, 2006). La dégranulation des cellules de Paneth se produit en réponse à des stimuli variés comme des agonistes cholinergiques, des bactéries ou des produits bactériens comme le LPS (Ayabe et al., 2000, 2002a, 2002b; Satoh et al., 1995).

I.1.3.6. Les cellules M ou « Microfold »

Au niveau du côlon, les cellules M, enchâssées dans la BEI, possèdent des microvilli qui empêchent l'accès des microorganismes à leur surface apicale. Elles sont associées aux follicules lymphoïdes et sont responsables de la reconnaissance et de la présentation de certains pathogènes luminaux aux cellules immunitaires (Neutra et al., 2001; Owen, 1999).

I.1.3.7 Les cellules Cup

Les cellules Cup sont caractérisées par une courte bordure en brosse, par une série linéaire de particules dans la membrane de leurs microvillosités et par une faible activité phosphatase alcaline (Gerbe et al., 2012). Elles expriment comme les cellules M, la vimentine, mais n'interviennent pas dans le transport des pathogènes/antigènes vers les cellules immunitaires.

I.1.3.8 Les cellules Tuft

Les cellules « Tuft » sont minoritaires, 0.4% des cellules de l'épithélium intestinal murin et se situent à l'apex des cryptes. Elles sont caractérisées par un unique système tubulo-vésiculaire et un faisceau de microfilaments connectés à de longues et fines microvillosités pénétrant la lumière intestinale (Gerbe et al., 2011, 2012; Reid et al., 2005). Elles ont notamment une fonction « senseur » du contenu luminal et peuvent sécréter des opioïdes.

I.1.4 L'homéostasie de la barrière épithéliale

L'homéostasie de la BEI est assurée par un équilibre entre les différents compartiments de prolifération, de différenciation et de mort programmée aboutissant à l'exfoliation des CEI (Potten, 1998; Potten et al., 1997). Cet équilibre permet un renouvellement de l'épithélium complet tous les 4-5 jours chez l'homme (Montrose, 2003) qui nécessite la production d'environ 10 milliards de cellules par jour (Bullen et al., 2006; van der Flier and Clevers, 2009). Les différents types de CEI sont issus de la différenciation des cellules souches intestinales présentes au fond des cryptes. Les cellules de Paneth se différencient en migrant vers le fond des cryptes, tandis que les trois autres types cellulaires migrent vers le haut selon l'axe crypto-villositaire (*Figure 6*).

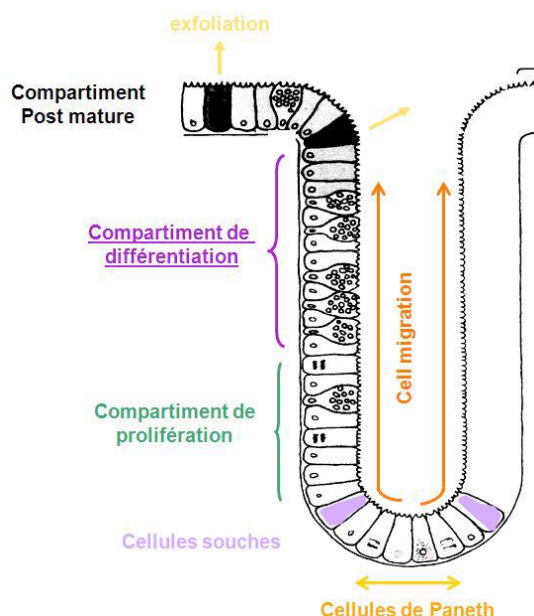


Figure 6 : Schéma simplifié des différents compartiments d'une crypte intestinale.

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

Le renouvellement perpétuel de l'épithélium intestinal et le maintien de son intégrité mettent en jeu une balance entre des cascades de signalisation : les trois voies, Wnt/ β -caténine (prolifération et maintien des cryptes), TGF β /BMP (inhibition de la prolifération et induction de la différenciation) et Hedgehog (prolifération, réparation, action anti-inflammatoire) maintiennent l'architecture des cryptes et des villi tandis que les deux voies, Notch (prolifération et inhibition de la différenciation) et Hippo (inhibition de la prolifération et apoptose) contrôlent le destin des cellules souches (Jeon et al., 2013).

I.1.4.1 La prolifération des cellules épithéliales intestinales

La prolifération cellulaire résulte du cycle cellulaire, succession de 4 phases : G1 (gap), S (synthèse), G2 et M (mitose). Entre la phase G1 et la phase S, il existe un point de restriction qui selon les signaux environnementaux conduit soit à l'entrée en phase S, soit à un état quiescent G0. Chaque étape est contrôlée par des kinases dépendantes des cyclines (CDK) se liant à des cyclines qui les activent. L'activité des CDK est elle aussi soumise à des contrôles négatifs via des interactions avec des protéines inhibitrices (CKI) comme INK4 et CIP/KIP qui répondent à des messagers extracellulaires.

La prolifération est contrôlée par la voie Wnt/ β -caténine (*Figure 7*). En l'absence de ligand, la β -caténine est séquestrée par un complexe de dégradation multiprotéique contenant la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli), l'axine, la GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase) et la CK1 (Casein Kinase). Puis la β -caténine est phosphorylée et dégradée par le protéasome. Les ligands Wnt sont des glycoprotéines sécrétées de manière paracrine par de nombreux types cellulaires qui vont se lier au récepteur transmembranaire Frizzled. Cela entraîne l'inhibition de la formation du complexe, la voie est alors activée. La β -caténine s'accumule dans le cytoplasme (Pinto and Clevers, 2005) avant d'être 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 tels que l'oncogène *c-myc* ou encore *BCL1* codant pour la cycline D1 (Tetsu and McCormick, 1999), entraînant ainsi une augmentation de la prolifération cellulaire (Pinto and Clevers, 2005). 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-villositaire. 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, une perte progressive de l'architecture glandulaire et des ulcérations de la muqueuse (Kuhnert et al., 2004; Pinto et al., 2003).

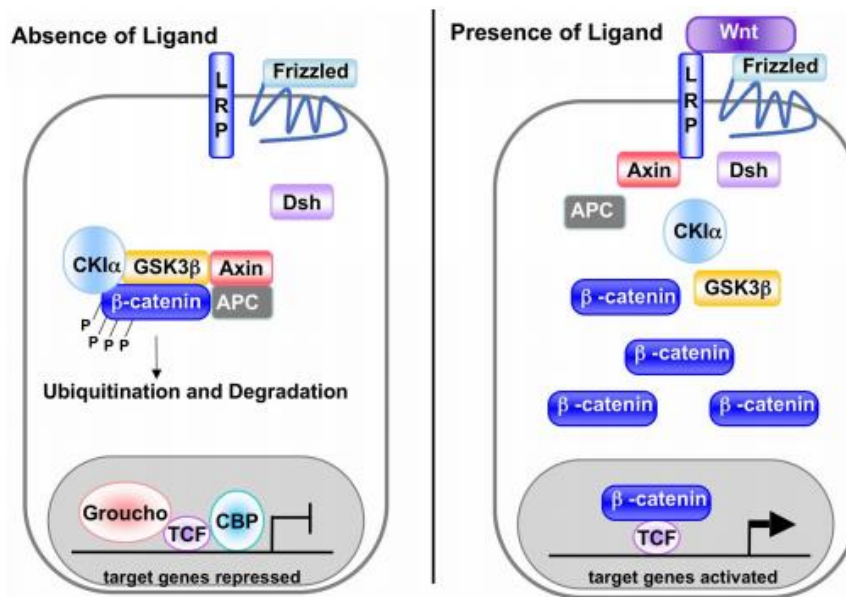


Figure 7 : Voie de signalisation Wnt/β-caténine.

En absence de ligand Wnt, le complexe de dégradation multiprotéique (CK1α, GSK3β, APC et Axin) hyperphosphoryle la β-caténine qui va être ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. La fixation d'un ligand Wnt à son récepteur Frizzled et son co-récepteur LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein) entraîne l'inhibition du complexe de dégradation. La β-caténine hypophosphorylée s'accumule dans le cytoplasme avant d'être transloquée dans le noyau. Son association avec le complexe TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancing factor) induit la transcription de gènes cibles. D'après Eisenmann, 2005.

I.1.4.2 La différenciation des cellules épithéliales intestinales

Au cours de la différenciation, la polarité de la BEI se met en place. Elle est assurée par la répartition spécifique des protéines au pôle apical et baso-latéral (Le Bivic et al., 1989, 1990). La différenciation des CEI au cours de leur migration le long des cryptes est contrôlée par la voie de signalisation Wnt/ β-caténine/ Notch (Figure 8).

De la même manière, l'inactivation d'APC résulte en la repopulation des villi par des cellules phénotypiquement comparables aux cellules des cryptes mais présentant une accumulation nucléaire de β-caténine et étant incapables de migrer et de se différencier (Sansom et al., 2004). Par ailleurs, chez les souris APC^{-/-}, il a été observé également une augmentation du nombre de cellules se différenciant en cellules de Paneth (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 prématurée des CEI concernant notamment le compartiment de prolifération comprenant les cellules souches (Fevr et al., 2007).

La voie de signalisation Notch semble également jouer un rôle majeur dans la différenciation des CEI (*Figure 8A*). L'interaction d'un ligand avec le récepteur Notch induit le clivage du récepteur et la libération du domaine intracellulaire NICD (Notch intracellular domain). Une fois libéré, NICD est ensuite transloqué dans le noyau activant la transcription des gènes cibles dont fait partie les Hes (Hairy/Enhancer of Split) notamment Hes1. Les Hes sont des répresseurs d'autres facteurs de transcription appelés bHLH (basic helix-loop-helix). Lorsque les facteurs bHLH sont dérprimés, ils induisent la différenciation des CEI (van der Flier and Clevers, 2009). Les intestins d'embryons de souris Hes1 ^{-/-} présentent une augmentation de la proportion de cellules Paneth, mucosécrétantes 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 invalidées pour le facteur de transcription bHLH Math1, est uniquement composé d'entérocytes (Yang et al., 2001).

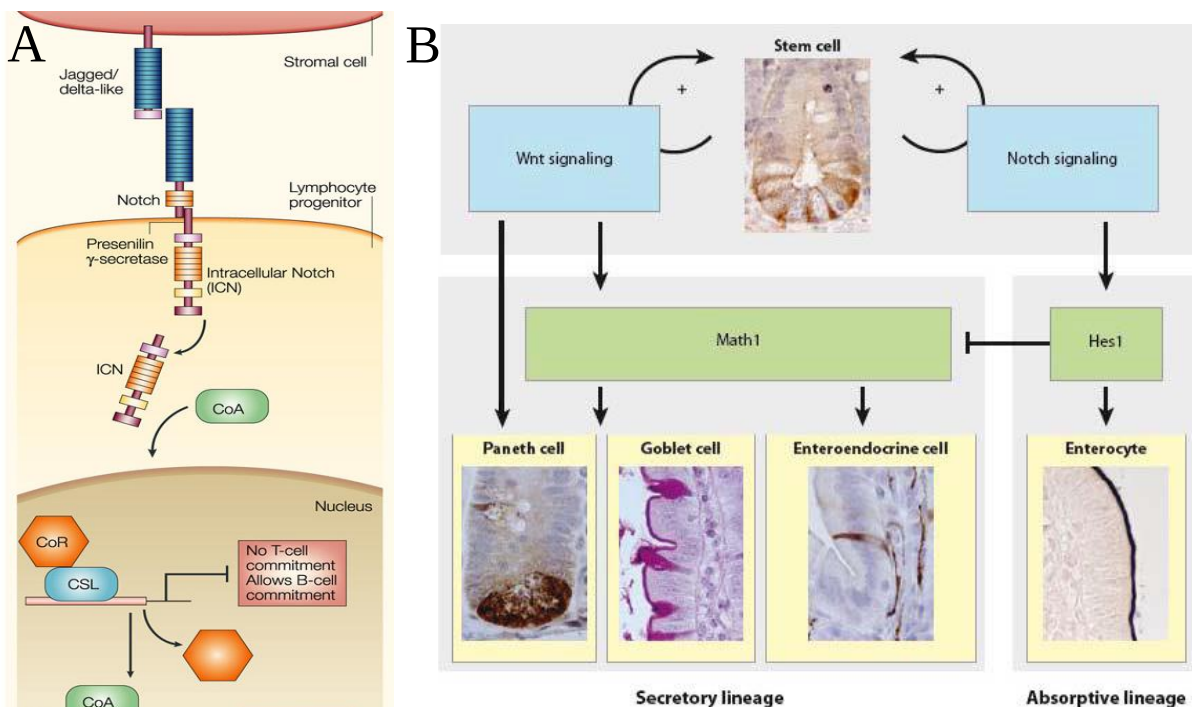


Figure 8 : Voie de signalisation Notch et influence des voies Wnt et Notch sur la différenciation des CEI.

(A) Suite à l'interaction d'un ligand (Jagged ou Delta-like) avec le récepteur Notch, celui-ci est clivé libérant le domaine intracellulaire NICD (Notch intracellular domain). Le domaine libre ICN (Intracellular Notch) est transloqué dans le noyau où il interagit avec un co-activateur (CoA) et induit la transcription des gènes cibles dont la famille Hes (Hairy/Enhancer of Split). D'après Zúñiga-Pflücker, 2004. (B) Représentation de l'influence des voies Notch et Wnt sur la différenciation des CEI. Le gène codant pour Hes1 régule la différenciation des entérocytes via la répression de Math-1. Le facteur de transcription Math-1 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.

I.1.4.3 La mort des cellules épithéliales intestinales

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

La nécrose (mort prématurée et non programmée) et l'autophagie (dégradation du cytoplasme de la cellule par ses propres lysosomes) sont également mis en jeu pour le maintien de l'intégrité de la BEI (Nunes et al., 2014). L'autophagie (*Figure 9*) est un mécanisme de défense contre les pathogènes intracellulaires en médiant la présentation des antigènes via le CMHII (Cooney et al., 2010; Travassos et al., 2010). Elle est impliquée dans les maladies neurodégénératives, la mort, la survie cellulaire, et la régulation des réponses immunitaires. Une dysfonction est associée à un défaut de prise en charge des pathogènes, prolongeant ainsi leur survie et induisant une inflammation incontrôlée. Les variants des gènes NOD2, ATG16L1 et IRGM de l'autophagie sont associés aux MICI (Bonen et al., 2003; Ogura et al., 2003; Spalinger et al., 2014) (*cf partie III.2 sur les MICI*).

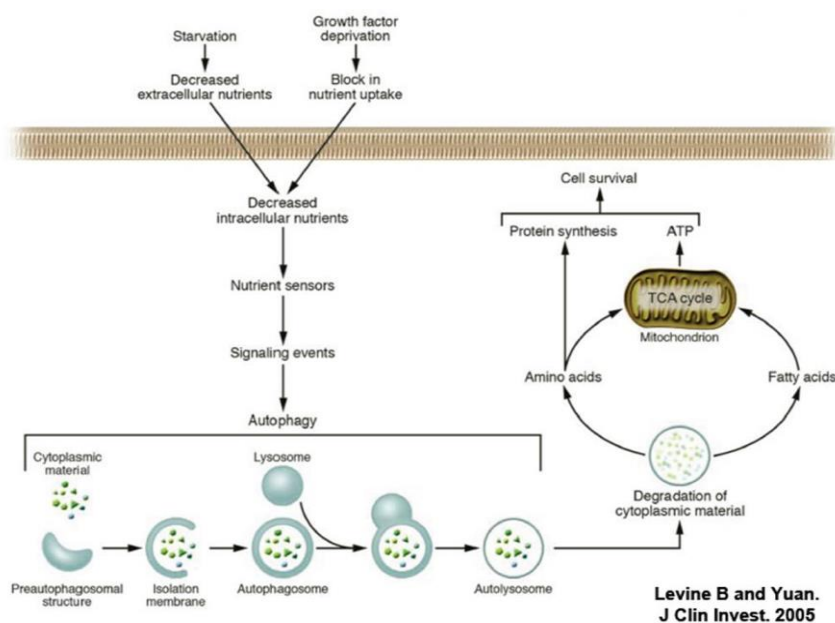


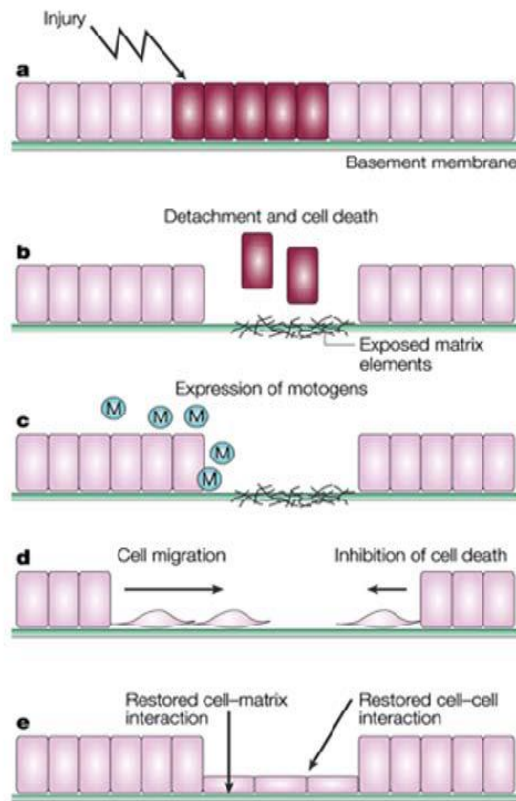
Figure 9: Mécanisme simplifié de l'autophagie. D'après Levine et Yuan, 2005.

I.1.4.4 La réparation de la barrière épithéliale intestinale

La BEI est en permanence soumise à des agressions physiques, telles que les déformations dues au péristaltisme, pouvant conduire à la formation de lésions « physiologiques » (Chaturvedi et al., 2007). Lors de conditions pathologiques, comme des invasions par des pathogènes ou des états inflammatoires chroniques, d'importantes desquamations de l'épithélium peuvent se produire. Des processus de réparation importants sont alors nécessaires pour assurer un retour à l'homéostasie et impliquent le recrutement de neutrophiles afin d'assurer un contrôle de l'infection de la lésion (Blikslager et al., 2007).

Le processus de réparation de la BEI est constitué de trois étapes séquentielles (*Figure 10*) qui, en réalité, se superposent chronologiquement *in vivo* (Sturm and Dignass, 2008). La première étape est la restitution épithéliale: les villi se contractent et les CEI viables autour de la zone lésée s'étalent et migrent pour rétablir rapidement la continuité de la BEI (Lacy, 1988). La restitution épithéliale est indépendante des mécanismes de prolifération cellulaire (Mammen and Matthews, 2003; Podolsky, 1999). Elle résulte d'un remodelage cellulaire mettant en jeu une dépolarisation partielle des CEI, qui vont acquérir un phénotype mobile grâce à la villine qui rompt l'actine-F et induit des réarrangements du cytosquelette d'actine (Ubelmann et al., 2013). Ensuite, s'en suivront deux étapes de prolifération et de différenciation des CEI pour fermer les espaces intercellulaires et les jonctions serrées afin d'aboutir à une régénération de la continuité et des fonctions de la BEI (Sturm and Dignass, 2008).

Pour des lésions superficielles, la réparation est rapide, de quelques heures à quelques jours (Podolsky, 1999). Dans les cas de lésions sévères et profondes, elle 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 un excès de production de collagène et d'éléments de la matrice est observé. Des défauts de réparation peuvent conduire à la formation d'ulcérations de la muqueuse (Sturm and Dignass, 2008).



a. lésion localisée de la BEI

b. détachement et mort des CEI générant un défaut de continuité de la BEI et une exposition directe de la matrice au contenu luminal

c. la matrice et les cellules adjacentes à la BEI libèrent des facteurs favorisant la restitution

d. étalement et migration des cellules viables entourant la zone lésée et inhibition de la mort des CEI

e. la restauration de la continuité de la BEI et de ses fonctions est permise par une restauration des jonctions cellule-cellule et cellule-matrice

Figure 10 : Étapes de la restitution de l'épithélium. D'après Taupin et Podolsky, 2003.

I.1.5 Les fonctions des entérocytes

I.1.5.1 Activité sécrétoire des entérocytes

La BEI communique avec son environnement par la sécrétion de cytokines, chimiokines (Stadnyk, 2002) agissant de façon autocrine et paracrine notamment des facteurs chimiotactiques favorisant le recrutement et l'activation des leucocytes au cours de lésions épithéliales. Les CEI sont les premières cellules productrices de chimiokines du fait de leur exposition aux antigènes de la flore. Des études ont montré que les lignées HT29 ou Caco-2, produisaient $\text{GRO}\alpha$, IL-8 (attraction des neutrophiles), MCP-1 (recrutement des monocytes/macrophages), MIP-1 α (présence des cellules dendritiques transépithéliales), MIP-1 β , IP-10 (recrutement lymphocytaire) et RANTES (Yang et al., 1997). La sécrétion d'IL-8 est constitutive ou variable selon les lignées (Branka et al., 1997; Daig et al., 2000; Warhurst et al., 1998; Yang et al., 1997). Les CEI sécrètent également de grande quantité de prostaglandines, PGE_2 , LTB_4 , 5-, 12-, et 15-HETE qui favorisent leur propre croissance et leur synthèse d'ADN (Cabral et al., 2013).

I.1.5.2 Le maintien de la barrière épithéliale intestinale

La BEI doit assurer l'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes et constituer une barrière de défense imperméable aux substances toxiques et agents pathogènes. La muqueuse intestinale joue le rôle de filtre sélectif constituant une véritable barrière physique grâce à l'existence d'interactions cellule-cellule et cellule-matrice et une barrière biologique par la sécrétion de mucus, de substances anti-microbiennes ou encore de cytokines.

Les interactions cellule-cellule

Les interactions cellule-cellule sont réalisées entre des CEI voisines par des complexes protéiques reliant leur cytosquelette : les jonctions adhérentes et les desmosomes.

Les jonctions adhérentes ou zonula adherens relient les CEI entre elles via des interactions Ca^{2+} -dépendantes réalisées par la protéine transmembranaire E-cadhérine (*Figure 11*). La E-cadhérine est reliée par son domaine cytoplasmique aux protéines γ - (plakoglobine) ou β -caténine. Ces complexes E-cadhérine/plakoglobine ou E-cadhérine/ β -caténine sont reliés au cytosquelette d'actine via des protéines cytoplasmiques α -caténine, α -actinine et vinculine (Ebnet, 2008). Ces jonctions fournissent une stabilité à la BEI et sont sans cesse remodelées en réponse à des stimuli. Leur assemblage et désassemblage sont régulés par le remodelage de l'actine, le recyclage des protéines jonctionnelles et par de nombreuses voies de signalisation comme les petites protéines G des familles Rho, Ras, Rab et Arf (Citalán-Madrid et al., 2013).

Il existe d'autres jonctions cellule-cellule telles que les desmosomes (*Figure 12*). Ces complexes relient les CEI par leur cytosquelette de filaments intermédiaires composés de cytokératines et permettent à la BEI, comme les jonctions adhérentes, de résister aux forces de pression et de tiraillement (Garrod et al., 2002).

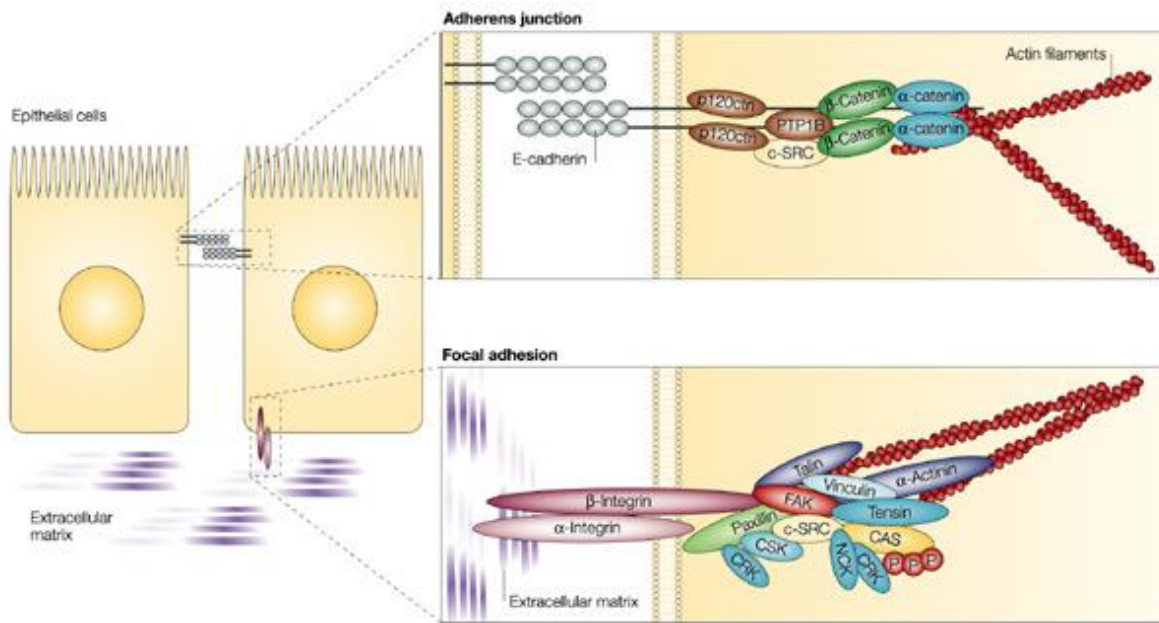


Figure 11 : Les jonctions adhérentes et les adhésions focales médient l'adhésion des CEI.

Les jonctions adhérentes (adherens junction) permettent l'adhésion cellule-cellule via la liaison de deux molécules d'E-cadhérine de deux cellules adjacentes. Un complexe protéique cytoplasmique constitué d' α -caténine, de β -caténine et de caténine P120 (p120ctn) relie l'E-cadhérine au cytosquelette d'actine. c-SRC associé à ce complexe et après activation, est capable de promouvoir la rupture des jonctions. La protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) aussi localisée dans le complexe peut déphosphoryler et activer c-SRC. Au niveau des adhésions focales, le cytosquelette d'actine des est lié à la matrice extracellulaire via les protéines transmembranaires, α - et β -intégrines et des protéines cytoplasmiques (paxilin, talin, vinculin, tensin and α -actinin). De nombreuses molécules de signalisation comme FAK (Focal Adhesion Kinase) ou c-SRC peuvent après activation augmenter le renouvellement des adhésions focales et la motilité cellulaire. c-SRC tyrosine kinase (CSK) est responsable de la phosphorylation et l'inactivation de c-SRC pour maintenir l'adhésion quand la motilité n'est pas requise. CRK et NCK sont des protéines adaptatrices et des substrats de c-SRC. Elles servent au recrutement d'effecteurs impliqués dans la réorganisation du cytosquelette. Enfin, CRK-associated substrate (CAS) est un substrat des tyrosine-kinases impliqué dans le contrôle médié par les intégrines. D'après Yeatman, 2004.

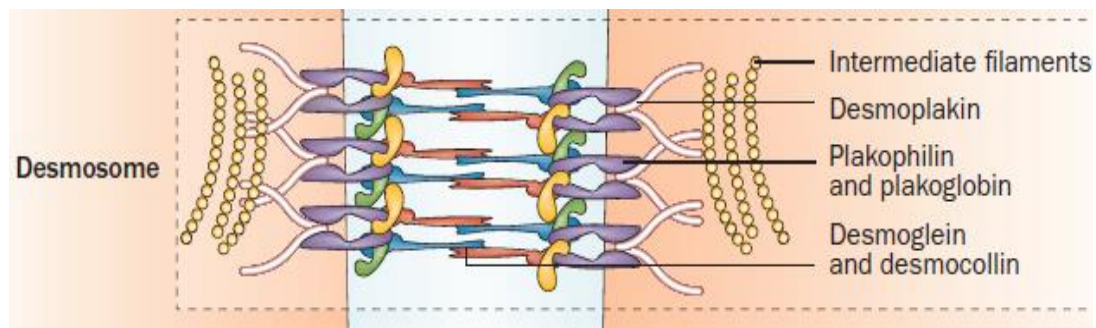


Figure 12: Organisation des desmosomes entre deux cellules épithéliales.

Les desmosomes lient les cellules épithéliales entre elles et confèrent la force mécanique à la barrière épithéliale intestinale. D'après Neunlist et al., 2012.

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

Les interactions cellule-matrice

A leur pôle basolatéral, les CEI adhèrent et établissent des interactions fonctionnelles avec la matrice extracellulaire constituée par un enchevêtrement complexe de macromolécules, composé d'un ensemble de polysaccharides et de protéines. Les polysaccharides, comme l'acide hyaluronique, sont reliés à des protéines pour former des protéoglycanes et donnent un gel permettant à la matrice de résister aux forces de compression (Bishop et al., 2007; Toole, 2001). Dans la composante protéique de la matrice, on distingue la famille des collagènes (type I à XIV) essentiellement responsable de la structure de la matrice (van der Rest and Garrone, 1991) ainsi que la fibronectine (2 sous-unités) et la laminine (16 membres) (Tzu and Marinkovich, 2008) plutôt impliquées dans l'organisation structurale et l'adhérence via leur liaison aux intégrines des CEI (Kaspar et al., 2006). 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 protéoglycanes 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 protéoglycanes (Basson, 2003). Les contacts entre la cellule et sa matrice sont assurés par les intégrines qui sont des hétérodimères composés de deux sous-unités α et β associées de façon non covalentes et dont il existe plusieurs isoformes donnant une spécificité d'interaction entre une intégrine donnée et un composant 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).

Les structures d'adhésion de la BEI avec sa matrice sont appelées adhésions focales (*Figure 11*). Les intégrines, liées par leur domaine extracellulaire à la matrice, sont rassemblées en amas. Elles 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. 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 : les héli-desmosomes. Les composants de la matrice extracellulaire, laminine, collagène et fibronectine, sont capables de moduler les fonctions de la BEI (détail en I.1.6).

I.1.5.3 Perméabilité de la barrière épithéliale intestinale

Les flux à travers la BEI, ou perméabilité, sont gouvernés par :

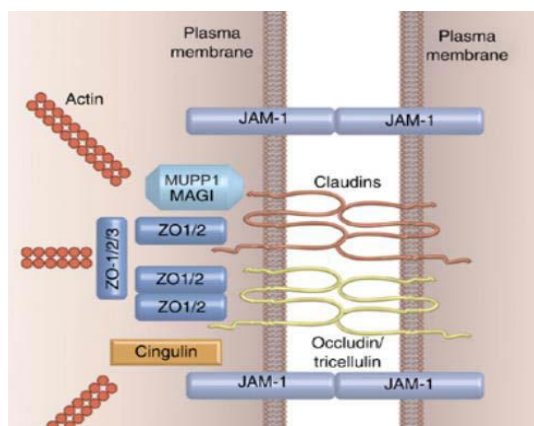
- la perméabilité paracellulaire qui résulte de l'existence, entre les CEI, de pores sélectifs à certains ions ou molécules, les jonctions serrées
- la perméabilité transcellulaire qui résulte d'un transport actif ou passif de molécules à travers les CEI, faisant intervenir des pompes et des canaux membranaires spécialisés.

Perméabilité paracellulaire

La perméabilité paracellulaire est permise par des pores (0,3 nm de diamètre) formés par les jonctions serrées (Suzuki, 2013). En modulant la taille de ces pores, les protéines des jonctions serrées, régulent le passage des électrolytes et des molécules selon leur taille mais aussi leur charge (Colegio et al., 2002; Tang and Goodenough, 2003). La perméabilité est régulée par différents facteurs comme des facteurs de croissance, des nutriments, des protéases, des cytokines et des agents pathogènes (Daugherty and Mrsny, 1999; Suzuki, 2013). Les méthodes d'étude de la perméabilité sont détaillées dans l'annexe 1.

Les jonctions serrées des CEI ont été identifiées dès 1963 (Farquhar and Palade, 1963) et les protéines majeures qui les composent ont été découvertes en 1986 par Stevenson et al (Stevenson et al., 1986). Ces jonctions se situent dans des micro-domaines membranaires glycolipidiques ou rafts (Nusrat et al., 2000a) et sont des complexes multiprotéiques associant des protéines transmembranaires, les claudines, l'occludine et les protéines JAM (Junction Adhesion Molecule ; CAR, Pals1, MAGI-1), des protéines cytoplasmiques, les zonula occludens (ZO), la cinguline reliées au cytosquelette d'actine (Förster, 2008) et la tricelluline (Figure 13). La perméabilité paracellulaire ou passage de molécules entre deux CEI, résulte

de la régulation des protéines de ces jonctions (Furuse et al., 2001). Il ne s'agit pas seulement d'un passage passif (Gonzalez-Mariscal et al., 2003; Matter and Balda, 2003) mais la perméabilité est également déterminée par la sélectivité de taille et de charge qui dépend de la composition moléculaire des jonctions serrées (Colegio et al., 2002; Tsukita et al., 2001). Ainsi, l'occludine est une protéine transmembranaire présentant des sites de phosphorylation sur sérine et thréonine. Elle a plusieurs formes entre 60 et 80kDa selon son état de phosphorylation et sa localisation (Wong, 1997). Selon les études, l'occludine participe à l'étanchéité de la BEI (Balda et al., 1996; Bamforth et al., 1999; McCarthy et al., 1996), à la migration transépithéliale des polynucléaires neutrophiles et à la régulation transcriptionnelle (Vietor et al., 2001). La famille des claudines comporte 24 isoformes entre 20 et 30kDa. Ces protéines transmembranaires participent à la formation et à la sélectivité des pores (Colegio et al., 2002; Van Itallie et al., 2001; Lu et al., 2013; Tsukita et al., 2001). Plus récemment identifiée, la tricelluline permet la structure et la fonction des jonctions entre trois CEI voisines en se liant à l'occludine et aux claudines (Krug et al., 2009). Les Zonula Occludens possèdent trois membres dont ZO-1, protéine de 220kDa, qui interagit avec son facteur de transcription ZONAB (ZO1 associated nucleic acid-binding protein) (Balda and Matter, 2000; Balda et al., 2003). Ce complexe va réguler la prolifération, la densité cellulaire et la transition G1-S du cycle cellulaire. Par exemple, une surexpression de ZO-1 entraîne la séquestration de ZONAB dans le cytoplasme où il forme un complexe avec CDK4 et ainsi inhibe la prolifération. Son implication dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire a été démontrée par de nombreuses études (Leroy et al., 2000; Nusrat et al., 2000b). ZO-2 interagit avec les claudines, l'occludine (Itoh et al., 1999b, 1999c) et est présente au niveau des jonctions et du noyau (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). La fonction de ZO-3 est mal connue mais elle semble aussi interagir avec les autres protéines des jonctions.



Les jonctions serrées lient deux cellules épithéliales intestinales voisines par l'intermédiaire d'un complexe multiprotéique composé des claudines, de l'occludine et des protéines JAM étant reliées au cytosquelette par l'intermédiaire des Zonula Occludens et de la cinguline. D'après Niessen et al., 2007.

Figure 13 : Organisation simplifiée des jonctions serrées.

Le mécanisme d'ouverture des jonctions serrées est régulé par la PKC et les protéines Rho GTPases qui entraînent la rupture des jonctions en modulant le cytosquelette d'actine. La phosphorylation de la MLC par la MLCK, induit la contraction de l'actomyosine périjonctionnelle aboutissant à l'ouverture des jonctions de la BEI (Ashida et al., 2012). L'activité des enzymes régulant ces jonctions sont soumises à de nombreux stimuli (bactéries, cytokines...) (Figure 14).

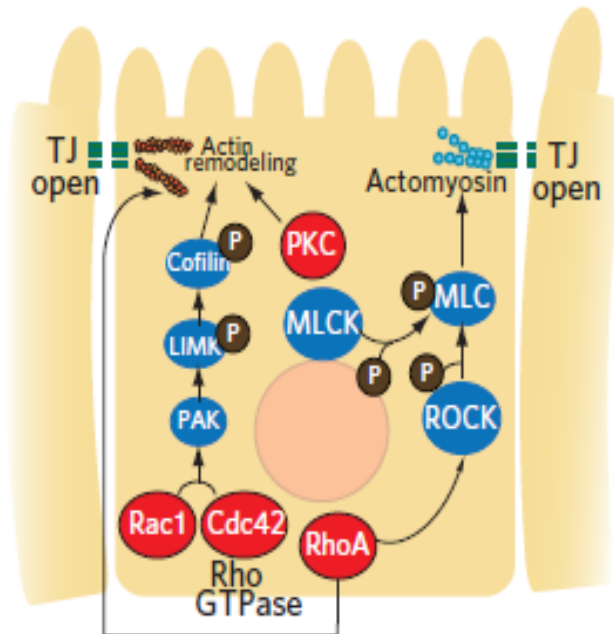


Figure 14 : Voies de régulation de l'ouverture des jonctions serrées. D'après Ashida et al., 2012.

Perméabilité transcellulaire

La perméabilité transcellulaire permet le passage des nutriments, de l'eau et des électrolytes à travers les entérocytes, vers la circulation sanguine. Selon leurs propriétés, les molécules peuvent traverser l'épithélium de manière passive ou active, par diffusion ou par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques.

Absorption de l'eau et des électrolytes

Les électrolytes et l'eau sont absorbés grâce à plusieurs mécanismes (Figure 15A). Tout d'abord, le Na^+ pénètre au pôle apical des entérocytes grâce au cotransport Na^+ /glucose ou Na^+ /acide aminé et grâce à l'antiport Na^+/H^+ , selon un gradient de concentration maintenu par la pompe $\text{ATPase Na}^+/\text{K}^+$ située dans la membrane basolatérale. Cette absorption entraîne une légère électronégativité luminale et une absorption d'eau qui concentre les ions dans la lumière intestinale. Il en résulte une absorption d'anions Cl^- par des voies paracellulaire et transcellulaire. La voie transcellulaire est permise par un transporteur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ au niveau de

la membrane apicale des entérocytes, qui fait apparaître une sécrétion d'ions HCO_3^- en échange de l'absorption de Cl^- . Cette absorption de NaCl résulte également en une absorption d'eau qui concentre les ions K^+ dans la lumière intestinale et favorise leur passage par la voie paracellulaire.

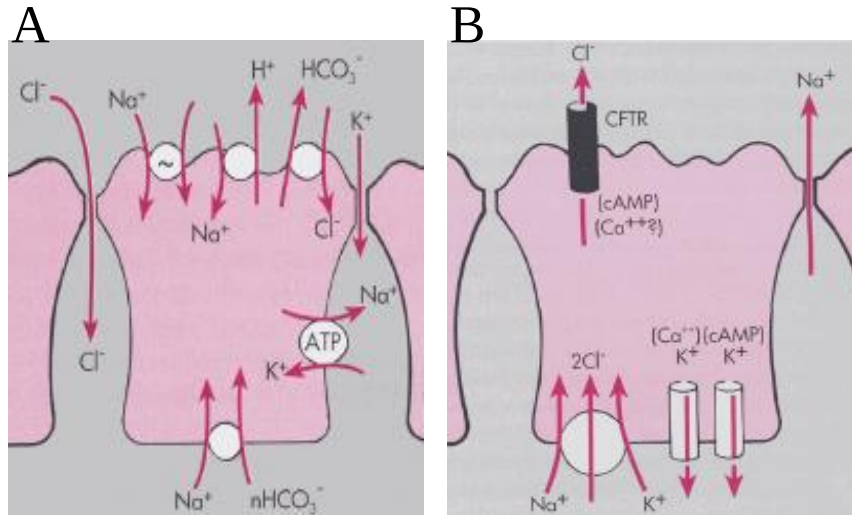


Figure 15: Absorption et sécrétion des électrolytes par les entérocytes.

(A) Une absorption de Na^+ et de Cl^- s'effectue dans l'intestin grêle. Une sécrétion de HCO_3^- se fait en échange de l'absorption des ions Cl^- . Les ions K^+ traversent la BEI par voie paracellulaire. (B) Les ions Cl^- sont sécrétés au pôle apical à travers les canaux CFTR. La sécrétion de Cl^- entraîne la sécrétion de Na^+ par voie paracellulaire.

http://www.chusa.upmc.fr/pedagogie/dcem1/eia_hge/DCEM1_Physiologie_digestive_2.pdf.

Sécrétion de l'eau et des électrolytes

Au niveau des cryptes, les ions Cl^- pénètrent au pôle basolatéral des CEI grâce au cotransport triple $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$. Ils sont ensuite sécrétés au pôle apical par des canaux CFTR. Les ions K^+ sont évacués au pôle basolatéral à travers les canaux K^+ . La sécrétion de Cl^- entraîne la sécrétion de Na^+ par voie paracellulaire et la sécrétion d'eau (Figure 15B). Dans la cellule au repos, les canaux Cl^- sont fermés mais leur ouverture peut être induite par une hormone ou un neurotransmetteur.

Absorption des macromolécules

De par leur taille, les macromolécules ou les structures cellulaires telles que les bactéries ou les cellules apoptotiques, ne peuvent pas traverser la membrane plasmique des entérocytes. Leur absorption est permise par des phénomènes d'endocytose, de phagocytose (Lu and Walker, 2001; Neal et al., 2006) ou de pinocytose (Walker and Isselbacher, 1974).

Absorption des nutriments (*Figure 16*)

Les acides gras libres, les monoglycérides et le cholestérol, formés sous l'action des enzymes pancréatiques, sont contenus dans des micelles chargées négativement et formées par les acides biliaires. Ces micelles sont endocytées dans l'intestin grêle. Les acides gras à chaîne longue nécessitent un transporteur MVM-FABP (microvillous membrane fatty acid-binding protein), dont l'activité dépend du gradient de Na^+ (Stremmel et al., 1985). A l'intérieur de l'entérocyte, les lipides sont transportés dans le cytosol grâce aux protéines de transport FABP (fatty acid binding protein) et SCP (sterol carrier protein). Les acides gras à moins de 11 carbones diffusent directement vers la veine porte alors que les acides gras à plus de 12 carbones subissent une réestérification dans le réticulum endoplasmique. Les triglycérides, phospholipides et esters de cholestérol reformés, sont emballés dans des chylomicrons recouverts d'apolipoprotéines et stockés dans l'appareil de Golgi avant d'être exocytés dans la lymphe. Les monosaccharides (glucose, fructose, galactose), même s'ils peuvent diffuser à travers la membrane plasmique, sont majoritairement transportés dans les entérocytes par des transporteurs spécifiques (Caspary, 1992). Le fructose entre dans l'entérocyte grâce au transporteur GLUT5 présent au niveau du pôle apical et ressort vers la circulation sanguine grâce au transporteur GLUT2 présent au niveau basolatéral (Jones et al., 2011). Le transport du fructose ne consomme pas d'énergie et s'effectue selon un gradient de concentration. Au contraire, le glucose et le galactose entrent activement dans l'entérocyte grâce à un cotransporteur sodium dépendant, appelé SGLT nécessitant de l'énergie fournie par le passage passif d'ions Na^+ (Hopfer and Groseclose, 1980). Le maintien du gradient Na^+ est assuré par les pompes Na^+/K^+ de la membrane basolatérale. Le glucose est ensuite transporté passivement à travers la membrane basolatérale vers le sang par des transporteurs GLUT2 (Cheeseman, 1993).

Un mécanisme dépendant du sodium, similaire à celui du glucose et du galactose, existe pour les acides aminés neutres. Le transport apical des dipeptides et tripeptides serait assuré par un transport actif alimenté par un gradient électrochimique H^+ faisant intervenir le transporteur Pept-1 en particulier (Adibi, 1997). Le gradient de protons est maintenu par un antiport Na^+/H^+ grâce à un gradient entrant des ions Na^+ .

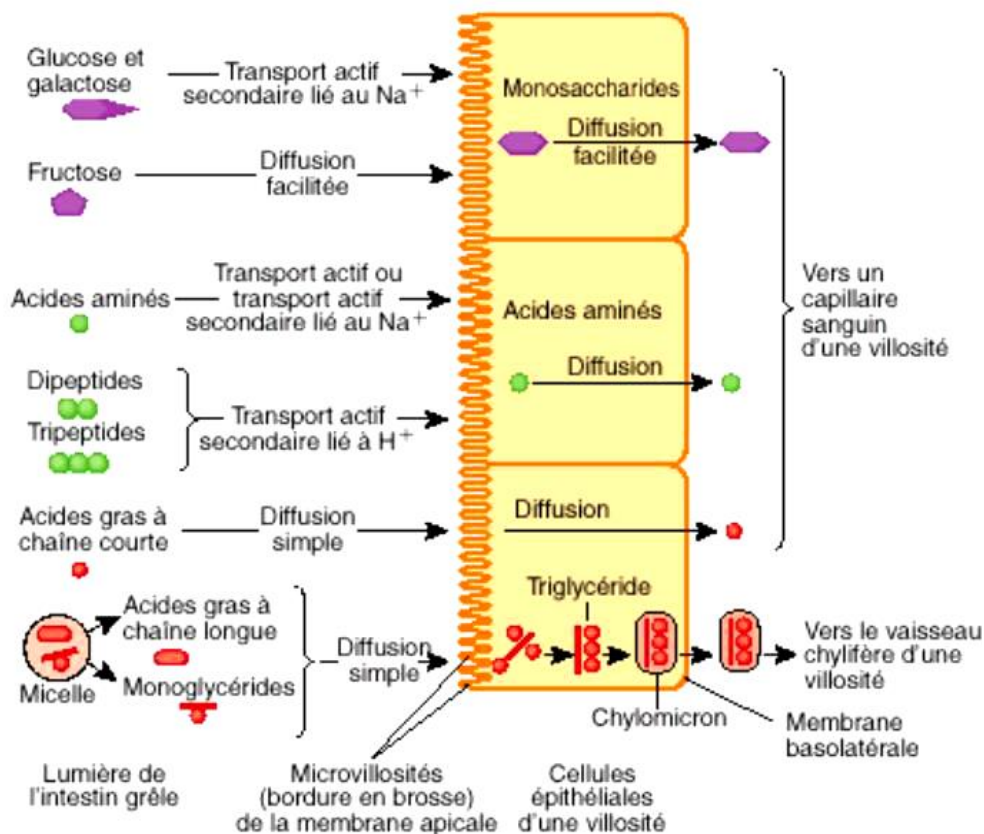


Figure 16 : Mécanismes d'absorption des nutriments par les CEI.

<http://cours.cegep-st-jerome.qc.ca/101-902-m.f/bio903/Digestif/absorption.html>.

I.1.5.4 Rôle des cellules épithéliales intestinales dans les réponses immunitaires innées et adaptatives

La BEI constitue une barrière physique et biologique contre l'invasion par des bactéries commensales ou pathogènes. Les CEI reçoivent et intègrent des signaux provenant de la lumière et du milieu intérieur et permettent la communication bactéries-hôte par de nombreuses voies de signalisation. De plus, le TD est considéré comme le plus grand organe immunologique et héberge au sein de son tissu lymphoïde un grand nombre de lymphocytes environ 5 à 20% des lymphocytes totaux (dont 1 à 9% dans la lamina propria) (Ganusov and De Boer, 2007; Pabst et al., 2008).

Les CEI sont essentielles aux réponses immunitaires innée et adaptative vis-à-vis du microbiote et des pathogènes luminaux (Figure 17).

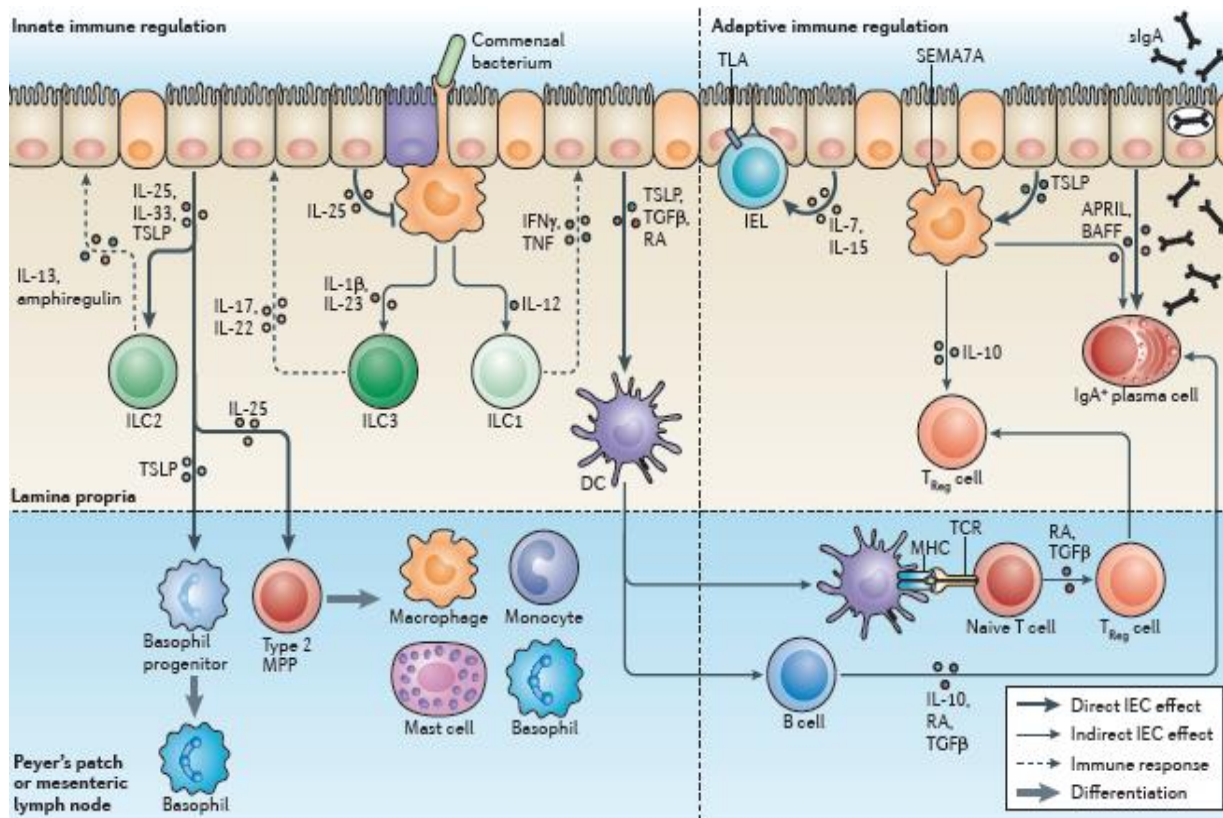


Figure 17: Les CEI régulent les fonctions immunes innée et adaptative.

L'IL-25 des CEI et le TSLP (thymic stromal lymphopoietin) provoquent respectivement l'expansion et la différenciation des progéniteurs basophiles et multipotents de type 2 (MMP type 2). L'IL-25, l'IL-33 et le TSLP stimulent les cellules lymphoïdes de type 2 (ILC2s) tandis que l'IL-25 supprime les fonctions des sous-types 1 et 3 (ILC1 et ILC3) en bloquant la production d'IL1 β , d'IL-23 et d'IL-12 par les macrophages. Les CEI conditionnent les cellules dendritiques (DC) et les macrophages vers un phénotype tolérogénique par la production de TSLP, TGF β et d'acide rétinoïque (RA). Les cellules dendritiques induisent la différenciation des cellules T CD4 $^{+}$ en T régulatrices (TReg) et la maturation des lymphocytes B en cellules productrices d'IgA. Les macrophages sont activés par le TSLP et les contacts avec la semaphorine 7A (SEMA7A) exprimée par les CEI. L'IL-10 alors produite par les macrophages permet l'expansion des TReg. Les CEI et les macrophages activés produisent du prolifération-inducing ligand (APRIL) et du B cell-activating factor (BAFF) induisant la production d'IgA par les cellules B. La présentation antigénique par les DC amplifie la réponse immune. IEL, intra-epithelial lymphocyte; TCR, T cell receptor; TLA, thymus leukaemia antigen. D'après Peterson et Artis, 2014.

Les CEI participent à l'immunité innée, par l'expression de nombreux pattern-recognition receptors (PRRs) (Toll-like receptors, TLRs ; NOD-like receptors, NLRs et Rig-like receptors, RLRs ; détails dans la partie III.1.2) mais également par la sécrétion de mucus et de peptides anti-microbiens (Goto and Ivanov, 2013; Goto and Kiyono, 2012).

Tout d'abord, la couche de mucus produite par les cellules de Goblet recouvrant l'épithélium s'oppose au passage de toxines et de pathogènes luminaux à travers la muqueuse et limite leur croissance (Katayama et al., 1997). De plus, le mucus empêche l'adhérence des pathogènes à la surface des CEI (Hasnain et al., 2010). D'autre part, les cellules de Paneth sécrètent des substances anti-microbiennes qui limitent la croissance de la flore commensale et des bactéries pathogènes. Par exemple, le LPS présent dans la lumière intestinale stimule la sécrétion de défensines (Ouellette and Bevins, 2001). Un autre mécanisme de protection est la sécrétion d'eau et d'électrolytes par les entérocytes vers la lumière empêchant l'adhérence des micro-organismes aux CEI (Resnick et al., 1993; Strohmeier et al., 1997). Les CEI participent à l'immunité adaptative grâce à la communication étroite avec des cellules immunitaires, des lymphocytes T, des lymphocytes B et des cellules dendritiques. Des lymphocytes intra-épithéliaux sont directement enchassés entre les CEI. Enfin, une classe de CEI, les cellules M sont en lien direct avec les follicules lymphoïdes. Après reconnaissance des pathogènes, ils provoquent leur transcytose vers les cellules des plaques de Peyer.

I.1.5.5 Influence des cellules épithéliales intestinales sur les neurones

Une étude a montré le rôle neuroprotecteur des CEI en cas de stress oxydant induit par la dopamine. De plus, les CEI sécrètent du NGF (Neuronal Growth Factor) qui participe à la neuroprotection et qui peut modifier le phénotype neurochimique des neurones en diminuant la proportion de neurones VIPergiques (Moriez et al., 2009).

I.1.6. Régulation de la barrière épithéliale intestinale

De nombreuses données ont mis en évidence l'importance du microenvironnement de la BEI dans la régulation de ses fonctions. En effet, elles sont soumises à des signaux provenant à la fois du contenu luminal, riche en éléments nutritifs et en bactéries, mais également par des signaux provenant du milieu « intérieur » constitué de plusieurs types cellulaires (*Figure 18*). En effet, à proximité immédiate de la BEI et communiquant avec celle-ci via des voies paracrine, se trouvent, entre autre, des fibroblastes, des myofibroblastes, des cellules immunitaires, des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales et des cellules nerveuses.

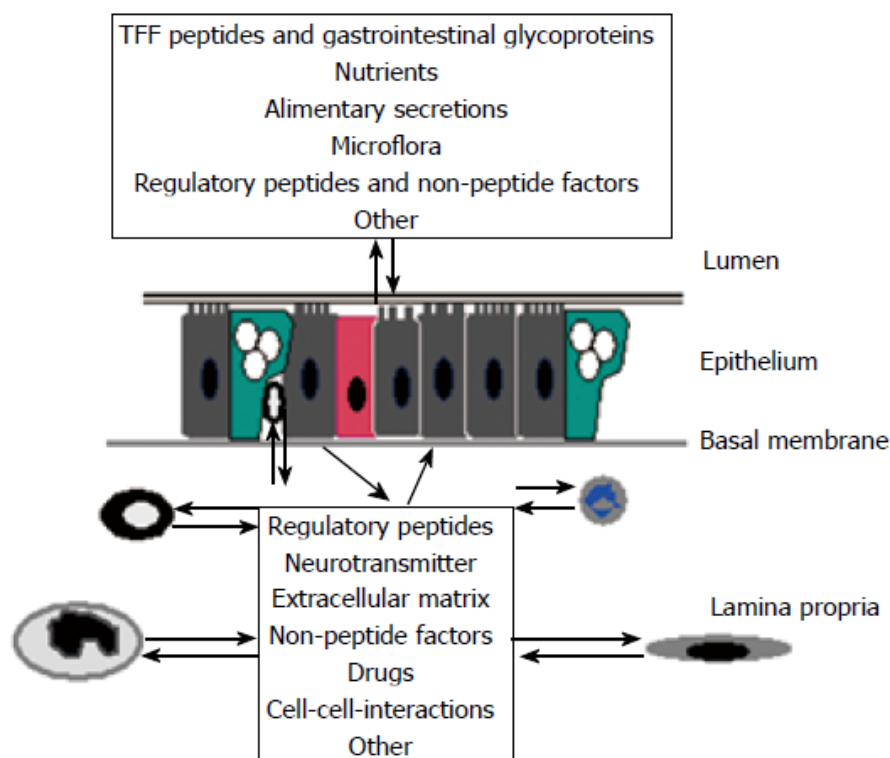


Figure 18: Le réseau régulant la muqueuse intestinale. D'après Sturm et Dignass, 2008.

Les composants de la matrice extracellulaire sont capables de modifier les fonctions de la BEI. Ainsi, la laminine-1 induit la différenciation des CEI alors que les autres isoformes stimulent leur adhésion et prolifération (Turck et al., 2005). La laminine-5 induit la formation des jonctions serrées de cellules HT29 (Chartier et al., 2006) et contrôle leur migration (Kedinger et al., 1998). Le collagène IV induit la différenciation des CEI (Basson et al., 1996) et augmente leur étalement et leur migration via des voies Src-dépendantes (Sanders and Basson, 2004, 2008). La fibronectine est capable de moduler l'adhésion des CEI et de favoriser la restitution épithéliale (Göke et al., 1996; Kolachala et al., 2007). Enfin, les facteurs piégés par la matrice comme le TGF β 1 (transforming growth factor 1), l'HGF (hepatocyte growth factor), le FGF (fibroblast growth factor) ou l'IL-1 β peuvent moduler les fonctions de la BEI. Les cellules mésenchymateuses, fibroblastes et myofibroblastes de la lamina propria produisent aussi du collagène, du FGF, du TGF α , du KGF (keratinocyte growth factor) et des MMP (matrix metalloproteinase) (Powell et al., 1999). De manière générale, ces cellules induisent la prolifération (HGF), la différenciation (TGF β) et la migration (HGF, VEGF) des CEI favorisant la réparation épithéliale (MMP) (Chen et al., 2005; Halttunen et al., 1996; McKaig et al., 1999).

Les processus de réparation sont principalement régulés par la famille des TFF (trefoil factor) (TFF-1, -2 et -3). Les TFF sont de petites protéines résistantes aux protéases et sécrétées abondamment à la surface de la muqueuse par les cellules mucosécrétantes (Taupin and Podolsky, 2003). *In vitro*, les TFF augmentent la restitution épithéliale (Dignass et al., 1994) et *in vivo*, ils limitent la formation de lésions et favorisent la réparation (Babyatsky et al., 1996; Playford et al., 1996). Dans les souris déficientes en TFF, une sensibilité accrue au DSS (Dextran Sodium Sulfate) associée à une quasi absence de réparation des lésions est observée (Mashimo et al., 1996). Cependant la réparation peut également être modulée par des facteurs de croissance, des cytokines, des prostaglandines, des polyamines ou des microRNAs (Blikslager et al., 2007; Chivukula et al., 2014; Sturm and Dignass, 2008). Par exemple, le butyrate issu de la fermentation bactérienne favorise la réparation en augmentant l'expression de l'occludine et de ZO-1 (Ma et al., 2012). De plus en plus d'études montrent l'importance des miRNAs dans la régulation du développement de la BEI et de ses fonctions (Bandrés et al., 2006; Chivukula et al., 2014; Gaulke et al., 2014; Zeng and Childs, 2012; Zhu et al., 2012). Les miRNAs sont de courts ARN non-codants qui modulent de nombreux processus cellulaires au niveau post-transcriptionnel. Des miRNAs épithéliaux peuvent réguler notamment la différenciation des cellules muco-sécrétantes ou le développement d'une réponse immune Th2 (Goto and Kiyono, 2011). Par exemple, le miR-21 est associé à la forme active de la RCH et régule négativement le TLR4 (Yang et al., 2013). De plus, le miR-122 régule la perméabilité en ciblant la dégradation de l'ARNm de l'occludine (Ye et al., 2011) et l'expression du miR-212, induite par l'alcool, entraîne une rupture des jonctions en diminuant la translation membranaire de ZO-1 (Tang et al., 2008b).

La perméabilité peut être régulée par des facteurs de croissance, des nutriments, des protéases, des cytokines et des agents pathogènes (Daugherty and Mrsny, 1999; Suzuki, 2013). Par exemple, le TGFβ1 renforce l'étanchéité de cellules T84 (Planchon et al., 1999, 1994). L'absorption de certains nutriments, comme le glucose ou certains acides aminés, augmente la perméabilité paracellulaire (Turner and Madara, 1995) car elle s'accompagne d'une entrée d'eau et d'une augmentation de la concentration intracellulaire en Na⁺, qui entraîne une activation de la MLCK (Daugherty and Mrsny, 1999). Une infection à *E. Coli* ou un traitement avec du TNF-α entraîne un changement de localisation des protéines ZO-1, occludine et claudine, témoignant d'une destruction des jonctions serrées et d'une perte de l'intégrité de la muqueuse (Li et al., 2008; Muza-Moons et al., 2004). Le butyrate diminue la

perméabilité de cellules HT29 (Kinoshita et al., 2002) et de la muqueuse colique de rat (Mariadason et al., 1999). Les probiotiques comme *Saccharomyces boulardii* diminuent la perméabilité de cellules T84 induite par *E. coli* (Cells et al., 2000; Madsen, 2001; Mangell et al., 2002).

De plus, les pathogènes agissent sur les CEI par le biais de PPRs, TLRs et NLRs. Leur distribution permet une spécificité de réponse (Gewirtz et al., 2001). Leur activation induit des signaux conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires qui activent et recrutent les cellules de l'immunité innée et l'expression de molécules d'adhésion. Le TLR3 est fortement exprimé par des CEI matures et des cellules de la lamina propria. Les TLR-3 et -5 sont ubiquitaires dans des CEI normales tandis que les TLR-2 et -4 sont faiblement exprimés mais ces derniers sont plus exprimés au niveau du côlon et de la muqueuse en raison de la présence du microbiote à proximité (Furrie et al., 2005; Hooper and Gordon, 2001; Ortega-Cava et al., 2003; Wood, 2004).

L'alimentation, en particulier les lipides, modifient notamment les sécrétions intestinales en stimulant la libération de CCK (Lieverse et al., 1994), PYY (Feinle-Bisset et al., 2005; Pilichiewicz et al., 2006), GLP-1 (Herrmann et al., 1995) et en inhibant la grhélène (Feltrin et al., 2006). Ces modifications sont associées à un ralentissement de la vidange gastrique.

La régulation des fonctions de la BEI par le système nerveux entérique (SNE) est résumée dans la figure ci-dessous (*Figure 19*) et abordée plus précisément dans les parties II.2.2 et II.3.2.4 (Neunlist et al., 2013).

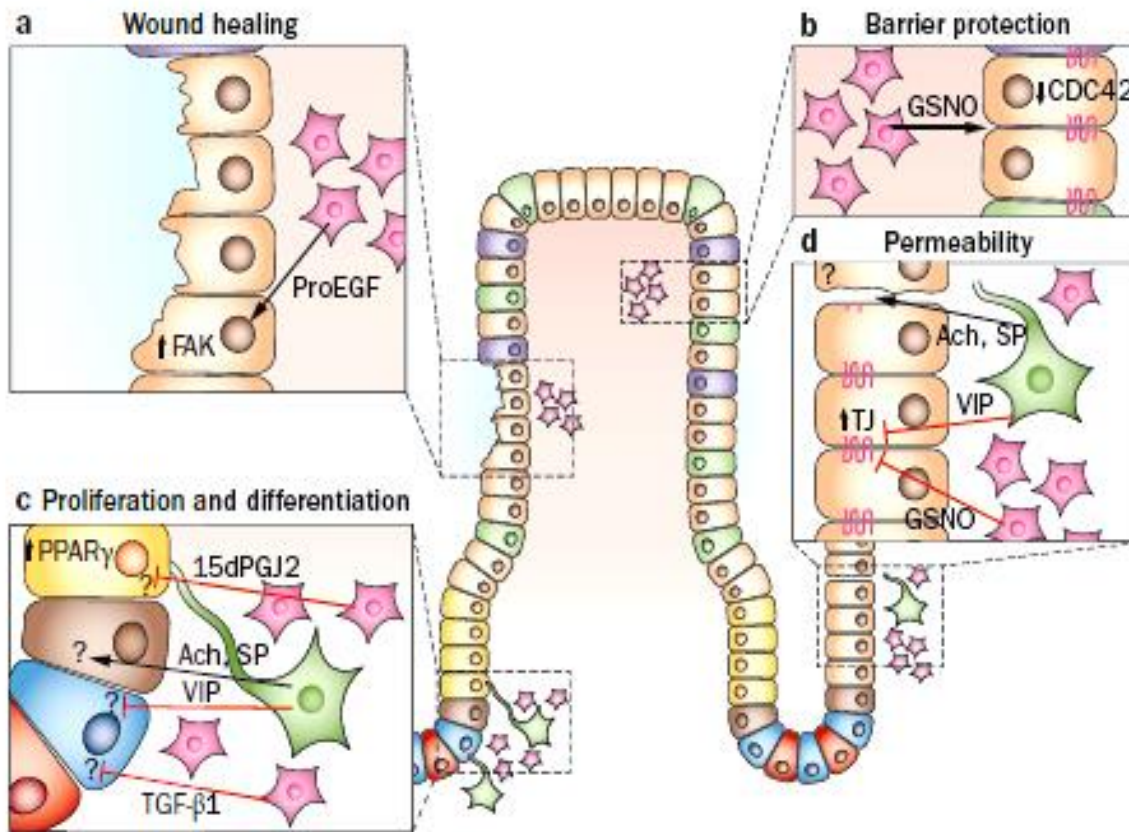


Figure 19: Les facteurs solubles produits par le système nerveux entérique régulent les fonctions de la barrière épithéliale intestinale.

Les neurones entériques (en vert) et les cellules gliales (en rose) produisent des facteurs solubles qui vont agir sur les cellules épithéliales intestinales (entérocytes en marron ; cellules souches intestinales en bleu ; cellules de Paneth en rouge ; cellules entéroendocrines en violet et cellules calciformes ou de Goblet en vert clair). (a) La réparation épithéliale : les CGE augmentent la réparation par la libération de proEGF, conduisant à l'augmentation de l'activité et de l'expression de FAK. (b) La protection de la barrière : durant une infection par des pathogènes comme *Shigella flexneri*, les CGE libèrent du GSNO qui réduit l'expression de cdc42 et augmente la résistance. (c) La prolifération et la différenciation : les neurones libèrent du VIP et les CGE du TGF β 1 et de la 15dPGJ₂, qui vont inhiber la prolifération des CEI. À l'inverse, des neuromédiateurs comme l'ACh ou la SP peuvent l'augmenter. (d) La perméabilité : le VIP réduit la perméabilité paracellulaire tandis que l'ACh l'augmente. Le GSNO glial peut diminuer la perméabilité en augmentant l'expression des protéines clés des jonctions serrées comme ZO-1. D'après Neunlist et al., 2013.

II. Le système nerveux entérique

II.1 Généralités sur le système nerveux entérique

II.1.1 Découverte du système nerveux entérique

L'étude du système nerveux entérique, ou neurogastroentérologie, débute dès les années 1860 avec la description par G. Meissner et L. Auerbach de deux plexus nerveux distincts présents dans la paroi intestinale : le plexus de Meissner ou plexus sous-muqueux et le plexus d'Auerbach ou plexus myentérique (Meissner, 1857 ; Auerbach, 1864 ; Timmermans et al., 1997). En 1893, S.R. y Cajal établit l'existence de sous-types de neurones, que A.S. Dogiel classifia en 1899 selon leur morphologie.

Le rôle fonctionnel du SNE fut quant à lui établi en 1899 par l'étude de Bayliss et Starling chez le chien (Bayliss and Starling, 1900). Sur des anses intestinales isolées, ils observèrent une avancée du contenu luminal s'accompagnant d'une contraction dans le sens oral et d'une relaxation dans le sens anal. Ils démontrèrent que la stimulation mécanique de l'intestin induisait ce réflexe moteur et qu'il était conduit par un système nerveux intrinsèque en particulier le plexus d'Auerbach. Le caractère intrinsèque de cette innervation fut confirmé par les travaux de J.N. Langley qui montra la persévérance des contractions après dégénérescence des afférences nerveuses (Langley and Magnus, 1905). Ainsi, en 1921 le système nerveux entérique fut défini comme la troisième division du système nerveux autonome. Alors considéré comme un simple relais post-ganglionnaire du système nerveux parasympathique (Hansen, 2003), ce n'est que depuis une cinquantaine d'années que la caractérisation du SNE et de ses fonctions a pris un véritable essor.

II.1.2 Organisation du système nerveux entérique

II.1.2.1 Composition du système nerveux entérique

Le SNE appartient au système nerveux autonome et constitue un réseau de fibres nerveuses dans la paroi du tube digestif. Il s'étend du tiers inférieur de l'œsophage à l'anus, mais présente également au niveau des glandes associées (les glandes salivaires, le pancréas ou encore la vésicule biliaire) (Furness, 2012; Hansen, 2003; Kirchgessner et al., 1990). Le SNE contrôle les fonctions gastrointestinales telles que la motricité, les sécrétions, l'absorption, le

Étude bibliographique

flux sanguin et les fonctions immunes et inflammatoires (Goyal and Hirano, 1996). Son organisation varie selon l'espèce et le segment du tube digestif (Timmermans et al., 1997). Le SNE est composé de deux principaux plexus : le plexus myentérique situé entre les deux couches musculaires lisses longitudinales et circulaires et le plexus sous-muqueux situé entre la couche musculaire circulaire et la muqueuse (*Figure 20*). Le plexus myentérique, présent de l'œsophage au rectum, régule principalement les fonctions de motricité tandis que le plexus sous-muqueux, particulièrement développé dans le petit et gros intestin, régule les fonctions de la muqueuse intestinale (sécrétion, absorption et immune) (Hansen, 2003). Chez l'homme, le plexus sous-muqueux est divisé en trois parties (Timmermans et al., 1997), le plexus sous-muqueux externe (Schabadasch ou Henle) adjacent à la musculature circulaire, le plexus interne (de Meissner) placé juste sous la muqueuse et le plexus intermédiaire localisé entre les deux (Hoyle and Burnstock, 1989; Ibba-Manneschi et al., 1995). Plus de 100 millions de neurones composent le SNE et 5 à 10 fois plus de CGE, le plexus sous-muqueux étant moins dense avec des connexions interganglionnaires plus fines que le plexus myentérique (Furness, 2000; Gershon, 1997; Goyal and Hirano, 1996; Wood et al., 1999).

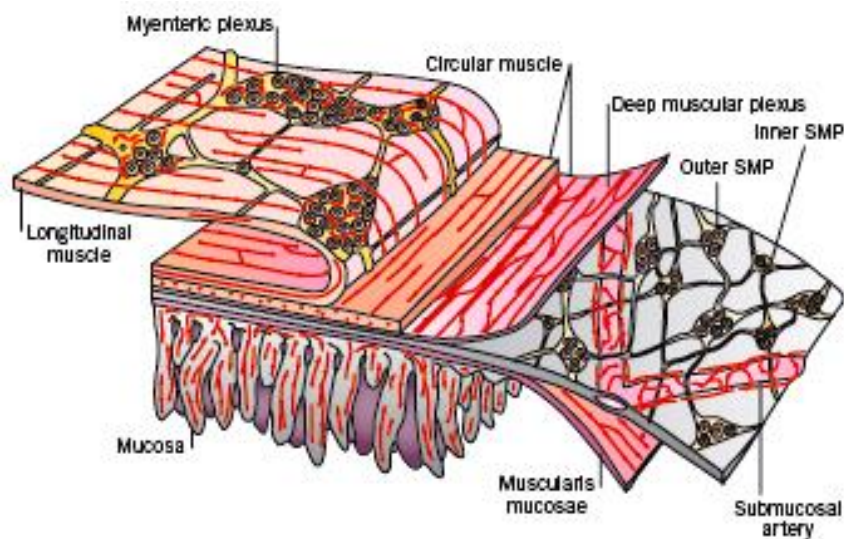


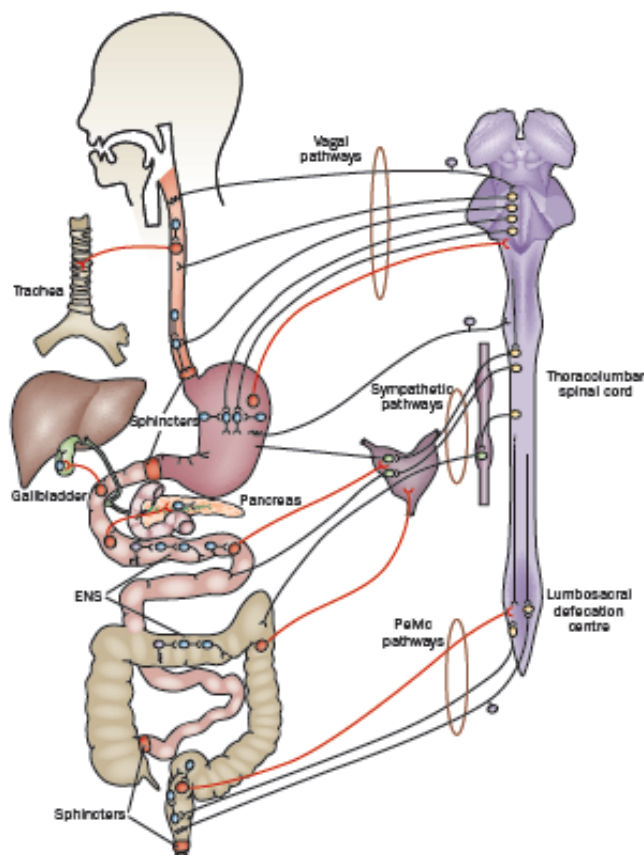
Figure 20: Organisation schématique du SNE humain et des grands mammifères.

Le SNE est composé de plexus ganglionnaires, le plexus myentérique et le plexus sous-muqueux. Les fibres nerveuses connectent les ganglions et les plexus innervant les différentes couches. D'après Furness, 2012.

Le SNE constitue un réseau d'amas ganglionnaires et de fibres interganglionnaires (Wedel et al., 1999) composés de deux entités que sont les neurones entériques et les CGE. Ainsi, les fibres nerveuses innervent l'ensemble des composantes du tube digestif, l'épithélium, les muscles, les vaisseaux sanguins et les glandes (Gabella, 1981).

II.1.2.2 Innervation extrinsèque du système nerveux entérique: l'axe cerveau-intestin

En plus des communications étroites entre les deux plexus entériques dans le contrôle des fonctions digestives, il existe une communication entre le SNE et le SNC, des afférences et efférences des systèmes nerveux sympathiques et parasympathiques (Wood, 1999). Ainsi le SNE possède des projections vers les ganglions coeliaques et mésentériques (Szurszewski et al., 2002) et des projections extra-digestives vers le pancréas (Anglade et al., 1987; Tiscornia, 1977) et la vésicule biliaire (Mawe and Gershon, 1989) (Figure 21).



Le système digestif contient de nombreux circuits réflexes du SNE (neurones moteurs et interneurones en bleu, neurones sensitifs en violet). Ces voies projettent, via des IFANS (Intestinofugal neurons ; en rouge) vers le SNC (neurones en jaune) ; les ganglions sympathiques, la vésicule biliaire et le pancréas. Les neurones sympathiques des ganglions paravertébraux (en vert) reçoivent des informations du SNE et du SNC. Les informations sensitives partent vers le SNE via des neurones intrinsèques primaires afférents (en violet) et vers le SNC via des neurones extrinsèques primaires afférents (en violet) qui suivent les voies afférentes spinales et vagues. Les informations du SNC atteignent le SNE et les effecteurs intestinaux à travers des voies vagues, sympathiques et pelviennes. D'après Furness, 2012.

Figure 21: Innervation du tube digestif.

L'axe cerveau-intestin est reconnu comme un acteur majeur de la physiopathologie digestive. Son concept est né d'observations cliniques sur l'effet préventif d'anti-dépresseurs sur la formation d'ulcères (Dajani et al., 2003). La communication est bidirectionnelle et passe via le nerf vague (Collins et al., 2012; Goehler et al., 2000). On retrouve parmi les acteurs de cette communication des neurotransmetteurs comme la sérotonine, la dopamine ou encore les prostaglandines (Dajani et al., 2003).

Ainsi, il existe de multiples niveaux d'innervation du tractus digestif (*Figure 22*). Les neurones primaires afférents qui transportent les informations au SNC sont localisés dans le nerf vague et le nerf splanchnique. Les neurones primaires afférents parasympathiques situés dans la couche de muscles lisses sont sensibles à la distension mécanique de l'intestin alors que ceux situés dans la muqueuse sont sensibles aux concentrations luminales en glucose, acides aminés ou acides gras à chaîne longue (Berthoud and Neuhuber, 2000). Ces neurones, dont le corps cellulaire est situé dans le ganglion du nerf vague, projettent jusqu'au noyau du tractus solitaire et sont à l'origine de plusieurs réflexes affectant la déglutition, la motricité ou encore la sécrétion intestinale. Les neurones afférents splanchniques ont leurs terminaisons dans la paroi du tube digestif et leur corps cellulaire dans le noyau dorsal du vague. Ces neurones afférents sont principalement des nocicepteurs et sont impliqués dans la détection de la douleur dans le tractus digestif (Mei, 1985). Les afférences vagales utilisent l'ACh comme neurotransmetteur. Les voies efférentes motrices parasympathiques sont constituées par le nerf vague qui contrôle les fonctions motrices et sécrétomotrices du tractus digestif supérieur et le nerf sacré qui contrôle les fonctions du côlon distal et du rectum (Kirchgessner and Gershon, 1989). L'innervation vagale a pour origine deux noyaux situés dans la moëlle (Hopkins et al., 1996): le noyau ambigu contenant des neurones somatomoteurs non autonomes qui innervent les muscles striés du pharynx, du larynx et de l'œsophage ; le noyau dorsal du vague contient des neurones préganglionnaires viscéromoteurs qui innervent de façon importante le SNE (Hopkins et al., 1996).

Cette communication SNE-SNC permet par exemple de réguler la satiété (Cummings and Overduin, 2007). De plus, une stimulation vagale active des neurones entériques (Berthoud et al., 2001) qui par une signalisation cholinergique nicotinique activent à leur tour les CGE (par l'inhibition de NFκB) ce qui améliore l'intégrité de la BEI (Cheadle et al., 2014) mais peut également, via l'activation de macrophages, avoir un effet anti-inflammatoire (Ghia et al., 2006). De même, des études ont montré l'intérêt d'une stimulation des racines sacrées, déjà utilisée dans le traitement de l'incontinence (Leroi et al., 2009), comme une nouvelle méthode de prise en charge des patients atteints de MICI avec des effets bénéfiques sur les fonctions et l'intégrité de l'épithélium (Meurette et al., 2012; *Annexe 3*).

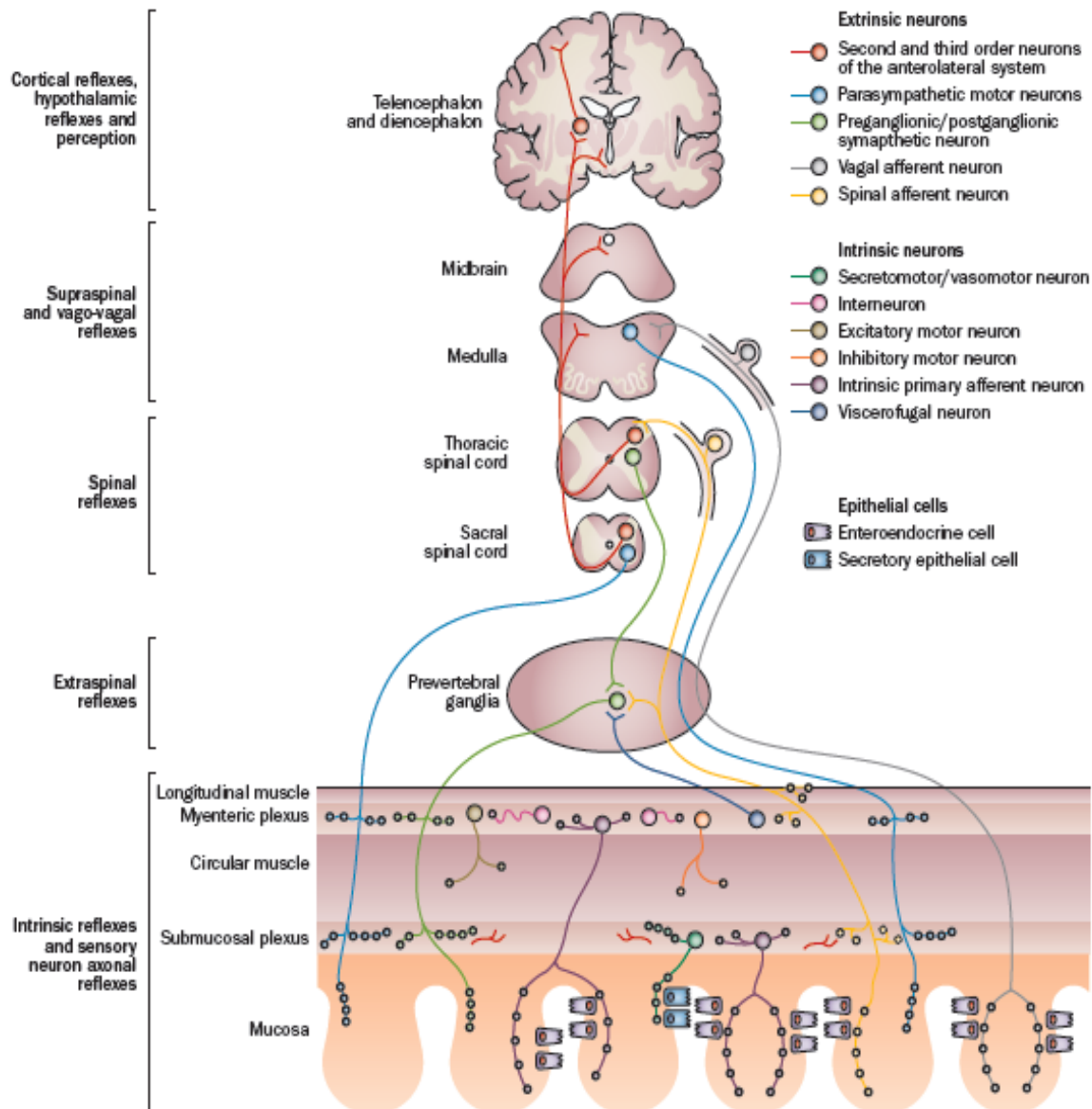


Figure 22: Multiples niveaux d'innervation des fonctions gastro-intestinales.

Les neurones entériques intrinsèques ont leurs corps cellulaires et leurs prolongements dans la paroi intestinale. Ils projettent aux neurones viscéromoteurs sympathiques post-ganglionnaires. Ces réflexes n'impliquent pas le SNC. Les neurones post-ganglionnaires projettent dans la paroi intestinale pour réguler les fonctions de sécrétion, le flux sanguin et la motricité. Ils reçoivent les informations des neurones préganglionnaires sympathiques de la moëlle épinière et forment une branche efférente du SNC. Les autres branches efférentes proviennent des neurones moteurs parasympathiques de la moëlle épinière et du tronc cérébral. Les neurones afférents extrinsèques ont leurs terminaisons dans la paroi intestinale et communiquent avec le SNC via les nerfs vague (ganglions nodaux et jugulaires) et spinaux (splanchniques et pelviens). D'après Brierley et Linden, 2014.

L'influence du SNE sur le SNC est également abordée par de nombreuses études notamment celles concernant la maladie de Parkinson. Ainsi, l'hypothèse de Braak suggère que la maladie débiterait au sein du SNE et se propagerait au cerveau via le nerf vague (Lebouvier et al., 2009).

II.1.3 Ontogenèse du système nerveux entérique

II.1.3.1 Colonisation du tube digestif par les cellules de la crête neurale

Les premières études sur le développement embryonnaire du SNE ont été menées par Kuntz en 1910. L'étude des précurseurs des ganglions sympathiques des plexus cardiaques et gastro-intestinaux suggérait que les précurseurs du SNE provenaient du segment vagal de la crête neurale. Cette hypothèse a été confirmée par les travaux de Jones en 1942 et Hammond en 1954. Les cellules du SNE dérivent des cellules de la crête neurale qui migrent à partir du segment vagal, sacré et rostro-troncal du neurectoderme (*Figure 23*) (Burns and Le Douarin, 2001; Gershon, 1998; Newgreen and Young, 2002). La majorité des cellules du SNE dérivent du segment vagal. Les cellules de la crête neurale du segment sacré vont coloniser uniquement la partie post-ombilicale du tube digestif et les cellules de la crête neurale du segment rostro-troncal vont quant à elles coloniser la partie antérieure du tube digestif (oesophage et estomac supérieur) (Gershon, 1997; Young et al., 2004). Les cellules de la crête neurale du segment vagal envahissent l'intestin antérieur au 9^e jour embryonnaire chez la souris et à la 4^e semaine de gestation chez l'homme. Ces cellules migrent alors dans le sens rostro-caudal et colonisent de façon séquentielle les différentes régions du tube digestif, de l'intestin antérieur (de l'oesophage au duodénum), puis l'intestin moyen (du grêle à l'appendice) et enfin l'intestin postérieur (du côlon transverse au rectum). La colonisation intestinale s'achève au 15^e jour chez l'embryon de souris et à 7 semaines chez l'homme (Heanue and Pachnis, 2007). Les cellules de la crête neurale situées derrière le front de migration, initialement réparties de façon aléatoire, se réunissent pour former des ganglions selon l'axe rostro-caudal (Fu et al., 2004; Wallace and Burns, 2005).

Le développement des fonctions du SNE débute au cours de la vie fœtale et se poursuit après la naissance. La formation du plexus sous-muqueux a lieu deux à trois jours après celle du plexus myentérique chez la souris, et deux à trois semaines chez l'homme. On suppose que les cellules du plexus sous-muqueux dérivent du plexus myentérique (Wallace and Burns, 2005). Cette hypothèse a été vérifiée dans une étude montrant que les cellules neurales progénitrices migrent du plexus myentérique vers la sous-muqueuse sous l'influence des nétrines, facteur de croissance exprimé par la muqueuse aux effets chimioattractants qui guident la migration des cellules dérivées des crêtes neurales exprimant leurs récepteurs DCC (deleted in colorectal cancer) (Jiang et al., 2003).

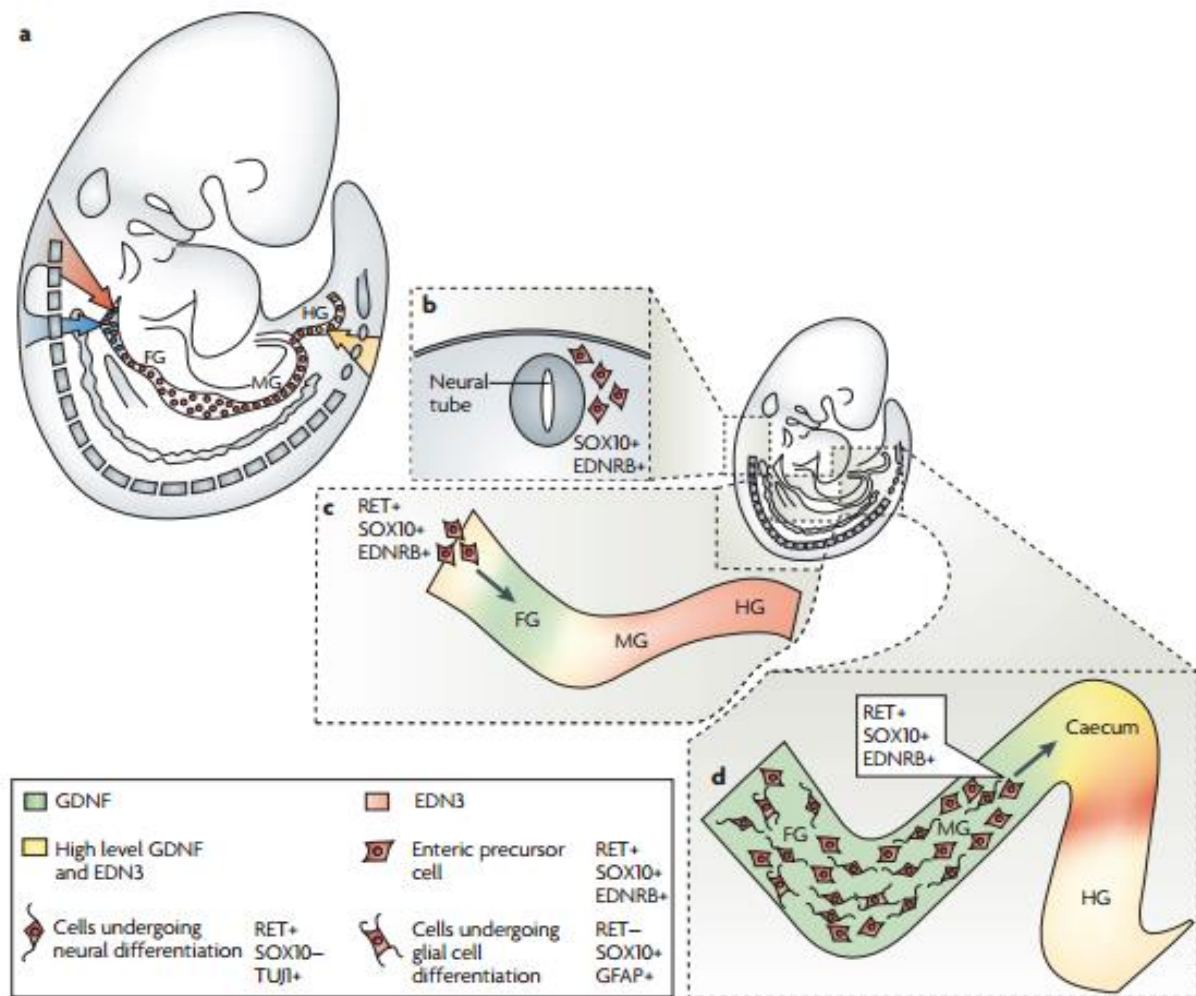


Figure 23 : Ontogénèse du système nerveux entérique.

(a). Au stade 8.5-9 chez l'embryon de souris, 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). La colonisation est complète au stade 15.5 de l'embryon. 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'oesophage 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 côlon (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). Au stade 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 Pachnis, 2007.

Étude bibliographique

Quand les cellules dérivées des crêtes neurales commencent à coloniser le tube digestif, elles se différencient en cellules gliales ou en différents types de neurones (Heanue and Pachnis, 2007; Young et al., 2003). Pendant leur différenciation, les cellules précurseurs du SNE prolifèrent et expriment des marqueurs généraux neuronaux (Hu) ou gliaux (S100 β) (Young et al., 2003). Les facteurs de transcription Mash-1 et Sox-10 sont impliqués dans la différenciation des cellules neurales (*Figure 24*). Mash-1 est impliqué dans le développement des neurones sérotonergiques (Blaugrund et al., 1996) et Sox-10 est essentiel à la différenciation des CGE (Kelsh, 2006). Les différents types de neurones sont générés de manière séquentielle. Les neurones sérotoninergiques et nitrergiques se développent de manière précoce contrairement aux neurones cholinergiques et CGRP (Burns and Le Douarin, 2001). Les CGE expriment quant à elles le marqueur S100 β plus précocement que le marqueur GFAP (Young et al., 2003). Enfin le BMP-2 (Bone morphogenetic protein 2), aussi produit par le mésenchyme intestinal, joue un rôle majeur dans la différenciation des cellules progénitrices en neurones ou en cellules gliales.

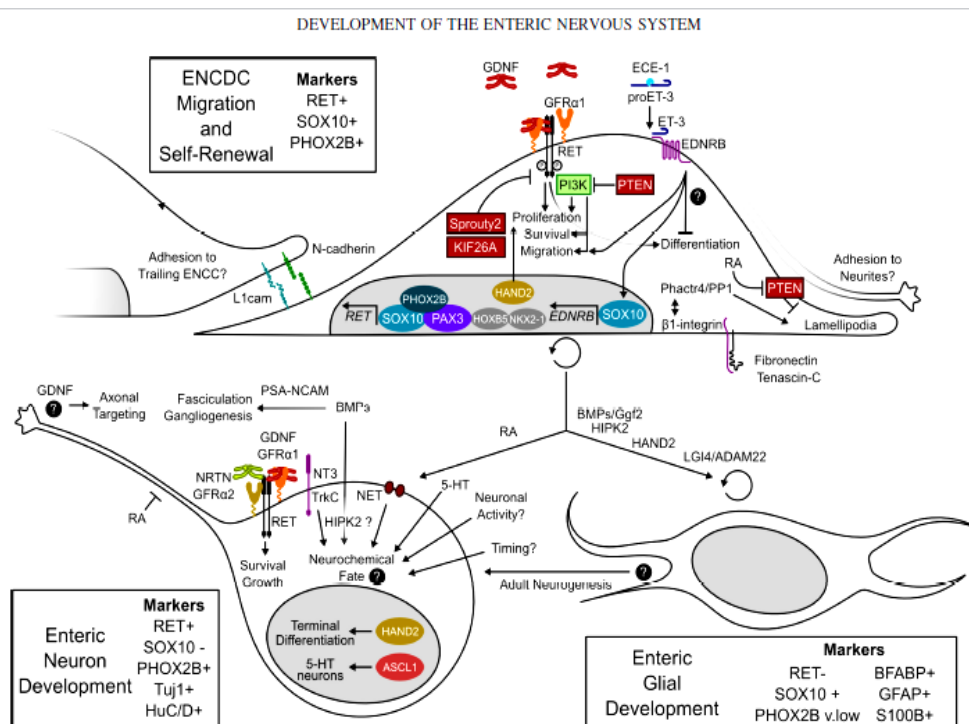


Figure 24: Proposition de signalisation impliquée dans le développement du SNE.

En haut, les cellules souches dérivées de la crête neurale (ENCC) donnent à gauche des neurones et à droite des cellules gliales entériques. Certaines molécules inhibent RET (en rouge), d'autres l'activent (en vert). Les facteurs de transcription dont on ne connaît pas les rôles sont en gris. Certains points restent inconnus comme le mécanisme et les cibles de l'ET-3/EDNRB, les facteurs contrôlant la formation axonale, à part le GDNF, et le rôle de la neurogenèse chez l'adulte. D'après Lake et Heuckeroth, 2013.

II.1.3.2 Contrôle génétique du développement du système nerveux entérique

La migration des cellules progénitrices dans le TD, leur maturation et leur différenciation sont contrôlées et dirigées par une série de signaux et de voies de signalisations activés ou inhibés en fonction du stade de développement. L'ensemble des processus conduisant à la formation et à la maturation du SNE est contrôlé par deux voies de signalisation majeures : la voie Ret/GFR α 1/GDNF et la voie EDNRB/ EDN-3 (*Figure 24*) (Barlow et al., 2003). Le récepteur à activité tyrosine kinase (Ret) est activé par son ligand le GDNF via le corécepteur GFR α 1. Ret est exprimé par les cellules progénitrices, GFR α 1 par les cellules progénitrices et les cellules du mésenchyme (Newgreen and Young, 2002). Le GDNF, produit par les cellules du mésenchyme, suit un gradient rostro-caudal en amont du front de migration des cellules de la crête neurale (Natarajan et al., 2002) suggérant un rôle chimioattractif guidant les cellules progénitrices. Le rôle majeur de cette voie est confirmé par les animaux transgéniques mutés pour ces trois gènes présentant une absence de ganglions entériques observée à partir de l'estomac (Cacalano et al., 1998; Moore et al., 1996; Pichel et al., 1996; Sánchez et al., 1996; Schuchardt et al., 1994; Shepherd et al., 2001, 2004). L'endotheline-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 clé dans le développement du SNE. Des souris mutées pour la délétion de ces gènes présentent une aganglionose distale (Baynash et al., 1994; Hosoda et al., 1994; Sidebotham et al., 2002). L'EDN-3 est produite par les cellules mésenchymateuses (Barlow et al., 2003). Ces données suggèrent que cette voie est impliquée dans le contrôle de la migration des cellules de la crête neurale. De plus, le nombre de cellules de la crête neurale est diminué chez des souris KO pour le gène EDN-3 (Stanchina 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 EDN-3 maintient le pouvoir mitogène des cellules de la crête neurale en inhibant leur différenciation. De plus, des mutations « perte de fonction » des 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 (aganglionose) dans le côlon distal (Gershon, 1998; Heanue and Pachnis, 2007; Taraviras and Pachnis, 1999).

II.1.3.3 Maturation du système nerveux entérique et modifications liées à l'âge

Après la naissance, le développement des plexus entériques se poursuit. Des études ont montré que le nombre total de neurones augmentait (Gabella, 1971), que l'organisation en ganglions s'effectuait entre 7 et 36 jours dans le côlon du raton (de Vries et al., 2010) et que la densité des neurones diminuait chez le raton et chez l'homme (de Vries et al., 2010; Wester et al., 1999). Enfin, la différenciation neurochimique s'étend tout au long du premier mois de vie chez le raton (Matini et al., 1997).

Au cours du vieillissement, des études ont rapporté des modifications morphologiques et cellulaires au sein du SNE (Saffrey, 2004, 2014). Ainsi, une diminution du nombre de neurones entériques et de l'aire des ganglions myentériques a été constatée chez l'homme (Gabella, 1989; Hanani et al., 2004). Des études ont décrit une perte de 22-67% de neurones dans l'œsophage de patients de plus de 70 ans par rapport à des patients âgés en moyenne de 30 ans (Eckardt and LeCompte, 1978; Meciano Filho et al., 1995). Au niveau de l'intestin grêle, il s'agirait d'une perte de l'ordre de 34% de neurones myentériques entre des patients de 69-76 ans et des patients de 20-40 ans (de Souza et al., 1993). Enfin, au niveau du côlon, le nombre de neurones myentériques par ganglion est réduit de 37% chez des patients âgés de 65 ans par rapport à des patients de 20-35 ans (Gomes et al., 1997). Des études montrent que cette perte affecte plus spécifiquement les neurones cholinergiques que ce soit chez le rat ou l'homme (Bernard et al., 2009; Cowen et al., 2000; Phillips et al., 2003; Wade and Cowen, 2004) et que la population nitrergique semble maintenue voire augmentée (Belai and Burnstock, 1999; Belai et al., 1995). Une autre étude montre chez la souris, une perte du nombre total de neurones et plus spécifiquement de neurones nitrergiques avec l'âge (Baudry et al., 2012). Peu d'études se sont intéressées aux neurones sous-muqueux mais il semble qu'une diminution de leur nombre soit détectée chez le rat et la souris (Bernard et al., 2009; El-Salhy et al., 1999; Phillips et al., 2007) mais non retrouvée chez l'homme. L'origine de ces modifications liées à l'âge pourrait être soit l'augmentation de production de dérivés réactifs de l'oxygène et donc de stress oxydant, soit une diminution des facteurs neurotrophiques protecteurs comme le GDNF ou la neurotrophine-3 (Anitha et al., 2006; Thrassivoulou et al., 2006). Les altérations des CGE ont été peu étudiées, cependant leur nombre semble également diminué avec l'âge dans toutes les zones du tube digestif (Phillips et al., 2004). Cette perte gliale semble proportionnelle à la perte neuronale.

II.2 Les neurones entériques

II.2.1 Présentation générale des neurones entériques

Les neurones du SNE ont été classés en se basant sur différents critères comme leur morphologie, leurs propriétés électrophysiologiques, pharmacologiques ou encore les connections qu'ils établissent avec les autres types cellulaires. Ces classifications « anciennes » sont aujourd'hui complétées par des classifications plus « fonctionnelles » où les termes de neurones sensitifs, d'interneurones et neurones moteurs excitateurs ou inhibiteurs sont utilisés. Tous les paramètres peuvent varier d'une espèce à l'autre et d'une région à l'autre du TD, cependant la plupart des études de classification ont été réalisées chez le cobaye.

II.2.1.1 Classification des neurones selon leur morphologie

La plus ancienne classification des neurones entériques a été initiée il y a plus d'un siècle par Dogiel. Elle est basée sur les caractéristiques morphologiques des neurones dans les plexus myentériques et sous-muqueux chez l'homme, le cobaye, le lapin, le rat, le chien et le chat (Dogiel, 1899). Il a décrit trois types de neurones appelés Dogiel I, II et III. Les travaux de Stach et Furness, de Timmermans ainsi que ceux de Brehmer identifièrent 4 autres types neuronaux, classés de IV à VII (Brehmer et al., 1999; Furness et al., 1988; Timmermans et al., 1997) (*Figure 25*). Cependant la majorité des neurones entériques appartiennent aux types I, II et III (Hansen, 2003).

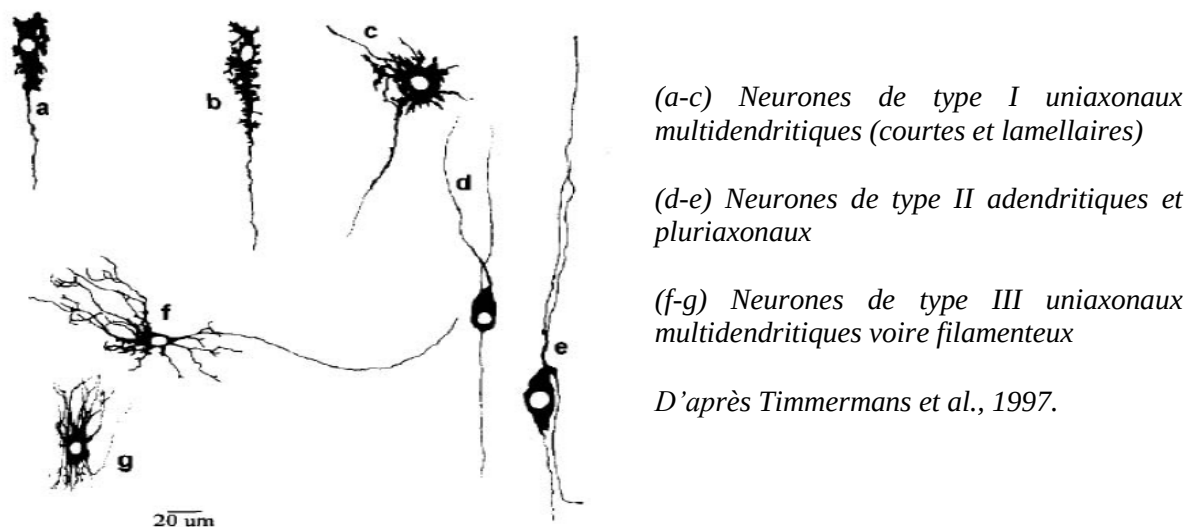


Figure 25: Types majoritaires des neurones entériques, I, II et III, retrouvés dans l'intestin grêle du cobaye selon la classification de Dogiel.

II.2.1.2 Classification des neurones selon leurs propriétés électrophysiologiques

La deuxième classification des neurones entériques est basée sur leurs caractéristiques électrophysiologiques (Lomax and Furness, 2000). Les premiers enregistrements intracellulaires permettant la description des propriétés électriques des neurones entériques ont été rapportés dans les années 1970 (Hirst et al., 1974; Nishi and North, 1973; Wood and Mayer, 1978). Ces premières études avaient initialement décrit trois types de neurones entériques. Cependant, le troisième type qui était non excitable, correspondait en fait aux CGE. Dans l'intestin du cobaye, les neurones entériques sont donc classés en deux catégories: les neurones de type S ou "Synaptic" et les neurones de types AH ou "After Hyperpolarisation" (Hirst et al., 1974; Wood et al., 1999).

Les neurones de type S présentent des potentiels d'action (PA) brefs suivis d'un potentiel d'hyperpolarisation de courte durée (20 à 100 ms). Ces PA sont bloqués par la tétrodotoxine (TTX). Ils présentent un potentiel exciteur post-synaptique (PPSE) rapide. Les neurones de type S présentent une morphologie variée de type Dogiel I ou III (uniaxonal) (Furness et al., 2004). Les neurones AH se caractérisent par un large potentiel d'hyperpolarisation suivant le PA (amplitude de 75 à 110 mV). Ils ne présentent pas de PPSE rapides mais des PPSE lents qui ne peuvent générer de PA (Wood et al., 1999). Ils présentent une inflexion dans la phase descendante de repolarisation, suivie de deux phases séparées d'hyperpolarisation (Hirst et al., 1974). De plus, les neurones AH sont insensibles à la TTX et ont une morphologie de type Dogiel II (Furness et al., 2004).

II.2.1.3 Classification des neurones selon leurs propriétés fonctionnelles

Le codage neurochimique

Les neurones entériques synthétisent et sécrètent des substances chimiques leur permettant de communiquer entre eux et avec les cellules cibles effectrices (McConalogue and Furness, 1994). Plus de trente neuromédiateurs ont été identifiés pour le SNE et jusqu'à onze molécules ont pu être détectées dans un même neurone (Schemann and Neunlist, 2004). Les neurones entériques expriment en général une combinaison de neuromédiateurs définissant leur codage neurochimique (*Figure 26*). Les neuromédiateurs et autres substances produites par les neurones peuvent être classés selon leur action excitatrice ou inhibitrice sur les cellules cibles (*Tableau I*).

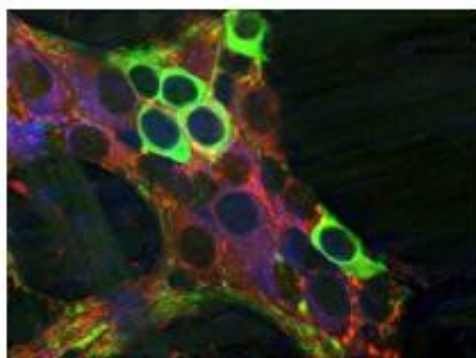


Figure 26: Ganglion myentérique de souris.

Photographie en microscopie à fluorescence des corps cellulaires des neurones marqués avec des anticorps couplés à des fluorophores et dirigés contre nNOS (neuronal nitric oxyde synthase; vert), VIP (violet) et ChAT (choline acetyltransferase ; rouge) (x63). Inserm U913.

Stimulation	Inhibition
ACh, ATP, 5-HT, histamine, neurokinine A, SP, CCK, GRP, motiline, bombésine, opioïdes, TRH, PGE ₂	NO, VIP, SOM, GABA, CGRP, NPY, galanine, glucagon, neurotensine, PACAP, PHI, PYY, sérotonine, dopamine

Tableau I : Principales substances sécrétées par les neurones ayant une action excitatrice ou inhibitrice sur les cellules cibles.

ACh, acétylcholine ; ATP, adénosine triphosphate ; 5-HT, 5-hydroxytryptamine ; SOM, somatostatine ; SP, substance P ; CCK, cholécystokinine ; GRP, gastrin-releasing polypeptide ; TRH, thyrotropin-releasing hormone ; PGE₂, prostaglandine E₂ ; NO, nitric oxide ; VIP, vasoactive intestinal peptide ; GABA, gamma butyric acid ; CGRP, calcitonin gene-regulated peptide ; NPY, neuropeptide Y ; PACAP, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide ; PHI, peptide histidine isoleucine ; PYY, peptide YY. D'après Hansen et al., 2003.

De nombreuses études associant des techniques d'immunohistochimie, de traçage neuronal, couplées à des études fonctionnelles et pharmacologiques ont permis de corréler le codage neurochimique des neurones à leur fonction. (Tableau II).

Fonction	codage neurochimique
IPAN	ChAT, Calb, CGRP, SP
Interneurones ascendants	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 II : Diversité du codage neurochimique des neurones entériques selon leurs fonctions physiologiques.

Les différents neurones de l'intestin grêle de cobaye et les principaux neuromédiateurs qu'ils produisent. Calb, calbindine ; Calret, calretinine ; DYN, dynorphine ; ENK, enkephaline ; IPAN, intrinsic primary afferent neuron. D'après Hansen et al., 2003.

Les neurones afférents primaires intrinsèques (IPANs)

Les IPANs représentent 20% des neurones entériques et jouent un rôle déterminant dans le contrôle et la régulation de l'état fonctionnel du tube digestif et de ses réponses aux différents stimuli chimiques ou mécaniques (Furness et al., 1998; Kirchgessner and Gershon, 1988). Les IPANs peuvent avoir deux origines : les neurones afférents intrinsèques dont les corps cellulaires, prolongements et synapses se situent dans le TD, et les neurones extrinsèques dont les corps cellulaires sont situés dans les ganglions jugulaires, nodaux (afférents vagues) ou dans les ganglions de la racine dorsale (afférents spinaux) (Furness et al., 1998). Leur principale fonction consiste à transduire et codifier les modifications de l'environnement chimique ou de l'état physique des tissus qu'ils innervent. Ils transmettent alors ces informations au circuit intégratif afin de modifier l'état fonctionnel de l'organe notamment les voies intrinsèques régulant le flux sanguin, la motricité et la sécrétion intestinales. Ces neurones semblent donc être à la fois mécanosensibles et chimiosensibles. Leur excitation peut être médiée par les cellules entérochromaffines (5-HT) ou d'autres cellules entéro-endocrines sécrétant de la CCK ou de la motiline (Ahlman and Nilsson, 2001). Les IPANs ont été définis comme des neurones AH avec une morphologie de type Dogiel II dans l'intestin grêle et le côlon de cobaye, avec des neurones analogues chez les autres espèces (Bornstein, 1994; Furness et al., 1998).

Les interneurones

Les interneurones ont été identifiés dans toutes les régions du TD. Ils représentent la majorité des neurones entériques et forment des chaînes dans le plexus myentérique qui s'étendent dans le sens anal ou oral (Pompolo and Furness, 1993). Ils innervent également les ganglions sous-muqueux. Leur rôle est d'intégrer et de transmettre l'information sensorielle aux neurones moteurs. Les interneurones sont de type Dogiel III avec de nombreuses dendrites ramifiées et filamenteuses (Portbury *et al.*, 1995). On distingue trois types d'interneurones descendants et un type d'interneurones ascendants dans l'intestin grêle du cobaye. Les interneurones ascendants, dont l'axone projette dans le sens oral, expriment l'ACh, la SP et la calrétnine (Brookes et al., 1997) et communiquent entre eux via l'ACh uniquement. Les interneurones descendants, dont l'axone projette dans le sens anal, sont de trois types : les interneurones ACh/5-HT pour les réflexes locaux de motricité et les réflexes sécrétomoteurs (Furness, 2000), les interneurones ACh/SOM impliqués dans la propagation du complexe de migration myoélectrique (Pompolo and Furness, 1998) et les interneurones ACh/NO/VIP.

Les neurones moteurs

Les neurones moteurs sont principalement des neurones uniaxonaux de type S (Brehmer et al., 1999). Ils transmettent l'information provenant des interneurons vers les cellules effectrices. Il en existe cinq types : les neurones excitateurs du muscle, les neurones inhibiteurs du muscle, les neurones sécrétomoteurs/vasodilatateurs, les neurones sécrétomoteurs non vasodilatateurs et les neurones innervant les cellules endocrines de l'estomac qui ne seront pas évoqués ici. Les neurones moteurs excitateurs et inhibiteurs innervent les muscles circulaires et longitudinaux ainsi que la *muscularis mucosæ* tout au long du TD. Les neurotransmetteurs des neurones excitateurs sont principalement l'ACh chez l'homme et les tachykinines ou l'énképhaline chez le cobaye, alors que les neurones inhibiteurs produisent différents neurotransmetteurs comme le NO, le VIP et l'ATP qui peuvent être libérés par le même neurone (Furness, 2000) (*Tableau II*). Les neurones sécrétomoteurs innervent la muqueuse intestinale et régulent la sécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale. Certains innervent à la fois la muqueuse et les artérioles présentes dans la paroi digestive ce qui leur permet de réguler à la fois les fonctions de sécrétion et de vasodilatation (flux sanguin). Les neurones sécrétomoteurs et sécrétomoteurs/vasodilatateurs peuvent être divisés en trois groupes (Furness et al., 2003): les neurones sécrétomoteurs/vasodilatateurs non cholinergiques co-exprimant le VIP, les neurones sécrétomoteurs/vasodilatateurs cholinergiques co-exprimant la calrétinine et les neurones cholinergiques co-exprimant le neuropeptide Y (NPY) qui sont uniquement sécrétomoteurs.

II.2.2. Rôle des neurones entériques sur les fonctions gastro-intestinales

II.2.2.1 Contrôle de la motricité digestive

La motricité digestive permet à la fois la fragmentation des aliments et le transport du bol alimentaire tout au long du tube digestif. Au niveau intestinal, la segmentation et le péristaltisme sont les mouvements moteurs les plus importants qui permettent la miction et la progression du chyme vers le côlon. La segmentation, qui permet le mélange du chyme avec les enzymes digestives et facilite l'absorption, est caractérisée par des contractions annulaires oscillantes dues à l'activité pacemaker des CIC (cellule interstitielle de Cajal).

Étude bibliographique

Le péristaltisme désigne les contractions circulaires (empêchant le reflux) et longitudinales (pour la propulsion) permettant l'avancée du chyme. Ces deux phénomènes moteurs sont contrôlés par le SNE, une innervation extrinsèque, ainsi que par des hormones gastrointestinales (gastrine, motiline, GLP-1, sécrétine, somatostatine et ghréline).

Les premiers travaux de Bayliss et Starling à la fin du XIXe siècle avaient mis en évidence l'existence d'un réflexe péristaltique contrôlé par un système nerveux indépendant du SNC. L'étude de Furness et al (1995) a pu montrer, après destruction de l'innervation extrinsèque, que le SNE était à l'origine de ce réflexe. Le péristaltisme, caractérisé par une contraction en amont et une relaxation en aval de la zone stimulée, peut être déclenché par des stimuli mécaniques (distorsion au passage du bol alimentaire, frottements) ou des stimuli chimiques (modification du pH, osmolarité, présence d'acides gras ou de glucides)(Allescher et al., 1989; Spencer et al., 1999, 2000). A la suite d'une stimulation, les cellules entéro-endocrines sécrètent de la sérotonine qui active les neurones primaires afférents intrinsèques (IPANs). Les IPANs vont libérer des neuromédiateurs comme l'ACh, la SP ou la CGRP (Furness, 2000; Wolf et al., 2007) qui activent des interneurones ascendants et descendants (*Tableau III*). Les interneurones ascendants sont connectés à des neurones moteurs excitateurs de type cholinergiques induisant une contraction en amont et les interneurones descendants sont connectés à des neurones inhibiteurs réactifs pour la NOS et le VIP (Porter et al., 1997) induisant une relaxation en aval du bol alimentaire (*Tableau II et Figure 27*). La cible de l'activation n'est pas seulement le muscle mais également les CIC, cellules pacemaker qui, en modulant les ondes électriques lentes, établiraient le rythme des contractions intestinales (Ward, 2000). Enfin, la motricité digestive est également soumise à la modulation extrinsèque par le SNC via les systèmes sympathiques et parasympathiques.

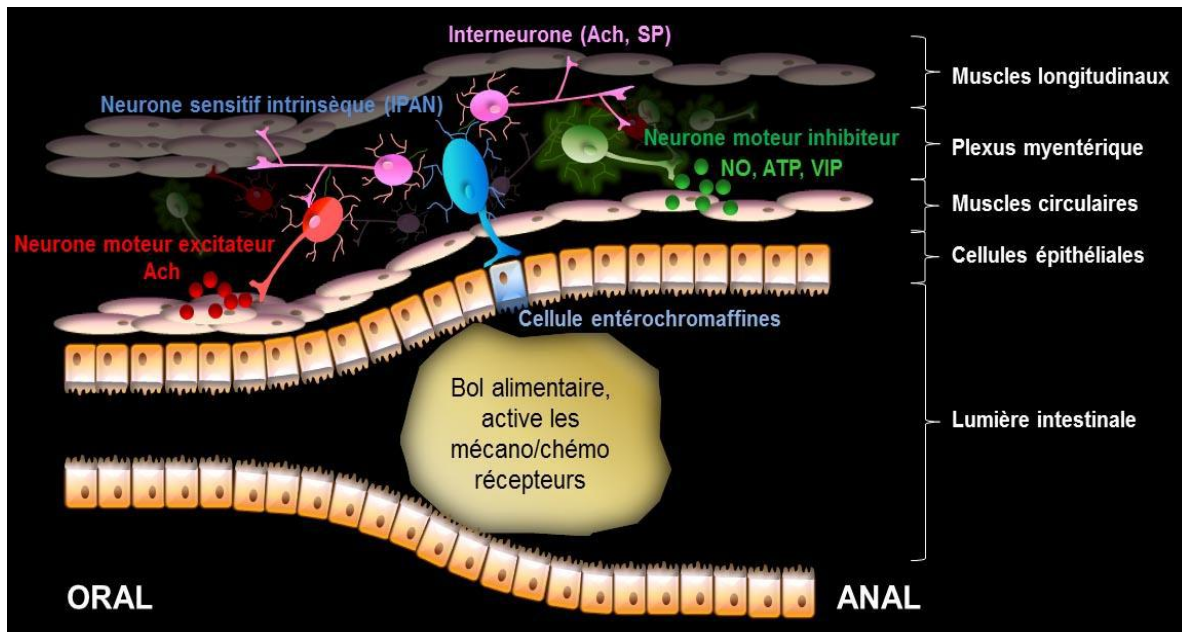


Figure 27: Schéma représentant le réflexe péristaltique dans l'intestin

Suite à une stimulation de la muqueuse par le bol alimentaire, les cellules entérochromaffines libèrent de la sérotonine et activent les IPANs. Les IPANs libèrent alors l'ACh, la SP et la CGRP qui activent les interneurons ascendants et descendants. Les interneurons ascendants, via la libération de l'ACh et de la SP, activent les neurones excitateurs qui libèrent eux-mêmes de l'ACh et de la SP qui provoquent la contraction des muscles. Par ailleurs, les interneurons descendants, via la libération de l'ACh, du NO, du VIP et de l'ATP, activent les neurones moteurs inhibiteurs qui en libérant du NO, du VIP et de l'ATP, provoquent une relaxation musculaire. Les CIC ne sont pas représentées ici.

Les CIC forment un réseau avec des ramifications dans les couches musculaires lisses longitudinales et circulaires ainsi qu'au contact des plexus du SNE. Ce sont des cellules pacemaker qui génèrent des ondes électriques lentes rythmant les contractions musculaires et donc le réflexe péristaltique par une voie dépendante de c-kit (Torihashi et al., 1995, 1999; Ward et al., 2006). Les CIC présentent des jonctions serrées avec les cellules musculaires ce qui leur permet d'assurer leur dépolarisation par l'ouverture de canaux calciques voltage dépendant et ainsi d'être à l'origine des ondes lentes. Elles sont innervées par les neurones entériques et répondent à différents neurotransmetteurs. Elles expriment des récepteurs muscariniques, des récepteurs aux neurokinines et au VIP, ce qui suggère qu'elles participent directement à la transmission des signaux des motoneurons entériques vers les cellules musculaires (Klein et al., 2013; Takaki, 2003; Ward, 2000). Un défaut de fonction de ces cellules conduit à des désordres moteurs sévères.

II.2.2.2 Contrôle du flux sanguin intestinal

80% du flux sanguin intestinal est reçu par la muqueuse et sa régulation s'effectue principalement au niveau des artérioles sous-muqueuses sous l'influence de stimuli chimiques, mécaniques et du SNE (Vanner and Surprenant, 1996). Dans l'intestin grêle et le côlon, la vasoconstriction des artérioles est contrôlée par des fibres nerveuses extrinsèques sympathiques des ganglions coeliaques et mésentériques avec pour médiateur principal l'ATP qui active les récepteurs P2X des artérioles (Evans and Surprenant, 1992; Vanner and Surprenant, 1996). La vasodilatation est assurée par une innervation extrinsèque provenant des ganglions rachidiens dorsaux via la libération de neuromédiateurs comme la SP et la CGRP (calcitonin gene-related peptide) (Vanner, 1994) et intrinsèque, par les neurones entériques sous-muqueux (Galligan et al., 1990; Jiang and Surprenant, 1992; Neild et al., 1990; Vanner and Surprenant, 1991). Dans le grêle du cobaye, cette innervation est cholinergique. Elle active des récepteurs muscariniques M3, ce qui induit la libération de NO vasodilatateur (Andriantsitohaina and Surprenant, 1992; Neild et al., 1990) tandis que dans le côlon il existe une innervation non cholinergique de type VIP et SP (Vanner and Surprenant, 1991). Les stimuli mécaniques induisent une vasodilatation suite à un réflexe cholinergique (Vanner, 1994; Vanner and Surprenant, 1996) et les stimuli chimiques font intervenir des neurones libérant la CGRP et la SP (Vanner and Bolton, 1996).

II.2.2.3 Contrôle de la sécrétion intestinale

En présence de pathogènes, la muqueuse intestinale augmente la sécrétion de mucus dans la lumière et l'accélération du transit contribue à leur élimination. Le contrôle de l'activité sécrétoire est assuré en partie par les neurones entériques.

Il existe une association entre la motricité et le transport d'électrolytes étant donné que les contractions intestinales se produisent en même temps que les sécrétions (Cooke et al., 1993), ce sont des réflexes sécrétomoteurs (*Figure 28*). La stimulation mécanique de la muqueuse active la libération de 5-HT par les cellules entérochromaffines, ce qui induit le réflexe sécrétomoteur. Cette sécrétion est bloquée par la tétradotoxine et reproduite par la sérotonine (Cooke et al., 1997; Kellum et al., 1999; Sidhu and Cooke, 1995). Une distension induit l'activation de neurones sécrétomoteurs ascendants cholinergiques et descendants VIPergiques (Neunlist et al., 1998) qui vont stimuler la sécrétion d'ions Cl^- et empêcher

l'entrée d'ions Na^+ (Hansen and Skadhauge, 1997). La distension peut également provoquer une sécrétion de SP par les neurones sécrétomoteurs, qui en se fixant sur des récepteurs NK-1 et NK-3, active des IPANs. D'autres neurotransmetteurs comme la CGRP et la neurotensine sont également impliqués dans le réflexe dans l'intestin grêle du cobaye (Pan and Gershon, 2000; Riegler et al., 2000). Les frottements peuvent induire la sécrétion d'électrolytes par une libération de 5-HT qui, via des IPANs, active des neurones sécrétomoteurs VIPergiques (Cooke et al., 1997; Sidhu and Cooke, 1995). De nombreuses substances comme l'ATP, le glutamate et le PACAP modulent l'activité des neurones sécrétomoteurs afin d'augmenter ou d'inhiber la sécrétion d'eau et d'ions par les CEI (Cooke, 2000; Cooke et al., 2003).

Le réflexe sécrétomoteur est majoritairement réalisé par les neurones sous-muqueux. Cependant, il existe des neurones sécrétomoteurs cholinergiques et VIPergiques dans le plexus myentérique qui projettent vers la muqueuse.

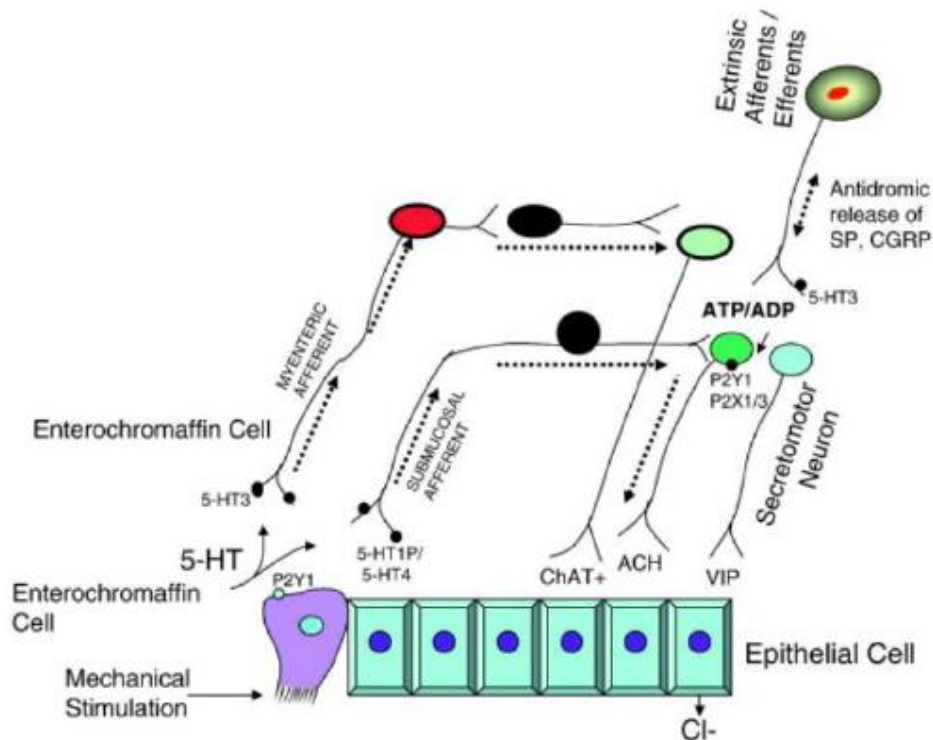


Figure 28: Schéma simplifié du réflexe sécrétomoteur.

Suite à une stimulation mécanique au niveau de la muqueuse, les cellules entérochromaffines libèrent de la 5-HT activant l'arc réflexe sécrétomoteur. Lors d'un frottement mécanique appliqué sur la muqueuse, seuls les IPANs du plexus sous-muqueux sont impliqués par opposition à une distension de la muqueuse qui fait intervenir les voies afférentes extrinsèques. Les neurones sécrétomoteurs ascendants sont cholinergiques tandis que les neurones sécrétomoteurs descendants sont VIPergiques. La libération du VIP et de l'ACh par les neurones sécrétomoteurs entraîne la libération d'ions chlore par les cellules épithéliales intestinales. D'après Xue et al., 2007.

La sécrétion de cytokines par les CEI peut aussi être régulée par le SNE. Ainsi, la SP serait impliquée dans la sécrétion d'IL-8 via une activation des protéines Rho et de NFκB (Zhao et al., 2002) et la somatostatine inhiberait la sécrétion d'IL-8 (Chowers et al., 2000a).

II.2.2.4. Contrôle de l'absorption intestinale

Parallèlement au contrôle des flux d'électrolytes, les neurones du plexus sous-muqueux régulent l'absorption d'ions Na^+ . En effet, une stimulation électrique de ces neurones entraîne une diminution de l'absorption de Na^+ (Hayashi et al., 2003). Le SNE peut réguler l'absorption d'acides aminés par la BEI. Par exemple, la CGRP diminue l'absorption d'alanine, de proline et de taurine par la muqueuse du jéjunum (Barada et al., 2000).

II.2.2.5 Contrôle de la prolifération des cellules épithéliales

Les neurones sont également capables de contrôler la prolifération et la différenciation des CEI. Des études ont montré que le GLP-2 était impliqué dans la croissance et la réparation de la BEI. En effet, le GLP-2 active les neurones entériques et les entérocytes et cette activation est inhibée par la TTX (Bjerknes and Cheng, 2001). De plus, une ablation chimique partielle des neurones myentériques dans le côlon de rat induit une hyperplasie épithéliale associée à une hyperprolifération des CEI (Zucoloto et al., 1988). L'équipe de See et al a confirmé ces résultats en appliquant une ablation similaire couplée à une dénervation extrinsèque, ce qui induisait une hyperprolifération des CEI associée à une augmentation de neurones sous-muqueux immunoréactifs pour le VIP (See et al., 1990). Dans un modèle de coculture de sous-muqueuse/CEI, l'activation électrique des neurones diminue la prolifération des CEI par voie VIPergique (Toumi et al., 2003). Le VIP et le PACAP diminuent la prolifération de lignées de CEI (Lelièvre et al., 1998) tandis que l'ATP et l'ADP inhibent la prolifération des CEI de rats *in vitro* mais stimulent leur migration (Dignass et al., 1998). Enfin, le rôle de la somatostatine a été suggéré car ces antagonistes inhibent la prolifération des CEI *in vivo* (Castell et al., 2001) et la SP module la réparation épithéliale en induisant la production de TGFβ1 par les fibroblastes, ce qui stimule la prolifération des CEI (Felderbauer et al., 2007).

II.2.2.4 Contrôle de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale

De nombreuses études ont suggéré l'implication de voies nerveuses dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire. L'augmentation de la perméabilité chez des rats allergiques à l'ovalbumine est inhibée par la TTX (Crowe et al., 1993) et le stress induit une augmentation de la perméabilité impliquant l'ACh (Kiliaan et al., 1998; Saunders et al., 1997). Le stress aigu active également les voies cholinergiques induisant la sécrétion pancréatique de trypsine qui altère la perméabilité colique de la souris (Demaude et al., 2009). La neurokinine A (NKA) augmente aussi la perméabilité au ^{51}Cr -EDTA dans le duodénum de rats, tandis que le VIP inhibe cette augmentation (Hällgren et al., 1998). Les travaux de Blais et al ont montré sur deux lignées de CEI, Caco2 et HT29-Cl.19A, que le VIP diminue la perméabilité tandis que l'ACh l'augmente (Blais et al., 1997). De plus, la stimulation électrique des neurones en coculture avec des CEI, diminuait la perméabilité et augmentait l'expression de ZO-1 via l'activation d'une voie VIPergique (Neunlist et al., 2003).

II.2.3 Régulation des neurones entériques

Le phénotype et les fonctions des neurones entériques sont sous l'influence de leur microenvironnement. Ainsi, les CEI jouent un rôle dans la neuroprotection en produisant du NGF modifiant leur phénotype neurochimique (Moriez et al., 2009). L'alimentation peut également induire des modifications neuronales. Par exemple, le glucose peut activer les neurones entériques (Liu et al., 1999; Sayegh et al., 2004) ou devenir neurotoxique (Tomlinson and Gardiner, 2008). D'autre part, les acides gras à chaîne courte, produits par la fermentation bactérienne des glucides et protéines non digérés, diminuent la fréquence des contractions des muscles longitudinaux du côlon de rat via une action sur le SNE (Ono et al., 2004). Par exemple, le butyrate peut augmenter l'excitabilité des IPANs du côlon de cobaye (Neunlist et al., 1999) et induire une hyperpolarisation de la membrane de neurones myentériques de rat isolés (Hamodeh et al., 2004). Ainsi, un régime butyrogène induit une augmentation de la proportion des neurones cholinergiques responsable d'un transit accéléré (Suply et al., 2012). Un régime occidental prévient la perte des neurones en particulier nitrergiques par l'augmentation de leptine et de GDNF (Baudry et al., 2012).

Le TD est l'accès principal à l'hôte pour de nombreux virus (Oberste et al., 2000) responsables par exemple de gastroentérites, certains entérovirus ayant démontré un neurotropisme élevé conduisant à une neurotoxicité (Holland-Cunz et al., 2006; Irie et al., 1989; Morrison and Fields, 1991). Ainsi, les neurones sous-muqueux et myentériques semblent pouvoir répondre aux pathogènes présents dans la lumière intestinale car ils expriment des TLRs (-2,-3, -4 et -7) (Anitha et al., 2012; Barajon et al., 2009; Brun et al., 2013) qui semblent être impliqués dans des lésions neuronales.

De nombreuses cytokines régulent également les neurones, comme l'IL-1 β et le TNF α qui semblent impliquées dans la neurotoxicité et la neurodégénérescence (Little and O'Callaghan, 2001). TRAIL, un membre de la famille du TNF α , peut être induit dans les neurones et causer leur apoptose (Cantarella et al., 2003; Huang et al., 2005).

Enfin, les CGE régulent la neurotransmission et ont un rôle neuroprotecteur notamment par la sécrétion de facteurs comme le GDNF, NGF, BDNF, NT-3, GSH, GSNO, la 15dPGJ₂ voire S100 β (*détail en II.3.2.2. et II.3.2.3*).

II.3 Les cellules gliales entériques

II.3.1 Présentation générale des cellules gliales entériques

II.3.1.1 Découverte des cellules gliales entériques

En 1856, R. Virchow donne pour la première fois le nom de neuroglie aux éléments non-neuronaux qu'il observe dans le SNC (Virchow, 1856). Quelques dizaines d'années plus tard, en 1899, A.S. Dogiel note la présence dans le SNE de cellules satellites nucléées à proximité des neurones entériques, les CGE. Ces cellules, assimilées d'abord à des cellules de Schwann, sont retrouvées en très grand nombre en périphérie des corps cellulaires et tout au long des fibres nerveuses (Stohr, 1952). Elles forment ainsi un réseau glial dense et étendu à tous les niveaux du TD (Ruhl, 2005), dans les plexus sous-muqueux, myentérique et « secondaires » (Björklund et al., 1984) et le long des fibres nerveuses du système nerveux extrinsèque (Gershon and Rothman, 2004, 1991) (*Figure 29*). En effet, de part leur origine et leurs propriétés, elles présentent de nombreuses similitudes avec les cellules de Schwann non myélinisantes (Cabarrocas et al., 2003). Cependant, les analyses immunohistochimiques et les observations en microscopie électronique ont finalement montré que les CGE étaient

différentes de ces cellules mais similaires dans leur structure aux astrocytes centraux (Cook and Burnstock, 1976; Gabella, 1972). Une seule CGE entoure plusieurs neurones entériques (Gershon and Rothman, 1991) tout comme les astrocytes centraux sont capables d'entourer 4 à 8 soma neuronaux et entre 300 et 600 dendrites (Halassa et al., 2007). Grâce à leurs jonctions communicantes, elles forment un véritable réseau fonctionnel de la même façon que les astrocytes (Maudlej and Hanani, 1992). Ce type cellulaire a été décrit comme le plus abondant du SNE (Gabella, 1981), les CGE étant 5 à 10 fois plus nombreuses que les neurones. La densité des CGE varie en fonction de l'espèce et leur répartition est différente selon les plexus et les portions du TD (Gabella and Trigg, 1984). Chez le cobaye, le rapport CGE/nombre de neurones est de 0,9 pour le plexus sous-muqueux et de 1,7 pour le plexus myentérique tandis que chez l'homme, le rapport est de 1,3 à 1,9 dans le plexus sous-muqueux versus 5,9 à 7,0 dans le plexus myentérique (Hoff et al., 2008).

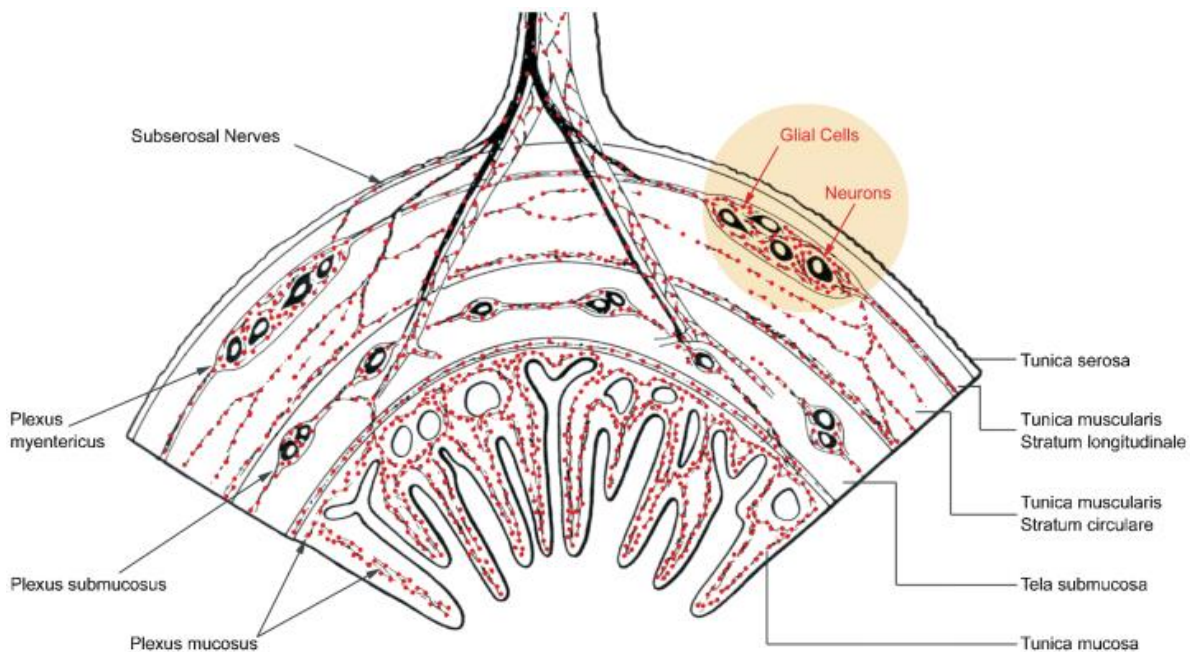


Figure 29: Localisation des cellules gliales entériques dans le tube digestif.
D'après Ruhl, 2005.

Les CGE peuvent être intra- ou extra-ganglionnaires mais peuvent également entourer les villosités des cryptes épithéliales intestinales et les vaisseaux sanguins (Figure 30). Cette proximité étroite, de l'ordre du μm rend possible une communication paracrine bidirectionnelle entre les CGE et les cellules de leur microenvironnement.

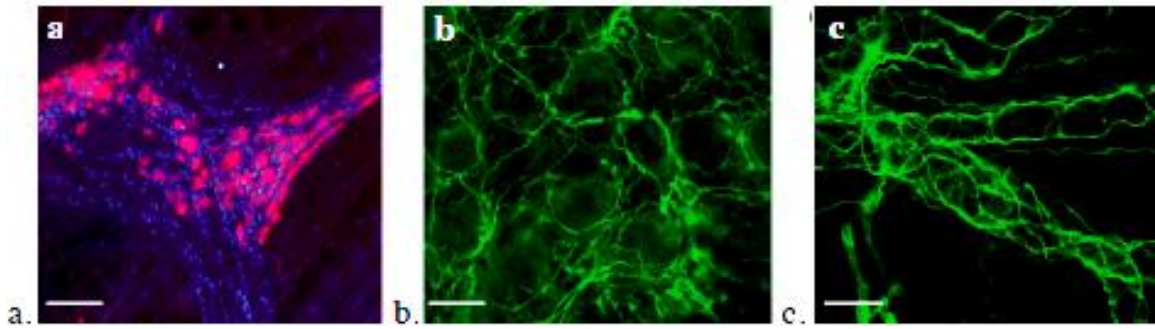


Figure 30: Les cellules gliales entériques (CGE) sont présentes dans les ganglions, autour des fibres interganglionnaires et à proximité de la BEI et des vaisseaux sanguins.

(a) Les CGE immunoréactives pour Sox-10 (en bleu) et les neurones entériques immunoréactifs pour Hu (en rouge). Photographie en microscopie à fluorescence du plexus myentérique de singe (échelle 100 μ m). (b et c) Les CGE immunoréactives pour S100 β , forment un réseau dense entourant les cryptes (b) et les vaisseaux sanguins (c) Photographie en microscopie à fluorescence de muqueuse colique humaine (échelle 25 μ m). D'après Neunlist et al., 2008.

II.3.1.2 Développement des cellules gliales entériques

Les CGE dérivent des cellules de la crête neurale. Les précurseurs entrent dans le TD et entament une migration dans le sens rostro-caudal avant de donner naissance aux précurseurs neuronaux et gliaux (Gershon and Rothman, 1991; Young et al., 2003). Alors que les neurones entériques se différencient à partir du stade E10.5 et sont identifiés au niveau du front de migration, les CGE restent à une certaine distance du front de migration (Young et al., 2003). La migration et la différenciation des précurseurs gliaux est sous le contrôle de gènes et de facteurs environnementaux, principalement la neurotrophine-3 activant le récepteur à tyrosine kinase (TrkC) (Chalazonitis et al., 1998a). Ce récepteur est régulé par les protéines BMP-2 et BMP-4, membres de la superfamille TGF β (Chalazonitis et al., 2004). D'autres facteurs sont également impliqués dans le développement des CGE : le ciliary neurotrophic factor (CNTF) et le leukemia inhibitory factor (LIF) via les sous-unités alpha (CNTFR α) et beta (gp130 et LIFR β) du récepteur au CNTF, respectivement (Chalazonitis et al., 1998b) ; les neurégulines (NRGs) via le récepteur ErbB3 et son corécepteur ErbB2 (Marchionni et al., 1993). Enfin, les facteurs de transcription Sox8 et Sox10 jouent un rôle crucial dans le développement des CGE puisque Sox-10 contrôle l'expression du récepteur ErbB3 par les cellules de la crête neurale (Bondurand and Sham, 2013; Britsch et al., 2001; Maka et al., 2005).

II.3.1.3 Morphologie et marqueurs des cellules gliales entériques

Tout comme les astrocytes, les CGE sont des cellules présentant un petit corps cellulaire et des extensions de taille et de forme variées (Björklund et al., 1984; Gabella, 1981; Hanani and Reichenbach, 1994). Du point de vue cytologique, le noyau des CGE se distingue facilement du noyau des neurones car il se caractérise par la présence de blocs de chromatine situés à proximité de la membrane nucléaire, elle-même caractérisée par la présence d'invaginations profondes.

Une différence majeure existe concernant l'organisation structurale et histologique des CGE chez les petits mammifères (souris, cobaye, etc) et chez les mammifères de grande taille (homme, chien, etc.). Chez les petits mammifères, les CGE possèdent des extensions radiaires entourant les faisceaux de neurites ; une seule cellule gliale peut recouvrir de ses prolongements jusqu'à 600 neurites (Gabella, 1981). En revanche, cette organisation en faisceaux n'est pas retrouvée chez l'homme et les mammifères de grande taille. Les neurones sont séparés les uns des autres par des extensions gliales qui entourent la totalité de la surface neuronale (Baumgarten et al., 1970). Cette différence histologique entre l'homme et les petits mammifères avait déjà été notée par Auerbach en 1864. Confirmant ces observations, le ratio CGE/neurones augmente avec la taille de l'espèce (Gabella and Trigg, 1984).

Certaines études suggèrent l'existence de populations distinctes de CGE basées sur des différences morphologiques et d'expression des marqueurs gliaux. Des classifications ont été proposées (Gabella, 1981; Hanani and Reichenbach, 1994) (*Figure 31*). Les CGE entourant les corps cellulaires sont présentes dans les ganglions ; elles possèdent des prolongements très courts (1à-30nm), irréguliers et sont empaquetées autour des neurones. Les CGE localisées au niveau des fibres nerveuses ont de très longs prolongements (80 nm) parallèles aux fibres et moins d'embranchements (Gabella, 1981; Hanani and Reichenbach, 1994).

L'existence de CGE présentant les deux types d'extensions empêche cependant toute distinction basée sur ce critère. La dernière classification en date prend en compte la localisation, la morphologie et les fonctions des CGE (Gulbransen and Sharkey, 2012).

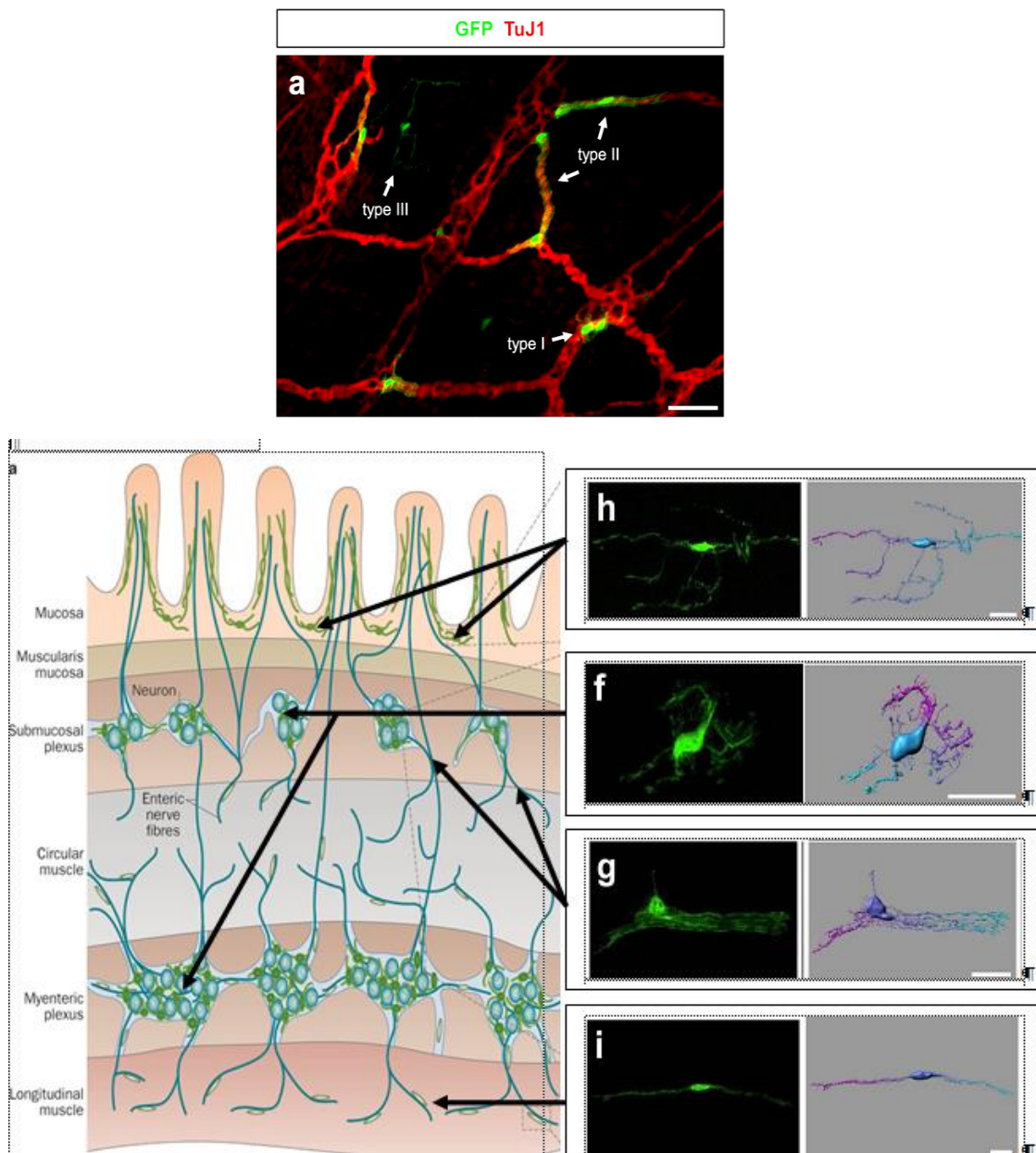


Figure 31 : Types de cellules gliales entériques.

Identification de CGE de souris Sox10CreMADM exprimant la GFP (vert) (a) au sein des ganglions, mais également à l'extérieur et au niveau des interconnexions du plexus myentérique (TuJ1, rouge). Les différents types de CGE : (f) Le type I ou protoplasmique est étoilé avec des prolongements irréguliers et est retrouvé au niveau des ganglions. (g) Le type II ou fibreux avec des longs prolongements est présent au niveau des fibres inter-ganglionnaires ; il est similaire aux astrocytes fibreux de la substance blanche. (h) Le type III ou muqueux présente de nombreux prolongements. (i) Le type IV ou intramusculaire caractérise une glie allongée courant le long des fibres nerveuses au sein de la musculature. Echelle (a) 50 μ m et (f-i) 20 μ m. Adaptation de Gulbransen et Sharkey, 2012 et Boesmans et al., 2014.

Les études immunohistochimiques des CGE ont révélé qu'elles présentent de nombreux marqueurs communs avec les astrocytes. Leurs filaments intermédiaires sont composés de deux protéines, la GFAP, composante majeure de ces gliofilaments (Jessen and Mirsky, 1980) et la vimentine. Alors que la vimentine est également exprimée dans les

myofibroblastes sous-épithéliaux, la GFAP est spécifique des CGE (Andoh et al., 2002; Ruhl, 2005), même si toutes les CGE ne l'expriment pas et que sa fonction précise reste inconnue (Von Boyen et al., 2004). Ces gliofilaments caractéristiques de 10 nm de diamètre forment des faisceaux ancrés à des agrégats moléculaires à la surface de la membrane. Ces faisceaux traversent le corps cellulaire et se projettent dans l'axe des extensions gliales, leur permettant d'adhérer aux surfaces ganglionnaires (Gabella, 1981). En revanche, toutes les CGE expriment la protéine S100 β (calcium binding protein) cytoplasmique jouant un rôle dans la régulation du cytosquelette ainsi que dans l'homéostasie calcique (Ferri et al., 1982; Heizmann, 2002). Cependant S100 β est loin d'être spécifique puisque son expression est retrouvée dans de nombreux types cellulaires (oligodendrocytes, cellules épithéliales du rein, progéniteurs neuraux, épendymocytes, cellules dendritiques, chondrocytes, mélanocytes, adipocytes, myoblastes, cellules musculaires et certaines neurones) (Arcuri et al., 2002; Deloulme et al., 2004; Donato, 2001, 2003; Donato et al., 2009; Hachem et al., 2005; Rambotti et al., 1999; Rickmann and Wolff, 1995a, 1995b; Sorci et al., 1999; Vives et al., 2003). La protéine S100 β cytoplasmique possède de nombreux effets régulateurs intracellulaires (*Figure 32*) mais peut également être sécrétée. Sox-10 est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des CGE aussi considéré comme un marqueur général des CGE (Hoff et al., 2008).

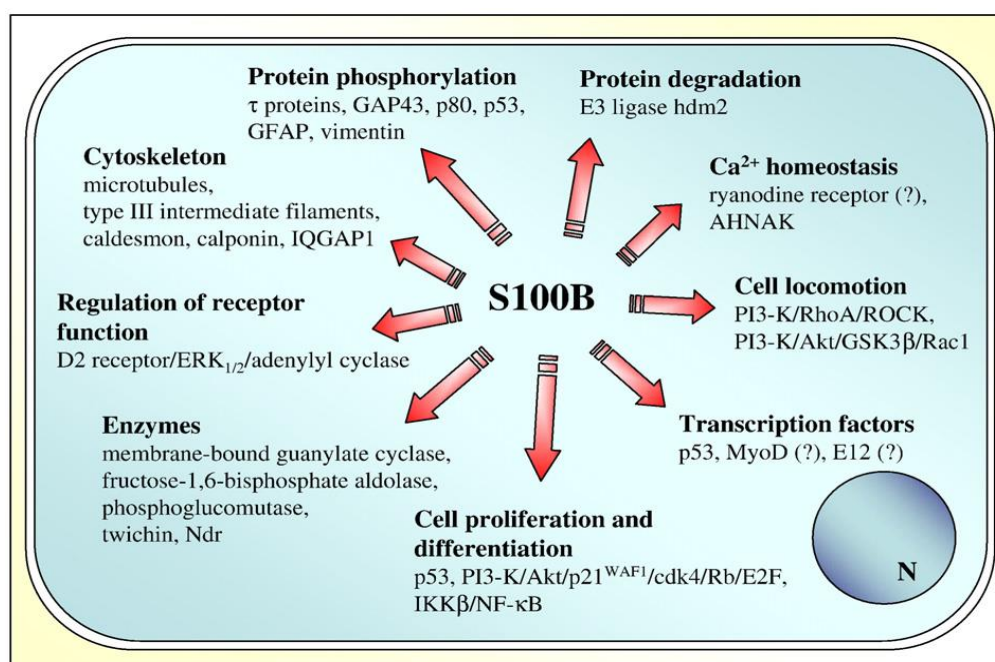


Figure 32: Proposition schématique des effets régulateurs intracellulaires de S100 β .
D'après Donato et al 2009

Enfin, les CGE expriment spécifiquement d'autres « marqueurs » tels que la glutamine synthase, la L-arginine ou l'antigène de surface Ran-2 (Rat neural antigen) (Jessen and Mirsky, 1983, 1985; Nagahama et al., 2001). La glutamine synthase et Ran-2 permettent de différencier les CGE des cellules de Schwann non myélinisantes qui expriment peu la glutamine synthase et n'expriment pas Ran-2 mais Ran-1 (Cabarrocas et al., 2003; Kato et al., 1990; Mirsky and Jessen, 1983).

Une étude récente de Boesmans et *al* a corrélié l'expression des marqueurs aux quatre sous-types gliaux identifiés (Boesmans et al., 2014). Ainsi, 56% des CGE de type 1 co-expriment GFAP et S100 β et 70% co-expriment GFAP et Sox10. Le pourcentage de cellules GFAP-/S100 β + est supérieur pour les types II et III, types pour lesquels l'expression de Sox10 seul atteint plus de 50%. Ainsi, la majorité des CGE co-expriment Sox10 et S100 β . En pratique, les CGE sont souvent identifiées en immunocytochimie par l'expression de Sox10, et/ou GFAP et/ou S100 β (Figure 33), l'expression de ces protéines étant dynamique et modulée par différents facteurs environnementaux (Ruhl, 2005).

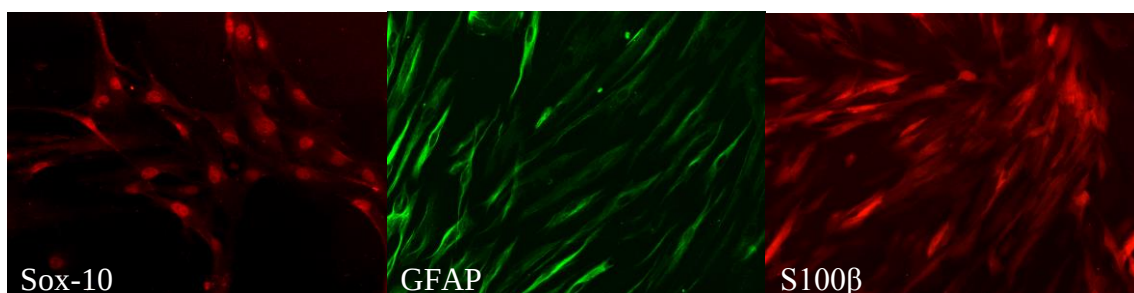


Figure 33: Immunomarquage de cellules gliales entériques humaines en culture.

II.3.2 Rôle des cellules gliales entériques sur les fonctions digestives

Les CGE ont longtemps été considérées à tort, au même titre que les astrocytes centraux, comme de simples cellules de soutien pour les neurones. Mais depuis leur découverte, de nombreuses études, notamment celles de délétion des CGE dans des modèles murins transgéniques ou des modèles chimiques, ont mis en évidence un rôle prépondérant de ces cellules dans l'homéostasie du tube digestif. En effet, outre la neuroprotection, leur proximité avec la BEI (~1 μ m) (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001; Neunlist et al., 2007; Wedel et al., 1999) et le réseau qu'elles constituent autour et à la base des cryptes (Hanani et al., 1989), en font des régulateurs clés des fonctions de la BEI telles que la prolifération, la différenciation des CEI, la réparation de la barrière, mais aussi sa perméabilité/résistance aux pathogènes.

II.3.2.1 Élément de support

Le rôle de support a été le premier rôle attribué à la cellule gliale, ce qui lui a valu son nom (glie = ‘glue’ en grec). Les CGE jouent un rôle de soutien mécanique et nutritionnel pour les neurones entériques (*Figure 34*). Tout d’abord, il a été montré que les CGE favorisaient la mise en place et la structuration spatiale des ganglions entériques. Ceci est dû à la présence de leurs filaments intermédiaires qui permettent l’ancrage des CGE à la surface des ganglions (Gabella, 1990) formant un réseau dense. De plus, les CGE n’assurent pas seulement un soutien passif. En effet, les CGE répondent aux stimulations mécaniques par une surexpression du gène *c-fos* mais aussi par une augmentation de leur taux intracellulaire de calcium, et ces ondes calciques peuvent se propager vers les autres CGE (Sharkey et al., 1999; Zhang et al., 2003). La réponse calcique des CGE est propagée grâce aux connexines 43 (Hanani et al., 1989) et son altération pourrait contribuer aux désordres de motricité observés dans certaines pathologies (McClain et al., 2014). Les CGE jouent également le rôle de support nutritionnel en garantissant aux neurones un microenvironnement régulé. Ce rôle est illustré principalement par la production de facteurs neurotrophiques comme le GDNF et la neurotrophine-3 dont le rôle précis n’est pas encore identifié (Hoehner et al., 1996). Par ailleurs, différentes études ont montré que les CGE représentent une source majeure d’acides aminés utilisés par les neurones pour la synthèse de neurotransmetteurs comme la L-arginine par exemple (Nagahama et al., 2001).

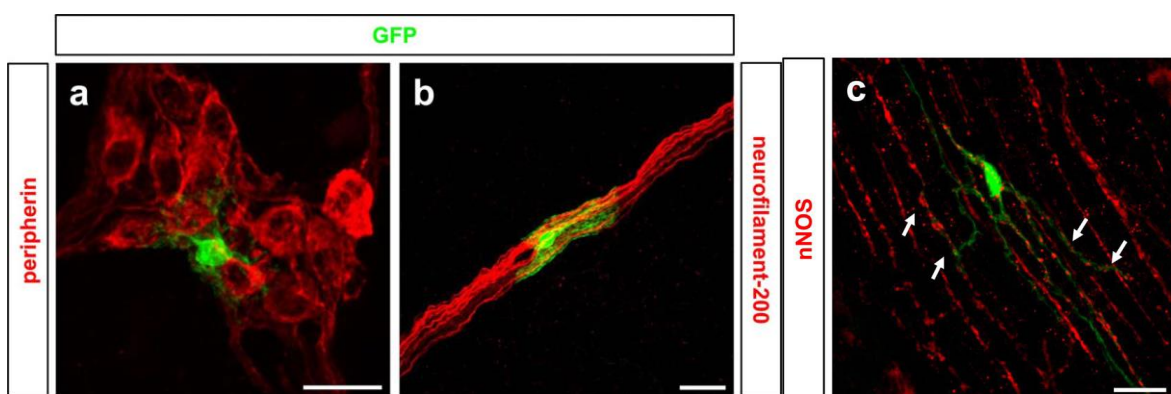


Figure 34: Interactions étroites entre les neurones entériques et les CGE dans le plexus myentérique de souris Sox10CreMADM.

(a) Les CGE de type I (vert) sont liées aux neurones (marqueur pan-neuronal, périphérine, rouge) au sein des ganglions. (b) Les CGE de type II (vert) sont localisées au niveau des fibres interganglionnaires (NF-200, rouge). (c) Les CGE de type III (vert) sont au contact de fibres nerveuses nitrergiques (nNOS, rouge). Echelle : 20 µm. D’après Boesmans et al., 2014.

II.3.2.2 Contrôle de la neurotransmission

De nombreuses études ont démontré le rôle des CGE dans la neurotransmission. Les CGE semblent être impliquées à la fois dans la synthèse et l'élimination de neurotransmetteurs, mais elles peuvent aussi jouer un rôle actif dans le processus de neurotransmission proprement dit. Le rôle des CGE dans la neurotransmission a d'abord été suggéré par la découverte de l'expression exclusive par les CGE de la glutamine synthase (Jessen and Mirsky, 1983; Kato et al., 1990). Cette enzyme responsable de la conversion du glutamate en glutamine assure un double rôle: la détoxification du milieu extracellulaire en glutamate qui peut être excitotoxique; l'approvisionnement des neurones en glutamine nécessaire à la synthèse de deux neuromédiateurs, le glutamate et l'acide γ -amino-butérique (GABA) (Zhou and Galligan, 2000). De plus, il a été montré que le transporteur GAT2 (γ -aminobutyric acid (GABA) transporter) est préférentiellement exprimé par les CGE, ce qui suggère leur implication dans l'élimination des molécules de GABA de l'espace extracellulaire (Fletcher et al., 2002). De plus, les transporteurs d'oligopeptides PEPT-2 sont également exprimés de façon majoritaire par les CGE (Ruhl, 2005), ce qui leur permet de récupérer et d'éliminer les produits de dégradation des neuropeptides tels que le VIP afin de les recycler.

Les CGE sont également impliquées dans la transmission nitrergique puisqu'elles sont la principale source de L-arginine, précurseur du monoxyde d'azote (NO) neuronal (Fletcher et al., 2002; Nagahama et al., 2001). L'implication des CGE dans la transmission nitrergique et peptidergique a été confirmée suite à la destruction partielle des CGE qui induit une diminution du niveau d'expression du NO et du VIP, dans les neurones entériques (Aube et al., 2006).

Les CGE semblent aussi jouer un rôle dans la transmission purinergique. L'expression de la NTPDase-2 (ecto-nucleotidase triphosphate diphosphohydrolase) localisée à la surface des CGE mais absente des neurones, suggère que les CGE contrôlent la disponibilité des bases purinergiques ATP et ADP (Braun et al., 2004). Par ailleurs, il a été montré que les CGE expriment des purinorécepteurs comme P2X7 et P2Y2 (Kimball and Mulholland, 1996; Vanderwinden et al., 2003) et répondent à l'ATP et l'UTP par une augmentation du calcium intracellulaire (Sarosi et al., 1998). Une autre étude montre que les CGE produisent de l'ATP

permettant la propagation d'ondes calciques entre les CGE (Zhang et al., 2003). Ces ondes calciques sont capables d'induire une réponse neuronale, ce qui confirme l'implication active des CGE dans le processus de neurotransmission (Figure 35). Enfin, les CGE expriment les canaux potassiques voltage-dépendants ce qui leur permet de réguler la concentration extracellulaire d'ions K^+ , dont l'accumulation peut affecter l'activité neuronale (Broussard et al., 1993; Hanani et al., 2000).

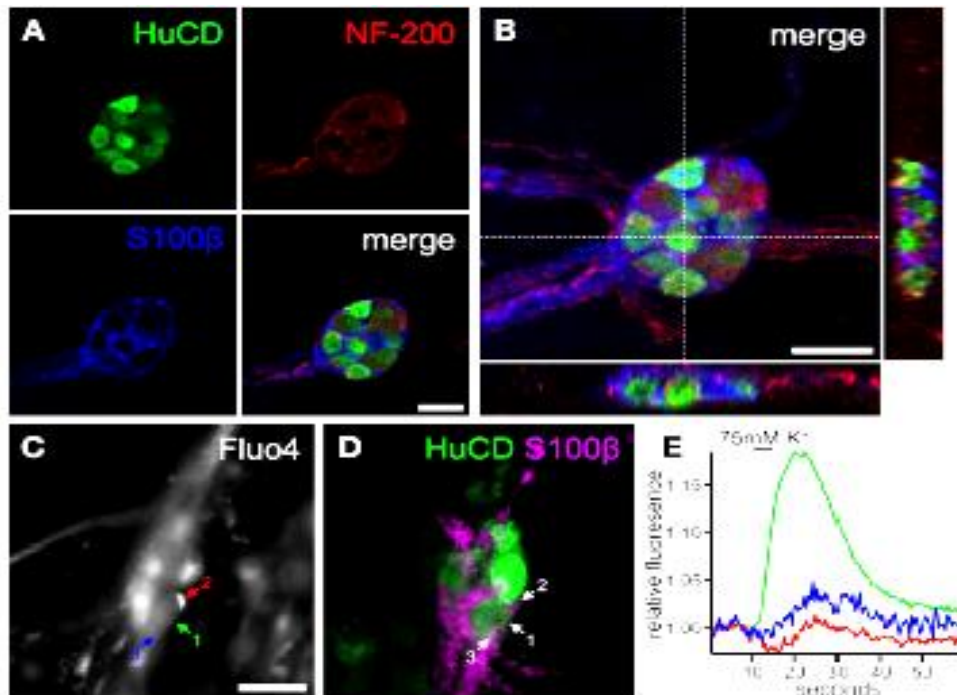


Figure 35: Interactions étroites entre les neurones et les cellules gliales entériques dans le système nerveux entérique.

(A) Image confocale d'un ganglion sous-muqueux humain d'une biopsie duodénale où les neurones sont marqués avec des anticorps anti-HuC/D (vert) et NF-200 (rouge) et les CGE avec S100β (bleu). (B) Projection de ce ganglion en vue orthogonale selon X en bas et Y à droite. (C) Imagerie à fluorescence en échelle de gris d'un ganglion sous-muqueux humain chargé en fluo-4 indicateur de Ca^{2+} . (D) Image de ce ganglion immunomarcuée pour HuC/D (vert) et S100β (magenta). (E) Réponses calciques du corps cellulaire neuronal et des deux cellules gliales après une dépolarisation à 75mM. Code des 3 couleurs des lignes en (E) présentées sur l'image (C). Echelles : 25μm (A, B) et 50μm (C).D'après Boesmans et al., 2013).

II.3.2.3 Contrôle de la survie

Le rôle des CGE dans le contrôle de la survie neuronale a été peu étudié et d'abord suggéré par analogie avec les astrocytes du SNC puis par les modèles de délétion gliale comme celui de Bush qui conduit à une mort neuronale (Bush et al., 1998). En effet, les CGE produisent et sécrètent des facteurs connus pour leurs rôles neurotrophiques et neuroprotecteurs dans le SNE ou dans le SNC, comme le GDNF (glial-derived neurotrophic factor), le NGF (nerve growth factor), la neurotrophine-3 (Anitha et al., 2006; Von Boyen et

al., 2006; Bush et al., 1998; Hoehner et al., 1996) ou encore le glutathion sous sa forme réduite (GSH) (Abdo et al., 2010) et sa forme nitrosylée (GSNO) (Savidge et al., 2007b). Le TGF β produit par les astrocytes a un effet protecteur contre le stress nitrosylant (Dhandapani and Brann, 2003). Plus récemment, la 15dPGJ₂, dérivé de la prostagladine D₂ a été décrite pour avoir un effet neuroprotecteur sur les neurones entériques via une voie Nrf2-dépendante (Abdo et al., 2012). Le GDNF produit réalise une boucle autocrine qui protège les cellules gliales entériques de l'apoptose car elles expriment les récepteurs GFR- α 1, 3 et le corécepteur Ret (Steinkamp et al., 2012). Le BDNF semble également avoir le même effet en se fixant sur le récepteur TrkB (Steinkamp et al., 2012a). Une étude récente a suggéré le rôle de la S100 β sécrétée sur la survie, l'apoptose des neurones et l'extension des neurites (Figure 36).

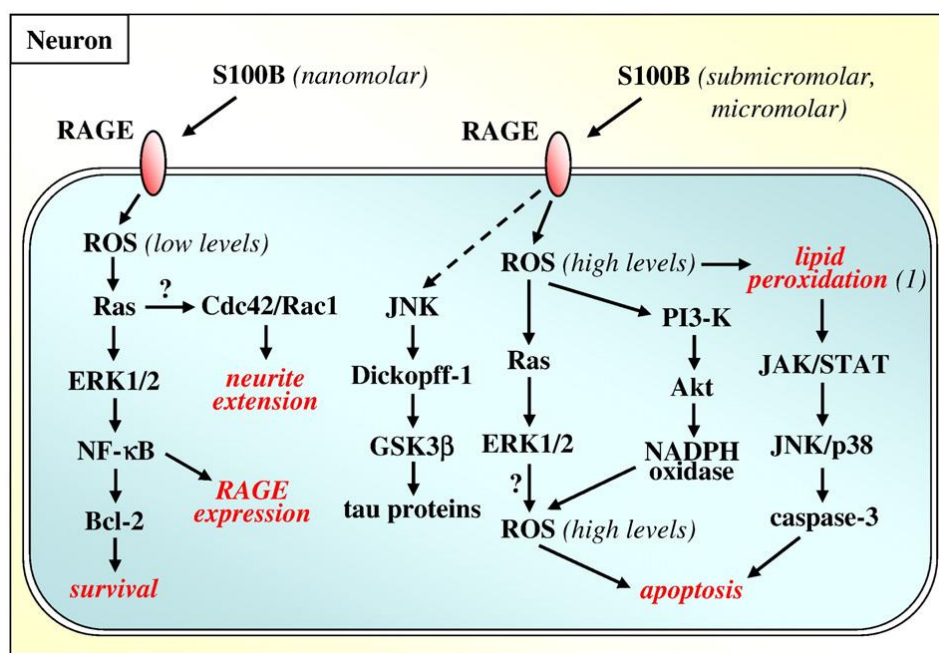


Figure 36: Proposition de modèle des effets du S100 β extracellulaire sur les neurones.
A faible dose, S100 β induit un effet anti-apoptotique et une croissance des neurites et à forte dose, S100 β induit l'apoptose et la peroxydation des lipides. D'après Donato et al., 2009

II.3.2.4 Contrôle de la barrière épithéliale intestinale

Les interactions glio-épithéliales sont très similaires aux relations qui existent entre les astrocytes du SNC et les cellules endothéliales au niveau de la barrière hémato-encéphalique. En effet, plusieurs études ont montré dans des modèles *in vivo* et *in vitro* que les astrocytes contrôlaient les fonctions de la barrière hémato-encéphalique (Beck et al., 1984; Janzer and Raff; Savidge et al., 2007a). Par analogie aux astrocytes du SNC, on prête aux CGE un rôle similaire sur la BEI.

Étude bibliographique

De nombreux éléments plaident en faveur de cette hypothèse, à commencer par la proximité de l'ordre de 0.5 à 2 μm qui existent entre ces deux types cellulaires et qui autorisent de nombreux échanges paracrines (Bohórquez et al., 2014; Neunlist et al., 2007) (Figure 37). En effet, les CGE forment un véritable réseau dense entourant les cryptes intestinales de leur base jusqu'au sommet des villosités (Liu et al., 2013; Neunlist et al., 2008; Ruhl, 2005) (Figure 38). La déplétion des CGE des modèles murins transgéniques (Aube et al., 2006; Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001) entraîne chez ces souris des altérations majeures de l'intégrité de la BEI notamment une inflammation intestinale associée à une augmentation de la perméabilité semblable à celle observée au cours des MICI.

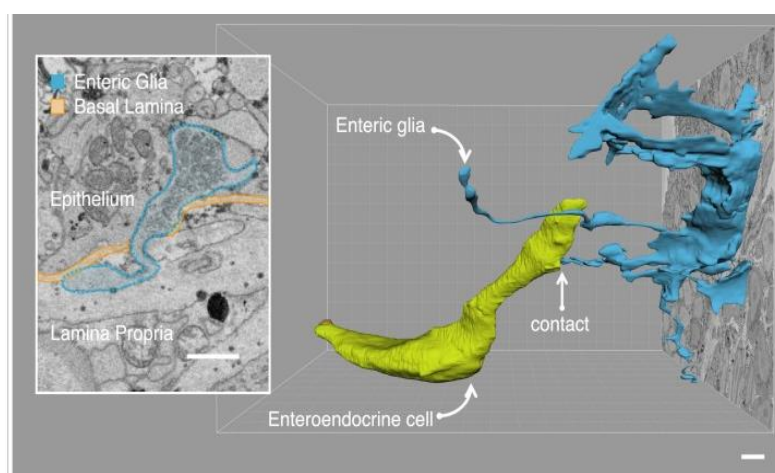


Figure 37 : Étude immunohistochimique en 3D montrant les interactions glio-épithéliales.
Les cellules gliales entériques pénètrent la lamina propria de l'épithélium. Leurs boutons terminaux viennent au contact des cellules entéro-endocrines. D'après Bohórquez et al., 2014.

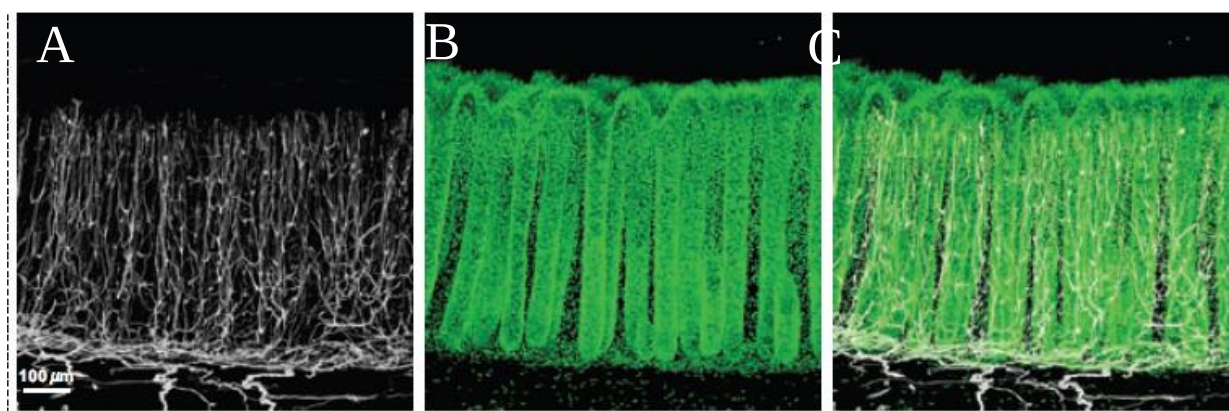


Figure 38 : Localisation des cellules gliales entériques au sein d'une muqueuse colique humaine par imagerie confocale.
(A) Prolongements des cellules gliales entériques le long des cryptes épithéliales coliques visualisés par un immunomarquage S100 β . (B) Noyaux des cellules épithéliales marqués au SYTO16. (C) Superposition des images. D'après Liu et al., 2013

Étude bibliographique

Les CGE secrètent de nombreuses substances qui régulent les fonctions de la BEI. Ainsi, le GSNO augmente la résistance de la BEI (Flamant et al., 2011; Savidge et al., 2007b), le pro-EGF augmente sa réparation (van Landeghem et al., 2011), la 15dPGJ₂ induit la différenciation des CEI et inhibent leur prolifération (Bach-ngohou et al., 2010) comme le TGFβ1 (Neunlist et al., 2007). Enfin, le GDNF a des propriétés anti-apototiques sur les CEI (Steinkamp et al., 2012b) et le NO régule le transport épithélial des ions (MacEachern et al., 2011). De plus, une étude transcriptomique du laboratoire parue dans BMC Genomics a mis en évidence l'impact des CGE sur l'expression de nombreux gènes épithéliaux dont les fonctions de certains sont encore inconnues (van Landeghem et al., 2009).

Une dernière donnée sur les mécanismes de contrôle des CGE sur leur environnement identifie la sécrétion de la protéine S100β comme régulatrice des cellules gliales et des cellules immunitaires (Figure 39).

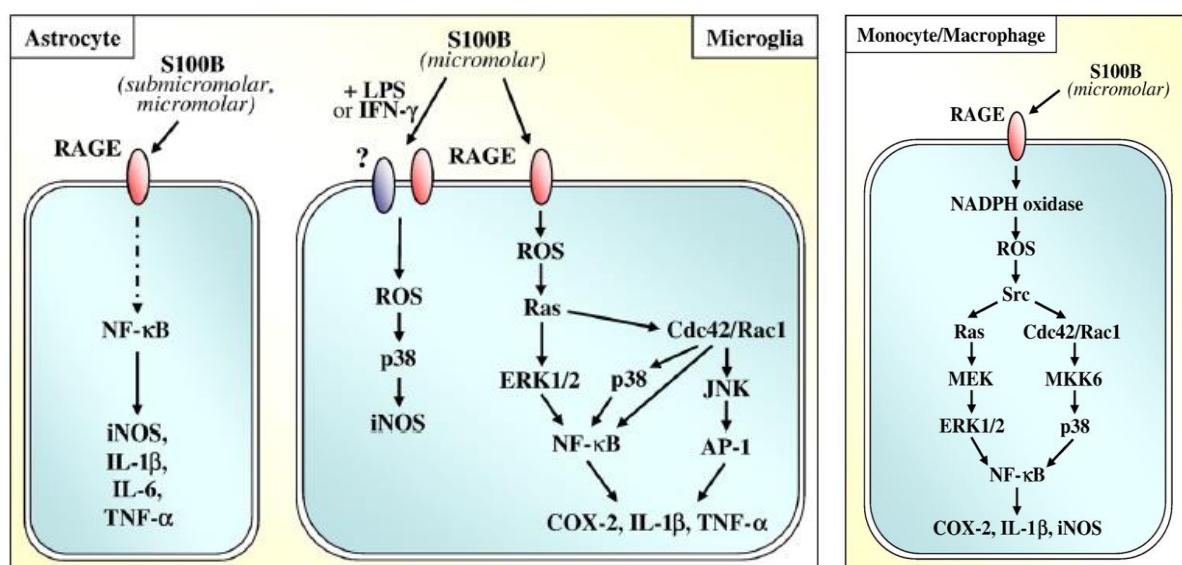


Figure 39: Proposition de modèle des effets de S100β sur les astrocytes, la microglie et les monocytes/macrophages.

S100β induit la voie NFκB chez les astrocytes. Pour la microglie et les monocytes/macrophages, S100β induit des voies similaires activant soit Ras/ERK ou Cdc42/Rac1 menant à l'activation de p38. Quelque soit la voie, S100β provoque la production de cytokines et d'enzymes pro-inflammatoires. D'après Donato et al, 2009.

Enfin, les CGE adultes en culture, exprimant p75, GFAP, S100β et Sox-10, démontrent un potentiel de multipotence pour former des neurones et des CGE en culture (Gershon, 2011; Joseph et al., 2011; Laranjeira et al., 2011).

Étude bibliographique

Le tableau suivant récapitule les nombreux récepteurs et enzymes exprimés par les CGE ainsi que les facteurs qu'elles sécrètent permettant une communication paracrine avec les cellules de leur microenvironnement (*Tableau III*).

Molécule	Effets	Références
ATP	Communication entre CGE et avec neurones	Zhang et al 2003
GDNF	Nutrition des neurones Anti-apoptotique pour CEI Survie, prolifération des neurones via NPY	Hoehner et al 1996 Steinkamp et al 2003 Anitha et al 2006
Glutamine synthase	Neurotransmission Détoxification et apport de glutamine	Jessen et Mirsky, 1983 Kato et al 1990 Galligan et al 2000 Fletcher et al 2002
Neurotrophine-3	Nutrition des neurones	Bar et al 1997
NGF	Neuroprotection	Von Boyen et al 2006
L-arginine	Nutrition des neurones NO pour transmission nitrergique	Nagahama et al 2001 Fletcher et al 2002
NO (NOSII)	Régulation du transport épithélial des ions	Mac Eachern et al 2011
PEPT-2	Elimination des déchets de neurotransmetteurs pour recyclage	Rühl et al 2005
NTPDase-2	Disponibilité ATP et ADP pour les neurones	Braun et al 2004
Récepteurs purinergiques	Augmentation ou diminution de leur réponse calcique donc communication	Kimball et Mulholland, 1996 Vanderwinden et al., 2003
Canaux potassiques	Régulation de la concentration en K ⁺	Broussard et al 1993 Hanani et al 2000
GSH	Neuroprotection	Abdo et al 2010
15dPGJ ₂	Neuroprotection via Nrf2 Inhibition de la prolifération / induction différenciation des CEI via PPAR γ	Abdo et al 2012 Bach-Ngohou et al 2010
GSNO	Augmentation de la résistance transépithéliale Augmentation expression de ZO-1 Résistance aux pathogènes	Savidge et al 2007 Flamant et al 2011
S100 β , IL-6	Communication avec le système immunitaire S100 β : selon dose : régulation de l'apoptose S100 β : production/libération de NO	Bar et al 1997 ; Rühl et al 2001 ; Neunlist et al 2008 Donato et al, 2009 Esposito et al 2007
TGF β 1	Inhibition de la prolifération des CEI	Neunlist et al., 2007
Pro-EGF	Restitution épithéliale via FAK	Van Landeghem et al 2011
PGE ₂	Modulation de l'activité neuronale	Murakami et al., 2007

Tableau III: Récapitulatif des molécules produites et des enzymes exprimées par les CGE.

II.3.2.5 Homologie avec les astrocytes centraux

Les CGE représentent 90% des cellules du SNC. Elles sont de trois types : les oligodendrocytes, les astrocytes et la microglie. Les oligodendrocytes (cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique) produisent la myéline entourant les axones ce qui les protègent et augmente la vitesse de transmission des signaux neuronaux. Les cellules microgliales, d'origine macrophagique, sont des cellules immunitaires résidentes du SNC qui réalisent la phagocytose. Enfin, les astrocytes présentent de nombreux prolongements entourant les vaisseaux sanguins et les synapses (Barres, 2008; Bushong et al., 2002; Ventura and Harris, 1999) et en plus de leur rôle de support, elles contrôlent les fonctions neuronales mais également les fonctions de la barrière hémato-encéphalique (Allen and Barres, 2009; Jessen, 2004; Volterra and Meldolesi, 2005). Brièvement, les astrocytes sont des cellules nourricières pour les neurones grâce à l'expression d'enzymes pour le métabolisme des acides aminés et des glucides comme la glutamine synthase (Dringen et al., 1993; Kirchhoff et al., 2001; Norenberg and Martinez-Hernandez, 1979). Ils peuvent également contrôler la synaptogenèse via la thrombospondine (Christopherson et al., 2005; Pfrieger and Barres, 1997) ou la transmission synaptique via des ondes calciques dues à la libération de glutamate et d'ATP (Aguilhon et al., 2008; Kirchhoff et al., 2001; Newman, 2003; Verkhratsky et al., 1998; Wang et al., 2006). Le rôle majeur des astrocytes centraux est la neuroprotection vis-à-vis du stress oxydant dues aux espèces réactives de l'oxygène, de l'azote (Almeida et al., 2001; Gegg et al., 2004) ou à l'excitotoxicité au glutamate (Arundine and Tymianski, 2004; Novelli et al., 1988). Les astrocytes utilisent différents facteurs pour assurer la survie et la prolifération des neurones : la sécrétion de glutathion (Dringen et al., 2000), l'élimination du glutamate (Bergles and Jahr, 1998; Clements et al., 1992), la libération de facteurs neurotrophiques comme le NGF, le BDNF, le FGF-2, le GDNF (Hailer et al., 2001), de cytokines, l'IL-6 et le TGF β ou de chimiokines comme RANTES.

Cependant, les astrocytes peuvent également devenir « réactifs » (Anderson et al., 2013; Reier and Houle, 1988). Il en résulte une hyperplasie, une hypertrophie, une hyperprolifération gliale « astrogliose », ainsi qu'une sur-expression de GFAP et une libération excessive de facteurs. Ces modifications peuvent aboutir à une glie cicatricielle qui pourrait conserver des propriétés protectrices ou être impliquée dans des phénomènes de neurodégénérescence.

II.3.3. Régulation des cellules gliales entériques

II.3.3.1. Modulation de l'activité des cellules gliales entériques par des stimuli mécaniques et neuronaux

L'activité des CGE peut être modulée par des stimulations mécaniques ou par des médiateurs neuronaux sans que l'impact fonctionnel de cette activation soit connu. Par exemple, chez le cobaye, une stimulation mécanique de la paroi colique entraîne une induction de c-fos dans les CGE (Sharkey et al., 1999) et celle de cultures primaires de CGE génère une augmentation du calcium intracellulaire qui se transmet à l'ensemble des CGE via les jonctions gap (Zhang et al., 2003). D'autre part, une stimulation des voies vagues 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 adrénergiques $\alpha 2a$ dans les CGE suggérant un contrôle de l'activité des CGE par le système nerveux sympathique (Nasser et al., 2006). 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 culture primaire 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). Par ailleurs, la concentration calcique intracellulaire des CGE est également augmentée par la 5-HT et la bradykinine (Kimball and Mulholland, 1996).

II.3.3.2. Microenvironnement glial

Les CGE sont également soumises aux autres types cellulaires présents dans leur microenvironnement mais aussi aux pathogènes qui peuvent passer au travers de la BEI au cours des pathologies digestives. Ainsi, le phénotype des CGE et leurs fonctions peuvent être modulés par des cytokines puisqu'elles expriment par exemple des récepteurs au TNF α et à l'IL-1 β . De plus, les CGE expriment les TLR-3, -4 et -7 mais aussi le TLR2, véritable senseur microbien ayant montré des capacités protectrices vis-à-vis des CEI (Anitha et al., 2012; Barajon et al., 2009; Brun et al., 2013). Enfin, il a également été montré que l'alimentation modulait le phénotype (Stenkamp-Strahm et al., 2013) et les fonctions (Baudry et al., 2012) gliales.

III. L'inflammation intestinale

L'inflammation est un ensemble de processus moléculaires et cellulaires qui sert à protéger l'organisme d'une agression par un agent exogène ou endogène. C'est un mécanisme physiologique faisant partie du fonctionnement d'un organisme vivant qui vise à éliminer un agent délétère et à réparer les tissus lésés. La non résolution de l'inflammation ou l'inflammation chronique sont des facteurs importants dans le développement de diverses pathologies. Il existe deux grands types de pathologies inflammatoires intestinales : les pathologies d'origine infectieuse et les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) qui seront présentées après un court rappel sur les phénomènes inflammatoires.

III.1 Caractéristiques générales de l'inflammation

L'inflammation siège dans des tissus vascularisés en particulier les tissus conjonctifs et épithéliaux. Elle est décrite depuis 2000 ans par quatre signes cliniques : la rougeur, l'œdème, la chaleur et la douleur. L'inflammation est une composante de la réponse immune qui a de multiples causes comme une nécrose tissulaire (infarctus), une réaction à un élément étranger endogène (cause immunologique, réaction chimique) ou exogène (agents infectieux tels les bactéries, champignons, virus, parasites et prions) ou un traumatisme, mais représente toujours une réponse à une agression. Elle se déroule en plusieurs stades :

- la congestion active, qui représente un accroissement du débit sanguin puis une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Elle s'accompagne de la libération de médiateurs inflammatoires.
- l'œdème inflammatoire, qui consiste en une augmentation de la quantité d'eau dans le milieu extracellulaire due à l'augmentation de la perméabilité vasculaire. L'œdème comprime les nerfs alentours et provoque la sensation douloureuse et les démangeaisons.
- la margination, le rolling puis la diapédèse leucocytaire, qui permettent aux polynucléaires et neutrophiles d'adhérer aux parois vasculaires et de passer entre les cellules endothéliales pour rejoindre le foyer inflammatoire en suivant des gradients chimiques.
- la production de facteurs nécessaires à la guérison
- la détersion qui permet d'évacuer les cellules mortes et les toxines présentes dans le foyer inflammatoire
- la réparation (cicatrisation ou régénération) qui doit aboutir à la formation d'un nouveau tissu fonctionnel.

III.1.1 Les médiateurs cellulaires de l'inflammation

Différents types cellulaires interviennent dans les processus inflammatoires, et en particulier les cellules immunitaires issues de l'hématopoïèse (Figure 40), puisque l'inflammation initie les réponses immunitaires innée et adaptative (Figure 41). On peut regrouper les cellules de l'inflammation en cellules sanguines circulantes (basophiles, lymphocytes, monocytes, plaquettes et polynucléaires), mais aussi en cellules résidentes tissulaires (cellules endothéliales, fibroblastes, macrophages, histiocytes, mastocytes, plasmocytes).

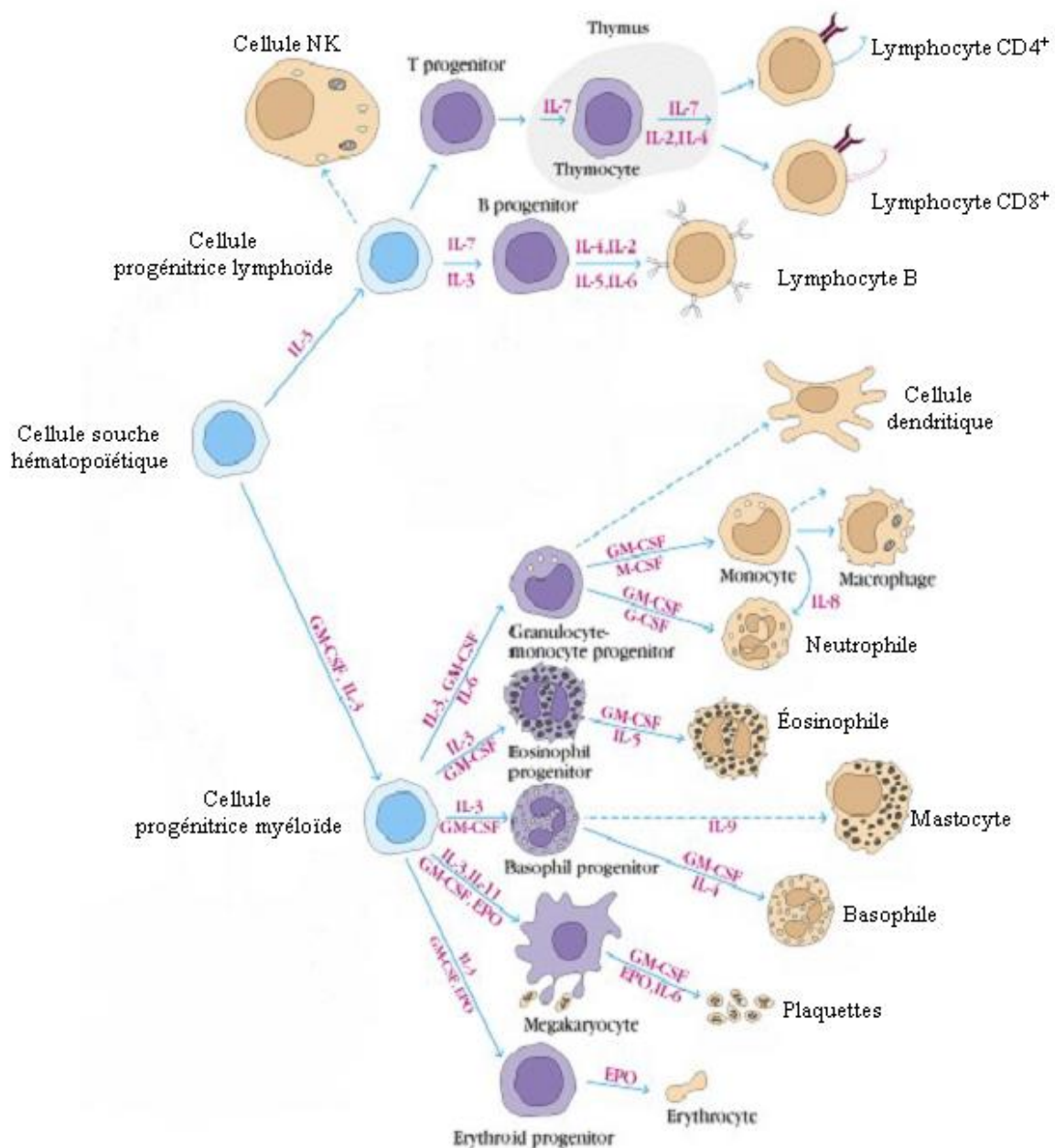


Figure 40 : Les différentes cellules immunitaires issues de l'hématopoïèse.
D'après Goldsby et al., 2000.

Étude bibliographique

Dans un premier temps, la réponse immunitaire innée va mettre en jeu les macrophages, les mastocytes, les cellules NK (Natural Killer), les cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles. Ces cellules expriment des « Pattern Recognition Receptors » (PRRs), les « Toll-Like Recpetors » (TLRs) et les « NOD-like Receptors » (NLRs) qui reconnaissent des éléments bactériens les « Pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs). L'activation de ces voies de signalisation conduit à la synthèse de cytokines et de chimiokines essentielles aux réponses immunitaires.

Dans un second temps et si l'inflammation persiste, la réponse immunitaire adaptative fait intervenir les lymphocytes B et T activés par les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques. Cette réponse est spécifique de l'agresseur. Les lymphocytes T sont activés par les cytokines et vont se différencier en Th1, Th2 ou Th17. Une dérégulation de leur réponse, de leur activation ou de leur prolifération avec une sécrétion accrue de cytokines peut concourir à la mise en place d'une inflammation délétère.

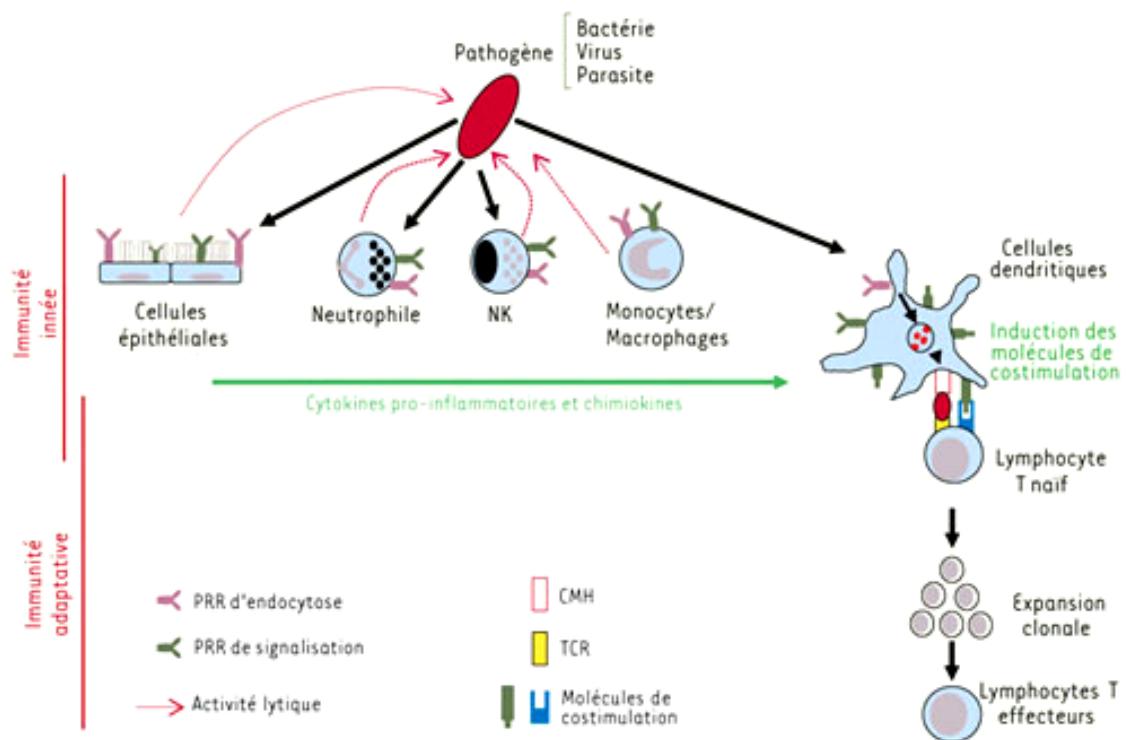


Figure 41: Les cellules dendritiques assurent le couplage entre les réponses immunitaires innée et adaptative.

Suite à l'entrée d'un pathogène, les cellules dendritiques ainsi que les autres cellules de l'immunité innée (cellules épithéliales, NK, neutrophiles et monocytes/macrophages) sont activées par leurs PRRs qui reconnaissent des motifs des pathogènes et vont produire des cytokines pro-inflammatoires. Les cellules dendritiques vont devenir des cellules présentatrices d'antigènes capables d'activer des lymphocytes naifs et induire ainsi la réponse adaptative. D'après S. Fanfano, 2008.

Les acteurs cellulaires de la réponse inflammatoire sont les polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages et microglie (phagocytose), les mastocytes et les polynucléaires basophiles (dégranulation d'histamine, de sérotonine), les lymphocytes B (sécrétion d'anticorps), T CD4⁺ et CD8⁺ (sécrétion de cytokines), NK (natural killer) (cytotoxicité) mais également les fibroblastes (production de collagène nécessaire à la cicatrisation). En plus de ces acteurs cellulaires, l'inflammation met en jeu différents acteurs moléculaires pour le déclenchement, la poursuite et la diffusion de l'inflammation depuis son foyer initial.

III.1.2. Les Pattern Recognition Receptors

Les cellules épithéliales intestinales expriment constitutivement des PRRs qui reconnaissent des motifs microbiens ou PAMPs tels que le lipopolysaccharide (LPS), le peptidoglycane, l'acide lipoteichoïque, l'ARN double ou simple brin et l'ADN déméthylé (motif CpG) (Baumgart and Carding, 2007). Le terme MAMP pour « Microbe-Associated Molecular Pattern » est de plus en plus utilisé, les motifs reconnus n'étant pas uniquement pathogènes. Les PRRs sont exprimés par les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules endothéliales mais également les neurones et les cellules gliales entériques. Ces récepteurs de l'immunité innée activent des voies de signalisation aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires. En permettant la maturation des effecteurs comme les cellules présentatrices d'antigènes par l'up-régulation des molécules de co-stimulation à leur surface (Geremia et al., 2014; Kawai and Akira, 2010), ils prennent également part à l'immunité adaptative en particulier à la réponse Th1 (Akira et al., 2001; Medzhitov, 2001). Ces PRRs regroupent deux familles de récepteurs, les TLRs et les NLRs.

Les TLRs sont au nombre de 10 chez l'homme et sont des récepteurs transmembranaires localisés au niveau de la membrane externe des cellules (TLR-1, -2, -4, -5, -6 et -10) ou au niveau de vésicules intracellulaires (TLR-7, -8 et -9) (Akira and Takeda, 2004; Takeda et al., 2003). Les TLRs -11 à -13 ne sont pas détectés chez l'homme. Ils appartiennent à la même famille que l'IL-1 récepteur et sont exprimés par les CEI, les macrophages ou encore les cellules dendritiques et participent à l'homéostasie intestinale via la reconnaissance des PAMPs de la flore et la production de cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ) (Bowie and O'Neill, 2000; Mukherji et al., 2013; Rakoff-Nahoum et al., 2004). Les TLRs reconnaissent différents composants (Hotte et al., 2012; Jijon et al., 2004; Kamdar et

al., 2013; Lee et al., 2006; Sartor, 2008) et ils activent les voies NFκB et « Mitogen Activated Protein Kinase » (MAPK) via les protéines adaptatrices MyD88 (Myeloid differentiation primary-response protein 88) qui interagit avec la protéine PKC (Corr et al., 2014) et IRAK/TRAF6 (IL-1R-associated kinase/TNF-receptor-associated factor 6) (Akira, 2006; Kawai and Akira, 2007; Krishnan et al., 2007) (*Figure 42*). Le TLR3 passe par la protéine TRIF et active l'IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3). Les dimères TLR1/2 et TLR2/6 lient des lipopeptides (Takeuchi and Akira, 2001; Takeuchi et al., 2000, 2002). Le TLR2 reconnaît l'acide lipoteichoïque des bactéries à Gram positif et des lipopeptides. Le TLR3 lie l'ARN double brin bactérien (Alexopoulou et al., 2001). Le TLR4 lie le LPS, composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Poltorak et al., 1998) et peut activer la voie NFκB de manière MyD88 dépendante mais aussi la voie de l'IRF3 via la protéine TRIF (Beutler, 2000). Si le TLR4 a d'abord été décrit comme un récepteur membranaire, des études ont aussi montré une localisation cytoplasmique au niveau de l'appareil de Golgi et des microtubules (Uronen-Hansson et al., 2004). La flagelline se lie au TLR5 (Hayashi et al., 2001). L'ARN bactérien simple brin est reconnu par les TLR-7 et -8 (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004) et le CpG de l'ADN est reconnu par le TLR9 (Gosu et al., 2012; Hemmi et al., 2000; Krug et al., 2004). La protéine adaptatrice MyD88-like (Mal/TIRAP) sert de lien entre TLR2/TLR4 et la signalisation MyD88 et est essentielle à l'homéostasie intestinale (Aviello et al., 2014a). De nombreuses études ont démontré l'implication des TLRs et de leurs voies dans l'inflammation ou la progression du cancer, comme le cancer colorectal (Elinav et al., 2013; Karin, 2006; Karin and Greten, 2005; Keogh and Parker, 2011; Meylan et al., 2006; So and Ouchi, 2010).

Les NLRs, NOD1 et NOD2, sont des récepteurs cytosoliques qui agissent en synergie avec les TLRs (Franchi et al., 2009; Meylan et al., 2006; Sartor, 2008). Ils sont exprimés par un large nombre de cellules présentes dans la muqueuse intestinale : cellules épithéliales intestinales dont les cellules de Paneth, monocytes et lymphocytes T. Leur localisation est intracellulaire. NOD2 reconnaît le Muramyl dipeptide (MDP) et NOD1 le Diaminopimelate (DAP), ces motifs peptidoglycan sont communs à toutes les bactéries. Ils peuvent également reconnaître l'ARN bactérien simple brin. NOD2 engage une interaction avec la protéine « Receptor Interacting Protein Kinase 2 » (RIPK2/RICK) qui induit une phosphorylation de IκB et ainsi la libération de NFκB qui après sa translocation dans le noyau aboutit à la production

de cytokines et chimiokines en particulier pro-inflammatoires $\text{TNF}\alpha$, IL-6, PFA-4, MIP-2 β et MCP-1 (Figure 42). La stimulation par l'ARN simple brin conduit à la production d'IFN β (Girardin and Philpott, 2004; Kaser et al., 2010). NOD2 active préférentiellement des adaptateurs TRAF2 et TRAF5 (Clarke and Weiser, 2011; Sartor, 2008) et son activation amplifie la réponse de certains TLRs (van Heel et al., 2005; Hiemstra et al., 2012). Les NLRs peuvent également activer le clivage par la caspase-1 des protéines précurseurs de certaines cytokines comme l'IL-1 et le l'IL-18 qui deviennent matures. Ces récepteurs favorisent donc l'induction de la réponse immunitaire précoce à de nombreux pathogènes (van Heel et al., 2005) et sont essentiels à l'homéostasie de la BEI, notamment pour la restitution épithéliale en cas d'inflammation physiologique (Parlato and Yeretssian, 2014).

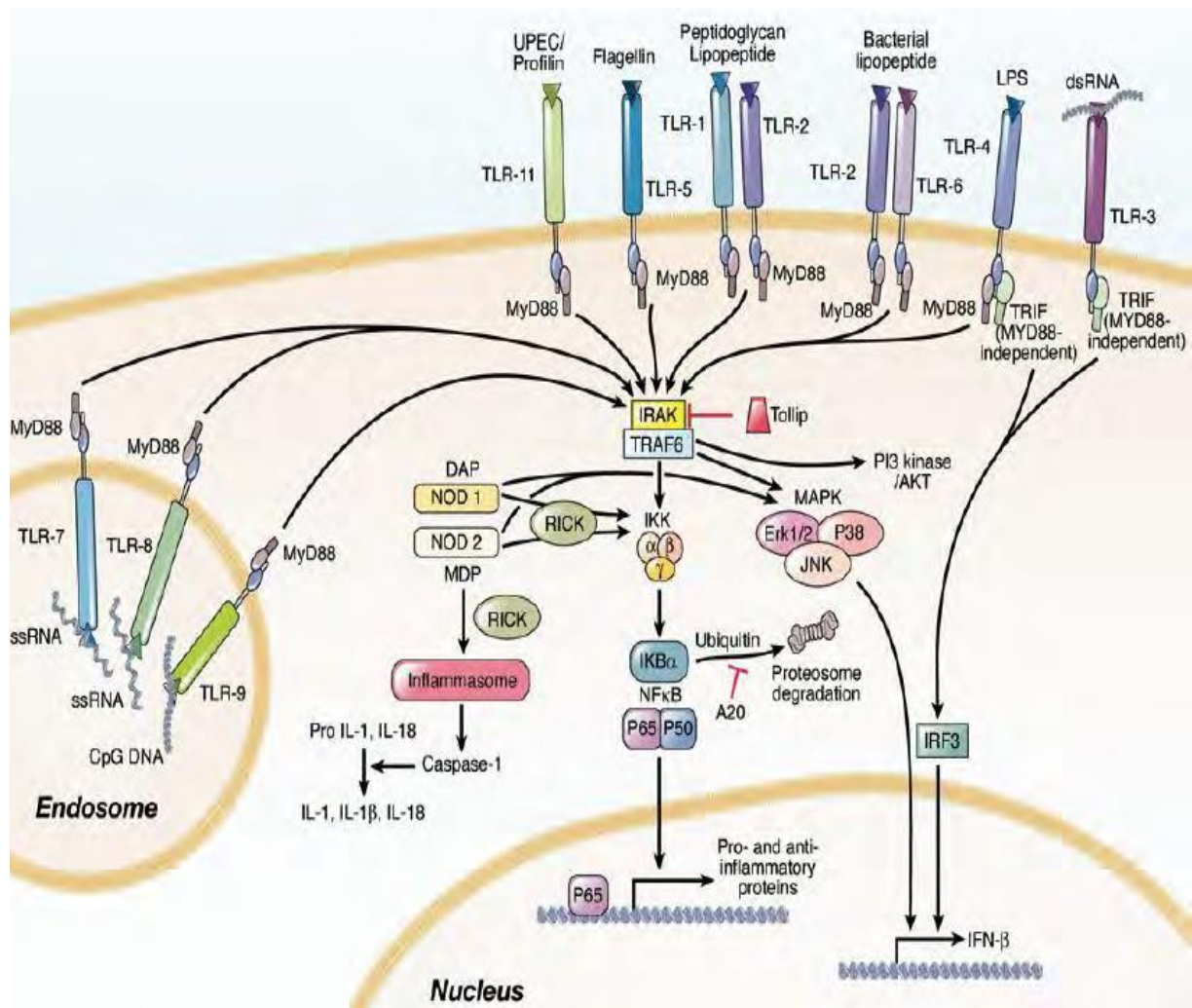


Figure 42: Localisation des différents TLRs et NLRs. leurs ligands et les voies qu'ils activent.
D'après Sartor et al., 2008

D'autres PRRs répondent aux différents PAMPs d'origine non bactérienne, comme la famille des « RIG Like Receptors » (RLRs). La protéine « Retinoid Inducible Gene 1 » RIG-1, détecte les PAMPs viraux et active le voie NF κ B, et est le représentant de cette famille le plus étudié. Quelque soit les PRRs, leur activation aboutit le plus souvent à l'activation soit de la voie NF κ B ou celle des MAPKs.

La voie NF κ B

En absence de signal d'activation, les sous-unités de NF κ B, p50 et p65 (ou RelA), sont couplées à une protéine cytoplasmique I κ B α . L'IKK (I κ B kinase), dont la régulation est essentielle (Pasparakis, 2009), est formée de 3 sous-unités, IKK α , IKK β et IKK γ ou NEMO (NF κ B Essential Modulator). Suite à l'activation, NEMO est neutralisée, libérant ainsi les sous-unités catalytiques α et β qui vont phosphoryler I κ B, qui sera ubiquitynilé et dégradé par le protéasome. Les sous-unités de NF κ B étant libérées, il est transloqué dans le noyau où il se lie aux séquences promotrices de ces gènes cibles, activant en particulier la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires et les gènes anti-apoptotiques (Baldwin, 1996; Lang et al., 2008; Mercurio et al., 1997) (*Figure 43*). De plus, les cytokines pro-inflammatoires produites par les cellules immunitaires peuvent aller activer la voie NF κ B au sein des CEI constituant une balance primordiale pour l'homéostasie de la BEI (Pasparakis, 2012; Zaph et al., 2007).

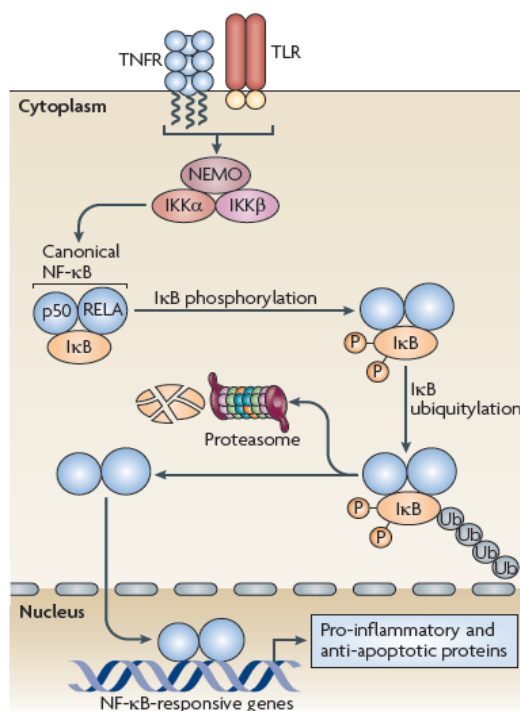


Figure 43: Détail de la voie de signalisation NF κ B. D'après Pasparakis, 2009.

La voie des MAP kinases

Tout comme la voie NFκB, les voies des MAPkinases sont impliquées dans la régulation de la majorité des fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, la mitose, la survie cellulaire et l'apoptose (Figure 44).

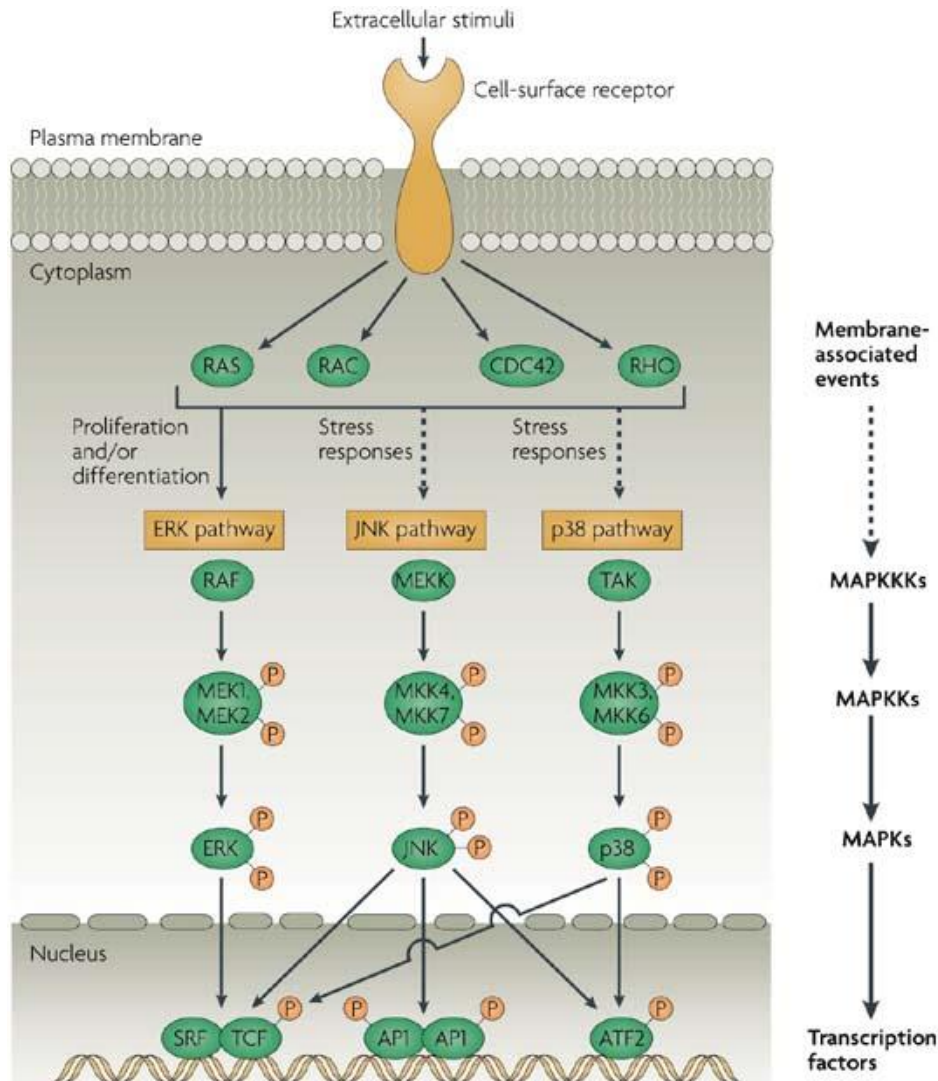


Figure 44: Schéma simplifié de trois voies de signalisation des MAPKineses.

Les stimuli extracellulaires activent les voies des MAPKs par des mécanismes médiés par des GTPases, RAS, RAC, CDC42 (cell-division cycle 42) et RHO (RAS homologue). Quand les MAPKKKs (MAPK kinase kinases), comme RAF, MEKK (MAPK/ERK kinase kinase) et TAK (TGFβ-activated kinase), sont activées, elles phosphorylent les MAPKKs (MAPK kinases) sur deux résidus sérine. Les MAPKKs phosphorylent à leur tour les MAPKs ERK (extracellular-signal-regulated kinase), JNK (JUN N-terminal kinase) et p38 sur deux résidus, thréonine et tyrosine, ce qui conduit à l'activation catalytique de ces MAPKs. Les MAPKs actives peuvent se transloquer dans le noyau pour phosphoryler des facteurs de transcription, comme le ternary complex factor (TCF) et le complexe activator protein 1 (AP1), incluant JUN et l'activating transcription factor 2 (ATF2), modulant ainsi la transcription des gènes. TCF forme un complexe avec le serum response factor (SRF) pour réguler l'induction Fos. AP1 est impliqué dans la transcription d'une grande variété de gènes. Les facteurs de croissance activent préférentiellement la voie ERK, tandis que le stress et les cytokines inflammatoires activent de préférence les voies JNK et p38.

III.1.3 Les médiateurs humoraux de l'inflammation

Les médiateurs humoraux de l'inflammation sont des médiateurs circulants ou des médiateurs cellulaires locaux (*Figure 45*). Les médiateurs circulants sont les kinines (vasodilatation ou douleur comme la bradykinine), le système du complément (dégranulation, adhésion et phagocytose des bactéries) et le système coagulation/fibrinolyse (cicatrisation). Les médiateurs synthétisés au niveau local sont nombreux, et en plus des classiques amines vasoactives, des cytokines et des eicosanoïdes, de plus en plus de rôles sont attribués aux neuromédiateurs, molécules d'adhésion, protéases de destruction tissulaire et radicaux libres.

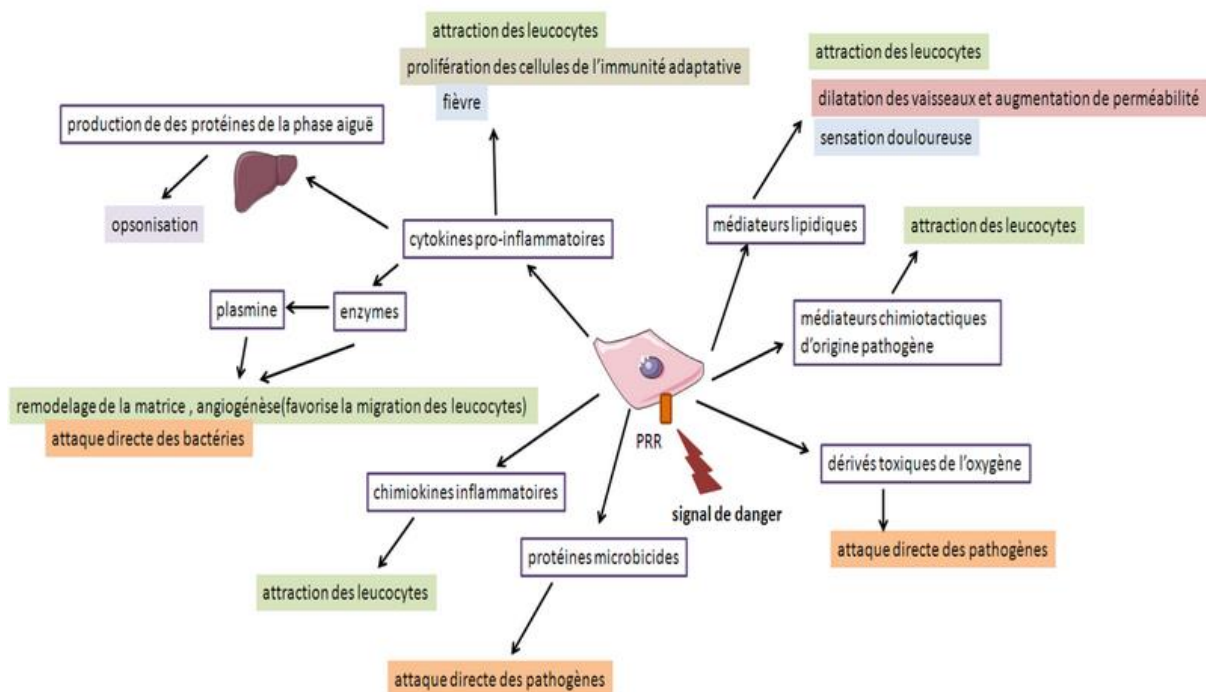


Figure 45: Les médiateurs de l'inflammation.

D'après <http://accres.ens-lyon.fr/accres/ressources/immunite-et-vaccination/immunite-innee-barrieres-naturelles-et-reaction-inflammatoire>.

Les amines vasoactives, l'histamine et la sérotonine, sont sécrétées par les mastocytes, les polynucléaires basophiles et les plaquettes pour induire une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire. L'histamine agit aussi au niveau de système nerveux et provoque la sensation de douleur. Les eicosanoïdes, les prostaglandines et leucotriènes ont des rôles dans la vasodilatation, la douleur, l'attraction des polynucléaires, et la fièvre. Les cytokines peuvent être produites par la plupart des cellules mais principalement les lymphocytes T, les monocytes et les macrophages, et ont un effet autocrine et paracrine. Il existe des cytokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires.

Nous développerons maintenant plus particulièrement les fonctions des cytokines et des eicosanoïdes dont il va être question dans ce travail de thèse.

III.1.3.1 Les cytokines

La superfamille des cytokines comprend le groupe des chimiokines, des interférons (IFNs) qui favorisent l'immunité innée, des interleukines (ILs), des « colony-stimulating factors » (CSFs), des « tumor necrosis factors (TNFs) et des « transforming growth factors (TGFs), des facteurs hématopoïétiques et des neurotrophines (Rothwell, 1999). Ces polypeptides produits par la plupart des cellules mais principalement les lymphocytes T, les monocytes et les macrophages, leurs effets autocrine et paracrine ont des rôles dans les processus inflammatoires mais participent également au développement, à la prolifération, à la survie, et à la différenciation (Araujo et al., 2009). Au cours de l'inflammation les cytokines contrôlent le recrutement des cellules immunitaires à travers l'endothélium vasculaire (Danese and Gasbarrini, 2005; Thomas and Baumgart, 2012) par le biais de molécules d'adhésion (MAdCAM1, ICAM-1, VCAM-1), puis les cellules recrutées au niveau des sites inflammatoires sécrètent à leur tour des médiateurs pro- et anti-inflammatoires. Il existe des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α) ou anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13). De plus selon le type de lymphocytes CD4⁺ qui les sécrètent, certaines cytokines ont un profil de type Th1 et participent à l'immunité cellulaire qui cible les pathogènes intracellulaires (virus, bactéries, parasites), comme l'IFN γ , l'IL-2, l'IL-12 et le TNF α . D'autres ont un effet anti-parasitaire et sont actives au cours des réactions allergiques, ce sont des cytokines de type Th2, comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13 (Bouma and Strober, 2003).

Les cellules recrutées au niveau des sites inflammatoires par des cytokines sécrètent à leur tour des médiateurs pro-inflammatoires. Ainsi, MIF est produit par les monocytes/macrophages pour le recrutement d'autres neutrophiles, les chimiokines sécrétées par les LTh1 pour le recrutement des macrophages et lymphocytes T CD8 cytotoxiques, les chimiokines des LTh2 pour recruter les éosinophiles et les mastocytes et enfin les chimiokines des LTh17 pour le recrutement d'autres lymphocytes T, cellules dendritiques et neutrophiles (Nishihira, 2012; Stadnyk, 2002; Zenewicz et al., 2009).

Là encore nous ne pouvons pas présenter les cytokines de manière exhaustive et ne parlerons ici que de cytokines d'intérêt telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, l'IFN γ et le TNF α puisque ce sont des médiateurs majeurs des mécanismes que nous allons étudier.

L'IL-1 β

L'IL-1 β est une cytokine multifonctionnelle plutôt décrite comme pro-inflammatoire. Son précurseur est clivé par la caspase-1 donnant une protéine mature. Elle est principalement produite par les macrophages activés mais peut l'être également par des cellules endothéliales ou des fibroblastes. C'est un médiateur inflammatoire important qui stimule l'expression de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium vasculaire favorisant ainsi la migration des leucocytes circulants vers le site inflammé. Elle régule aussi les fonctions de prolifération, de différenciation cellulaire et d'apoptose. Son rôle le plus important est l'induction de la fièvre par action directe sur les centres de l'hypothalamus. Un rôle neuroprotecteur de l'IL-1 β est également suggéré (Carlson et al., 1999; Diem et al., 2003) et elle semble capable de favoriser la croissance des neurites après des dommages au niveau du nerf sciatique (Temporin et al., 2008a, 2008b). Ces effets sont assez comparables à ceux du TNF α . L'IL-1 β se fixe sur son récepteur l'IL-1R1 qui est exprimé par de nombreux types cellulaires dont les neurones ou les astrocytes après une lésion. Cette fixation active MyD88/TRAF6 puis deux voies de signalisation : MAPK/AP1 et NF κ B. La fixation de l'IL-1 sur le récepteur de type II, exprimé par les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes B, n'entraîne aucun signal intracellulaire.

L'IL-6

Selon les études, l'interleukine-6 est décrite comme une cytokine pro- ou anti-inflammatoire. Elle est produite par les monocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules microgliales, les astrocytes et les neurones du SNC (Gadient and Otten, 1997; Schöbitz et al., 1992) mais aussi au niveau du SNE par les CGE (Rühl et al., 2001). L'IL-6 régule des fonctions telles que la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaires et mais a également un rôle dans de nombreuses pathologies (Gruol and Nelson, 1997). L'IL-6 appartient à la famille des cytokines neuropoïétiques avec le CNTF (ciliary neurotrophic factor), le LIF (leukemia inhibitory factor), l'OSM (oncostatin M), l'IL-11, le CT-1 (cardiotrophin-1), la NNT-1 (neurotrophin-1), l'IL-27, neuropoïétine et le BSF3 (B-cell stimulating factor 3). Leur récepteur contient la sous-unité gp130 qui s'homodimérise

et active la voie JAK/STAT (Janus kinase-signal transducer activator of transcription et mitogen activated protein kinase signal transduction). L'activation de JAK conduit à l'activation du dimère de facteurs de transcription STAT1/STAT3 qui est transloqué dans le noyau pour induire la transcription de gènes. Le récepteur à l'IL-6 existe sous sa forme membranaire mIL-6R et sa forme soluble sIL-6R (Hibi et al., 1996).

L'IL-8

Elle appartient à la famille des chimiokines ayant pour rôle principal le chimiotactisme leucocytaire (Keshavarzian et al., 1999; MacDermott, 1999; McCormick et al., 1993; Mukaida et al., 1998). L'expression d'IL-8 par les CEI est constitutive et favorise leur migration, leur prolifération et la réparation épithéliale (Brew et al., 2000; Rennekampff et al., 2000; Wilson et al., 1999). Ces récepteurs sont le CXCR1 et le CXCR2 couplés aux protéines G. Les chimiokines sont réparties en 4 sous-groupes : CC, CXC, CX3C et C (lymphotactine ; C pour cystéine, X pour acide aminé) et possèdent des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, les CCR (Brew et al., 2000; Cascieri and Springer, 2000; Dwinell et al., 1999) (Figure 42). Les CEI expriment des chimiokines des groupes CC et CXC, GRO α , IL-8, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES (Yang et al., 1997).

L'IL-10

L'IL-10 est une cytokine décrite comme anti-inflammatoire et sa délétion est utilisée pour développer des modèles de colites (Arrieta et al., 2009). Elle est produite par les monocytes, les mastocytes, les lymphocytes Th2 et les lymphocytes B. Après fixation sur l'IL-10R, elle active des voies comme ERK1/2, p38 et NF κ B qui conduisent à l'inhibition de la production de cytokines de type Th1 comme l'IL-2, l'IFN γ ou encore le TNF α et à la diminution de l'expression des molécules du CMHII.

L'IFN γ

L'IFN γ est une interleukine clé du système immunitaire pour la défense contre les pathogènes. Il est produit par les cellules immunitaires et les cellules épithéliales et se lie à l'IFN γ R. Il permet ainsi l'internalisation des bactéries par l'épithélium via Erk1/2-ARF6 (Smyth et al., 2012), en augmentant leur transcytose (Clark et al., 2005).

Le TNF α

Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire ayant un rôle majeur dans les maladies inflammatoires et auto-immunes (Kollias, 2005). Il est produit majoritairement par les mastocytes de la muqueuse intestinale humaine (Bischoff et al., 1999), les eosinophiles, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T (Bazzoni and Beutler, 1996; Costa et al., 1993; Gordon and Galli, 1991). Il a un rôle chimioattractant pour les neutrophiles et monocytes, augmente la perméabilité vasculaire, active les lymphocytes T, les eosinophiles et les mastocytes (van Deventer, 1997; van Overveld et al., 1991; Paleolog et al., 1994). Le TNF α a deux récepteurs membranaires TNFRI et TNRII ainsi que leurs formes solubles dont les effets sont médiés en majeure partie par NF κ B.

III.1.3.2 Les prostaglandines

La famille des eicosanoïdes est divisée en deux grandes catégories les leucotriènes et les prostanoïdes (prostaglandines (PGs), thromboxanes (TX) et prostacycline (PGI₂), dérivant de l'oxydation d'acides gras polyinsaturés (AGPI) à 20 atomes de carbone (Bonventre, 1992). Ces AGPI, n-3 (oméga-3) ou n-6 (oméga-6), issus de l'alimentation, sont des acides gras essentiels aux grandes fonctions de l'organisme. Les eicosanoïdes de la série 3 dérivent de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) appartenant à la classe des n-3. En revanche les eicosanoïdes des séries 1 et 2 dérivent des n-6 et plus précisément, soit de l'acide eicosatétraénoïque aussi appelé acide arachidonique (AA) pour la série 2 ou de l'acide eicosatriénoïque pour la série 1. L'AA est aussi à l'origine des acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE). Les PGs sont retrouvées dans la plupart des cellules des mammifères et sont également considérées comme des hormones appelées autacoïdes (Dajani et al., 2003). Ce sont des composants métaboliques instables et ne sont donc pas stockés dans l'organisme. Leur présence, en périphérie des cellules ainsi que leur large tropisme cellulaire leur confère une variété importante d'actions physiologiques. Elles sont des médiateurs de l'inflammation impliqués dans la pathogenèse de nombreuses maladies.

Nous développerons maintenant plus particulièrement les PGs de type 2 et le 15-HETE dont il va être question dans ce travail de thèse.

Voies de synthèse des prostaglandines

La première étape est la libération d'acide arachidonique (AA) à partir des phospholipides membranaires par l'action de la phospholipase A₂ (PLA₂). L'AA est transformé en prostanglandine G₂ (PGG₂) par l'activité cyclooxygénase puis en prostanglandine H₂ (PGH₂) par l'activité peroxydase des COX-1 et COX-2. La PGH₂ est une molécule instable qui va être transformée enzymatiquement pour donner naissance à une série de molécules actives, les prostaglandines primaires D₂ (PGD₂), E₂ (PGE₂) et I₂ (PGI₂). La PGD₂ se transformera à son tour en prostaglandine J₂ (PGJ₂). La prostaglandine F₂ alpha (PGF₂α) est dérivée quant à elle de la PGE₂ et de la PGH₂ (Figure 46).

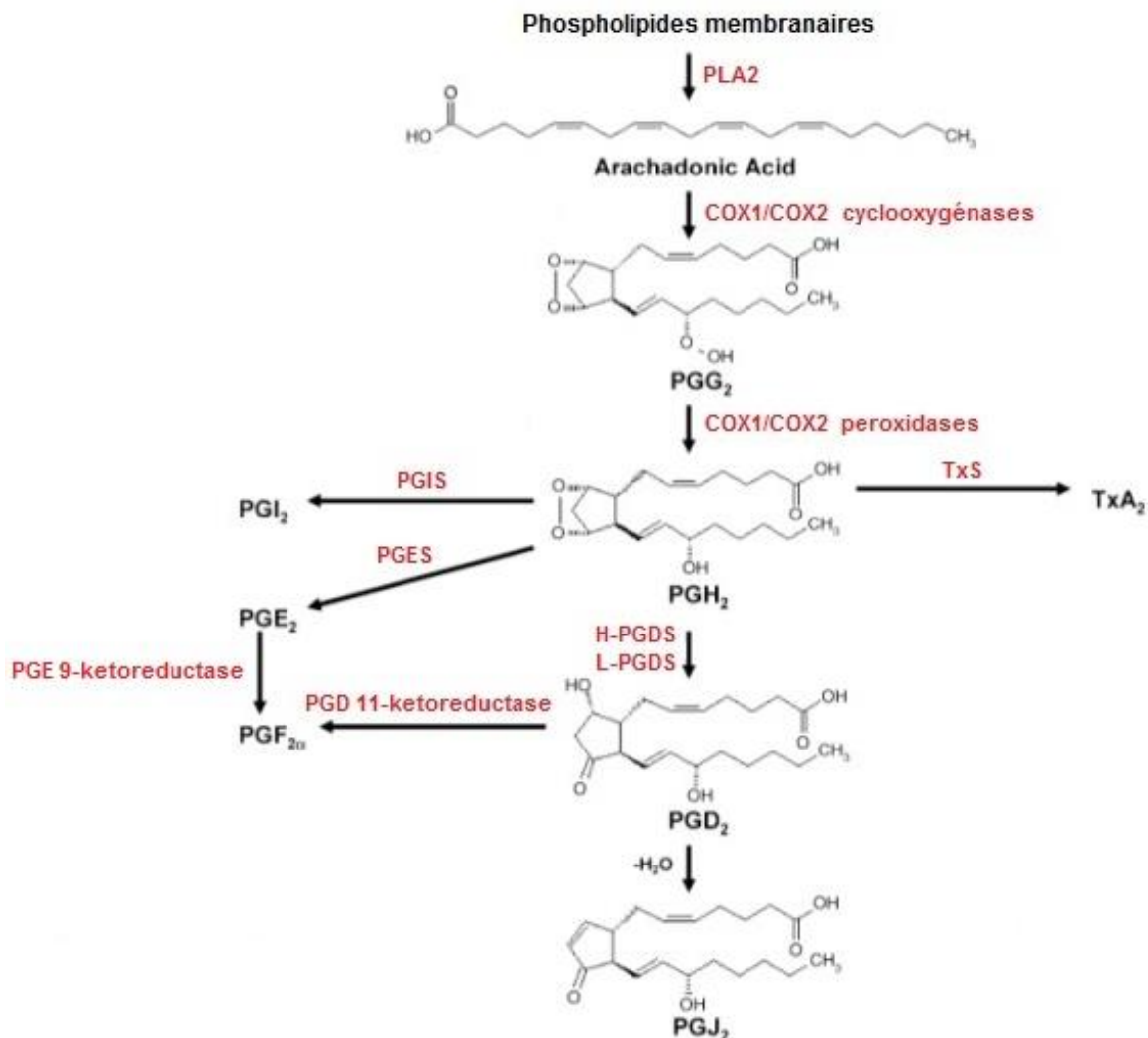


Figure 46 : Biosynthèse des prostaglandines de série 2 à partir de l'acide arachidonique.

Les phospholipases A₂

Les phospholipases A₂ (PLA₂) constituent une superfamille d'enzymes catalysant l'hydrolyse des phospholipides membranaires en position *sn*-2 et générant ainsi la libération d'un acide gras libre et d'un lysophospholipide (*Figure 46*) (Balsinde et al., 2002), réaction principale associée à la libération de l'AA. Les PLA₂ sont codées par 15 gènes distincts chez les mammifères et sont réparties en 3 classes : les phospholipases sécrétées (sPLA₂), les phospholipases intracellulaires (iPLA₂) et les phospholipases cytosoliques (cPLA₂). Les sPLA₂ hydrolysent les phospholipides membranaires et libèrent l'acide gras. Elles sont exprimées chez l'Homme dans les organes lymphoïdes et le tractus digestif (Abdo et al., 2010). Les iPLA₂ jouent un rôle dans le remodelage des phospholipides et les réparations membranaires et sont exprimées de façon ubiquitaire dans la plupart des cellules et des tissus (Balsinde et al., 2002). Les cPLA₂ sont exprimées de façon ubiquitaire, avec des taux élevés chez l'Homme dans le cerveau, le poumon, les reins, le coeur, la rate, le placenta et le pancréas (Hirabayashi and Shimizu, 2000). Toutes les PLA₂ sont capables de libérer de l'AA. Cependant, la libération d'AA, nécessaire à la synthèse des eicosanoïdes (prostaglandines et thromboxanes), semble être l'activité principale de la cPLA₂.

Les cyclooxygénases

Les cyclo-oxygénases (COX) sont les enzymes catalysant la première étape de la synthèse des eicosanoïdes. Elles portent également le nom de prostaglandine endoperoxyde H synthase. On connaît deux isoformes majeures COX-1 et COX-2 (PGHS-1 et PGHS-2). Un troisième isoforme, COX-3, a été identifié en 2002 mais son rôle reste discuté (Botting, 2000). COX-1 est exprimée de façon constitutive dans la plupart des cellules. COX-1 est impliquée dans la synthèse basale des prostaglandines et participe au maintien de l'homéostasie tissulaire. COX-2 n'est pas exprimée dans tous les tissus, à l'exception du SNC, mais elle est fortement induite sous l'effet de stimuli, notamment l'inflammation (Tanabe and Tohnai, 2002). Il a été montré que COX-1 et COX-2 étaient cytoplasmiques, essentiellement liées à la membrane nucléaire et au réticulum endoplasmique (Smith et al., 2000). Ces enzymes ont une activité catalytique double : cyclo-oxygénase et peroxydase. COX-1 et COX-2 lient l'AA au niveau du site COX du domaine catalytique, où 2 molécules d'oxygène se lient à l'AA pour former l'intermédiaire bicyclique PGG₂. PGG₂ migre ensuite vers le site POX de l'enzyme, plus en surface de la protéine, où il est réduit en PGH₂. Bien que les sites COX des deux enzymes diffèrent, leur affinité pour l'AA est similaire (Smith et al., 2000).

Les prostaglandines E synthases

Les prostaglandines E synthases (PGES) sont les enzymes catalysant la transformation de la PGH_2 en PGE_2 . A ce jour, trois isoformes des PGES ont été identifiées : la prostaglandine E synthase-1 microsomale (mPGES-1), la prostaglandine E synthase-2 microsomale (mPGES-2) et la prostaglandine E synthase cytosolique (cPGES). La mPGES-1, localisée sur la membrane périnucléaire et couplée à COX-2, convertit la PGH_2 en PGE_2 (Jakobsson et al., 1999). Son activité enzymatique requiert la présence du glutathion (GSH) (Murakami et al., 2000; Tanioka et al., 2000) et elle est inductible par des stimuli inflammatoires. La mPGES-2 est couplée à COX-1 et COX-2. Elle fonctionne comme une enzyme cytosolique mais peut-être fonctionnelle lorsqu'elle est liée à une membrane (Murakami et al., 2003). La distribution de cette enzyme varie dans les tissus. Elle est majoritairement retrouvée dans le cerveau, le coeur, le muscle squelettique, les reins et le foie (Tanikawa et al., 2002). La mPGES-2 est exprimée de façon constitutive. Cependant, une expression importante de la mPGES-2 est retrouvée dans les cancers colorectaux humains, dans lesquels mPGES-1 est également augmentée (Murakami et al., 2003). Les modèles murins d'inactivation n'ont pas permis d'établir son rôle physiologique. La cPGES, localisée dans le cytoplasme et au niveau de l'appareil de Golgi (Tanioka et al., 2000), présente une activité dépendante du GSH. L'expression de la cPGES est constitutive et ubiquitaire dans de nombreux tissus et cellules (Tanioka et al., 2000). La localisation cytoplasmique de cPGES permet un couplage préférentiel avec COX-1 dans le réticulum endoplasmique. La génération de modèles murins invalidés pour cPGES n'a pas permis d'élucider le rôle de cPGES dans la mesure où les souris ne sont pas viables après la parturition.

Les prostaglandines D synthases

Les prostaglandines D synthases (PGDS ou PTGDS) sont les enzymes catalysant la transformation de la PGH_2 en PGD_2 . A ce jour, deux isoformes ont été identifiées : la forme hématopoïétique (H-PGDS) et la forme lipocaline (L-PGDS). La H-PGDS est une protéine cytosolique qui produit la PGD_2 à partir de la PGH_2 (Figure 15) (Kanaoka et al., 1997; Urade and Hayaishi, 2000). La H-PGDS requiert obligatoirement le GSH pour sa réaction enzymatique. La H-PGDS est largement distribuée dans les tissus périphériques et est localisée dans les cellules présentatrices d'antigènes, les mastocytes, les lymphocytes Th2 (Kanaoka and Urade, 2003; Tanaka et al., 2000).

Étude bibliographique

La L-PGDS est le premier membre de la famille de gènes des lipocalines (lipophilic ligand-carrier protein) (Beuckmann et al., 2000; Urade and Hayaishi, 2000) à être reconnu comme étant une enzyme. La L-PGDS présente une localisation variée dans les organismes des mammifères. Cette protéine est retrouvée dans le SNC, les organes génitaux mâles, le coeur, dans différentes parties du tractus digestif comme l'estomac ou le côlon (Eguchi et al., 1997; Hokari et al., 2009, 2011; Mase et al., 1999; Urade et al., 1987). La L-PGDS est aussi sécrétée dans de nombreux fluides tels que, le liquide céphalorachidien ou la bile (Baeker et al., 2002; Beuckmann et al., 2000; Mase et al., 1999). La L-PGDS aussi appelée β -trace est une protéine N-glycosylée. La L-PGDS subit des modifications post-traductionnelles (Grünewald et al., 1999; Manya et al., 2000), elle peut être phosphorylée et oxydée au niveau d'une cystéine (Baeker et al., 2002). La L-PGDS présente une double spécificité : c'est une enzyme capable de produire la PGD₂, mais aussi un transporteur lipophile.

Au niveau du SNC, les PGs sont impliquées dans la régulation du sommeil (Urade and Hayaishi, 1999), dans la modulation des neurones catecholaminergiques, serotoninergiques et cholinergiques (Brus et al., 1979; Narumiya et al., 1982) et la régulation de la dopamine. Cependant, elles semblent également impliquées dans des processus pathologiques comme la dépendance aux drogues, la fièvre, l'excitotoxicité, l'épilepsie. Une augmentation de COX-2 est retrouvée chez les patients Parkinsoniens, et des taux élevés de PGE₂, PGF₂ et thromboxane B₂ sont mesurés chez les patients ayant une démence associée au SIDA (Kaufmann et al., 1997a, 1997b).

Les prostaglandines E et F ont également de nombreux effets au niveau du TD (*Tableau IV*).

Étude bibliographique

Physiological Effects	PGEs	PGFs	Prostacycline
Gastric Acid Secretion	Inhibition	No inhibition	Inhibition
Gastric Blood Flow	Stimulation	Variable	Stimulation
Gastric Mucus Secretion	Stimulation	Stimulation	Stimulation
Intestinal Bicarbonate	Stimulation	Unknown	Unknown
Gastric Mucosal Barrier	Active	Unknown	Active
Pancreatic Secretion	Inhibition	Unknown	Unknown
Hepatic Blood Flow	Increase	Unknown	Unknown
Small Intestinal Electrolytes & Water Secretion	Increased	Increased	Increased
Gall Bladder Muscle	Contraction	Contraction	Unknown
Sphincter of Oddi	Relaxation	Unknown	Unknown
Lower Esophageal Sphincter	Relaxation	Contraction	Unknown
Gastric & Intestinal Cytoprotection	Active ^a	Active	Active ^a
Experimental Ulcers	Active	Active	Active

^aThe dosages shown effective in animal cytoprotective studies are well below their gastric antisecretory doses.

Tableau IV: Effets physiologiques des prostaglandines sur l'intestin.
D'après Dajani et al., 2003.

Rôles de la PGE₂

La PGE₂ issue de la transformation de la PGH₂ par les PGES, est produite de façon ubiquitaire. Elle agit après fixation sur des récepteurs membranaires (EP 1 à 4) couplés à des petites protéines G. Malgré une forte affinité pour PGE₂, d'autres PGs peuvent s'y fixer (Breyer, 2001). La PGE₂ est impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques tels que l'ovulation, la résorption osseuse (Suzawa et al., 2000), la sécrétion duodénale de bicarbonate, l'hypertension et la carcinogenèse colique (Ushikubi et al., 2000). Une étude a montré qu'en synergie avec la PGI₂, la PGE₂ avait un rôle dans la restauration des fonctions de la BEI après des lésions, mécanisme médié par une augmentation de l'AMPc et du Ca²⁺, pour la fermeture des jonctions serrées (Blikslager et al., 1997).

Rôles de la PGD₂

La PGD₂ est issue de la transformation de la PGH₂ par les enzymes PGDS et produite de façon ubiquitaire. La PGD₂ se fixe sur deux récepteurs membranaires, DP1 et DP2. Le

récepteur DP1 est couplé aux protéines Gs (Boie et al., 1995) et localisé au niveau des muscles lisses bronchiques, vasculaires, au niveau des plaquettes, des CEI, des fibroblastes et des cellules dendritiques (Pettipher and Hansel, 2008). Le récepteur DP2 ou CRTH2, couplé aux protéines Gi, est exprimé par les lymphocytes Th2, les basophiles, les éosinophiles, les monocytes (Gervais et al., 2001; Pettipher and Hansel, 2008). La PGD₂ possède de nombreux rôles physiologiques dans la réponse allergique, la régulation du sommeil, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la relaxation des muscles lisses, la perméabilité vasculaire, la bronchoconstriction et l'attraction des cellules immunitaires (Beasley et al., 1988; Hardy et al., 1984; Kanaoka and Urade, 2003; Monneret et al., 2001) mais également un rôle dans la physiopathologie du tube digestif.

Les dérivés de la PGD₂ : la 15dPGJ₂ et le (9 α ,) 11 β PGF₂ α

La PGD₂ va subir une série de réactions non-enzymatiques donnant lieu à la formation de dérivés (Figure 47) (Scher et Pillinger, 2005).

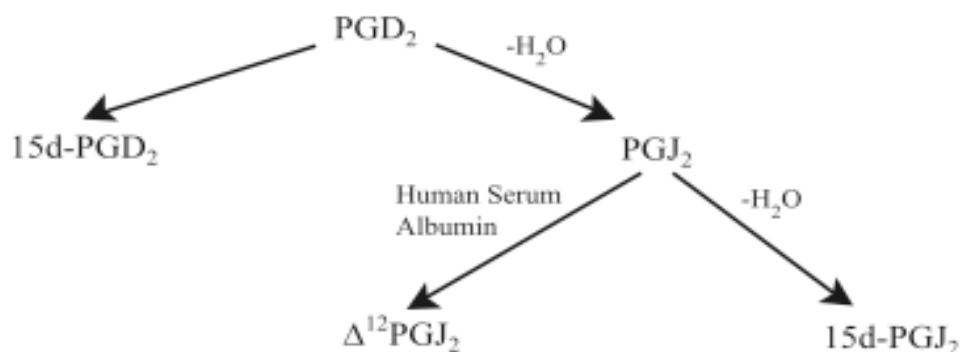


Figure 47: Synthèse des dérivés de la PGD₂. D'après Scher & Pillinger, 2005.

Ces réactions vont donner lieu notamment à la formation de la PGJ₂ produite à partir de la déshydratation de la PGD₂. En présence d'albumine, la PGJ₂ subit une nouvelle dérivation en Δ^{12} -PGJ₂. En revanche, en absence d'albumine, une nouvelle déshydratation de la PGJ₂ entraîne la perte de deux groupes hydroxyles et la migration de la double liaison en position 12-14. Cette réaction aboutit à la formation de la 15deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J₂ (15dPGJ₂) (Kikawa and Narumiya, 1984; Shibata et al., 2002). La 15dPGJ₂ appartient à la famille des PG mais possède des propriétés biologiques différentes en raison de la présence des groupements électrophiles qui vont réagir avec des composés nucléophiles cellulaires comme les groupements thiols des cystéines (Scher and Pillinger, 2005).

La PGD_2 est rapidement métabolisée et subit des réactions enzymatiques donnant lieu à la formation de son dérivé primaire, le $9\alpha,11\beta\text{-PGF}_2\alpha$ ou $11\beta\text{-PGF}_2\alpha$ (Figure 48). Certaines enzymes de la voie des prostaglandines sont des aldo-ketoreductases. Cette famille se divise en deux superfamilles AKR1B (aldo-réductases) et AKR1C (kétoréductases) dont cinq membres ont été identifiés chez l'Homme, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2 et AKR1C3 (Rizner, 2012). Ces enzymes sont associées au développement de nombreux cancers humains comme le cancer du foie, du sein, des ovaires, du col de l'utérus (Alexiou et al., 2009) et au développement du diabète (Ramana, 2011; Srivastava et al., 2011; Tammali et al., 2011).

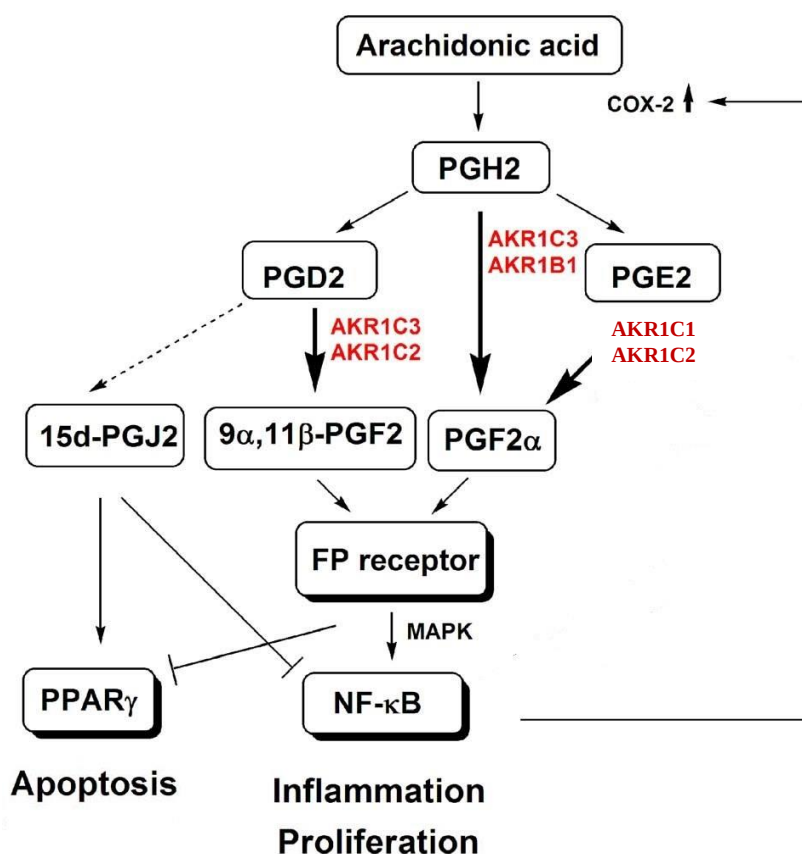


Figure 48: Implication des enzymes AKR1B et AKR1C dans la biosynthèse des prostaglandines et des dérivés de la PGD_2 et leurs voies d'action.

AKR1C3 et AKR1B1 convertissent la PGH_2 en $\text{PGF}_2\alpha$ tandis que AKR1C3 et AKR1C2 convertissent la PGD_2 en $9\alpha,11\beta\text{-PGF}_2$. Ces deux prostaglandines activent le récepteur FP qui active à son tour la voie des MAPKs (mitogen-activated protein kinase) et NF κB . De plus, la voie MAPK inactive PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) qui contrôle la croissance cellulaire. En réduisant la PGD_2 en $9\alpha,11\beta\text{-PGF}_2$, AKR1C3 et AKR1C2 préviennent la formation non-enzymatique du dérivé pro-apoptotique 15-d-PGJ_2 qui active PPAR γ et inactive NF κB . D'après Rizner, 2012.

AKR1B1 catalyse la peroxydation des lipides notamment la réduction des conjugués GSH (Barski et al., 2008; Kabututu et al., 2009) et agit comme une PG synthase en convertissant PGH_2 en $\text{PGF}_2\alpha$ (Bresson et al., 2011). AKR1B1 est impliquée dans les voies de l'inflammation puisqu'en réduisant les conjugués GSH des aldéhydes, elle stimule indirectement la voie NF κ B qui conduit à la production de médiateurs inflammatoires comme COX-2 (Barski et al., 2008; Ramana, 2011). Cette voie est également activée par la fixation de $\text{PGF}_2\alpha$ à son récepteur FP induisant les voies MAPK. Les AKR1C régulent l'activité des androgènes, oestrogènes, progestérones ainsi que leurs récepteurs et sont notamment impliqués dans les maladies utérines (Penning et al., 2000; Steckelbroeck et al., 2004). AKR1C3 catalyse la formation de $\text{PGF}_2\alpha$ à partir de PGH_2 et de $9\alpha,11\beta\text{-PGF}_2$ à partir de PGD_2 ce qui prévient la formation du dérivé pro-apoptotique 15dPGJ_2 (Byrns et al., 2011). AKR1C1 et AKR1C2 convertissent la PGE_2 en $\text{PGF}_2\alpha$ et AKR1C2 a une faible activité 11-kétoréductase qui réduit PGD_2 en $9\alpha,11\beta\text{-PGF}_2$ (Dozier et al., 2009).

Rôles de la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandine J_2

La 15dPGJ_2 agit de façon autocrine et/ou paracrine mais à l'inverse des autres PGs, n'a aucun récepteur spécifique identifié. Certaines études ont montré que la 15d-PGJ_2 pouvait se lier au récepteur DP2 des éosinophiles, et induire une augmentation du taux de calcium intracellulaire (Monneret et al., 2002). D'autres études ont montré que l'activité de la 15d-PGJ_2 était principalement liée aux liaisons covalentes formées avec des cibles intracellulaires (Figure 19). Ainsi, après son passage au travers de la membrane plasmique par diffusion ou par le biais de transporteurs comme le transporteur aux PGs (PGT) ou le transporteur MOAT (Mediated Organic Anion Transport) (Narumiya and Fukushima, 1986; Scher and Pillinger, 2005), la 15dPGJ_2 va se lier à des facteurs de transcription (Straus and Glass, 2001) ou d'autres protéines qui vont moduler différentes voies de signalisation comme les voies NF κ B, AP-1 (Activator Protein 1), Nrf-2 (NF-E2 Related Factor), PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ), HIF-1 (Hypoxia Inductible Factor 1), p53 ou encore STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) (Figure 49). Ainsi, selon la voie activée, la 15dPGJ_2 peut avoir différents effets (Kim and Surh, 2006).

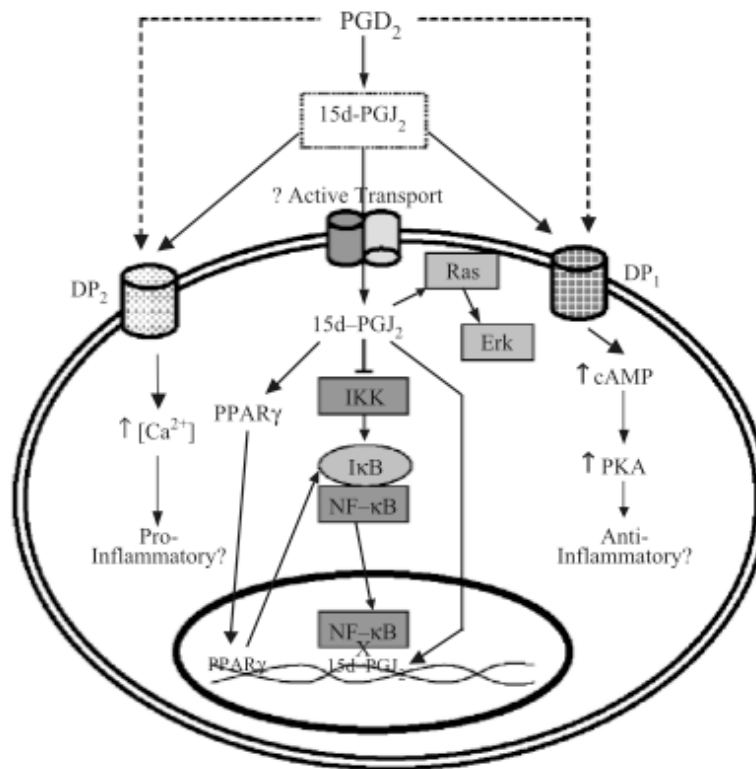


Figure 49: Voies de signalisation de la 15d-PGJ₂.

La 15dPGJ₂ n'a pas de récepteur spécifique. Elle peut se fixer sur les récepteurs DP ou des protéines intracellulaires comme des protéines G (Ras), NFκB ou PPARγ. La fixation sur DP2 augmente le calcium intracellulaire, tandis que DP1 augmente l'AMPcyclique ce qui augmente l'activité de la PKA. La 15dPGJ₂ active PPARγ qui se transloque dans le noyau et va se fixer sur l'ADN pour induire la transcription de gènes. Elle inhibe IKKβ et donc l'activité de NFκB soit la transcription de gènes pro-inflammatoires. D'après Scher et Pillinger, 2005.

La 15dPGJ₂ induit un effet anti-inflammatoire par l'inhibition de la voie STAT en diminuant son activité transcriptionnelle et sa fixation sur l'ADN. Il en est de même pour le facteur HIF-1. La 15dPGJ₂ peut également se lier à p53, qui s'accumule dans le noyau où p53 après phosphorylation et fixation sur l'ADN va induire l'apoptose (Kim and Surh, 2006). De plus, la 15dPGJ₂ peut avoir des effets anti-inflammatoires en inhibant les facteurs de transcription NFκB ou AP-1 associés à des gènes pro-inflammatoires. Ainsi, la 15dPGJ₂ peut se fixer à la sous-unité IKKβ ou d'autres sous-unités du complexe NFκB pour en inhiber l'activité. De la même manière, la 15dPGJ₂ peut interagir avec AP-1 en se fixant à la protéine c-Jun, ce qui diminue l'activité transcriptionnelle d'AP-1 et sa fixation sur l'ADN (Figure 50). Ce rôle anti-inflammatoire de la 15dPGJ₂ explique son implication dans différentes situations pathologiques associées à une inflammation comme l'ischémie (Cuzzocrea et al., 2003a), les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) et la maladie d'Alzheimer (Combs et al., 2000).

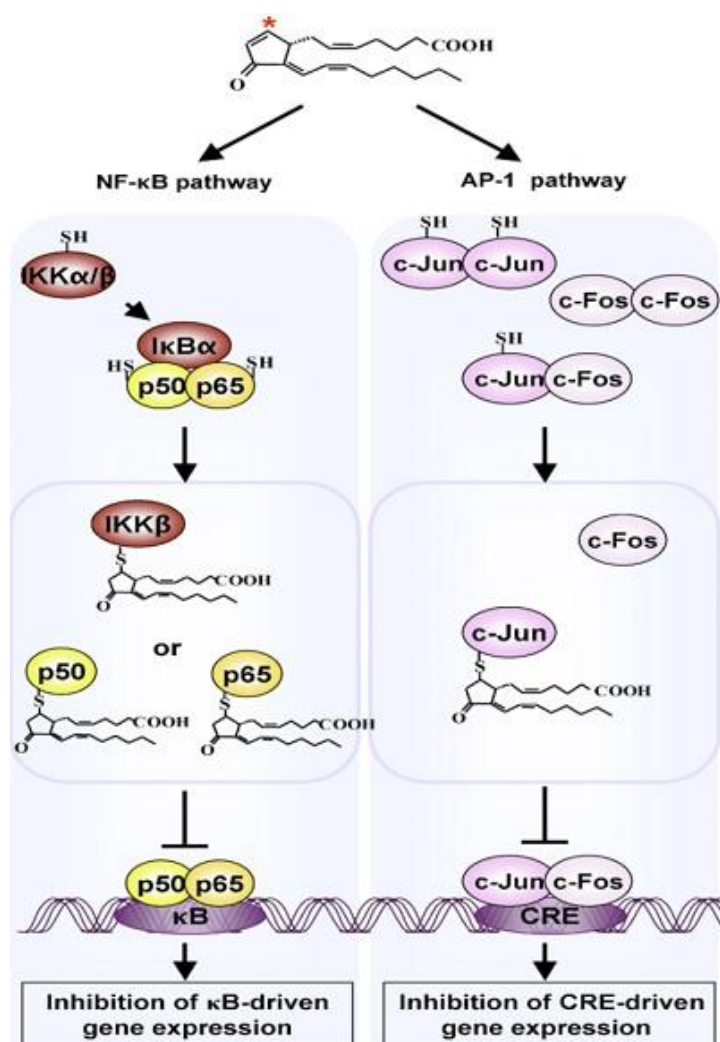


Figure 50: Mécanismes de modulation des voies NFκB et AP-1 par la 15d-PGJ₂.
D'après Kim & Surh, 2006.

Cependant, les deux cibles principales de la 15dPGJ₂ sont le facteur de transcription Nrf2 (NF-E2 related factor 2) et le récepteur nucléaire PPARγ.

Voie PPARγ

Le récepteur PPARγ a été découvert dans les années 90 pour son rôle dans le métabolisme des lipides, son expression dans le tissu adipeux et son implication dans la régulation de la résistance à l'insuline (Zhu et al., 1993). La 15dPGJ₂ a été démontrée comme étant un ligand naturel de PPARγ en 1995 (Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995). Ainsi, une grande partie des fonctions de la 15dPGJ₂ serait médiée par l'activation de PPARγ (Cuzzocrea et al., 2003b; Kim and Surh, 2006; Muñoz et al., 2005; Yuan et al., 2005) (Figure 51).

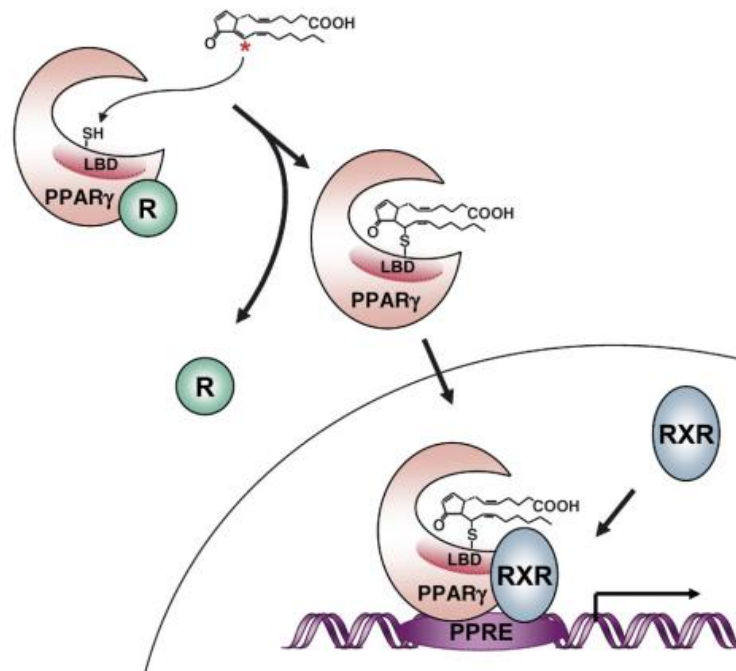


Figure 51: Mécanisme d'activation de PPAR γ par la 15dPGJ $_2$.

La 15dPGJ $_2$ se lie à la cystéine 285 du domaine de liaison (LBD) de PPAR γ . Une fois libéré de son co-répresseur (R), le complexe 15dPGJ $_2$ -PPAR γ est transloqué dans le noyau et forme un hétérodimère avec le récepteur nucléaire RXR (retinoid X receptor). Cet hétérodimère reconnaît des éléments de réponse PPRE et sa fixation active la transcription de gènes cibles. D'après Kim et Surh 2006.

Le gène PPAR γ est localisé sur le chromosome 6 chez l'homme (Greene et al., 1995; Sher et al., 1993) et son épissage alternatif conduit à la formation de quatre isoformes, PPAR γ 1 à 4 (Fajas et al., 1997). PPAR γ 1 est l'isoforme prédominant dans le côlon, PPAR γ 3 est présent en plus faible quantité et PPAR γ 2 n'est pas détecté dans la muqueuse colique (Gupta and Dubois, 2002). Les plus hauts niveaux d'expression de PPAR γ sont retrouvés dans le tissu adipeux et le côlon (Dubuquoy et al., 2000), des niveaux intermédiaires sont retrouvés dans les reins, le foie, le coeur, l'intestin grêle (Guan et al., 1997; Vidal-Puig et al., 1997), la prostate (Mueller et al., 2000), les macrophages (Willson et al., 2000) et de faibles quantités de PPAR γ sont détectées dans le muscle squelettique (Fajas et al., 1997). Au sein du côlon, l'expression majeure de PPAR γ siège dans les cellules épithéliales différenciées avec une expression croissante du fond des cryptes vers leur sommet. Il a été montré aussi que les niveaux de PPAR γ augmentaient du segment colique proximal vers le segment distal (Lefebvre et al., 1999). Enfin, PPAR γ est aussi exprimé au niveau des neurones des plexus myentérique et sous-muqueux (Cluny et al., 2009).

Étude bibliographique

Parmi les ligands naturels de PPAR γ se trouvent de nombreux acides gras polyinsaturés (acide linoléique, arachidonique) et des dérivés d'eicosanoïdes qui lient et activent le récepteur à des concentrations de l'ordre du micromolaire, équivalentes à celles retrouvées dans le sérum humain (Tableau V). Malgré des effets indépendants de PPAR γ , 15dPGJ₂ est le ligand naturel de PPAR γ le plus utilisé dans les études. Les drogues de la famille des thiazolidinediones (TZD) sont des ligands spécifiques de PPAR γ (Lehmann et al., 1995; Spiegelman, 1998). D'autres ligands synthétiques ont été développés tel que le GW7845 (Alarcón de la Lastra et al., 2004).

Modulators	EC50/Ki	Plasma concentration	Sources	Effects in colon through PPAR γ
PUFAs ⁴¹				
Omega 3				
α -linolenic acid	ND	0.27 mM	High fat fish, marine mammals, milk	ND
γ -linolenic acid	ND		High fat fish, marine mammals, milk	ND
Eicosapentaenoic acid	ND	1.01 mM	High fat fish, marine mammals, milk	ND
Docohexanoic acid	ND	3.54 mM	High fat fish, marine mammals, milk	ND
Omega 6				
Linoleic acid	~10 μ M	21.45 mM	Meats, eggs, milk, vegetable oils	ND
Dihomo- γ -linolenic acid	ND	3.06 mM	Meats, eggs, milk, vegetable oils	ND
Arachidonic acid	ND	11.36 mM	Meats, eggs, milk, vegetable oils	ND
Omega 9				
Palmitoleic acid	ND		Rapeseed	ND
Oleic acid	ND		Olive oil	ND
Derivatives				
Conjugated linoleic acid ⁴²	ND	—	Milk, meat, seeds	Yes
Nitrolinoleic acid ⁴³	~133 nM	500 nM	Endogenous	ND
Nitrooleic acid ⁴⁴	~100 nM	619 nM	Endogenous	ND
Eicosanoids ⁴¹				
8S-hydroxyeicosapentaenoic acid	ND	—	Endogenous	ND
12-hydroxyeicosatetraenoic acid	ND	—	Endogenous	ND
15-hydroxyeicosatetraenoic acid	ND	—	Endogenous	ND
9-hydroxyoctadecadienoic acid	ND	—	Endogenous	ND
13-hydroxyoctadecadienoic acid	ND	—	Endogenous	ND
15dPGJ ₂ ⁴⁵	1 μ M/—	—	Endogenous	Yes
Miscellaneous				
Swietenia mahagony extract ⁴⁶	50 μ g/l	—	S mahagony	ND
Lysophosphatidic acid ⁴⁷	2 μ M	5–25 μ M	Platelets	ND
9-tetrahydrocannabinol ⁴⁸	ND	—	Cannabis sativa	ND
Soy isoflavone ⁴⁹	ND	—	Soy	ND

15dPGJ₂, 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J₂; ND, not determined; PUFAs, polyunsaturated fatty acids.

TableauV: Affinité et rôle physiologique des ligands naturels de PPAR γ .

D'après Dubuquoy et al., 2006.

Enfin, certains anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont capables de se lier et d'activer PPAR γ à de fortes concentrations. Il s'agit de l'indométhacine, de l'ibuprofène, du fénoprophène et de l'acide fuflenamique (Lehmann et al., 1997) (Tableau VI). En plus de la spécificité des PPARs vis-à-vis du ligand, PPAR γ possède un site de transactivation AF-1 indépendant du ligand pouvant être phosphorylé par la voie MAPK sur des résidus sérine et modulant ainsi l'activité du récepteur.

Étude bibliographique

Modulators	EC50/Ki	Effects in colon through PPAR γ
Glitazones		
Rosiglitazone ⁴⁵	89 nM/8 nM	Yes
Ciglitazone ⁵⁷	3 μ M/–	ND
Troglitazone ⁴⁵	0.54 μ M/474 nM	Yes
Pioglitazone ⁴⁵	0.59 μ M/364 nM	Yes
Netoglitazone (MCC-555) ⁵⁸	8 μ M/–	ND
Glitazars		
Muraglitazar ⁵⁹	110 nM/–	ND
Tesaglitazar ⁴⁰	0.25 μ M/18 nM	ND
Farglitazar ⁶¹	0.0034 μ M/–	ND
Ragaglitazar ⁶²	2.1 μ M/–	ND
NSAIDs ⁶⁴		
Indomethacin	40 μ M/–	ND
Flufenamic acid	ND	ND
Fenoprofen	ND	ND
Ibuprofen	ND	ND
L-Tyrosine derived compounds		
FMOC-L-Leu ⁶³	–/15 μ M	Yes
Miscellaneous		
5-ASA ⁶⁴	–/28.7 mM	Yes
CDDO ⁶⁵	–/310 nM	Yes
COOH ⁶⁶	ND	ND
Triphenyltin ⁶⁷	95 nM/–	ND
BADGE ⁶⁸	ND	ND

5-ASA, 5-aminosalicylic acid; BADGE, bisphenol A diglycidyl ether; CDDO, 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid; COOH, 2-[2-(4-phenoxy-2-propylphenoxy) ethyl]indole-5-acetic acid; FMOC-L-Leu, fluorenylmethyloxycarbonyl-L-leucine; ND, not determined.

Tableau VI: Affinité et fonctions intestinales des ligands synthétiques de PPAR γ .

D'après Dubuquoy et al., 2006.

PPAR γ régule l'expression de ses gènes cibles en formant des hétérodimères avec les RXR α (Retinoid X Receptor α) qui se lient à des séquences spécifiques de l'ADN, des PPRES (Peroxisome Proliferator Responsive Element) (Kliwer et al., 1992; Tugwood et al., 1992). Cela jouerait un rôle central dans la régulation des voies de signalisation de l'inflammation en agissant sur des kinases et des facteurs de transcription comme NF κ B, c-jun, c-fos, NFAT (Nuclear Factor of Activated T cell) et en inhibant la production mucoale de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α , IFN γ), de chimiokines, la prolifération et l'expression de certaines molécules d'adhésion (VCAM-1) (Desreumaux et al., 2001; Jackson et al., 1999; Marx et al., 2000; Su et al., 1999; Yang et al., 2000) (Figure 52). PPAR γ agit selon deux types d'activités transcriptionnelles. La première est une liaison de l'hétérodimère PPAR-RXR à l'ADN en présence d'un ligand, ce qui active la transcription du gène cible (Murphy and Holder, 2000). La seconde c'est que PPAR γ est capable de réguler négativement la transcription de gènes par transrépression. Cette activité serait responsable des effets anti-inflammatoires de PPAR γ .

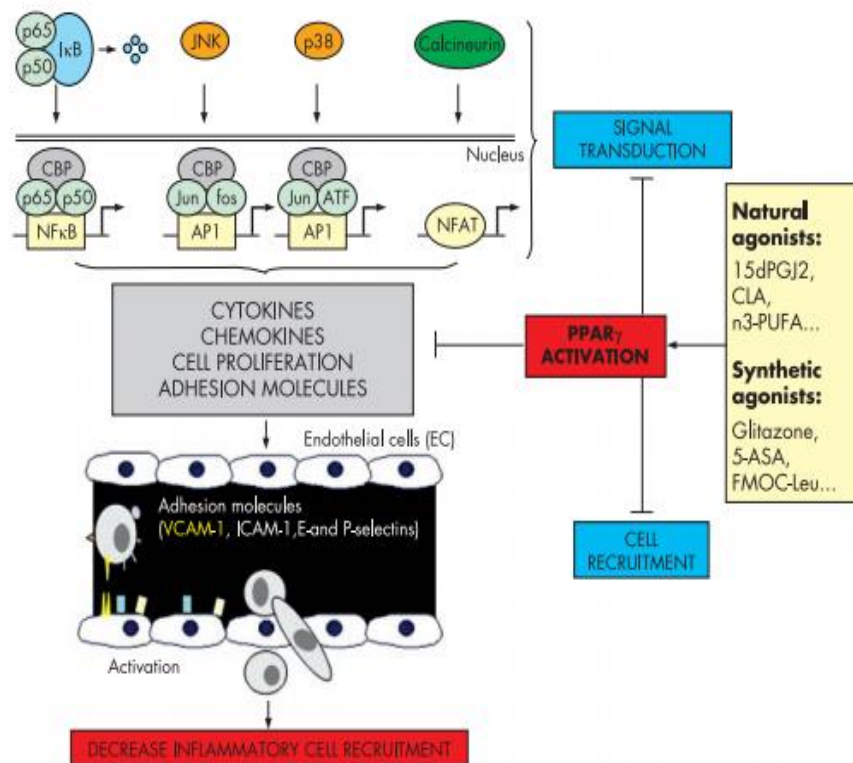


Figure 52: Le récepteur PPAR γ interfère avec les voies de signalisation de l'inflammation. PPAR γ inhibe la voie NF κ B par des interactions avec I κ B et CBP, un co-activateur de p65. La voie MAPK est aussi régulée par PPAR γ par une réduction de l'activation de JNK et p38 et une inhibition des facteurs de transcription c-jun, c-fos et NFAT (nuclear factor of activated T cell). La régulation de ces voies résulte en une inhibition de la production de cytokines et de chimiokines, de la prolifération cellulaire, de l'expression de molécules d'adhésion (comme VCAM-1) ce qui réduit le recrutement cellulaire sur les sites inflammatoires des tissus. D'après Dubuquoy et al, 2006

Des études ont suggéré que PPAR γ était un inhibiteur clé de l'inflammation colique. Dans les cellules épithéliales coliques, la transrépression des facteurs de transcription comme NF- κ B, AP-1 et STAT1 codant pour des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, le TNF α ou l'IFN γ serait à l'origine de l'effet anti-inflammatoire de PPAR γ . L'action inhibitrice de PPAR γ sur AP-1 pourrait être la conséquence de l'interaction directe du récepteur avec c-jun (Delerive et al., 1999). PPAR γ est aussi capable d'inhiber la transcription induite par NF- κ B en interagissant physiquement avec les sous unités p50 et p65, activant la première et inhibant la seconde (Bassaganya-Riera, 2002; Chung et al., 2000). Dans les cellules endothéliales vasculaires, la troglitazone inhibe la phosphorylation de p65 induite par le TNF α (Sasaki et al., 2005). Enfin, une étude a suggéré un modèle pour l'inhibition de l'expression de la iNOS : PPAR γ réprimerait les activités transcriptionnelles de STAT1, AP-1 et NF- κ B en interagissant directement avec le co-activateur de transcription CBP (CREB Binding Protein), établissant des ponts avec des co-répresseurs comme SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator A) (Li et al., 2000) (Figure 53).

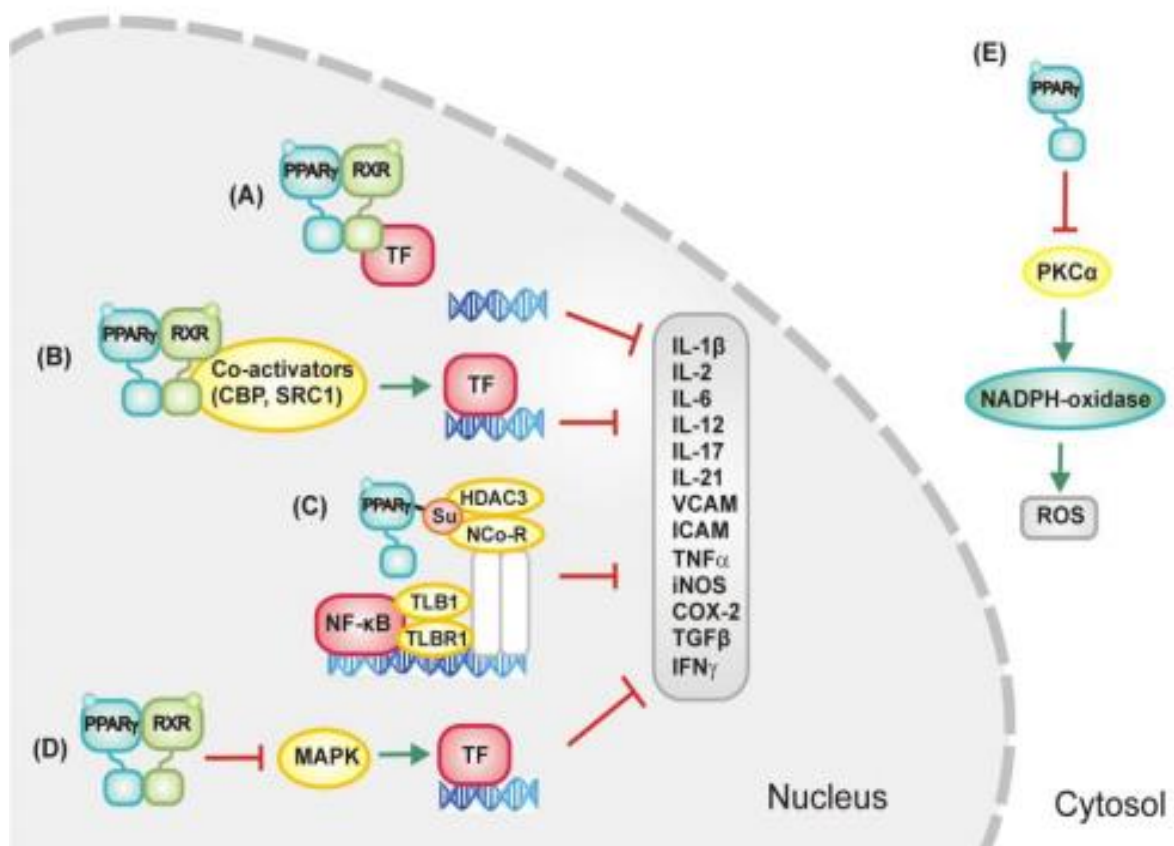


Figure 53: Mécanisme d'inhibition de l'expression des gènes pro-inflammatoires par PPARγ

En réponse à la fixation d'un agoniste, PPARγ forme un hétérodimère avec RXR. Cet hétérodimère peut (A) directement s'associer aux facteurs de transcription (TF) comme NFκB, STAT et AP-1 et empêcher l'expression des gènes pro-inflammatoires ; (B) séquestrer les co-activateurs transcriptionnels des facteurs de TF, comme CBP et SRC-1, qui augmentent l'expression des gènes pro-inflammatoires. (C) En réponse à sa SUMOylation (Su), PPARγ inhibe la dégradation par le protéasome du complexe NCoR/HDAC3/TLB1/TLBR1 qui permet l'expression des gènes pro-inflammatoires via NFκB. (D) Outre ces trois mécanismes de transrépression, PPARγ inhibe les MAPKs pour diminuer la cascade de signalisation nécessaire à l'induction de l'expression des gènes pro-inflammatoires. (E) Enfin, il est suggéré que PPARγ inhiberait la translocation de la PKCα, ce qui réduirait l'activation de la NADPH oxidase. D'après Schmidt et al., 2010.

Des études *in vitro* ont montré que l'activation de PPARγ induisait un arrêt du cycle cellulaire en modulant des cyclines (p21 et p27 ; (Yoshizumi et al., 2004) ou réduisait l'expression de la cycline D1 essentielle pour l'entrée dans le cycle cellulaire mais également le récepteur à l'EGF, ces deux gènes étant retrouvés surexprimés au cours des cancers colorectaux (Chen and Xu, 2005). D'un autre côté, les agonistes de PPARγ augmenteraient la différenciation cellulaire en augmentant l'expression de marqueurs de différenciation comme l'ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire), les cytokératines 18, 19 et 20, la villine et la phosphatase alcaline (Kitamura et al., 1999; Sarraf et al., 1998) et en inhibant les gènes de maturation comme RegIA (Regenerating gene IA). Plus récemment, il a été suggéré que PPARγ pouvait jouer un rôle dans le développement du SNC (Wada and Kamisaki, 2003),

qu'il pouvait induire la prolifération, la migration et la différenciation des cellules souches neurales via les voies Wnt ou STAT3 (Cimini and Cerù, 2008) ou qu'il protégeait les neurones du SNC d'un stress oxydant généré par une ischémie ou une épilepsie (Pei et al., 2010; Yu et al., 2008).

Voie Nrf2 (Nuclear factor-E2 related factor 2)

Le facteur de transcription Nrf2 est l'autre cible intracellulaire privilégiée de la 15dPGJ₂. Nrf2, découvert en 1994, est connu pour son rôle dans l'activation des gènes anti-oxydants (Moi et al., 1994). L'activité Nrf2 est régulée en partie par la protéine cytoplasmique inhibitrice Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) qui maintient le facteur dans le cytoplasme (Itoh et al., 1999a). L'activité transcriptionnelle de Nrf2 peut être directement augmentée par différentes molécules dérivées des PGs, comme la 15dPGJ₂ qui se lie de façon covalente à Keap1 afin de libérer Nrf2 et permettre sa translocation dans le noyau (Itoh et al., 2004; Levonen et al., 2004) (Figure 54).

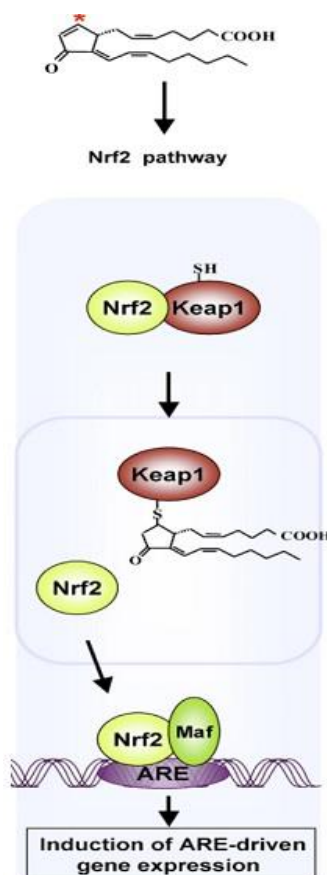


Figure 54: Mécanisme d'activation de Nrf2 par la 15d-PGJ₂.

La fixation de la 15dPGJ₂ sur Keap1 empêche sa fixation avec Nrf2. Par conséquent, Nrf2 n'est pas dégradé et se fixe sur l'élément de réponse ARE afin d'activer l'expression des gènes cibles. D'après Kim et Surh, 2006.

Le gène codant pour Nrf2, NFE2L2 chez l'homme, appartient à une famille de gènes codant pour les facteurs de transcription « base leucine zipper » (bZIP) (Chan et al., 1995). La capacité de Nrf2 à se fixer à l'ADN est influencée par les conditions redox, l'oxydation de résidus cystéines inhibant sa liaison. L'activation de Nrf2 se fait par son association en hétérodimère avec l'un des trois membres de la famille des petites Maf (MafF, MafG, ou MafK) pour former la forme active du facteur de transcription (Kobayashi and Yamamoto, 2006). Ce complexe se lie alors à des sites de reconnaissance sur l'ADN des gènes cibles appelés ARE (Antioxidant Responsive Elements) ou encore EpRE (Electrophile Response Element). Nrf2 régule ainsi des gènes codant des protéines chaperones ou des protéines impliquées dans les fonctions anti-oxydantes, dans la protéolyse dépendante de l'ubiquitine, dans la croissance cellulaire et l'apoptose (Lee et al., 2003; McMahon et al., 2003). L'absence de Nrf2 exacerbe la sensibilité au stress oxydant sans altérer le développement embryonnaire de la souris (Cho et al., 2002; Enomoto et al., 2001; Yoh et al., 2001).

Nrf2 a été identifié dans des cellules érythroïdes, des progéniteurs hématopoïétiques et des mastocytes mais elle est exprimée de manière ubiquitaire dans de nombreux tissus avec les concentrations les plus élevées (par ordre décroissant) dans les reins, les muscles, les poumons, le coeur, le foie et le cerveau. Nrf2 est constitutivement activé mais son activité peut être augmentée par des substances chimiques comme le resvératrol et des substances endogènes comme le NO et la 15dPGJ₂, aux propriétés électrophiles (Dhakshinamoorthy and Porter, 2004; Itoh et al., 2004; Kawamoto, 2000). A l'inverse, Nrf2 peut être réprimé par la protéine Keap1 qui le séquestre dans le cytoplasme (Itoh et al., 1999b) ou par sa liaison à un complexe d'ubiquitinylation E3 ligase composé entre autre de Keap1 qui va induire sa dégradation par le protéasome (Cullinan et al., 2004; McMahon et al., 2003; Nguyen et al., 2003; Zhang and Gordon, 2004).

Rôles du 11 β PGF₂ α

La PGD₂ et ses dérivés sont impliqués dans les réponses asthmatiques aux allergènes, à l'aspirine ou à l'exercice (Baek et al., 2013; Bochenek, 2004; O'Sullivan et al., 1998; Sullivan and Dahlen, 1996). Les principaux marqueurs sont le 9 α ,11 β PGF₂ α et le leukotriène E4 (Misso et al., 2004). La PGD₂, produite par les mastocytes durant la réponse allergique et son métabolite, le 9 α ,11 β PGF₂ α , sont des agonistes contractiles potentiels pour les voies

aériennes (Beasley et al., 1987). Peu d'études se sont intéressées au $11\beta\text{PGF}_2\alpha$ et les données connues concernent principalement l'allergie. Ainsi, les patients développant de l'asthme dû aux sulfites après une consommation de vin présentent une augmentation des concentrations urinaires en $11\beta\text{PGF}_2\alpha$ (Misso et al., 2009) tout comme les enfants asthmatiques après l'effort (Nagakura et al., 1998). Après présentation de l'allergène, la libération de $11\beta\text{PGF}_2\alpha$ est augmentée dans le plasma des patients asthmatiques. Ainsi, le $11\beta\text{PGF}_2\alpha$ est considéré comme un marqueur de l'augmentation de la synthèse de PGD_2 et probablement de l'activation des mastocytes (Bochenek, 2004). Le $11\beta\text{PGF}_2\alpha$ est présent dans le liquide amniotique humain et est up-régulé par les composants bactériens et des cytokines pro-inflammatoires, suggérant son rôle dans les mécanismes de l'accouchement (Mitchell et al., 2005). Une autre étude a montré que le $11\beta\text{PGF}_2\alpha$ et son stéréoisomère, le $\text{PGF}_2\alpha$, sont des agonistes du récepteur chimioattractant DP2 (CRTH2) (Sandig et al., 2006).

III.1.3.3 Les acides hydroxyeicosatetraénoïques

Nous n'aborderons pas la voie de synthèse des leucotriènes issus de la transformation de l'acide arachidonique par la 5-lipoxygénase (5-LOX) à l'origine des leucotriènes B₄, C₄, D₄ et E₄ dont les rôles chimiotactiques ou dans l'allergie sont connus. Nous nous intéresserons dans cette partie aux acides hydroxyeicosatetraénoïques (5-, 8-, 12- et 15-HETE) et plus particulièrement au 15-HETE.

Le 15-HETE est synthétisé à partir de l'acide arachidonique par l'activité des lipoxygénases 15-LOX-1 et 15-LOX-2. La 15-LOX-1 est principalement exprimée par les réticulocytes, les éosinophiles, les macrophages et les cellules épithéliales de la peau et intestinales (Lu et al., 2012) tandis que l'expression de la 15-LOX-2 est décrite dans la peau, la cornée, les poumons, la prostate, les macrophages, les oligodendrocytes et dans la microglie (Brash et al., 1997; Danielsson et al., 2008; Haynes and van Leyen, 2013). La 15-LOX-1 est associée à des effets bénéfiques anti-tumorigéniques dans les cancers colorectaux, mais est également corrélée à la taille de plaques d'athérome, au remodelage et à l'angiogénèse vasculaire observés au cours de l'hypertension pulmonaire (Ma et al., 2011a; Shureiqi et al., 2005; Zuo et al., 2012). Dans un modèle de souris qui développe spontanément des plaques d'athéromes, l'inactivation du gène *Alox15B* codant pour la 15-LOX-2 entraîne une diminution des lipides contenus dans les plaques d'athérome (Magnusson et al., 2012).

Le 15-HETE n'a pas de récepteur spécifique identifié mais on sait toutefois qu'il peut se fixer au récepteur TRPV1 (transient receptor potential vanilloid subfamily member 1) dans l'hypertonie (Koskela et al., 2012). De plus, le 15-HETE peut activer NFκB et les voies de signalisation Src et ERKs (Hsi et al., 2002; Prato et al., 2010; Singh et al., 2011; Zhao et al., 2011) et inhiber les COX. Il peut être un ligand endogène de PPARγ notamment dans la prostate, où la perte d'expression de 15-LOX2 pourrait contribuer à l'augmentation de la prolifération et à la diminution de la différenciation concourant au développement d'un carcinome (Shappell et al., 2001). Le 15-HETE régule la mitogenèse des lymphocytes, favorise la néo-vascularisation et stimule la migration des cellules endothéliales (Riehl et al., 1990). Sa production est augmentée en cas d'hypoxie et conduit à la fibrose via p38 et le TGFβ1 ainsi qu'au remodelage vasculaire via la voie ROCK (Ma et al., 2011a; Zhang et al., 2014). Le 15-HETE entraîne aussi l'agrégation plaquettaire et augmente l'adhésion des monocytes et des macrophages ainsi que la perméabilité endothéliale (Kundumani-Sridharan et al., 2013). En revanche, le rôle du 15-HETE dans les fonctions de la BEI est inconnu.

III.2 L'inflammation pathologique : l'exemple des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI)

Lorsque l'inflammation persiste, elle devient délétère. C'est le cas lors de certaines infections ou au cours des MICI où une activation excessive du système immunitaire est constatée.

Il existe plusieurs formes cliniques d'inflammation :

-l'inflammation aiguë: elle peut-être congestive (coups de soleil), hémorragique (grippe maligne), oedémateuse (œdème de Quincke), fibrineuse (péricardite), purulente, ou nécrosante et gangréneuse (sténose, diabète, certaines bactéries ou traumatismes violents)

-l'inflammation subaiguë: elle est caractérisée par des granulomes (rhumatisme articulaire, la goutte, la sarcoïdose, syphilis)

-l'inflammation chronique: elle est caractérisée par de la fibrose soit importante qui empêche le fonctionnement correct de l'organe (cirrhose) soit légère avec des granulomes épithélioïdes (MICI).

III.2.1 Caractéristiques générales des MICI

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) incluent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH).

III.2.1.1 Historique

Déjà dans la Rome antique, les travaux de deux médecins, Soranus et Aretaeus, décrivaient la survenue de formes diarrhéiques non contagieuses fréquentes suggérant une RCH. D'autres données suggèrent qu'au XVII^e siècle, Louis XIII serait décédé des suites de coliques et de vomissements probablement imputables à une MC. Cependant, la description des MICI est plus récente. Ainsi, la RCH a été mise en évidence par Sir Samuel Wilks en 1859 chez une femme âgée de 42 ans décédée des suites de diarrhée chronique et fièvre, tandis que la MC n'a été officiellement décrite qu'en 1932 par le docteur Burril B. Crohn, médecin Américain, dans « Journal of the American Medical Association » (Crohn et al., 1932).

III.2.1.2 Définition

Les MICI sont des affections inflammatoires chroniques du TD évoluant par poussées successives entrecoupées de phases de rémission clinique asymptomatique. La MC est caractérisée par une inflammation transmurale discontinue de la paroi intestinale pouvant affecter tous les segments du TD avec une prédominance pour la région iléo-caecale (40% des cas) (Marteau and Jian, 2001; Kirsner, 2001; Levy, 2009; Xavier and Podolsky, 2007; De Saussure and Bouhnik, 2007). La RCH est caractérisée par une inflammation mucosale continue du côlon et du rectum (De Dombal et al., 1968; Faharat et al., 1999; Kirsner, 2001; Levy, 2009).

III.2.1.3 Signes cliniques et complications

De manière générale, les MICI n'affectent pas l'espérance de vie des patients mais altèrent leur qualité de vie avec de nombreuses complications. Elles ont un retentissement important dans la vie sociale et professionnelle, car si elles n'augmentent pas la mortalité, elles présentent une morbidité élevée avec une survenue précoce, des effets secondaires lourds et un risque accru de développer d'autres pathologies comme le cancer colorectal.

Les signes cliniques sont : une diarrhée chronique, des douleurs abdominales, des rectorragies, des manifestations ano-périnéales spécifiques de la MC (fissures, fistules, ulcérations) et des lésions extra-digestives (ostéo-articulaires, hépato-biliaires, oculaires, et cutanées). Des sténoses du grêle (pouvant se traduire cliniquement par un syndrome de Koenig) et du côlon peuvent survenir après quelques années d'évolution de la maladie inflammatoire. Elles peuvent se compliquer d'occlusions, de fistules puis d'abcès. La colectasie compliquée de perforation est une complication devenue rare mais pouvant mettre en jeu le pronostic vital des patients. Les carences nutritionnelles (anémie, déficit vitaminiques...) secondaires à la malabsorption sont des complications générales non négligeables. Les MICI ont également été identifiées comme un facteur de risque de cancer colorectal. Le risque est augmenté avec la durée d'évolution de la maladie, l'étendue de la colite ainsi qu'en cas de complication hépato-biliaire de type cholangite sclérosante primitive et d'antécédent familial de cancer colorectal (ECCO statement 9A, 9B, 9C) (Gillen et al., 1994a, 1994b; Jess et al., 2004; Palli et al., 1998). En effet, des lésions dysplasiques dues à une prolifération épithéliale peuvent siéger au niveau des sténoses et conduire au développement d'un adénocarcinome colorectal et/ou du grêle pour les patients atteints de MC (Faharat et al., 1999; Marteau and Jian, 2001 ; De Saussure and Bouhnik, 2007).

III.2.1.4 Diagnostic

Le diagnostic est posé devant un ensemble d'arguments clinico-biologiques (Fakhoury et al., 2014) associés à la constatation de lésions endoscopiques caractéristiques de MICI, confirmé par un examen anatomopathologique des prélèvements biopsiques réalisés au cours d'une iléo-coloscopie. Un score d'activité clinique (MC : Crohn disease activity index (CDAI) et RCH : Lichtiger) et endoscopique (MC : CDEIS et RCH : UCEIS) est établi lors du bilan initial de la maladie et tout au long du suivi. Les biopsies réalisées par endoscopie donnent accès à l'étude de la muqueuse et du SNE (Neunlist et al., 2011 ; Annexe 2). Lors du bilan initial de MICI et régulièrement au cours du suivi d'une MC, il est important d'évaluer l'atteinte de l'intestin grêle. Celle-ci se fait par une entero-IRM (examen non irradiant). Elle peut également se faire par entero-scanner ou vidéo-capsule endoscopique après s'être assuré de l'absence de sténose du grêle. De nouvelles méthodes d'investigation plus fines telles que l'endomicroscopie confocale sont de plus en plus utilisées pour analyser *in situ* l'état de l'épithélium intestinal, le flux sanguin et la perméabilité à des substances en permettant des

analyses quantitatives avec plus d'exactitude que l'endoscopie « classique » (Musquer et al., 2013, Annexe 4).

III.2.1.5 Épidémiologie

Les MICI sont des pathologies de l'adulte jeune mais 10% des cas sont des enfants ou des personnes âgées (Cosnes et al., 2011; Langholz, 2010; Peyrin-Biroulet et al., 2010). Le pic d'incidence de la MC est prononcé entre 20 et 29 ans alors que celui de la RCH touche une tranche d'âge plus étendue allant de 20 à 40 ans mais qui reste variable en fonction du sexe (Lerebours et al., 2003; Molinié et al., 2004) (Figure 55). En effet, la MC semble toucher plus fréquemment les femmes avec un ratio homme/femme de 0,8 et la RCH, les hommes avec un ratio de 1,1.

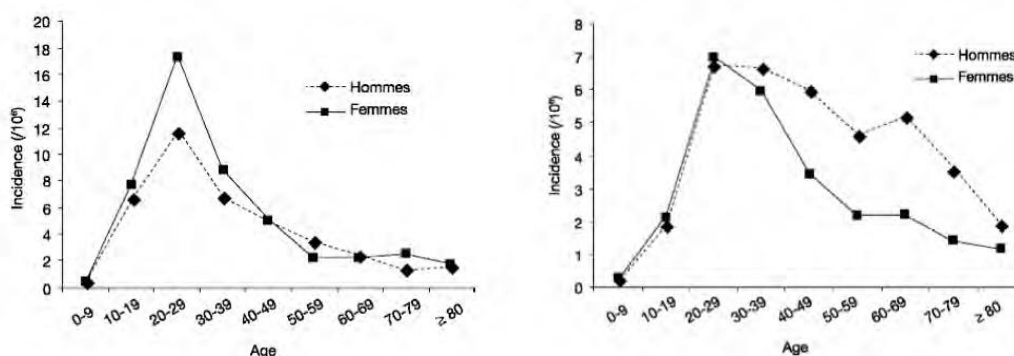


Figure 55: Variation de l'incidence de la MC et la RCH en fonction du sexe et de l'âge

A gauche, le pic d'incidence de la MC varie de la même façon pour les deux sexes et se situe entre 20 et 29 ans. A droite, le pic d'incidence de la RCH se situe entre 20 et 29 ans, puis diminue pour les femmes tandis qu'il reste élevé pour les hommes avec un nouveau pic autour de 60 ans. D'après Lerebours et al., 2003.

Depuis les années 1980 on assiste à une véritable explosion de publications de chiffres d'incidence et de prévalence sur le continent européen, au Moyen Orient, dans la zone Pacifique et en Amérique latine. Ceci traduit la reconnaissance de ces maladies dans le Monde. Les taux les plus élevés ont été enregistrés en Amérique du Nord et dans le Nord de l'Europe. De plus, certains pays du Pacifique tels que l'Australie et la Nouvelle-Zélande qui partagent les mêmes facteurs génétiques et environnementaux, ont également des taux d'incidence élevés. Les pays en voie d'occidentalisation (Afrique du Nord, Chine, Inde, Corée du Sud, Iran et Liban) voient également l'incidence des MICI augmenter ces dernières années (Cosnes et al., 2011; Ng et al., 2013). La répartition des MICI suit un gradient Nord-Sud en particulier dans les pays industrialisés et quelque soit le pays, la population blanche de souche européenne et les personnes issues de milieu rural sont les catégories les plus touchées (Figures 56 et 57).



Figure 56: Carte de l'incidence de la maladie de Crohn dans le monde.

Les incidences les plus fortes de la maladie de Crohn, de 5 à plus de 10 pour 100000 habitants, sont observées en Amérique du Nord, Australie, Nouvelle-Zélande et en l'Europe du Nord ainsi qu'en Espagne. L'incidence de la MC est en augmentation pour les pays en voie d'occidentalisation comme la Chine, l'Afrique du Sud, l'Arabie Saoudite, le Brésil ou encore l'Argentine. D'après Ng et al., 2013.

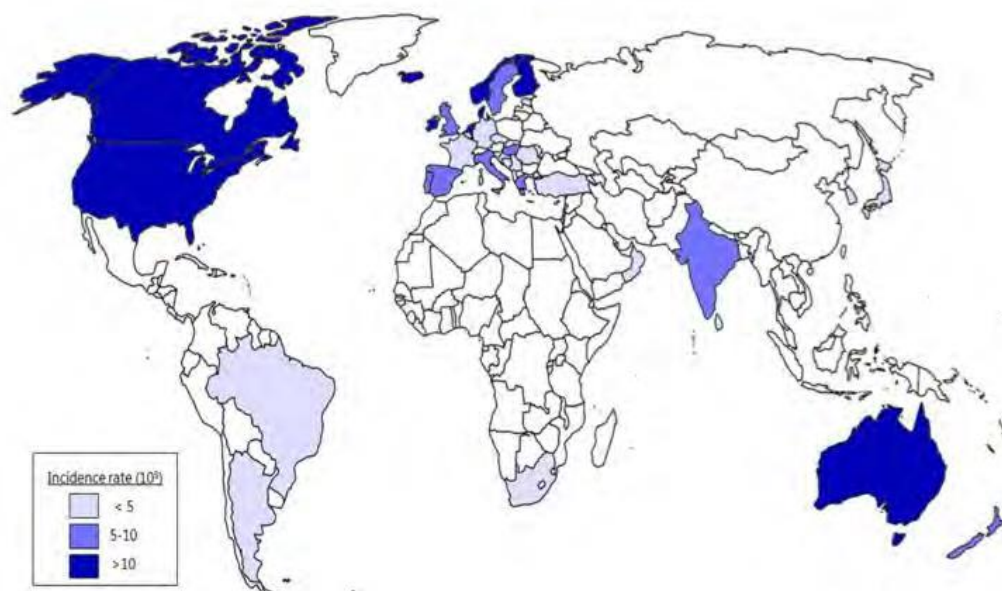


Figure 57: Carte de l'incidence de la rectocolite hémorragique dans le monde.

Les incidences les plus fortes de la rectocolite-hémorragique, de 5 à plus de 10 pour 100000 habitants, sont observées en Amérique du Nord, Australie, Nouvelle-Zélande, Inde et en l'Europe du Nord excepté en France et en Allemagne. L'incidence de la RCH est en augmentation pour les pays en voie d'occidentalisation comme l'Afrique du Sud, le Brésil ou encore l'Argentine. D'après Ng et al., 2013.

Le nombre de malades en Europe est estimé à 1 million pour la MC et 1,5 million pour la RCH dont près de 200 000 patients en France (Chouraki et al., 2011; Flamenbaum et al., 1997; Gunesh et al., 2008; Jacobsen et al., 2006; Latour et al., 1998; Molinie, 2004; Nerich et al., 2006; Ott et al., 2008; Pagenault et al., 1997; Shivananda et al., 1996). Les études épidémiologiques montrent une incidence de la MC qui varie de 0,7 à 10,7 pour 100 000 habitants et de 3,9 à 17 pour la RCH (Björnsson and Jóhannsson, 2000; Jacobsen et al., 2006; Vucelić et al., 1991). Leur prévalence étant respectivement de 8,3 à 214 et de 21,4 à 294 (Cosnes et al., 2011; Frangos and Frangos, 2007; Piront et al., 2002). Si l'incidence de la RCH se stabilise voire régresse en Europe, celle de la MC présente une évolution de 23% ces dernières années (Faharat et al., 1999; (Gower-Rousseau et al., 2013; Lerebours et al., 2003; Molinié et al., 2004; Ng et al., 2013; Shivananda et al., 1996). Cependant, la MC reste moins fréquente que la RCH sauf en France, en Belgique et en Allemagne où l'incidence moyenne est de 6/100000 contre 4/100000 (Gunesh et al., 2008; Latour et al., 1998; Ott et al., 2008).

III.2.1.6. Physiopathologie des MICI

Les MICI sont des pathologies multifactorielles dont l'étiologie reste encore inconnue. L'hypothèse physiopathologique actuellement « dominante » pour les MICI est celle d'une prédisposition génétique à développer une sur-activation du système immunitaire intestinal sous l'influence d'antigènes bactériens du microbiote intestinal entraînant les lésions inflammatoires (infiltration massive de leucocytes au niveau de la muqueuse intestinale) responsables des dégâts anatomiques (Baumgart and Carding, 2007; Cho, 2008; Fiocchi, 1998; Kaser et al., 2010; Macfarlane et al., 2009a; Podolsky, 2002; Sartor, 2008; Sokol et al., 2008; Xavier and Podolsky, 2007).

Facteurs génétiques

Les taux de concordance chez des jumeaux homozygotes sont selon les études de 50% environ pour la MC, de moins de 10% pour la RCH (Cortot et al., 2009; Kaser et al., 2010; Orholm et al., 1991; Tysk et al., 1988) et nuls pour les jumeaux dizygotes (Bonon and Cho, 2003; Jess et al., 2005). De plus, la fréquence des formes familiales des MICI (8 à 30% des cas de MC), ainsi que le risque élevé de développer une MICI pour les apparentés au premier degré avec un patient (2-14% pour la MC et 7-11% pour la RCH ; Actis, 2013) illustrent l'importance des facteurs génétiques mais aussi leur caractère non exclusif.

Depuis les années 90, 7 loci de prédisposition pour les MICI ont été identifiés grâce aux études GWA (Genome-Wide Association Study) et nommés IBD 1 à 7 et sont soit spécifiques de la MC ou de la RCH soit partagés par les deux pathologies (Ahmad et al., 2004; Kaser et al., 2010). Ces études se focalisent sur l'étude des SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) qui sont des variations de séquences d'ADN lorsqu'un seul nucléotide diffère entre les membres d'une même espèce ou entre deux chromosomes de la même paire. Elles ont permis de mettre en évidence plus de 99 SNPs de susceptibilité aux MICI (Franke et al., 2010) dont plusieurs gènes essentiels aux fonctions gastro-intestinales telles que les fonctions de barrière, la restitution épithéliale, la défense contre les pathogènes, l'immunité innée et adaptative (Hisamatsu et al., 2013), la génération des ROS («Reactive Oxygen Species») ou encore l'autophagie (Weersma et al., 2008).

Le premier gène de susceptibilité de la MC a été identifié en 2001, il s'agit du gène NOD2 pour «Nuclear-binding Oligomerization Domain containing protein 2», aussi appelé CARD15 pour «Caspase Recruitment Domain containing protein 15» situé sur le chromosome 16q12 dans le locus IBD1 (Hugot et al., 2001, 1996). Trois mutations ont été identifiées et associées à la MC: R702W ou SNP8 multiplie le risque par 2, p.G908R ou SNP12 multiplie le risque par 3 et l'insertion p.L1007 ou SNP13 qui multiplie le risque par 4 (Economou et al., 2004). Une mutation de ce gène est retrouvée chez 50% des patients atteints de la maladie de Crohn (Hampe et al., 2001, 2002), 15% des patients à l'état homozygote, 10-30% pour l'état hétérozygote, 8-15% des sujets sains et n'est pas retrouvé chez les patients atteints de RCH. De plus, les variants du gène NOD2 semblent associés, aux formes de MC touchant l'intestin grêle, à la survenue de la maladie à un jeune âge et à la tendance à développer des sténoses (Ahmad et al., 2004; Economou and Pappas, 2008; Hugot and Cho, 2002; Lesage et al., 2002). Cependant, ces variants NOD2 ne semblent pas impliqués dans l'étiologie de la maladie de Crohn dans tous les pays et surtout pas dans les pays asiatiques (Arnott et al., 2004; Bonen and Cho, 2003; Cavanaugh, 2006; Kugathasan et al., 2005). Le risque relatif de développer une maladie de Crohn est de 3 chez les sujets porteurs homozygotes et de plus de 30 pour les individus hétérozygotes. Ce gène NOD2 code un récepteur intracellulaire impliqué dans la reconnaissance de peptidoglycanes bactériens non reconnus par les TLRs (Girardin et al., 2003). Il est exprimé par les cellules dendritiques (Gutierrez et al., 2002), les macrophages et également par les entérocytes, en particulier les cellules de Paneth. L'inactivation de NOD2 entraînerait des défauts de sécrétion de défensines et donc une perte

de protection non immune contre les pathogènes luminaux. Malgré une expression de NOD2 augmentée dans les macrophages et les cellules de Paneth au cours de la MC (Ogura et al., 2003), la perte de fonction au sein des macrophages induirait une infection bactérienne persistante et donc un recrutement excessif des lymphocytes T. Enfin, un polymorphisme NOD2 est aussi observé dans des pathologies auto-immunes comme le syndrome de Blau confirmant son rôle dans des pathologies inflammatoires (Henckaerts and Vermeire, 2007).

De nombreux autres gènes liés à la réponse immunitaire ont été associés aux MICI : ATG16L1 (Autophagy 16 Like 1) sur le chromosome 2, IRGM (Immunity Related GTPase M) sur le chromosome 5 et ITLN1 (Intelectine Lactoferrine Receptor) sont spécifiques de la MC (Duerr et al., 2006). En revanche, des mutations liées à l'IL-10 (Glocker et al., 2010; Kotlarz et al., 2012) et son récepteur, IL-10R (Glocker et al., 2010) ou encore l'ARPC2 (Actin-related Protein 2) semblent spécifiques de la RCH. CARD9 (Gross et al., 2006; Zhernakova et al., 2008), IL23R (différenciation LTh17), IL27 ou encore TLR4 sont aussi associés aux MICI (Barrett et al., 2008; Duerr et al., 2006). Par exemple, des souris KO pour le TLR4 et stimulées chimiquement au DSS (Dextran Sodium Sulfate) développent plus facilement des colites (Fukata et al., 2005, 2007) et des mutations TLR4 diminuent la sensibilité de souris au LPS ce qui les prédispose à des infections par des bactéries à Gram négatif (Qureshi et al., 1999). Il existe également un lien entre HLA et MICI avec le loci IBD3 notamment l'allèle rare DRB1 codant une sous-unité beta1 du CHMII, prédispose à une RCH (Turkcapar et al., 2006). Les résultats des études GWA ont permis de découvrir de nombreux gènes de susceptibilité associés aux MICI qui sont résumés dans la *figure 58*.

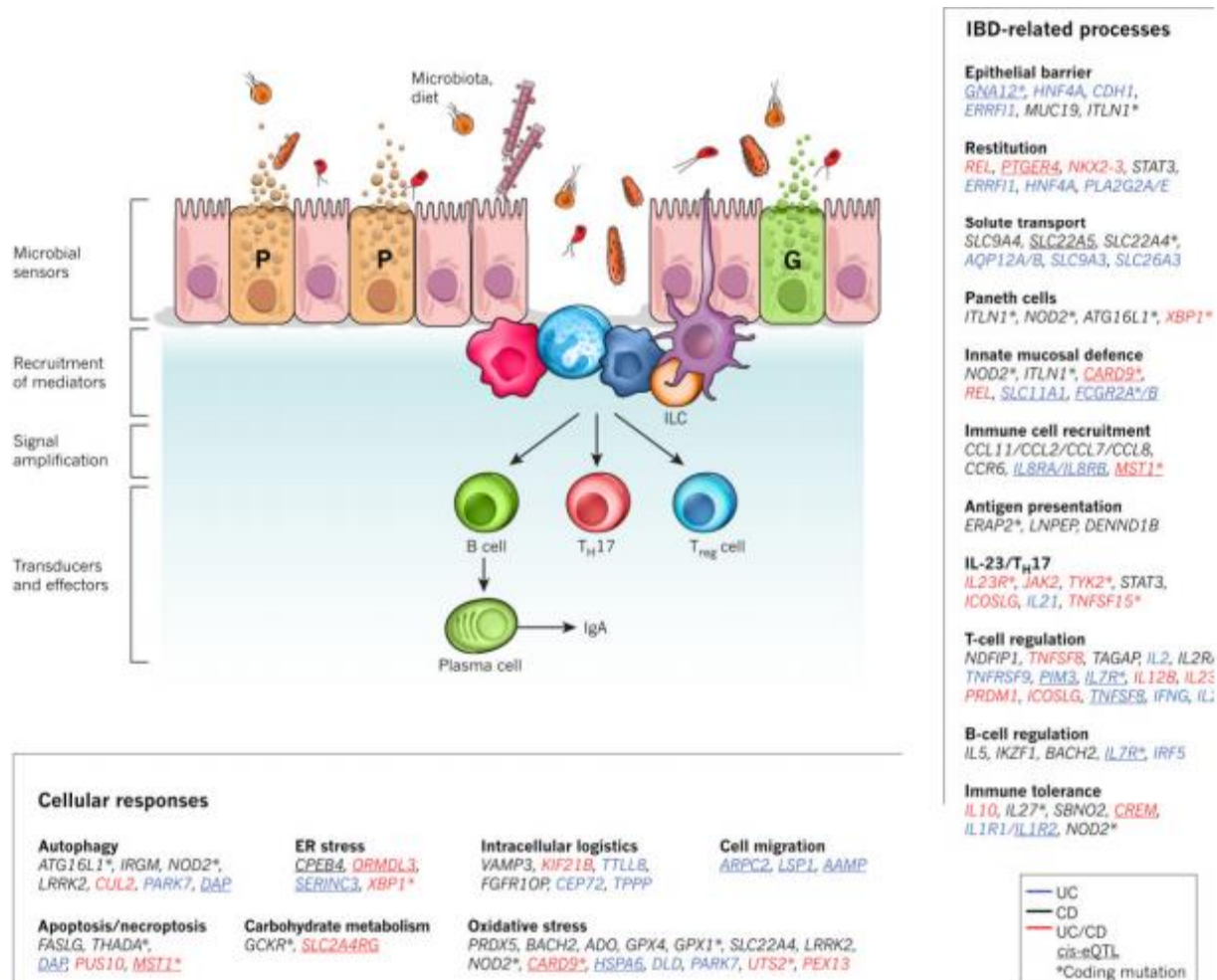


Figure 58 : Modèle de pathogenèse des MICI basé sur les études GWA.

L'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale est contrôlée par l'action coordonnée des cellules épithéliales et des cellules de l'immunité innée et adaptative. La barrière devenue perméable permet le passage de microbes détecté par le système immunitaire inné qui met en place une réponse inflammatoire et réparatrice appropriée d'une part et par la libération de médiateurs extracellulaires qui recrutent d'autres cellules notamment celles de l'immunité adaptative. Les variants génétiques, le microbiote et les facteurs immunitaires affectent l'équilibre de ces signaux. Les gènes impliqués dans ces fonctions avec des SNPs (single nucleotide polymorphisms) associés aux MICI ont été classés selon leurs fonctions. Le texte indique si les gènes sont liés à des loci de risque associés à la MC (en noir), à la RCH (en bleu) et aux deux pathologies (en rouge). Les astérisques correspondent aux mutations codantes, les cis-expression quantitative trait loci (cis-eQTL) sont soulignées. G : goblet cell; P : Paneth cell. D'après Khor et al., 2011.

Si aucune indication à rechercher la présence de ces variants n'est réalisée en pratique clinique, l'identification de biomarqueurs prédictifs ou de diagnostic ouvre des perspectives cliniques intéressantes (Kaser et al., 2010; Tsianos et al., 2011).

Facteurs environnementaux

-le tabagisme

Le rôle du tabac dans la survenue d'une MICI est bien établi (Ananthakrishnan, 2013a) mais les effets sont opposés entre la MC et la RCH. Le tabac apparaît comme un facteur protecteur pour la RCH en réduisant son risque de 40% (Calkins, 1989; Cosnes, 2004) et en induisant une maladie moins sévère et moins étendue. Les ex-fumeurs ont 70% de risque de développer une RCH par rapport aux non-fumeurs en particulier dans les deux années suivant le sevrage (Mahid et al., 2006; Motley et al., 1988). L'arrêt du tabac est également aggravant et sa reprise bénéfique sans être reproduite par l'usage de patchs de nicotine (Beaugerie et al., 2001; Cosnes et al., 2001; Nikfar et al., 2010). Concernant la MC, le tabac est un facteur favorisant (risque multiplié par deux) : il augmente la fréquence des poussées, les complications, la précocité des traitements lourds comme la chirurgie et aussi le risque de récurrence surtout chez la femme (Bernstein, 2010; Cosnes, 2004) (*Figure 59*). Le sevrage tabagique fait donc partie intégrante du traitement de la MC en s'avérant bénéfique dès la 1^{ère} année (Cortot et al., 2009; Cosnes et al., 2001; Lakatos et al., 2007). Quant au tabagisme passif, il n'influence pas le risque de développer une MICI (Baron et al., 2005). Si le mécanisme d'action du tabac reste non élucidé, des études ont montré qu'il modifie la perméabilité de la BEI, la production de cytokines, les taux de métabolites de l'acide arachidonique, la réponse immunitaire, le tonus des muscles lisses et la contractilité, la vascularisation et la motilité intestinale (Lakatos et al., 2007). Ces effets seraient imputables à la nicotine et au monoxyde de carbone, ce dernier induisant un déséquilibre entre les radicaux oxygénés libres et les anti-oxydants concourant aux lésions épithéliale et endothéliale. Pour les patients atteints de RCH, l'effet bénéfique serait lié à l'augmentation de la synthèse de mucines due à la nicotine (Birrenbach and Böcker, 2004; Lakatos et al., 2007).

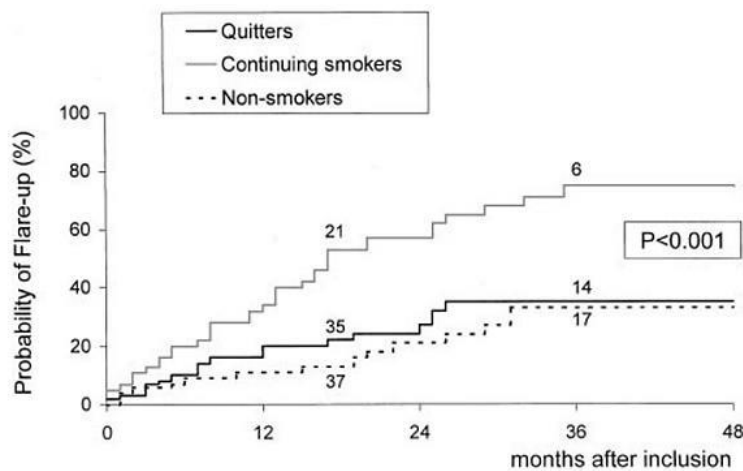


Figure 59: Comparaison du risque de rechute de la maladie de Crohn chez 3 groupes de patients: fumeurs, non-fumeurs, et ex-fumeurs.

Ce graphique représente la probabilité de rechute de la MC chez 3 groupes de patients : quitters (ex-fumeurs), continuing smokers (fumeurs) et non-smokers (non-fumeurs). Les chiffres sur les courbes indiquent la probabilité en pourcentage à 18 et 36 mois après l'inclusion dans l'étude. La valeur p montre une différence significative entre le risque de rechute pour les fumeurs et les ex-fumeurs d'où l'intérêt d'inclure le sevrage tabagique dans la prise en charge de la MC. D'après Cosnes et al., 2004.

-l'appendicectomie

L'appendicectomie réduit le risque de survenue de RCH dans la plupart des études publiées et de façon indépendante du tabagisme. Une méta-analyse incluant 13 études représentant un effectif de 2770 patients atteints de RCH et de 3352 sujets cas-contrôles conclut à une réduction d'environ 70 % du risque de survenue de RCH en cas d'appendicectomie (Koutroubakis and Vlachonikolis, 2000). L'effet protecteur de l'appendicectomie est d'autant plus important que celle-ci est réalisée avant l'âge de 20 ans et pour une appendicite aiguë ou une lymphadénite mésentérique et non de façon erronée (Andersson et al., 2001). Ceci suggère que c'est la condition inflammatoire qui conduit à l'appendicectomie, plutôt que l'appendicectomie elle-même, qui est inversement corrélée au risque de développer ultérieurement une RCH. L'appendicectomie ralentirait l'évolution d'une RCH installée (Cosnes et al., 2002). Cet effet protecteur pourrait passer par la modification du système immunitaire de la muqueuse intestinale (Koutroubakis et al., 2002). Cet acte chirurgical pourrait en revanche augmenter la MC mais cet effet est discuté. En effet en cas de maladie de Crohn, les patients ayant une atteinte iléo-caecale ont plus souvent une appendicectomie dans les mois ou les années précédant le diagnostic, suggérant que l'indication chirurgicale est portée pour une maladie de Crohn ignorée. Dans la plupart des séries, l'appendicectomie n'a pas de rôle protecteur contre la maladie de Crohn. Deux théories ont été avancées pour expliquer le rôle protecteur de l'appendicectomie contre la RCH.

L'appendice en tant que réservoir de bactéries pourrait contenir un antigène ou un agent bactérien responsable de la RCH, disparaissant avec l'appendicectomie. L'appendice possède un tissu lymphoïde abondant et pourrait être un site d'activation des lymphocytes B : ceci pourrait générer une réponse dirigée contre certaines bactéries de la flore normale et de façon croisée contre l'épithélium colique. D'autres auteurs ont suggéré que c'est la production de cytokines dans l'appendice qui serait à l'origine de modifications immunologiques le long du côlon. Ainsi, l'appendicectomie modifierait la réponse immunitaire ce qui protégerait contre le développement ultérieur de la RCH.

Le tabac et l'appendicectomie sont les deux facteurs environnementaux ayant la plus grande incidence sur la physiopathologie des MICI, les autres facteurs ayant un moindre impact.

-le mode de vie (Powell et al., 2000)

Les pays occidentaux ont l'incidence la plus élevée de MICI malgré un bon état sanitaire (eau potable, propreté et médication). Ceci s'expliquerait par une exposition limitée à des infections dans l'enfance entraînant un manque de maturation du système immunitaire qui conduirait à l'âge adulte, à une réponse immunitaire aberrante à certains antigènes (Baumgart and Carding, 2007; Kabeerdoss et al., 2011; Ponder and Long, 2013). Ainsi, des germes comme *Mycobacterium paratuberculosis* sont retrouvés dans les tissus de patients ayant une MC, et *Listeria monocytogenes* dans les tissus intestinaux de 75% des patients atteints de MC et 13% pour les patients atteints de RCH (Baumgart and Carding, 2007; Cortot et al., 2009; Faharat et al., 1999). D'autres bactéries comme *Chlamydia pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Shigella flexneri* (Radhakrishnan et al., 2007), *Helicobacter pylori* (Hansen et al., 2011) ou des souches d'*Escherichia coli* entéroinvasives adhérentes (Baumgart et al., 2007; Darfeuille-Michaud et al., 2004; Martin et al., 2004) semblent également impliquées dans la pathogenèse des MICI. Les patients atteints de MICI ont une incidence plus élevée d'infections périnatales et infantiles, impliquant une exposition excessive aux antibiotiques dans l'enfance (Shaw et al., 2011; Virta et al., 2012) qui en modifiant la flore intestinale, multiplierait par plus de trois le risque de développer une MC. L'hypothèse d'un rôle du virus de la rougeole (Ekblom et al., 1994, 1996) ou de son vaccin (Morris et al., 2000) est aujourd'hui infirmée.

-l'allothérapie

La prise d'antibiotiques, de contraceptifs oraux, de traitements hormonaux, d'anti-inflammatoires non stéroïdiens est également un facteur de risque relatif de MICI. Les infections bactériennes dans la petite enfance, plus précisément l'utilisation d'antibiotiques, à l'origine de probables modifications du microbiote intestinal, sont associées à une augmentation du risque d'apparition de MC pendant l'enfance, mais pas de RCH. Certaines études suggèrent que la contraception orale est un facteur favorisant l'apparition des MICI en multipliant le risque par 1,4 (Cornish et al., 2008), leur aggravation (Ponder and Long, 2013) et en augmentant le risque de rechute. Ceci concerne les traitements à base d'oestrogènes car ils stimuleraient l'immunité, et donc la prolifération des macrophages qui provoqueraient des lésions thrombotiques gastro-intestinales, contrairement aux oestro-progestatifs qui n'auraient pas d'influence (Cornish et al., 2008; Cosnes et al., 1999). Différentes études, notamment cas-témoins, ont suggéré que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et plus rarement l'aspirine pouvaient révéler une MICI ou en déclencher des poussées. La fréquence de cet effet, dont l'estimation est rendue difficile par les effets digestifs propres des AINS, n'est pas connue précisément et les études récentes montrent que le risque, s'il existe, est très faible. Les informations sur les AINS anti-COX-2 sont également divergentes, mais un traitement de courte durée (moins de 2 semaines) semble dépourvu d'inconvénient. Il en est de même pour l'aspirine prescrite à faible dose. L'effet délétère des AINS s'expliquerait par leur action inhibitrice sur la synthèse des prostaglandines ainsi que le blocage des cyclo-oxygénases concourant à l'induction de dommages de la muqueuse intestinale et augmentant la perméabilité intestinale (Ananthakrishnan, 2013b; Miner, 1997; Ponder and Long, 2013).

-l'alimentation

La modification des habitudes alimentaires pourrait expliquer l'augmentation du risque de développer une MICI, les antigènes présents dans l'alimentation étant en contact direct avec la muqueuse intestinale influencent la composition du microbiote (Wild et al., 2007). Le régime occidental riche en graisses polyinsaturées, en protéines animales, en sucres raffinés favoriserait la survenue de MICI (Ekbom and Montgomery, 2004; Jantchou et al., 2010; Russel et al., 1998). Il existe notamment une corrélation entre l'augmentation de la consommation de saccharose (2 fois supérieure) et l'apparition d'une MC (Riordan et al., 1998). La consommation de fruits et légumes réduirait le risque de RCH et un régime riche en fibres limitant l'adhérence des bactéries pathogènes, atténuerait le risque de MC. Le curcumin

réduirait les colites dans un modèle de RCH, en raison de son effet anti-inflammatoire par l'inhibition de NFkB (Ali et al., 2012; Arafa et al., 2009; Deguchi et al., 2007; Hanai and Sugimoto, 2009; Richman and Rhodes, 2013). La consommation d'eau du robinet est selon les études, protecteur (Baron et al., 2005) ou facteur de risque (Aamodt et al., 2008). Enfin, de nombreuses études se sont intéressées à l'impact de l'allaitement sur la survenue des MICI montrant soit un effet protecteur s'il est supérieur à trois mois car favorisant l'évolution de la flore du nourrisson, soit délétère en transmettant des polluants et des agents infectieux (Barclay et al., 2009; Baron et al., 2005; Baumgart and Carding, 2007; Hansen et al., 2011; Klement et al., 2004; Louis and Marteau, 2010 ; Ponder and Long, 2013).

-la pollution

Des études ont montré un parallèle entre industrialisation et incidence des MICI mais sans lien évident avec la pollution atmosphérique. Cependant, le dioxyde d'azote augmente le risque de développer une MC et le dioxyde de soufre augmente celui d'une RCH (Kaplan et al., 2010). L'aluminium connu pour être impliqué dans une pathologie granulomateuse digestive des équidés serait un candidat pour la prédisposition aux MICI (Louis and Marteau, 2010).

-le stress et les facteurs psychologiques:

La difficulté à évaluer l'impact du stress rend les résultats des études hétérogènes. Tandis qu'une étude récente n'a pas montré d'influence significative du stress (Lerebours et al., 2007), une autre étude a trouvé un rôle significatif de la dépression et du stress (Maunder and Levenstein, 2008). Un lien existe également entre des événements stressants et des rechutes chez les patients atteints de MICI (Ananthakrishnan et al., 2013; Louis and Marteau, 2010), le stress entraînant un possible relargage de neuropeptides capables de modifier la perméabilité intestinale.

Facteurs immunitaires : un déséquilibre de la flore intestinale

La flore intestinale ou microbiote est constituée de 10^{14} microorganismes (bactéries, levures, champignons) (Seksik, 2010; Seksik et al., 2010) majoritairement anaérobie dont les deux grands groupes sont *Bacteroides* et *Firmicutes* et une population moindre aérobie, entérobactéries et lactobacilles (Bäckhed et al., 2005) (*Figure 60*).

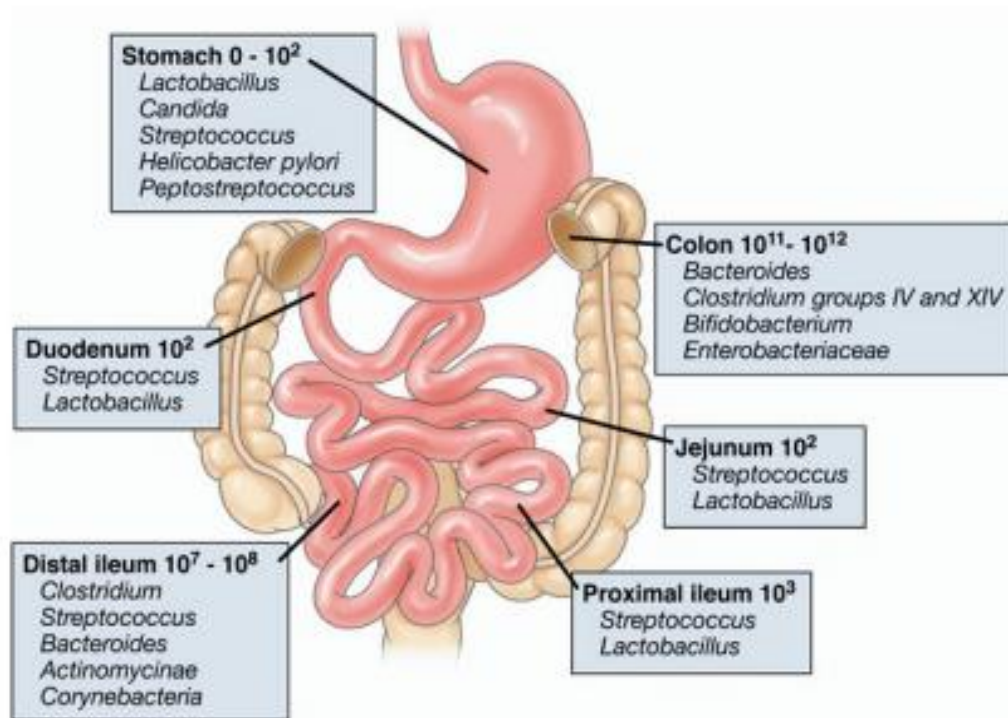


Figure 60 : Composition et concentration des espèces microbiennes dominantes dans la lumière intestinale des diverse régions du tube digestif. D'après Sartor, 2008

Le microbiote, étant à la fois un facteur environnemental et un facteur immunitaire, semble jouer un rôle clé dans la physiopathologie des MICI. En effet, les traitements antibiotiques améliorent l'état des patients (Wang et al., 2012), les modèles murins axéniques ne développent pas de colite (Kim et al., 2005; Sartor, 2009) et la déplétion du microbiote intestinal dans des modèles animaux réduit voire supprime l'inflammation. L'existence d'un microbiote «colitogénique» est suggéré par le développement de colite chez une souris sauvage à laquelle on a transféré le microbiote d'une souris mutée qui présente une colite. Des études ont montré une réaction immunitaire de la muqueuse intestinale vis-à-vis des bactéries commensales et non d'un agent exogène. Une dysbiose est observée au cours de la MC : ce déséquilibre entre des bactéries délétères et des bactéries bénéfiques sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux (Cho, 2008; Macfarlane et al., 2009b; Rioux et al., 2007) pourrait même être prédictif de rechute de MC (Sokol et al., 2008). En effet après l'arrêt de traitements immunomodulateurs tels que les anti-TNF α , des taux bas de bactéries protectrices sont constatées dans les selles des patients (*Clostridium coccoides*, *Bacteroides*, *Firmicutes* comme *F. Prausnitzii* productrice de butyrate, *Lachnospiraceae*) (Louis et al., 2009; Louis, 2012). Le microbiote des patients atteints de MC montre une modification du

rapport Firmicutes/Bacteroidetes, avec un rapport qui s'échelonne de 1/1 à 3/1 au lieu de 10/1 chez le sujet sain. Les selles des patients atteints de MC présentent également une réduction non seulement quantitative de bactéries mais également qualitative, avec moins de bactéries anti-inflammatoires comme *Bifidobacteria* ou *Lactobacilli* (Giaffer et al., 1991; Seksik, 2003) et un excès de bactéries pathogènes comme *Escherichia Coli* adhérente et invasive (AIEC) qui produit des cytokines pro-inflammatoires (Boudeau et al., 1999; Darfeuille-Michaud et al., 1998, 2004; Glasser et al., 2001; Martinez-Medina et al., 2009). Le profil des peptides anti-microbiens est modifié au cours des MICI (Bevins and Salzman, 2011; Ho et al., 2013). Ainsi, des auto-anticorps dirigés contre des composants microbiens sont retrouvés dans le sang des malades atteints de MC (anti-Omp contre la membrane d'*Escherichia Coli*, anti-I2 contre *Pseudomonas Aeruginosa*, ASCA contre *Saccharomyces cerevisiae*) ou encore BPI (van Schaik et al., 2013; Schinke et al., 2004; Solberg et al., 2009).

De plus, de nombreuses mutations génétiques (NOD2, TLRs) touchent des gènes impliqués dans la réponse immunitaire acquise ou innée (Cario, 2010; Duerr et al., 2006; Economou et al., 2004; Rioux et al., 2007; Wehkamp and Stange, 2006). Des variants NOD2 sont corrélés à une diminution des alpha-défensines 5 et 6 dans la MC (Bevins and Salzman, 2011; Wehkamp et al., 2005) et les TLRs en particulier le TLR4, récepteur au LPS est surexprimé au cours des MICI (Cario et al., 2000). Le LPS induit une réponse immunitaire exacerbée chez les patients atteints de MICI et son taux est retrouvé augmenté dans le sang des patients (Caradonna et al., 2000).

Tous ces facteurs qu'ils soient liés à l'évolution du mode de vie ou aux facteurs génétiques contribuent à la survenue des MICI (*Figure 61*).

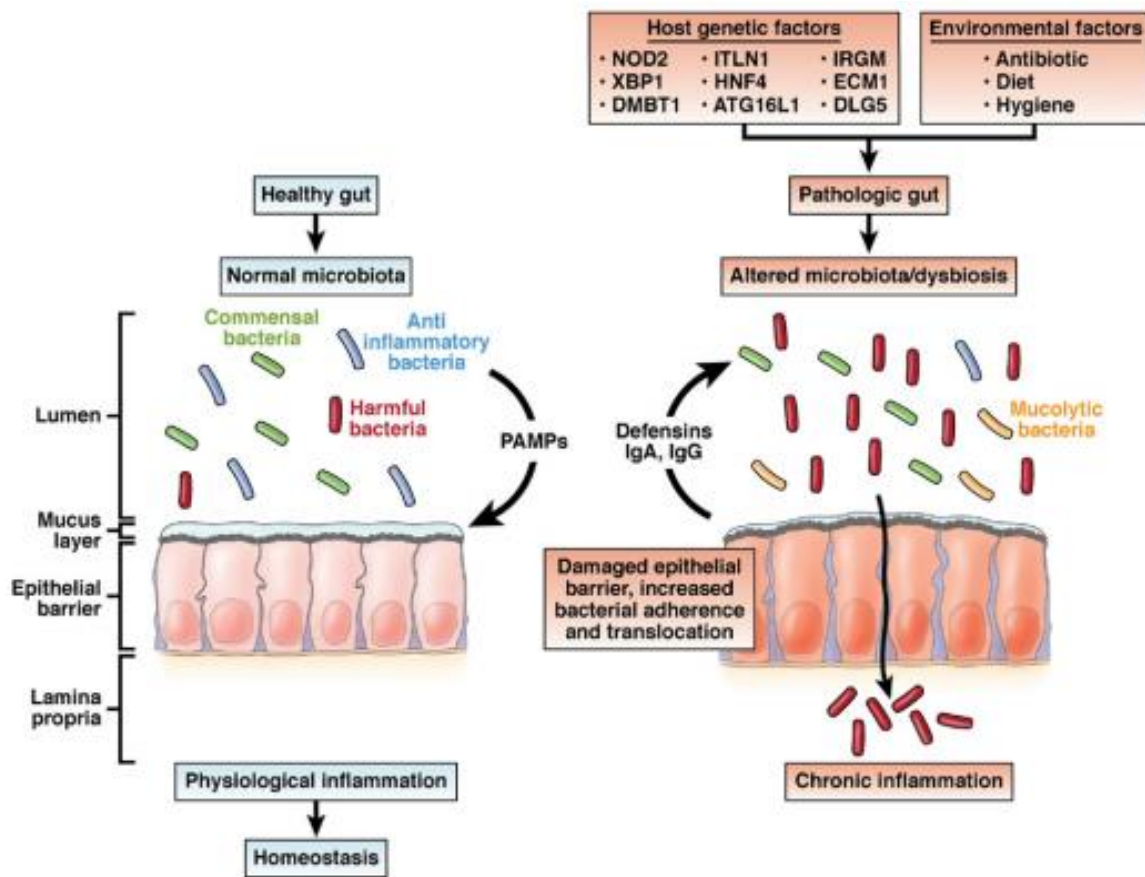


Figure 61: Les facteurs génétiques, environnementaux et le microbiote sont impliqués dans la pathogenèse des MICI. D'après Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011.

III.2.1.7. Stratégie thérapeutique des MICI

Les MICI sont des maladies chroniques invalidantes dont les traitements reposent sur le contrôle des poussées, le soulagement de la douleur, la prévention des récives (Colombel, 2010) ainsi que la gestion des complications (carences, nutrition...). Le choix du traitement est fonction de l'étendue des lésions, de la durée d'évolution de la maladie, des éventuelles manifestations extra-digestives, des traitements antérieurs utilisés et des antécédents personnels des patients avec toujours pour objectif d'éviter la chirurgie.

Traitement médical

-les dérivés salicylés

Les dérivés salicylés sont les plus anciens des médicaments topiques utilisés dans les MICI. La sulfapyridine (Salazopirine) est le premier médicament de cette famille (1942) qui a connu depuis, de nombreux dérivés. Le principe actif de tous ces produits est l'acide 5-

aminosalicylique, ou 5-ASA (mésalazine). Le mode d'action précis du 5-ASA reste encore imparfaitement connu. Le 5-ASA est très rapidement absorbé dans le grêle et l'iléon terminal et rapidement N-acétylé dans le grêle et le foie en dérivé inactif N-acétyl-5ASA. La fraction métabolisée par le grêle est en partie régurgitée et excrétée dans les selles, et la fraction hépatique éliminée par voie rénale. L'effet thérapeutique des 5-ASA est donc dépendant d'un effet topique sur le côlon (ce qui explique en partie la différence d'efficacité des 5-ASA dans la RCH et la MC). La concentration intraluminaire de 5-ASA dans le côlon est 10 à 100 fois plus grande que la concentration muqueuse. Le 5-ASA agit sur la muqueuse et non pas après absorption. Il agit en réduisant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α) en se liant à PPAR γ ; il inhibe les médiateurs des lipoxygénases et cycloxygénases et est anti-oxydant (Iacucci et al., 2010). La place des dérivés du 5-ASA dans le traitement des MICI est de plus en plus évidente. Ces produits sont devenus le traitement essentiel des formes mineures et modérées de RCH ainsi que du maintien en rémission des formes quiescentes.

-les corticoïdes

Les corticoïdes sont le traitement de référence des poussées d'intensité moyenne à sévère. En cas de poussée sévère un traitement systémique d'attaque est débuté jusqu'à l'obtention d'une rémission clinique. Afin de limiter les nombreux effets secondaires des corticoïdes classiques, une recherche s'est développée pour mettre au point un corticoïde administrable par voie orale, mais ayant des effets systémiques limités (budésonide). Le budésonide est un corticoïde de synthèse ayant une forte affinité pour les récepteurs aux gluco-corticoïdes (195 fois celui de l'hydrocortisone) et un très fort taux d'extraction hépatique. Il exerce donc une action topique au niveau de l'intestin, mais avec des effets systémiques moindres. Il est donc utilisé dans les formes iléo-caecales de MC. Il existe des lavements à la bethaméthasone pour les formes distales de RCH. La liaison à leur récepteur (récepteur aux glucocorticoïdes, GR) induit l'activation et la translocation nucléaire de ce dernier qui agit comme un facteur de transcription. Les corticoïdes inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires et de phospholipase A₂. Ils modulent l'inflammation en favorisant les cellules immunitaires régulatrices, la migration leucocytaire, la phagocytose (Dejean and Richard, 2013).

-les immunosuppresseurs

Les immunosuppresseurs occupent aujourd'hui une place importante dans le traitement des MICI. On estime à près de 50% le pourcentage de patients traités par ces agents. L'azathioprine ou son métabolite la 6-mercaptopurine sont indiqués en traitement de fond pour prévenir les rechutes de la MC, ou pour les formes cortico-dépendantes, cortico-résistantes et les lésions ano-périnéales. Ces analogues des purines induisent une cytotoxicité, inhibent la prolifération des lymphocytes, réduisent la synthèse d'anticorps, l'activité des cellules NK et la synthèse de $\text{TNF}\alpha$ et d'IL-2. En cas d'intolérance à l'azathioprine ou d'échec de ce traitement, le méthotrexate peut être prescrit. Cet anti-métabolite bloque la production des bases puriques et pyrimidiques et réduit la prolifération des cellules immunitaires. Concernant la ciclosporine, son efficacité a été montrée pour les poussées sévères et/ou corticorésistantes de RCH.

-les biothérapies

Le $\text{TNF}\alpha$ est une cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle clé dans la pathogénie de la MC qui est caractérisée par un phénotype Th1. Sa production accrue au cours des MICI rend les anticorps anti- $\text{TNF}\alpha$ intéressants en thérapeutique. A ce jour, seuls l'infliximab (anticorps monoclonal chimérique humain/murin) et l'adalimumab (anticorps monoclonal humain recombinant) ont une A.M.M. en France à la fois dans la MC et la RCH. Le golimumab commercialisé depuis le printemps 2014 a obtenu récemment une A.M.M. pour la RCH. Le certolizumab pegol n'a pas d'A.M.M. en France dans les MICI. Il a été montré que ces biothérapies diminuent le recours à la chirurgie, réduisent le nombre d'hospitalisations, permettent un sevrage des corticoïdes et une cicatrisation muqueuse endoscopique, et améliorent la qualité de vie des malades, en plus d'entraîner une mise en rémission de la maladie qui persiste chez environ un tiers des malades après un an de traitement. Ils sont indiqués dans la MC luminale et fistulissante et en cas de localisation ano-périnéale. Ils sont également indiqués pour les RCH actives modérées à sévères chez les patients qui n'ont pas répondu de manière adéquate à un traitement conventionnel comprenant les corticoïdes et l'azathioprine ou la 6-mercaptopurine, ou chez lesquels ce traitement est contre-indiqué. Concernant les effets indésirables, Globalement, il faut retenir qu'il existe une légère augmentation du risque d'infections sévères (incluant la réactivation d'une tuberculose latente) mais pas de cancers sous anti-TNF seul au cours des MICI.

-autres

Les antibiotiques (métronidazole) peuvent être efficaces pour les poussées d'intensité légères à modérées. De nouveaux traitements sont également en cours d'expérimentation comme la thalidomide, les inhibiteurs de molécule d'adhésion ou de facteurs de croissance, les anti-cytokines. Des traitements symptomatiques de type anti-spasmodiques et anti-diarrhéique font partie de la prise en charge globale des MICI (Larrieu, 2012), tout comme le traitement des manifestations extra-digestives et des complications nutritionnelles.

La microencapsulation artificielle, à base d'alginate-polylysine-alginate (APA), de substances diverses comme le thalidomide diminuent le degré d'inflammation et le taux de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle murin de colite DSS en limitant ses effets secondaires et pourrait être une piste thérapeutique pour les MICI (Fakhoury et al., 2014; Metz et al., 2006).

Ces traitements médicamenteux s'utilisent de plus en plus en combothérapie afin d'augmenter l'efficacité sur la symptomatologie clinique et endoscopique puisque la cicatrisation muqueuse est désormais l'objectif thérapeutique à atteindre.

Traitement chirurgical

Le caractère chronique et récidivant de la MC fait que, malgré l'amélioration des traitements médicaux, au moins les $\frac{3}{4}$ des patients auront recours un jour à la chirurgie. L'utilisation plus large des traitements immunosuppresseurs et l'apparition de nouvelles drogues telles que les anti-TNF ont quelque peu modifié les indications de la chirurgie, au moins sa survenue dans l'histoire de la maladie. Le risque du recours à la chirurgie est dépendant de la localisation de la maladie. Les patients ayant une atteinte de l'intestin grêle ou de l'iléon terminal ont un risque relatif de 3,2 comparé à ceux qui ont une localisation colorectale. Quelle que soit l'indication de la chirurgie dans la MC, celle-ci ne se conçoit qu'en association avec le traitement médical. En dehors d'une urgence révélant la maladie, la chirurgie est toujours précédée d'un traitement médical, et le traitement postopératoire a pour but de diminuer le risque de récurrence post-opératoire. La principale indication de la chirurgie dans la MC est l'échec du traitement médical, soit du fait de son inefficacité, soit par crainte de ses effets secondaires. Les interventions chirurgicales sont la colectomie subtotal ou totale (ablation du côlon voire du rectum) avec iléostomie (raccord du grêle à la peau) avec une remise en continuité dans les trois à six mois suivants (Faharat et al., 1999). L'anastomose

iléo-anale (raccord du grêle à l'anus en recréant un réservoir distal) ou iléo-rectale (raccord du grêle au rectum) constitue le traitement de référence de la RCH. Plus de 75% des patients atteints de MC subiront au moins une chirurgie, il s'agit le plus souvent d'une résection iléo-colique ou d'une résection du grêle en raccordant les parties saines (Maggiori and Panis, 2012; Regimbeau et al., 2001).

Mesures hygiéno-diététiques

La prise en charge des patients s'accompagne souvent de modifications des règles de vie. Le sevrage tabagique fait partie intégrante du traitement des patients atteints de MC. L'activité physique est recommandée et le suivi psychologique peut-être conseillé. En ce qui concerne l'alimentation, aucune restriction alimentaire n'est recommandée en raison des carences dues aux phénomènes de malabsorption. Seule une consommation moindre en graisses, en lait et en fibres, en particulier en période de crise et pour les patients présentant des sténoses, est conseillée (Larrieu, 2012). En cas de poussées aiguës, de complications sévères ou de dénutrition importante, une nutrition de type entérale ou parentérale peut être réalisée.

Aucun aliment thérapeutique n'a démontré son efficacité contrairement à l'utilisation de probiotiques et prébiotiques. Les probiotiques sont des micro-organismes vivants présents dans notre alimentation ou apportés par des compléments alimentaires telles que les souches microbiennes *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* et *Saccharomyces boulardii*. Des études ont démontré leur efficacité dans le maintien de la rémission de la RCH ou encore en traitement post-chirurgical (Fujimori et al., 2009; Groeger et al., 2013; Ishikawa et al., 2011; Matthes et al., 2010; Oliva et al., 2012). Les prébiotiques sont des sucres non métabolisés par nos protéases intestinales mais digérés par les enzymes bactériennes dont elles stimulent la croissance. Par exemple, des études ont montré que l'ingestion de fructo-oligosaccharide induisait une réduction de l'activité des MICI (Marteau et al., 2004; Scaldaferri et al., 2013). La co-administration symbiotique de probiotiques et de prébiotiques peut également être réalisée (Ducluzeau, 2002).

III.2.2 Les médiateurs cellulaires de l'inflammation en condition pathologique

L'inflammation observée au cours des MICI, est caractérisée par une dérégulation du système immunitaire avec l'activation des réponses immunitaires innée et acquise, ainsi qu'une perte de tolérance vis-à-vis du microbiote (Sartor, 2004). Ces pathologies sont caractérisées par le relargage d'un grand nombre de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (Raddatz et al., 2005; Schreiber et al., 1999; Woywodt et al., 1999) au sein de la muqueuse intestinale (Danese et Gasbarrini, 2005) et une augmentation du nombre de lymphocytes T (Sartor, 2006) dont l'extravasation est accrue (Baumgart and Carding, 2007; Kaser et al., 2010; Thomas and Baumgart, 2012). De plus, il est maintenant établi que la RCH présente un profil lymphocytaire Th2 et que la MC présente un profil lymphocytaire de type Th1 (Michetti, 2000)

III.2.2.1. Réactions immunitaires

Les MICI sont caractérisées par une perte de tolérance immunitaire. Ainsi, au cours de la MC, l'augmentation d'expression de CD14, CD16, HLA-DR et CD11b, c dans la muqueuse inflammée, indique un recrutement cellulaire massif (Rogler et al., 1997, 1998a). De plus, les macrophages surexpriment des molécules de co-stimulation, ce qui perpétue la réponse immunitaire (Rogler et al., 1999) en augmentant l'activation de la voie NFκB dans la muqueuse (Rogler et al., 1998b) et l'augmentation des TLR-2 et -4. D'autres études ont mis en évidence l'induction d'une activité oxydative des macrophages et l'induction de la NADPH oxydase (Hausmann et al., 2002) ainsi que la présence de taux élevés d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de NO dans les tissus de patients atteints de MICI (Simmonds et al., 1992) ce qui participe aux lésions tissulaires.

La réponse immunitaire excessive et inappropriée décrite au cours des MICI, est accompagnée de deux autres événements majeurs concourant à la physiopathologie, une altération de la BEI et une altération du SNE.

III.2.2.2 Atteintes de la barrière épithéliale au cours de l'inflammation intestinale

Les CEI impliquées dans la dysrégulation immunitaire

La reconnaissance des antigènes luminaux et les processus inflammatoires caractéristiques des MICI débutent au niveau de la barrière épithéliale intestinale.

Les CEI possèdent à leur surface de nombreux médiateurs à l'interface de l'hôte-microbiote (Goto and Ivanov, 2013; Goto and Kiyono, 2012) dont l'expression est modifiée au cours de l'inflammation. Des défauts d'interactions des CEI avec les cellules dendritiques sont alors observées (Strisciuglio et al., 2013). Une expression aberrante des molécules de co-stimulation à la surface des CEI induit une rupture de l'homéostasie immunologique (Nakazawa et al., 2004). De plus, les CEI sécrètent du LBP (LPS binding protein) en réponse à l'inflammation, qui à faible concentration est présenté au TLR4 et à forte concentration, neutralise le LPS et prévient la réponse inflammatoire exacerbée. Le LBP est considéré comme un nouvel agent thérapeutique pour promouvoir la réparation lors d'une entérocolite nécrosante (Richter et al., 2012). La fixation du LPS sur le TLR4 des CEI induit l'expression de COX2 via ERK qui nécessite la transactivation de l'EGFR. Cette voie favorise la réparation épithéliale en stimulant la survie, la prolifération et la migration des CEI (McElroy et al., 2012). L'altération de la glycosylation mucosale augmente le recrutement des bactéries (Ryder et al., 1995) en particulier, l'augmentation de la glycoprotéine CEACAM6 associée à la MC, qui constitue un ligand important pour *E. coli* (Barnich and Darfeuille-Michaud, 2010; Barnich et al., 2007).

Au cours des MICI, une dérégulation de la voie Notch est observée. Il s'agit d'une déplétion des cellules calciformes au cours de la RCH et d'une dérégulation de la différenciation des cellules sécrétrices pour la MC (Gersemann et al., 2009; Zheng et al., 2011). De plus, des souris traitées avec des inhibiteurs des γ -sécrétases donc présentant une inhibition de Notch, développent des colites (Okamoto et al., 2009). Un défaut des cellules de Paneth induisant une réduction de sécrétion de défensines comme HD-5 et HD-6 est constatée au cours de la MC (Jäger et al., 2013; Simms et al., 2008). Les β -défensines hBD-1, hBD-2 et hBD-3 sont surexprimées dans la RCH et diminuées dans la MC (Aldhous et al., 2009; Wehkamp et al., 2002, 2003).

Étude bibliographique

Un défaut d'autophagie est également constaté au cours des MICI. Cette dysfonction est liée à une modification phénotypique des cellules de Paneth car de nombreux gènes de susceptibilité des MICI et en particulier de la MC, gouvernent les fonctions de ces cellules, notamment ATG16L1 et IRGM dont l'expression des protéines est réduite (Scharl and Rogler, 2012). Les mutations ATG16L1 induisent un défaut d'exocytose des granules et une altération de la morphologie des cellules de Paneth, ce qui conduit à une survie prolongée des bactéries invasives qui ont un taux de réplication élevée (Cooney et al., 2010; Spalinger et al., 2014; Travassos et al., 2010) induisant une sécrétion incontrôlée de cytokines pro-inflammatoires comme le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-6 et l'IL-1 β (Lapaquette et al., 2012; Plantinga et al., 2011). Des mutations NOD2 induisent une réduction des α -défensines, des mutations XBP-1 modifient la morphologie des cellules de Paneth et réduisent leur activité anti-microbienne. De plus d'autres variants des gènes PTNP2, TLR9, KCNN4, TCF4 et LRP6 réduisent les activités anti-microbienne et bactéricide (*Figure 62*) (Bevins and Salzman, 2011; Jäger et al., 2013; Klag et al., 2013).

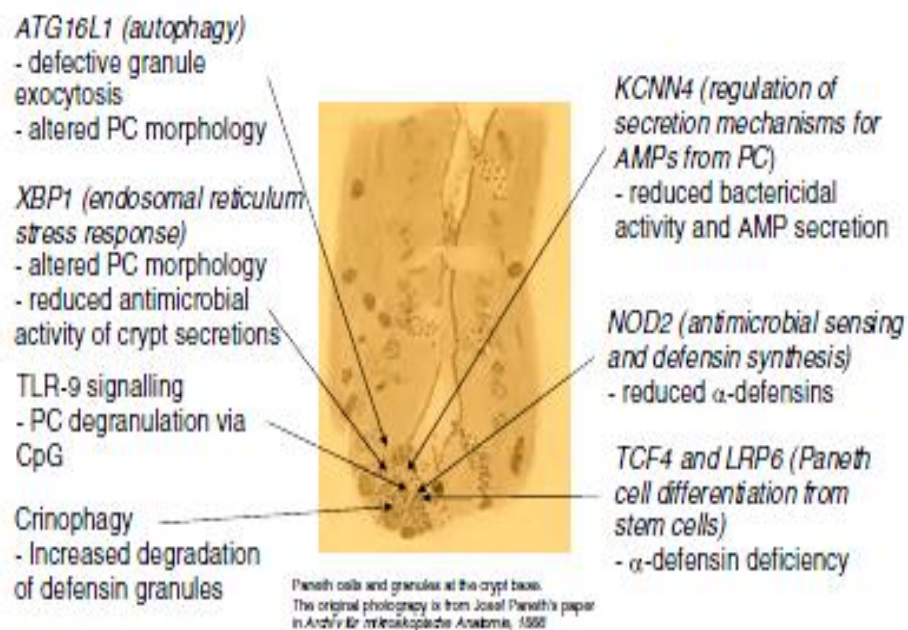


Figure 62: Variations génétiques retrouvées dans la maladie de Crohn et qui modifient les fonctions des cellules de Paneth. D'après Jäger et al 2013 et Klag et al., 2013.

Enfin, un autre gène de susceptibilité, LRKK2 est impliqué dans la pathogenèse des MICI. En effet, des souris invalidées pour LRKK2 sont plus susceptibles au développement de colite par le DSS car NFAT1 est inhibé et la production de cytokines pro-inflammatoires augmentée. Les cellules déficientes en LRKK2 présentent une diminution de leur capacité à tuer des bactéries intracellulaires (Gardet et al., 2010). Ces phénomènes mènent à une augmentation de susceptibilité à l'infection bactérienne et sont à l'origine de la colite. Les mécanismes de l'homéostasie de la BEI et ceux impliqués dans l'inflammation mucosale sont résumés dans la *figure 63*.

La sécrétion de cytokines par la BEI participe également à l'inflammation intestinale (Fiocchi et al., 1997). Or, les bactéries ou les cytokines pro-inflammatoires modulent ces sécrétions. Ainsi, des infections bactériennes type *E. Coli*, *L. monocytogenes*, *S. dysenteriae* ou *C. difficile* induisent une production d'IL-8 par des lignées de CEI, Caco-2, HT29 ou T84 (Jung et al., 1995). L'IL- β induit également la sécrétion d'IL-8 via p38 (Parhar et al., 2003) par les CEI des lignées HT29 et Caco2, sécrétion diminuée par le butyrate (Böcker et al., 2003). La PGE₂ induit la sécrétion d'IL-8 par des cellules T84 via l'AMPc (Yu and Chadee, 1998) et le TNF α est un puissant inducteur de la production d'IL-8 par des cellules HT29 et T84 via les voies ERK1/2 et p38 (Jijon et al., 2002). Enfin, le VIP et la neurotensine induisent la sécrétion d'IL-8 par des lignées de CEI (Toumi et al., 2004; Zhao et al., 2003). Chez les patients atteints de MICI, des taux élevés d'IL-8 sont retrouvés (MacDermott, 1999) et proportionnels au score histologique (Mazzucchelli et al., 1994), la concentration étant plus élevée en zone inflammatoire que non inflammatoire et plus élevée pour la RCH que la MC (MacDermott, 1999). Cependant une étude de Grimm et al., donne des résultats contradictoires car aucune détection transcriptomique et protéique d'IL-8 n'est constatée dans la muqueuses de patients MICI (Grimm et al., 1996).

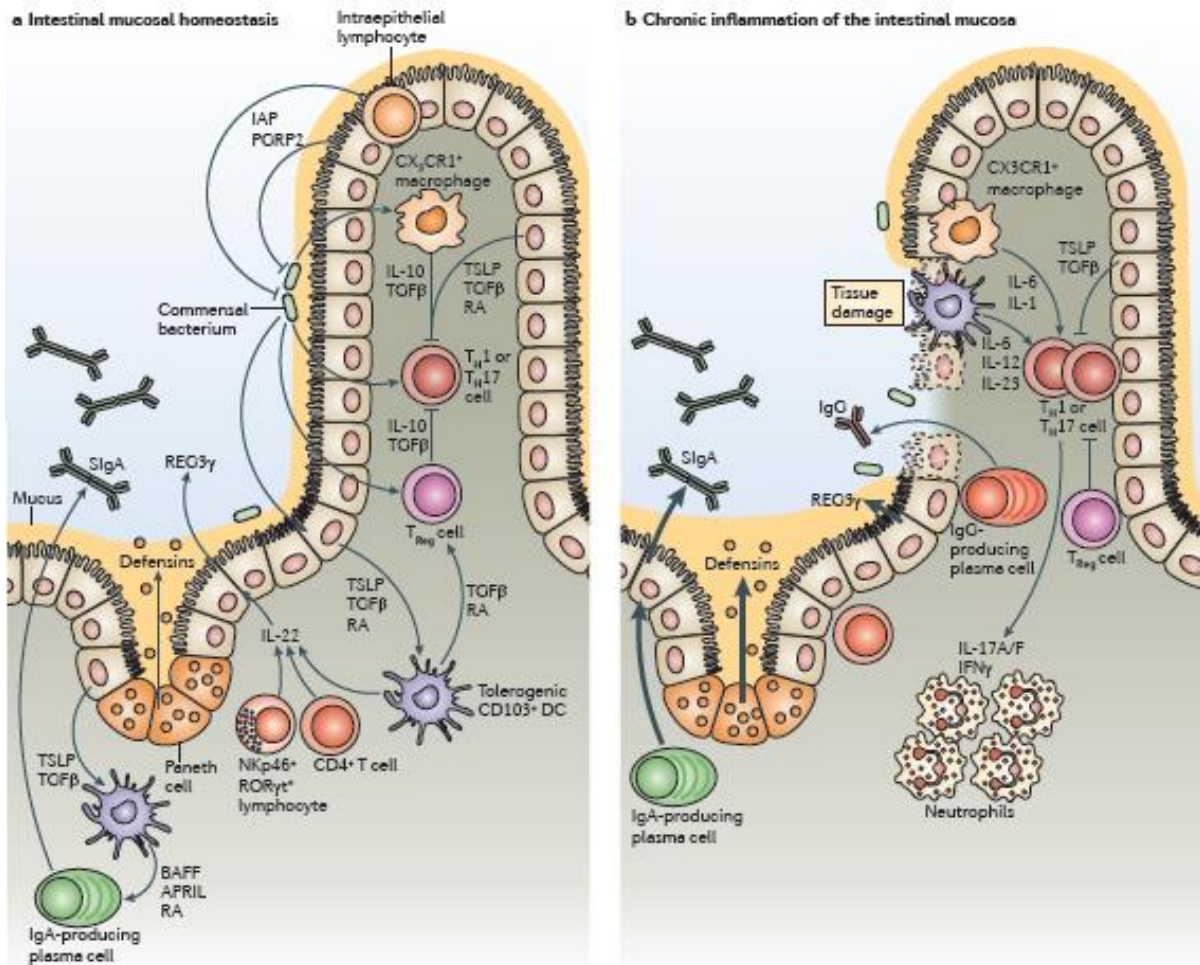


Figure 63: Réseau cellulaire de l'homéostasie immunitaire intestinale et processus conduisant à l'inflammation muqueuse.

a) De nombreux mécanismes maintiennent l'homéostasie hôte-microbiote comme la production d'IgA par les cellules plasmiques suivie de leur transport épithélial vers la lumière, IgA sécrétés (sIgA). Cette production est augmentée par l'acide rétinoïque (RA), le facteur activateur des cellules B (BAFF) et le ligand induisant la prolifération (APRIL). Ces sIgA limitent la translocation des antigènes et bactéries. La couche de mucus et la production constitutive d' α -défensines protège la surface épithéliale de l'exposition directe aux microbes. De plus, la sécrétion d'IL-22 par les cellules NK, les lymphocytes CD4⁺ et les cellules dendritiques (DCs) CD103⁺ favorise la production épithéliale de REG3 γ (regenerating islet-derived protein 3 γ). L'activation immunitaire inappropriée est contrôlée par la dégradation enzymatique des constituants microbiens par l'alkaline phosphatase intestinale (IAP) ou la PGRP2 (amidase peptidoglycan recognition protein 2). Les facteurs régulateurs dérivant des cellules épithéliales comme la TSLP (thymic stromal lymphopoietin), le TGF β (transforming growth factor β) et l'acide rétinoïque, activent les cellules dendritiques tolérantes qui favorisent le développement des lymphocytes T régulateurs (Treg). Les Treg et les macrophages CX3CR1⁺ contrôlent les cellules Th1 (T helper 1) et Th17 via la production de TGF β et d'IL-10. b) L'infection microbienne et les dommages tissulaires impliquent la rupture de la barrière épithéliale, ce qui stimule la libération de peptides anti-microbiens et supprime les propriétés tolérantes des cellules dendritiques par l'induction de leur production d'IL-6, d'IL-12 et d'IL-23. L'IL-6 et l'IL-1 sécrétées par les macrophages activés induisent la production d'IFN γ et d'IL-17 par les Th1 et Th17, ce qui stimule la réaction pro-inflammatoire impliquant l'infiltration des neutrophiles et les cellules plasmiques, la destruction tissulaire et potentiellement la dysfonction de l'organe. D'après Renz et al., 2012.

La BEI présente une perméabilité accrue

L'atteinte épithéliale au cours des MICI est caractérisée par une altération de la perméabilité intestinale avec un rapport lactulose/mannitol augmenté c'est-à-dire une augmentation de la perméabilité paracellulaire (lactulose) et une diminution de la perméabilité transcellulaire (mannitol) (Arnott et al., 2000; Flynn and Kane, 2011; Groschwitz and Hogan, 2011; J1 et al., 1993; Schmitz et al., 1999; Söderholm et al., 1999; Vogelsang, 2008). Celle-ci est considérée comme un marqueur de diagnostic et de suivi. En effet, l'augmentation de la perméabilité précède les rechutes (D'Inca et al., 1999; Söderholm et al., 2002), peut prédire une MC chez les parents de premier degré avec un malade (Buhner et al., 2006; Irvine and Marshall, 2000) et présente chez des sujets sains, est un marqueur de risque de MICI (Hilsden et al., 1996). La barrière devient perméable aux nombreux pathogènes présents dans la lumière ce qui contribue à l'initiation et à l'entretien de l'inflammation (Bomsel and Alfsen, 2003; Niedergang and Kweon, 2005; Schmitz et al., 1999). De plus, le passage accru d'eau et d'ions est responsable des diarrhées. Plusieurs phénomènes semblent être à l'origine de l'augmentation de la perméabilité, tels que l'apoptose des cellules épithéliales, l'altération de la couche de mucus, l'altération des jonctions serrées (Schulzke et al., 2009) et des modifications d'architecture comme des ulcérations.

Des défauts d'initiation de la mort des CEI peuvent conduire à une accumulation excessive et anormale de cellules participant au développement du cancer intestinal. Jusqu'à récemment, l'activation des caspases était considérée comme un mécanisme contribuant aux dysfonctions et à l'inflammation. Or, l'utilisation de bloqueurs de caspase induit aussi des dysfonctions de la BEI. Ainsi, un manque d'activité comme un défaut d'activité de la caspase-8 conduit à une mort des CEI et à l'inflammation intestinale ce qui démontre la nécessité d'un contrôle de l'apoptose des cellules épithéliales (Günther et al., 2014). De plus, l'apoptose des CEI est dérégulée au cours des MICI (Günther et al., 2013). En effet, la présence de corps apoptotiques a été trouvée dans des biopsies de patients RCH (Hagiwara et al., 2002; Souza et al., 2005) et l'apoptose semble augmentée dans les zones inflammatoires au cours de la MC (Di Sabatino et al., 2003). Cette apoptose, également sous le contrôle de cytokines, implique le réarrangement des jonctions. De plus, la nécrose des CEI est augmentée par les bactéries au cours des MICI notamment via la caspase-8 et le TNF α (Dourmashkin et al., 1983; Günther et al., 2013; Watson, 1995). Ainsi, une perte de CEI est constatée dans les zones inflammatoires et les zones adjacentes (Iwamoto et al., 1996).

La couche de mucus produite par les CEI et présente à leur surface constitue la première barrière de défense du TD. Le mucus est composé de mucine 2 produite et stockée dans des cellules spécialisées, les cellules calciformes. Il forme deux couches, la plus interne est au contact de l'épithélium tandis que la plus externe est colonisée par les bactéries commensales (Johansson et al., 2011; Steck et al., 2012). De nombreux arguments sont en faveur d'un rôle du mucus dans la physiopathologie des MICI (Boltin et al., 2013). Un défaut de renouvellement et de formation de la couche interne de mucus permet aux bactéries d'atteindre l'épithélium et est impliqué dans le développement de colite (Johansson and Hansson, 2012) (Figure 64). La déplétion de la mucine 2 dans des modèles murins engendre une colite spontanée (Velcich et al., 2002). De plus, au cours de la RCH, une réduction de l'épaisseur de la couche de mucus, une réduction du nombre de cellules calciformes et une diminution de production de mucine 2 accompagnées d'une augmentation de la colonisation bactérienne ont été rapportées (Gersemann et al., 2012; Johansson et al., 2014; McCormick et al., 1990; Pullan et al., 1994). Des études ont également montré une corrélation entre les lésions de la BEI (abcès, ulcérations) et l'augmentation des bactéries lumineales (Schultz et al., 1999; Swidsinski et al., 2007). L'altération du mucus est moins marquée pour la MC par rapport à la RCH (McCormick et al., 1990; Pullan et al., 1994).

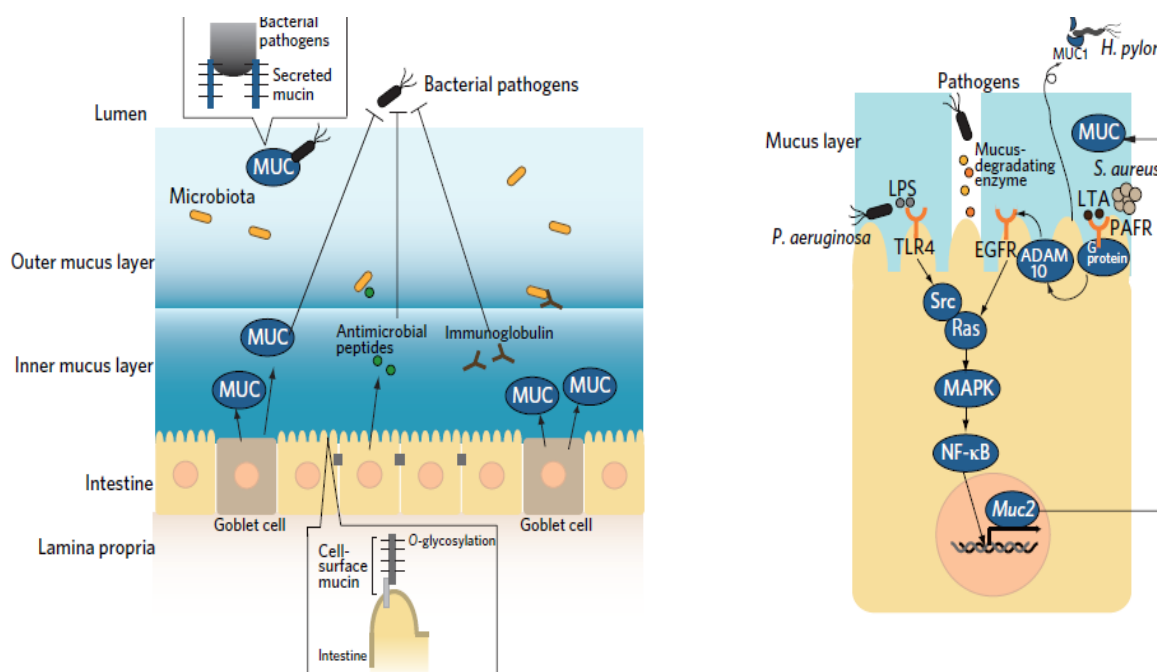


Figure 64 : Le mucus, une barrière vis-à-vis des pathogènes.

(a) La couche de mucus est une ligne de défense contre les bactéries pathogènes. (b) Les bactéries pathogéniques induisent la production de mucine 2 via une voie NFκB dépendante ou non des TLRs alors que d'autres bactéries pathogènes ont des activités d'enzymes mucolytiques qui détruisent la couche de mucus. PAFR : platelet-activating factor receptor. D'après Ashida et al., 2012.

Des études ont montré que la perméabilité au ^{51}Cr -EDTA était augmentée dans les muqueuses iléales de MC (Söderholm et al., 2002). Dans les tissus de patients atteints de MICI, des modifications d'expression de ZO-1, occludine, claudines 1 et 2 ont été retrouvées sans modification de ZO-2 (Gassler et al., 2001). Une autre analyse de la muqueuse de patients suggère que la transmigration des neutrophiles est associée à une diminution de l'occludine, de la claudine-1 et de ZO-1 (Kucharzik et al., 2001). Au cours de la MC, les claudines 5 et 8 sont redistribuées, les claudines 3, 4, 5, 8 et l'occludine sont sous-exprimées, la claudine 2 qui participe à la formation des pores est sur-exprimée ce qui conduit à l'augmentation de la perméabilité paracellulaire (Prasad et al., 2005; Zeissig et al., 2007). Les études ont montré des changements identiques pour la RCH avec une surexpression supérieure de la claudine 2 et une baisse d'expression des claudines 1, 3 et 4, de l'occludine et de la tricelluline (Hering et al., 2012; Prasad et al., 2005).

Ces modifications protéiques semblent résulter de l'action de cytokines car la surexpression de la claudine 2 peut être due à la production d'IL-13, de $\text{TNF}\alpha$ et d'IFN γ . Le $\text{TNF}\alpha$ et l'IFN γ correspondent au profil de la MC et peuvent induire une contraction du réseau d'actine et myosine via l'induction de l'expression de la MLCK (Wang et al., 2005). L'activité de la MLCK est augmentée au cours des MICI et par le $\text{TNF}\alpha$ et l'IFN γ et sa surexpression est corrélée à l'inflammation mucosale et à l'activité de la MICI (Blair et al., 2006; Wang et al., 2005). La MLCK phosphoryle la MLC et entraîne l'ouverture des jonctions serrées et donc accroît la perméabilité (Al-Sadi and Ma, 2007; Al-Sadi et al., 2008, 2010). La revue de Suzuki et al résume l'effet des cytokines sur la perméabilité intestinale (Suzuki, 2013). La brèche de l'intégrité de la BEI induit une inflammation aiguë ou chronique caractérisée par l'augmentation de $\text{TNF}\alpha$ et d'IFN γ (Braegger et al., 1992; Dionne et al., 1997; Hering et al., 2012). Le $\text{TNF}\alpha$ seul ou combiné à l'IFN γ induit l'augmentation de la perméabilité, l'augmentation de l'expression des récepteurs TNFRI et II et un changement d'expression et de localisation des protéines des jonctions serrées (Ma et al., 2011b; Wang et al., 2005). Des souris déficientes pour le TNFRI et soumises au DSS, développent une colite via le TNFRII dont la fixation du $\text{TNF}\alpha$ active la MLCK et donc augmente l'expression de la claudine 2. Cela entraîne l'augmentation de la perméabilité, la rupture des jonctions et l'apoptose (Su et al., 2013).

Ainsi, le TNF α augmente la perméabilité *in vitro* et *in vivo* via l'activation de la voie ERK 1/2 qui conduit à l'activation du facteur de transcription Elk-1 qui est transloqué dans le noyau où il se lie au promoteur de la MLCK (Al-Sadi et al., 2013; Ma et al., 2005; Mankertz and Schulzke, 2007; Ye et al., 2006). Le TNF α induit une sous-expression des claudines-1, -2, -4 et de l'occludine via l'activation de PI3kinase, de p38 et de NF κ B qui augmentent à terme la phosphorylation de la MLC et entraînent un déclin de la résistance des T84 (Fischer et al., 2013). L'IFN γ augmente également la perméabilité de cellules T84 (Bruewer et al., 2003, 2005; Madara and Stafford, 1989) via la surexpression de la claudine-2 limitée en condition physiologique par le gène PTNP2 fonctionnel (McCole, 2012). La rupture des jonctions est également due à la surexpression de HIF-1 α et de NF κ B (Yang et al., 2014).

L'IL-1 β augmente la perméabilité *in vivo* et *in vitro* par l'activation de p38 et de Erk1/2 qui phosphoryle et active respectivement le substrat ATF-2 (activating transcription factor-2) ou Elk-1 qui se transloquent dans le noyau où ils vont s'attacher au promoteur de la MLCK (Al-Sadi and Ma, 2007; Al-Sadi et al., 2008, 2010, 2013). Ainsi, le TNF α , l'IFN γ et l'IL-1 β ou cytomix, augmentent la perméabilité paracellulaire et modifient l'expression et la localisation de ZO-1, de l'occludine et de la phospho-MLC, altérations réduites en présence de CGE ou de GSNO (Cheadle et al., 2013).

L'IL-6 augmente également la perméabilité *in vivo* et *in vitro* pour le flux de molécules de petite taille. L'IL-6 augmente l'expression de la claudine-2 via l'activation de la voie JNK qui conduit à l'activation d'AP-1 qui se lie au promoteur de la claudine-2 (Al-Sadi et al., 2014; Suzuki et al., 2011).

De plus, l'activité des protéases bactériennes et le taux de trypsine luminale sont augmentés au cours des MICI (Carroll and Maharshak, 2013). Or, des études ont mis en évidence que les protéases augmentaient la perméabilité dans des modèles de colite au TNBS (Stein et al., 1998) avec une dégradation de l'occludine également présente dans des modèles d'infection parasitaire chez la souris (McDermott et al., 2003). Les protéases activent notamment PAR2 (proteinase-activated receptor-2) qui augmente la perméabilité paracellulaire associée à l'inflammation (Cenac et al., 2002). PAR2 étant retrouvé à des taux élevés au cours des MICI (Hyun et al., 2008). Les acides gras à chaîne longue, précurseurs des eicosanoïdes comme l'acide eicosapentaénoïque (EPA), l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide linoléique diminuent la résistance et augmentent la perméabilité épithéliale de Caco-2 mais font l'inverse sur des cellules T84 (Usami et al., 2001, 2003).

En revanche, deux autres cytokines, l'IL-10 et le TGF β 1 (Hering et al., 2012; Howe et al., 2005; Madsen et al., 1997) diminuent la perméabilité de la BEI.

Ainsi, les altérations de la BEI, caractéristiques des MICI, sont associées à une chute de la résistance transépithéliale, à une augmentation de la perméabilité, à une production augmentée de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-8) et diminuée de cytokines anti-inflammatoires (IL-1RA, IL-4, IL-10). (Fiocchi, 1998; Merga et al., 2014; Schmitz et al., 1999; Söderholm et al., 2002).

Les CEI présentent un défaut de réparation

Le TNF α entraîne une desquamation de la BEI (Watson and Hughes, 2012) qui peut être visualisée par endomicroscopie confocale couplée à la fluorescéine chez l'homme et qui a permis la mise an place du score de Watson, grade I (état normal), grade II (défaut fonctionnel), grade III (défaut de structure). L'inflammation induite par le TNBS provoque aussi des desquamations restaurées en 6 heures et une BEI mature en 7 jours grâce à une phagocytose accrue des entérocytes (Pontell et al., 2009). La régénération en condition inflammatoire a été étudiée chez la drosophile et a montré l'implication de la prolifération et de la différenciation des cellules souches intestinales sous le contrôle des voies JNK, JAK/STAT, Wnt/Wingless, Notch, InR, PVR, EGFR et Hippo (Kux and Pitsouli, 2014). Au cours des MICI, un défaut de réparation de la BEI est observée (Fiorino et al., 2011; Okamoto and Watanabe, 2005; Sturm and Dignass, 2008) et est un facteur prédictif de l'activité des MICI (Flynn and Kane, 2011).

L'IFN γ , augmenté au cours des MICI, serait aussi protecteur en favorisant la résolution de l'inflammation et la restitution épithéliale par l'augmentation de l'expression apicale du récepteur IL-10R1 sur les CEI et l'induction de la signalisation IL-10 et SOCS3 (Kominsky et al., 2014). De plus, la voie STAT5 impliquée dans la réparation (Gilbert et al., 2012) est diminuée dans le côlon inflammé au cours de la MC. Or, STAT5 augmente l'expression de ZO-1 et diminue l'activité de NF κ B, donc l'expression de la MLCK ce qui rend la BEI moins perméable. Des modèles murins invalidés pour STAT5 sont également plus sensibles au développement d'une colite (Han et al., 2006).

Ainsi, la sécrétion de cytokines, l'altération du mucus, l'apoptose des CEI et l'altération des jonctions serrées concourent à l'augmentation de la perméabilité (Bojarski et al., 2001; Heller et al., 2005, 2008; Schulzke et al., 2009), élément clé de la pathogenèse des MICI (Figure 65).

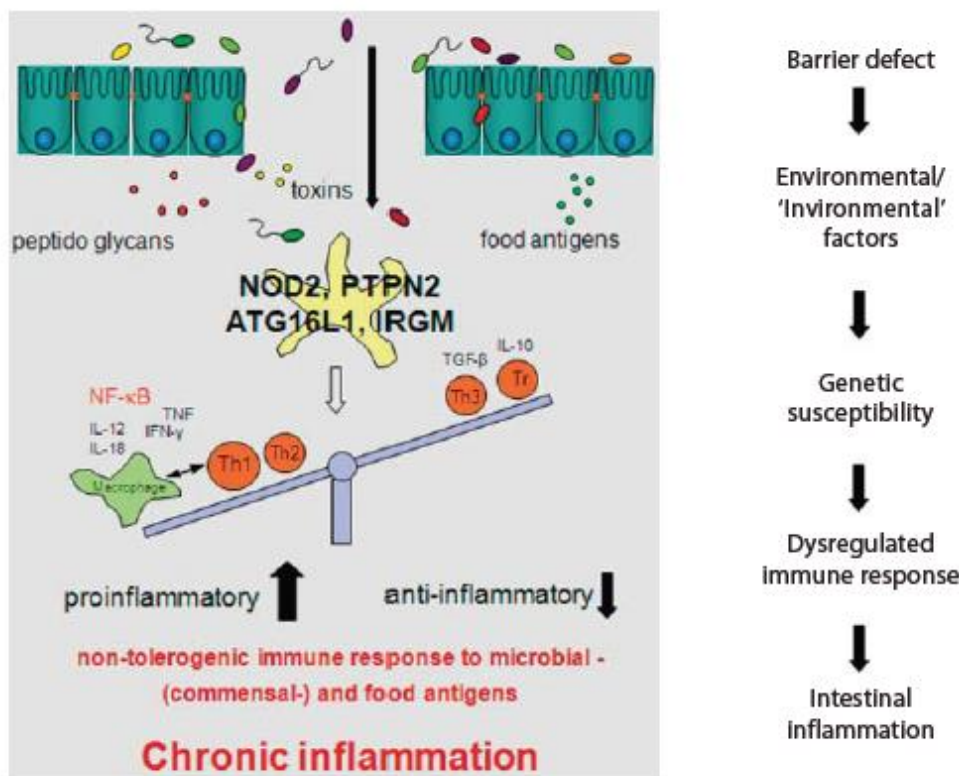


Figure 65: Modèle de la pathogenèse des MICI

Un défaut de la BEI notamment d'autophagie entraîne une pénétration des bactéries commensales et des pathogènes conduisant à un déséquilibre vers une réponse pro-inflammatoire qui serait à l'origine de l'inflammation intestinale chronique. D'après Scharl et Rogler 2012.

III.2.3 Les PRRs en pathologie inflammatoire

L'évolution de la réponse inflammatoire reste le résultat d'un déséquilibre de la balance entre des effets protecteurs et des effets délétères au cours des MICI. Ainsi, la dérégulation des TLRs et leur stimulation accrue induit une inflammation chronique et des dommages tissulaires (Cario and Podolsky, 2006; Rakoff-Nahoum et al., 2004). Les cytokines pro-inflammatoires ou le LPS peuvent aussi modifier l'expression des PRRs.

Pendant l'inflammation, l'expression des TLR-2 et -4 est augmentée (Hausmann et al., 2002). Le TNFα et l'IFNγ induisent l'augmentation de l'expression du TLR2 au niveau des astrocytes centraux (Phulwani et al., 2008). L'IFNγ augmente l'expression du TLR4 (Covacu

et al., 2010) et le LPS augmente l'expression du TLR-2 et -4 (Faure et al., 2001). La voie impliquée dans ces différentes régulations est celle du NFκB qui induit la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα. Le LPS active le TLR4 et via la voie NFκB, peut favoriser la survie (Anitha et al., 2012) ou induire la perte des neurones conduisant à l'inflammation intestinale (Arciszewski et al., 2005, 2008). Le taux de LPS circulant est retrouvé plus élevé chez les patients atteints de MICI (Caradonna et al., 2000). Le TLR4 des neurones sensitifs est impliqué dans la modulation de la douleur (Rumio et al., 2006) et un défaut d'expression protège des dommages liés à l'ischémie (Hua et al., 2007). D'autres données montrent que les TLR-2 et -4 sont activés par l'ischémie et que leur non fonctionnalité augmente la résistance à la mort induite par l'AVC (Tang et al., 2007, 2008a).

Des polymorphismes des TLRs sont associés aux MICI. Au cours des MICI, l'expression des TLR-3 et -4 est modifiée (Cario, 2010; Cario et al., 2000). L'expression des TLR-2 et -4 et de leur corécepteur transmembranaire CD14 est augmentée au niveau des CEI coliques au cours des MICI et au niveau de l'iléon pour la MC (Brown et al., 2014; Frolova et al., 2008). L'expression du TLR4 est augmentée à la surface des CEI et sa distribution est différente selon la pathologie. Il est retrouvé au niveau baso-latéral pour la RCH et au niveau apical pour la MC, ce qui peut impacter sur les réponses à la flore commensale (Cario and Podolsky, 2006; Vamadevan et al., 2010). Une surexpression des TLR-2 et -4 est retrouvée au niveau des cellules de la lamina propria, notamment des cellules dendritiques, et semble participer à l'altération de la reconnaissance microbienne avec pour conséquence une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de l'activation des effecteurs de l'immunité acquise (Hart et al., 2005; Niess, 2008). L'augmentation d'expression des TLRs conduit à l'activation du facteur NFκB dont la translocation dans le noyau induit une production massive de cytokines pro-inflammatoires : l'IL-1β, le TNFα, l'IL-6, l'IL-8 et le MCP-1 par les macrophages et production d'IL-1β, de TNFα et d'IL-8 par les CEI (Rogler and Andus, 1998; Rogler et al., 1998b). En revanche, les modèles murins invalidés pour le TLR-2, -4, -9 ou MyD88 ne développent pas spontanément de colite mais ont une plus grande susceptibilité à en développer suite à une induction chimique comme le DSS (Abreu, 2010; Cario, 2010). Les modèles invalidés pour le TLR2 développent une colite au DSS qui induit des altérations de l'architecture du SNE et du codage neurochimique, une réduction de motilité, des sécrétions mucosales anormales avec une baisse de GDNF (Brun et al., 2013). De plus, si la délétion du TLR3 protège d'une colite induite au DSS chez la souris,

la délétion du TLR5 entraîne le développement spontané d'une colite (Vijay-Kumar et al., 2007). La délétion de Mal, protéine adaptatrice de l'interaction TLR-MyD88, induit une colite sévère avec une grave inflammation (Aviello et al., 2014b). De plus l'expression du TLR5 et le taux de flagelline, son ligand spécifique, sont élevés chez les patients atteints de MICI, ce qui induit une production importante de TNF α altérant les fonctions de la BEI (Sitaraman et al., 2005). Enfin, une étude récente montre que les TLR-2, -3 et -4 sont impliqués dans l'inflammation intestinale à la fois par la dérégulation de la réponse immune mais également par un effet pro-oxydatif sur les CEI (Latorre et al., 2014).

Les NLRs sont impliqués dans l'inflammation (Lala et al., 2003) et le cancer (Saxena and Yeretssian, 2014). Les modèles de souris KO pour NOD2 ne développent pas spontanément une colite mais sont plus sensibles à son induction par le DSS. Ces souris présentent une diminution de l'expression des α -defensines par les cellules de Paneth parallèlement à une augmentation de la translocation bactérienne (Kaser et al., 2010; Ogura et al., 2003), comme pour des mutations de NOD2 (Koslowski et al., 2010) qui entraînent également une perte de l'inhibiteur de la réponse Th1 induite normalement par le TLR2 (Zelinkova et al., 2005). Ainsi, les variants de NOD2 sont associés à un défaut d'autophagie observé dans la physiopathologie des MICI. En effet, l'autophagie via ATG16L est alors inefficace (Kaser et al., 2010; Kobayashi et al., 2005).

L'activation de NF κ B est également retrouvée dans la muqueuse des patients atteints de MICI (Ellis et al., 1998; Schreiber et al., 1998). Si une inhibition de NF κ B a été suggérée comme bénéfique dans des modèles murins de colite (Davé et al., 2007; Neurath and Meyer zum Büschenfelde, 1996; Shibata et al., 2007), d'autres études ont montré que son inhibition entraînait la mort des CEI et la diminution de synthèse de peptides anti-microbiens responsables d'un passage accru de bactéries à travers la BEI (Pasparakis, 2009) (*Figure 66*).

Des modèles de souris KO pour la protéine NEMO au niveau des CEI développent spontanément une colite avec une perte de l'intégrité de la BEI, une diminution de la production de β -defensines 3 et une augmentation de la translocation bactérienne vers la muqueuse (Kaser et al., 2010; Nenci et al., 2007). La délétion d'IKK β atténue la formation des tumeurs associées à l'inflammation en induisant l'apoptose cellulaire (Greten et al., 2004).

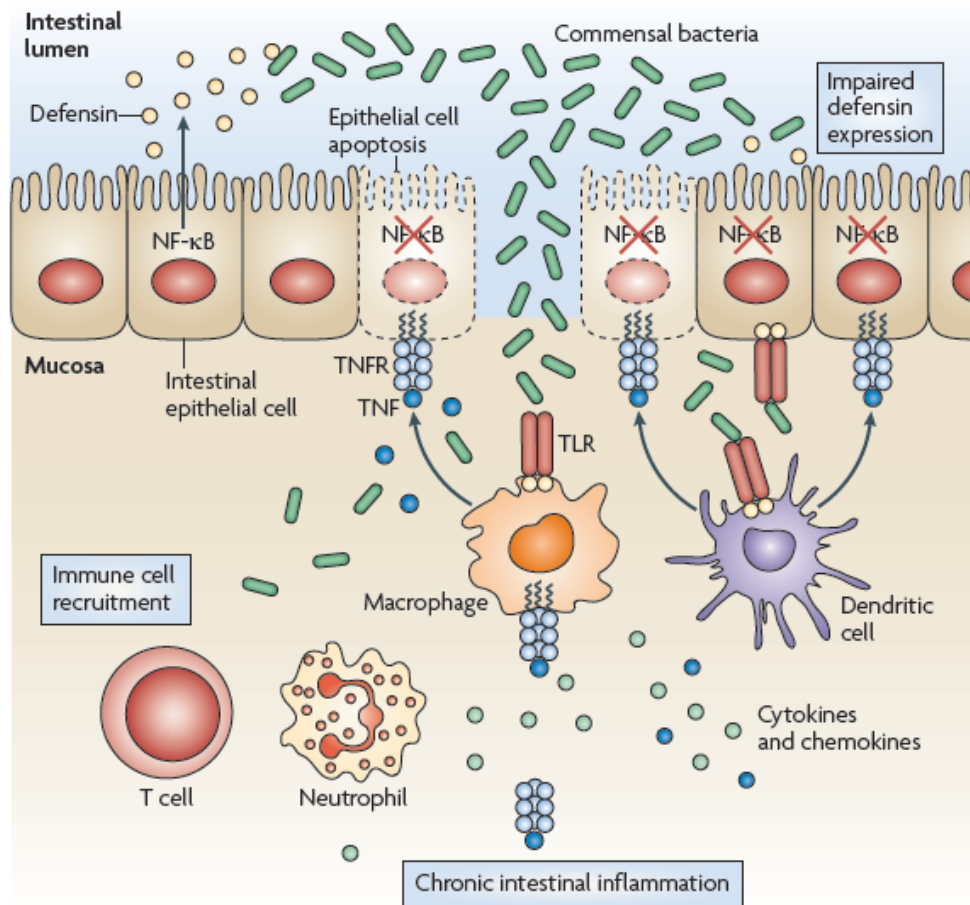


Figure 66: L'inhibition de NFκB dans les CEI perturbe l'homéostasie et provoque des colites chroniques.

L'inhibition de NFκB induit une augmentation de la mort des CEI ainsi qu'une diminution de synthèse de peptides anti-microbiens comme les α-défensines ce qui compromet l'intégrité de la BEI. Ce phénomène conduit à l'invasion de la muqueuse colique par les bactéries commensales et ainsi au développement d'une colite chronique via MyD88 et TNFRI. D'après Pasparakis et al., 2009.

III.2.4 Les cytokines en pathologie inflammatoire

La MC présente un profil de type Th1 c'est-à-dire un déséquilibre de sécrétion des cytokines pro-inflammatoires $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ (Brand, 2009) induite par l' $\text{IL-1}\beta$, l' IL-2 , l' IL-6 et le $\text{TNF}\alpha$ produit par des macrophages et des cellules dendritiques, dans le but d'éliminer les pathogènes intracellulaires en activant la production de métalloprotéinases par les fibroblastes, de chimiokines comme MIP-3 par les CEI, les cellules endothéliales et d'autres cellules immunitaires (Caprioli et al., 2008; Kaser and Tilg, 2012; Zenewicz et al., 2009). Cette réponse immune Th1 aberrante en réponse à des antigènes du microbiote (Duchmann et al., 1995) est caractéristique d'une maladie autoimmune (Baumgart and Sandborn, 2012; Zenewicz et al., 2009) qui suggère que la MC pourrait être considérée en partie comme une maladie autoimmune. La RCH présente un profil Th2 favorisé par la

production d'IL-5 et d'IL-13 qui induisent la sécrétion, comme dans l'allergie ou l'asthme, de nombreuses cytokines comme l'IL-13, l'IL-5, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-9, l'IL-25 et l'IL-10. L'IL-10 produites par les lymphocytes B, T, les CEI et les cellules dendritiques exerçant un rôle anti-inflammatoire en diminuant la production de TNF α et d'IL-12. L'IL-13 retrouvée en grande quantité dans la muqueuse des patients atteints de RCH est impliquée dans les lésions épithéliales (Heller et al., 2005).

D'autres phénomènes sont observés aux cours des MICI comme une up-régulation de la prolifération des lymphocytes Th17 avec une élévation de la production d'IL-17, d'IL-21, d'IL-22 et de TNF α (Kaser et al., 2010; Zenewicz et al., 2009). Les lymphocytes Th17 expriment l'IL-23-récepteur qui est retrouvé muté chez les patients atteints de MICI et aussi up-régulé par l'IL-6. De plus, l'IL-22 produite est pro-inflammatoire car elle stimule la production d'IL-6, d'IL-8 et d'IL-11 par les fibroblastes mais aussi d'IL-8, de TNF α , et de β défensines (Caprioli et al., 2008). Enfin, les cellules natural killer présentent, sous l'influence de l'IL-12, des effets cytotoxiques directs et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17, l'IL-22 et l'IL-13 (Middendorp and Nieuwenhuis, 2009). Des études ont également montré un défaut d'apoptose des cellules immunitaires notamment au cours de la MC (Ina et al., 1999) et une diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs qui ont un rôle crucial dans la suppression de l'inflammation via le TGF β (Bouma and Strober, 2003). Une augmentation du nombre de cellules dendritiques dans la muqueuse des patients est aussi observée (de Baey et al., 2003), ainsi que l'expression du CMHII (Krajina et al., 2003).

L'IL-1 β

Au cours de la MC, un taux élevé d'IL-1 β est retrouvé dans les tissus intestinaux, le sérum des patients, et est corrélé avec la sévérité de l'inflammation (Mahida et al., 1989; Olson et al., 1993; Reinecker et al., 1993; Schreiber et al., 1999; Woywodt et al., 1994; Youngman et al., 1993). De plus, son antagoniste naturel, l'IL-1ra, qui bloque l'inflammation en inhibant la production de prostaglandines et de leucotriènes (Cominelli et al., 1992; Ferretti et al., 1994), est retrouvé en quantité moindre chez les patients atteints de MICI (Cominelli and Pizarro, 1996; Heresbach et al., 1997a; Hyams et al., 1995). La source principale d'IL-1ra serait les macrophages de la lamina propria (Nishiyama et al., 1994). Enfin, des polymorphismes de l'IL-1 β et de l'IL-1ra sont associés aux MICI et à leur sévérité (Heresbach et al., 1997b; Manchanda et al.; Nemetz et al., 1999).

L'IL-6

L'IL-6 est une cytokine clé de l'inflammation aigüe et chronique. Sa production est induite par des facteurs inflammatoires comme le LPS, l'IL-1 β ou encore le TNF α (Lotz, 1993). Des taux élevés d'IL-6 sont mesurés au cours des MICI et le sIL-6R semble participer au maintien de la résistance des lymphocytes T de la muqueuse à l'apoptose durant la MC et ainsi contribuer à la poursuite de l'inflammation chronique (Atreya et al., 2000a, 2000b) (Figure 67).

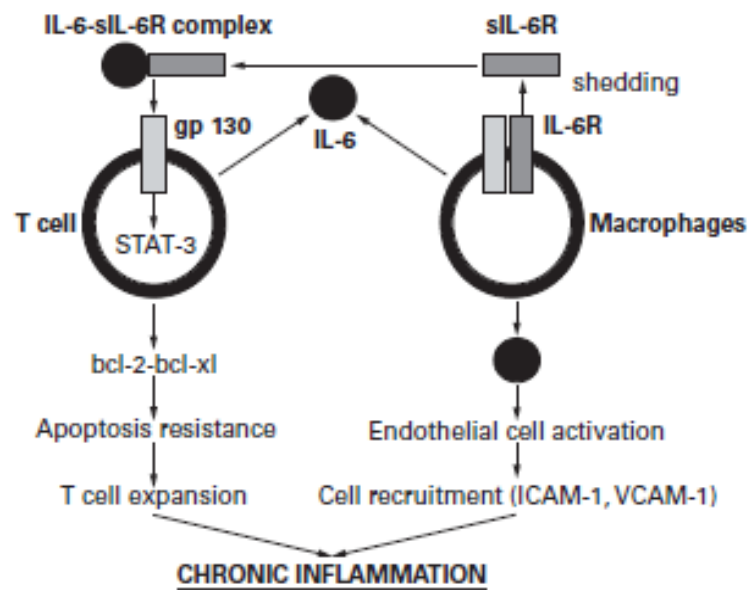


Figure 67 : L'IL-6, son récepteur et leur rôle dans l'inflammation chronique.

La forme soluble du récepteur à l'IL-6, sIL-6R forme un complexe avec l'IL-6 qui se lie à gp130 exprimé par les lymphocytes T et active via STAT-3, les gènes anti-apoptotiques bcl-2 et bcl-xl. Au niveau des macrophages, l'IL-6 peut induire l'expression de molécules d'adhésion pour le recrutement leucocytaire. Ces phénomènes participent à l'inflammation chronique et font de la voie de l'IL-6, une cible thérapeutique au cours des MICI. D'après Atreya et al., 2000.

L'IL-8 et l'IL-10

L'idée du rôle prépondérant de l'IL-8 dans l'inflammation a persisté jusqu'à la découverte du TNF α (van Deventer, 1997; Fiocchi, 1998). Sa production est accrue au cours des MICI. La sécrétion d'IL-8 peut être stimulée par le TNF α , l'IL-1 β et certaines toxines bactériennes et favorise la transmigration des neutrophiles en condition inflammatoire (MacDermott, 1999; McCormick et al., 1993). De nombreuses chimiokines sont surexprimées au cours des MICI, c'est le cas de l'IL-8, MCP-1, MCP-3, l'IP 10, MIP-1 (Banks et al., 2003; Stadnyk, 2002; Uguccioni et al., 1999). Des modèles de souris génétiquement modifiés, IL10 $^{-/-}$ ou TCRalpha $^{-/-}$ développent des colites spontanées en conditions normales mais pas en conditions axéniques (Arrieta et al., 2009; Balish and Warner, 2002; Kullberg et al., 1998).

Le TNF α

Des études ont montré qu'à faible dose, le TNF α protégeait contre les infections bactériennes et à forte dose, qu'il détruisait les tissus, provoquait un choc septique et participait au développement des MICI (Echtenacher et al., 1996; Malaviya et al., 1996). Il augmente la production d'IL- β , d'IL-6 et de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium. Le TNF α joue un rôle central dans la genèse des lésions intestinales en stimulant l'endothélium, en augmentant le recrutement leucocytaire et l'infiltrat inflammatoire (lymphocytes, neutrophiles) (Sanchez-Munoz et al., 2008; Williams et al., 1990). La dégranulation d'enzymes et la libération de radicaux libres participent aux lésions épithéliales et au remaniement tissulaire. Il augmente la perméabilité et renforce la présentation antigénique ce qui maintient l'inflammation. Le TNF α induit la cytotoxicité et l'apoptose via sa fixation au TNFRI et II, menant à l'activation de NF κ B. Les cellules de la lamina propria, de la muqueuse intestinale et les macrophages libèrent de grandes quantités de TNF α (Borruel et al., 2002; van Deventer, 1997; Reinecker et al., 1993; Rogler et al., 1998b; Targan, 2000). De plus, l'utilisation d'anticorps anti-TNF α , comme l'infliximab, induit des effets bénéfiques (Baert and Rutgeerts, 1999; Baert et al., 1999; D'haens et al., 1999; Ricart and Sandborn, 1999; Rutgeerts et al., 1999; Stack et al., 1997; Targan et al., 1997).

Enfin, au cours des MICI, les cellules de la lamina propria présentent une sécrétion augmentée de TNF α , d'IL-6 et d'IL1- β (Breese et al., 1994; Dionne et al., 1997; Reimund et al., 1996; Reinecker et al., 1993; Schreiber et al., 1999). Plus récemment, l'IL-21, -27 et 32 ont été identifiés comme des nouveaux acteurs des MICI (Fantini et al., 2007).

III.2.5 La voie des prostaglandines et du 15-HETE en pathologie inflammatoire

L'implication des PGs dans la physiopathologie des MICI a été évoquée dès 1977 (Gould et al., 1977). Cependant, l'exacerbation ou la réactivation des MICI induite par l'inhibition de leur synthèse par des AINS, suggère aussi un rôle bénéfique des PGs (Wallace, 1992). La prévalence des MICI peut être augmentée par un déséquilibre entre des apports en n-3 anti-inflammatoire et en n-6 pro-inflammatoire (Monk et al., 2012; Tyagi et al., 2012). Par exemple, l'acide α -linoléique (n-3) diminue l'expression de iNOS, COX-2, d'IL-6, d'IL-8 et de TNF α (Hassan et al., 2010). Cependant, l'étude d'Hokari et al montre que selon les n-3, l'effet peut être pro- ou anti-inflammatoire (Hokari et al., 2013).

Régulation des enzymes en pathologie inflammatoire

Tout d'abord, en ce qui concerne les enzymes des voies de synthèse, l'administration de LPS à des cultures d'astrocytes, induit via le TLR4 une surexpression de COX-2 et une diminution de l'expression de COX-1 conduisant à une production accrue de PGE₂ (Font-Nieves et al., 2012). L'expression de COX-2 dans les entérocytes peut aussi être induite par un traitement au LPS et impliquée l'EGFR (McElroy et al., 2012). De nombreuses études démontrent le rôle de COX-2 dans le développement du cancer colorectal associé ou non à une MICI (Agoff et al., 2000; Brown and DuBois, 2005). L'augmentation de l'expression de mPGES-1 a été observée chez des patients présentant une MICI (Subbaramaiah et al., 2004) et le LPS augmente également l'expression de mPGES-1 (Mancini et al., 2001; Yamagata et al., 2001). Les modèles murins invalidés pour mPGES-1 (Murakami et al., 2000) ont notamment suggéré que la mPGES-1 jouait un rôle essentiel dans la production de PGE₂ au cours des processus inflammatoires (Mancini et al., 2001; Yamagata et al., 2001). Ainsi, l'invalidation du gène mPGES-1 liée à COX-2 chez des souris soumises à une colite induite par du DSS, entraîne une exacerbation des symptômes, une perte des CEI et des abcès cryptiques alors que l'invalidation de mPGES-1 liée à COX-1 montre une diminution de la production de PGE₂ dans l'estomac des souris suggérant un rôle de PGE₂ dans la protection de la muqueuse intestinale et notamment gastrique (Boulet et al., 2004).

Enfin, la L-PGDS peut être induite par des stimuli inflammatoires. Ainsi, au sein du tube digestif, une augmentation de la L-PGDS a été retrouvée lors d'une infection par *Helicobacter pylori*. De même lors d'une colite induite au DSS chez des souris, une augmentation de l'expression transcriptionnelle de la L-PGDS a été observée. Cette augmentation étant associée à une exacerbation de la colite (Hokari et al., 2009). En revanche, un modèle de souris invalidées pour la L-PGDS soumises au DSS, ne présentait pas d'amélioration ni d'aggravation de la colite. De façon similaire, il a été observé le même phénomène chez des patients atteints de RCH (Hokari et al., 2011).

Régulation des métabolites et de leurs voies en pathologie inflammatoire

La PGE₂

La PGE₂ est décrite comme une PG pro-inflammatoire. Ainsi, au cours des MICI, des taux de PGE₂ importants ont été mesurés sur le site inflammatoire et sont corrélés à l'activité de la maladie (Sharon et al., 1978). Des modèles de colite induite au TNBS chez la souris ont également montré que la production de PGE₂ exacerbait le processus inflammatoire par

l'augmentation de la production des interleukines pro-inflammatoires IL-23 et IL-17 (Sheibanie et al., 2007). L'exposition à la PGE₂ induit une altération de la motricité en augmentant l'excitabilité électrique des neurones myentériques et altère également les sécrétions de la muqueuse comme PGF₂ et PGI₂ (Frieling et al., 1995, 1997; Manning et al., 2002). Cependant et de manière intéressante, un rôle anti-inflammatoire de la PGE₂ a été suggéré par l'utilisation des inhibiteurs de COX qui peuvent favoriser ou aggraver la maladie (Bjarnason et al., 1993). De plus, il a été montré que la PGE₂ était nécessaire pour supprimer les symptômes d'une colite et protéger l'épithélium contre les lésions induites par l'inflammation. Des souris invalidées pour COX-2 ou pour un récepteur de la PGE₂, le récepteur EP4 (PGE₂ receptor 4), sont plus sensibles au développement d'une colite expérimentale. A l'inverse, l'utilisation d'agoniste du récepteur EP4 améliorait la colite chez les souris sauvages (Kabashima et al., 2002; Morteau, 2000; Morteau et al., 2000). Enfin, la PGE₂ joue un rôle prédominant dans le développement tumoral colorectal, en se fixant à ces récepteurs et en activant ainsi plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération, l'angiogenèse, dans le maintien de la tumeur et dans sa progression (Greenhough et al., 2009; Wang and Dubois, 2006). L'ensemble de ces données suggère que la PGE₂ présente une dualité dans son fonctionnement. Elle intervient dans le processus inflammatoire lors d'une colite mais également au cours de la carcinogénèse colique. De plus, sa présence semble nécessaire au maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale.

La PGD₂

Des modèles de colites expérimentales suggèrent que la PGD₂ joue un rôle important dans la résolution de l'inflammation et dans le maintien des altérations des colonocytes et des fonctions de la BEI (Vong et al., 2010). Contrairement à la PGE₂ qui semble synthétisée surtout pendant la phase aigüe, la synthèse de PGD₂ semble plus modérée, tardive et persistante (Ajuebor et al., 2000; Vong et al., 2010; Zamuner et al., 2003, 2005). D'une part le rôle anti-inflammatoire de la PGD₂ a été suggéré par de nombreuses études. Dans un modèle de colite chez le rat, une rapide augmentation de la PGD₂ a été décrite associée à une diminution de l'infiltrat granulocytaire dans la muqueuse colique. Ces effets étaient probablement médiés par l'activation des récepteurs de la PGD₂, les récepteurs DP (Ajuebor et al., 2000). De plus, une étude sur des patients, atteint d'une RCH, en rémission depuis 5 ans au moins, a permis de mettre en évidence une concentration de PGD₂ colique importante. Cette étude suggère que la PGD₂ constitue un médiateur pro-résolutif de l'inflammation, dans

le cas de la RCH (Vong et al., 2010). De plus, lors d'une gastrite induite par *Helicobacter pylori*, l'expression de la L-PGDS est augmentée dans les fibroblastes et dans la muqueuse gastrique ainsi que la production de PGD₂. Ces résultats montraient que la PGD₂ jouait un rôle protecteur sur la muqueuse gastrique (Hokari et al., 2009).

D'autre part des études suggèrent également un rôle pro-inflammatoire de la PGD₂. Lors d'une colite induite par le TNBS chez le rat, il a été montré que l'activité de COX-2 et probablement de la PGD₂, participait au maintien de la sécrétion épithéliale et des dysfonctions de la BEI (Zamuner et al., 2003). Enfin, la production prolongée de PGD₂ après la résolution de colite favoriserait le processus de tumorigénèse colique (Zamuner et al., 2005). Cette hypothèse est également suggérée dans l'étude de Vong et al ou la production de PGD₂ dans la muqueuse pourrait à long terme favoriser l'apparition d'un cancer colorectal (Vong et al., 2010). Comme la PGE₂, la PGD₂ présente une dualité dans son fonctionnement. Elle protège contre le processus inflammatoire lors des phases précoces de l'inflammation. En revanche, la PGD₂ serait délétère sur le plus long terme en exacerbant l'inflammation et en favorisant la tumorigénèse. La dualité de ces effets serait liée aux voies de signalisation activées : l'effet bénéfique semblant passer via DP1 et PPAR γ (Rajakariar et al., 2007) tandis que l'effet délétère semble passer par DP2 connu pour son rôle dans la promotion de l'allergie (Fujitani et al., 2002).

En ce qui concerne la voie des acides hydroxyeicosatétraénoïques, la 15-LOX-2 est sous-exprimée dans la muqueuse colique humaine des patients atteints d'une RCH (Mangino et al., 2006) ce qui conduit à la fois à une réduction de la production de 15-HETE mais également de lipoxine A4 (Kaser et al., 2010; Mangino et al., 2006).

PPAR γ

Des études récentes suggèrent l'implication des bactéries dans la régulation de PPAR γ . L'augmentation de l'expression de PPAR γ par les microorganismes implique en partie la reconnaissance du LPS par le TLR4 exprimé par les CEI activées. De plus, l'expression de PPAR γ est diminuée dans les biopsies de patients atteints de la RCH mais maintenue pour la MC (Dubuquoy et al., 2003). L'implication de PPAR γ dans la régulation de l'inflammation intestinale a été démontrée par l'administration de troglitazone et de rosiglitazone à des souris avec une colite induite au DSS, qui réduit la sévérité de l'inflammation (Dubuquoy et al.,

Étude bibliographique

2000; Su et al., 1999). A l'heure actuelle, plus de vingt publications ont rapporté des effets similaires de PPAR γ chez différentes espèces (rat, souris, cochon) dans différents modèles de colite (induction chimique, bactérienne ou ischémie-reperfusion) comme dans des colites spontanées chez les souris IL-10 -/- (Tableau .VII).

Table 3 Anti-inflammatory properties of peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) in experimental models of inflammatory bowel diseases

Model	Modulators	Reference
Acute colitis		
DSS	Troglitazone	Su ⁹
	Rosiglitazone	Saubermann ⁷⁴
	Pioglitazone	Takagi, ⁷⁵ Schaefer ⁷⁶
	CLA	Bassaganya-Riera ⁵¹
TNBS	Troglitazone	Desreumaux ¹⁴
	Rosiglitazone	
	Pioglitazone	Schaefer ⁷⁶
	FMOC-L-leu	Rocchi ⁶³
	5-ASA	Rousseaux ⁶⁴
Ischaemia/reperfusion	Rosiglitazone	Nakajima ⁷⁰
	15-d-PGJ2	Cuzzocrea ⁵³
	NS-398	Sato ⁷⁷
	Glutamine	Sato ⁷⁸
	CLA	Hontecillas ⁵⁰
Bacteria induced colitis		
Chronic colitis		
DSS	Troglitazone	Tanaka ⁷⁹
TNBS	Rosiglitazone	Sanchez-Hidalgo ⁸⁰
CD4+CD45RBhigh	CLA	Bassaganya-Riera ⁵¹
IL-10 KO	Rosiglitazone	Lytle ⁷¹
SAMP1/YitFc	Rosiglitazone	Sugawara ⁷²
Genetic evidence		
PPAR γ +/–		Desreumaux, ¹⁴ Nakajima, ⁷⁰ Saubermann ⁷⁴
AdPPAR γ		Katayama ⁷³
SAMP1/YitFc		Sugawara ⁷²
PPAR γ ^{fl/fl} Cre ⁺		Bassaganya-Riera ⁵¹

5-ASA, 5-aminosalicylic acid; 15dPGJ2, 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2; CLA, conjugated linoleic acid; DSS, dextran sodium sulphate; FMOC-L-Leu, fluorenylmethyloxycarbonyl-L-leucine; IL-10 KO, interleukin 10 knockout mice; PPAR γ ^{fl/fl} Cre⁺, PPAR γ conditional knockout mice; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid.

Tableau VII: Propriétés anti-inflammatoires de PPAR γ dans des modèles expérimentaux de MICI.
D'après Dubuquoy et al., 2006.

Malgré ces données, peu d'études ont évalué le rôle de PPAR γ dans les MICI. Une diminution de 60% de l'expression de PPAR γ est observée dans les cellules épithéliales du côlon de patients atteints de RCH (Bouguen et al., 2014) en zones inflammées et saines, en comparaison aux patients atteints de MC ou contrôle. Une des hypothèses proposées est que des modifications épigénétiques de PPAR γ diminueraient son expression et des taux élevés de TLR4 dans les cellules épithéliales pourraient altérer la tolérance de la muqueuse au LPS luminal ce qui conduirait à une inflammation colique superficielle (Annese et al., 2012; Dubuquoy et al., 2003; Kaser et al., 2010) (Figure 68). Une étude récente de Sugawara et al a suggéré que PPAR γ était un gène de susceptibilité pour la MC en montrant le lien entre la maladie et la fréquence de deux polymorphismes (SNP) des allèles PPAR γ (Sugawara et al., 2005).

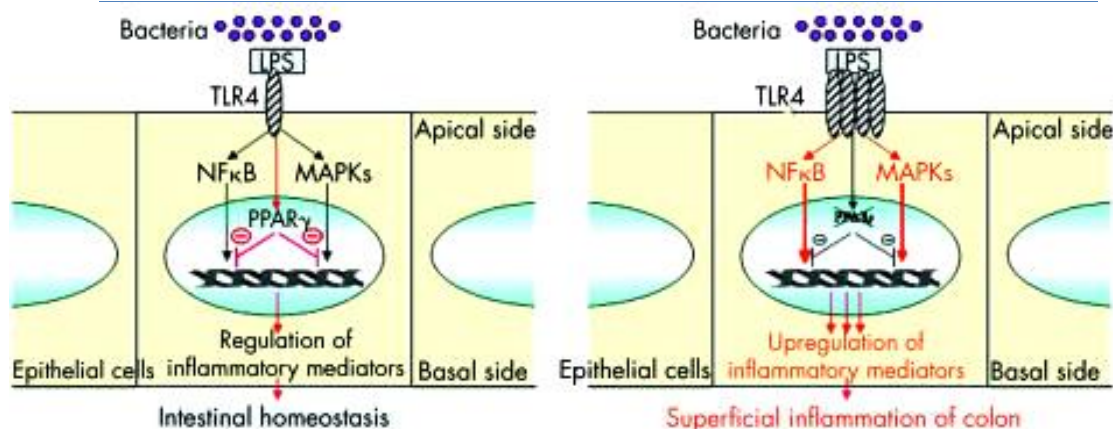


Figure 68: Modèle de la physiopathologie de la RCH impliquant la dégradation de PPAR γ induite par le TLR4. D'après Dubuquoy et al, 2006.

Il faut également noter que des niveaux d'expression élevés sont retrouvés dans l'épithélium au cours des cancers colorectaux, mais les données épidémiologiques permettant d'établir un lien hypothétique entre le cancer du côlon et PPAR γ sont en contradiction. En effet, d'une part, il a été établi une forte corrélation entre l'augmentation du risque de cancer et la consommation d'acides gras poly-insaturés qui sont des activateurs de PPAR γ (Giovannucci et al., 1994; Wasan et al., 1997). D'autre part, la réduction du risque de cancer a été associée à la prise d'AINS, qui sont également des activateurs de PPAR γ (Lehmann et al., 1995). De plus, PPAR γ aurait une action anti-tumorale par des effets anti-prolifératifs et pro-différenciateurs au sein des cellules épithéliales cancéreuses coliques humaines.

Nrf2

Le facteur de transcription Nrf2 est activé dans des macrophages stimulés par le LPS (Ashino et al., 2008; Srisook et al., 2005). Cette activation fait intervenir le monoxyde d'azote (NO) produit par les macrophages activés et conduit à l'expression des gènes antioxydants, des enzymes intervenant dans la synthèse du GSH et l'hème oxygénase (HO-1). Ces antioxydants pourraient limiter les effets collatéraux de l'inflammation liés aux espèces réactives de l'oxygène et du NO produits au cours de l'activation de macrophages et des neutrophiles (Dhakshinamoorthy and Porter, 2004). Une déficience en Nrf2 induit une diminution de la résistance transépithéliale en modifiant l'intégrité des jonctions serrées comme l'expression de la claudine 4 (Chen et al., 2014). Nrf-2 apparaît comme un modulateur important de l'inflammation et est envisagé comme une cible thérapeutique anti-inflammatoire (Innamorato et al., 2008; Thimmulappa et al., 2007). Comme PPAR γ , il semble que Nrf2 puisse protéger de la survenue de cancer mais également y participer (Osburn and Kensler; Ramos-Gomez et al., 2001) et que son activation diminue l'efficacité des chimiothérapies cancéreuses (Hayes and McMahon, 2006).

III.3 La neuro-inflammation

Les fibres nerveuses et les neurones entériques présentent des altérations au cours des pathologies digestives (*Tableau VIII*).

Pathologie	Atteintes des neurones
Maladie de Chagas	Perte massive dans les régions dilatées ou non
Entérocolite nécrosante	Neurodégénérescence
Atrésie	Diminution de la densité neuronale
Constipation sévère	Plasticité neurochimique
Diabète	Diminution de l'expression de la nNOS et mort neuronale
Maladie de Crohn	Plasticité neurochimique et mort neuronale
Rectocolite hémorragique	Plasticité neurochimique et mort neuronale

Tableau VIII: Atteintes des neurones au cours des pathologies digestives.
D'après Savidge et al., 2007.

III.3.1 Les neurones entériques, cibles de l'inflammation intestinale

Tout d'abord le premier argument suggérant l'implication des neurones dans l'inflammation est que la densité neuronale est corrélée à la sévérité de l'inflammation intestinale (Ray, 2011) et qu'elle est augmentée dans les régions inflammées durant les MICI (Margolis et al., 2011). Pourtant de nombreuses études rapportent une perte neuronale pendant l'inflammation, des modifications du codage neurochimique ou des propriétés électrophysiologiques (*Figure 69*). Ainsi, au cours de la RCH, une perte de 61% de neurones HuC/D⁺ (Bernardini et al., 2012) est mesurée.

Au cours de l'inflammation, une perte de l'innervation VIPergique dans la lamina propria et la sous-muqueuse est constatée (Kubota et al., 1992). Le VIP est le neurotransmetteur le plus commun de la neuroplasticité (Ekblad and Bauer, 2004) car il est le plus rapidement up-régulé dans les situations pathologiques. Il est retrouvé augmenté au cours de la MC (Belai et al., 1997). De même, chez les enfants ayant une MC, le plexus sous-muqueux présente une augmentation du nombre de neurones immunoréactifs pour le VIP, avec des neurones nitrergiques peu détectables sur un nombre total inchangé. En revanche, dans le plexus myentérique, une augmentation de neurones NOS est notée, sans différence pour les VIPergiques pour un nombre total toujours inchangé (Boyer et al., 2007).

Les modèles expérimentaux murins de colite induite chimiquement montrent d'autres altérations de l'innervation. Un modèle de colite au DSS provoque une augmentation de nNOS et de NPY qui conduit à augmentation de production de TNF α et une diminution de GSH (Chandrasekharan et al., 2008, 2013a). Des études montrent également une diminution des neurones cholinergiques (Collins et al., 1992), une augmentation de 5-HT (Coates et al., 2004) et de SP (Bernstein et al., 1993). Un premier modèle au TNBS de Jacobson démontrait une altération du plexus myentérique à la fois dans les régions inflammées et non inflammées (Jacobson et al., 1995). Par la suite, Lin et al ont montré une différence de réponse des neurones à l'inflammation avec une plus grande sensibilité des neurones exprimant le NGF (Lin et al., 2005). Parmi les neurones NGF⁺, les auteurs notaient une réduction des neurones excitateurs cholinergiques et ceux exprimant la calbindine et une augmentation des neurones nitrergiques conduisant à un déséquilibre entre les voies neurales excitatrices et inhibitrices (Lin et al., 2005). Une autre étude a montré que la colite au TNBS induisait une réduction de la transmission synaptique des neurones sécrétomoteurs de type VIPergiques et non cholinergiques pour un nombre de neurones inchangé, ce qui concorde avec l'étude de Abad et al (Abad et al., 2003). Ces changements dans les circuits nerveux du SNE contribuent aux dysfonctions sécrétoires localisées principalement au niveau du foyer inflammatoire (Hons et al., 2009). Une autre étude évalue une perte de neurones sous-muqueux VIPergiques sans changement des neurones nitrergiques, perte compensée par le GLP2 qui réduit l'inflammation et prévient la perte neuronale (Sigalet et al., 2010).

Enfin, les travaux de Mawe et al se sont intéressés aux modifications électrophysiologiques induites par le TNBS (Mawe et al., 2009). Ainsi, dans le plexus sous-muqueux et myentériques, les neurones AH présentent des potentiels d'action plus courts, insensibles à la TTX et deviennent hyperexcitables ce qui implique une diminution des sécrétions neuronales, une dysmotilité et une activation de COX-2 et d'autres prostaglandines. Pour les neurones de type S, seuls ceux avec des projections ascendantes sont hyperexcitables (Brierley and Linden, 2014). Dans ce modèle au TNBS, une perte de neurones des ganglions paravertébraux qui reçoivent des informations provenant du plexus myentérique, peut être constatée (Linden, 2012). Au contraire, une inflammation due à un stress oxydant comme l'H₂O₂ semble réduire l'excitabilité des neurones myentériques de rat en modifiant leur potentiel de membrane par l'inhibition des courants sodiques (Pouokam et al., 2009).

L'inflammation induit des changements morphologiques de l'ensemble du réseau nerveux, avec une hypertrophie des fibres nerveuses de la sous-muqueuse et de la muqueuse, ainsi qu'une hyperplasie et des dommages axonaux. Ces altérations sont associées à une hypertrophie et une hyperplasie des neurones surtout au cours de la MC (Geboes and Collins, 1998). Une induction de PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) par l'inflammation dans les neurones est un marqueur différenciant la MC de la RCH. PAI-1 est impliqué dans la régénération nerveuse après une lésion (Laerum et al., 2008).

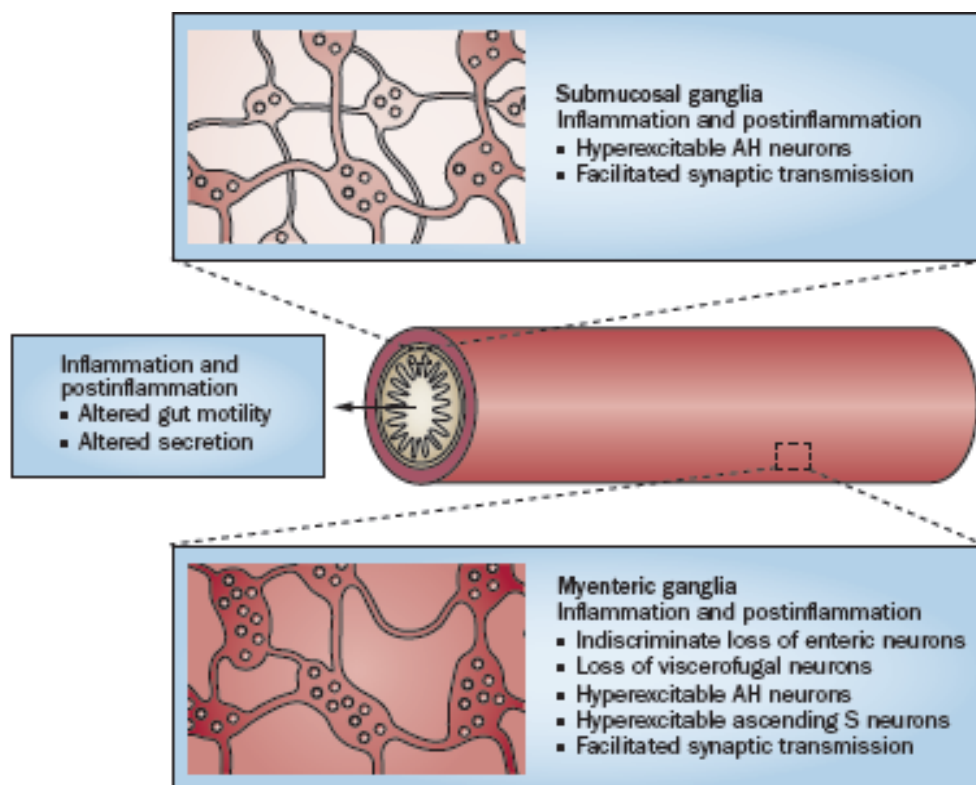


Figure 69: Neuroplasticité du SNE pendant et après l'inflammation intestinale.
D'après Brierley et Linden, 2014.

III.3.2 Les neurones entériques, acteurs de l'inflammation intestinale

L'implication des voies nerveuses extrinsèques est démontrée par les études de dénervation chirurgicale ou l'utilisation d'antagonistes de la SP ou de la CGRP, qui réduisent les manifestations de l'inflammation induites par l'infection par la toxine A de *C. Difficile* (Castagliuolo et al., 1994; Keates et al., 1998; Pothoulakis et al., 1994). Le rôle des voies nerveuses dans l'inflammation a également été démontré dans des modèles de colite. En effet, l'inhibition du récepteur à la SP ou un antagoniste du NPY réduit l'inflammation induite par

le DSS (Hassani et al., 2005; Stucchi et al., 2000) et un antagoniste de la SP diminue l'inflammation provoquée par le TNBS (McCafferty et al., 1994). La SP et la CGRP augmentent la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF α par les monocytes/macrophages (Cuesta et al., 2002; Laurenzi et al., 1990; Yaraee et al., 2003) et la SP induit la production d'IL-8 par les neutrophiles (Serra et al., 1994).

Dans des modèles murins de colite induite au TNBS, l'administration de VIP réduit la sévérité de l'inflammation en diminuant la production de TNF α , d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-12 et en augmentant celle de l'IL-10 (Abad et al., 2003). Le VIP induit la production d'IL-8 par les CEI (HT-29) via p38 et ERK1/2 (Toumi et al., 2004). La SP et son récepteur NK-1R sont impliqués dans de nombreux processus pathologiques et en particulier dans l'inflammation (Koon and Pothoulakis, 2006). Le VIP et le PACAP inhibent la sécrétion de chimiokines (MIP-2, KC, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 et RANTES) en inhibant la voie NF κ B (Delgado and Ganea, 2001) et diminuent la production d'IL-6 et de TNF α par les macrophages de souris stimulés au LPS (Delgado et al., 1999; Martinez et al., 1998). La somatostatine peut quant à elle inhiber la dégranulation des mastocytes au cours d'infection par *T. spiralis* (Vergara et al., 2002) et la sécrétion d'IL-8 et d'IL-1 β par des CEI traitées par du TNF α (Chowers et al., 2000b). De plus, des neurotransmetteurs comme le VIP ou le NPY participent également à l'activation du système immunitaire au cours de l'inflammation (Chandrasekharan et al., 2013b) (*Figure 70*).

De nombreuses études ont montré des sécrétions de cytokines pro-inflammatoires au sein des plexus du SNE sans identifier leur source, CGE ou neurones entériques. Cependant, une étude du laboratoire a clairement démontré, dans un modèle de co-culture muqueuse/sous-muqueuse, que les neurones sous-muqueux pouvaient sécréter de l'IL-8 en réponse à la production d'IL-1 β par la muqueuse durant une infection à *C. difficile*, ces résultats ayant été confirmés par des lignées neuronales (NT2-N et SH-SY5Y) traitées à l'IL-1 β (Tixier et al., 2005). Une autre étude a montré une immunoréactivité des neurones myentériques de l'estomac de rat pour l'IL-1 β et l'IL-6 en situation basale ou après stimulation au LPS, suggérant une production neuronale (Schicho et al., 2003).

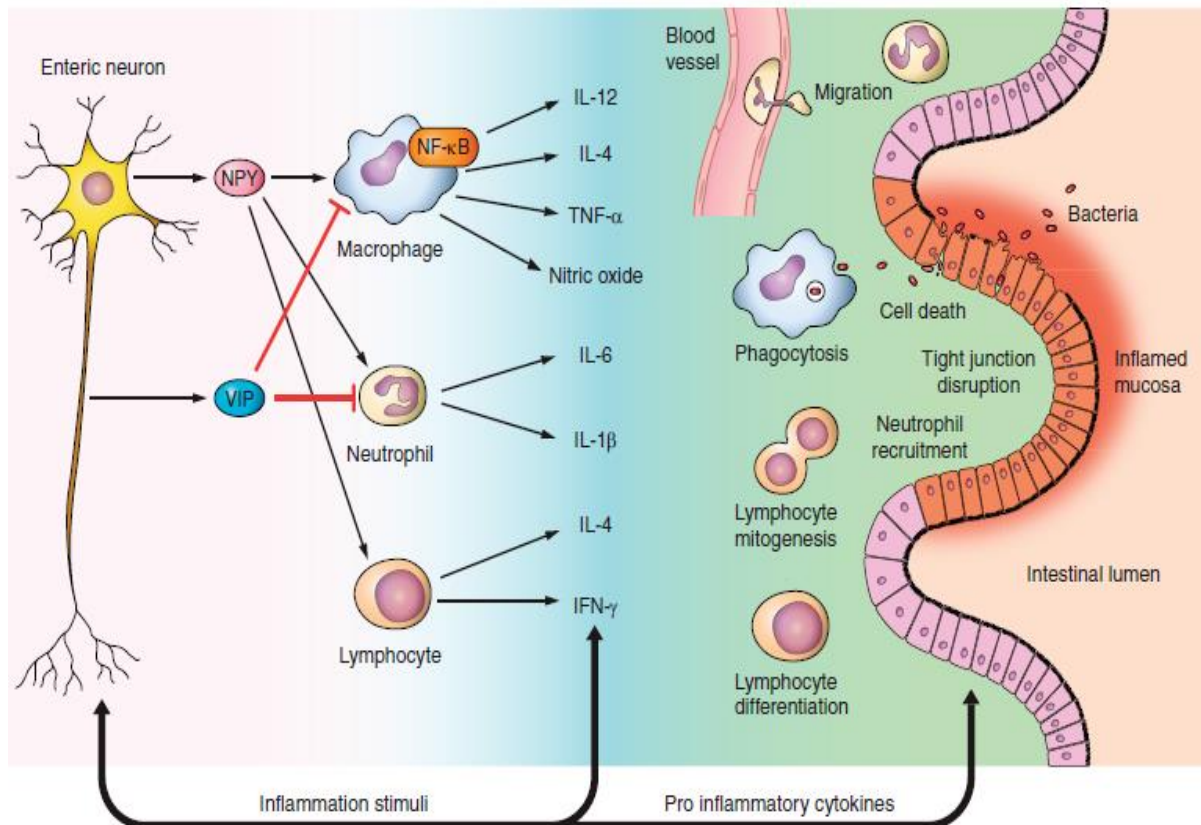


Figure 70: Les interactions entre le SNE et le système immunitaire régulent l'inflammation intestinale.

Des neurotransmetteurs comme le NPY et le VIP peuvent activer les cellules immunitaires (lymphocytes, macrophages et neutrophiles) induisant la libération de cytokines comme le $\text{TNF}\alpha$, l' IL-6 et l' $\text{IFN}\gamma$ qui peuvent activer en retour les récepteurs du SNE. Ces échanges modulent le recrutement des neutrophiles, la phagocytose, la production de cytokines, la mitogenèse et la différenciation des lymphocytes, la rupture des jonctions serrées et la mort cellulaire. D'après Chandrasekharan et al., 2013.

III.4 La glio-inflammation

De nombreuses études ont montré une altération du réseau glial au cours de pathologies diverses en particulier digestives fonctionnelles ou inflammatoires, telles que la constipation, la diverticulite ou encore les MICI. Cependant, l'implication fonctionnelle de ces altérations n'a pas été caractérisée. Ainsi, des modifications de l'expression des marqueurs gliaux sont observées au cours de nombreuses pathologies digestives (*Tableau IX*). L'implication des CGE dans les MICI sera détaillée dans les parties suivantes.

Pathologie	Atteintes des CGE
Maladie de Chagas	Perte gliale précède perte neuronale
Pseudo-obstruction intestinale chronique	Infection spécifique des CGE par le JC virus
Cancers colorectaux	Diminution de l'expression de S100 β dans les zones tumorales et en marge des tumeurs
Entérocolite nécrosante	Diminution de l'expression de la GFAP
Maladie coeliaque	Augmentation de l'expression de S100 β
Atrésie	Diminution de l'expression de la GFAP
Constipation sévère	Diminution de l'expression de S100 β et de la GFAP
Diverticulose colique	Diminution de l'expression de S100 β et de la GFAP
Diabète	Non déterminé
Maladie de Crohn	Diminution de l'expression de S100 β et de la GFAP dans les zones non-inflammatoires Induction de l'expression du CMHII
Rectocolite hémorragique	Augmentation de l'expression de S100 β et de la GFAP dans les zones inflammatoires

Tableau IX: Principales atteintes des cellules gliales entériques au cours de pathologies digestives.

D'après Savidge et al., 2007 ; Neunlist et al., 2008 ; Esposito et al., 2007 ; Villanacci et al., 2008 ; Wedel et al., 1998 ; Cornet et al., 2001, Geboes et al., 1992 ; Bassoti et al., 2005 et 2006 ; da Silveira et al., 2009 ; Selgrad et al., 2009 ;

III.4.1 Les modèles d'étude des cellules gliales entériques

L'implication directe des CGE dans le contrôle des fonctions gastro-intestinales a été établie grâce à la mise au point de modèles d'ablation des CGE *in vitro* et *in vivo*.

Le premier modèle établie par Bush et al est un modèle de souris transgénique exprimant la thymidine kinase du virus de l'herpès (HSV-TK) sous le contrôle du promoteur de la GFAP (Bush et al., 1998). Le traitement au ganciclovir induit une destruction spécifique des CGE car celui-ci est transformé par la TK en produits toxiques. Au bout de 6 jours, la perte massive se situe dans le jéjunum et l'iléon, les CGE restantes présentant des altérations. Au 11e jour, les souris développent une jéjuno-iléite fulminante avec des desquamations massives de l'épithélium, des altérations de l'architecture des cryptes, une hyperplasie, des infiltrats de leucocytes et de neutrophiles, une fibrose de la lamina propria, des nécroses tissulaires, une perforation transmurale, le tout accompagné d'une neurodégénérescence. Tous ces phénomènes conduisant à la mort au 19^e jour. Ce modèle a été repris par Savidge en 2007 et a permis de mettre en évidence le rôle des CGE sur les fonctions de la BEI via la libération de GSNO (Savidge et al., 2007b).

Le second modèle est un modèle de souris transgénique aboutissant à une destruction massive des CGE (Cornet et al., 2001). Il s'agissait d'un modèle double transgénique obtenu en croisant des souris exprimant l'hémagglutinine (HA) sous le contrôle de la GFAP et des souris exprimant le récepteur à l'HA au niveau de leurs lymphocytes. Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques reconnaissent l'HA et détruisent les CGE. Les souris développent une entérocolite fulminante avec des hémorragies, des ulcères, des perforations, des infiltrats et une désorganisation de la paroi intestinale et elles meurent en 4 à 5 jours. Une adaptation de ce modèle a été réalisée afin d'obtenir une destruction plus modérée du réseau glial (Aube et al., 2006). Il s'agit d'injecter à des souris exprimant l'HA sous le promoteur GFAP, des quantités définies de lymphocytes T CD8⁺ dirigés contre l'HA. Dans ce modèle, une modification du codage neurochimique est également observée avec une perte de neurones VIPergiques et SP dans le plexus sous-muqueux et de neurones nitrergiques dans le plexus myentérique, ce qui explique en partie l'altération du transit intestinal et le ralentissement de la vidange gastrique. La perméabilité intestinale est également augmentée.

Un troisième modèle utilise un agent gliotoxique, le fluorocitrate (Nasser et al., 2006). Il ne détruit pas les CGE mais inhibe leur métabolisme mitochondrial en inhibant l'aconitase, enzyme clé du cycle de Krebs. Le fluorocitrate a été décrit comme rentrant préférentiellement dans les astrocytes du SNC (Hassel et al., 1992). Suite à l'injection de fluorocitrate en IP pendant 7 jours, une diminution de la capture des dipeptides par les CGE est observée mais sans modification ni de leur morphologie, ni de leur nombre. Dans ce modèle, une altération du transit du grêle mais pas du côlon est observée.

L'ablation sévère ou modérée des CGE induit une augmentation de la perméabilité intestinale associée à une inflammation intestinale aiguë en cas d'ablation sévère (Savidge et al., 2007). Elle est associée à une augmentation de perméabilité vasculaire dans la muqueuse intestinale (Aube et al., 2006 ; Bush et al., 1998 ; Cornet et al., 2001).

III.4.2 Les cellules gliales entériques, cibles de l'inflammation intestinale

La glie réactive est définie comme une glie présentant une hypertrophie, une augmentation de prolifération, une augmentation de l'expression de GFAP notamment après stimulation au LPS et dans les zones inflammatoires. Ainsi, des altérations des CGE sont observées chez les patients avec des pathologies inflammatoires, mais également au cours de la constipation et de la diverticulite (Bassotti and Villanacci, 2011; Bassotti et al., 2007; Neunlist et al., 2008; Wedel et al., 2002).

Tout d'abord au cours des MICI une hypertrophie et une hyperplasie des CGE sont observées (Geboes and Collins, 1998). L'inflammation stimule la mitose et donc la prolifération des CGE myentériques (Bradley et al., 1997). Le nombre de CGE semble diminuer en zone non inflammatoire et augmenter en zone inflammatoire (von Boyen et al., 2006; Villanacci et al., 2008). De plus, une autre étude montre qu'au cours de la RCH, il y a une perte de 38% de CGE S100 β positives avec une augmentation du rapport CGE/neurones (Bernardini et al., 2012). D'autres études montrent également une réduction de la quantité de CGE au cours de la MC (von Boyen et al., 2011; Cornet et al., 2001). Cette hyperprolifération est aussi retrouvée par d'autres études chez les patients MICI (Collins et al., 1996 ; Geboes and Collins, 1998 ; Cirillo et al., 2001). L'IL-1 β augmente la prolifération des CGE *in vitro*, alors que l'IL-10 à faible dose supprime la prolifération et à forte dose l'augmente (Rühl et al., 2001) L'IL-1 β , le TNF α et le LPS augmentent la prolifération des CGE GFAP positives (Von Boyen et al., 2004) ainsi que les colites induites au TNBS (Bradley et al., 1997).

L'expression des marqueurs gliaux est altérée par l'inflammation intestinale. Ainsi, au cours des MICI, une perte d'immunoréactivité des fibres nerveuses S100 β est observée dans la lamina propria et associée à la sévérité de la pathologie (Kubota et al., 1992). L'étude de biopsies de patients atteints de la MC a montré une diminution de l'expression de la GFAP et de S100 β dans la muqueuse et la sous-muqueuse et dans les zones non inflammatoires (Cornet et al., 2001 ; Villanacci et al., 2008). Une augmentation de l'expression de la GFAP en zone inflammatoire a été mesurée chez les patients MICI, plus importante pour la RCH (Cornet et al., 2001 ; von Boyen et al., 2006). L'étude de Cirillo a montré une augmentation de l'expression de S100 β et de la iNOS au cours de la RCH (Cirillo et al., 2009). De plus,

l'ajout de TNF- α , d'IL-1 β ou de LPS induit l'expression de GFAP *in vitro* dans des cultures primaires de CGE de rat (von Boyen et al., 2004). Enfin, l'inflammation induite par l'IL-1 β et le TNF α , mais pas par l'IL-4 et l'IFN γ , augmente l'endothéline produite par les CGE. Or, les CGE expriment les récepteurs ET-A et ET-B ce qui par action autocrine de l'ET-1 conduit à la surexpression de la GFAP (von Boyen et al., 2010).

III.4.3 Les cellules gliales entériques, actrices de l'inflammation intestinale

Les CGE expriment de manière constitutive le CMHI. En revanche, le CMHII est induit au cours de l'inflammation dans les deux plexus. *In vitro*, l'IFN γ et le TNF α induisent l'expression du CMHII et de l'ICAM-1 par les CGE, ce qui augmente l'adhésion des lymphocytes T (Geboes et al., 1992). Les CGE deviennent ainsi des cellules présentatrices d'antigènes préférentiellement infectées par certains pathogènes comme *M. paratuberculosis* notamment impliqué dans la MC (Chamberlin et al., 2001), ce qui renforce leur implication dans l'étiologie de la MC (Sechi et al., 2007).

De plus, le LPS et l'IFN γ activent les CGE ce qui est démontré par une activation de c-fos et du CMHII, une augmentation de leur prolifération, une augmentation de l'expression de S100 β , de la GFAP et de la production NO par induction de l'expression de iNOS via l'interaction S100 β -RAGE (Cirillo et al., 2011). L'IL-1 β et le TNF α uprégulent l'expression de c-fos dans les CGE en cultures et dans les tissus (Cirillo et al., 2011; Rühl et al., 2001; Tjwa et al., 2003). Chez les patients atteints de la MC, les CGE de la muqueuse présentent des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires (Schreiber et al., 1999). Ainsi, les CGE sont capables de sécréter de l'IL-6 en réponse à l'IL-1 β et au TNF α (Rühl et al., 2001) mais elles peuvent aussi produire de l'IL-1 β et du TNF α (Rühl et al., 1994). Soumises au LPS, les CGE produisent de l'IL-1 β ce qui augmente l'activité PLA₂, COX-2 conduisant à la libération de PGE₂ qui augmente la réponse neuronale à la bradikinine (Murakami et al., 2009). Les CGE augmentent également la sécrétion de métalloprotéinases de la matrice (Lin et al., 2007).

Le TNF α et IFN γ induisent l'apoptose des CGE par l'activation des caspases 3/7 mais pas l'IL-6 ou l'IL-1 β (Steinkamp et al., 2012). Lors des MICI, la diminution d'expression du GDNF et du BDNF induirait une apoptose massive des CGE qui serait responsable de la perte

d'intégrité de la muqueuse et donc un passage accru des pathogènes luminaux et ainsi l'initiation du processus inflammatoire (Steinkamp et al., 2012). Cependant des données contradictoires montrent une augmentation de GDNF et de NGF au cours des MICI (DiMola et al., 2000 ; Steinkamp et al., 2003 ; von Boyen et al., 2006). De plus, les cytokines, en particulier l'IL-1 β et le TNF α , augmentent l'expression de GDNF par les CGE (Von Boyen et al., 2006; von Boyen et al., 2006) ce qui semble réduire l'inflammation, améliorer le transit colique retardé par le DSS (Liu et al., 2014), augmenter la libération de iNOS (Xiao et al., 2014) ou encore faciliter la réinnervation et le retour à l'homéostasie (Gougeon et al., 2013). De plus, la déplétion en facteurs neurotrophiques, NT-3 et NGF, aggrave la sévérité de l'inflammation dans un modèle murin de colite au TNBS (Reinshagen et al., 2000).

En ce qui concerne les conséquences fonctionnelles sur les neurones entériques, une altération des CGE peut conduire à une modification du codage neurochimique, comme observé dans les modèles d'ablation de glie entérique, avec une diminution de la proportion de neurones nitrergiques dans le plexus myentérique et une perte de neurones VIPergiques dans le plexus sous-muqueux conduisant à un ralentissement de la motricité intestinale (Aube et al., 2006). Pour les conséquences sur la BEI, au cours de la MC, les CGE altérées (Cabarrocas et al., 2003 ; Cornet et al., 2001) induisent une augmentation de la perméabilité de la BEI (Buhner et al., 2006; Söderholm et al., 2002) tout comme au cours de la RCH (Büning et al., 2012). Cette augmentation de perméabilité précède le développement de l'inflammation (Savidge et al., 2007). Des défauts de réparation imputés aux altérations des CGE sont également observées au cours de la RCH (MacDonald et al., 2005) et de la MC (Okamoto and Watanabe, 2005).

Les disparités dans les résultats observés sont vraisemblablement dues tant aux différences de modèles utilisés qu'aux marqueurs mesurés.

Objectifs de l'étude

L'analyse des données de la littérature mettent en évidence le rôle clé du système nerveux entérique (SNE) dans la physiologie du tube digestif mais son rôle dans la pathogenèse des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) est peu connu. En effet, via la libération de nombreux médiateurs (neurotransmetteurs, cytokines, médiateurs lipidiques), les neurones et les cellules gliales entériques (CGE) contrôlent l'homéostasie du tube digestif, en particulier en régulant les fonctions de la barrière épithéliale intestinale (BEI). Ces dernières sont majoritairement régulées par les médiateurs gliaux, le GSNO, l'EGF, l'IL-6, le TGF β et plus récemment identifié, le 15dPGJ₂ (Neunlist et al., 2012). De nombreuses études ont montré des altérations des CGE au cours des MICI, cependant il n'y a pas de données précises sur les modifications de production de leurs médiateurs et leurs conséquences fonctionnelles.

Ainsi, le premier travail présenté dans cette thèse avait pour but :

- 1) de montrer que le SNE est un acteur de l'inflammation intestinale en particulier via la production de cytokines pro-inflammatoires et d'identifier les voies de signalisation impliquées
- 2/ de caractériser les CGE isolées à partir de pièces opératoires de patients atteints de la maladie de Crohn (MC) (CGE pathologiques) par l'expression des marqueurs gliaux et la production de médiateurs en comparaison à des CGE issues de patients atteints de cancers (CGE contrôle)
- 3/ de mettre en évidence le rôle sur la BEI de glio-médiateurs dérivés de la PGD₂, la 15dPGJ₂ et le 11 β -PGF₂ α et le rôle du 15-HETE, ainsi que les mécanismes de signalisation impliqués.

Ce travail de thèse est présenté sous la forme de trois articles. Le premier article vient d'être accepté et visait à étudier l'implication du SNE dans l'inflammation intestinale et plus particulièrement la production de cytokines pro-inflammatoires, le TNF α et l'IL-6 et leur modulation par l'activation du SNE. L'activité du SNE peut être modulée par des stimulations électriques du système nerveux extrinsèque comme une stimulation des racines sacrées qui active le SNE et vient modifier les propriétés de la BEI (Annexe 3).

Objectifs de l'étude

Le second et le troisième article sont en préparation et sont complémentaires. Ils s'intéressent à la caractérisation des CGE de patients atteints de MICI, la production de médiateurs et les voies de signalisation impliquées. Pour ces deux études, un protocole de cultures primaires de CGE isolées à partir de tissus de patients a été utilisé (Annexe 5). Le deuxième article se focalise sur la production gliale de 15-HETE, son rôle sur la perméabilité de la BEI et les mécanismes impliqués. Le troisième porte sur la caractérisation des CGE de MC et en particulier la dysrégulation de la production de 15dPGJ₂ et de 11β-PGF₂α et son rôle dans le contrôle des fonctions de résistance, de prolifération, d'étalement des CEI et de réparation de la BEI

Deux autres articles sont présentés en annexe. L'annexe 2 présente la validation d'un modèle d'endoscopie pour analyser le SNE au sein de biopsies panpariétales dans un modèle porcin. L'annexe 4 porte sur la comparaison de l'endoscopie classique et de la microendoscopie confocale pour analyser les cryptes épithéliales de la muqueuse des patients atteints de la MC.

Résultats

Article 1: L'activation du système nerveux entérique module la réponse neuronale induite par le LPS

Présentation de l'article 1

Le SNE joue un rôle central dans la régulation des fonctions gastro-intestinales (Furness, 2012), et s'il a été montré qu'il peut protéger l'organisme vis-à-vis des pathogènes (Sharkey et Savidge, 2014), sa réaction propre à des agents infectieux ou même à un environnement inflammatoire reste mal défini. Cependant, il a été montré que le SNE est sensible à son environnement. En effet des analyses du SNE dans des modèles murins de colite ou dans des patients atteints de MICI ont mis en évidence une hyperplasie des neurones et des changements de leur codage neurochimique ainsi qu'une hypertrophie et une hyperexcitabilité neuronale (Geboes et Collins, 1998 ; Lomax et al., 2005 ; Vasina et al., 2006). Ces changements étaient associés à une augmentation de production de TNF α , et il est maintenant bien défini que le SNE est capable de répondre à des cytokines (Margolis et al., 2011 ; Lomax et al., 2006) et à des composants bactériens comme le LPS puisque les neurones et les CGE expriment des récepteurs aux cytokines comme le TNFR1, le TNFR2 (Chandrasekharan et al., 2013), ou l'ILR-1 (Stoffels et al., 2014), des Toll-like receptors, les TLR-2, -3, 4 et 7 (Rumio et al., 2006 ; Barajon et al., 2009 ; Anitha et al., 2012 ; Esposito et al., 2013 ; Turco et al., 2013 ; Brun et al., 2013). Les conséquences fonctionnelles de l'activation des TLRs restent mal connues, de même que la capacité du SNE à ne pas être seulement sensible mais plutôt réactif à des agents pathogènes. La réaction du SNE à une infection dépasse-t-elle les anomalies structurales observées ? L'activation du SNE module-t-elle cette réaction ?

Pour apporter des réponses à ces questions, nous avons voulu déterminer si le SNE pouvait répondre directement au LPS en synthétisant une cytokine pro-inflammatoire majeure, le TNF α et si l'activité neuronale pouvait moduler cette production *in vitro* et *ex vivo*.

Pour cette première étude, nous avons mesuré la réponse au LPS de cultures primaires de SNE mais également de plexus myentériques humains provenant de résections coliques de patients contrôles. L'impact de l'activation du SNE sur la production de TNF α en réponse au LPS a été évalué par l'activation électrique et chimique du SNE, et des analyses biochimiques nous ont permis de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans ces phénomènes.

Ce travail démontre pour la première fois que le SNE et en particulier les neurones entériques produisent du TNF α en réponse au LPS via l'activation des voies ERK et AMPK. De plus, l'activation neuronale est capable d'inhiber cette synthèse de réduire l'expression du TLR2 et de moduler la production d'IL-6. Ces données renforcent l'idée que le SNE est un acteur important dans la réponse inflammatoire et surtout que l'activation neuronale serait anti-inflammatoire confirmant la piste thérapeutique de l'activation vagale ou celle des racines sacrées pour moduler le SNE.

Cet article a été soumis le 6 juin 2014 à Journal of Neuroinflammation et est actuellement en révision.

Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system

Sabrina Coquenlorge^{1, 2, 3, 4}

Email: sabrina.coquenlorge@univ-nantes.fr

Emilie Duchalais^{1, 2, 3, 4}

Email: emilie.duchalais@gmail.com

Julien Chevalier^{1, 2, 3, 4}

Email: julien.chevalier@univ-nantes.fr

Francois Cossais^{1, 2, 3, 4}

Email: francois.cossais@mri.bund.de

Malvyne Rolli-Derkinderen^{1*, 2, 3, 4, †}

Email: malvyne.derkinderen@univ-nantes.fr

Michel Neunlist^{1*, 2, 3, 4, †}

Email: Michel.Neunlist@univ-nantes.fr

¹ Neuropathies of the enteric nervous system and digestive diseases, INSERM UMR913, School of Medicine, University of Nantes, 1, rue Gaston Veil, Nantes F-44035, France

² University of Nantes, 1 quai de Tourville, BP 13522, Nantes, Cedex 1 F-44035, France

³ Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, Hopital Hôtel-Dieu, 1 place Alexis Ricordeau, Nantes F-44093, France

⁴ Centre de Recherche en Nutrition Humaine, Hopital Hôtel-Dieu, 1 place Alexis Ricordeau, Nantes F-44093, France

[†] Equal contributors.

Abstract

Background

Evidence continues to mount concerning the importance of the enteric nervous system (ENS) in controlling numerous intestinal functions in addition to motility and epithelial functions. Nevertheless, little is known concerning the direct participation of the ENS in the inflammatory response of the gut during infectious or inflammatory insults. In the present study we analyzed the ENS response to bacterial lipopolysaccharide, in particular the production of a major proinflammatory cytokine, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α).

Methods

TNF- α expression (measured by qPCR, quantitative Polymerase Chain Reaction) and production (measured by ELISA) were measured in human longitudinal muscle-myenteric plexus (LMMP) and rat ENS primary cultures (rENSpc). They were either treated or not treated with lipopolysaccharide (LPS) in the presence or not of electrical field stimulation (EFS). Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) pathways was analyzed by immunocytochemistry and Western blot analysis. Their implications were studied using specific inhibitors (U0126, mitogen-activated protein kinase kinase, MEK, inhibitor and C compound, AMPK inhibitor). We also analyzed toll-like receptor 2 (TLR2) expression and interleukin-6 (IL-6) production after LPS treatment simultaneously with EFS or TNF- α -neutralizing antibody.

Results

Treatment of human LMMP or rENSpc with LPS induced an increase in TNF- α production. Activation of the ENS by EFS significantly inhibited TNF- α production. This regulation occurred at the transcriptional level. Signaling analyses showed that LPS induced activation of ERK but not AMPK, which was constitutively activated in rENSpc neurons. Both U0126 and C compound almost completely prevented LPS-induced TNF- α production. In the presence of LPS, EFS inhibited the ERK and AMPK pathways. In addition, we demonstrated using TNF- α -neutralizing antibody that LPS-induced TNF- α production increased TLR2 expression and reduced IL-6 production.

Conclusions

Our results show that LPS induced TNF- α production by enteric neurons through activation of the canonical ERK pathway and also in an AMPK-dependent manner. ENS activation through the inhibition of these pathways decreased TNF- α production, thereby modulating the inflammatory response induced by endotoxin.

Keywords

Enteric nervous system, LPS, TNF- α , AMPK, ERK

Background

The enteric nervous system (ENS), composed of neurons and enteric glial cells (EGC), is a central regulator of gastrointestinal functions encompassing gut motility, electrolyte transport and intestinal epithelial barrier (IEB) functions [1]. Recently, the ENS has been recognized as a major player in gut protection in response to pathogen or inflammatory insult [2]. Conversely, the ENS is also affected in disease, in particular in inflammatory bowel diseases (IBD). Alterations in ENS functions and phenotype (altered excitability and neuroplastic changes) occur in IBD [3,4]. These changes are associated with gastrointestinal (GI) dysfunctions such as altered motility, diarrhea and even pain. The ENS could also be directly involved in the inflammatory response to infectious or inflammatory challenges. Indeed, in animal models of colitis, enteric neuronal hyper- and hypoplasia was associated with

increased and reduced production of TNF- α , respectively [5]. In addition, hypertrophy and hyperplasia of enteric neurons has been reported in IBD [6]. However, the mechanism responsible for neuronal modulation of the severity of inflammation remains unknown. Being putatively due to the modulation of neuroimmune interactions, it is tempting to speculate that enteric neurons could directly produce and regulate key cytokines involved in IBD.

During inflammation, the ENS responds to a wide range of mediators, such as cytokines [7]. The ENS can also respond to bacterial challenges such as lipopolysaccharide, as it expresses a wide array of toll-like receptors (TLRs). Enteric neurons express TLR4 [8,9]. TLR3 and TLR7 are expressed in the myenteric and submucosal plexi. TLR3, TLR4 and TLR7 are also expressed in EGC [10-13]. The functional consequences of the activation of TLRs by their ligands in enteric neurons remain largely unknown. TLR2 was nevertheless shown to be necessary for maintaining ENS integrity and protection from colitis [14]. Stimulation of TLR4 in EGC induced the release of nitric oxide [12]. However, the ability of enteric neurons to respond to lipopolysaccharides (LPS) and to synthesize cytokines such as TNF- α , as well as the signaling pathways involved, remain unknown.

The overall aim of this study was to determine whether the ENS can directly respond to LPS by producing the major proinflammatory cytokine TNF- α , and whether ENS activity can modulate this production.

Methods

Generation of enteric nervous system cultures

Rat ENS primary cultures (rENSpc) were performed as previously described using the small intestines of E15 Sprague-Dawley rat embryos (Janvier Laboratories SA, Le Genest-St-Isle, France) [15]. These procedures were approved by the local Animal Care and Use Committee (agreement E. 44011; INSERM, Nantes, France). Briefly, the small intestines of rat embryos were removed, diced in Hank's Buffered Salt Solution (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, United States) and collected in 5 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-F12 (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, California, United States) (1:1) for digestion at 37°C for 15 minutes in 0.1% trypsin (Sigma-Aldrich). The trypsin reaction was stopped by adding medium containing 10% fetal calf serum and then treated by DNase I 0.01% (Sigma-Aldrich) for 10 minutes at 37°C. After triturating with a 10 mL pipette, cells were centrifuged at 750 rpm for 10 minutes. Cells were counted and then seeded at a density of 2.4×10^5 cells/cm² on 24-well plates previously coated with a solution of gelatin (0.5%; Sigma-Aldrich) in sterile phosphate buffered saline. After 24 hours, the medium was replaced with a serum-free medium DMEM-F12 (1:1) containing 1% of N-2 supplement (Life Technologies). Cultures were maintained for 14 days. Using this method, rENSpc is composed of well-organized ganglia interconnected by interganglionic fiber strands forming a network that lays on a smooth muscle cells monolayer (smooth muscle actin or SMA positive cells). Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis, aimed to reveal the cellular composition of the rENSpc, revealed that enteric neurons and glial cells represent 5 to 6% and 20 to 40%, respectively, of cells present in culture (personal observation). Half of the medium was replaced every other day and the day before the experiment.

Enteric nervous system treatments

The rENSpc were treated with lipopolysaccharides (*Escherichia coli* and *Salmonella typhosa*; 1:1, Sigma-Aldrich) at 0.1 µg/ml for the indicated time, except for Figure 1A, where different concentrations were tested. For the purpose of establishing which pathways and receptors are implicated in TNF-α and TLR2 regulation, U0126 (mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 or MEK1/2 inhibitor; 10 µM), compound C (5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) inhibitor; 10 µM) (Calbiochem, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, United States) and anti-rat TNF-α (1 and 10 µg/ml; eBiosciences, San Diego, California, United States) were added 30 minutes prior to the addition of LPS or ENS stimulation. Pam3CSK4 (TLR1/2 agonist; 100 ng/ml; Invivogen, San Diego, California, United States), A438079 (selective P2X₇ antagonist; 30 µM; Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom), adenosine-5'-triphosphate (ATP) (100 µM) and 2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine-5'-triphosphate triethylammonium salt (BzATP) (selective P2X₇ agonist; 100 µM; Sigma-Aldrich) were also used to treat ENS plus or minus LPS.

Enteric nervous system activation

To study the effect of neuronal activity on cytokine secretion, rENSpc were electrically stimulated in 24-well plates fitted with a pair of platinum electrodes connected to an electrical stimulator (DualImpedance Research Stimulator, Harvard Apparatus Ltd, Edenbridge, United Kingdom). The electrical field stimulation (EFS) parameters used were trains of constant current pulses (pulse duration: 20 µs; amplitude: 8 V; frequency: 15 Hz) applied for seven hours, with reversal of electrode polarity every 30 minutes, and supernatants and lysates were collected after 24 hours for ELISA TNF-α measurements and quantitative PCR (qPCR). Neuronal activation was verified by analysis of *c-Fos* expression after seven hours of EFS (Additional file 1). Putative neuronal damage induced by EFS was also verified. Following seven hours of EFS, no change in neuron-specific enolase (NSE) in the culture medium or in protein gene product (PGP)9.5 expression was observed as compared to control (non-stimulated condition), suggesting that EFS did not affect neuronal viability. Neuronal activity during the seven hours was also measured using an essential neuromediator, ATP.

Enteric glial cells

Primary cultures of human and adult rat EGCs were obtained according to the procedure described by Soret *et al.* [16]. Briefly, human EGC were originated from colonic resections of patients with colorectal cancer (according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Human and registered under the number DC-2008-402). Adult rat EGC were obtained from entire small intestines of Sprague-Dawley rats. After dissection of rat or human segments, the remaining longitudinal muscle-myenteric plexus (LMMP) was placed in GentleMACS tubes C in a GentleMACS dissociator (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Germany) for enzymatic digestion (250 µl protease, 5 g/l⁻¹; 250 µl collagenase, 20 g/l⁻¹; 400 µl bovine serum albumin, 50 g/l⁻¹; Sigma-Aldrich) and mechanical dissociation in DMEM/F12 medium (supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 1.1 µg/ml amphotericin B, 20 µg/ml gentamicin, 6 mM glutamine and 2.1 g/l NaHCO₃; Life Technologies). Following gentle agitation at 37°C, pellets were washed and resuspended in DMEM/F12 complete medium. The suspension was placed under a microscope and ganglia were picked up using a pipette with a sterile tip and seeded in 24-well plate coated with gelatin. After 48 hours, the medium was entirely replaced and only EGC proliferated to reach confluency after two to four weeks. The primary cultures

of EGC from rat embryos (JUG2 cell line) was obtained as described by Bach-Ngohou *et al.* [17] and derived from ENS primary culture after trypsinization and differential centrifugation. EGC were treated with LPS at a concentration of 0.1 µg/ml for seven hours before collecting supernatants.

Human tissue experiments

Colonic segments were pinned in a dissection dish containing ice-cold, sterile oxygenated Krebs solution (Sigma-Aldrich). Mucosae, submucosal and circular muscles were carefully removed under a dissection microscope and the remaining LMMP was placed in a 24-well plate containing DMEM/F12 complete medium (supplemented as in EGC primary culture procedure). The following day, the medium was replaced with 1:1 DMEM-F12 containing 1% N-2 supplement, and specimens were electrically stimulated with the same equipment and parameters as for rENSpc stimulation. After seven hours, supernatants and lysates were collected and tissues were weighted to normalize the ELISA analysis.

Immunofluorescence

After treatments, rENSpc were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde at room temperature for 30 minutes. Following pre-incubation in PBS containing 5% donkey serum and 0.5% Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich) for 30 minutes, cells were incubated with the following primary antibodies overnight at 4°C: rabbit anti-phospho-p44/p42 (P-ERK), rabbit anti-phospho-acetyl coenzyme A (CoA) carboxylase (P-ACC; 1:500; Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, United States), goat anti-TLR2 (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, United States), and goat anti-TNF-α (1:200; Santa Cruz Biotechnology). Anti-rabbit and anti-goat conjugated to Cyanine3 (1:500; Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, United States) were used as secondary antibodies for one hour. In the following step, the cells were labelled with primary antibodies for neuronal or glial markers: mouse anti-Hu (1:200; Molecular Probes®, Life Technologies), rabbit anti-PGP9.5 (1:1,000; Ultraclone Limited, Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France), mouse anti-Sox10 (1:500; R&D systems, Minneapolis, Minnesota, United States), rabbit anti-S100b (1:1,000; DakoCytomation, Glostrup, Denmark), mouse anti-S100b (1:1,000, Abcam, Cambridge, United Kingdom), and mouse anti-β-tubulin III (1:1,000; Sigma-Aldrich). After secondary antibodies (FluoProbes™488; 1:200; Interchim or Cyanine5; 1:200; Jackson ImmunoResearch), images were acquired with an Olympus IX 50 fluorescence microscope coupled to a digital camera (model DP71, Olympus), analyzed with Cell B software (Soft Imaging System, Olympus), and treated with Image J software (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, United States).

Immunoblotting

ENS cells cultured for different times (as indicated), with or without stimuli, LPS or agonists, were lysed in RA1 (Nucleospin RNAII, Macherey-Nagel, Düren, Germany) to separate RNA and proteins. Proteins were precipitated and pellets were resuspended in Phosphate-buffered saline/tris (2-carboxyethyl)phosphine (PSB/TCEP) (Macherey-Nagel). Samples were processed for electrophoresis using NuPAGE™ MES SDS buffer kit (Life Technologies) and separated on 4 to 12% Bis-Tris gels (NuPAGE, Life Technologies). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes with the iBlot™ system (Life Technologies). After blocking with Tris-buffered saline (TBS), 0.1% Tween 20 and 5% nonfat dry milk for one hour, blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBS and 5% nonfat dry

milk for rabbit anti-phospho-Thr172-AMPK (P-AMPK), rabbit anti-AMPK, rabbit anti-phospho-p44/p42 (P-ERK), rabbit anti-p44/p42 and rabbit anti-phospho-Acc (1:500; Cell Signaling Technology), and mouse anti-beta-actin (1:5000; Sigma-Aldrich). Immunoblots were probed with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Life Technologies) and visualized by chemiluminescence (ECL Crescendo or Forte, Merck Millipore). Quantitative analysis was performed using Image J software. The value of phosphorylated and total protein immunoreactivity was normalized to the amount of β -actin immunoreactivity and expressed as the fold increase relative to the control, taken as 1.

Real-time quantitative PCR analysis

According to the manufacturer's recommendations, total RNA extraction from cells was performed with Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) and 1 μ g purified RNA was denatured and processed for reverse transcription using Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies). PCR amplifications were performed using the Absolute Blue SYBR green fluorescein kit (Roche, Basel, Schweiz) run on a Rotor-Gene (Qiagen, Venlo, The Netherlands). The following primers were used:

S6 number: [GenBank:NM_001010].

Forward primer: 5'-CCAAGCTTATTCAGCGTCTTGTTACTCC-3'.

Reverse primer: 5'-CCCTCGAGTCCTTCATTCTCTTGGC-3'.

TNF- α number: [GenBank:NM_012675.3].

Forward primer: 5'-CTCATTCCTGCTCGTGCGGG-3'.

Reverse primer: 5'-TACGACGTGGGCTACGGGCTT-3'.

TLR2 number: [GenBank:NM_198769.2].

Forward primer: 5'-CAGATGGCCAGAGGACTCA-3'.

Reverse primer: 5'-AATGGCCTTCCCTTGAGAG-3'.

Relative quantification of gene expression was determined using the standard curve method and endogenous control ribosomal protein S6 mRNA. The ratios, TNF- α /S6 or TLR2/S6, were compared with control experimental conditions normalized to 1.

ELISA

The concentrations of TNF- α and IL-6 were determined in rENSpc and human LMMP specimen culture supernatants by ELISA (BD OptEIA™ ELISA Set, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, United States) according to the manufacturer's instructions. Absorbance measurements were performed at 450 nm on a spectrophotometric enzyme-linked immunosorbent sandwich assay (ELISA) plate reader (Varioskan™, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, United States) using the SkanIt software (Thermo Scientific). For human LMMP specimens, the TNF- α concentration was expressed related to the weight of the specimen.

Statistical analysis

Data resulted from independent experiments performed in duplicate or triplicate. Statistical significance was evaluated using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, United States). For time- and dose-dependent experiments, a two-way ANOVA test followed by a Bonferroni *post-hoc* test was used. The time-dependent response to LPS in Western blots was analyzed with a Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA test, followed by Dunn's *post-hoc* test. The differences between groups were calculated by a two-tailed Student's *t*-test for nonparametric and unpaired data, or by Mann-Whitney U test.

Results

Neurons of the enteric nervous system produce TNF- α in response to lipopolysaccharide stimulation

To determine whether the ENS could respond to LPS by producing proinflammatory cytokines, we measured TNF- α concentrations in the supernatants of rENSpc treated with different concentrations of LPS for two to 24 hours. We have verified that neurons of the rENSpc expressed the TLR4 and were thereby able to respond to LPS (Additional file 2). The TNF- α concentration was significantly increased after eight hours of 1 μ g/ml LPS stimulation, and between 12 to 24 hours for LPS concentrations ranging from 0.01 to 1 μ g/ml (Figure 1A). We chose the intermediate LPS concentration (0.1 μ g/ml) for the rest of the study. Using immunocytochemistry, we further aimed to identify the ENS cell type (neuronal or glial) expressing TNF- α . In rENSpc, enteric neurons were organized in ganglia connected to each other by interganglionic fiber strands as demonstrated by immunostaining using β III-tubulin (Tuj) antibody (Figure 1B). EGCs, identified by S100 β immunostaining, were also present in enteric ganglia (Figure 1B). We showed that in rENSpc treated with LPS for 24 hours, TNF- α immunoreactivity was detected in the cytoplasm of Tuj-positive cells, but not in S100 β -positive cells (Figure 1B). To confirm that EGC do not produce TNF- α , we measured TNF- α production from human, adult and embryonic rat EGC in response to treatment with LPS. None of these cells responded to LPS treatment with an increase in TNF- α production (Figure 1C). Our results show that enteric neurons are the cells of the rENSpc producing TNF- α in response to LPS stimulation.

Figure 1 Enteric neurons produce TNF- α in response to LPS stimulation. (A) rENSpc were treated in a time- and dose-dependent manner with LPS. Quantification of TNF- α secretion was measured by ELISA. Values represent the mean $\pm$ SEM of between three and seven independent samples per condition (two-way ANOVA test followed by a Bonferroni *post-hoc* test; * P < 0.05 as compared with the same time point without LPS). (B) Representative images of TNF- α localization in the rENSpc (four independent samples). Immunocytochemical triple labeling of ENS cultures were performed using anti-TNF- α , anti-S100 β (glial marker) and anti-Tuj (neuronal marker) antibodies. Examples of neurons expressing TNF- α are depicted with white arrowheads. Scale bar: 50 μ m. (C) LPS treatment of enteric glial cell cultures did not induce TNF- α production (between four and ten independent experiments). EGC, enteric glial cells; LMMP, longitudinal muscle / myenteric plexus; LPS, lipopolysaccharides; rENSpc, rat enteric nervous system primary culture; S100 β , S100 calcium binding protein beta; SEM, standard error of the mean; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; Tuj, β III-tubulin.

Rat enteric nervous system activation inhibits the lipopolysaccharide-induced increase in TNF- α transcript and protein levels

To assess if ENS activity could regulate TNF- α production, we measured LPS-induced TNF- α production in the supernatants of rENSpc after EFS and in those not treated with EFS. EFS had no significant effect on basal TNF- α production. However, EFS significantly inhibited TNF- α production induced by LPS in rENSpc (Figure 2A). qPCR analysis indicated that EFS inhibited the increase in TNF- α mRNA level observed after LPS (Figure 2B). These results show that LPS induce an increase in TNF- α transcript and protein levels, and that ENS activation reduces TNF- α production.

Figure 2 ENS activation in rat primary cultures inhibits the LPS-induced increase in TNF- α transcript and protein levels. (A) Evaluation of the impact of electrical field stimulation (EFS) on TNF- α secretion was performed by ELISA in rENSpc treated (+) or not (-) with LPS (0.1 μ g/ml) (twelve independent experiments). (B) TNF- α mRNA expression was measured in rENSpc by qPCR (twelve independent experiments). (C) The effect of ATP (100 μ M) and involvement of P2X7 receptor on TNF- α secretion were measured by ELISA in ENS cultures pretreated or not with BzATP (P2X7 agonist; 100 μ M) or A439079 (P2X7 antagonist; 30 μ M) (five independent experiments). Values represent the mean $\pm$ SEM (Mann-Whitney U test; * P < 0.05 as compared with control without LPS; # P < 0.05 LPS with EFS, agonist or antagonist versus LPS alone; § P < 0.05 LPS with ATP compared with LPS with ATP in presence of A438079). ATP, adenosine-5'-triphosphate; BzATP, 2'-(3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine-5'-triphosphate triethylammonium salt; CT, control; EFS, electrical field stimulation; LPS, lipopolysaccharide; mRNA, messenger ribonucleic acid; rENSpc, rat enteric nervous system primary culture; SEM, standard error of the mean; TNF- α , tumor necrosis factor alpha.

ATP inhibits lipopolysaccharide-induced production of TNF- α through P2X7 receptor activation

Various studies have demonstrated the anti-inflammatory effects of adenosine receptor activation [18,19] and ATP is a common intercellular messenger produced by enteric neurons [20]. To determine their putative regulatory role in LPS-induced TNF- α production by the ENS, we studied the potential role of ATP and purinergic receptor activation. An increased extracellular ATP concentration remarkably decreased the LPS-induced production of TNF- α . The application of BzATP, a P2X7 agonist, induced a similar reduction in TNF- α production, as did ATP. The ATP effects were partially reversed by the selective P2X7 antagonist, A438079 (Figure 2C). These results show that LPS-induced TNF- α production is reduced by ATP stimulation of P2X7 receptors.

ERK and AMPK inhibition prevent lipopolysaccharide-induced TNF- α upregulation

To decipher the signaling pathways responsible for LPS-induced TNF- α synthesis by the ENS, and its modulation by EFS, we analyzed the possible implication of the canonical extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway, and also of the 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) pathway. By Western blot analysis using phospho-specific antibodies recognizing the active form of the ERKs, we showed that phosphorylation of ERKs was increased after two hours of LPS stimulation, with no change in ERK expression (Figure 3A). Activation of the AMPK pathway can be measured by the phosphorylation of the Thr172 of the AMPK itself, or by the phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase (ACC), an AMPK target, on its Ser19. Neither AMPK nor ACC phosphorylation changed significantly over time, with or without LPS treatment (data not shown). Immunocytochemical analyses revealed that the immunoreactivity for phospho-ERK and phospho-ACC concurred with Tuj and Hu (neuronal markers), but not with S100 β or Sox10 (glial markers) immunoreactivity (Figure 3B). These data show that, while the AMPK pathway was constitutively activated in neuronal cells, ERKs were activated in neurons after LPS treatment. Pretreatment of rENSpc with U0126 or compound C inhibitors of the ERK or AMPK pathways, respectively, significantly reduced TNF- α mRNA expression (Figure 3C) and TNF- α production (Figure 3D). Interestingly, ERK phosphorylation was not affected by

compound C (Figure 3E), and ACC-phosphorylation was not modified by U0126 (Figure 3F), again suggesting the independence of the two pathways. These results demonstrate that the AMPK and ERK pathways participate independently in LPS induction of TNF- α production by the ENS.

Figure 3 ERK and AMPK inhibition prevent LPS-induced increase in TNF- α transcript and protein levels. (A) ERK pathway activation in rENSpc treated with LPS from two minutes to seven hours was measured by Western blotting using phospho-ERK antibodies (P-ERK). The relative amount of P-ERK was determined by normalizing with β -actin (four to eight independent experiments). Values represent the mean $\pm$ SEM as fold/mean t0 (one-way ANOVA test followed by Dunn's *post-hoc* test; * P < 0.05 as compared with t0 without LPS). (B) Localization of activated - ERK and - AMPK in rENSpc treated for two hours with LPS was performed by immunocytochemistry using P-ERK or phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (P-ACC), with S100 β and Sox10 (glial markers) or Hu and Tuj (β III-tubulin, neuronal markers). Scale bar: 50 μ m. Inserts show higher magnification images (40x for P-ERK and 100x for P-ACC). ERK- and AMPK-dependent pathway contribution to TNF α production were assessed using MEK1/2 inhibitor (U0126; 10 μ M) and AMPK inhibitor (C compound, CC; 10 μ M) co-treatment on rENSpc treated (+) or not (-) with LPS for seven hours. (C) Quantification of TNF- α mRNA by qPCR (six to 11 independent samples). (D) TNF- α secretion was assayed by ELISA with or without the presence of inhibitors (six independent samples). The independence of the ERK and AMPK pathways was determined by Western blotting. (E) ERK phosphorylation was not affected by CC and (F) ACC phosphorylation was not modified by U0126 (eight and three independent experiments, respectively). (Mann-Whitney U test; * P < 0.05 as compared with control without LPS; # P < 0.05 as compared with LPS without inhibitor). (G) The EFS impact on ERK and AMPK activation was measured on rENSpc treated (+) or not (-) with LPS and EFS for two hours by Western blotting using P-ERK and P-AMPK antibodies. Immunoblots are representative of five independent experiments with similar results.

Electrical field stimulation inhibits AMPK and lipopolysaccharide-induced ERK activation

To determine if EFS could inhibit TNF- α production by modulating the ERK and AMPK pathways, we analyzed ERK and AMPK activation in rENSpc treated, or not, with LPS, in the presence or absence of EFS. EFS had no significant effect on basal pathway activity but, combined with LPS treatment, it significantly reduced the phosphorylation of ERK and AMPK compared to the LPS conditions (Figure 3G). This suggests that ENS activation limits TNF- α production by inhibition of LPS-induced ERK activation and decrease of AMPK activity.

Human enteric nervous system activation inhibits the lipopolysaccharide-induced increase in TNF- α production

To assess if the induction of TNF- α production by LPS and its regulation by EFS also occurs in human samples, we measured LPS-induced TNF- α production in the supernatants of human LMMP after, or not, EFS. EFS had no significant effect on basal TNF- α production. However, EFS significantly inhibited TNF- α production induced by LPS in the LMMP (Figure 4A). The application of BzATP, a P2X7 agonist, induced a similar reduction in TNF- α production (Figure 4B). Pretreatment of LMMP with U0126 or compound C inhibitors of

the ERK or AMPK pathways, respectively, significantly reduced TNF- α production (Figure 4C). These results show that in human LMMP as in rENSpc, LPS induces an increase in TNF- α production that depends on AMPK and ERK pathways, and that ENS activation reduces this production by stimulation of the P2X7 receptors.

Figure 4 ENS activation in human LMMP inhibits the LPS-induced TNF- α production. (A) The impact of electrical field stimulation (EFS) on TNF- α secretion by the human LMMP treated (+) or not (-) with LPS (0.1 μ g/ml) was performed by ELISA (four independent experiments each performed in triplicate; CT means control). (B) The involvement of P2X7 receptor on TNF- α secretion were measured by ELISA in human LMMP pretreated, or not, with BzATP (P2X7 agonist; 100 μ M) before LPS stimulation (three independent experiments each performed in triplicate; CT means control). (C) ERK- and AMPK-dependent pathway contribution to TNF α production induced by LPS were assessed using MEK1/2 inhibitor (U0126; 10 μ M) and AMPK inhibitor (C compound, CC; 10 μ M) co-treatment on human LMMP treated, or not, with LPS for seven hours (three independent experiments each performed in triplicate; CT means control). Values represent the mean $\pm$ SEM (Mann-Whitney U test; * P < 0.05 as compared with control without LPS; # P < 0.05 LPS with EFS, agonist versus LPS alone). AMPK, 5'-AMP-activated protein kinase; BzATP, 2'-(3')-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine-5'-triphosphate triethylammonium salt; CT, control; CC, C compound; CT, control; EFS, electrical field stimulation; ERK, extracellular signal-regulated kinase; LMMP, longitudinal muscle / myenteric plexus; LPS, lipopolysaccharide; MEK1/2, mitogen-activated protein kinase kinase 1/2; SEM, standard error of the mean; TNF- α , tumor necrosis factor alpha.

Rat enteric nervous system primary cultures upregulate the neuronal expression of TLR2 in response to lipopolysaccharide stimulation

To further investigate the ENS response to LPS, we measured, using qPCR, *TLR2* mRNA expression in rENSpc. *TLR2* mRNA was detected in control conditions and LPS treatment induced a strong increase in its expression (Figure 5C). To determine if this regulation also occurred at the protein level, and to identify the cells expressing TLR2, we compared immunoreactivity for TLR2 with immunoreactivity for the neuronal marker Tuj or for the glial marker S100 β on rENSpc stimulated, or not, with LPS. TLR2 immunoreactivity was detected slightly in our control conditions but clearly appeared in Tuj-positive cells, and rarely in S100 β -positive cells, when rENSpc were treated with LPS (Figure 5A). To confirm that TLR2 expression is mainly neuronal, we have analyzed TLR2 immunoreactivity in human EGC. The glial marker S100 β staining of cultures of human EGC always present highly positive cells and low positive cells. Only the highly S100 β -positive EGC also expressed the TLR2 (Figure 5B), but no changes were observed after LPS stimulation. All together these data show that mainly enteric neurons express the TLR2 and respond to LPS through TLR2 upregulation.

Figure 5 LPS-induced TNF- α production leads to TLR2 upregulation and TLR2 contributes to TNF α production. (A) Localization of TLR2 on neuronal or glial cells of the rENSpc was analyzed by immunocytochemistry using anti-TLR2, -Tuj (β -tubulin III) and -S100 β antibodies on cultures treated for seven hours with LPS (0.1 μ g/ml), or not. Scale bar: 50 μ m. (B) Expression of TLR2 was also observed in human EGC cultures by immunocytochemistry using anti-TLR2 and -S100 β antibodies on cultures treated for seven hours with LPS (0.1 μ g/ml), or not. (C) Relative expression of TLR2 mRNA in rENSpc treated (+), or not (-), with LPS for seven hours (15 independent samples). Values represent

the mean $\pm$ SEM of TLR2 mRNA quantification against RPS6 (Mann-Whitney U test; $*P < 0.05$ as compared with control without LPS). (D) Quantification of TLR2 mRNA in rENSpc treated (+), or not (-), with LPS (0.1 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of, or not, anti-TNF- α (1 $\mu\text{g/ml}$ and 10 $\mu\text{g/ml}$), was performed by RT-qPCR (five independent samples) (Mann-Whitney U test; $*P < 0.05$ as compared with control without LPS; $\#P < 0.05$ as compared with LPS treatment without anti-TNF α). (E) TLR2 mRNA expression in rENSpc treated (+), or not (-), with LPS in the presence of, or not, EFS stimulation (11 to 16 independent samples). TLR2 mRNA quantification relative to S6 was expressed as induction fold to the control mean (Mann-Whitney U test; $*P < 0.05$ as compared with control without LPS; $\#P < 0.05$ as compared with LPS treatment without EFS). (F) ENS cultures were treated (+), or not (-), with LPS (0.1 $\mu\text{g/ml}$) and Pam3CSK4 (TLR1/2 agonist; 0.1 $\mu\text{g/ml}$). Values represent the mean $\pm$ SEM of eight independent experiments (Mann-Whitney U test; $*P < 0.05$ as compared with control without LPS; $\$P < 0.05$ as compared with Pam3CSK4 without LPS).

Lipopolysaccharide-induced TNF- α production participates in TLR2 upregulation and can be prevented by electrical field stimulation activation of the enteric nervous system

To determine if TNF- α production induced by LPS could be involved in the TLR2 upregulation observed in enteric neurons in response to LPS, we measured *TLR2* mRNA in rENSpc stimulated by LPS in the absence or presence of TNF- α -neutralizing antibodies. Anti-TNF- α antibodies significantly reduced the expression of the *TLR2* mRNA induced by LPS (Figure 5D). In the same manner, EFS stimulation of the rENSpc significantly reduced the *TLR2* mRNA expression induced by LPS (Figure 5E). These data show that TNF- α production induced by LPS upregulated the TLR2 receptor expression and depends on ENS activity.

TLR2 activation induces TNF- α production

TLR2, as well as TLR4, activation in different cell types can induce TNF- α production [21]. To assess the involvement of TLR2 in the ENS response to LPS, we measured TNF- α production in rENSpc stimulated with the TLR1/2 agonist, Pam3CSK4. Pam3CSK4 induced a significant increase in TNF- α production that could be further increased after the addition of LPS (Figure 5F). These results suggest that TLR2 activation can induce TNF- α production by enteric neurons.

Interleukin-6 production is potentiated by enteric nervous system activation

An additional functional consequence of TNF- α regulation by ENS activity could be the regulation of other cytokines, such as interleukin-6 (IL-6). To address this issue, we measured IL-6 production by rENSpc treated with LPS in the absence or presence of TNF- α -neutralizing antibodies. Like TNF- α , IL-6 production was increased by LPS, but this was delayed in time compared to the TNF- α response (data not shown). TNF- α -neutralizing antibodies had no effect on basal IL-6 production but, surprisingly, significantly increased that induced by LPS (Figure 6A). EFS stimulation of the ENS increased the IL-6 production (Figure 6B). This suggests that ENS activation, through TNF- α downregulation, can potentiate IL-6 production.

Figure 6 ENS activation potentiates IL-6 production due to downregulation of TNF- α . (A) LPS-induced IL-6 production in rENSpc in the presence, or not, of anti-TNF- α (1 μ g/ml and 10 μ g/ml) was measured in an ELISA assay (five to seven independent samples). (B) The impact of EFS stimulation on IL-6 production by ENS cultures treated (+) with LPS (0.1 μ g/ml) or without (-) (four to eight independent experiments). Values represent the mean $\pm$ SEM (Mann-Whitney U test; * P < 0.05 as compared with control without LPS; # P < 0.05 as compared with LPS treatment). EFS, electrical field stimulation; LPS, lipopolysaccharide; rENSpc, rat enteric nervous system; SEM, standard error of the mean; TNF- α , tumor necrosis factor alpha.

Discussion

In this study, we showed that stimulation of human or rat ENS by LPS induces neuronal production of TNF- α , which is inhibited by neuronal activity. This regulation partially occurs through the inhibition of the ERK and AMPK neuronal pathways activated by LPS, and can be reproduced by ATP via P2X7 receptors. Furthermore, neuronal activation leads to a TNF- α -dependent inhibition, LPS-induced neuronal TLR2 downregulation, and IL-6 production.

TNF- α production is one of the common inflammatory responses of the gut to LPS endotoxin. An increase in plasma TNF- α level occurs in animals as early as 90 minutes after an intraperitoneal injection of LPS [22]. In addition to this acute TNF- α production, an elevated level of circulating TNF- α can be measured during chronic inflammation, such as IBD [23]. In this context, our work addressed the question of identifying the ENS as TNF- α -producing cells, among other known cells of the gut. Indeed, in the gut, TNF- α is produced by activated macrophages, CD4+ lymphocytes, natural killer [24] and dendritic cells. In addition, nonimmune cells such as epithelial cells, endothelial cells, smooth muscle cells, vascular smooth muscle cells, fibroblasts and cardiac myocytes have also been shown to produce TNF- α [25,26]. Our work showed that enteric neurons in primary culture produce TNF- α in response to LPS stimulation. In contrast, we were unable to detect any TNF- α production, with or without LPS, in EGCs (from rENSpc, or from rat or human EGCs). Besides producing TNF- α , enteric neurons have also previously been shown to produce other cytokines and chemokines, such as IL-8 [27]. Production of TNF- α has also been shown in the CNS, by neurons [28,29] and also, in contrast to the ENS, by astrocytes [19,30]. Altogether, our study suggests that enteric neurons could, as resident cells, relay a first inflammatory reaction to LPS by producing TNF- α .

It is well known that the synthesis of biologically active TNF- α is regulated at several different levels and that mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways are critical for its production, as well as for that of several other proinflammatory cytokines [31]. LPS can signal through all three p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK) and ERK MAPKs [32,33], and through different downstream effectors to regulate TNF- α transcription [34], as well as TNF- α translation [35,36]. We observed that ERKs were activated in enteric neurons after LPS challenge, and that ERK pathway inhibition significantly, but only partially, inhibited TNF- α production and transcription. It was more surprising to observe the basal activation of the AMPK pathway in enteric neurons and the drastic inhibition of LPS-induced TNF- α transcription and production by the AMPK inhibitor, C compound. Indeed, several studies, using various inflammatory stimuli, have shown that the energy-sensing enzyme AMPK has anti-inflammatory actions thought to be largely mediated by negative regulation of the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) pathway [37-41]. However, some evidence emphasizes the

dual effect of C compound on the inflammatory response, which upregulated the release of TNF- α production in non-stimulated microglia, but downregulated TNF- α release in LPS-stimulated microglia [42]. This complex regulation is consistent with the inhibition of ERK and AMPK phosphorylation by ENS activation.

In a more general consideration, ERK is known to be activated in response to stimuli linked to neuronal activity [43]. However, it is also well known that the activation of MAPK is transient [43,44] and hardly ever sustained in physiological conditions, due to desensitizing or negative feedback processes. We could assume that ENS activation precociously activates ERK pathways that might not be further impacted by LPS stimulation. We also observed that EFS effects on LPS-induced TNF- α production can be reproduced with ATP (Figure 2D), but not with acetylcholine, serotonin or vasoactive intestinal polypeptide (unpublished results). The ATP-induced inhibition of TNF- α production was reproduced by activation of the purinergic receptor, P2X7, and blocked in part by a P2X7 antagonist. Various studies have recently reported a wide range of actions of P2X7 in enteric neurons. First, P2X7 expression has been reported to be widely expressed in enteric neurons [45,46]. Activation of P2X7 has been shown to increase neuronal excitability [45], as well as being responsible for neuronal death induced by inflammation [47]. Here, we observed that activation of the P2X7 receptor could limit TNF- α production in enteric neurons.

TNF- α can have various effects on different cell types, such as immune cells, intestinal epithelial cells or even muscle cells during intestinal inflammation [48-52]. Our study suggests that production of TNF- α by enteric neurons can modulate neuronal functions in an autocrine manner, as demonstrated by the TNF- α -dependent increase in neuronal TLR2 expression. TNF- α has also been reported to have multiple other effects on enteric neurons. For instance, TNF- α has been shown to inhibit norepinephrine release from the rat myenteric plexus [53], to modulate neuronal excitability [54] and even have neuroprotective effects [55]. TNF- α production by enteric neurons could also induce enteric glial reactivity [56]. In addition, we have shown that TNF- α limits LPS-induced IL-6 production, which is, however, amplified when the ENS is activated. This pleiotropic cytokine has a central role in generating acute-phase responses, inflammation and lymphocyte differentiation. Concerning the ENS, IL-6 increases neuronal excitability [57-59], and can participate in gastrointestinal dysfunction associated with intestinal inflammation or irritable bowel syndrome. In addition, IL-6 can also reduce enteric neuronal survival [60]. In our study, the cellular origin of IL-6 was not investigated but may involve both EGCs and intestinal smooth muscle cells, both of which respond to TNF- α stimulation by IL-6 production [61,62].

We also demonstrated that LPS-induced TNF- α production by enteric neurons induced the neuronal expression of TLR2. TLR2 expression induced by LPS has already been described in endothelial cells [63], and our work extends this regulation to neuronal cells, and shows that this regulation occurs through TNF- α production. TLR2 is a TLR of particular interest because it mediates reaction to inflammation [64], could have nonimmune functions and effects opposite those mediated by TLR4 [65] and its expression is induced in the intestines of patients with IBD [66]. The LPS-induced increase in TLR-2 expression in enteric neurons could participate in a protective response to inflammatory or infectious challenges, as recent data have reported that genetic deficiency of TLR2 induces anomalies in the structure, neurochemical coding and function of ENS. This is in part due to glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) production [14], which has been shown to have central neuroprotective and neuromodulatory effects in the ENS [67,68].

Conclusions

Although *in vivo* data are lacking to make conclusions about the impact of ENS activity on the intestinal response to LPS, our study is the first demonstration that the ENS can produce TNF- α , that its activation inhibits TNF- α production and TLR2 expression, and also potentiates IL-6 production. This study thus defines the ENS as a potent player in neuroimmune inflammation.

Abbreviations

ACC: Acetyl-coenzyme A Carboxylase; AMPK: 5'-Adenosine monophosphate-activated protein kinase; ATP: Adenosine-5'-triphosphate; BzATP: 2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine-5'-triphosphate triethylammonium salt; CC: C compound; CT: Control; EFS: Electrical field stimulation; EGC: Enteric glial cell; ENS: Enteric nervous system; ERK: Extracellular signal-regulated kinase; IBD: Inflammatory bowel disease; IL-6: Interleukin-6; LMMP: Longitudinal muscle/myenteric plexus; LPS: Lipopolysaccharide; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; MEK: Mitogen-activated protein kinase kinase; mRNA: messenger ribonucleic acid; qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; rENSpc: Rat enteric nervous system primary culture; RPS6: Ribosomal S6 protein; S100 β : S100 calcium binding protein beta; SEM: Standard Error of the Mean; SMA: Smooth Muscle Actin; TLR: Toll-like receptor; TNF α : Tumor necrosis factor alpha; Tuj: β III-tubulin.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SC designed experimental activities and performed the experiments. ED, JC and FC performed experiments. SC, MRD and MN wrote the manuscript. MRD and MN conceived and designed the research study. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), Nantes University, the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) of Nantes and la Région des Pays de la Loire (NEUROMIC). SC is a recipient of a doctoral fellowship from Inserm-Pays de La Loire. MRD is supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS). MN is supported by a Contrat d'interface Hospitalier du CHU of Nantes. FC and ED are supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

References

1. Furness JB: **The enteric nervous system and neurogastroenterology.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012, **9**:286–294.
2. Sharkey KA, Savidge TC: **Role of enteric neurotransmission in host defense and protection of the gastrointestinal tract.** *Auton Neurosci* 2014, **181**:94–106.
3. Lomax AE, Fernandez E, Sharkey KA: **Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation.** *Neurogastroenterol Motil* 2005, **17**:4–15.
4. Vasina V, Barbara G, Talamonti L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Tonini M, De Ponti F, De Giorgio R: **Enteric neuroplasticity evoked by inflammation.** *Auton Neurosci* 2006, **126–127**:264–272.
5. Margolis KG, Stevanovic K, Karamooz N, Li ZS, Ahuja A, D'Autreaux F, Saurman V, Chalazonitis A, Gershon MD: **Enteric neuronal density contributes to the severity of intestinal inflammation.** *Gastroenterology* 2011, **141**:588–598. e582.
6. Geboes K, Collins S: **Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis.** *Neurogastroenterol Motil* 1998, **10**:189–202.
7. 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**:250–257.
8. Rumio C, Besusso D, Arnaboldi F, Palazzo M, Selleri S, Gariboldi S, Akira S, Uematsu S, Bignami P, Ceriani V, Ménard S, Balsari A: **Activation of smooth muscle and myenteric plexus cells of jejunum via Toll-like receptor 4.** *J Cell Physiol* 2006, **208**:47–54.
9. Anitha M, Vijay-Kumar M, Sitaraman SV, Gewirtz AT, Srinivasan S: **Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling.** *Gastroenterology* 2012, **143**:1006–1016. e1004.
10. Barajon I, Serrao G, Arnaboldi F, Opizzi E, Ripamonti G, Balsari A, Rumio C: **Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia.** *J Histochem Cytochem* 2009, **57**:1013–1023.
11. Esposito G, Cirillo C, Sarnelli G, De Filippis D, D'Armiento FP, Rocco A, Nardone G, Petruzzelli R, Grosso M, Izzo P, Iuvone T, Cuomo R: **Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease.** *Gastroenterology* 2007, **133**:918–925.
12. Turco F, Sarnelli G, Cirillo C, Palumbo I, De Giorgi F, D'Alessandro A, Cammarota M, Giuliano M, Cuomo R: **Enteroglial-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells.** *Gut* 2014, **63**:105–115.
13. Esposito G, Capoccia E, Turco F, Palumbo I, Lu J, Steardo A, Cuomo R, Sarnelli G, Steardo L: **Palmitoylethanolamide improves colon inflammation through an enteric glia/toll like receptor 4-dependent PPAR-alpha activation.** *Gut* 2014, **63**:1300–1112.

14. Brun P, Giron MC, Qesari M, Porzionato A, Caputi V, Zoppellaro C, Banzato S, Grillo AR, Spagnol L, De Caro R, Pizzuti D, Barbieri V, Rosato A, Sturniolo GC, Martinez D, Zaninotto G, Palù G, Castagliuolo I: **Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system.** *Gastroenterology* 2013, **145**:1323–1333.
15. Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, Thinard R, Naveilhan P, Vanden Berghe P, Neunlist M: **Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system.** *J Physiol* 2008, **586**:1963–1975.
16. Soret R, Coquenlorge S, Cossais F, Meurette G, Rolli-Derkinderen M, Neunlist M: **Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells.** *Neurogastroenterol Motil* 2013, **25**:e755–e764.
17. Bach-Ngohou K, Mahe MM, Aubert P, Abdo H, Boni S, Bourreille A, Denis MG, Lardeux B, Neunlist M, Masson D: **Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2.** *J Physiol* 2010, **588**:2533–2544.
18. Reinstein LJ, Lichtman SN, Currin RT, Wang J, Thurman RG, Lemasters JJ: **Suppression of lipopolysaccharide-stimulated release of tumor necrosis factor by adenosine: evidence for A2 receptors on rat Kupffer cells.** *Hepatology* 1994, **19**:1445–1452.
19. Kucher BM, Neary JT: **Bi-functional effects of ATP/P2 receptor activation on tumor necrosis factor- α release in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes.** *J Neurochem* 2005, **92**:525–535.
20. Galligan JJ, Bertrand PP: **ATP mediates fast synaptic potentials in enteric neurons.** *J Neurosci* 1994, **14**:7563–7571.
21. Horwood NJ, Page TH, McDaid JP, Palmer CD, Campbell J, Mahon T, Brennan FM, Webster D, Foxwell BM: **Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production.** *J Immunol* 2006, **176**:3635–3641.
22. Lefort J, Singer M, Leduc D, Renesto P, Nahori MA, Huerre M, Creminon C, Chignard M, Vargaftig BB: **Systemic administration of endotoxin induces bronchopulmonary hyperreactivity dissociated from TNF- α formation and neutrophil sequestration into the murine lungs.** *J Immunol* 1998, **161**:474–480.
23. Szkaradkiewicz A, Marciniak R, Chudzicka-Strugala I, Wasilewska A, Drews M, Majewski P, Karpinski T, Zwozdzia B: **Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients.** *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2009, **57**:291–294.
24. Lodoen MB, Lanier LL: **Natural killer cells as an initial defense against pathogens.** *Curr Opin Immunol* 2006, **18**:391–398.
25. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF: **A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion.** *J Clin Invest* 1995, **95**:55–65.

26. Ogle CK, Guo X, Hasselgren PO, Ogle JD, Alexander JW: **The gut as a source of inflammatory cytokines after stimulation with endotoxin.** *Eur J Surg* 1997, 163:45–51.
27. 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, 7:1798–1810.
28. Gahring LC, Carlson NG, Kulmar RA, Rogers SW: **Neuronal expression of tumor necrosis factor alpha in the murine brain.** *Neuroimmunomodulation* 1996, 3:289–303.
29. Renauld AE, Spengler RN: **Tumor necrosis factor expressed by primary hippocampal neurons and SH-SY5Y cells is regulated by alpha(2)-adrenergic receptor activation.** *J Neurosci Res* 2002, 67:264–274.
30. Sheng WS, Hu S, Min X, Cabral GA, Lokensgard JR, Peterson PK: **Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes.** *Glia* 2005, 49:211–219.
31. Swantek JL, Cobb MH, Geppert TD: **Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK.** *Mol Cell Biol* 1997, 17:6274–6282.
32. Meldrum KK, Meldrum DR, Hile KL, Yerkes EB, Ayala A, Cain MP, Rink RC, Casale AJ, Kaefer MA: **p38 MAPK mediates renal tubular cell TNF-alpha production and TNF-alpha-dependent apoptosis during simulated ischemia.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, 281:C563–C570.
33. Hoareau L, Bencharif K, Rondeau P, Murumalla R, Ravanan P, Tallet F, Delarue P, Cesari M, Roche R, Festy F: **Signaling pathways involved in LPS induced TNFalpha production in human adipocytes.** *J Inflamm (Lond)* 2010, 7:1.
34. Rowlett RM, Chrestensen CA, Nyce M, Harp MG, Pelo JW, Cominelli F, Ernst PB, Pizarro TT, Sturgill TW, Worthington MT: **MNK kinases regulate multiple TLR pathways and innate proinflammatory cytokines in macrophages.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008, 294:G452–G459.
35. Kotlyarov A, Neininger A, Schubert C, Eckert R, Birchmeier C, Volk HD, Gaestel M: **MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis.** *Nat Cell Biol* 1999, 1:94–97.
36. Gais P, Tiedje C, Altmayr F, Gaestel M, Weighardt H, Holzmann B: **TRIF signaling stimulates translation of TNF-alpha mRNA via prolonged activation of MK2.** *J Immunol* 2010, 184:5842–5848.
37. Cacicedo JM, Yagihashi N, Keaney JF Jr, Ruderman NB, Ido Y: **AMPK inhibits fatty acid-induced increases in NF-kappaB transactivation in cultured human umbilical vein endothelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 324:1204–1209.

38. Giri S, Nath N, Smith B, Viollet B, Singh AK, Singh I: **5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase.** *J Neurosci* 2004, **24**:479–487.
39. Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J: **Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype.** *J Immunol* 2008, **181**:8633–8641.
40. Meares GP, Qin H, Liu Y, Holdbrooks AT, Benveniste EN: **AMP-activated protein kinase restricts IFN-gamma signaling.** *J Immunol* 2010, **190**:372–380.
41. Galic S, Fullerton MD, Schertzer JD, Sikkema S, Marcinko K, Walkley CR, Izon D, Honeyman J, Chen ZP, van Denderen BJ, Kemp BE, Steinberg GR: **Hematopoietic AMPK beta1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity.** *J Clin Invest* 2011, **121**:4903–4915.
42. Labuzek K, Liber S, Gabryel B, Buldak L, Okopien B: **Ambivalent effects of compound C (dorsomorphin) on inflammatory response in LPS-stimulated rat primary microglial cultures.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2010, **381**:41–57.
43. Paillusson S, Tasselli M, Lebouvier T, Mahe MM, Chevalier J, Biraud M, Cario-Toumaniantz C, Neunlist M, Derkinderen P: **alpha-Synuclein expression is induced by depolarization and cyclic AMP in enteric neurons.** *J Neurochem* 2010, **115**:694–706.
44. Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B: **Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling.** *Nature* 2003, **424**:743–748.
45. Hu HZ, Gao N, Lin Z, Gao C, Liu S, Ren J, Xia Y, Wood JD: **P2X(7) receptors in the enteric nervous system of guinea-pig small intestine.** *J Comp Neurol* 2001, **440**:299–310.
46. Palombit K, Mendes CE, Tavares-de-Lima W, Silveira MP, Castelucci P: **Effects of ischemia and reperfusion on subpopulations of rat enteric neurons expressing the P2X7 receptor.** *Dig Dis Sci* 2013, **58**:3429–3439.
47. Gulbransen BD, Sharkey KA: **Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012, **9**:625–632.
48. Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Eppler HJ, Riecken EO, Schulzke JD: **Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6.** *J Cell Sci* 1999, **112**(Pt 1):137–146.
49. Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A: **Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms.** *J Immunol* 2003, **171**:6164–6172.
50. Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR: **Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier**

dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol* 2005, 166:409–419.

51. Al-Sadi R, Ye D, Dokladny K, Ma TY: Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* 2008, 180:5653–5661.

52. Weber CR, Raleigh DR, Su L, Shen L, Sullivan EA, Wang Y, Turner JR: Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity. *J Biol Chem* 2013, 285:12037–12046.

53. Hurst SM, Collins SM: Mechanism underlying tumor necrosis factor-alpha suppression of norepinephrine release from rat myenteric plexus. *Am J Physiol* 1994, 266:G1123–G1129.

54. Rehn M, Hubschle T, Diener M: TNF-alpha hyperpolarizes membrane potential and potentiates the response to nicotinic receptor stimulation in cultured rat myenteric neurones. *Acta Physiol Scand* 2004, 181:13–22.

55. Gougeon PY, Lourenssen S, Han TY, Nair DG, Ropeleski MJ, Blennerhassett MG: The pro-inflammatory cytokines IL-1beta and TNFalpha are neurotrophic for enteric neurons. *J Neurosci* 2013, 33:3339–3351.

56. von Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, Schafer KH, Adler G, Kirsch J: Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* 2004, 53:222–228.

57. Xia Y, Hu HZ, Liu S, Ren J, Zafirov DH, Wood JD: IL-1beta and IL-6 excite neurons and suppress nicotinic and noradrenergic neurotransmission in guinea pig enteric nervous system. *J Clin Invest* 1999, 103:1309–1316.

58. Kelles A, Janssens J, Tack J: IL-1beta and IL-6 excite neurones and suppress cholinergic neurotransmission in the myenteric plexus of the guinea pig. *Neurogastroenterol Motil* 2000, 12:531–538.

59. O'Malley D, Liston M, Hyland NP, Dinan TG, Cryan JF: Colonic soluble mediators from the maternal separation model of irritable bowel syndrome activate submucosal neurons via an interleukin-6-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010, 300:G241–G252.

60. Sand E, Themner-Persson A, Ekblad E: Mast cells reduce survival of myenteric neurons in culture. *Neuropharmacology* 2009, 56:522–530.

61. Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford RM: Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1995, 95:1262–1270.

62. 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:G1163–G1171.

63. Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev A, Equils O, Arditi M: **Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation.** *J Immunol* 2001, **166**:2018–2024.
64. Esen N, Tanga FY, DeLeo JA, Kielian T: **Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*.** *J Neurochem* 2004, **88**:746–758.
65. Freria CM, Velloso LA, Oliveira AL: **Opposing effects of Toll-like receptors 2 and 4 on synaptic stability in the spinal cord after peripheral nerve injury.** *J Neuroinflammation* 2012, **9**:240.
66. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ: **Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases.** *Gastroenterology* 2005, **129**:50–65.
67. Baudry C, Reichardt F, Marchix J, Bado A, Schemann M, des Varannes SB, Neunlist M, Moriez R: **Diet-induced obesity has neuroprotective effects in murine gastric enteric nervous system: involvement of leptin and glial cell line-derived neurotrophic factor.** *J Physiol* 2012, **590**:533–544.
68. Rodrigues DM, Li AY, Nair DG, Blennerhassett MG: **Glial cell line-derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system.** *Neurogastroenterol Motil* 2011, **23**:e44–e56.

Additional files

Additional_file_1 as PDF

Additional file 1 EFS induces only neuronal activation

Additional_file_2 as PDF

Additional file 2 Expression of TLR4 in ENS and EGC cultures is not modified by LPS treatment.

Figure 1

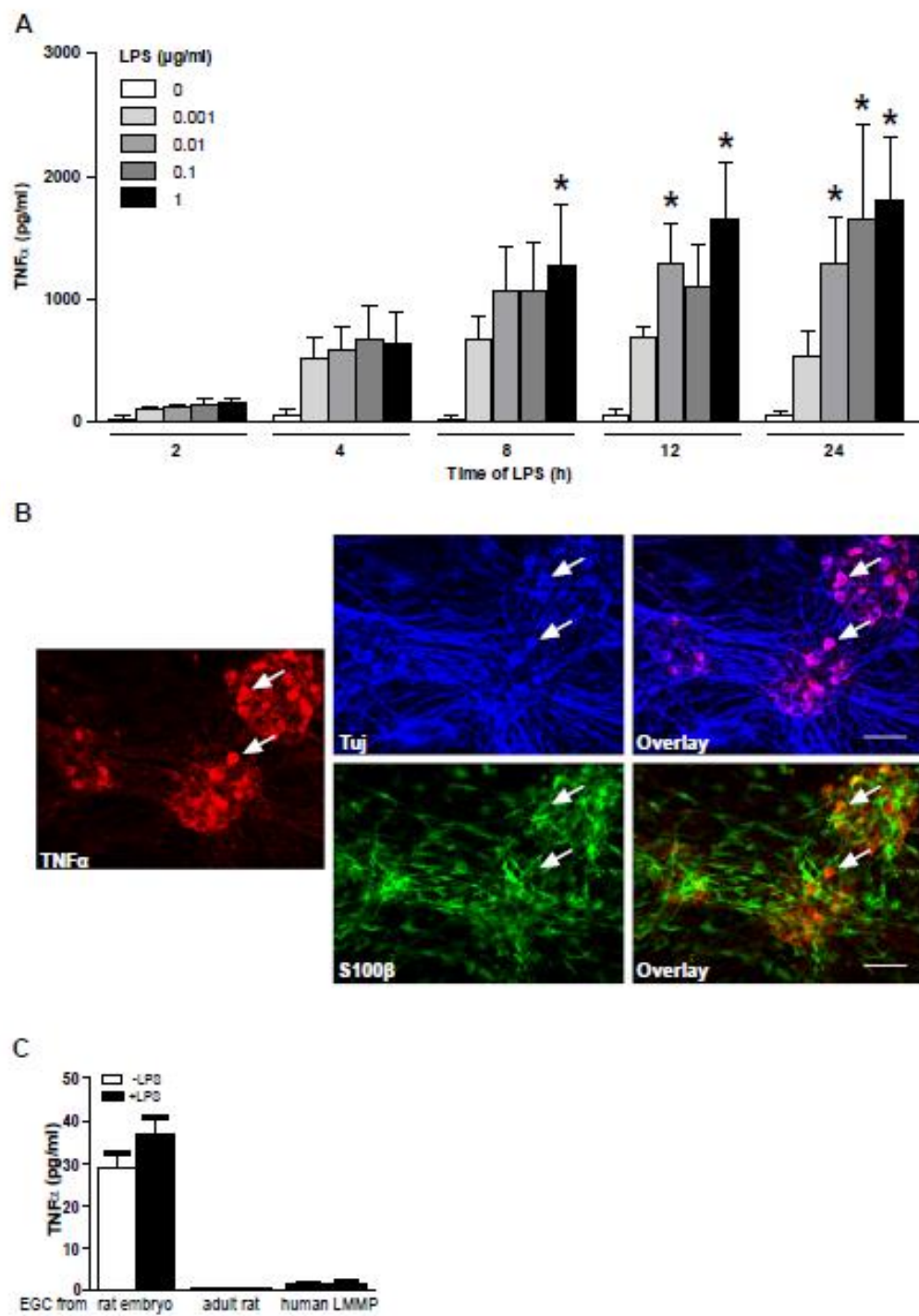


Figure 2

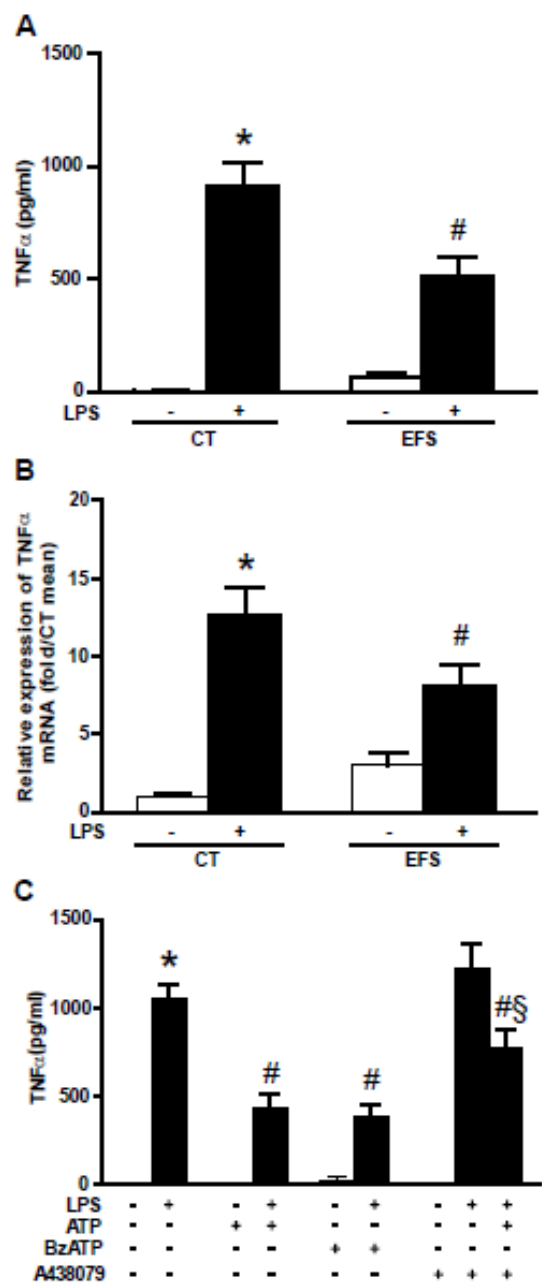


Figure 3

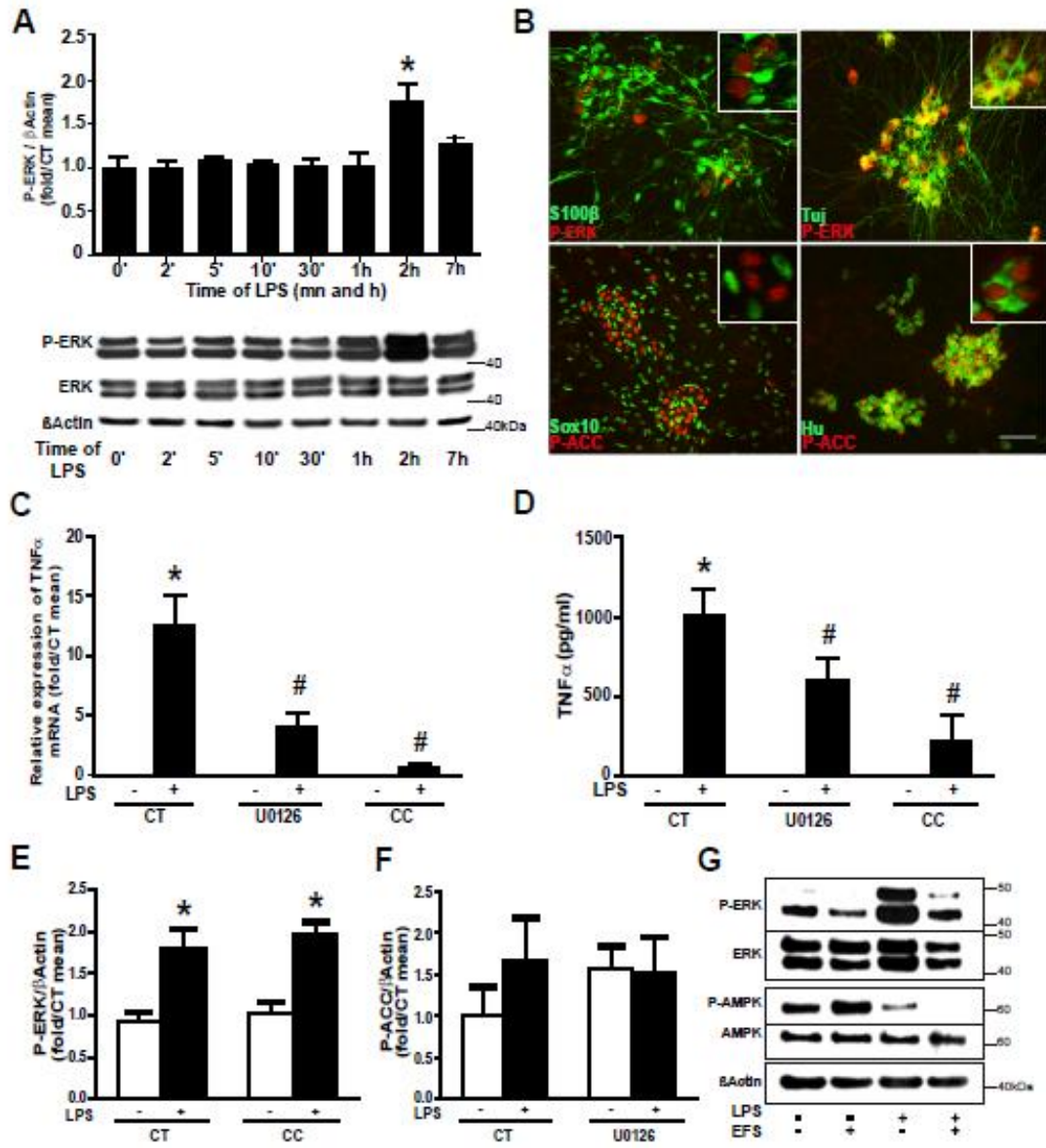


Figure 4

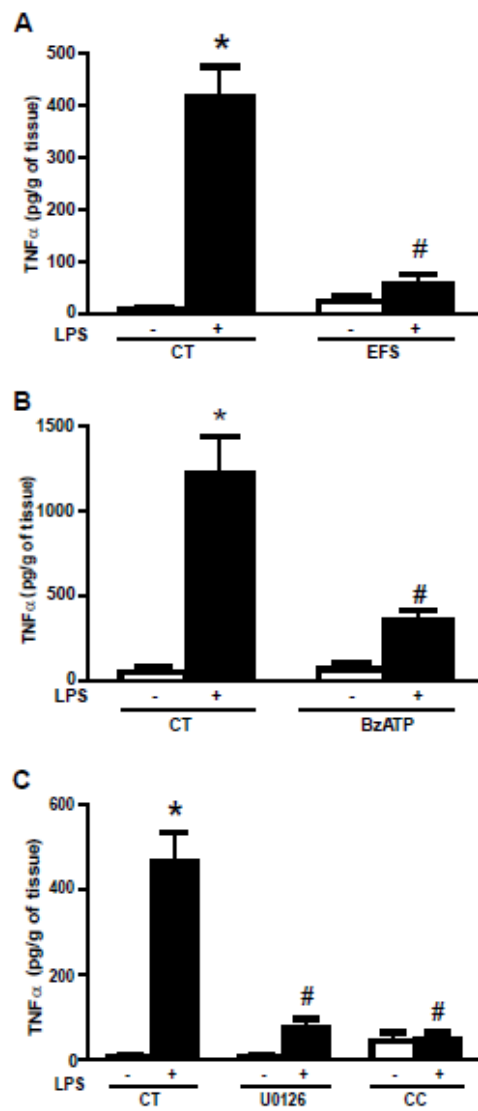


Figure 5

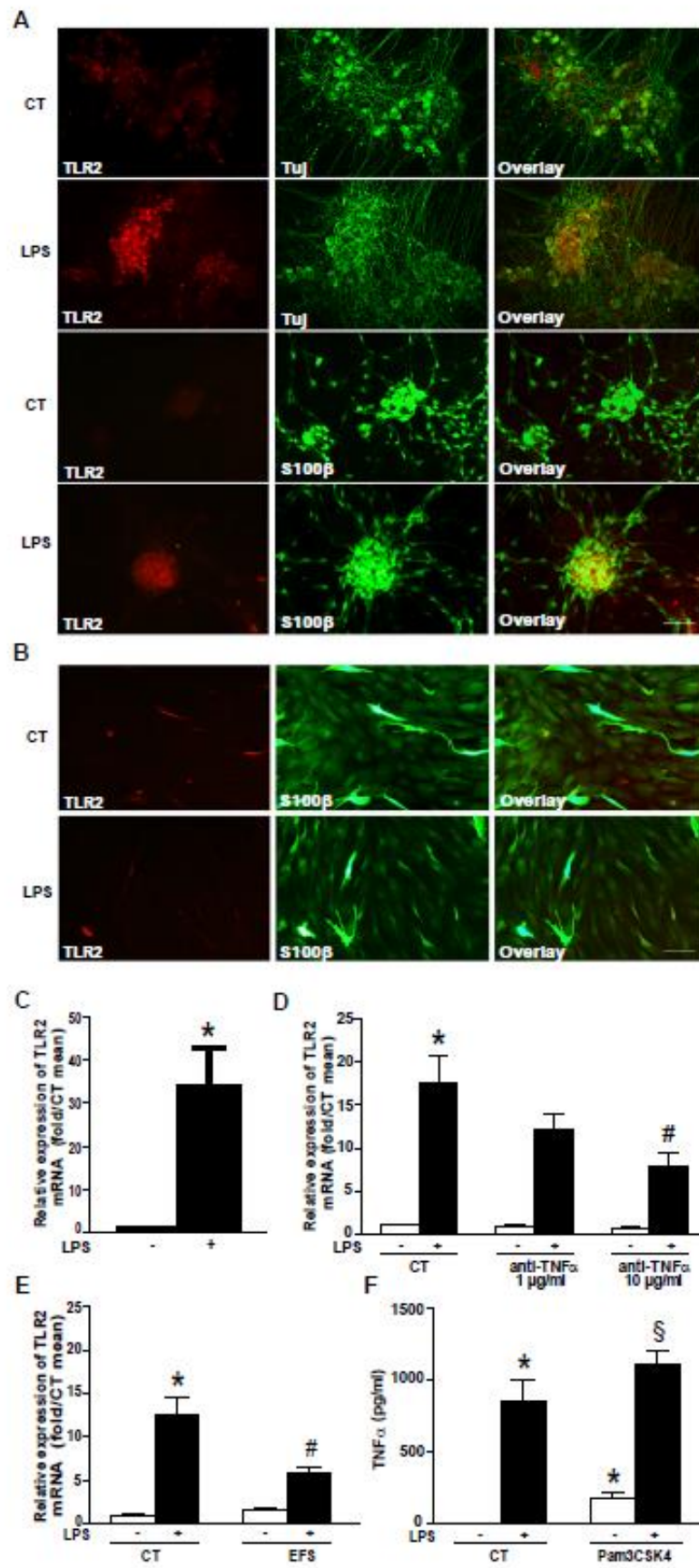
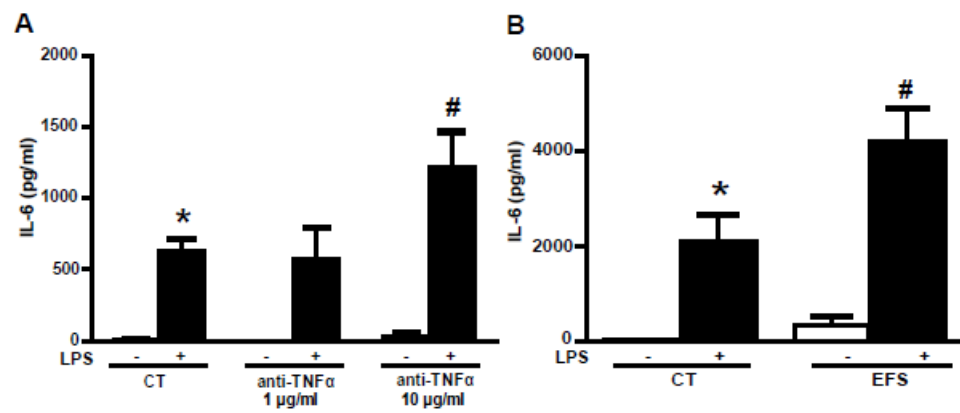
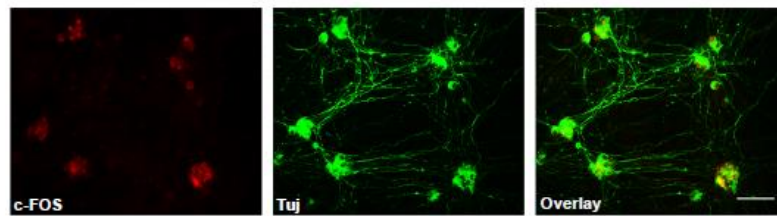


Figure 6



Additional file 1

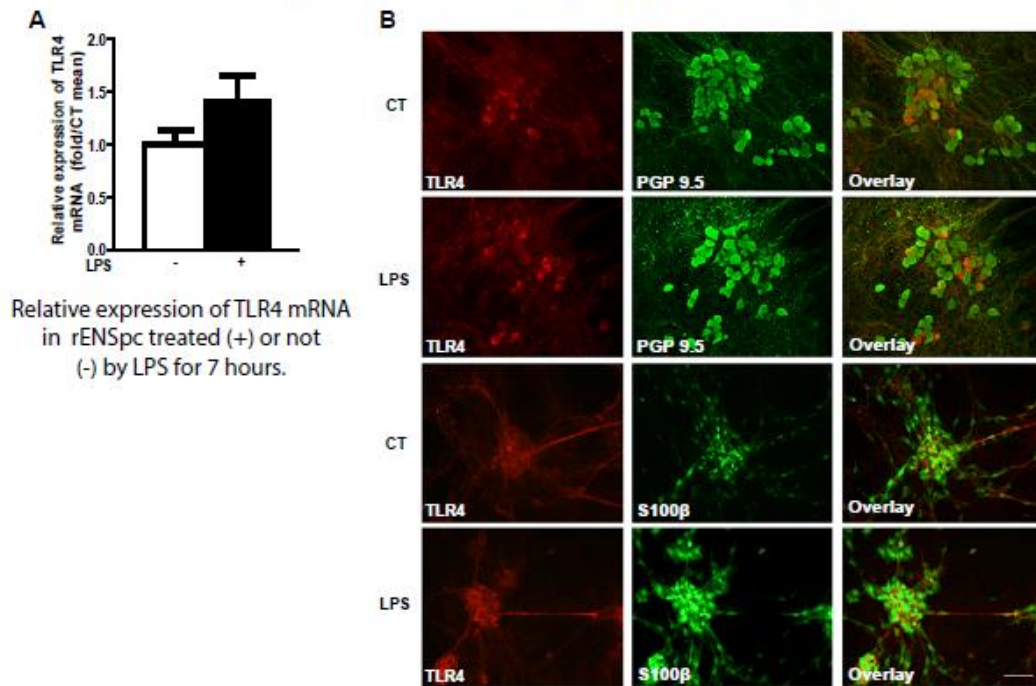
EFS induces only neuronal activation.



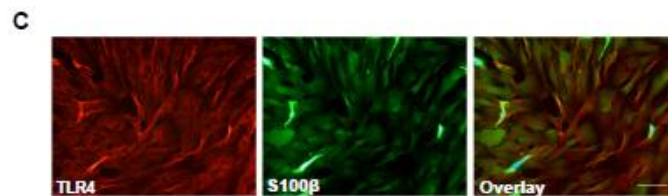
Immunocytochemical double labeling of rENSpc were performed using anti-c-Fos (Calbiochem) and anti-Tuj (β III-tubulin; Sigma) antibodies after 7 hours of EFS. Scale bar : 50 μ m.

Additional file 2

Expression of TLR4 in ENS and EGC cultures is not modify by LPS treatment.



Localization of TLR4 on neuronal and glial cells in rENSpC was analyzed by immunocytochemistry using anti-TLR4 (Imgenex), anti-PGP 9.5 (Ultraclone Limited) and anti-S100β (DakoCytomation) antibodies. Scale bar : 50µm.



Expression of TLR4 on human enteric glial cells in EGC primary cultures was analyzed by immunocytochemistry using anti-TLR4 and anti-S100β antibodies. Scale bar : 50µm

Article 2: Les cellules gliales entériques produisent du 15-HETE pour réguler les propriétés de l'épithélium intestinal : dérégulation au cours de la maladie de Crohn.

Présentation de l'article 2

Notre première étude sur la réponse inflammatoire du SNE nous a permis de mettre en évidence qu'en réponse au LPS, et selon leur activation, les neurones produisent du $\text{TNF}\alpha$. Une des conséquences de cette production est le contrôle de la production d'IL-6. Or, nous avons identifié que la sécrétion d'IL-6 mesurée au sein des cultures primaires de SNE était d'origine gliale (résultat non montré) (Rühl et al., 2001). En plus de montrer la complexité des interactions neuro-gliales, ces résultats soulignent l'importance des CGE dans la réponse inflammatoire. Ces cellules, dont l'étude a longtemps été négligée, ont maintenant une place à part entière dans la régulation des fonctions digestives, en particulier dans le contrôle des propriétés et des fonctions de la BEI. La première évidence est le résultat de l'ablation sévère des CGE qui induit une jéjuno-iléite fulminante caractérisée par une rupture de la BEI (Bush et al., 1998 ; Cornet et al., 2001). Une ablation moins sévère des CGE augmente la perméabilité paracellulaire et précède le développement de l'inflammation intestinale (Aube et al., 2006 ; Arrieta et al., 2009). D'autres arguments montrent le contrôle par les CGE de la prolifération, de la différenciation, de la réparation, de la résistance et de la perméabilité épithéliale (Neunlist et al., 2013)

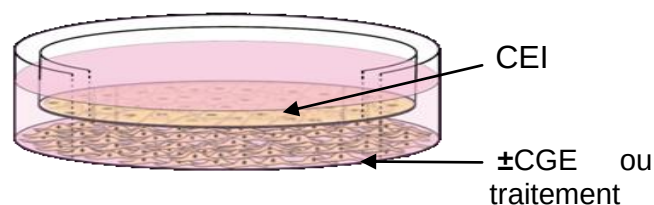
Ainsi, les CGE inhibent la prolifération des CEI via la libération de $\text{TGF}\beta 1$ (Neunlist et al., 2007) et régulent la prolifération et la différenciation des CEI via la 15dPGJ2 (Bach-Ngohou et al., 2010). Les CGE augmentent également la restitution épithéliale par la production de pro-EGF (Van Landeghem et al., 2011) et les CGE augmentent la résistance et diminuent la perméabilité paracellulaire en partie par la production de GSNO (Savidge et al., 2007).. Tous ces résultats identifient les CGE comme une source de facteurs solubles capables de renforcer la BEI via une communication paracrine, mais le sécrétome des CGE n'est pas défini. On pourrait de plus, emettre l'hypothèse que dans un contexte pathologique ou dans un environnement inflammatoire, en particulier celui des MICI, ce sécrétome serait modifié puisque des altérations des CGE sont observées, notamment des modifications de l'expression des marqueurs gliaux (Cornet et al., 2001 ; Villanacci, 2008 ; von Boyen et al., 2011).

Les acides gras polyinsaturés sont des composés clés dans l'induction et la résolution de l'inflammation et leur rôle au cours des MICI fait depuis peu l'objet d'études. L'acide arachidonique est métabolisé par trois voies biochimiques majeures : la voie des cyclooxygénases (COX) conduisant à la synthèse des prostaglandines, prostacycline et thromboxane ; la voie des lipoxygénases (LOX) conduisant à des acides gras hydroxyeicosatétraénoïques (HETE) et les leucotriènes ; la voie de l'époxygénase dépendante de P450 qui génère les époxyeicosanoïdes. Des études ont montré une régulation des COX et LOX au cours de la RCH active (Jupp et al., 2007), ainsi qu'une élévation de thromboxane B2 (Hommes et al., 1996), de leucotriène B4 (Sharon et al., 1984) et de prostaglandine E2 (Rampton et al., 1980) dans la RCH et la MC, mais ces productions sont attribuées à la muqueuse

et plus spécifiquement aux neutrophiles (Nielsen et al., 1987). Ainsi, la contribution des CGE dans la synthèse de ces acides gras polyinsaturés est peu connue même s'il a déjà été démontré que les CGE produisaient de la PGE2 (Murakami et al., 2007) et de la 15dPGJ2 (Bach-Ngohou et al., 2010).

Le but de ce travail était de définir en partie le sécrétome des CGE en réalisant un profil des acides gras polyinsaturés présents dans le milieu conditionné de CGE de rat. Il s'agissait ensuite de doser les médiateurs identifiés dans du milieu conditionné de CGE humaines contrôles ou issues de patients atteints de MC et d'étudier leur impact fonctionnel dans la régulation de la perméabilité de la BEI.

Pour ces travaux, nous avons utilisé des cultures primaires de CGE issues d'intestins de rat ou de pièces de résection intestinales de patients contrôles ou atteints de MC (Soret et al., 2013 ; Annexe 4). Le dosage de 24 lipides dans les milieux conditionnés des CGE (6kPGF₁ α , TxB₂, PGE₂, PGE₃, PGA₁, 8-isoPGA₂, 15dPGJ₂, LxA₄, RvD₁, LTB₄, LTB₅, PDx, 18-HEPE, 5-, 8-, 12- et 15-HETE, 17-HDoHE, 14-HDoHE, 14,15-EET, 11,12-EET, 8,9-EET, 5,6-EET, et le 5-oxo-EET) a été réalisé par N. Cenac (CPTP Toulouse-Purpan, UMR563) par une méthode de spectrophotométrie décrite dans Faouder et al., 2013. Les fonctions de barrière, résistance et la perméabilité, ont été mesurées *in vitro* dans un système de culture de CEI (lignée Caco-2) en monocouche sur des filtres transwell en présence ou non de CGE ou d'un traitement en baso-latéral.



Modèle de culture des Caco-2 en monocouche sur des filtres transwell en co-culture avec des CGE saines vs pathologiques ou cultivées en présence ou non d'un traitement.

La perméabilité a également été mesurée *ex vivo* après deux injections en IP de 15-HETE ou de l'inhibiteur de la 15-lipoxygénase-1. La perméabilité paracellulaire est quantifiée via le flux d'acide sulfonique-FITC à travers les filtres transwell ou les fragments coliques de rat placés en chambre d'Ussing.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'existence d'altérations fonctionnelles intrinsèques des CGE au cours de la MC, qui est le non-maintien du contrôle de la perméabilité de la BEI. De plus, elle identifie un nouveau médiateur glial, le 15-HETE, et montre son rôle dans le contrôle de la perméabilité de la BEI via l'augmentation de l'expression de ZO-1 et une voie dépendante de l'AMPK.

Cet article est actuellement en préparation.

Enteric glial cells produce 15-HETE to regulate intestinal epithelial permeability: dysregulation in Crohn's disease

Camille Pochard,^{1,2,3, 4} Sabrina Coquenlorge,^{1,2,3, 4} Julie Jaulin,^{1,2,3, 4} Nicolas Cenac,⁵
Nathalie Vergnolle,⁵ Guillaume Meurette^{1,2,3, 4}, Michel Neunlist^{1,2,3, 4}
and Malvyne Rolli-Derkinderen^{1,2,3, 4}

CP and SC contributed equally

Corresponding author: Malvyne Rolli-Derkinderen or Michel Neunlist, Neuropathies of the enteric nervous system and digestive diseases, INSERM UMR913. School of Medicine, University of Nantes; 1, rue Gaston Veil, NANTES; F-44035, France; Phone number: +33 (0)2 40 41 29 50; Fax number +33 (0)2 40 08 75 06; e-mail address: malvyne.derkinderen@univ-nantes.fr; Michel.Neunlist@univ-nantes.fr

Author affiliations

¹INSERM, UMR913, Nantes, F-44093, France.

²Nantes University, Nantes, F-44093, France.

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

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

⁵ INSERM UMR1043, Toulouse, F-33 000, France.

KEYWORDS: Enteric Nervous System; Epithelial Cells; Inflammatory Bowel Disease; AMPK; ZO-1

Word count:

ABSTRACT

OBJECTIVE: Enteric glial cells (EGC) produce soluble mediator to regulate intestinal epithelial barrier (IEB) homeostasis. The present study concerns the definition of the EGC polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolite profile and functional studies of EGC and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) on IEB permeability in a physiological or a Crohn's disease (CD) context.

DESIGN: The PUFA signatures of rat EGC and 15-HETE dosage on human EGC from control and CD patients were established using high sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry. 15-HETE producing enzyme was identified on rat and human EGC and tissues by immunostaining. Human EGC impact on IEB permeability was measured in a co-culture model using Caco-2. *In vitro* and *in vivo* 15-HETE functional impact on IEB permeability as well as 15-HETE molecular signaling were analyzed using pharmacological approaches and western blot analysis.

RESULTS: EGC expressed the 15-lipoxygenase-2 and mostly produced 15-HETE that increased IEB resistance and decreased IEB permeability. The 15-HETE production by EGC from CD patients was reduced compared to EGC from control patients. At the same time, CD EGC were unable to decrease IEB permeability, but addition of 15-HETE backed up the permeability to control conditions. *In vivo*, inhibition of 15-HETE production reproduced pathological feature by increasing it. 15-HETE regulated IEB permeability through an increase in ZO-1 expression and an inhibition of AMP-activated kinase (AMPK).

CONCLUSION: This study not only presents the first evidence for EGC functional abnormalities in CD, but also reveals that 15-HETE can control IEB permeability *in vivo* through an AMPK-dependent pathway.

SUMMARY BOX

What is already known on this subject?

- ▶ In a physiological context, enteric glial cells (EGC) produce soluble mediator to regulate intestinal epithelial barrier (IEB) homeostasis
- ▶ In CD patients, EGC present some phenotypic changes
- ▶ An increase in IEB permeability is observed in CD patients

What are the new findings?

- ▶ Human and rat EGC express the 15-lipoxygenase-2 and produce 15-HETE
- ▶ 15-HETE increased IEB spreading and resistance and decreased IEB permeability
- ▶ EGC from CD patients are functionally abnormal: they misproduce 15-HETE and fail to reduce IEB permeability
- ▶ 15-HETE induces ZO-1 expression and inhibits the AMPK to regulate IEB TEER and permeability

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- ▶ These results establish a molecular basis for developing and testing therapeutic strategies in the field of CD by targeting 15-HETE production or AMPK inhibition.

INTRODUCTION

Accumulating data demonstrate that under physiological conditions, enteric glial cells (EGC) positively regulate the intestinal epithelial barrier (IEB). First evidence for EGC requirement in maintaining IEB homeostasis is the drastic phenotype of mice model defective for EGC. *In vivo*, severe ablation of EGC induces a fulminant jejuno-ileitis, characterised by disruption of IEB integrity [1, 2]. Less severe ablation of EGC increases paracellular permeability in the absence of gut inflammation [3] or prior to the development of intestinal inflammation [4]. Additional arguments are the works demonstrating that EGC control the major IEB properties that are proliferation, differentiation, healing, resistance and permeability [5]. EGC inhibit intestinal epithelial cell (IEC) proliferation via the release of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) [6] and regulate IEC proliferation and differentiation via the 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J₂ (15dPGJ₂) [7]. Both *in vivo* and *in vitro* experiments show that EGC enhance IEB repair following mechanical or inflammatory injury through production of derived pro-epidermal growth factor [8]. EGC also increase IEB resistance and reduced paracellular permeability, in part by S-nitrosoglutathione (GSNO) [9]. Consistently, EGC increase IEB resistance evoked by stressors such as bacteria, inflammatory mediators or skin burn injuries [10, 11, 12]. All together these studies identify EGC as a source for soluble factors able to reinforce the IEB via paracrine signaling, but no broad glial secretome is defined, and the production of gliomediators in pathological contexts remains to be determined. This could be of particular interest to understand pathological mechanisms of inflammatory bowel disease (IBD). Indeed in Crohn's disease (CD) or ulcerative colitis (UC), EGC present abnormalities. First, in UC, GFAP and GDNF expression are significantly higher in the mucosa of patients with UC as compared to those of controls [13]. In contrast to UC, a reduced number of GFAP positive EGC is present in non inflamed gut specimens of patients with CD [2, 13]. However, none of the currently available data provide evidence of EGC dysfunction in IBD that could be responsible for gut dysfunction and/or pathological symptom generation.

Otherwise, polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolites are bioactive compounds that play an important role in the induction and the resolution of inflammation, and characterization of their role in IBD are currently in progress. The major PUFA in diet is the linoleic acid, which is precursor to arachidonic acid (AA). AA is metabolized via three major

biochemical pathways as followed: the cyclooxygenase pathway leading to prostaglandins, prostacyclin and thromboxane; the lipoxygenases (LOX) pathway giving rise to various hydroperoxy and hydroxy (HETE) fatty acid as well as leukotrienes; the P450-dependent epoxygenase pathway generating epoxyeicosanoids. Previous studies have shown up regulation of COX and LOX in active UC [14] and elevation of thromboxane TXB₂ [15], leukotriene LTB₄ [16] and prostaglandin PGE₂ [17] in UC or CD. But their productions are attributed to mucosa [15, 16, 17] or more specifically to neutrophils [18]. EGC contribution is unknown, but it has already been described that EGC can produce PGE₂ [19] and 15dPGJ₂ [7].

In this study we wanted to define a part of EGC secretome by performing PUFA profiling of EGC conditioned media. We additionally assessed functional impact of 2 PUFA metabolites produced by EGC, and study the role of the 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) in the regulation of IEB permeability in CD pathological context.

MATERIAL AND METHODS

Human and rat EGC cultures

Cultures of human and adult rat enteric glial cells (EGC) were obtained according to the procedure described by Soret et al. [20]. Briefly, human EGC originated from macroscopically healthy areas of intestinal resections of control patients (patients having undergone surgery for colorectal cancer) and of patients with an established diagnosis of CD according to international criteria. Six control (age, 19–58 y; sex ratio 1:1) and six CD (age, 17–63 y; sex ratio 1:1) patients were included in this study. Patients gave their informed consent to take part in the study and all procedures were performed according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Human and registered under the no. DC-2008-402. Adult rat EGC (ROG) were obtained from entire small intestines of Sprague-Dawley rats. Human EGC and ROG were maintained for 3 to 5 passages in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM 4.5g/L Glc) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mmol/L glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin. All over the passages, an immunocytochemistry study was assessed to verify the purity of the cellular population (see Immunocytochemistry). EGC cultures presenting more than 80% of GFAP-, Sox10-, and

S100 β positive cells were used for these experiments. The rat embryonic cell line (JUG) was obtained as described by Bach-Ngohou et al. [7] and was studied between passages 18 to 30.

PUFA dosage

The PUFA dosage was performed as described Le Faouder et al [21]. This innovative method allows the simultaneous measurement of 24 lipids that are 6-keto-prostaglandin F $_{1\alpha}$ (6kPGF $_{1\alpha}$), thromboxan B $_2$ (TXB $_2$), prostaglandin E $_2$ (PGE $_2$), prostaglandin E $_3$ (PGE $_3$), prostaglandin A $_1$ (PGA $_1$), 8-iso prostaglandin A $_2$ (8-isoPGA $_2$), 15-Deoxy-Delta12,14-Prostaglandin J $_2$ (15d-PGJ $_2$), lipoxin A $_4$ (LxA $_4$), resolvin D1 (RvD $_1$), leukotrien B $_4$ (LTB $_4$), leukotrien B $_5$ (LTB $_5$), 10(S), 17(S)-protectin (PDx), 18-hydroxyeicosapentaenoic acid (18-HEPE), 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) and 12-HETE, 8-HETE, 5-HETE, 17-hydroxy-docosahexaenoic acid (17-HDoHE) and 14-HDoHE, 14,15-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) and 11,12-EET, 8,9-EET, 5,6-EET, 5-oxoeicosatetraenoic acid (5-oxo-EET). Briefly, the 24 lipids of interest and 3 deuterated internal standards (LxA $_4$ -d $_5$, LTB $_4$ -d $_4$, 5-HETE-d $_8$), were separated by LC-MS/MS analysis on HPLC system (Agilent LC1290 Infinity) coupled to Agilent 6460 triple quadrupole MS (Agilent Technologies) equipped with electro-spray ionization operating in negative mode. Reverse-phase HPLC was performed using ZorBAX SB-C18 column (2.1 mm; 50 mm; 1.8 μ m) (Agilent Technologies) with a gradient elution. Mobile phase A consisted of water, ACN and FA (75/25/0.1); Solvent B: ACN, FA (100/0.1). Compounds were separated with a linear gradient to 85% B from 0 to 8.5 min and 100% B to 9 min. Isocratic elution continued for 1 min at 100% B then 100% A was reached at 11 min and maintained to 12 min. The flow rate was 0.35 mL/min. The autosampler was set at 5°C and the injection volume was 5 μ L. Data were acquired in MRM mode with optimized conditions (fragmentors and collision energy). Peak detection, integration and quantitative analysis were done using Mass Hunter Quantitative analysis software (Agilent Technologies).

PUFA profile was established in EGC conditioned media. 5000 JUG, ROG or HOG were plated in 12 well plates and after one day placed in 2ml defined DMEM media supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin but without any serum. After 3 days, conditioned media were centrifuged at 14,000 rpm for 5 minutes at 4°C, 1ml was used for analysis of permeability and TEER on Caco-2 filters and 500 μ l frozen at -80°C until analysis.

Intestinal epithelial cell (IEC) culture

The human IEC line Caco-2 was cultured in DMEM (4.5g/L Glc) media supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mmol/L glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin.

Spreading and proliferation assessment

For spreading and proliferation experiments 60 000 Caco-2 cells were seeded on 12-well transwell filters (Pore size 0.40 µm, Corning, Avon, France). 5-HETE (100pg/ml) or 15-HETE (100pg/ml) were added or not the following day for 2 other days. The IEC size was measured thanks to anti-zonula occludens-1 (ZO-1) immunostaining. After the two days of experiment, IEC transwell filters were fixed in PBS 4% paraformaldehyde for 15min. Fixed filters were separated from the transwell and incubated for 30 min at RT with PBS containing 0.5% triton X-100 and 10 % horse serum (PBS-TX-HS). Filters were then incubated with a mouse monoclonal antibody anti-ZO-1 (1:500; Invitrogen) diluted in PBS-TX-HS overnight at 4°C. After washing with PBS, filters were incubated with an anti-mouse CY-3 (1:500; Jackson ImmunoResearch) for 45 min at RT. Filters were mounted on slides for fluorescence microscopy analysis. Images were acquired with a digital camera (Olympus DP 50) coupled to a fluorescence microscope (Olympus IX 50). Cell surface area was measured with ImageJ software. An average of 45.3 +/- 7.3 IEC was analyzed for each experimental condition. The proliferation rate was evaluated with the counting of DAPI nuclear staining.

Measurement of transepithelial electrical resistance (TEER) and permeability

For TEER and permeability experiments, 100 000 Caco-2 cells were seeded on 24-well transwell filters coated with collagen I. To determine the effect of EGC conditioned media or 5- or 15-HETE on IEB resistance, the transepithelial electrical resistance (TEER) was measured one day after treatment with an epithelial voltohmmeter (EVOM, World Precision Instruments, Inc, Sarasota, FL). To determine the effect of EGC conditioned media or 5- or 15-HETE on IEB permeability, 50 µL of the apical medium was replaced by 50 µL of fluorescein-5.6 sulfonic acid (1 mg mL⁻¹; Invitrogen). The fluorescence level of basolateral aliquots (150 µL) was measured every 30 min for a period of 180 min using a fluorimeter (Varioskan, Thermo SA, France). Paracellular permeability was determined by average of the gradient of change in fluorescence intensity over time, using a linear regression fit model measured in the specimens.

Immunocytochemistry and immunohistochemistry

Human and rat EGC seeded in 48-well plates were also fixed in PBS 4% paraformaldehyde (PAF) for 15min. Immunostaining was performed as described above for IEC, using the 15-Lipoxygenase-2 Polyclonal Antibody (1:500; Cayman) or the 15-Lipoxygenase-1 Polyclonal Antibody (1:500; Cayman) and a secondary anti-sheep or rabbit 488 (FluoProbes®488; 1:1000; Interchim). Submucosal plexus of control patients were also analyze for lipoxygenase immunoreactivity with slight modification of time and buffer composition from the above described protocol. Tissues were fixed for 4hours in PAF, incubated in NH₄CL (100mM) for 15min before incubation in PBS-0.5% triton X-100-1% saponine for 1h and blocking procedure 2 hours in PBS-0.5% triton X-100-1% saponine and 10 % horse serum. Primary antibodies are incubated 2 days, and secondary antibody overnight. S100 β (mouse monoclonal antibody, Abcam) immunoreactivity allows the identification of EGC. Images were acquired with an Olympus IX 50 fluorescence microscope coupled to a digital camera (model DP71, Olympus), analyzed with Cell B software (Soft Imaging System, Olympus).

Western blotting

After different time of 15-HETE stimulation, the Caco-2 filters were washed with ice cold PBS and dived into ice cold RIPA buffer completed with protease inhibitor cocktail (Roche diagnostic), and serine–threonine phosphatase inhibitor cocktail (Sigma). Nuclei and unlysed cells were removed by centrifugation at 10 000 *g* for 10 min at 4°C and samples were processed for electrophoresis using NuPAGE MES SDS buffer kit (Invitrogen) and separated on 4–12% or 3-8% Bis-Tris gels (NuPAGE, Life Technologies). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes with the iBlot™ system (Life Technologies). After blocking with TBS/0.1% Tween20/ 5% nonfat dry milk for 1 hour, blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBS/ 5% nonfat dry milk for mouse anti-ZO-1 (Thermo Scientific, 1:200), rabbit anti-occludin (Abcam, 1:250), rabbit anti-claudin 1 (Invitrogen, 1:250) rabbit anti-phospho-Thr172-AMPK (P-AMPK), rabbit anti-AMPK, rabbit anti-phospho-p44/p42 (P-ERK), rabbit anti-p44/p42, rabbit anti phosphoY416Src, rabbit anti-Src (Cell Signaling), anti-phosphotyrosine 4G10Platinium and mouse anti-beta-GAPDH (1:1000; Santa Cruz). Immunoblots were probed with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Life Technologies) and visualized by chemiluminescence (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad) using Gel-Doc imager and the Image Lad Software (Bio-Rad).The value of phosphorylated or total protein immunoreactivity was normalized to

unphosphorylated form or GAPDH immunoreactivity, respectively, and expressed as fold increase relative to the average of control values taken as 1.

Animal procedure

For *in vivo* assessment of 15-HETE in IEB permeability, 15-HETE (2ml of 400ng/ml PBS) or 15-lipoxygenase inhibitor 1 (2ml of 4μl/ml PBS; Cayman chemical) were given to male Sprague Dowley rats (250g, Janvier) by two intraperitoneal injections of 1ml (IP) distanced of 2 hours. Four hours after the first IP, animals were sacrificed and the entire colon was removed, opened and washed three times in cold Krebs's solution ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.187 g L^{-1} , NaCl 6.84 g L^{-1} , KCl 0.35 g L^{-1} , NaHCO_3 2.10 g L^{-1} , Glucose 1.98 g L^{-1} , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.368 g L^{-1} , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.244 g L^{-1}). 4 pieces of each colon were mounted in Ussing chambers (0.03 cm^2 exposed surface area) (Physiological instruments, San Diego, CA, USA) as previously described [22] Each chamber contained 2 mL of Ham's Nutrient Mixture (HAM/F12; Invitrogen, Courtaboeuf, France). The media was maintained at 37 °C and continuously gassed with 95% O_2 and 5% CO_2 . After 30 min of equilibrium, 200 μL of apical medium was replaced by 200 μL of fluorescein-5.6 sulfonic acid (1 mg mL^{-1} ; Invitrogen). The fluorescence level of basolateral aliquots (150 μL) was measured every 30 min for a period of 180 min using a fluorimeter (Varioskan, Thermo SA, France). Paracellular permeability was determined by average of the gradient of change in fluorescence intensity over time, using a linear regression fit model measured in the specimens (GraphPad Software Company, La Jolla, CA, USA). 4 rats were included in each group. Two rats of the control group were treated with 15-HETE excipient, ethanol, whereas two others control rats were treated with the 15-LOX inhibitor excipient that is chloroform at the same dilution than the drugs.

Drugs

5- or 15-HETE were purchased from Cayman Chemicals. U0126 (MEK1/2 inhibitor; 10 μM; Calbiochem) or AICAR (AMPK activator; 10 μM; Calbiochem) were added 30 min prior or not to the addition of 15-HETE.

Statistical analysis

All graphics were drawn and analyzed with GraphPad Prism Software (GraphPad Software, San diego, California) using a Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA test followed by Dunn's post test. Values of p0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Rat EGC produce 5- and 15-HETE

To uncover molecules potentially implicated in glio-epithelial communication, we characterized the profile of 24 n-6 (eicosanoids)/n-3 (docosanoids) PUFA-derived metabolites in conditioned media of adult rat EGC (ROG) or embryonic rat cell line (JUG). 5- and 15-HETE levels were significantly higher in conditioned media of ROG and JUG compared to defined DMEM culture media (figure 1). 18-HEPE and 8-HETE levels were also significantly higher in ROG conditioned media, but not in the JUG one (figure 1). This analysis shows that rat EGC can produce 5- and 15-HETE.

15-HETE increases IEB spreading and resistance and decreases IEB permeability

In a first set of experiments we determined if these mediators could regulate IEB properties by direct treatment of Caco-2 with 5- or 15-HETE. Compared to untreated cells, 15-HETE significantly increased TEER (figure 2A) and decreased permeability (figure 2B) of Caco-2 monolayers, whereas 5-HETE has no significant effect. Both mediators increased Caco-2 spreading (figure 2C) compared to untreated cells. 5- or 15-HETE did not modify Caco-2 cell number in these conditions (figure 2D). These first functional data demonstrate that 5- or 15-HETE could regulate IEB properties, and that 15-HETE had broader effect than 5-HETE, regulating spreading but also resistance and permeability of an IEC monolayer.

Human and rat EGC express the 15-lipoxygenase-2

To better understand the 15-HETE production by EGC, we analyzed the expression of its two producing enzymes, the 15-lipoxygenase-1 (15-LOX-1) and the 15-lipoxygenase-2 (15-LOX-2) in ROG, but also in human EGC and human sub-mucosal plexus, by immunostaining. 15-LOX-2 immunoreactivity appeared as a cytoplasmic staining of 100% of ROG (figure 3A) or human EGC (figure 3B). 15-LOX-1 immunoreactivity was undetectable. Co-staining of human enteric submucosal plexus with 15-LOX-2 and S100 β glial marker showed that 15-LOX-2 is expressed *in situ* in EGC, but also in neurons (figure 3C).

Default of 15-HETE production by CD EGC is responsible for increased IEB permeability

To analyze the importance of glial production of 15-HETE and its impact on IEB in a pathological context, we studied EGC from CD patients compared to control patients. 15-HETE production was measured in control and CD EGC conditioned media. It revealed a significant lower level of 15-HETE in CD EGC conditioned media compared to control EGC conditioned media (figure 4A). To study functional impact of control and CD EGC on IEB, we replaced Caco-2 basolateral culture media by EGC conditioned media. Control EGC conditioned media induced a significant decrease in IEB permeability, but CD EGC conditioned media has no effect (figure 4B). 15-HETE supplementation in CD EGC conditioned media significantly decrease IEB permeability but has no additional effect when added in control EGC conditioned media (figure 4B). These data show that the functional defect presented by CD EGC could be fixed by 15-HETE addition.

***In vivo* inhibition of 15-HETE production induces IEB permeability**

To evaluate the range of 15-HETE impact on IEB permeability *in vivo*, rats were IP injected with 15-HETE or 15-LOX inhibitor1, and permeability of colon pieces was measured in Ussing chambers. Injection of 15-HETE has no significant effect, whereas injection of 15-LOX inhibitor1 induced an increase in IEB permeability (figure 4C). This shows that 15-HETE production constantly hold IEB permeability *in vivo*.

15-HETE induces ZO-1 expression in IEC

To further understand the mechanisms of 15-HETE regulation of IEB permeability, we analyzed the expression of tight junction proteins on Caco-2 cells treated with 15-HETE 5 min, 15 min or 24 hours. Expression of the *zonula occludens* 1 (ZO-1) was increased after 15 min and 24 hours of 15-HETE treatment, whereas claudin 1 and occludin expressions were unchanged (figure 5A and 5B). This shows that 15-HETE could decrease IEB permeability through a rise in ZO-1 expression.

15-HETE inhibits AMPK to increase IEB resistance

To refine signaling involved in 15-HETE control of IEB permeability, we analyzed the transduction pathways activated by 15-HETE in IEC. No 15-HETE receptors are currently described, but 15-HETE regulates several cellular functions through tyrosine phosphorylation,

Src, ERK or AMPK activations [23, 24, 25]. Global tyrosine phosphorylation did not vary along with time of 15-HETE stimulation (figure 6A and 6B). Quantification of specific major signals of tyrosine phosphorylation at 22, 40 or 110kDa did not show further variations (data not shown). ERK phosphorylation was significantly increased after 15 min and 24 hours of 15-HETE treatment, and Src phosphorylation remained stable (figure 6A and 6B). On the contrary AMPK phosphorylation was significantly reduced after 15 min of 15-HETE treatment (figure 6A and 6B). To study the implication of ERK activation or AMPK inhibition on 15-HETE induced reduction of permeability, we pretreated Caco-2 with the ERK pathway inhibitor U0126 or AMPK activator AICAR. U0126 treatment alone decreased IEB permeability and 15-HETE had no additional effect (figure 6C). The AICAR compound entirely blocked the 15-HETE-induced decrease in IEB permeability but had no effect alone (figure 6D). These data demonstrated that ERK activation by 15-HETE was not responsible for IEB permeability inhibition whereas AMPK inhibition did.

DISCUSSION

Whereas several works described phenotypic abnormalities in EGC from CD patients, no functional study was available to define if these cells presented dysfunctions. Our work demonstrates that CD EGC are defective for IEB permeability control, defect that could be due to their low 15-HETE production. At the same time we describe that EGC express the 15-LOX-2, and not the 15-LOX-1, to produce 15-HETE and regulate IEC spreading, IEB resistance and permeability. In addition, 15-HETE controls IEB permeability through AMPK and ZO-1 targeting.

The profile of PUFA derivatives produced by EGC indicate that a few metabolites are present in EGC conditioned medium, and that LOX metabolites such as 5- and 15-HETE are the most present. Considering the low stability of these compounds, we cannot conclude about the absence of the other PUFA production by EGC, but we could ensure the production of 5- and 15-HETE. The detection of 18-HEPE and 8-HETE in the culture of EGC from adult (ROG) and not from embryos (JUG) underline that PUFA production can also be linked to EGC development. We have previously shown that the 15dPGJ₂ prostaglandin could be produced by rat EGC [7], but this was observed when EGC were cultivated in presence of heat-inactivated fetal calf serum, that can activate AA release from phospholipids, and thereby globally increase PUFA production [26]. If we compare our data to measurement

performed in cells, EGC produce about hundred or thousand time less 15-HETE than cancer or normal prostate epithelial cells, respectively [27], cells that express the 15-LOX-2.

This study shows for the first time the expression of 15-LOX-2 in human EGC and ganglionated submucosal plexus of the enteric nervous system. Among the 18 LOX sequences published, the 15-LOX-2, originally identified in hair follicles has been found in skin, prostate, and cornea [28] and later in lung, esophageal epithelial cells and ovarian tissue [29, 30, 31]. The biological functions of 15-LOX-2 in different cell types are diverse. Until now, 15-LOX-2 has mainly been studied in relation to cancer and atherosclerosis. 15-LOX-2 negatively regulates proliferation of prostate epithelial cells [27, 32] and have tumor suppressing role [33, 34]. Concerning atherosclerosis, the beneficial role of 15-LOX have been for a long while questioned regarding the 15-LOX anti-inflammatory effect through lipid mediator production and pro-inflammatory and atherogenic effects through oxLDL formation [35]. Nevertheless recent works focus on 15-LOX-2 proatherogenic role [36, 37, 38] in particular by increasing inflammation. In fact, 15LOX-2 exerts biological activities via the formation of bioactive lipids, mainly the 15-HETE, that could exhibit numerous pro- or anti-inflammatory properties. 15-HETE increases platelet aggregation [39], induces endothelial cell barrier dysfunction [40], angiogenesis [24, 41, 42, 43, 44] and vascular or pulmonary smooth muscle remodeling [23, 25, 45, 46, 47, 48, 49, 50]. Concerning effects on epithelium, 15-HETE has been shown to induce cell growth of pre-confluent non-differentiated intestinal epithelial cells [51]. We did not find 15-HETE effect on Caco-2 cell number, and couldn't explain this difference i.e. same cell line, drug concentration and incubation time, except that we were cultivating IEC on filters. Only one other study described that 15(S)-HETE can increase Caco-2 TEER and decrease permeability [52]. We confirm these results and have additionally shown that 15-HETE induces Caco-2 spreading and control the permeability *in vivo*. This enlarges the spectra of 15-HETE effects on IEB, and because they are beneficial, we could consider them to reinforce the IEB, especially in a pathological context presenting IEB defects.

Due to their anti- or pro-inflammatory properties, some PUFA has already been measured in mucosa of inflammatory bowel disease patients [15, 16, 17, 18]. More recently, it has been shown that levels of PGE₂, PGD₂, TXB₂, 5-HETE, 11-HETE, 12-HETE and 15-HETE are significantly elevated in inflamed mucosa and correlate with severity of inflammation in UC patients [53]. 15-HETE production is also induced after ischemia in mice jejunal tissue [54]. Our work brings evidence for a protective role of 15-HETE, prompt to

reinforce the IEB by diminishing its permeability. But our data show that this is a continuous effect performed by healthy EGC. We were unable to detect any significant impact of additional 15-HETE on gut wall permeability, suggesting that 15-HETE overproduction should have other target cells such as macrophages.

Our work additionally shows that on Caco-2 cells, 15-HETE does not activate Src or induce tyrosine phosphorylation as previously described [25, 46], but activates the ERK and inhibits the AMPK pathways. But ERK activation is not responsible for the reduction of permeability observed, whereas the AMPK inhibition does. The energy sensor AMPK is generally activated in response to cellular stress, as occurs during inflammation, and to our knowledge few data link 15-LOX activity or 15-HETE production to AMPK. Nevertheless the nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibitor of 15-LOX induced phosphorylation and activation AMPK [55], confirming the relation we are describing between 15-HETE and AMPK. In addition, if the expression of AMPK is necessary for an amelioration of the epithelial barrier [56, 57], AMPK activation has been linked to intestinal barrier dysfunction [58, 59]. In addition AMPK activation has already been shown to decrease ZO-1 expression [58]. Further work is necessary to define if as described, inhibition of the AMPalpha2 isoform, but not inhibition of the alpha1 can reinforce epithelial barrier [60].

Our works define the novel protective role of 15-HETE on the IEB, and shows that 15-HETE mediate its effect through AMPK inhibition. In addition, this work brings the first evidence of human EGC dysfunction in CD. Altogether our *ex vivo* functional studies indicate that primary cultures of EGC isolated from non-inflamed intestine of CD patients exhibit loss of function as compared to EGC isolated from control patients. These findings suggest that CD EGC have altered intrinsic functional phenotype. It is thus tempting to speculate that impaired intrinsic functions of EGC from CD patients predispose and/or directly participate to the disease onset, supporting the idea that CD could be a 'gliopathy'.

Acknowledgement We are indebted to Tony Durand for quantitative PCR expertise. Experiments were carried within the small animal exploration facility Cardix, which is supported by the GIS-IBiSA program.

Contributors MRD and MN designed the research study, supervised the study and wrote the paper. CP, SC, JJ and NC performed experiments. MRD and CP analyzed the data. NC and NV participated in the critical reading of the manuscript. GM managed and provided human surgical samples.

Funding This work was supported by grants from the INSERM, Nantes University, and the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) of Nantes. SC is a recipient of a doctoral fellowship from Inserm-Pays de La Loire. MRD is supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS). MN is supported by a Contrat d'interface Hospitalier du CHU of Nantes.

Competing interests

The authors have no competing interests.

Ethics approval Experiment were performed according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Human and registered under the no. DC-2008-402

REFERENCES

- 1 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.
- 2 Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, *et al.* Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;**98**:13306-11.
- 3 Aube 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.
- 4 Arrieta MC, Madsen K, Doyle J, *et al.* Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. *Gut* 2009;**58**:41-8.
- 5 Neunlist M, Van Landeghem L, Mahe MM, *et al.* The digestive neuronal-glial-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nature reviews* 2013;**10**:90-100.
- 6 Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, *et al.* Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2007;**292**:G231-41.
- 7 Bach-Ngohou K, Mahe MM, Aubert P, *et al.* Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *The Journal of physiology* 2010;**588**:2533-44.
- 8 Van Landeghem L, Chevalier J, Mahe MM, *et al.* Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2011;**300**:G976-87.
- 9 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.
- 10 Cheadle GA, Costantini TW, Lopez N, *et al.* Enteric glia cells attenuate cytomix-induced intestinal epithelial barrier breakdown. *PloS one* 2013;**8**:e69042.
- 11 Costantini TW, Krzyzaniak M, Cheadle GA, *et al.* Targeting alpha-7 Nicotinic Acetylcholine Receptor in the Enteric Nervous System: A Cholinergic Agonist Prevents Gut Barrier Failure after Severe Burn Injury. *The American journal of pathology* 2012;**181**:478-86.
- 12 Flamant M, Aubert P, Rolli-Derkinderen M, *et al.* Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut* 2011;**60**:473-84.
- 13 von Boyen GB, Schulte N, Pfluger C, *et al.* Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC gastroenterology* 2011;**11**:3.
- 14 Jupp J, Hillier K, Elliott DH, *et al.* Colonic expression of leukotriene-pathway enzymes in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases* 2007;**13**:537-46.
- 15 Hommes DW, Meenan J, de Haas M, *et al.* Soluble Fc gamma receptor III (CD 16) and eicosanoid concentrations in gut lavage fluid from patients with inflammatory bowel disease: reflection of mucosal inflammation. *Gut* 1996;**38**:564-7.
- 16 Sharon P, Stenson WF. Enhanced synthesis of leukotriene B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1984;**86**:453-60.

- 17 Rampton DS, Sladen GE, Youlten LJ. Rectal mucosal prostaglandin E2 release and its relation to disease activity, electrical potential difference, and treatment in ulcerative colitis. *Gut* 1980;**21**:591-6.
- 18 Nielsen OH, Ahnfelt-Ronne I, Elmgreen J. Abnormal metabolism of arachidonic acid in chronic inflammatory bowel disease: enhanced release of leucotriene B4 from activated neutrophils. *Gut* 1987;**28**:181-5.
- 19 Murakami M, Ohta T, Otsuguro KI, *et al.* Involvement of prostaglandin E(2) derived from enteric glial cells in the action of bradykinin in cultured rat myenteric neurons. *Neuroscience* 2007;**145**:642-53.
- 20 Soret R, Coquenlorge S, Cossais F, *et al.* Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 2013;**25**:e755-64.
- 21 Le Faouder P, Baillif V, Spreadbury I, *et al.* LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *Journal of chromatography* 2013;**932**:123-33.
- 22 De Quelen F, Chevalier J, Rolli-Derkinderen M, *et al.* n-3 polyunsaturated fatty acids in the maternal diet modify the postnatal development of nervous regulation of intestinal permeability in piglets. *The Journal of physiology* 2011;**589**:4341-52.
- 23 Jiang J, Wang S, Wang Z, *et al.* The role of ERK1/2 in 15-HETE-inhibited apoptosis in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Journal of receptor and signal transduction research* 2011;**31**:45-52.
- 24 Kundumani-Sridharan V, Niu J, Wang D, *et al.* 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced angiogenesis requires Src-mediated Egr-1-dependent rapid induction of FGF-2 expression. *Blood* 2010;**115**:2105-16.
- 25 Singh NK, Wang D, Kundumani-Sridharan V, *et al.* 15-Lipoxygenase-1-enhanced Src-Janus kinase 2-signal transducer and activator of transcription 3 stimulation and monocyte chemoattractant protein-1 expression require redox-sensitive activation of epidermal growth factor receptor in vascular wall remodeling. *The Journal of biological chemistry* 2011;**286**:22478-88.
- 26 Lahoua Z, Astruc ME, Crastes de Paulet A. Serum-induced arachidonic acid release and prostaglandin biosynthesis are potentiated by oxygenated sterols in NRK 49F cells. *Biochimica et biophysica acta* 1988;**958**:396-404.
- 27 Tang S, Bhatia B, Maldonado CJ, *et al.* Evidence that arachidonate 15-lipoxygenase 2 is a negative cell cycle regulator in normal prostate epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 2002;**277**:16189-201.
- 28 Brash AR, Boeglin WE, Chang MS. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;**94**:6148-52.
- 29 Chanez P, Bonnans C, Chavis C, *et al.* 15-lipoxygenase: a Janus enzyme? *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2002;**27**:655-8.
- 30 Xu XC, Shappell SB, Liang Z, *et al.* Reduced 15S-lipoxygenase-2 expression in esophageal cancer specimens and cells and upregulation in vitro by the cyclooxygenase-2 inhibitor, NS398. *Neoplasia (New York, NY)* 2003;**5**:121-7.
- 31 Roffeis J, Hornung D, Kuhn H, *et al.* 15-Lipoxygenase-2 is differentially expressed in normal and neoplastic ovary. *Eur J Cancer Prev* 2007;**16**:568-75.

- 32 Tang DG, Bhatia B, Tang S, *et al.* 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) is a functional tumor suppressor that regulates human prostate epithelial cell differentiation, senescence, and growth (size). *Prostaglandins & other lipid mediators* 2007;**82**:135-46.
- 33 Bhatia B, Maldonado CJ, Tang S, *et al.* Subcellular localization and tumor-suppressive functions of 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) and its splice variants. *The Journal of biological chemistry* 2003;**278**:25091-100.
- 34 Jiang WG, Watkins G, Douglas-Jones A, *et al.* Reduction of isoforms of 15-lipoxygenase (15-LOX)-1 and 15-LOX-2 in human breast cancer. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 2006;**74**:235-45.
- 35 Wittwer J, Hersberger M. The two faces of the 15-lipoxygenase in atherosclerosis. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 2007;**77**:67-77.
- 36 Magnusson LU, Lundqvist A, Karlsson MN, *et al.* Arachidonate 15-lipoxygenase type B knockdown leads to reduced lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis. *PloS one* 2012;**7**:e43142.
- 37 Wuest SJ, Crucet M, Gemperle C, *et al.* Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages. *Atherosclerosis* 2012;**225**:121-7.
- 38 Rydberg EK, Krettek A, Ullstrom C, *et al.* Hypoxia increases LDL oxidation and expression of 15-lipoxygenase-2 in human macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2004;**24**:2040-5.
- 39 Vijil C, Hermansson C, Jeppsson A, *et al.* Arachidonate 15-lipoxygenase enzyme products increase platelet aggregation and thrombin generation. *PloS one* 2014;**9**:e88546.
- 40 Othman A, Ahmad S, Megyerdi S, *et al.* 12/15-Lipoxygenase-derived lipid metabolites induce retinal endothelial cell barrier dysfunction: contribution of NADPH oxidase. *PloS one* 2013;**8**:e57254.
- 41 Ma C, Li Y, Ma J, *et al.* Key role of 15-lipoxygenase/15-hydroxyeicosatetraenoic acid in pulmonary vascular remodeling and vascular angiogenesis associated with hypoxic pulmonary hypertension. *Hypertension* 2011;**58**:679-88.
- 42 Soumya SJ, Binu S, Helen A, *et al.* Effect of 15-lipoxygenase metabolites on angiogenesis: 15(S)-HPETE is angiostatic and 15(S)-HETE is angiogenic. *Inflamm Res* 2012;**61**:707-18.
- 43 Soumya SJ, Binu S, Helen A, *et al.* 15(S)-HETE-induced angiogenesis in adipose tissue is mediated through activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 2014;**91**:498-505.
- 44 Yuan D, Ran Y, Liu Q, *et al.* Enhancement of the HIF-1 α /15-LO/15-HETE axis promotes hypoxia-induced endothelial proliferation in preeclamptic pregnancy. *PloS one* 2014;**9**:e96510.
- 45 Li X, Ma C, Zhu D, *et al.* Increased expression and altered subcellular distribution of PKC- δ and PKC- ϵ in pulmonary arteries exposed to hypoxia and 15-HETE. *Prostaglandins & other lipid mediators* 2010;**93**:84-92.
- 46 Potula HS, Wang D, Quyen DV, *et al.* Src-dependent STAT-3-mediated expression of monocyte chemoattractant protein-1 is required for 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vascular smooth muscle cell migration. *The Journal of biological chemistry* 2009;**284**:31142-55.
- 47 Wang S, Wang Y, Jiang J, *et al.* 15-HETE protects rat pulmonary arterial smooth muscle cells from apoptosis via the PI3K/Akt pathway. *Prostaglandins & other lipid mediators* 2010;**91**:51-60.

- 48 Wang Y, Liang D, Wang S, *et al.* Role of the G-protein and tyrosine kinase--Rho/ROK pathways in 15-hydroxyeicosatetraenoic acid induced pulmonary vasoconstriction in hypoxic rats. *Journal of biochemistry* 2010;**147**:751-64.
- 49 Zhang L, Ma J, Li Y, *et al.* 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) protects pulmonary artery smooth muscle cells against apoptosis via HSP90. *Life sciences* 2010;**87**:223-31.
- 50 Zhang L, Ma J, Shen T, *et al.* Platelet-derived growth factor (PDGF) induces pulmonary vascular remodeling through 15-LO/15-HETE pathway under hypoxic condition. *Cellular signalling* 2012;**24**:1931-9.
- 51 Cabral M, Martin-Venegas R, Moreno JJ. Role of arachidonic acid metabolites on the control of non-differentiated intestinal epithelial cell growth. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2013;**45**:1620-8.
- 52 Ohata A, Usami M, Miyoshi M. Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxygenase activation. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* 2005;**21**:838-47.
- 53 Masoodi M, Pearl DS, Eiden M, *et al.* Altered colonic mucosal Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) derived lipid mediators in ulcerative colitis: new insight into relationship with disease activity and pathophysiology. *PloS one* 2013;**8**:e76532.
- 54 Gobbetti T, Le Faouder P, Bertrand J, *et al.* Polyunsaturated fatty acid metabolism signature in ischemia differs from reperfusion in mouse intestine. *PloS one* 2013;**8**:e75581.
- 55 Lee MS, Kim D, Jo K, *et al.* Nordihydroguaiaretic acid protects against high-fat diet-induced fatty liver by activating AMP-activated protein kinase in obese mice. *Biochemical and biophysical research communications* 2010;**401**:92-7.
- 56 Elamin EE, Masclee AA, Dekker J, *et al.* Short-chain fatty acids activate AMP-activated protein kinase and ameliorate ethanol-induced intestinal barrier dysfunction in Caco-2 cell monolayers. *The Journal of nutrition* 2013;**143**:1872-81.
- 57 Jing H, Yao J, Liu X, *et al.* Fish-oil emulsion (omega-3 polyunsaturated fatty acids) attenuates acute lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion through Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase-sirtuin1 pathway. *The Journal of surgical research* 2014;**187**:252-61.
- 58 Scharl M, Paul G, Barrett KE, *et al.* AMP-activated protein kinase mediates the interferon-gamma-induced decrease in intestinal epithelial barrier function. *The Journal of biological chemistry* 2009;**284**:27952-63.
- 59 Scharl M, Paul G, Weber A, *et al.* Protection of epithelial barrier function by the Crohn's disease associated gene protein tyrosine phosphatase n2. *Gastroenterology* 2009;**137**:2030-40 e5.
- 60 Qin S, Rodrigues GA. Differential roles of AMPKalpha1 and AMPKalpha2 in regulating 4-HNE-induced RPE cell death and permeability. *Experimental eye research* 2010;**91**:818-24.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Rat EGC mostly produce 5- and 15-HETE.

Production of eicosanoids from arachidonic acid (AA) was measured using high sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry in the culture medium of adult rat EGC (ROG) or embryonic rat cell line (JUG). Data represent means $\pm$ SEM of 4 independent cultures. * $p < 0.05$

Figure 2. 15-HETE increases IEB spreading and resistance and decreases IEB permeability.

5- or 15-HETE functional impact on IEB was assessed by TEER, permeability, spreading and proliferation measurement. (A) TEER was measured on Caco-2 monolayer after 1 day of 5- or 15-HETE (100pg/ml) in the basolateral chamber. (B) Permeability was measured by sulfonic acid flux through the same Caco-2 monolayer. (C) Spreading was measured using ZO-1 staining on Caco-2 after 2 days of treatments. (D) Cell proliferation was estimated by direct counting of DAPI staining. These four parameters are represented as fold to the control average. Data represent means $\pm$ SEM of 4 to 6 independent experiments. * $p < 0.05$

Figure 3. Human and rat EGC express the 15-lipoxygenase-2.

(A) ROG immunostaining for 15-lipoxygenase-2 (15-LOX-2) (B) Submucosal immunohistochemistry was performed using anti-15LOX-2 and -S100 β (glial marker) antibodies. Representative pictures. Scale bar 100 μ m.

Figure 4. EGC from CD patients are functionally abnormal: they misproduce 15-HETE and fail to reduce IEB permeability.

(A) 15-HETE production was measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the culture medium of human EGC from control (control) or CD (CD) patients. Data represent means $\pm$ SEM of 6 independent control and 5 CD EGC cultures. * $p < 0.05$. (B) Permeability was measured by sulfonic acid flux through the Caco-2 monolayer incubated without (WO) or with control (cont) or CD (CD) EGC conditioned media, with the supplementation in 15-HETE(+15-HETE) or not. Data represent means $\pm$ SEM of fold to the control average of 3 to 6 independent experiments. * $p < 0.05$. (C) 15-HETE functional impact *in vivo* was evaluated by the measurement of colon permeability of rats 4 hours after IP injections with 15-HETE (15-HETE) or 15-lipoxygenase inhibitor 1 (15-lox INH). Data represent means $\pm$ SEM of two independent experiments, 4 animals per group for each experiment; * $p < 0.05$.

Figure 5. 15-HETE induces ZO-1 expression in IEC

(A) Claudin-1, occludin and ZO-1 expressions were measured by Western blotting from Caco-2 monolayers stimulated 5 min, 15 min or 24 h with 15-HETE (100 pg/ml) at the basolateral side.(B) Quantification of Western blot analysis. Data represent means of fold to control average $\pm$ SEM of 4 independent experiments.* $p<0.05$

Figure 6. 15-HETE inhibits AMPK to decrease IEB permeability

(A) Total phospho-Tyrosine (P-Tyr), ERK phosphorylation (P-ERK), Src phosphorylation (P-Src) and AMPK phosphorylation (P-AMPK) levels were measured by Western blotting from Caco-2 monolayer stimulated 5 min, 15 min or 24 h with 15-HETE (100pg/ml) at the basolateral side.(B) Quantification of Western blot analysis. Data represent means of fold to control average $\pm$ SEM of 4 independent experiments.* $p<0.05$ (C) Impact of ERK inhibition on IEB permeability was assessed by pretreatment of Caco-2 monolayer with the MEK inhibitor (U0126, 10 μ M) 30min prior 15-HETE stimulation. Data represent means of fold to control average $\pm$ SEM of 3 independent experiments.* $p<0.05$ (D) Impact of AMPK activation on IEB permeability was assessed by treatment of Caco-2 monolayer with the AMPK activator (AICAR, 10 μ M). Data represent means of fold to control average $\pm$ SEM of 3 independent experiments.* $p<0.05$ vs control; . $p<0.05$ vs 15-HETE

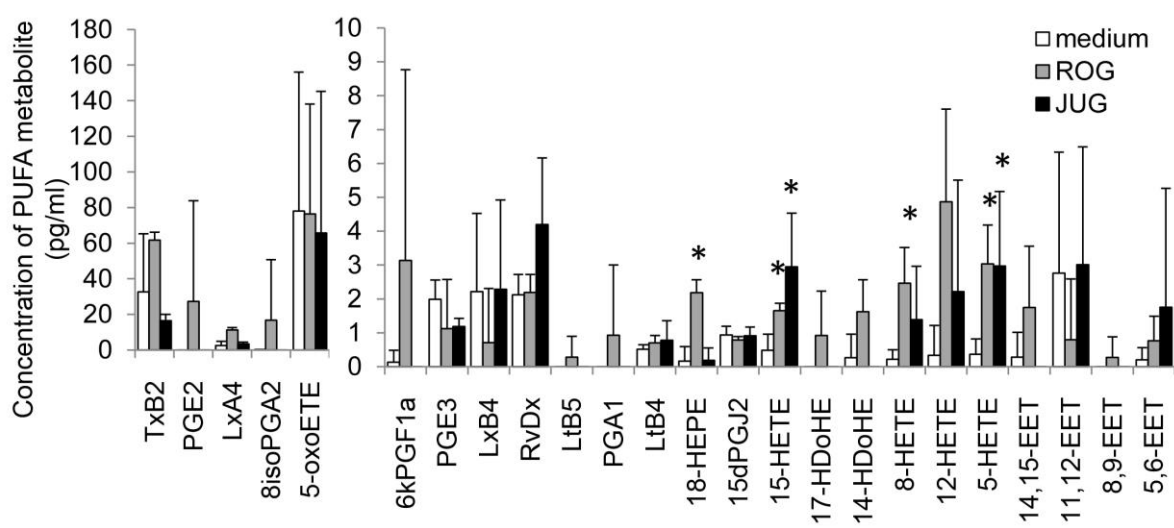


Figure 1

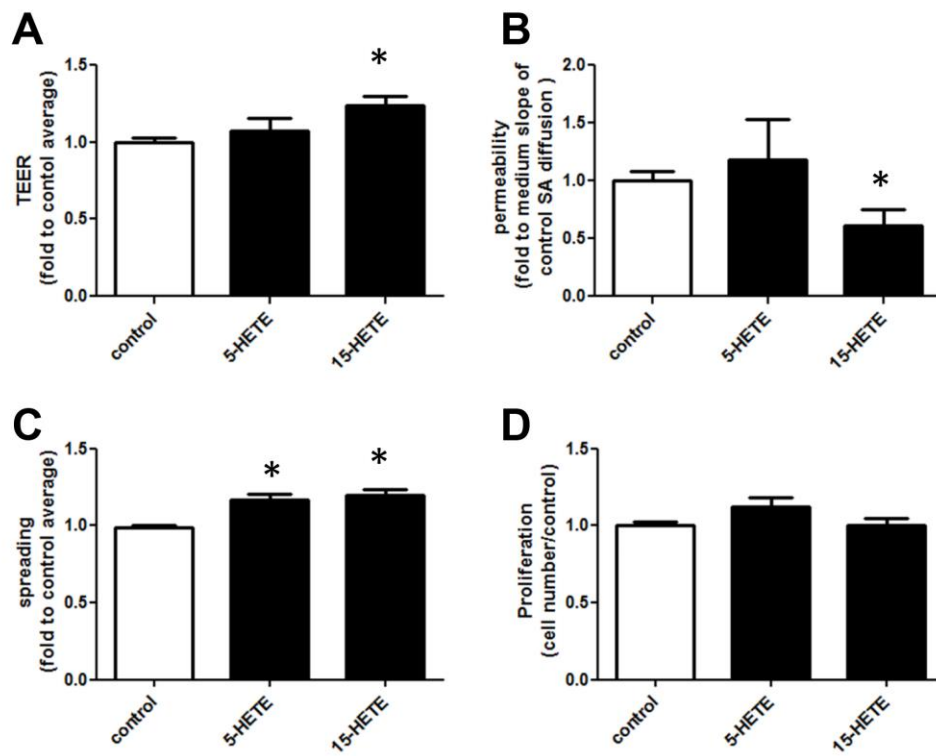


Figure 2

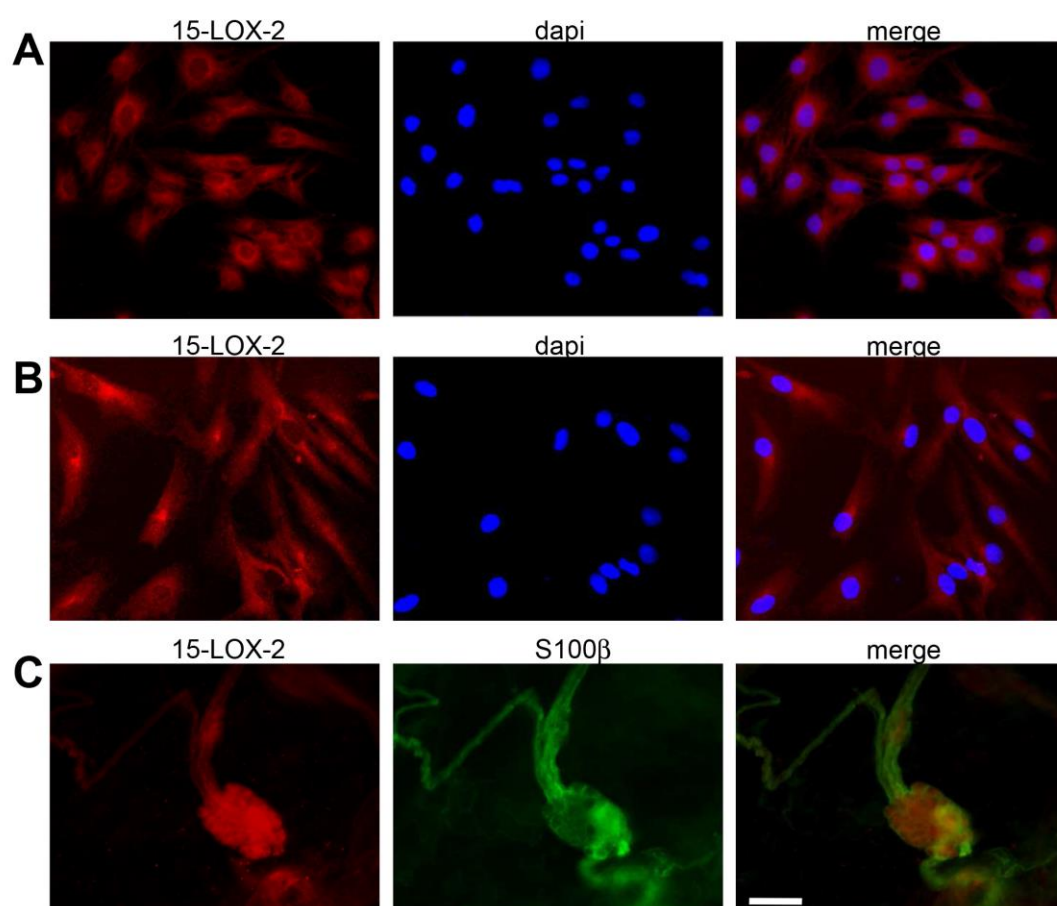


Figure 3

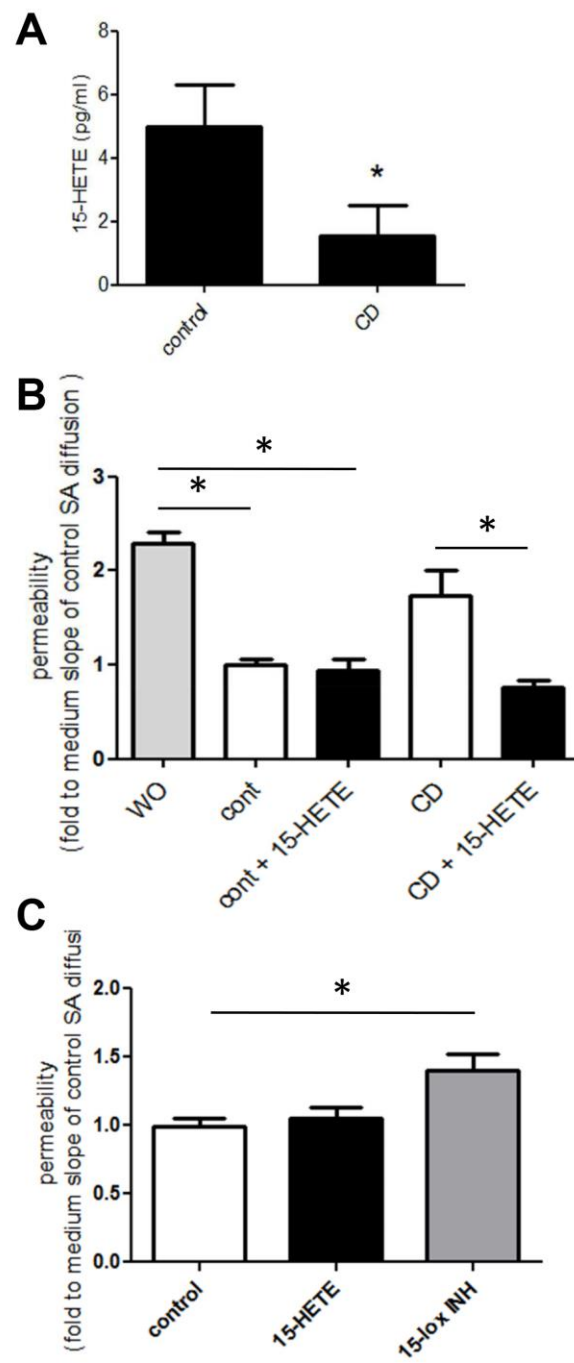


Figure 4

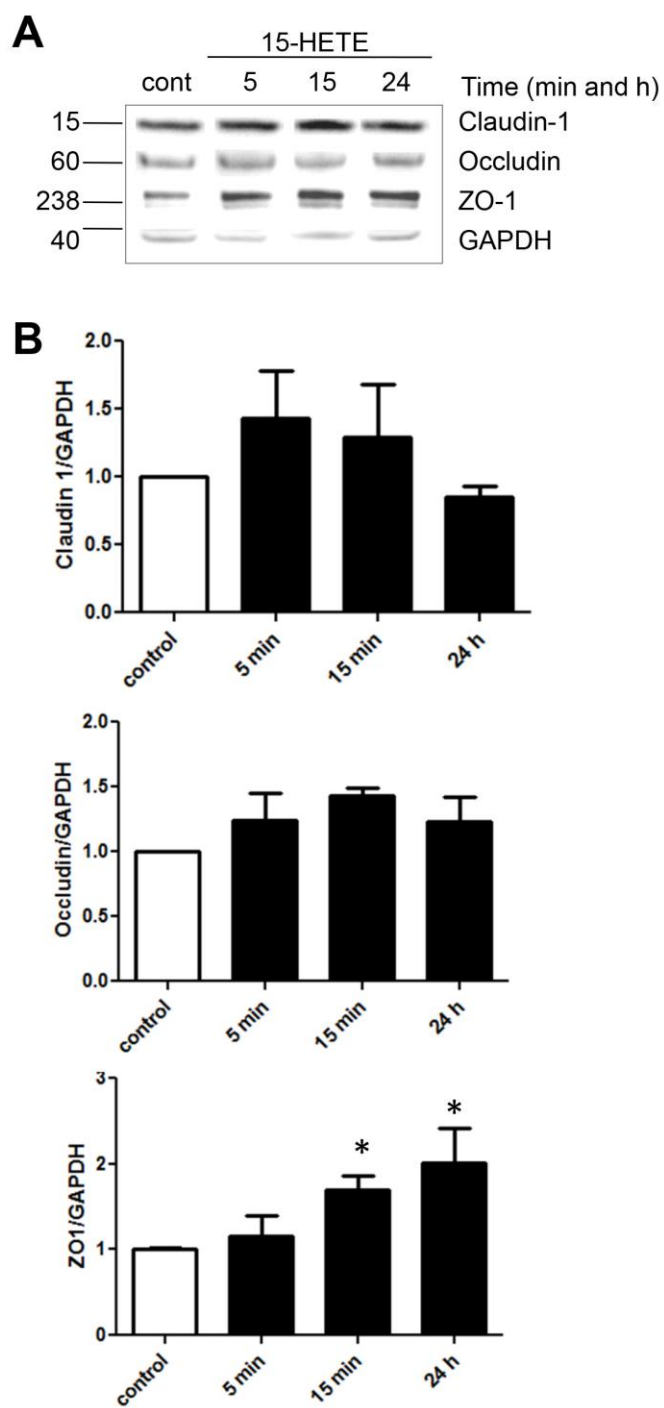


Figure 5

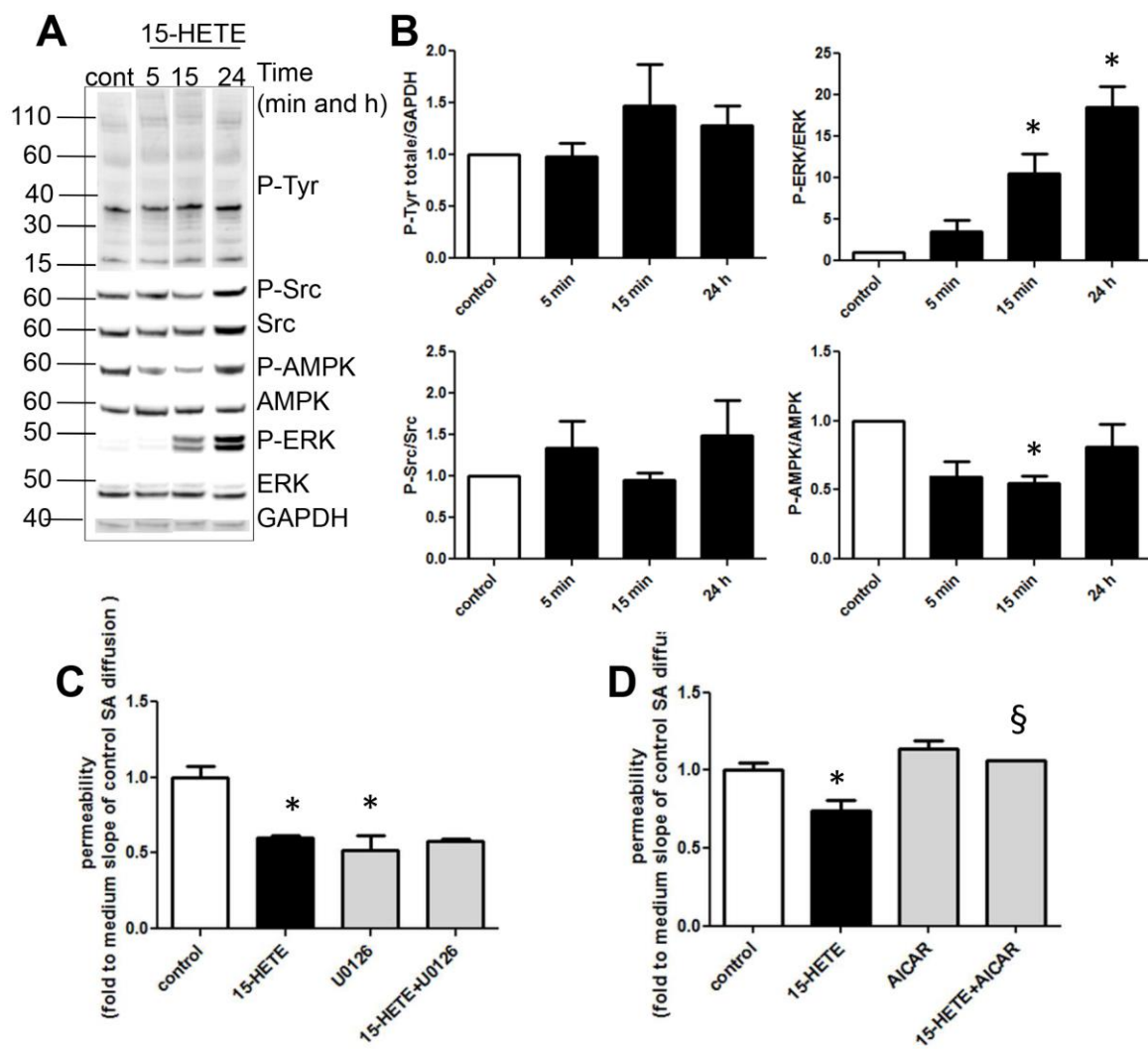


Figure 6

Article 3: Un défaut de L-PGDS dans les cellules gliales entériques de patients atteints de la maladie de Crohn réduit les capacités de réparation de la barrière épithéliale intestinale.

Présentation de l'article 3

Dans l'article précédent, nous avons identifié un nouveau médiateur lipidique produit par les CGE de rat, le 15-HETE et nous avons ainsi montré son rôle dans le contrôle de la perméabilité épithéliale intestinale. De plus, nous avons mis en évidence un défaut de production de 15-HETE par les CGE de patients atteints de la MC suggérant des dysfonctions intrinsèques des CGE qui pourraient concourir à la pathogenèse des MICI.

Pour continuer nos investigations sur les CGE, nous nous sommes exclusivement concentrés sur la caractérisation des CGE humaines en comparant des CGE pathologiques, issues de pièces opératoires de patients atteints de la MC, à des CGE « saines », issues de pièces de résection colique de patients atteints de cancer (Soret et al., 2013 ; Annexe 4). Nous avons tout d'abord caractérisé l'expression des marqueurs gliaux, S100 β , GFAP et Sox10 mais aussi par la production de médiateurs gliaux connus (TGF β 1, pro-EGF, IL-6, GSNO) pour réguler la prolifération, la différenciation, la réparation, la résistance ou encore la perméabilité de la BEI (Neunlist et al., 2013).

Pour élargir notre recherche et identifier d'autres glio-médiateurs potentiellement impliqués dans la pathogenèse des MICI, nous avons, par la même technique de spectrophotométrie que dans l'article précédent, effectué un screening de 31 lipides dans les milieux conditionnés des CGE humaines (6kPGF $_1\alpha$, TxB $_2$, PGE $_2$, PGE $_3$, PGD $_2$, PGF $_2$, 11 β PGF $_2\alpha$, PGA $_1$, 8-iso-PGA $_2$, 15dPGJ $_2$, 7MaR $_1$, LxA $_4$, RvD $_1$, RvD $_2$, LTB $_4$, LTB $_5$, PDx, 18-HEPE, 5-, 8-, 12- et 15-HETE, 14- et 17-HDoHE, 14,15-EET, 11,12-EET, 8,9-EET, 5,6-EET, 5-oxo-EET, 9- et 13-HODE). Nous avons caractérisé l'impact fonctionnel de deux nouveaux gliomédiateurs sur l'étalement, la prolifération, la résistance et la réparation de la BEI, ainsi qu'identifier en partie les mécanismes impliqués dans ces effets.

Ce travail identifie un nouveau glio-médiateur lipidique, le 11 β PGF $_2\alpha$ et son rôle sur la réparation de la BEI. Il met à nouveau en évidence une dysfonction intrinsèque des CGE, une moindre capacité à induire la réparation de la BEI, due cette fois à un défaut de production de 11 β PGF $_2\alpha$ et de 15dPGJ $_2$ par les CGE de patients atteints de MC. Cette dysfonction pourrait participer et/ou être à l'origine de la maladie de Crohn.

Cet article est actuellement en préparation.

L-PGDS lack in enteric glial cells from Crohn's disease patients restricts intestinal epithelial barrier healing

Short title: Glial 15dPGJ₂ and 11βPGF₁α impact mucosa

Sabrina COQUENLORGE,⁽¹⁻⁴⁾ Laurianne VAN LANDEGHEM,⁽¹⁻⁴⁾ Julie JAULIN,⁽¹⁻⁴⁾
Nicolas CENAC⁽⁵⁻⁶⁾, Nathalie VERGNOLLE,⁽⁵⁻⁶⁾ Michel NEUNLIST,[§]
⁽¹⁻⁴⁾ and Malvyne ROLLI-DERKINDEREN^{§ (1-4)}

¹ INSERM, UMR913, Nantes, F-44093, France.

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

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

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

⁵ Centre de Pathophysiologie, CHU Purpan, Toulouse.

⁶ INSERM UMR-1043 CNRS UMR-5282, Toulouse, France.

[§] Equal contribution

Correspondence:

Malvyne Rolli-Derkinderen or Michel Neunlist. Neuropathies of the enteric nervous system and digestive diseases, INSERM UMR913. School of Medicine, University of Nantes; 1, rue Gaston Veil, NANTES; F-44035, France; Phone number: +33 (0)2 40 41 29 50; Fax number +33 (0)2 40 08 75 06; e-mail address: malvyne.derkinderen@univ-nantes.fr; Michel.Neunlist@univ-nantes.fr

Grant Support. This work was supported by grants from the INSERM, Nantes University, and the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) of Nantes. SC is a recipient of a doctoral fellowship from Inserm-Pays de La Loire. MRD is supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS). MN is supported by a Contrat d'interface Hospitalier du CHU of Nantes. LVL is supported by La Ligue

Abbreviations-*List alphabetically abbreviations not mentioned in the Style Guide, which follows the Instructions to Authors. (Note: In general, the use of abbreviations is discouraged.)*

Disclosures. The authors have no competing interests.

Author Contributions. SC, LVL, JJ and NC performed experiments. MRD and MN designed the research study and supervised the study. SC, LVL, MRD and MN wrote the paper. SC, MRD and MN analyzed the data. NV participated in the critical reading of the manuscript.

Acknowledgement We are indebted to Guillaume Meurette for the management and supply of human surgical samples.

ABSTRACT 260words

Background & aims: Enteric glial cells (EGC) are essential to intestinal epithelial barrier (IEB) homeostasis and functions. Particularly, in healthy intestines, EGC reduce IEB permeability and promote mucosal healing. In Crohn's Disease (CD), both EGC phenotype and IEB functions are altered, but putative involvement of EGC in CD pathogenesis remains unknown. We investigated whether EGC impact on IEB functions is altered/impaired in CD and sought to identify the mechanisms involved.

Methods: EGC isolated from CD and control patients were cultured for phenotypic and functional characterization. EGC secretome was studied using ELISA or high sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry for lipid profiling. EGC functional impact on human IEC (Caco-2) was studied measuring transepithelial electrical resistance (TEER), spreading, proliferation and wound healing in a non-contact co-culture model. 15dPGJ₂, PPAR γ agonist (Rosiglitazone) or antagonist (GW9662), as well as antagonists of prostaglandin F receptor (AL8810) and prostaglandin D2 receptor (CAY10595) were used to assess signaling pathways involved.

Results: EGC isolated from CD and control patients showed similar expression of glial markers (GFAP, S100 β , Sox10) and EGC-derived soluble factors (IL-6, TGF β , proEGF, GSH), but CD EGC produced significantly decreased amounts 15dPGJ₂ and 11 β PGF₂ α and expressed less L-PGDS. In contrast to control EGC, CD EGC had no significant impact on IEC TEER, spreading and proliferation. EGC effects on IEC proliferation, spreading and IEB resistance were reproduced by 15dPGJ₂, 11 β PGF₂ α and PPAR γ agonist, but were blocked by FP, DP2 and PPAR γ antagonists.

Conclusion: CD EGC have impaired ability to promote IEB healing and this is caused by defects in L-PGDS-dependent pathway.

Keywords : spreading, inflammatory bowel disease, PPAR γ , PUFA

INTRODUCTION

Compelling evidence has demonstrated that defects in mucosal healing are central to Crohn's Disease (CD) pathogenesis and prognosis. In particular several studies have reported that intestinal transmural lesions precede inflammation and are considered as a predictive factor of relapse (Arrieta 2006; Wyatt 1993; Hollander 1986; Ma 1997). Mucosal healing has further been suggested to represent a treatment goal and a predictive factor for sustained clinical remission in CD (Froslic 2007; Baert et al, 2010).

The intestinal epithelium is a dynamic interface between the environment and the organism that must constantly preserve its integrity to maintain digestive and barrier functions. After injury, mucosal repair is a key process to restore epithelium lining, permeability and intestinal homeostasis. Three main concomitant regenerative processes participate to mucosal healing and include epithelial restitution, that involves cell spreading and migration into the wound, cell proliferation and differentiation (Sturm 2008). It has now been well demonstrated that IEB functions, including intestinal healing, are regulated by neighboring cells, the so-called microenvironment, and in particular the enteric nervous system (ENS).

ENS is an integrative neuronal network localized along the gastrointestinal tract that regulates key digestive functions such as gut motility and mucosal secretion (Shemann and Neunlist 2004, Furness 2006). ENS is composed of enteric neurons and enteric glial cells (EGC) that outnumber enteric neurons by a factor of 4 to 10 (Hoff 2008) and share common markers and functional properties with central nervous system astrocytes (Jessen & Mirsky 1980, Gabella 1981, Ferri, 1982, Ruhl 2004, Savidge 2007, Abbott 2006). EGC form a dense network that surrounds intestinal crypts, and are located at less than 2 μ m from intestinal epithelial cells (IECs). A considerable number of studies from our group and others have now well demonstrated that EGC are key regulators of IEB homeostasis and functions. In particular EGC selectively impact IEC major functions *via* paracrine signaling. For instance they inhibit IEC proliferation *via* the release of TGF- β 1 and 15dPGJ₂, a derivative of omega-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA), and activation of PPAR γ -dependent pathways (Neunlist et al, 2007; Bach-Ngohou 2010). Importantly, EGC promote mucosal healing *via* enhanced cell spreading/restitution and proEGF secretion (Van Landeghem et al, 2011), and decrease intestinal permeability *via* S-nitrosoglutathione (GSNO) production (Savidge et al, 2007).

Of major interest, EGC ablation in transgenic murine models leads to histopathological alterations reminiscent to CD (Bush et al 1998; Cornet et al 2001, Aube 2006). Some human studies have reported abnormalities of the EGC network in CD patients with mostly altered expression of EGC markers such as S100 β and GFAP (Von Boyen 2011; Villanacci 2008, Cornet et al, 2001). However whether CD EGC have altered ability to regulate IEC functions remains totally unknown.

In this study, we hypothesized that CD EGC will show impaired functional phenotype as compared to ‘healthy’ EGC, thus participating to CD-associated defects in mucosal healing. Using a non-contact co-culture model of human EGC isolated from CD or control patients and IEC (Caco-2), we assessed whether CD EGC have differential impact on IEC proliferation, spreading and healing than control EGC, and we identified glial-soluble factors and signaling pathways involved.

MATERIALS AND METHODS

Enteric glial cells

Cultures of human enteric glial cells (EGC) were obtained according to the procedure described by Soret et al. ¹. Briefly, human EGC originated from intestinal resections of control patients (patients having undergone surgery for colorectal cancer) and from patients with an established diagnosis of CD according to international criteria. 15 control (age 56–89y; sexe ratio 5men:10women) and 11 CD (age, 17-63y; sexe ratio 4men :7women 1) patients were included in this study. Patients gave their informed consent to take part in the study and all procedures were performed according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Human and registered under the no. DC-2008-402. All over the passages, an immunocytochemistry study was assessed to verify the purity of the cellular population as described by Soret et al. ¹. EGC cultures presenting more than 80% of GFAP-, Sox10-, and S100 β positive cells were use for these experiments, at passage 3.

Co-culture model and spreading, TEER and healing measurement

The human IEC line Caco-2 was cultured in DMEM medium. For “spreading and resistance“ experiments, Caco-2 cells and EGC were respectively seeded on 24-well transwell filters (Pore size 0.45 μ m, Corning, Avon, France) at 90×10^3 cells/cm² and in 24-well plates at $7,9 \times 10^3$ cells/cm² for three days. The IEC size was measured thanks to anti-zonula occludens-1 immunostaining (see Immunofluorescence staining). The transepithelial electrical resistance

(TEER) was measured every day with an epithelial voltohmmeter (EVOM, World Precision Instruments, Inc). For “wound healing” experiments, Caco-2 cells and EGC were respectively seeded onto 6-well filters at 122×10^3 cells/cm² and in 6-well plates at $2,1 \times 10^3$ cells/cm² for 15 days. Caco-2 monolayers were wounded with the 0.5-10µl tip of a pipette. Each hole was photographed at 0 and 48h by using a microscope (Axiovert 200M; Zeiss; objective lens 5x) with Axiovision software and surface was quantified with ImageJ software. Epithelial healing was calculated as the percentage of the remaining wound area after two days of treatments or EGC coculture compared to t0.

Immunofluorescence staining

IEC transwell filters were fixed in PBS 4% paraformaldehyde for 30min. The IEC size was measured thanks to anti-zonula occludens-1 (ZO-1) immunostaining and proliferation rate was evaluated by DAPI staining. Briefly, fixed filters were incubated for 30 min at RT with PBS containing 0.5% triton X-100 and 10 % horse serum (PBS-TX-HS) and then incubated with a mouse monoclonal antibody anti-ZO-1 diluted in PBS-TX-HS (1:500; Invitrogen) for 2 h at RT. After washing with PBS, filters were incubated with an anti-mouse CY-3 (1:500; Jackson ImmunoResearch) for 45 min at RT. After washing with PBS containing DAPI for the first wash, filters were mounted on slides for fluorescence microscopy analysis. Images were acquired with a digital camera (Olympus DP 50) coupled to a fluorescence microscope (Olympus IX 50). Cell surface area was measured with ImageJ software. An average of 149.9 ± 8.6 IEC was analyzed for each experimental condition.

ELISA

The concentrations of IL-6 (BD OptEIA™ ELISA Set, BD Biosciences), TGFβ1 (Cytoset, Novex®, Life Technologies) and GSH (glutathione assay kit, Sigma-Aldrich) were determined in EGC culture supernatants by ELISA according to the manufacturer's instructions. Absorbance measurements were performed at 450 nm on a spectrophotometric enzyme-linked immunosorbent sandwich assay (ELISA) plate reader (Varioskan®, Thermo Scientific) using the SkanIt software.

PUFA dosage

The PUFA dosage was performed as described Le Faouder et al ². This innovative method has been improved to the simultaneously measure 31 lipids that are 6-keto-prostaglandin F_{1α} (6kPGF_{1α}), thromboxan B₂ (TXB₂), prostaglandin E₂ (PGE₂), prostaglandin E₃ (PGE₃), prostaglandin A₁ (PGA₁), 8-iso prostaglandin A₂ (8-isoPGA₂), 15-Deoxy-Delta12,14-Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), lipoxin A₄ (LxA₄), resolvin D₁ (RvD₁), leukotrien B₄ (LTB₄),

leukotrien B₅ (LTB₅), 10(S), 17(S)-protectin (PDx), 18-hydroxyeicosapentaenoic acid (18-HEPE), 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) and 12-HETE, 8-HETE, 5-HETE, 17-hydroxy-docosahexaenoic acid (17-HDoHE) and 14-HDoHE, 14,15-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) and 11,12-EET, 8,9-EET, 5,6- EET, 5-oxoeicosatetraenoic acid (5-oxo-EET). Briefly, the 24 lipids of interest and 3 deuterated internal standards (LxA₄-d₅, LTB₄-d₄, 5-HETE-d₈), were separated by LC-MS/MS analysis on HPLC system (Agilent LC1290 Infinity) coupled to Agilent 6460 triple quadrupole MS (Agilent Technologies) equipped with electro-spray ionization operating in negative mode. Reverse-phase HPLC was performed using ZorBAX SB-C18 column (2.1 mm;50 mm;1.8 µm) (Agilent Technologies) with a gradient elution. Mobile phase A consisted of water, ACN and FA (75/25/0.1); Solvent B: ACN, FA (100/0.1). Compounds were separated with a linear gradient to 85% B from 0 to 8.5 min and 100% B to 9 min. Isocratic elution continued for 1 min at 100% B then 100% A was reached at 11 min and maintained to 12 min. The flow rate was 0.35 mL/min. The autosampler was set at 5°C and the injection volume was 5 µL. Data were acquired in MRM mode with optimized conditions (fragmentors and collision energy). Peak detection, integration and quantitative analysis were done using Mass Hunter Quantitative analysis software (Agilent Technologies).PUFA profile was established in EGC conditioned media. 75 000 HOG were plated in T25 flasks and placed in 5 ml defined DMEM media supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10% heat-inactivated fetal calf serum. After 3 days, conditioned media were centrifuged at 14,000 rpm for 5 minutes at 4°C and 500µl frozen at -80°C until analysis.

Real-time quantitative PCR analysis

IEC filters were lysed in RA1 buffer (Macherey-Nagel) in order to study mRNA and protein expression. According to the manufacturer's recommendations, total RNA extraction from cells was performed with Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) and 1 µg purified RNA was denatured and processed for reverse transcription using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). PCR amplifications were performed using the Absolute Blue SYBR green fluorescein kit (Roche) and run on a Rotor-Gene (Qiagen). The following primers (Sigma-Aldrich) were used:

GCLc (Glutamate cysteine ligase, catalytic subunit) # NM_001197115.1

Forward Primer: 5'-AGGTGACATTCCAAGCCTGC-3'

Reverse Primer: 5'-CCCCAGCGACAATCAATGTC-3'

Prostaglandine D2 synthase (L-PGDS or PTGDS) # NM_000954.5

Forward Primer: 5'-AGAAGAAGGCGGCGTTGTCC-3'

Reverse Primer: 5'-CCACCACTGACACGGAGTAGG-3'

Prostaglandin-endoperoxide synthase2 (prostaglandinG/H synthase and cyclooxygenase) (PTGS2 or COX2) NM_000963.3

Forward Primer: 5'-TGGAAGCCTTCTCTAACCTC-3'

Reverse Primer: 5'-TCAGGAAGCTGCTTTTACCTT-3'

IL6 # NM_000600

Forward Primer: 5'-CAATGAGGAGACTTGCCTGGTGAA -3'

Reverse Primer: 5'-TGTGGTTGGGTCAGGGGTGGTT-3'

S6 # NM_001010

Forward Primer: 5'-CCAAGCTTATTCAGCGTCTTGTTACTCC-3'

Reverse Primer: 5'-CCCTCGAGTCCTTCATTCTCTTGGC-3'

Relative quantification of gene expression was determined using the standard curve method and endogenous control ribosomal protein S6 mRNA.

Immunoblotting

Lysates from RA1 extraction were precipitated and pellets were resuspended in PSB/TCEP (Macherey-Nagel). Samples were processed for electrophoresis using NuPAGE MES SDS buffer kit (Invitrogen) and separated on 4–12% Bis-Tris gels (NuPAGE, Life Technologies). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes with the iBlot™ system (Life Technologies). After blocking with TBS/0.1% Tween20/ 5% nonfat dry milk for 1 hour, blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBS/ 5% nonfat dry milk for rabbit anti-proEGF (1:500; Pierce), and mouse anti-beta-actin (1:5000; Sigma-Aldrich). Immunoblots were probed with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Life Technologies) and visualized by chemiluminescence (ECL, Biorad). Quantitative analysis was performed using ImageJ software. The value of protein immunoreactivity was normalized to the amount of β -actin immunoreactivity.

Treatment of IEC monolayers

IEC cultivated on filters as described in our “Co-culture model” section were also treated with PGD2 (1 μ M); 15dPGJ2 (5 μ M); 11bPGF2 α (5 μ M); 17phenyltrnorPGF2 α (5 μ M) (all from Cayman Chemical) or the PPAR γ agonist (Rosiglitazone; 5 μ M; Sigma-Aldrich) for three days, and spreading, TEER, or healing were measured as described above. IEC co-cultivated with control or CD EGC were also treated with FP receptor antagonist (AL8810 1 μ M; Cayman Chemical), DP2 receptor antagonist (CAY10595 10 nM; Cayman Chemical), or

PPAR γ antagonist (GW9662; 10 μ M; Sigma-Aldrich) for two days, and healing was measured as described above.

Statistics

Data are expressed as the mean $\pm$ SEM of three to ten independent experiment performed. The significance of differences was determined using a Mann-Whitney test to compare two groups and a one-way analysis of variance (ANOVA), Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's post-test, to compare three groups or more. Differences were considered statistically significant for $p < 0.05$.

RESULTS

Primary cultures of EGC from CD patients have lost their ability to regulate IEC functions.

In previous studies we and others have shown that EGC increase Caco-2 cell transepithelial electrical resistance (TEER), indicative of accelerated sealing of the monolayer, stimulate cell spreading and limit cell proliferation (Neunlist et al, 2007; Van Landeghem et al, 2011). To determine whether CD EGC have impaired functional impact on IEC, we compared effects of EGC isolated from CD patients vs. control patients on Caco-2 cell TEER, spreading and proliferation in a non-contact co-culture model. Consistent with previous work (Soret et al, 2013), human control EGC massively increased Caco-2 resistance and spreading (Figure 1A, 1B and 1D), and also inhibited cell proliferation (Figure 1C). In contrast, CD EGC did not impact TEER (Figure 1A) or spreading (Figure 1B and 1D), and even significantly stimulated Caco-2 proliferation (Figure 1C). Using an *in vitro* mechanically-induced wound healing model, we also show that while primary cultures of control EGC enhanced wound closure, CD EGC had no significant impact (Figure 1E and 1F). These results demonstrate that EGC from CD patients have impaired effects on IEC functions.

CD EGC show altered secretome.

CD EGC exhibit no defects in IL-6, TGF β , EGF and glutathione production.

We hypothesized that CD-associated impairment of EGC functional phenotype was due to altered soluble factor production. Thus, we first quantified four soluble factors secreted by EGC and known to reproduce EGC impact on IEB functions. Those included interleukin 6 (IL6), TGF- β 1, EGF and glutathione. *IL-6* (Figure 2A), *TGF- β 1* (Figure 2C), *EGF* (Figure 2E) and *GCLC* (Figure 2G) mRNA were expressed at similar levels in control and CD EGC. Consistently IL6 (Figure 2B), TGF β (Figure 2D), proEGF (Figure 2F) and glutathione (Figure 2H) proteins were produced at equivalent levels in control and CD EGC.

CD EGC produce less 15dPGJ₂ and 11 β PGF₂ α and express less L-PGDS than control EGC.

Previous work from our group and others has shown that EGC secrete PUFA metabolites that regulate IEB functions such as 15dPGJ₂ and PGE₂ (Bach-Ngohou 2010; Martín-Venegas R et al, 2006; Murakami M et al, 2007). We next sought to determine whether PUFA metabolite release was altered in primary cultures of EGC vs. control EGC. Mass spectrometry data on

EGC conditioned medium show that among 31 PUFA metabolites assessed, 21 were released by both CD and control EGC (Table I). Importantly 15dPGJ₂ and 11β-Prostaglandin F₂α (11βPGF₂α) concentrations were significantly reduced in CD EGC conditioned medium compared to control EGC conditioned medium (Table I). Both 15dPGJ₂ and 11βPGF₂α derive from transformation of PGD₂, which is synthesized by L-PGDS and COX enzymes. To assess if this pathway was altered in CD EGC, we assessed *Cox-2* and *L-PGDS* mRNA expression. Our RT-qPCR data demonstrated that *Cox-2* mRNA was unchanged but *L-PGDS* mRNA expression was significantly repressed in CD EGC compared to control EGC (Figure 3). Collectively these results indicate that L-PGDS pathway is down-regulated in EGC derived from CD patients.

15dPGJ₂ and 11βPGF₂α reproduce control EGC impact on IEC functions

To determine the impact of L-PGDS pathway, and specifically PGD₂ and its derivatives, on IEB functions, we assessed IEC response to PGD₂, 15dPGJ₂ and 11βPGF₂α. Only 15dPGJ₂ induced a significant increase in TEER and inhibited IEC proliferation (Figure 4A and 4C). IEC spreading was strongly enhanced by both 15dPGJ₂ and 11βPGF₂α (Figure 4B), but only 11βPGF₂α significantly accelerated wound closure (Figure 4D-E). These data demonstrate that 15dPGJ₂ reproduced control EGC effects on IEC except healing, whereas 11βPGF₂α pathway strongly enhanced cell restitution but did not impact proliferation.

PPARγ agonist induces IEC spreading

15dPGJ₂ is an endogenous PPARγ ligand and our previous work demonstrated that EGC-derived 15dPGJ₂ limits IEC proliferation via PPARγ activation (Bach-Ngohou 2010). However whether 15dPGJ₂-induced increases in IEC TEER and spreading involve PPARγ-dependent regulatory mechanisms remains to be demonstrated. Using PPARγ agonist Rosiglitazone, our results demonstrate that PPARγ activation results in increases in TEER (Figure 5D) as well as cell spreading (Figure 5E).

Functional defect of CD EGC on IEB properties involved FP, DP2 and PPARγ-dependent pathways

To assess if 15dPGJ₂ and 11βPGF₂α are the mediators of EGC regulation of IEB, we blocked 15dPGJ₂ and 11βPGF₂α dependent pathways in our co-culture model of IEC and control or CD EGC. 15dPGJ₂ can act through PPARγ but also through DP2 receptor, and 11βPGF₂α

has been shown to act through FP receptor. We then used the selective FP antagonist (AL8810), DP2 antagonist (CAY10595) and PPAR γ antagonist (GW9662). DP, FP and PPAR γ antagonists had no effect on Caco-2 healing (Figure 6A) or on Cao-2 healing induced by CD EGC (Figure 6C). On contrary the CAY10595 and GW9662 entirely blocked IEB healing induced by control EGC, but the AL8810 had no effect (Figure 6B). These data shows that DP2 and PPAR γ -dependent pathways are involved in IEB healing induced by EGC and that CD EGC lack these regulations.

DISCUSSION

The main goal of this work was to assess whether primary cultures of EGC from CD patients have altered effects on IEC functions compared to EGC from control patients. Our data demonstrate that in contrast to control EGC, CD EGC do not stimulate TEER, spreading or wound closure, indicating that CD EGC have lost their ability to activate cell restitution. Interestingly, while control EGC limited IEC proliferation, CD EGC stimulated it. Our data also show that human EGC from control patients produce 15dPGJ₂ and 11 β -PGF₂ α prostaglandin to induce IEC spreading and wound healing. Importantly CD EGC showed a downregulation of L-PGDS expression and reduced production of 15dPGJ₂ and 11 β -PGF₂ α . We also demonstrate that these mediators act through DP2- and PPAR γ -dependent pathways.

One of our main findings is that CD EGC did not accelerate sealing of epithelial monolayers, did not stimulate cell spreading and as a result, did not promote wound closure, as opposed to their healthy homologues. These data strongly implies that defects in mucosal healing observed in CD are at least in part due to EGC that have lost their ability to promote cell restitution (Figure 7). Also our results indicate that CD EGC stimulate IEC proliferation in contrast to normal glia that is a potent inhibitor of IEC proliferation. This could participate to CD-associated increased risk of hyperplasia and colorectal cancer development (Figure 7). Altogether our *ex vivo* functional studies indicate that primary cultures of EGC isolated from non-inflamed intestine of CD patients exhibit loss of function as compared to EGC isolated from control patients. These findings suggest that CD EGC have altered intrinsic functional phenotype. It is thus tempting to speculate that impaired intrinsic functions of EGC from CD patients predispose and/or directly participate to the disease onset.

In previous studies we have shown that 15dPGJ₂ was released by rat EGC ³, and PGE₂, PGD₂ or 15dPGJ₂ have been shown to be produced in central glial cells ⁴⁻⁷. In the present study, among 31 tested and in addition to these 4 prostaglandins, we detected 17 other PUFA derivatives in EGC conditioned medium, which attests that the three major AA metabolic pathways, *i.e.* COX; LOX and p450 signaling pathway, are active in EGC. Considering the low stability of PUFA catabolic products, we cannot rule out that the PUFA derivatives that we did not detect are actually produced in EGC.

In this study we show that CD EGC release smaller amounts of 15dPGJ₂ than EGC from control patients. 15dPGJ₂ derives from prostaglandin D₂, which results from prostaglandin H₂ (PGH₂) isomerization by prostaglandin D synthase (PGDS). While IEC, mast cells and fibroblasts express H-PGDS, the most representative form of PGDS in the gut ^{8, 9}, EGC express the lipocalin-PGDS (L-PGDS) ³. Glial production of 15dPGJ₂ exerts anti-proliferative and pro-differentiating effects on IEC ³ but has no effect on paracellular permeability ^{3, 10}. Here we confirmed 15dPGJ₂ anti-proliferative effects and demonstrate that 15dPGJ₂ also induces IEC spreading and accelerate IEC monolayer sealing. Thus 15dPGJ₂ did not significantly promote wound closure, demonstrating that the healing measured depends on proliferation. Beside its impact on IEC, 15dPGJ₂ can also regulate other cells of the glial microenvironment. For instance, 15dPGJ₂ is a neuroprotective agent ¹¹⁻¹³ and is believed to be responsible for neutrophil recruitment ¹⁴. Also COX pathway or PGD₂ have been described to regulate enteric nervous system excitability ^{15, 16}. Thus it is likely that CD EGC deficit in 15dPGJ₂ production participate to abnormalities/alterations observed in enteric neurons during CD ¹⁷⁻¹⁹.

Type 2 PGD₂ receptor (DP2) and peroxysome-proliferator activated receptor (PPAR γ) are 15dPGJ₂ membrane and nuclear receptors, respectively. While 15dPGJ₂ can have other binding-protein partners ²⁰ and thereby can act via PPAR γ -independent pathways ^{11, 21}, current views in the field suggest that 15dPGJ₂-mediated regulation of IEC functions involves PPAR γ activation. Besides canonical pathways such as Wnt/ β -catenin or Notch, recent data have shown that PPAR γ signaling is also a key pathway in control of IEC major functions ²². For instance, PPAR γ activation inhibits IEC proliferation and promotes cell differentiation ^{23, 24}. In the present study we demonstrate that PPAR γ activation, in response to EGC presence or not, can promote IEC spreading and wound closure. The barrier-promoting impact of 15dPGJ₂-PPAR γ pathway that we have observed in the intestine, could also be of interest in other epithelial tissues, and explain protective effects of this pathway against lethal influenza

infection with lung inflammation and lung viral load reduction²⁵. We have also observed that PPAR γ antagonist showed the same potential than DP2 antagonist in decreasing IEB healing, suggesting that glial 15dPGJ2 mediates its effect through both DP2 and PPAR γ .

Another finding of this work was that 11 β -PGF $_2\alpha$ production was reduced in CD EGC as compared to control EGC. 11 β -PGF $_2\alpha$ is the primary plasma metabolite of PGD $_2$ *in vivo* (Liston and Roberts PNAS 1985) and had no known gastric function. It inhibits ADP- or thrombin-induced human platelet aggregation (Pugliese JBC 1985), induces human bronchial smooth muscle contractions (Coleman BJP 1989), inhibits adipose differentiation (Lepak Prostagandins 1993) and promotes prostate cell proliferation²⁶. Described as equipotent to PGF $_2\alpha$, 11 β -PGF $_2\alpha$ is believed to act through FP receptors, although this still needs to be clearly demonstrated. To the best of our knowledge this is the first study that demonstrates that 11 β -PGF $_2\alpha$ is produced in the intestine by EGC and that it massively enhances cell restitution and wound closure. The non significant effect of FP antagonist observed on IEB healing, even a trend, suggests that other downstream signaling could also be involved to induce 11 β -PGF $_2\alpha$ -dependent healing.

Collectively our results demonstrate that EGC from CD patients exhibit loss of function as compared to control EGC, due to defects in L-PGDS, 15dPGJ $_2$ and 11 β -PGF $_2\alpha$ expression/synthesis (Figure 7). Thus this work confirms and extends the major role of EGC-derived PUFA derivatives on intestinal homeostasis and mucosal repair after injury. Two scenarios could be considered without being mutually exclusive. First, defects in L-PGDS pathway in CD EGC could predispose to CD onset, but also it could favor relapse, since PUFA metabolites are known to participate to inflammation resolution²⁷ and we show here that they promote mucosal healing.

REFERENCES

1. Soret R, Coquenlorge S, Cossais F, Meurette G, Rolli-Derkinderen M, Neunlist M. Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells. *Neurogastroenterol Motil* 2013;25:e755-64.
2. Le Faouder P, Baillif V, Spreadbury I, Motta JP, Rousset P, Chene G, Guigne C, Terce F, Vanner S, Vergnolle N, Bertrand-Michel J, Dubourdeau M, Cenac N. LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013;932:123-33.
3. Bach-Ngohou K, Mahe MM, Aubert P, Abdo H, Boni S, Bourreille A, Denis MG, Lardeux B, Neunlist M, Masson D. Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J Physiol* 2010;588:2533-44.
4. Blanco A, Alvarez S, Fresno M, Munoz-Fernandez MA. Amyloid-beta induces cyclooxygenase-2 and PGE2 release in human astrocytes in NF-kappa B dependent manner. *J Alzheimers Dis* 2010;22:493-505.
5. Takayama F, Wu Z, Ma HM, Okada R, Hayashi Y, Nakanishi H. Possible involvement of aiPLA2 in the phosphatidylserine-containing liposomes induced production of PGE2 and PGD2 in microglia. *J Neuroimmunol* 2013;262:121-4.
6. Weaver-Mikaere L, Gunn AJ, Mitchell MD, Bennet L, Fraser M. LPS and TNF alpha modulate AMPA/NMDA receptor subunit expression and induce PGE2 and glutamate release in preterm fetal ovine mixed glial cultures. *J Neuroinflammation* 2013;10:153.
7. Xia M, Zhu Y. Signaling pathways of ATP-induced PGE2 release in spinal cord astrocytes are EGFR transactivation-dependent. *Glia* 2011;59:664-74.
8. Hokari R, Nagata N, Kurihara C, Watanabe C, Komoto S, Okada Y, Kawaguchi A, Nagao S, Hibi T, Nagata K, Urade Y, Miura S. Increased expression and cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in Helicobacter pylori-induced gastritis. *J Pathol* 2009;219:417-26.
9. Park JM, Kanaoka Y, Eguchi N, Aritake K, Grujic S, Materi AM, Buslon VS, Tippin BL, Kwong AM, Salido E, French SW, Urade Y, Lin HJ. Hematopoietic prostaglandin D synthase suppresses intestinal adenomas in ApcMin/+ mice. *Cancer Res* 2007;67:881-9.
10. Ponferrada A, Caso JR, Alou L, Colon A, Sevillano D, Moro MA, Lizasoain I, Menchen P, Gomez-Lus ML, Lorenzo P, Cos E, Leza JC, Menchen L. The role of PPARgamma on restoration of colonic homeostasis after experimental stress-induced inflammation and dysfunction. *Gastroenterology* 2007;132:1791-803.
11. Abdo H, Mahe MM, Derkinderen P, Bach-Ngohou K, Neunlist M, Lardeux B. The omega-6 fatty acid derivative 15-deoxy-Delta(1)(2),(1)(4)-prostaglandin J2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress. *J Physiol* 2012;590:2739-50.
12. Nicholson JD, Puche AC, Guo Y, Weinreich D, Slater BJ, Bernstein SL. PGJ(2) provides prolonged CNS stroke protection by reducing white matter edema. *PLoS One* 2012;7:e50021.
13. Lin TN, Cheung WM, Wu JS, Chen JJ, Lin H, Chen JJ, Liou JY, Shyue SK, Wu KK. 15d-prostaglandin J2 protects brain from ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:481-7.

14. Fernandez-Bustamante A, Klawitter J, Wilson P, Elkins ND, Agazio A, Shibata T, Uchida K, Christians U, Repine JE. Early increase in alveolar macrophage prostaglandin 15d-PGJ2 precedes neutrophil recruitment into lungs of cytokine-insufflated rats. *Inflammation* 2013;36:1030-40.
15. Balestra B, Vicini R, Cremon C, Zecchi L, Dothel G, Vasina V, De Giorgio R, Paccapelo A, Pastoris O, Stanghellini V, Corinaldesi R, De Ponti F, Tonini M, Barbara G. Colonic mucosal mediators from patients with irritable bowel syndrome excite enteric cholinergic motor neurons. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:1118-e570.
16. Heredia DJ, Grainger N, McCann CJ, Smith TK. Insights from a novel model of slow-transit constipation generated by partial outlet obstruction in the murine large intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;303:G1004-16.
17. Bassotti G, Villanacci V, Nascimbeni R, Cadei M, Fisogni S, Antonelli E, Corazzi N, Salerni B. Enteric neuroglial apoptosis in inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis* 2009;3:264-70.
18. Boisse L, Chisholm SP, Lukewich MK, Lomax AE. Clinical and experimental evidence of sympathetic neural dysfunction during inflammatory bowel disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36:1026-33.
19. Villanacci V, Bassotti G, Nascimbeni R, Antonelli E, Cadei M, Fisogni S, Salerni B, Geboes K. Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterol Motil* 2008;20:1009-16.
20. Yamamoto Y, Takase K, Kishino J, Fujita M, Okamura N, Sakaeda T, Fujimoto M, Yagami T. Proteomic identification of protein targets for 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 in neuronal plasma membrane. *PLoS One* 2011;6:e17552.
21. Olsen KC, Epa AP, Kulkarni AA, Kottmann RM, McCarthy CE, Johnson GV, Thatcher TH, Phipps RP, Sime PJ. Inhibition of transglutaminase 2, a novel target for pulmonary fibrosis, by two small electrophilic molecules. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;50:737-47.
22. Su W, Bush CR, Necela BM, Calcagno SR, Murray NR, Fields AP, Thompson EA. Differential expression, distribution, and function of PPAR-gamma in the proximal and distal colon. *Physiol Genomics* 2007;30:342-53.
23. Kato M, Kusumi T, Tsuchida S, Tanaka M, Sasaki M, Kudo H. Induction of differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in colon cancer cell lines by troglitazone. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:73-9.
24. Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, Spiegelman BM. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med* 1998;4:1046-52.
25. Cloutier A, Marois I, Cloutier D, Verreault C, Cantin AM, Richter MV. The prostanoid 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin-j2 reduces lung inflammation and protects mice against lethal influenza infection. *J Infect Dis* 2012;205:621-30.
26. Wang S, Yang Q, Fung KM, Lin HK. AKR1C2 and AKR1C3 mediated prostaglandin D2 metabolism augments the PI3K/Akt proliferative signaling pathway in human prostate cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2008;289:60-6.
27. Gobbetti T, Le Faouder P, Bertrand J, Dubourdeau M, Barocelli E, Cenac N, Vergnolle N. Polyunsaturated fatty acid metabolism signature in ischemia differs from reperfusion in mouse intestine. *PLoS One* 2013;8:e75581.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Functional impact of human enteric glial cells (EGC) on IEC monolayers.

IEC properties were evaluated in Caco-2 monolayers after three days of indirect coculture with control (+Control EGC), CD EGC (+CD EGC) or without coculture (-EGC). (A) Transepithelial electrical (TER) compared to IEC TER -EGC considered as 1, (B) epithelial spreading expressed as percentage of -EGC IEC surface, and (C) IEC proliferation expressed as a percentage of -EGC cell number were expressed as mean $\pm$ SEM. n=20 -EGC, n=14 control EGC; n=11 CD EGC; Kruskal-Wallis test; *p<0.05 as compared to -EGC. (D) Representative ZO-1 immunostaining of IEC monolayers after three days of indirect coculture with control (+Control EGC), CD EGC (+CD EGC) or without coculture (-EGC) (Scale bar=100 μ m). (E) Representative pictures of epithelial healing of IEC monolayers after two days of indirect coculture with control (+Control EGC), CD EGC (+CD EGC) or without coculture (-EGC). (F) Epithelial healing was measured as a percentage of remaining wound area at 48h compared to the wound area at t0. n=7 -EGC and control EGC; n=4 CD EGC; Kruskal-Wallis test; *p<0,05 as compared to IEC without EGC

Figure 2. No difference in EGC-derived soluble factors expression between control and CD EGC.

Study of four glial mediators (IL-6, TGF β , EGF and glutathione GSH) expression was performed by ELISA (B, D, H), Western-Blot (F) or qPCR of the mediator or of its producing enzyme (glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit, GCLC). n=12 control EGC and n=7-9 CD EGC; Mann-Whitney test.

Table I. Human enteric glial cells secrete PUFA metabolites.

31 polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolites were quantified by liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry in EGC supernatants. Among the 21 mediators secreted by human EGC, only two by-products of prostaglandin D2, 15dPGJ₂ and 11 β PGF₂ α were misproduced by CD EGC as compared to control EGC. n=14 control EGC and n=11 CD EGC; Mann-Whitney test; *p<0,05 as compared to control EGC.

Figure 3. CD enteric glial cells present a defect in PGD₂ synthase expression. Quantitative PCR analyze of *Cox2* and *L-PGDS* mRNA expression related to *RPS6* mRNA expression. Control and CD EGC expressed the same level of *Cox2* (A) mRNA expression but CD EGC have a significant reduced expression for *L-PGDS*. n=13 control EGC and n=11 CD EGC; Mann-Whitney test; *p<0,05 as compared to control EGC.

Figure 4. Functional impact of EGC-derived PGD₂ metabolites on IEC monolayers.

IEC properties were evaluated in Caco-2 monolayers after three days of culture in presence of lipid mediators (PGD₂, 15dPGJ₂ and 11βPGF₂α) or not (CT) (A) Transepithelial electrical (TER) expressed as percentage of CT TER, (B) epithelial spreading expressed as percentage of CT IEC surface, and (C) IEC proliferation expressed as a percentage of CT cell number were measured. n=5-8 independent experiments performed in duplicates; Kruskal-Wallis test; *p<0,05 as compared to CT. (D) Representative pictures of epithelial healing of IEC monolayers cultured without treatment (CT) or with the PGD₂ metabolites 15dPGJ₂ and 11βPGF₂α for two days. (E) Quantification of epithelial healing was calculated as a percentage of remaining wound area at 48h compared to the wound area at t0. n=7-11; Kruskal-Wallis test; *p<0,05 as compared to IEC without treatment.

Figure 5. PPAR_γ agonist reproduces control EGC effect on IEC monolayers.

IEC properties were evaluated in Caco-2 monolayers after three days of treatment with rosiglitazone (PPAR_γ agonist) (A) Transepithelial electrical (TER) expressed as percentage of CT TER and (B) epithelial spreading expressed as percentage of CT IEC surface were measured. n=6 independent experiments; Mann-Whitney test; *p<0,05 as compared to CT. (C) Representative ZO-1 immunostaining of IEC filters treated or not with rosiglitazone.

Figure 6. Implication of FP, DP receptors and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR_γ) in IEB healing induced by EGC

FP (AL8810), DP (CAY10595) and PPAR_γ (GW9662) antagonists were applied directly on IEC culture (-EGC) (A), on IEC and control EGC coculture (Control EGC) or on IEC and CD EGC coculture (CD EGC) during three days. Quantification of epithelial healing was calculated as a percentage of remaining wound area at 48h compared to the wound area at t0. n=3-6 independent experiments; Kruskal-Wallis test; *p<0,05 as compared to without treatment.

Figure 7. Schematic representation of the control of IEC properties by human EGC from control and CD EGC.

Human EGC can produce PUFA metabolites derived from omega-3 or -6 (ω6). Among the 21 mediators secreted by human EGC, only two by-products of prostaglandin D₂ (PGD₂), 15dPGJ₂ and 11βPGF₂α were misproduced by CD EGC that express less L-PGDS but the same level of COX2. 15dPGJ₂ and 11βPGF₂α glial production regulates IEB healing through PPAR_γ and DP2 dependent pathway.

Suppl. Data 1. Human enteric glial cells characterization: control and CD EGC express the same level of glial markers.

(A) *GFAP*, (B) *S100 β* , (C) *Sox10* mRNA expression were by RT-qPCR and expressed as a ratio to *S6* mRNA. n=14 control EGC and n=11 CD EGC; Mann-Whitney test.

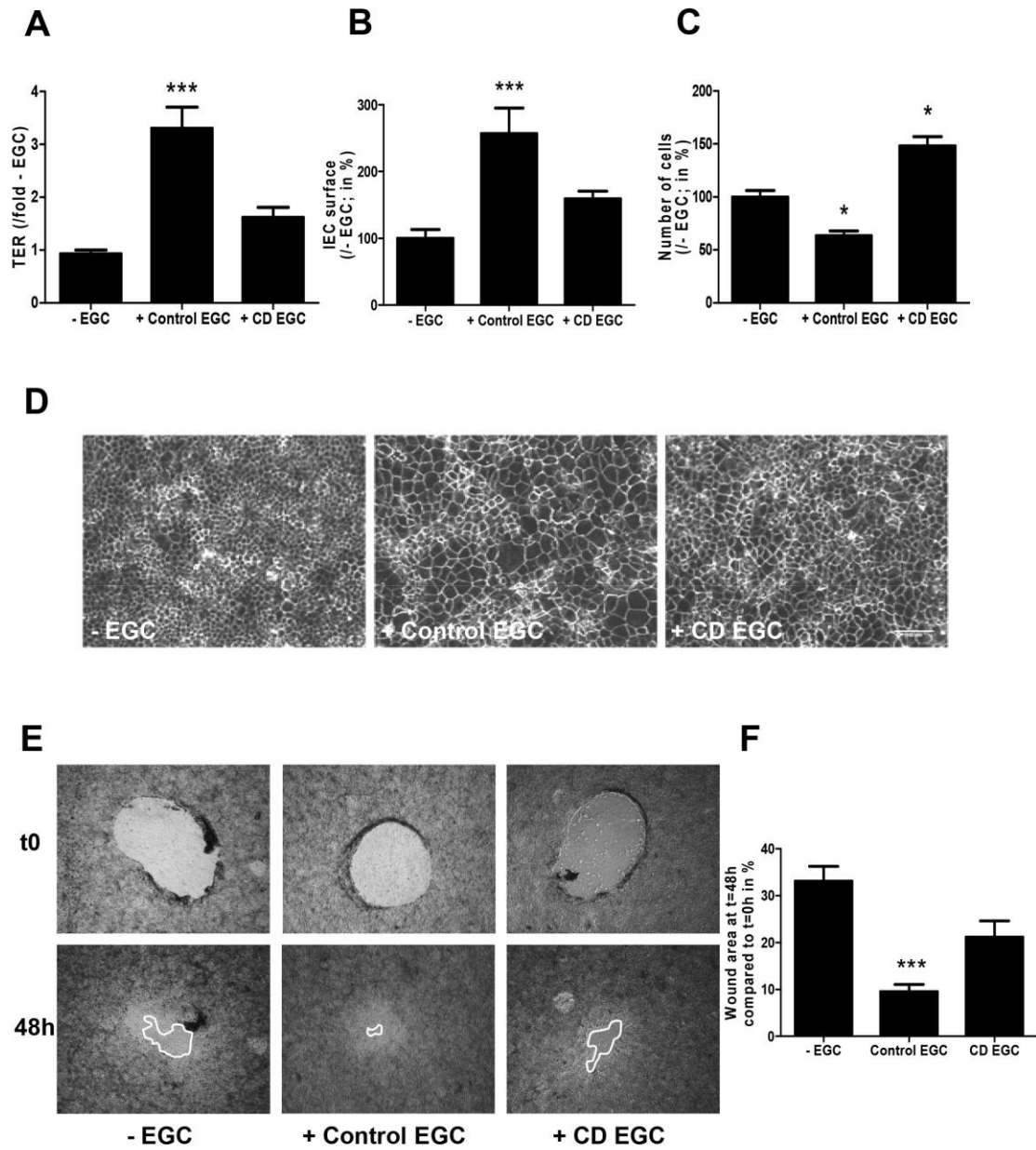


Figure 1

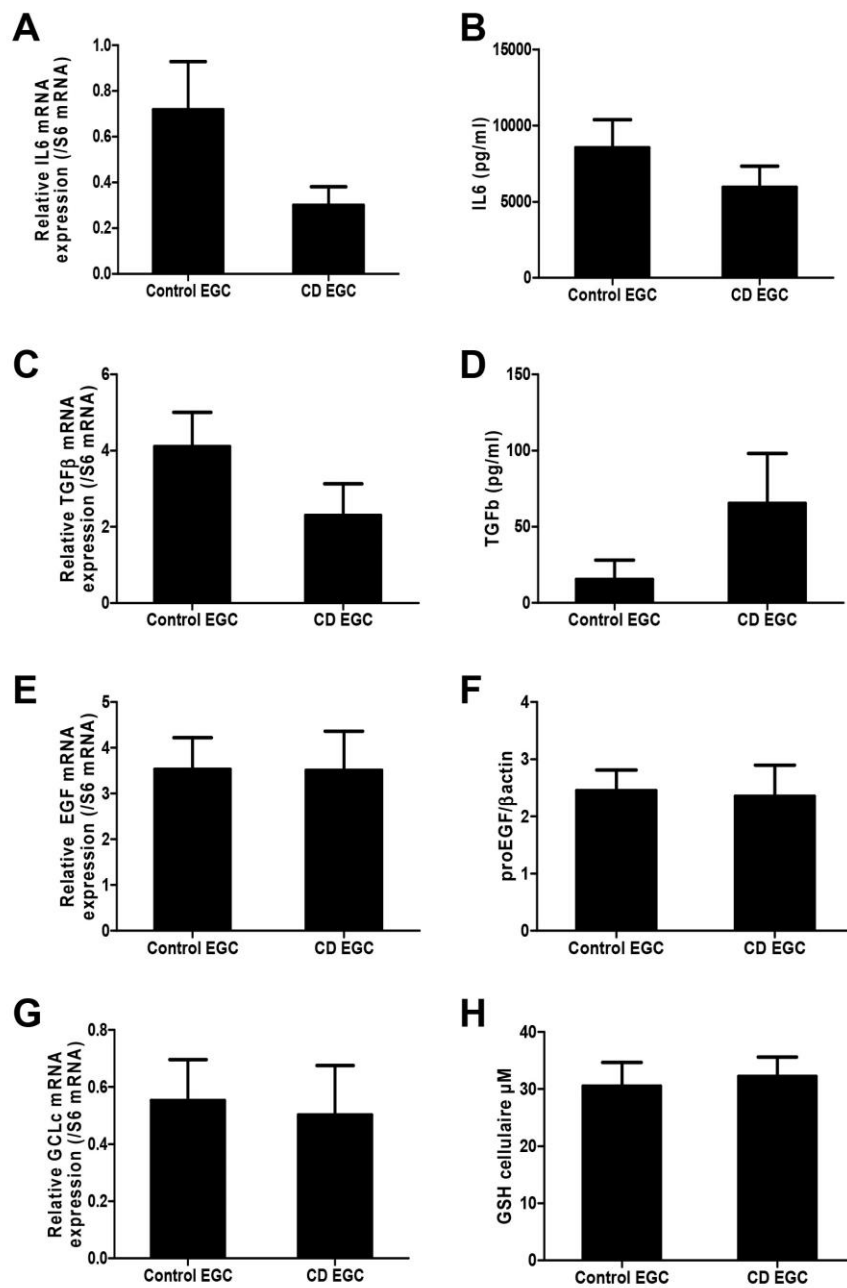


Figure 2

	6kPGF1a	TxB2	PGE3	11B-PGF2a	PGF2a	PGE2	PGD2	
control	52,6	458,9	117,5	418,7	354,2	85,5	111,6	(pg/ml)
	80,4	271,1	172,3	168,8	313,7	102,2	54,5	SD
CD	82,7	323,0	110,1	** 234,2	197,6	347,1	149,4	(pg/ml)
	117,1	67,6	112,5	79,5	90,8	770,2	65,0	SD
	LxA4	8isoPGA2	PGA1	7MaR1	PDx	LTB4	18-HEPE	
control	679,0	175,3	7,4	706,4	210,3	143,5	1338,4	(pg/ml)
	513,2	161,7	25,8	972,3	272,9	192,9	1307,4	SD
CD	500,8	259,5	29,5	24,3	0,0	19,2	408,2	(pg/ml)
	320,5	409,6	46,8	41,5	0,0	25,3	97,5	SD
	15dPGJ2	15-HETE	17-HDoHE	14-HDoHE	8-HETE	12-HETE	5-HETE	
control	108,2	1587,5	3811,7	4996,9	887,5	3685,2	258,2	(pg/ml)
	32,6	1424,0	4354,0	4602,9	1020,5	2664,8	226,7	SD
CD	** 72,9	643,1	629,6	2476,2	259,3	2293,0	117,9	(pg/ml)
	20,2	253,9	162,0	689,5	139,5	771,7	62,1	SD
non detected	LxB4	RvD2	RvD1	LTB5	5,6-DiHETE			
	11,12-EET	8,9-EET	5,6-EET	14,15-EET	5oxoETE			

Table I

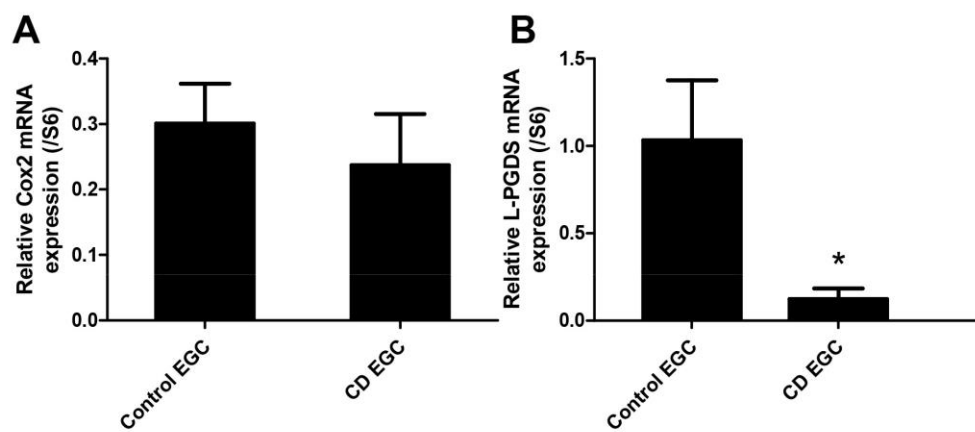


Figure 3

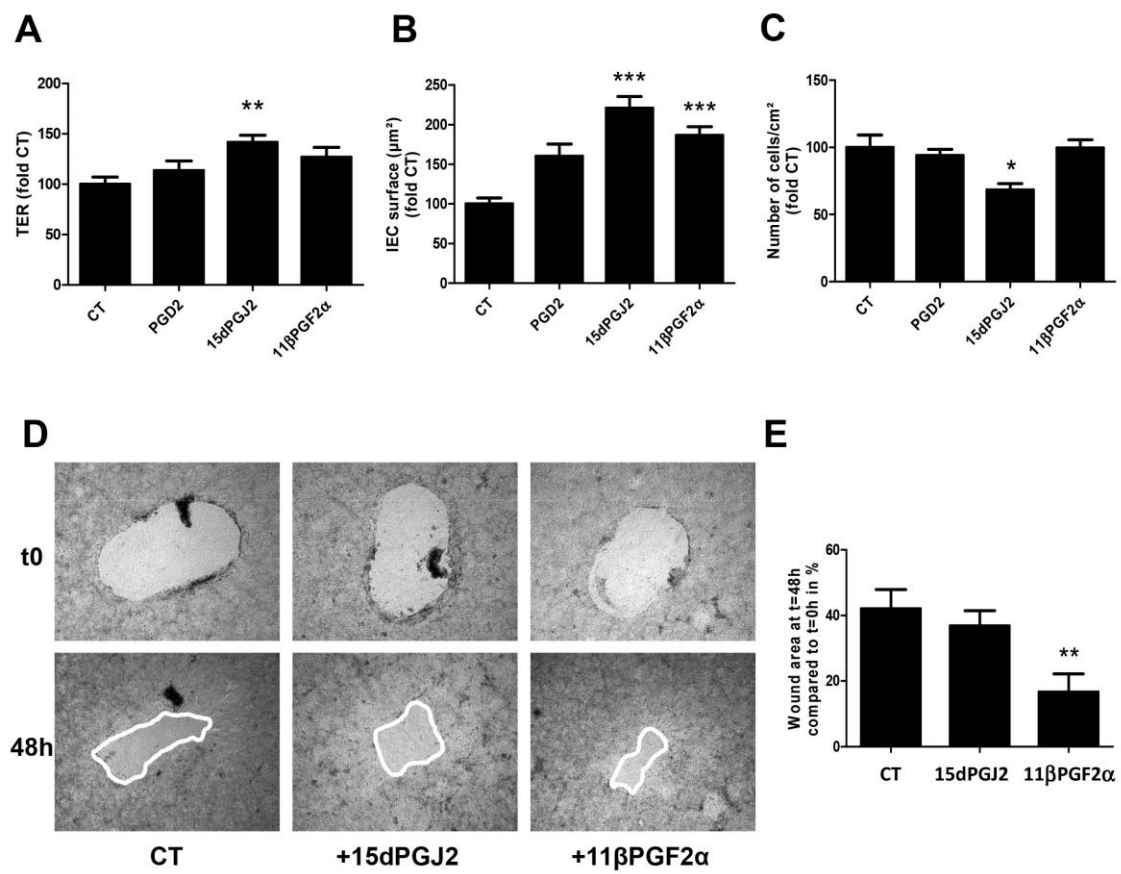


Figure 4

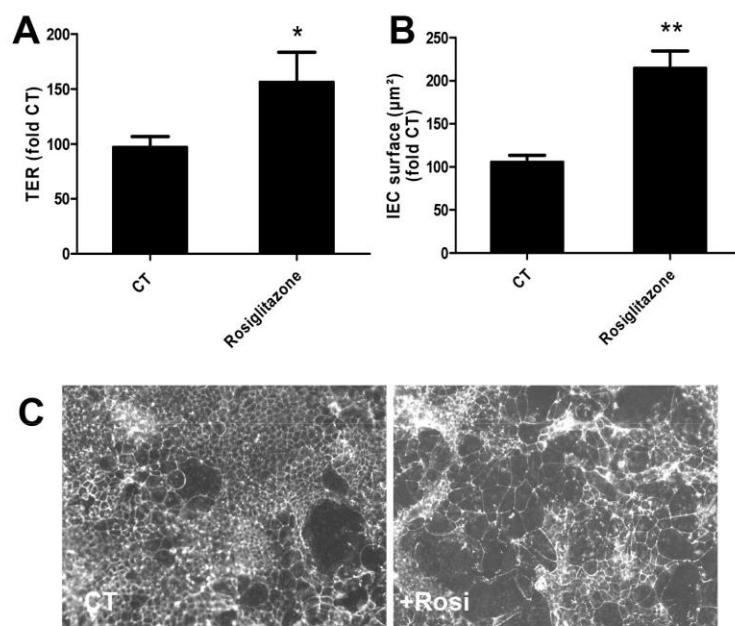


Figure 5

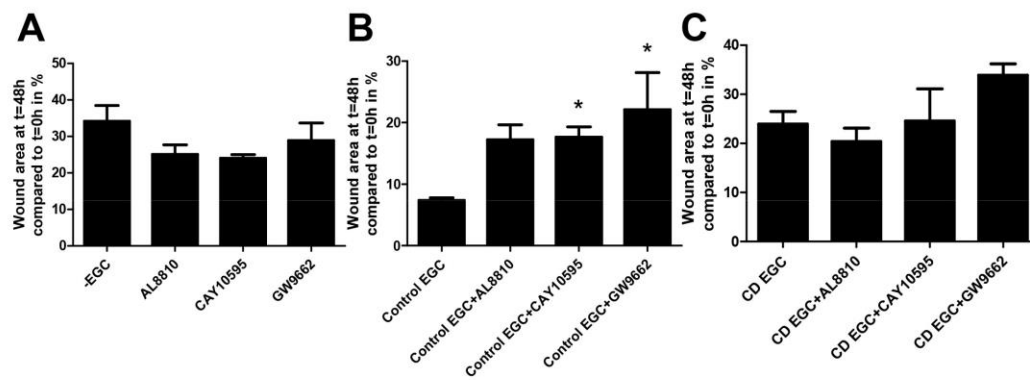


Figure 6

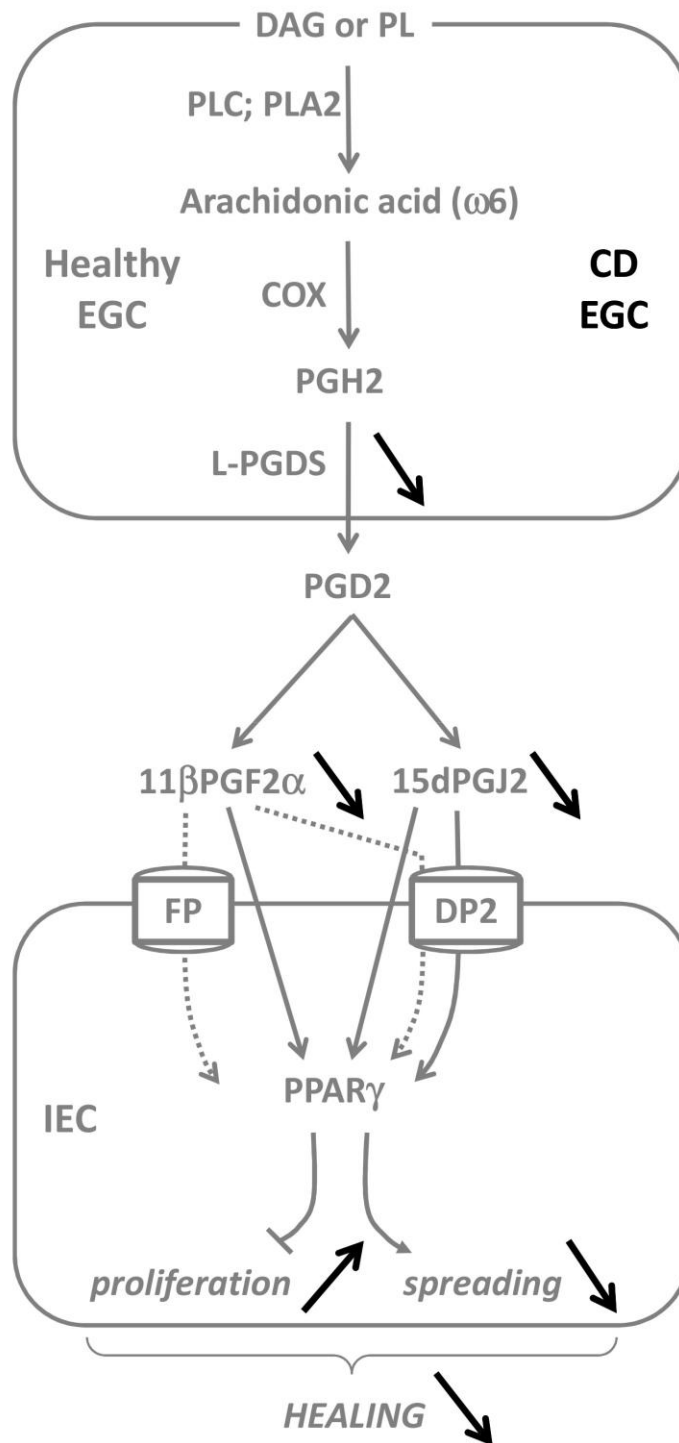
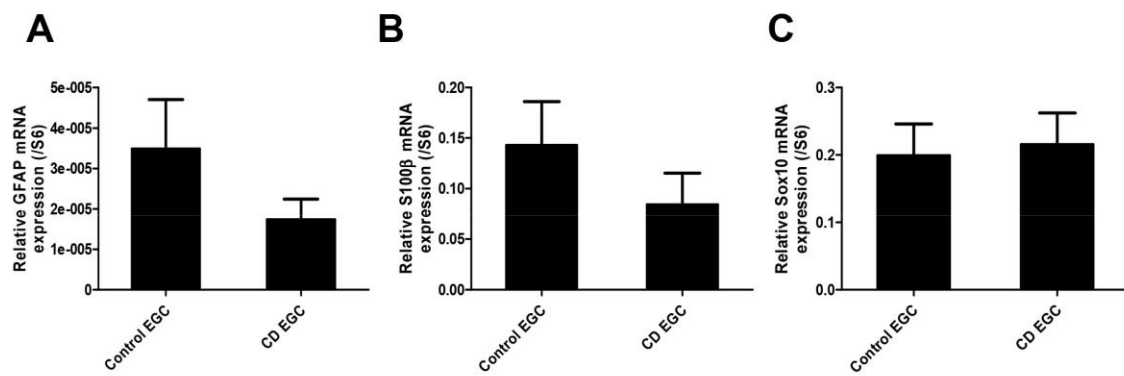


Figure 7



Suppl data 1

Discussion

Ces travaux de thèse ont permis d'apporter de nouvelles données quant au rôle du système nerveux entérique (SNE), neurones et cellules gliales entériques (CGE), dans la réaction inflammatoire ou dans la maladie de Crohn. Le SNE a en effet un rôle actif dans l'inflammation intestinale, notamment en produisant des médiateurs solubles qui vont réguler les cellules de son microenvironnement comme les entérocytes de la barrière épithéliale intestinale (BEI). Nous avons montré qu'une cytokine pro-inflammatoire majeure, le $\text{TNF}\alpha$, peut être produite par les neurones entériques en réponse à un pathogène, et que cette production est réduite par l'activation du SNE. Le $\text{TNF}\alpha$ produit amplifie la réponse inflammatoire en augmentant l'expression du TLR2 et en diminuant la production d'interleukine-6 par les CGE. La seconde partie de ce travail se focalise sur la caractérisation des CGE humaines et l'identification de nouveaux gliomédiateurs lipidiques dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI). En effet, nous avons montré que les CGE de patients atteints de la maladie de Crohn (MC) présentent des modifications intrinsèques, en dehors de tout environnement inflammatoire, conduisant à leur dysfonction et à un défaut de régulation des fonctions de la BEI (perméabilité, résistance, prolifération, réparation). Nous discuterons ici le potentiel bénéfique de la réaction inflammatoire médiée par le SNE puis alors la notion de « gliopathie » et l'intérêt d'approfondir nos connaissances sur les CGE.

Le SNE senseur de son environnement

Notre travail renforce l'idée que le SNE est un système intégratif, qui certes contrôle l'homéostasie et les fonctions gastrointestinales, mais sans jamais oublier de répondre aux informations du SNC et de son microenvironnement sain mais aussi pathologique. Les neurones entériques participent en effet aux mécanismes de défense, et notamment à la réponse aux entérotoxines (Castagliuolo et al., 1994 ; Pothoulakis et al., 1998). La modulation de leur codage neurochimique ou de leurs propriétés électrophysiologiques après l'exposition à des stimuli inflammatoires ou des facteurs sécrétés par les cellules environnantes, comme les cytokines (Lomax et al., 2006 ; Vasina et al., 2006), peut ne pas être interprétée comme une lésion du SNE, mais bien comme une réaction de propagation de la réponse inflammatoire. Le SNE peut produire des cytokines qui régulent les fonctions de la BEI (Neunlist et al., 2007 ; Tixier et al., 2006), mais la production de $\text{TNF}\alpha$ que nous avons mise

Discussion et conclusion

en évidence peut aussi réguler les CGE ou d'autres cellules du microenvironnement. De manière générale, jusqu'à la découverte récente de l'expression de Toll-like receptors (TLRs) par le SNE, il était admis que son recrutement dans les réponses immunes et inflammatoires nécessitaient un intermédiaire cellulaire, cellules épithéliales ou immunes (Goehler et al., 2000 ; Wood, 2004). Les TLRs sont des récepteurs de l'immunité innée qui permettent une reconnaissance rapide des MAMPs (microorganism-associated molecular patterns) pathogènes ou non pathogènes (Akira et al., 2006). Ils induisent des réponses locales médiées par les phagocytes via l'activation de voies de signalisation conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF α) (Akira et al., 2001 ; Takeda et al., 2003). Au sein des plexus sous-muqueux et myentérique, les neurones et les CGE expriment constitutivement les TLR-3 et -7 qui reconnaissent les ARN viraux, le TLR2 qui reconnaît les lipopeptides bactériens et enfin le TLR4 qui lie le LPS et est plus fortement présent au niveau du côlon distal (Anitha et al., 2012 ; Barajon et al., 2009 ; Brun et al., 2013 ; Ortega-Cava et al., 2003 ; Rumio et al., 2006). La proximité étroite du SNE avec les éléments luminaux peut expliquer la différence avec le SNC, dont l'expression des TLRs est constitutive seulement pour les cellules gliales et la microglie (Bsibsi et al., 2002; Kielian, 2006), mais stimulée par des conditions pathologiques pour les autres cellules comme les neurones (Jackson et al., 2006; Lafon et al., 2006). En conditions physiologiques, le SNE n'est pas directement exposé au contenu luminal et les interactions sont limitées à une localisation sous-épithéliale. La translocation bactérienne pouvant être un élément physiologique participant au développement des tissus lymphoïdes, à l'induction de la tolérance vis-à-vis de la flore et ainsi à l'homéostasie intestinale (Macpherson and Uhr, 2004a, 2004b). En revanche, en conditions pathologiques comme au cours des MICI, une rupture de l'intégrité de la BEI entraîne une augmentation de perméabilité et une translocation massive des bactéries et des virus vers les cellules immunes de la muqueuse et des plaques de Peyer (Bomsel and Alfsen, 2003; Niedergang and Kweon, 2005) dont la proximité avec les fibres nerveuses est étroite (Vulchanova et al., 2007). Or chez les patients atteints de MICI, le taux de LPS circulant est retrouvé augmenté (Caradonna et al., 2000). Ce qui amplifie la problématique, c'est la dysbiose observée (Cho, 2008 ; Macfarlane et al., 2009; Rioux et al., 2007) avec des taux bas de bactéries protectrices comme *F. prausnitzii* (Louis and Flint, 2009) ou anti-inflammatoires comme *Bifidobacteria* (Giaffer et al., 1991; Seksik et al., 2003) et un excès de bactéries pathogènes comme *E.coli* adhérente et invasive (AIEC) produisant des cytokines pro-inflammatoires (Boudeau et al., 1999; Darfeuille-Michaud et al., 1998, 2004; Glasser et al.,

2001; Martinez-Medina et al., 2009). Si différentes études ont démontré le rôle des TLR-2 et -4 dans les lésions neuronales, notamment suite à une ischémie, un AVC (Hua et al., 2007; Tang et al., 2007) ou dans les MICI (Fort et al., 2005), certaines montrent que l'activation du TLR4 promeut la survie neuronale (Anitha et al., 2012). Nous n'avons pas observée de dommages neuronaux dans notre système. Les dosages NSE ou l'analyse de l'expression de la caspase-8 (résultats non montrés) n'ayant pas mis en évidence de mort neuronale. La réponse au LPS que nous avons observée est tout d'abord une augmentation de l'expression du TLR2. L'intérêt pour l'étude des TLR-2 et -4 notamment, vient des résultats des modèles murins d'invalidation de ces TLRs : l'invalidation du TLR2 conduit au développement d'une colite spontanée (Brun et al., 2013) alors que celle du TLR4 ou de MyD88, son adaptateur essentiel ; augmente la susceptibilité au DSS (Abreu et al., 2010 ; Cario, 2010). Ce rôle protecteur des TLRs est aussi suggéré par les polymorphismes du TLR2 associés aux MICI (Mizushima et al., 2008). Par ailleurs, on a imputé des rôles importants aux modifications d'expression des TLR-2, -4, de leur co-récepteur CD14 et de leur distribution sur les CEI (Brown et al., 2014 ; Cario et al., 2000 ; Cario, 2010 ; Frolova et al., 2008). Des altérations de la reconnaissance microbienne ont pour conséquence une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de l'activation des effecteurs de l'immunité acquise (Hart et al., 2005 ; Niess, 2008). Des modèles intégrés de délétion inductible et tissu spécifique des TLRs, nous permettrait de mieux définir leur contribution à la réponse inflammatoire.

La réponse au LPS que nous avons observée induit ensuite une diminution de la production l'IL-6 consécutive à la production de $\text{TNF}\alpha$. Là encore la définition de l'IL-6 comme cytokine pro- ou anti-inflammatoire serait trop simpliste, d'autant que ces notions sont souvent associées à des effets néfastes ou bénéfiques. Néanmoins la balance $\text{TNF}\alpha/\text{IL-6}$ que nous avons mis en évidence suggère que le SNE transduit un signal inflammatoire par une baisse de production d'IL-6.

L'activation du SNE est-elle bénéfique ?

De la même manière nous pouvons nous poser la question de l'effet bénéfique ou non de l'activation du SNE, puisque nous avons montré qu'en activant le SNE nous inversons le rapport $\text{TNF}\alpha/\text{IL-6}$.

Discussion et conclusion

Il est décrit qu'une stimulation vagale est capable d'activer les neurones entériques (Berthoud et al., 2001) qui par une signalisation cholinergique nicotinique activent à leur tour les CGE ce qui améliore l'intégrité de la BEI (Cheadle et al., 2014) mais peut également via l'activation de macrophages avoir un effet anti-inflammatoire (Ghia et al., 2006). La voie cholinergique activée par la stimulation vagale a un effet anti-inflammatoire aux endotoxines, comme le LPS, ou à une colite induite par le DSS, notamment en réduisant la libération de TNF α , d'IL-1 β , d'IL-6, sans effet sur l'IL-10 (Borovikova et al., 2000; Ghia et al., 2006; Tracey, 2007). De même, des études ont montré l'intérêt d'une stimulation des racines sacrées (SRS), déjà utilisée dans le traitement de l'incontinence (Leroi et al., 2009) ou de la constipation (Dinning et al., 2007), comme une nouvelle méthode de prise en charge des patients atteints de MICI. En effet, une des études du laboratoire a mis en évidence que la SRS dans un modèle porcin active le SNE induisant des effets bénéfiques sur les fonctions et l'intégrité de l'épithélium (Meurette et al., 2012 ; Annexe 2). Cette première étude a donné suite à d'autres travaux du laboratoire ayant montré l'intérêt de la SRS dans la prise en charge des MICI permettant la mise en place actuelle d'un essai clinique.

La réponse précoce du SNE au LPS serait de médier la réponse inflammatoire (nos résultats et Cuesta et al., 2002 ; Hassani et al., 2005 ; Mc Cafferty et al., 1994 ; Rühl et al., 1994 et 2001) alors que son activation, conséquente ou non à l'inflammation, serait impliquée dans sa résolution. Par ailleurs, au cours de l'inflammation intestinale chronique, une hyperexcitabilité neuronale est observée (Lakhan and Kirchgessner, 2010) et pourrait être un reliquat d'inflammation non résolue.

La signalisation neuronale

La transcription de TNF α résulte de la voie des MAPKs (ERK1/2, p38 et JNK/SAPK). Or dans notre étude, le LPS active des voies ERK et AMPK conduisant à la production du TNF α . Des données montrent que l'AMPK est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation (Li and Keaney, 2010; Young et al., 2005) notamment qu'elle peut activer p38 et ainsi la production du TNF α (Li et al., 2005). Les modèles KO au niveau du SNC pour ERK ne sont pas viables avec notamment de graves problèmes de développement du cerveau (Satoh et al., 2011). Dans les neurones corticaux ou hypothalamiques, l'inhibition de

Discussion et conclusion

l'AMPK réduit les dommages suivant un AVC et l'activation de l'AMPK les augmente (McCullough et al., 2005). Ainsi, il serait intéressant de mettre au point des modèles animaux d'invalidation conditionnelle des voies et surtout neurone-spécifique pour observer d'éventuelles modifications de la réponse inflammatoire.

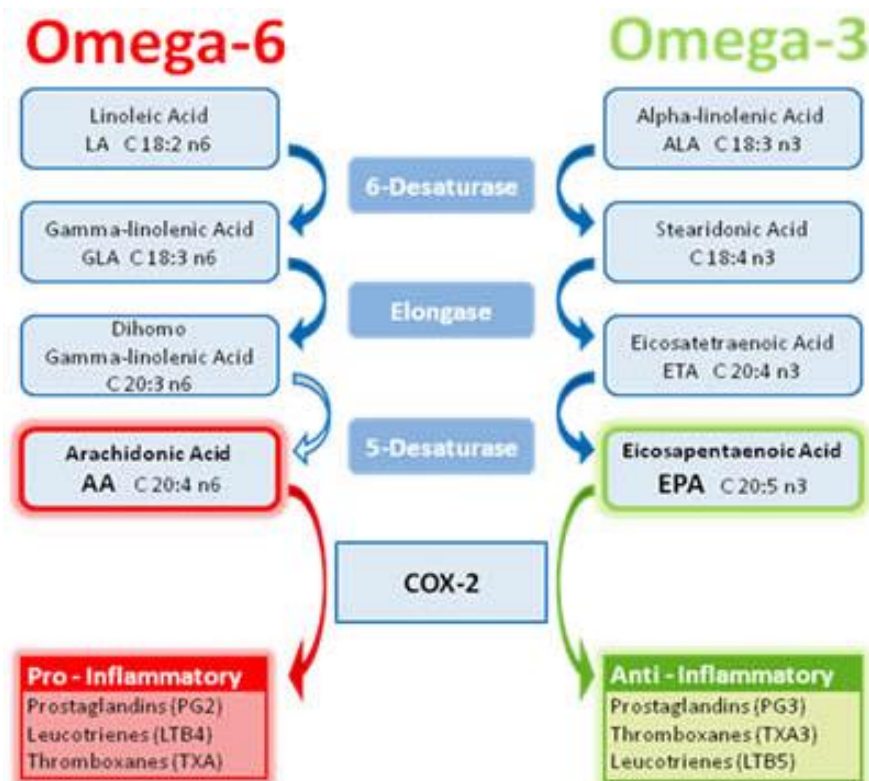
Dans un deuxième temps, nous avons montré que l'activation neuronale, électrique (EFS) ou chimique (ATP) via le P2X7, inhibe l'activation des voies ERK, AMPK et donc réduit la production de TNF α . Par conséquent cette activation entraîne une réduction de l'expression du TLR2 et une potentialisation de la synthèse d'IL-6. L'ATP est important dans la communication neuro-gliale (Gomes et al., 2009 ; Gulbransen and Sharkey, 2009) et de nombreux récepteurs purinergiques sont exprimés par les neurones et les CGE (P2X2,3,4,5,6,7 ainsi que P2Y1,2,6) (Burnstock, 2008; Fields and Burnstock, 2007; Gomes and Chevalier, 2009). L'ATP extracellulaire induit la libération de TNF α par la microglie via la fixation au récepteur P2X7 provoquant un flux calcique et une activation ERK/p38 (Hide et al., 2000; Suzuki et al., 2004). Cependant, l'ATP à 1 mM se fixe à P2X7, diminue la production de TNF α induite par le LPS dans des cultures primaires d'astrocytes corticaux de rat alors qu'à des doses plus faibles, l'ATP potentie la libération de TNF α (Kucher and Neary, 2005). Ces données suggèrent que l'ATP libéré par les cellules voisines des astrocytes induit un mécanisme senseur de la sévérité des dommages du SNC qui va moduler la production de TNF α par les astrocytes et ainsi leur réponse inflammatoire.

Le rôle des PUFAs

Dans la littérature, nombre d'études ont suggéré l'intérêt de la consommation des oméga, n-3 et n-6, dans le bon fonctionnement de l'organisme, en particulier dans la prévention des pathologies neurodégénératives ou cardio-vasculaires (régulation de la tension artérielle, élasticité des vaisseaux, agrégation des plaquettes). En ce qui concerne les MICI, les données ont montré que leur prévalence pouvait être augmentée par un déséquilibre entre des apports en n-3 considérés comme anti-inflammatoires et en n-6 considérés comme pro-inflammatoires (Monk et al., 2012; Tyagi et al., 2012) et dont l'excès peut provoquer des douleurs et des maladies inflammatoires comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, des études ont montré que les n-3 avaient des effets bénéfiques sur l'inflammation intestinale en régulant les réponses immunes (Stulnig, 2003; Whiting et al., 2005). Les n-3 préviennent la

Discussion et conclusion

redistribution des protéines des jonctions serrées et ainsi la rupture de la BEI (Li et al., 2008). Cependant, il existe des résultats contradictoires notamment l'étude d'Hokari et al qui démontre que selon les n-3, l'effet peut être pro- ou anti-inflammatoire (Hokari et al., 2013). Dans ce travail, nous apportons de nouveaux arguments pour reconsidérer le rôle des n-6, principaux constituants du système nerveux et du cerveau, dans l'inflammation, et la nécessité de cette inflammation pour la réparation et le maintien de la BEI.



Les PGs ont des rôles dans la réponse allergique comme dans la mise en place et la résolution de l'inflammation en particulier la PGD_2 et ses dérivés la 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J_2 (15dPGJ₂) et le $11\beta PGF_2\alpha$. La 15dPGJ₂, issue de la déshydratation de la PGD_2 , a été identifiée par une étude de notre laboratoire comme un gliomédiateur qui inhibe la prolifération des CEI via PPAR γ (Bach-Ngohou et al., 2010) et possède des effets neuroprotecteurs via Nrf2 et l'activation de la GCLc pour la synthèse de GSH (Abdo et al., 2010). Le $11\beta PGF_2\alpha$, issu de la transformation enzymatique de la PGD_2 par les enzymes AKR1C2 et AKR1C3, est connu comme marqueur de la réponse allergique, en particulier dans l'asthme dû aux sulfites du vin ou après l'exercice (Misso et al., 2009; Nagakura et al., 1998) et reflète probablement l'activation des mastocytes (Bochenek et al., 2004). Le $11\beta PGF_2\alpha$ est up-régulé par les composants bactériens et les cytokines proinflammatoires

Discussion et conclusion

(Mitchell et al., 2005). Nos travaux ont permis d'identifier un nouveau rôle de la 15dPGJ₂ qui non seulement inhibe la prolifération des CEI mais augmente leur étalement et la résistance de la BEI. Ils ont surtout permis d'identifier un nouveau gliomédiateur, le 11βPGF₂α et son rôle sur l'augmentation de l'étalement et de la réparation épithéliale. Les études sur la PGD₂ ont démontré la dualité de ses actions. D'une part, la PGD₂ est considérée comme anti-inflammatoire et pro-résolutive de l'inflammation car elle augmente dans les modèles de colite et est associée à une diminution de l'infiltrat granulocytaire dans la muqueuse colique, effets médiés par l'activation des récepteurs DP (Ajuebor et al., 2000). De plus, une étude sur des patients atteints d'une RCH en rémission a permis de mettre en évidence une concentration de PGD₂ colique importante (Vong et al., 2010). D'autre part, des études suggèrent également un rôle pro-inflammatoire de la PGD₂, notamment avec une activité augmentée qui participerait aux dysfonctions de la BEI (Zamuner et al., 2003) et une production prolongée après la résolution de la colite qui favoriserait le processus de tumorigénèse colique (Zamuner et al., 2005 ; Vong et al., 2010). La PGD₂ est issue de l'action de la PGDSynthase en particulier la forme L-PGDS sur la PGH₂, elle-même issue de l'action des COX-1 et -2 sur l'acide arachidonique. L'inflammation ou la colite induite au DSS augmente l'expression de la L-PGDS (Hokari et al., 2010). Pour la COX-2, son activité est augmentée dans les colites et participerait aux dysfonctions de la BEI (Zamuner et al., 2003). En ce qui concerne l'expression des COX2, les données de la littérature suggéraient une augmentation d'expression donnant lieu à des essais thérapeutiques avec l'administration d'anti-inflammatoires COX-2. Or, ils apparaissent délétères dans les maladies inflammatoires de l'intestin au même titre que les AINS non sélectifs y compris l'aspirine, inhibant COX-1 et COX-2. Les AINS inhibiteurs sélectifs de COX-2 ont une toxicité gastro-duodénale (Fitzgerald et Patrono, 2001) réduite par rapport à celle des AINS non sélectifs. Au niveau du côlon, les études chez l'animal montrent que les anti-COX-2 entraînent une amélioration des colites expérimentales induites par l'acide acétique (Karmeli et al., 2000), non confirmée dans un modèle de colite au TNBS (Lesch et al., 1999; Reuter et al., 1996). Les souris invalidées pour COX-1 ou COX-2 ne développent pas de colite spontanée mais l'absence de COX-2 plus que l'absence de COX-1 augmente la susceptibilité colique au DSS: les anti-COX-2 potentialisent les lésions (Morteau et al., 2000). Notre travail pose, comme pour le TLR2, la question de la spécificité cellulaire. Nous décrivons une expression gliale de la L-PGDS, qui peut aussi être sécrétée par les CGE mais son activité dans le milieu est non connue (Bach-Ngohou et al., 2010). La part de la production glial de PGD₂ par rapport à la production

Discussion et conclusion

épithéliale est quantitativement vraisemblablement mineure, mais n'a fonctionnellement pas forcément moins d'impact. La compartimentalisation, c'est-à-dire l'organisation d'une signalisation en microdomaines a été bien mise en évidence, notamment concernant le calcium au niveau du cœur (Berthouze et al., 2011) et l'on peut supposer l'existence de microdomaines riches en PGD_2 et/ou ses dérivées spécifiquement entre les CGE et le pôle basal des CEI. La localisation des récepteurs DP1 et DP2, et plus généralement la voie d'action de la PGD_2 et ses dérivés sur les CEI reste à définir. Il serait par ailleurs déjà intéressant de comparer les effets des AINS administrés par voie orale ou intraveineuse.

Une autre possibilité est que les actions des produits finaux de la voie des COX soient diverses et potentiellement contraires, et qu'une inhibition très en amont ne permette pas de voir ce qui se passe très en aval. Par exemple, certains effets paradoxaux de la PGE_2 commencent à être expliqués de part les différentes fonctions liées à ses sous-types de récepteurs EP1, 2, 3 et 4 (Rodríguez-Lagunas et al., 2010). Il en est de même pour l'acide 15(S)-hydroxyeicosatétraénoïque ou 15-HETE issu de la catalyse des AGPI par les LOX. La 15-LOX2 sous-exprimée dans la muqueuse colique humaine chez les patients atteints d'une RCH (Mangino et al., 2006), ce qui conduit à la réduction de la production de 15-HETE (Kaser et al., 2010 ; Mangino et al., 2006). Les études précédentes ont montré que le 15-HETE induisait une croissance des CEI (Cabral et al., 2013), une augmentation de la TER (Ohata et al., 2005). Dans notre travail, nous avons montré que les CGE humaines exprimaient la 15-LOX2, nous avons mesuré une baisse de production de 15-HETE par les CGE pathologiques de patients atteints de la MC et identifié un nouveau rôle du 15-HETE : la baisse de la perméabilité de la BEI. Le 15-HETE n'a pas de récepteur clairement identifié, mais il a été montré qu'il peut se lier aux membranes plasmiques (Vonakis and Vanderhoek, 1993) ou au TRPV1 (Koskela et al., 2012). Nous avons observé qu'un ajout en apical des CEI n'induit aucun effet contrairement à l'addition dans le milieu basolatéral. Ceci suggère la présence de récepteurs en basolatéral seulement et un contrôle par des cellules à proximité des CEI comme les CGE.

CIBLES EPITHELIALES des médiateurs GLIAUX

L'autre résultat majeur est que les effets des dérivés de la PGD_2 sont en partie médiés par $PPAR\gamma$, rôle confirmé par l'impact de son inhibiteur le GW9662 et la reproduction des

Discussion et conclusion

effets par un agoniste sélectif, la rosiglitazone. Or, PPAR γ activé par l'administration de rosiglitazone, réduit la sévérité de la colite au DSS (Su et al., 1999). Malgré ces données, peu d'études ont évalué le rôle de PPAR γ dans les MICI. Une diminution de 60% de l'expression de PPAR γ est observée dans les CEI du côlon de patients atteints de RCH (Bouguen et al., 2014) en zones inflammées et saines, en comparaison aux CGE de MC ou aux CGE contrôle. Une des hypothèses proposées est que des modifications épigénétiques de PPAR γ diminueraient son expression, et que des taux élevés de TLR4 dans les CEI pourraient altérer la tolérance de la muqueuse au LPS luminal, ce qui conduirait à une inflammation colique superficielle (Annese et al., 2012 ; Dubuquoy et al., 2006 ; Kaser et al., 2010). De plus, une étude récente a suggéré que PPAR γ était un gène de susceptibilité pour la MC (Sugawara et al., 2005). Les données de la littérature montrent que la 15dPGJ₂ active PPAR γ et inhibe NF κ B alors que le 11 β PGF₂ α fait l'inverse. Dans notre étude, il nous reste à étudier les niveaux d'expression de PPAR γ et de NF κ B pour voir dans quelle mesure les voies sont impliquées dans les défauts fonctionnels des CGE de Crohn. De plus, la 15dPGJ₂ peut également interagir avec le récepteur DP2 de la PGD₂, or les Caco-2 utilisées dans cette étude expriment DP2 mais pas DP1 (résultats non publiés du laboratoire Le Loupp et al., 2012). De plus, le 11 β PGF₂ α n'a pas de récepteur identifié. Nous avons ainsi testé l'effet de l'antagoniste CAY10595 des récepteurs DP qui se résume donc à un effet sur DP2 et l'antagoniste AL8810 du récepteur FP de la PGF₂ α . Le CAY10595, mais pas l'AL8810, inhibe la réparation épithéliale. Cependant, la réparation semblait majoritairement due à l'action du 11 β PGF₂ α . Ainsi, ce résultat suggère que le 11 β PGF₂ α pourrait comme la 15dPGJ₂ agir via le récepteur DP2.

Concernant le 15-HETE, il active les MAPK ERKs et inhibe l'AMPK des CEI. Nous n'avons pas identifié les conséquences de l'activation des ERK par le 15-HETE, mais avons montré que l'inhibition de l'AMPK était responsable de la diminution de la perméabilité par le contrôle de l'expression de ZO-1. Cette nouvelle voie est d'autant plus intéressante, que l'AMPK, ce senseur énergétique, a une activité régulant et régulée par la prise alimentaire. Par exemple, une supplémentation en n-3 peut restorer des mécanismes impliqués dans l'homéostasie des fonctions cérébrales après un traumatisme en activant l'AMPK (Wu et al., 2007). De plus, l'activation de PPAR γ stimule l'AMPK et ainsi le métabolisme du glucose cardiaque conduisant à une réduction des dommages tissulaires au cours des maladies

Discussion et conclusion

cardiovasculaires (Xiao et al., 2010). PPAR γ peut également réguler la motilité des CEI via l'activation des MAPK en particulier les voies PI3k, cdc42 et son effecteur PAK et ERK1/2 (Chen et al., 2006).

Il faut aussi noter que l'AMPK peut réguler les petites protéines G qui sont impliquées dans les fonctions de la BEI. Ainsi, l'AMPK α 1 est capable d'inhiber RhoA et induire un effet vasoprotecteur (Gayard et al., 2011). Or, de nombreuses études ont montré l'implication de la voie RhoA/ROCK dans l'inflammation (Segain et al., 2003) et son activation comme son inhibition est corrélée à une augmentation de la perméabilité de la BEI, alors que Rac1 et Cdc42 sont impliquées dans la stabilité de la BEI (Schlegel et al., 2010). De plus, si les protéines Rho semblent essentielles pour la restitution épithéliale (Santos et al., 1997), des études montrent que l'inhibition de la réparation induite par les endotoxines ou l'éthanol, voire la rupture de la BEI, étaient médiées par l'activation de la voie RhoA/ROCK (Cetin et al., 2004; Elamin et al., 2014) et que l'activation de Rac1 était quant à elle essentielle pour la migration et l'étalement des kératinocytes (Hamelers et al., 2005). En effet, la réorganisation du cytosquelette d'actine pour l'étalement des cellules épithéliales nécessite une activation de Rac1 et Cdc42 et une inhibition de Rho (Filipenko et al., 2005). Il serait donc intéressant d'identifier précisément les mécanismes impliqués dans les effets que nous avons observés en analysant l'activation des petites protéines G. Une délétion tissu-spécifique de l'AMPK au niveau de l'épithélium pourrait permettre de voir, si dans un modèle inflammatoire, l'inhibition de cette voie rétablirait l'effet hypo-perméant induit par le 15-HETE.

En conclusion, nous avons démontré que les CGE de Crohn possèdent des propriétés intrinsèques délétères avec la perte de la capacité à diminuer la perméabilité (défaut 15-HETE), la prolifération des CEI (15dPGJ₂) et à augmenter l'étalement, la résistance et la réparation de la BEI (15dPGJ₂ et 11 β PGF₂ α). De plus, certaines de nos données préliminaires en contexte inflammatoire, suggèrent que les CGE de Crohn contrairement aux CGE contrôle perdent la capacité à réagir à l'inflammation. En découvrant de nouvelles propriétés des gliomédiateurs lipidiques, nous avons démontré l'implication de nouvelles voies de signalisation et suggéré, contrairement aux données de la littérature, que les n-6 pouvaient avoir un rôle bénéfique dans l'inflammation.

Les MICI, une gliopathie ?

Les neuropathies entériques sont définies par une neurodégénérescence et/ou une altération des propriétés neuronales. Le concept de gliopathie est né d'études au niveau du SNC, suggérant que les astrocytes participent à l'initiation et la propagation des pathologies neurologiques (Verkhratsky et al., 2012). De nombreux arguments plaident en faveur d'une gliopathie entérique au cours des MICI associée à l'initiation et/ou l'évolution de la maladie.

Tout d'abord, la notion de gliopathie est renforcée par l'impact de l'ablation des CGE (Aube et al., 2006 ; Bush et al., 1998 ; Cornet et al., 2001 ; Nasser et al., 2006) induisant selon la sévérité, des altérations de l'architecture de l'épithélium, une neurodégénérescence ou une modification du codage neurochimique. De plus, l'inflammation intestinale induit une hyperprolifération (Bradley et al., 2007 ; Cirillo et al., 2001 ; Collins et al., 1996 ; von Boyen et al., 2004), une hyperplasie (Steinhoff et al., 1988) mais également une augmentation de l'expression de la GFAP (von Boyen et al., 2004) et une induction du CMHII (Geboes et al., 1992) qui font des CGE de potentielles cellules présentatrices d'antigènes. Les CGE sont altérées au cours des MICI avec une diminution d'expression de la GFAP et de S100 β dans la muqueuse, la sous-muqueuse et les zones non inflammatoires (Cornet et al., 2001 ; Villanacci et al., 2008) et une augmentation d'expression de la GFAP en zones inflammatoires (Cornet et al., 2001 ; von Boyen et al., 2006) mais aussi de S100 β et iNOS dans la RCH (Cirillo et al., 2009). Nous n'avons pas retrouvé de modification d'expression des marqueurs gliaux dans nos CGE de patients. L'absence d'augmentation d'expression des marqueurs gliaux des CGE en culture peut facilement s'expliquer par l'absence d'environnement inflammatoire, mais la diminution d'expression de la GFAP que nous ne retrouvons pas en culture suggère (i) qu'il y a effectivement une perte gliale dans la MC, ou (ii) que les sous-populations gliales sont différentes dans la MC que celles isolées et utilisées pour notre étude. Jusqu'à maintenant, aucune donnée ne nous permet de dire que les CGE présentes dans le plexus sous-muqueux et celles du plexus myentérique seraient différentes au point de vue phénotypique et fonctionnel. De plus, la MC étant une pathologie transpariétale, nous pouvons penser que même si notre étude porte sur l'analyse de CGE myentériques sur le contrôle de la BEI, ce modèle peut permettre d'identifier des altérations gliales au cours de la MC. Ainsi, la mise au point d'une nouvelle méthode d'isolation et de culture de CGE du plexus sous-muqueux afin de confirmer nos données et répondre à ces nouvelles questions, serait intéressante. Il nous faudrait encore

Discussion et conclusion

étudier l'impact de ces CGE « pathologiques » sur le phénotype et les fonctions des autres cellules de leur microenvironnement, neurones, cellules souches ou encore cellules immunitaires.

Nos données montrent que les CGE de MC présentent des défauts fonctionnels qui pourraient expliquer ou concourir au développement des lésions de la barrière observées au cours de la MC. Nous n'avons pas encore déterminé si ces CGE de MC étaient constitutivement dysfonctionnelles ou avaient été rendu dysfonctionnelles par l'inflammation chronique. Il a en effet été montré que l'inflammation chronique pouvait entraîner des modifications épigénétiques comme une méthylation de l'ADN (Karatzas et al., 2014). Ainsi, nous pouvons nous demander si nos résultats viennent d'une prédisposition génétique des CGE, qui présentent un défaut d'expression de L-PGDS, de 15-LOX2, ou encore de NOD2, ces derniers étant associés aux MICI, ou s'il s'agit de modulation épigénétique des CGE liée à une inflammation chronique. Sachant que lors de toutes nos études nous avons également étudié des CGE de RCH et qu'elles ne présentent aucun des défauts fonctionnels observés chez les CGE de MC, ce serait une inflammation chronique de type Th1 et non Th2 qui modifierait les CGE. Pour répondre à cette question, nous allons utiliser une analyse à grande échelle des gènes exprimés par les CGE contrôles et MICI à l'aide de puces et analyser le remodelage épigénétique que l'inflammation chronique a pu induire sur les CGE de MC.

CGE = astrocytes périphériques ?

La morphologie, les marqueurs et les fonctions des CGE sont en de nombreux points similaires aux astrocytes centraux (Savidge et al., 2007). Les données permettent de faire un véritable parallèle entre l'unité neuro-glio-épithéliale et la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, la BHE est régulée par les interactions des astrocytes avec les neurones et les cellules endothéliales (Abbott et al., 2006). Les astrocytes renforcent la BHE en augmentant l'expression des protéines de jonctions (Dehouck et al., 1990) en régulant le transport de molécules par la modulation de l'expression de transporteurs comme GLUT1 (McAllister et al., 2001) et en régulant la fonction métabolique par l'expression d'enzymes (Abbott, 2002). Les astrocytes ont un rôle dans la neuroprotection et produisent des cytokines (IL-6, IL-1 β) des médiateurs TGF β 1 (Garcia et al., 2004), GDNF (Igarashi et al., 1999), GSH (Minich et al., 2006).

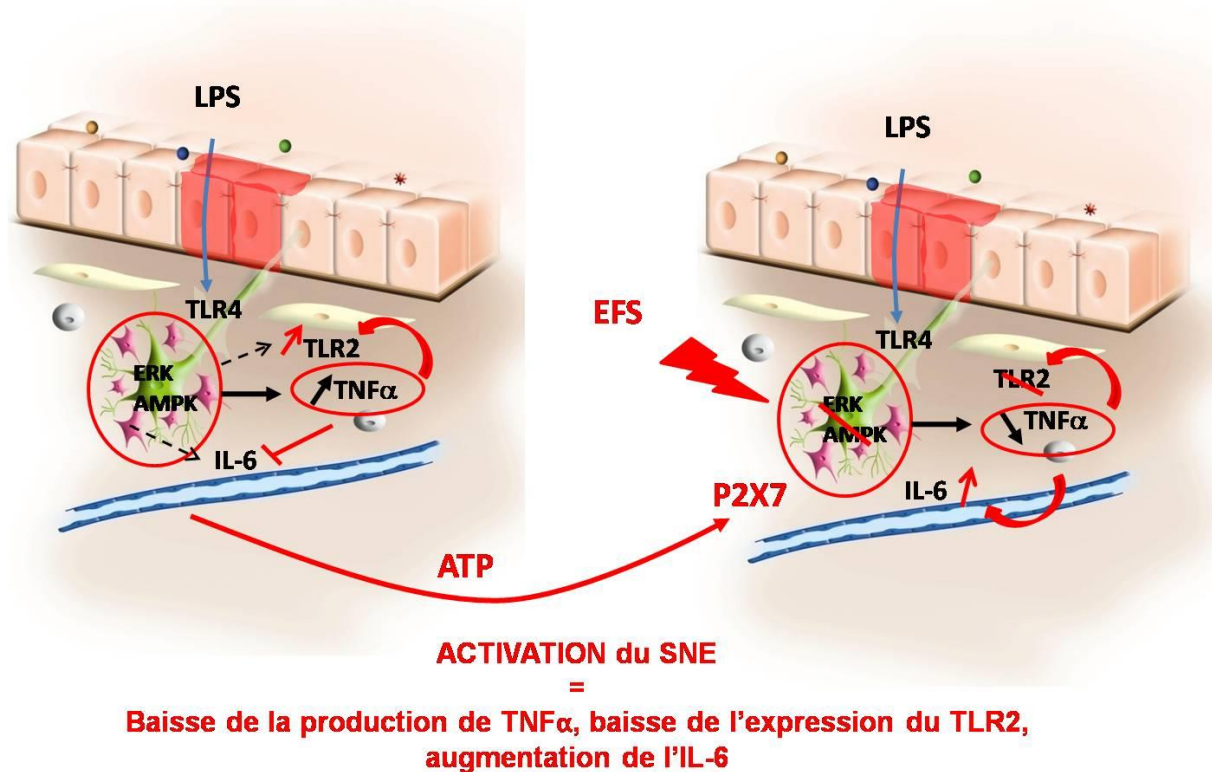
En s'appuyant sur ces constats de ressemblance et sur le fait que les CGE sont plus accessibles que les astrocytes du SNC, leur étude pourrait permettre, comme une fenêtre ouverte sur le cerveau, d'améliorer les connaissances sur le phénotype et les fonctions des cellules gliales en physiopathologie. D'une manière plus spécifique, l'hypothèse de Braak suggère que l'initiation de la maladie de Parkinson serait digestive due à l'entrée d'un facteur environnemental, et se propagerait via le nerf vague au SNC, les biopsies coliques des patients fournissant du matériel pour étudier les altérations liées à la maladie et mieux comprendre ses mécanismes. De plus, dans d'autres pathologies neurodégénératives comme la sclérose en plaques, de nombreux patients présentent des troubles digestifs (constipation, diarrhée) notamment dus aux lésions des nerfs de l'axe intestin-cerveau mais reflétant peut être un éventuel rôle du SNE dans la pathogenèse de ces troubles. En effet, des études suggèrent la piste d'un pathogène du tractus gastrointestinal qui contribuerait au développement de la réaction auto-immune (Deretzi et al., 2009).

Conclusion

Les travaux exposés dans cette thèse ont permis d'identifier de nouveaux rôles du système nerveux entérique dans l'inflammation intestinale.

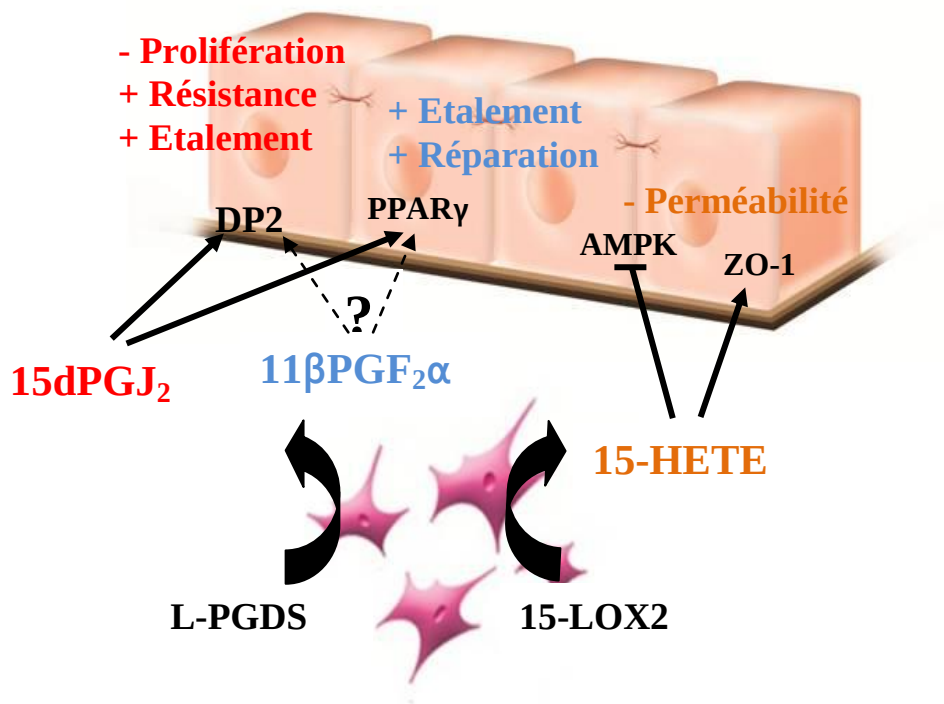
Nous avons montré dans un premier temps, que les neurones entériques peuvent sécréter du $\text{TNF}\alpha$, en réponse au LPS, en activant des voies ERK et AMPK. Cette synthèse est inhibée par l'activation neuronale conduisant également à une diminution de l'expression du TLR2 et de la production d'IL-6 gliale, toutes deux induites par le LPS. L'ensemble de ces mécanismes est résumé dans la figure ci-dessous. Ces nouvelles données renforcent l'idée du rôle actif des neurones dans la réponse inflammatoire digestive.

Discussion et conclusion



Dans un second temps, nous avons caractérisé les cellules gliales entériques humaines issues de patients atteints de la maladie de Crohn afin de déterminer si leur phénotype et leurs fonctions étaient modifiés devenant ainsi des cellules délétères contribuant à l'étiologie de la MC et/ou concourant à sa poursuite.

Nous avons montré que les CGE de patients atteints de la MC en culture ne présentaient pas de différence d'expression des marqueurs gliaux (GFAP, S100 β et Sox10) et de production de gliomédiateurs connus (IL-6, TGF β , proEGF, GSH). En revanche, ces travaux démontrent que les CGE pathologiques présentent une baisse de production de trois médiateurs lipidiques le 15-HETE, la 15dPGJ₂ et un nouveau dérivé de la PGD₂ peu connu, le 11 β PGF₂ α . Nous avons mis en évidence leurs fonctions et une partie de leur mécanisme d'action. Ainsi, le 15-HETE diminue la perméabilité de la BEI par une inhibition de l'AMPK et une augmentation d'expression de ZO-1. La 15dPGJ₂, en plus d'inhiber la prolifération des CEI, augmente l'étalement des CEI et la résistance de la BEI, tandis que le 11 β PGF₂ α favorise la réparation épithéliale en partie via l'activation de DP2 et une voie PPAR γ dépendante. Les résultats de cette deuxième partie sont résumés dans la figure suivante.

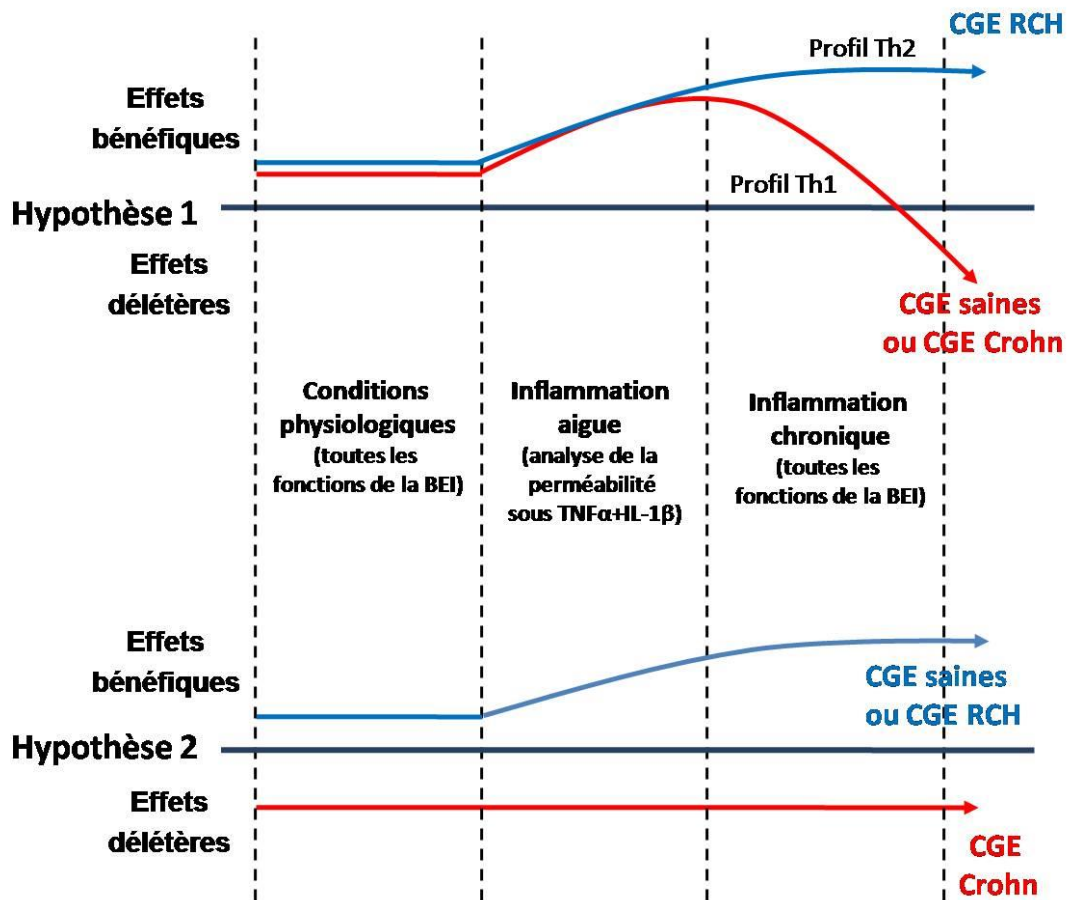


L'autre donnée importante de ce travail et des données préliminaires mentionnées, repose sur la différence fonctionnelle entre des CGE de patients atteints de MC et de RCH. Pour le moment, seule la perméabilité de la BEI a été évaluée en condition d'inflammation aiguë ($\text{TNF}\alpha + \text{IL-1}\beta$). Ces données laissent place à deux hypothèses représentées sur le graphique suivant.

Hypothèse 1 : les CGE « saines » comme les CGE « Crohn » sont protectrices, en conditions physiologiques comme au cours de l'inflammation aiguë. Par contre, soumises à une inflammation chronique, elles présentent des défauts fonctionnels (profil Th1). En revanche, les CGE « RCH » demeurent protectrices en conditions physiologiques comme inflammatoires, elles ne présentent aucun défaut fonctionnel (perméabilité, résistance de la BEI, étalement des CEI) et soumises à un stress inflammatoire, elles demeurent hypo-perméantes (profil Th2).

Hypothèse 2 : les CGE « saines » et les « CGE « RCH » ont le même comportement, elles sont bénéfiques et renforcent leurs fonctions en condition inflammatoire tandis que les CGE « Crohn » ont des propriétés intrinsèques qui les rendent délétères quelque soit l'environnement.

Discussion et conclusion



Ces données suggèrent que ces CGE « réactives » pourraient, comme les astrocytes centraux réactifs, soit maintenir leurs effets bénéfiques pour les CGE « RCH » dont les capacités seraient dépassées au cours de la maladie, soit devenir délétères et participer au développement de la maladie pour les CGE « MC ». En conclusion, ces travaux de thèse ont apporté des éléments supplémentaires pour confirmer le rôle du SNE dans la réponse inflammatoire digestive, tant par la production de TNF α par les neurones entériques et la modulation de l'activation neuronale, que par la production de médiateurs lipidiques par les CGE régulant les différentes fonctions de la BEI

Annexes

Annexe 1 : Méthodes d'étude de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale

La perméabilité peut être mesurée *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* (Arrieta et al., 2006). Il s'agit de la mesure de la résistance transépithéliale et de la mesure de flux de traceurs radioactifs ou fluorescents.

In vivo, la perméabilité intestinale peut être évaluée grâce à l'administration dans la boisson de traceurs. Leur taux est déterminé dans le sang périphérique ou les urines (Gotteland et al., 2001 ; Playford et al., 2001). Cependant, le sucrose, le lactulose, le mannitol ou encore le rhamnose sont dégradés par la flore colique et sont donc principalement le reflet de la perméabilité du grêle. Pour évaluer la perméabilité colique, des molécules stables comme le Cr-EDTA ou le sucralose sont utilisés (Arrieta et al., 2006).

Ex vivo, la perméabilité peut être mesurée en plaçant des fragments de muqueuse ou des biopsies en chambre d'Ussing (Figure 17). Ce dispositif permet de délimiter un pôle apical et un pôle basolatéral et de mesurer le flux de traceur fluorescent à travers la muqueuse placée dans la cassette entre les deux chambres. Il est possible d'ajouter un clamp électrique pour mesurer la TER, c'est-à-dire le courant ionique, entre les deux compartiments.

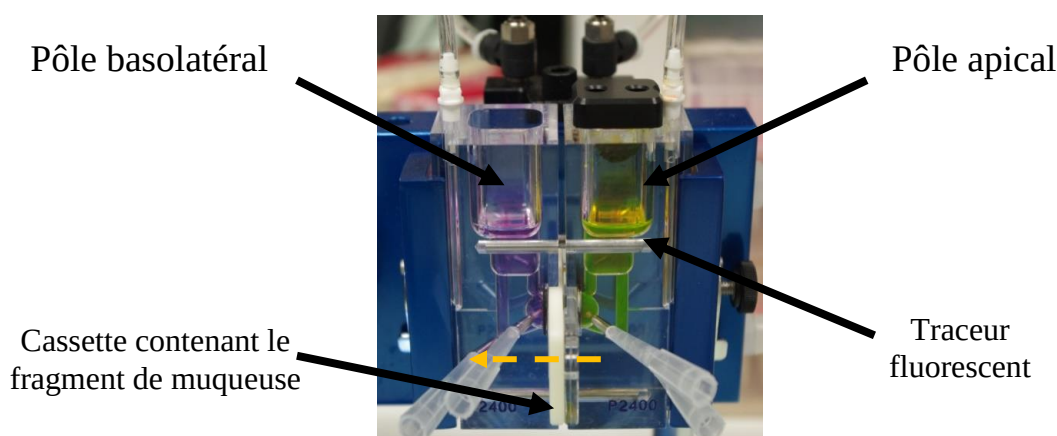


Figure 17 : Chambre d'Ussing pour mesurer la perméabilité paracellulaire ex vivo.
Insert U913.

La perméabilité peut également être mesurée *in vitro* sur des lignées de CEI (tableau I). Il s'agit de lignées tumorales obtenues à partir d'adénocarcinomes coliques humains, de lignées fœtales humaines ou de rat transformées par l'oncogène T du virus simien (SV40) mais qui sont souvent immatures (Quaroni et Beaulieu, 1997 ; Emami et al., 1989 ; Macartney et al., 2000).

Lignée	Phénotype	Référence
Caco-2	Entérocyte	Pinto et al., 1983
HT29	Indifférencié Entérocyte Cellules mucosécrétantes	Fogh, 1975 Pinto et al., 1982 Huet et al., 1987
HT29- Cl.16E	Cellules mucosécrétantes	Angeron et Labois, 1984
HT29- Cl.19A	Cellules sécrétrices d'électrolytes	Angeron et Labois, 1984
HT29-MTX	Cellules mucosécrétantes	Lesuffleur et al., 1993 et 1995
T84	Cellules sécrétrices d'électrolytes	Dharmasathaphorn et al., 1984
DLD-1	Hétérogène plutôt entérocytes	Dexter et al., 1981
SW403	Hétérogène plutôt indifférencié	Leibovitz et al., 1976
SW620	Indifférencié	Leibovitz et al., 1976
LS174T	Hétérogène plutôt mucosécrétant	Tom et al., 1976

Tableau: Lignées de cellules épithéliales issues d'adénocarcinomes coliques humains.

Ces lignées ont été utilisées comme modèles en raison de la difficulté à isoler des CEI. Depuis des études ont décrit des procédés de culture à partir de fragments de cryptes coliques ou d'intestin fœtal. (Moyer et al., 1996 ; Pang et al., 1996 ; Sanderson et al., 1996 ; Perreault et Beaulieu., 1998 ; Kalabis et al., 2003) mais leur phénotype n'est pas complètement établi. Les lignées de CEI sont utilisées pour étudier les phénomènes sécrétoires, la prolifération, la résistance et la perméabilité. En effet, cultivées sur des filtres perméables (« Transwell »), les CEI, en particulier les Caco-2, forment une monocouche polarisée de cellules différenciées, délimitant un pôle apical supérieur et un pôle basolatéral inférieur (Figure 18). Ce dispositif permet d'étudier l'impact de traitement sur le phénotype et les fonctions épithéliales ou celui d'une coculture avec d'autres lignées cellulaires. Ces filtres permettent également la mesure de la TER avec un ohmètre dont les deux électrodes, l'une placée sur le filtre et l'autre dans le puits, évalue la différence de potentiel électrique.

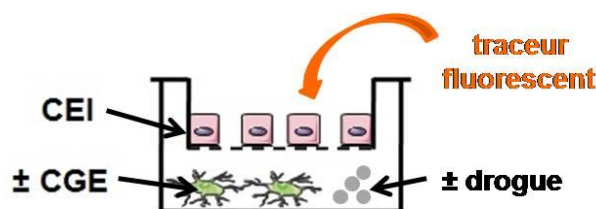


Figure 18: Modèle de coculture des cellules épithéliales intestinales sur filtre Transwell.

Les traceurs utilisés couramment pour mesurer la perméabilité paracellulaire sont l'acide sulfonique-FITC (400Da), le dextran-FITC ou l'inuline-FITC de 4 à 70kDa et pour la perméabilité transcellulaire, la HRP (Horseradish Peroxydase, 40kDa). Les marqueurs radioactifs comme le mannitol ou l'inuline marqués au tritium ou encore le ⁵¹CrEDTA (tétra-acétylène d'éthylène diamine marqué au chrome 51) peuvent être utilisés.

Annexe 2 : “Colonic endoscopic full-thickness biopsies : from neuropathological analysis of the myenteric plexus to the functional study of neuromuscular transmission.”

NEW METHODS: Experimental Endoscopy

Colonic endoscopic full-thickness biopsies: from the neuropathological analysis of the myenteric plexus to the functional study of neuromuscular transmission

Michel Neunlist, PhD, Sabrina Coquenlorge, BS, Philippe Aubert, MS, Emilie Duchalais-Dassonneville, MS, Stanislas Bruley des Varannes, MD, PhD, Guillaume Meurette, MD, Emmanuel Coron, MD, PhD

Nantes, France

Background: Better understanding of the pathophysiological mechanisms involved in severe dysmotility disorders is crucial to improve patient management and identify novel therapeutic targets. Recent studies suggested that endoscopic full-thickness biopsies (eFTBs) could be developed as an alternative to surgical biopsies. However, currently it remains unknown whether eFTBs would allow myenteric plexus analysis on whole mounts and the evaluation of neuromuscular transmission.

Objective: To determine with eFTB specimens the ability to analyze on whole mounts the key parameters of the myenteric plexus, ie, ganglia and neurons, and to perform functional evaluation of neuromuscular transmission.

Design: An experimental pilot study in 6 pigs was conducted in accordance with French institutional guidelines.

Intervention: Under general anesthesia, pigs underwent a rectosigmoidoscopy. In each pig, an eFTB was performed at 25, 30, and 35 cm from the anal margin with an EMR-based technique. Tissue specimens were immediately processed for immunohistochemical and/or functional ex vivo analysis of neuromuscular transmission. In 2 pigs, over-the-scope clips were used to seal the perforation.

Main Outcome Measurements: Feasibility of obtaining specimens containing myenteric plexus and muscularis propria, quantitative and standardized immunohistochemical evaluation of ganglia and myenteric neurons, ex vivo assessment of neuromuscular transmission and its pharmacology, and closure rate (ancillary study).

Results: Adequate tissue specimens were obtained in 100% of the procedures, on average, in 6 ± 2 minutes. Immunohistochemical analysis of a whole mount of the myenteric plexus showed that each eFTB contained 14 ± 5 ganglia and 1562 ± 1066 myenteric neurons. In circular muscle strips, electrical field stimulation or exposure to a pharmacological agent induced a specific tissue response. A successful closure was achieved in 50% of cases.

Limitations: Nonsurvival study; safety of the procedure needs to be specifically assessed and compared with recently published data.

Conclusions: We demonstrate, for the first time, that full-thickness biopsy specimens obtained by using an endoscopic approach allow the performance of a precise study of the ENS phenotype on whole mounts of the myenteric plexus and the performance of functional studies such as evaluation of neuromuscular transmission. However, further studies are warranted to identify the optimal and safest endoscopic procedure before application of eFTB in humans. (Gastrointest Endosc 2011;73:1029-34.)

Abbreviations: EFS, electrical field stimulation; eFTB, endoscopic full-thickness biopsy; ENS, enteric nervous system; GINMD, GI neuromuscular disease; OTSC, over-the-scope clips.

DISCLOSURE: Dr. Neunlist is recipient of a Contrat d'Interface Inserm. The authors disclosed no financial relationships relevant to this publication.

Copyright © 2011 by the American Society for Gastrointestinal Endoscopy 0016-5107/\$36.00

doi:10.1016/j.gie.2011.01.041

Received October 8, 2010. Accepted January 17, 2011.

Current affiliations: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U913, Université de Nantes Faculté des Sciences et Techniques, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, CHU de Nantes, Nantes, France.

Reprint requests: Emmanuel Coron, MD, PhD, INSERM U913, CHU Hôtel Dieu, 1, place Alexis Ricordeau, 44035 Nantes, France.

GI neuromuscular diseases (GINMDs) are a heterogeneous group of dysmotility disorders that include achalasia, gastroparesis, chronic intestinal pseudo-obstruction and slow transit constipation.^{1,2} Most GINMDs are associated with dysfunctions of key cellular components of the gut, ie, the enteric nervous system (ENS), interstitial cells of Cajal, muscle cells, or even immune cells.³ However, in humans, both diagnostic aspects and pathophysiological mechanisms involved remain poorly established, mainly because of the lack of both quantitative normative histopathological data on ENS lesions and functional assessment of neuromuscular transmission. A recent consensus report highlighted the urgent need to use a standardized access to tissues and evaluation methods of the ENS.²

There is growing evidence that full-thickness biopsy specimens may be the material of choice in assessing neuromuscular dysfunctions in severe GINMDs.⁴ Although surgery is the method of reference to obtain full-thickness biopsy specimens, several novel endoscopic techniques might be used as alternatives,⁵⁻⁹ including EMR-based techniques.⁷⁻⁹ Full-thickness EMR techniques have been mainly used to remove GI tumors^{7,8} but also in 1 study to access the ENS in the stomach. Indeed, Rajan et al⁹ established proof-of-concept of performing a no-hole double EMR technique to access to the myenteric plexus in the stomach of a porcine model at the cost of a high rate of delayed perforation. However, this study did not address the issue of whether endoscopic full-thickness biopsy (eFTB) could allow both an analysis of the ENS phenotype by using whole mounts and a functional study of neuromuscular transmission. Further suggesting the potential use of the endoscopic full-thickness resection technique, both as a diagnostic and therapeutic tool, are the recent data obtained in patients managed conservatively by standard endoclips for bowel perforations^{10,11} as well as the recent development of novel clipping and suturing devices for natural orifice transluminal endoscopic surgery.¹⁰⁻¹⁵

Therefore, the aims of our study were to establish that EMR-derived eFTB specimens allow (1) the characterization of whole-mount key parameters of the ENS, ie, ganglion and neuronal density, and (2) to perform *ex vivo* functional evaluation of neuromuscular transmission.

METHODS

The research was conducted by using 6 Gall KO pigs (5 males; average weight 50 kg) in compliance with the French institutional guidelines. These procedures were approved by the local institutional animal research committee (Agreement E. 44010; Inserm, Nantes, France). General anesthesia was induced and maintained with 2% to 5% isoflurane (Abbott, Rungis, France). Surgically assisted antegrade colonic lavage was performed by water enema through a 6.5F catheter placed at 40 cm of the anal margin before the endoscopic procedure.

Take-home Message

- With further studies identifying the ancillary steps for the safest endoscopic procedure, endoscopic full-thickness biopsy could be easily used in humans in well-defined clinical research settings.

eFTB technique

A rectosigmoidoscopy was performed in live pigs with a standard endoscope (EG450; Fujinon, Saitama, Japan). Three eFTBs were performed in each animal at 25, 30, and 35 cm from the anal margin with the Duette device (Cook Medical, Winston-Salem, NC). We used an EMR ligation technique, previously described in the esophagus,¹⁶ and applied it to the colon as follows: the colonic wall was suctioned of into a ligation cap without previous submucosal injection, and then a single rubber band was deployed at the base to create a panparietal pseudopolyp, which was subsequently removed by a snare placed below the band. In a subgroup of 2 pigs, a 12-mm OTSC (Ovesco Endoscopy, Tübingen, Germany) was placed at the resection site to close the defect (Fig. 1A, B). The Duette mucosectomy device was removed and replaced by the OTSC on the tip of the same endoscope. The full-thickness biopsy site was visualized endoscopically, and tissue approximation was performed by using a new prototype of grasping forceps (Wilson Instruments Co, Shanghai, China). The grasping forceps were then retrieved into the cap, suction was applied, and the OTSC was deployed. Technical success of closure was judged by the air and methylene blue leakage test under laparotomy evaluation, with the colon being submerged in saline solution. Animals were euthanatized at the end of the endoscopic procedure.

Processing of tissue samples

Each resected specimen was dissected under a binocular microscope to obtain 2 tissue fragments: 1 containing the mucosa and the other composed of the muscularis (containing the myenteric plexus).

Morphological and immunohistochemical analysis. The 2 segments (muscularis and mucosa) were stretched in a Sylgard-coated Petri dish and fixed for 4 to 6 hours in paraformaldehyde at room temperature. Before microdissection, the surface areas of the stretched muscularis and mucosa specimens were determined by using Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Md). Then, under a dissection microscope, the circular muscle and part of the longitudinal muscle were removed from the muscularis to obtain whole mounts of the myenteric plexus. Immunostaining of the whole mounts was performed according to standard methods¹⁷ with antibodies against NF220 (1:500, AB1989; Millipore, Billerica, Mass) and Hu (1:200; Invitrogen, Breda, the Netherlands) for

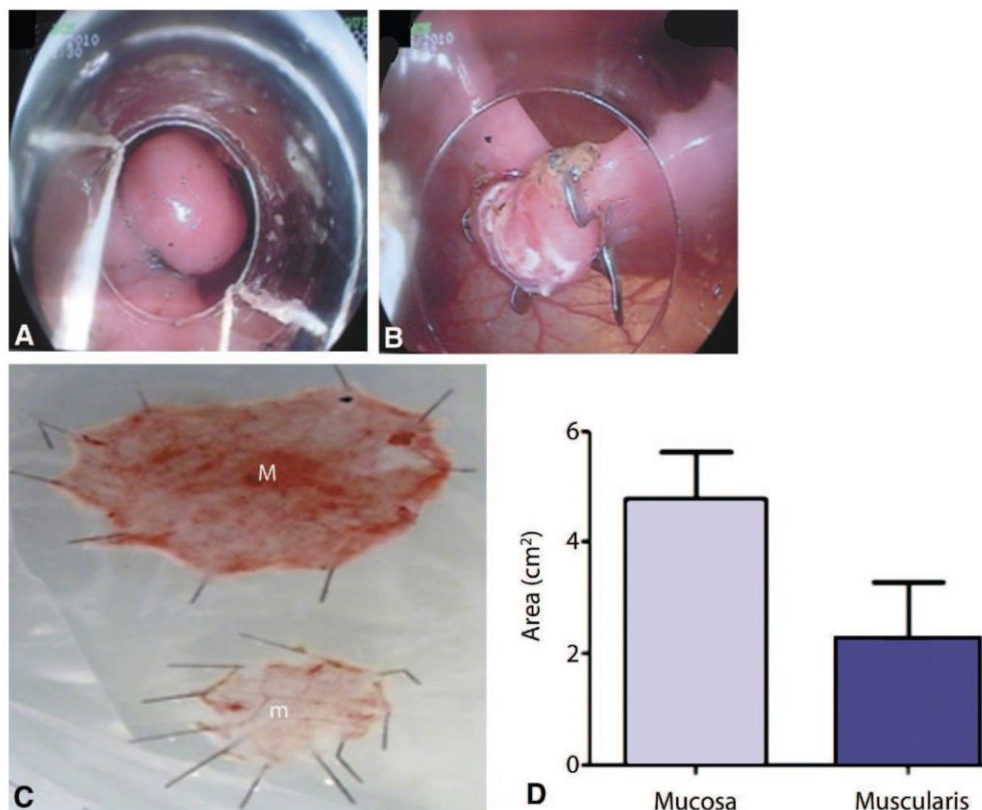


Figure 1. Technique of endoscopic full-thickness biopsy (eFTB) and morphological evaluation of tissue samples. **A.** In the normal colon of the pig, a panparietal pseudopolyp is created by suction into a transparent cap, then resected and removed for tissue evaluation. **B.** An over-the-scope clip is placed at the resection site to close the defect. **C.** Following microdissection, muscularis (M) and mucosa (m) specimens are pinned in a Sylgard coated Petri dish. **D.** Surface area of all mucosa and muscularis specimens obtained from all endoscopic full thickness biopsies performed. The area of the mucosa was significantly larger as compared with the one of the muscularis propria. * $P < .0001$, $n = 18$.

identification of ganglionic structures and neurons, respectively. Whole mounts were then rinsed, placed on slides, covered with fluorescent mounting medium (Dako, Carpinteria, Calif), and observed with a microscope IX 50 (Olympus Medical Systems, Tokyo, Japan). Pictures were acquired with a digital camera DP71 (Olympus Medical Systems), connected to a computer through a frame grabber card (Cell B; Olympus Medical Systems).

Ex vivo measurements of neuromuscular transmission. Strips of circular muscle (approximately 5×10 mm) were dissected and placed in an organ chamber with 7 mL of Krebs solution at 37°C continuously bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2 . Strips were stretched with a preload of 10 mN, which was maintained during an equilibration period of 90 minutes. Then, strips were subjected to electrical field stimulation (EFS) by using previously described parameters¹⁸ as follows: train du-

ration, 10 seconds; pulse frequency, 20 Hz; pulse duration, 300 μs ; and pulse amplitude, 12 V. This procedure was repeated 2 to 3 times with 10-minute washout periods between stimulation. The contractile response of the muscle strip was continuously recorded by using isometric force transducers (No. 7005; Basile, Comerio, Italy), coupled to a PowerMac Performa 7100/80 computer equipped with the MacLab/4s System (ADI, Spechbach, Germany). At the end of each experiment, a dose-response curve with carbachol (10^{-11} - 10^{-4} M) was performed. The EFS-induced response was evaluated by measuring the EFS-induced area under the curve during the EFS period and the area over the curve 1 minute after stimulation. The effects of carbachol were evaluated by measuring the area over the curve of the carbachol-induced contraction for 2 minutes after addi-

tion of carbachol. All values were normalized to the tissue weight.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism software version 5.00 for Windows (GraphPad Software, Inc, La Jolla, Calif). Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation. The significance of differences was determined by using the 1-way analysis of variance for normally distributed data or the Mann-Whitney I test. Differences were considered statistically significant for $P < .05$.

RESULTS

The technique of eFTB was successfully completed on all sites tested (100%, $n = 18$). OTSCs were successfully placed to seal the perforation at 6 of 6 sites. However, air bubbles and/or methylene blue leakage were observed at 3 of 6 sites. Total time to perform a full-thickness biopsy (ie, from initial insertion to removal of the endoscope with the specimen) was 6 ± 2 minutes per site ($n = 18$). The total time of the closure procedure (ie, from the removal of the biopsy specimen to the removal of the endoscope after placement of the OTSCs) was 4 ± 2 minutes per site ($n = 6$).

Morphological analysis of the eFTB specimens

The size of the mucosa specimen was significantly larger than the muscularis specimen (Fig. 1C, D). The size of the mucosa and muscularis specimens was independent of the location of the biopsies (data not shown).

Immunohistochemical analysis

The size of the whole mounts of eFTB specimens (taken at 30 cm from the anal margin) was 0.8 ± 0.5 cm² ($n = 6$). For each biopsy specimen, NF220 staining revealed the presence of ganglia containing enteric neurons (Fig. 2). The number of ganglia per biopsy was 14 ± 5 , and each ganglia contained 40 ± 11 Hu-immunoreactive neurons ($n = 6$). The total number of neurons per biopsy (contained within ganglia and also within interganglionic fiber strands) was 1562 ± 1066 ($n = 6$). The individual values of each parameter evaluated are presented in Table 1.

Neuromuscular transmission assessment

All circular muscle strips exhibited spontaneous contraction at baseline. Furthermore, EFS induced a biphasic contractile response characterized by relaxation during the EFS followed by a contractile response after the EFS (Fig. 3A, B). In addition, carbachol induced a dose-dependent increase in muscle contraction (Fig. 3C, D).

DISCUSSION

This study established, for the first time, that eFTB allows a precise study of ENS phenotype on whole mounts of myenteric plexus to be performed and func-

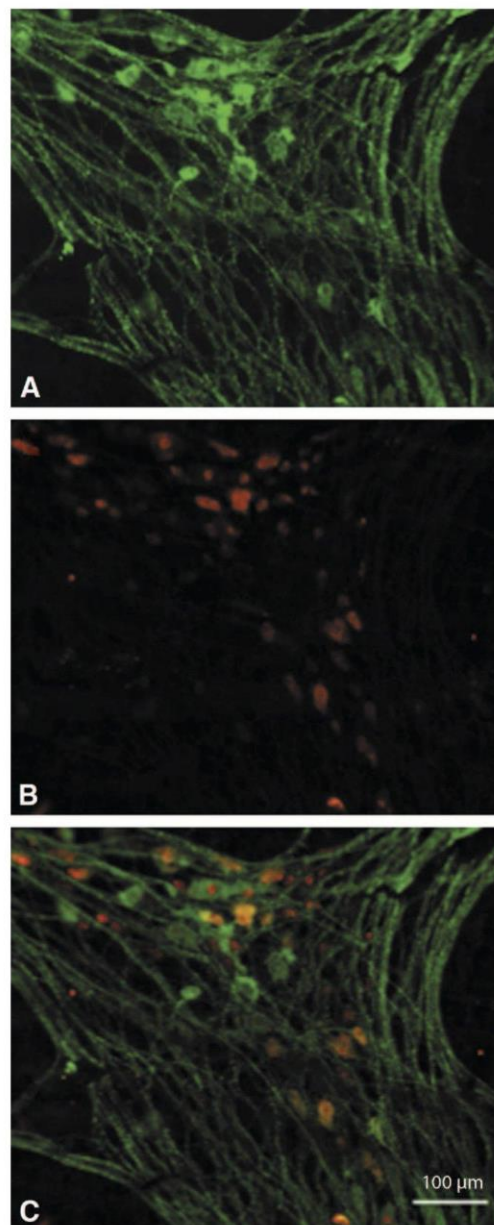


Figure 2. Photomicrograph of colonic myenteric plexus and neurons obtained in whole mounts preparations from endoscopic full-thickness biopsy (eFTB). **A**, Myenteric ganglia were identified with anti-NF220 antibody and contained **(B)** Hu-immunoreactive (IR) neurons. **C**, Merged images of NF 220-IR and Hu-IR structures (scale bar, 100 μ m; $n = 6$).

Table 1. Neuropathological characteristics of pig colonic myenteric plexus obtained from endoscopic full-thickness biopsy (eFTB).

Parameters	Pig 1	Pig 2	Pig 3	Pig 4	Pig 5	Pig 6	Mean (SD)
Whole mount area (cm ²)	0.46	0.77	1.21	0.22	0.68	1.51	0.81 (0.48)
Neurons/eFTB	604	1209	2180	348	1817	3212	1562 (1066)
Ganglia/eFTB	12	13	16	6	17	19	14 (5)
Neurons/ganglia	23	51	42	32	50	43	40 (11)
Neuronal density (/cm ²)	1313	1570	1802	1582	2672	2127	1844 (489)
Ganglia density (/cm ²)	26	17	13	27	25	13	20 (7)

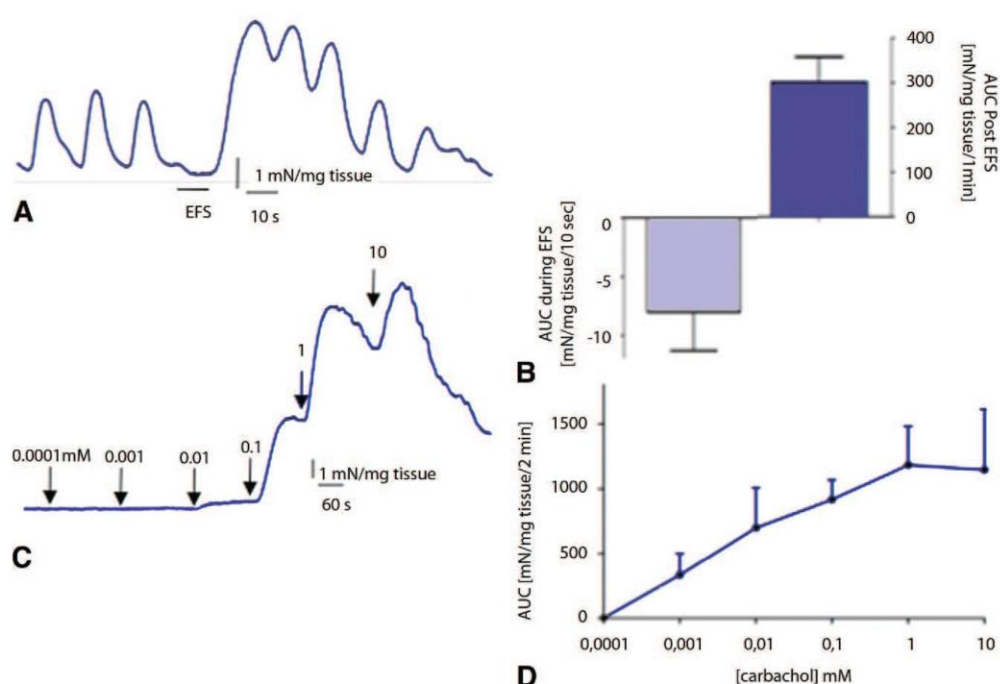


Figure 3. Measure of contractile activity in isolated segments of colon obtained from endoscopic full-thickness biopsy (eFTB). **A**, Typical recording showing muscular relaxation during electrical field stimulation (EFS) followed by a contractile off response. **B**, Quantitative assessment of muscular response during EFS stimulation (10 sec) and for 1 minute after stimulation reported by area under the curve (AUC). **C**, Typical recording of carbachol dose-response stimulation of contraction in circular muscle strip. **D**, Quantitative assessment of muscular response following carbachol administration, measured for 2 minutes after stimulation showed by AUC (n = 3).

tional studies such as evaluation of neuromuscular transmission to be performed. However, closure of the EMR-induced perforation was achieved successfully in 3 of 6 cases (ancillary study).

An important aspect of this study is the ability to obtain specimens of sufficient size to allow a precise neuropathological characterization of the myenteric plexus in the distal colon. In particular, the size of the

muscularis (2.1 cm²), before microdissection, is similar to that recommended by the London classification (2.3 cm²).²

Second, our study demonstrates that the microdissection of a single eFTB specimen allows whole mounts of myenteric plexus to be obtained. This step is necessary to perform a comprehensive and quantitative study of the phenotype of the myenteric plexus. The neuronal density or number of

neurons per ganglia appears high, although no previous report analyzed these parameters in the pig colon. Our results also support the feasibility of performing precise neurochemical coding of a single eFTB specimen. Indeed, because a large number of neurons are available per whole mount (ie, 1500), dividing them into pieces would allow multiple staining of various neuronal or glial mediators of interest. Third, our study also shows the possibility of characterizing both neuromuscular transmission and pharmacological studies on muscle strips obtained by eFTB. Indeed, we showed in the circular muscle of the pig colon that EFS induced a relaxation followed by a rebound contraction and carbachol induced a dose-response contraction. In addition, studying both neuromuscular transmission and circular and/or longitudinal muscle response to various agonists might help to better differentiate between neurons and muscular lesions, in particular in GINMDs.

An important limitation to this study was the lack of sufficient safety data, although this was not a primary endpoint. Indeed, we reported a successful closure rate of 50%, which could be a major concern for the safety of an eFTB procedure. These results were obtained in a small number of experiments without taking into account the learning curve for placing OTSCs. However, von Renteln et al⁶ reported a similar closure rate with OTSCs after full-thickness resection. Nevertheless, in a second group of animals, the authors improved their results to a closure rate of 100% by combining an endoloop with the OTSC to approximate the margins before the resection. These results might suggest better safety with a no-hole prophylactic approach, as previously used by Rajan et al.⁹ However, recent studies assessing the closure of natural orifice transluminal endoscopic surgery access sites demonstrated similar efficacy and safety between surgical repair and endoscopic novel clipping or suturing devices.¹²⁻¹⁵ With further studies identifying the ancillary steps for the safest endoscopic procedure, eFTB could be easily used in humans in well-defined clinical research settings.¹⁹

In conclusion, our study highlights the diversity of functional and morphological analysis that can be performed with eFTB specimens obtained in the pig colon. The combination of these approaches could be used to answer major unmet needs concerning the development of novel diagnostic and therapeutic targets for GINMDs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Prof. J.P. Galmiche for his helpful criticisms and review of the manuscript and are grateful to Prof. Gilles Blanche, David Minault, and Jeremy Hervouet from the large animal facility at the Institute of Transplantation-Urology-Nephrology (ITUN)/Inserm U643.

REFERENCES

- Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, et al. Gastrointestinal neuromuscular pathology: guidelines for histological techniques and reporting on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Acta Neuropathol* 2009;118:271-301.
- Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, et al. The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Gut* 2010;59:882-7.
- Di Nardo G, Blandizzi C, Volta U, et al. Review article: molecular, pathological and therapeutic features of human enteric neuropathies. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28:25-42.
- Knowles CH, Veress B, Tornblom H, et al. Safety and diagnostic yield of laparoscopically assisted full-thickness bowel biopsy. *Neurogastroenterol Motil* 2008;20:774-9.
- Fraser H, Neshev E, Storr M, et al. A novel method of full-thickness gastric biopsy via a percutaneous, endoscopically assisted transenteric approach. *Gastrointest Endosc* 2010;71:813-4.
- Von Renteln D, Schmidt A, Vassiliou MC, et al. Endoscopic full-thickness resection and defect closure in the colon. *Gastrointest Endosc* 2010;71:1267-73.
- Von Renteln D, Schmidt A, Riecken B, et al. Gastric full-thickness suturing during EMR and for treatment of gastric-wall defects (with video). *Gastrointest Endosc* 2008;67:738-44.
- Agrawal D, Chak A, Champagne BJ, et al. Endoscopic mucosal resection with full-thickness closure for difficult polyps: a prospective clinical trial. *Gastrointest Endosc* 2010;71:1082-8.
- Rajan E, Gostout CJ, Lurken MS, et al. Endoscopic "no hole" full-thickness biopsy of the stomach to detect myenteric ganglia. *Gastrointest Endosc* 2008;68:301-7.
- Magdeburg R, Collet P, Post S, et al. Endoclippping of iatrogenic colonic perforation to avoid surgery. *Surg Endosc* 2008;22:1500-4.
- Yang DH, Byeon JS, Lee KH, et al. Is endoscopic closure with clips effective for both diagnostic and therapeutic colonoscopy-associated bowel perforation? *Surg Endosc* 2010;24:1177-85.
- von Renteln D, Rudolph HU, Schmidt A, et al. Endoscopic closure of duodenal perforations by using an over-the-scope clip: a randomized, controlled porcine study. *Gastrointest Endosc* 2010;71:131-8.
- von Renteln D, Schmidt A, Vassiliou MC, et al. Natural orifice transluminal endoscopic surgery gastrotomy closure with an over-the-scope clip: a randomized, controlled porcine study (with videos). *Gastrointest Endosc* 2009;70:732-9.
- Moran EA, Gostout CJ, McConico AL, et al. Natural orifice transluminal endoscopic surgery used for perforated viscus repair is feasible using lower peritoneal pressures than laparoscopy in a porcine model. *J Am Coll Surg* 2010;210:474-9.
- Park PO, Bergström M, Rothstein R, et al. Endoscopic sutured closure of a gastric natural orifice transluminal endoscopic surgery access gastrotomy compared with open surgical closure in a porcine model. A randomized, multicenter controlled trial. *Endoscopy* 2010;42:311-7.
- Soehendra N, Seewald S, Groth S, et al. Use of modified multiband ligator facilitates circumferential EMR in Barrett's esophagus (with video). *Gastrointest Endosc* 2006;63:847-52.
- Lin Z, Gao N, Hu HZ, et al. Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 2002;14:197-204.
- Bruley des Varannes S, Chevalier J, Pimont S, et al. Serum from achalasia patients alters neurochemical coding in the myenteric plexus and nitric oxide mediated motor response in normal human fundus. *Gut* 2006;55:319-26.
- Leung FW. Double-EMR-derived full-thickness biopsy and functional GI disorders. *Gastrointest Endosc* 2008;67:304-6.

Annexe 3 : “Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum : results from a porcine model.”

Neurogastroenterology & Motility

Neurogastroenterol Motil (2012) 24, 267–e110

doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01839.x

Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum: results from a porcine model

G. MEURETTE*,†,‡, C. BLANCHARD*,†,‡, E. DUCHALAIS-DASSONNEVILLE*,†,‡, S. COQUENLORGE*,†,‡, P. AUBERT*,†,‡, M. WONG*,†,‡, P.-A. LEHUR*,†,‡ & M. NEUNLIST*,†,‡

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U913, Nantes, France

†Université de Nantes- Faculté des Sciences et Techniques, Nantes, France

‡Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Clinique de chirurgie digestive, CHU Nantes, France

Abstract

Background The mechanism of action of sacral nerve stimulation (SNS) remains largely elusive. The aims of this study were to develop a clinically relevant animal model for percutaneous SNS and to describe its effect on the epithelial barrier of the rectum. **Methods** Under general anesthesia and after percutaneous electrode placement for S3 nerve root stimulation, six pigs underwent unilateral stimulation and six bilateral stimulation. Animals were stimulated for 3 h using an external pulse generator (1–2.5 V; 14 Hz; 210 µs). Six animals underwent electrode implantation without stimulation and served as controls. Full-thickness rectal biopsies were performed prior to and after stimulation. Paracellular permeability was evaluated by measuring sulfonic acid flux across the rectal mucosa in Ussing chambers. Histological assessment of mucosal thickness, epithelial desquamation, and mucus expression were performed. **Key Results** Percutaneous stimulation resulted in successful anal contractions whose amplitude and uniformity was enhanced following bilateral compared with unilateral stimulation. In controls, paracellular permeability significantly increased during the stimulation period whereas it remained unchanged following unilateral stimulation. In contrast, permeability was significantly reduced by bilateral stimulation. This effect was associated with a concomitant reduction in mucosal thickness and a trend toward increased amount of mucus on surface epithelium compared with controls. **Conclusions** &

Inferences The development of a porcine model of percutaneous SNS revealed the ability of neuromodulation to reinforce rectal epithelial barrier. Furthermore, our results suggest that SNS could be used for treatment of gastrointestinal pathologies with reduced rectal mucosal barrier functions

Keywords animal model, barrier function, sacral nerve stimulation.

Abbreviations: ENS, enteric nervous system; IEB, intestinal epithelial barrier; SNS, sacral nerve stimulation.

INTRODUCTION

Sacral nerve stimulation (SNS) has been shown to be effective in the treatment of severe fecal incontinence resulting in a significant improvement in continence and quality of life of affected individuals.^{1–3} Despite being one of the most significant developments in the management of fecal incontinence over the past decade, the precise mechanisms of action remains elusive and a matter of debate.^{4,5} Postulates include a direct increase in sphincter tone, modulatory effects on rectal and colonic motility, and central nervous system adaptation.⁶

Among other gut functions putatively targeted by SNS are the intestinal epithelial barrier (IEB) functions. In fact, recent studies have shown that electrical stimulation of the vagal nerve enhances IEB resistance and reduce paracellular permeability during gut insults.^{7,8} Interestingly, evidences suggest that SNS stimulates not only sympathetic but also presacral parasympathetic plexus.⁶ In addition, neuromediators such as acetylcholine or vasoactive intestinal peptide (VIP) have been shown to increase and decrease paracellular permeability, respectively.^{9,10} Furthermore, IEB lesions characterized by increased paracellular permeability have been identified in several gastrointestinal diseases

Address for Correspondence

Guillaume Meurette, Inserm U913- Clinique de chirurgie digestive et endocrine, CHU Nantes, France.
Tel: +33240083022; fax: +33240083036;
e-mail: guillaume.meurette@chu-nantes.fr

Received: 5 October 2011

Accepted for Publication: 6 November 2011

associated with motility dysfunctions, such as Irritable Bowel Syndrome (IBS).¹¹ In this context, reducing paracellular permeability reduces visceral hypersensitivity in animal model of IBS¹² and even prevents the development of intestinal inflammation in IL10^{-/-} mice.¹³ However, it remains currently unknown as to whether SNS can also modulate IEB functions, and in particular paracellular permeability, offering another potential explanation for its mechanism of action.⁶

Unraveling the precise mechanisms of action of SNS and the identification of novel therapeutic targets have been somewhat hampered over the years by the lack of feasible animal models on which to conduct relevant translational human trials. Animal models of SNS performed in rats, dog, and rabbits have identified possible mechanisms by which SNS affect gut motility, but the results have been conflicting at best, probably the result of interspecies differences and difficulties in assessing treatment outcomes, particularly with anal manometry.¹⁴ An alternative animal model that could be used to address the current shortfalls in existing animal models, both from a physiological and therapeutic standpoint, is the pig. Indeed, the porcine anatomy is more closely related to that of humans and thus more relevant than smaller animals models¹⁵ allowing more similar treatment parameters and protocols to be adapted for use in humans. In addition, pigs have also recently been used to better characterize the impact of SNS on voiding dysfunction. These studies have demonstrated a superior efficacy of bilateral stimulation compared with unilateral stimulation on bladder function.¹⁶ At present, however, all animal models for SNS have involved an invasive laminectomy for the placement of electrodes, which fails to replicate the percutaneous approach used in humans, which in itself could affect the true efficacy and interpretation of results gleaned from such trials as a result of the added morbidity of the laminectomy.

Therefore, the aims of our study was thus to firstly evaluate the feasibility of the percutaneous approach for SNS in a porcine model and to subsequently determine the effects of SNS upon epithelial barrier functions in the rectum.

MATERIAL AND METHODS

Porcine model for percutaneous SNS

A total of twenty pigs (weighing between 30 and 40 kgs) were used in this study. All pigs were 6 months old and had achieved sexual and brain maturity.¹⁷ Experiments were performed in a dedicated surgical facility of the Research Laboratory, LGA (Laboratoire des grands animaux, INSERM U 643), in accordance with French Veterinary Regulations and Ethics Committee standards (Agrée-

ment: E.44010). All procedures were performed under general anesthesia, with animals in the right lateral position, with induction by Isoflurane 5% and nitrous-oxide 60% and thereafter maintained on Isoflurane 2%. The SNS started at least after a mean 30 min of steady state anesthesia to minimize the influence of drugs of the induction phase on the central of peripheral nervous system.

After cleaning with an iodine-based solution and draping, percutaneous placement of electrodes was performed using the conventional peripheral nerve evaluation test kits for humans (Medtronic™ number 041828-004; Medtronic inc. Minneapolis USA) and using surface landmarks predefined in preliminary experiments (Fig. 1A,B). Further confirmation of the accurate electrode placement was obtained with a laminectomy performed in the two first stimulated animals (Fig. 1C,D).

Twelve animals underwent percutaneous S3 stimulation, with six of them undergoing unilateral stimulation and the other six undergoing bilateral stimulation. The control group (sham stimulated) comprised six animals submitted to percutaneous puncture at the same landmarks without stimulation. Electrode placement and stimulation was deemed satisfactory when contractions of the anal sphincter were observed. Stimulation duration was set at 3 h and stimulation intensity was set at the minimum level required to obtain anal contraction (1–2.5 V; 14 Hz, 210 μ s) using an external pulse generator (Medtronic™ Model 3625 Screener).

For each pig, two full-thickness rectal biopsies 3 cm above the dentate line were performed via a transanal approach before and after SNS. The rectal biopsy sites were primarily sutured for hemostasis. At the end of SNS procedure, the animals were sacrificed by intravenous injection of pentobarbital.

Ex-vivo assessment of rectal paracellular permeability

Each biopsy was placed in ice cold Krebs solution ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.187 g L⁻¹, NaCl 6.84 g L⁻¹, KCl 0.35 g L⁻¹, NaHCO_3 2.10 g L⁻¹, Glucose 1.98 g L⁻¹, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.368 g L⁻¹, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.244 g L⁻¹) and sent to the laboratory for immediate processing and analysis. Each specimen was micro-dissected to separate the mucosa from the submucosa (in the plane of the submucosal blood vessels).

Specimens of rectal mucosa were then mounted in dedicated Ussing chambers (Transcellab, TBC, Paris, France) exposing a mean surface of 0.0314 cm². Specimens were bathed on each side in 1.5 mL of Ham's Nutrient Mixture (HAM/F12, Invitrogen, France). The media was continuously oxygenated and maintained at 37 °C by a gas flow of 95% O₂ and 5% CO₂. After an equilibration period of 30 min, 150 μ L of apical medium was replaced by 150 μ L of fluorescein-5.6 sulfonic acid (1 mg mL⁻¹, 400 D, Invitrogen, France). The fluorescence level of basolateral aliquots of 150 μ L was measured at 30 min intervals over a period of 180 min using a fluorimeter (Varioskan, Thermo SA, France). Paracellular permeability was determined by averaging the gradient of change in fluorescence intensity over time using a linear regression fit model measured in the specimens (GraphPad Prism 5, La Jolla, USA).

Histological evaluation of the impact of SNS upon rectal mucosa

Following microdissection, specimens of mucosa were fixed in paraformaldehyde (4% in PBS). After tissue washing in PBS, they were dehydrated and embedded in paraffin. Sequential sections of mucosa (5 μ m) were made. Bilateral stimulated and control tissues were analyzed by classical microscopy following haemat-

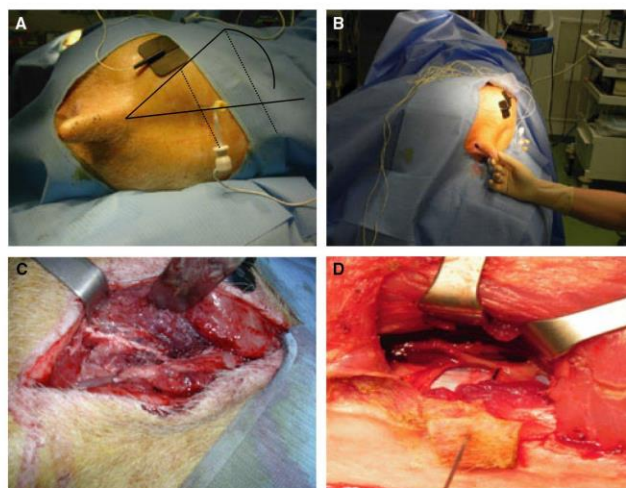


Figure 1 Electrode placement landmarks. (A) Percutaneous placement of electrode for unilateral SNS using defined landmarks. (B) Percutaneous placement of electrodes for bilateral SNS. (C) Following laminectomy and dissection, S3 root is approximately 2 mm in diameter and clearly isolated. (D) Dissection after SNS revealed the close proximity between the electrode and the S3 nerve root.

oxylin-eosin staining. Each section was observed under an Olympus IX 50 microscope (Olympus Inc., Center Valley, PA, USA). Pictures were acquired using a digital camera DP71 (Olympus), connected to a computer through a frame grabber card (Cell B software, Olympus). Three parameters were analyzed to describe the morphology of the mucosa, as previously reported¹⁸: (i) mucosal thickness was determined by measuring the distance between the surface epithelium and the underlying muscularis mucosae, (ii) the height of the surface epithelium and (iii) assessment of the surface epithelium continuity (% of continuous epithelium along the mucosal surface). The mean values were therefore computed on a total of 10 fields (three values per field) examined per experiment and per condition. Investigators were blinded for histological observations.

Assessment of the impact of SNS upon mucus expression in the mucosa

Sections of mucosa (5 μ m) of bilateral stimulated and control tissues were analyzed using classical microscopy following alcian blue staining. Evaluation of mucus expression on the surface epithelium and in the crypts was determined using a semi-quantitative standardized score defined as follows:

- 0 No mucus on the field
- 1 Small amount of mucus (<25% of the surface epithelium)
- 2 Average amount of mucus (25–75% of the surface epithelium)
- 3 Large amount of mucus (>75% of the surface epithelium)

Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. Statistical analysis was performed using Prism (GraphPad Prism 5, La Jolla, CA, USA). To determine differences between two groups or between multiple groups, Wilcoxon test or Kruskal-Wallis followed by Dunn's tests were used, respectively. Linear regres-

Table 1 Clinical parameters monitored during the experiments

	Temperature		Heart rate		Oxygen saturation	
	Start	End	Start	End	Start	End
Mean $\pm$ SD	37.1 $\pm$ 0.5	35.6 $\pm$ 1.2*	88 $\pm$ 8	107 $\pm$ 42	95 $\pm$ 2	95 $\pm$ 2

* $P < 0.05$ compared with the start of stimulation.

sion analysis was also performed. A P -value < 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Percutaneous SNS in a porcine model

All 12 pigs undergoing stimulation had successful contractions of the anal sphincter. Clinical parameters (body core temperature, heart rate, and blood pressure) were monitored throughout the experiments in each group (Table 1). No significant variation was observed in heart rate and blood pressure either within or between the treatment groups. However, body temperature decreased significantly during the course of the experiments, but not differently between the three groups.

The anatomical landmarks of electrode position were measured in eight animals at the end of the

procedure. The electrodes were positioned at an average of 12.0 ± 2.5 cm ($n = 8$) from the anal margin and 1 cm lateral to the vertebral midline, up to an average depth of 3.9 ± 0.2 cm ($n = 8$).

Unilateral stimulation resulted in ipsilateral spastic contractions of the anus, whereas bilateral stimulation not only enhanced contraction amplitude, but also produced a more uniform contraction of the entire anal sphincter complex (Video S1). These contractions remained sustained during the whole stimulation procedure.

Effect of SNS upon rectal paracellular permeability

Paracellular permeability at the beginning of the experiment was similar in all three groups ($P = 0.31$; $n = 18$). In controls (sham stimulated), paracellular permeability increased by 24% ($P = 0.03$; $n = 6$) between the beginning and the end of the experimental procedure (Fig. 2A). During unilateral SNS, paracellular permeability remained unchanged ($P = 0.84$; $n = 6$) (Fig. 2B). In contrast, paracellular permeability was significantly reduced by 20% following bilateral stimulation ($P = 0.03$; $n = 6$) (Fig. 2C). Furthermore, compared with controls, changes in paracellular permeability induced during the course of SNS were

significantly reduced following bilateral, but not unilateral SNS (Fig. 2D).

Effects of SNS upon mucosal histology

We next focussed the study on bilateral SNS and controls, as it had more significant effects upon rectal barrier permeability than unilateral SNS. In controls, rectal mucosa thickness did not change between the beginning and the end of the procedure (93 ± 34 vs 87 ± 21 μm , respectively; $P = 0.31$) (Fig. 3A,C). In contrast, mucosa thickness was significantly reduced between the beginning and the end of bilateral stimulation (101 ± 30 vs 75 ± 9 μm , respectively; $P = 0.03$) (Fig. 3B,D). Concerning the surface epithelium continuity and height, no significant difference was observed between the control and the SNS group (data not shown).

Effects of SNS upon epithelial mucus distribution

Concerning bilateral SNS, the score reflecting the amount of mucus at the surface of the epithelium was increased at the end of the stimulation procedure compared with the beginning (0.30 ± 0.21 vs 0.15 ± 0.09 , respectively; $P = 0.06$; Fig. 4B,D). In contrast, in controls the mucus scores remained

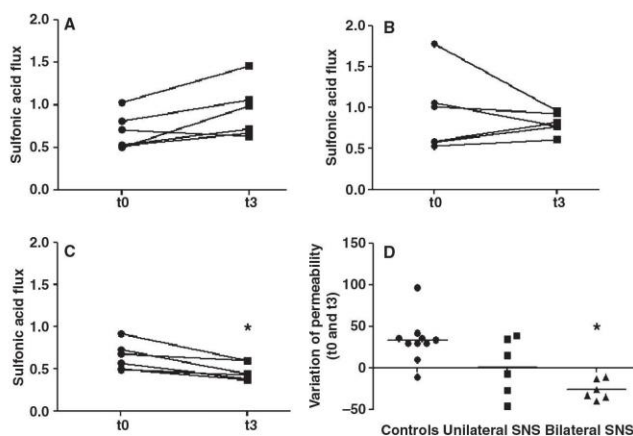


Figure 2 Impact of sacral nerve stimulation (SNS) on paracellular permeability. (A) In controls (sham stimulated) paracellular permeability increased significantly between the beginning (t0) and the end of the procedure (t3). (B) During unilateral SNS, no significant change in paracellular permeability occurred. (C) Following bilateral SNS, paracellular permeability decreased significantly. Individual values represent the mean obtained from two segments per animal and per condition. * $P < 0.05$ Wilcoxon test. (D) Impact of SNS upon the changes in paracellular permeability induced during the course of the experiments. Changes in paracellular permeability were significantly different between control and bilateral SNS * $P < 0.05$ Kruskal–Wallis followed by Dunn's test.

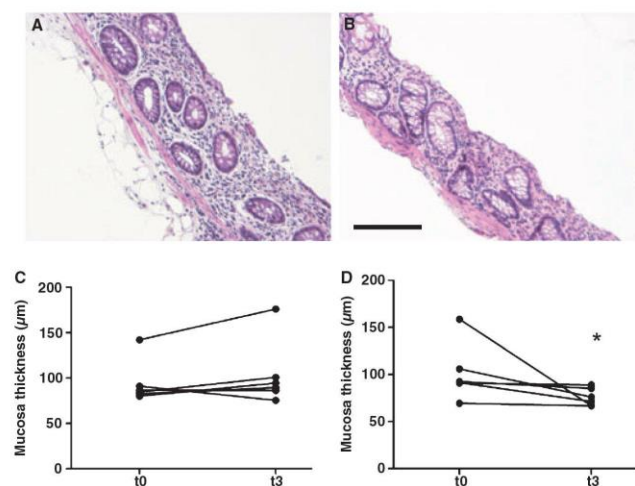


Figure 3 Impact of sacral nerve stimulation (SNS) on mucosal histology. Sections of mucosa from control (A) and bilateral SNS (B) stimulated pigs were stained with hematoxylin eosin and observed under a microscope. Mucosal thickness in the bilateral stimulated group (D) was significantly reduced at the end of the 3 h stimulation period (t3) compared with the beginning (t0). In contrast, no change in mucosal thickness was observed in the control group (C). Individual data represent the mean of three measures per field and 10 fields per animal and condition. * $P < 0.05$ Wilcoxon test. Scale bar: 20 μm .

unchanged after 3 h (0.10 ± 0.08 vs 0.09 ± 0.06 , respectively; $P = 0.47$; Fig. 4A,C). No difference was measured in the mucus score of the crypts in both groups (Fig. 4E,F). However, interestingly, in stimulated pigs, the surface epithelium mucus score and the crypt mucus score were positively and linearly correlated ($r^2 = 0.88$ and $P = 0.03$).

DISCUSSION

In this study, we have first demonstrated the feasibility of a porcine model for percutaneous SNS, avoiding the morbidity of a laminectomy-based approach, providing therefore a suitable large animal model for SNS research. Secondly, to the best of our knowledge, this is also the first study showing that sustained SNS induces a significant reduction in mucosal paracellular permeability of the rectum, together with a concomitant reduction in mucosal thickness and increased surface mucus secretion.

A first result of this pilot study was the observation that bilateral SNS significantly reduced paracellular permeability of the rectal mucosa. Although unilateral did not decrease paracellular permeability, it prevented the increase in paracellular permeability observed in sham animals. These results performed on small-sized groups need to be confirmed in the future on larger

animal samples. Previous studies have shown that vagal stimulation can enhance IEB resistance and reduce paracellular permeability in the small intestine.^{7,8} The effects of vagal stimulation could be ultimately mediated by enteric neurons and/or glial cells, as vagal stimulation increases enteric neuronal activity.^{19,20} Consistently, direct electrostimulation of the human enteric nervous system has also been shown to reduce paracellular permeability of intestinal epithelial monolayers.¹⁰ Our results obtained with SNS extend these findings to regions of the digestive system that are not under direct vagal control (i.e. distal colon and rectum). The SNS could exert its effects upon the rectal barrier through stimulation of parasympathetic presacral plexus, which has been shown to be activated during SNS stimulation.⁶ However, to date, the mediators responsible for the barrier reinforcing effects of SNS remain to be identified. Among putative candidates, vasoactive intestinal peptide or S-Nitrosoglutathione have been identified as enteric neuro-glial mediators enhancing barrier functions.^{21,22} Interestingly, these mediators can reduce paracellular permeability over short-term periods similar to the duration of SNS used in our study. The ability of bilateral SNS, but not unilateral SNS to reduce paracellular permeability could be due to the increased release of mediators by bilateral SNS com-

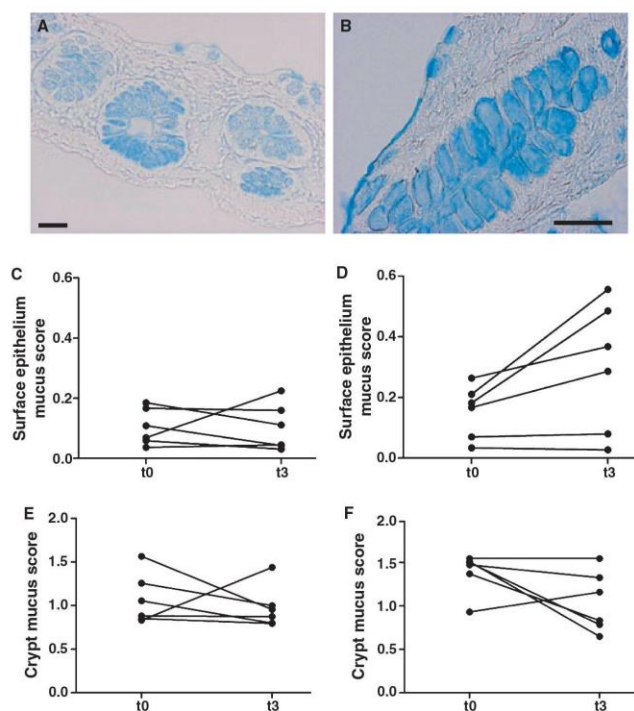


Figure 4 Effects of sacral nerve stimulation (SNS) upon epithelial mucus distribution. Sections of mucosa from control (A) and bilateral SNS (B) stimulated pigs were stained with alcian blue and observed under a microscope. In controls, the score reflecting the amount of mucus at the surface of the epithelium remained unchanged after 3 h (C). In the bilateral SNS group, the mucus score was increased at the end of the stimulation procedure compared with the beginning ($P = 0.06$; Wilcoxon test) (D). No difference in mucus score was measured in the crypts of the control (E) and the bilateral SNS group (F). Scale bars: 10 μm .

pared with unilateral one. Interestingly, improved results of bilateral SNS compared with unilateral stimulation have been reported in the management of voiding dysfunction,¹⁶ but also in the treatment of fecal incontinence.²³

We have further demonstrated that SNS increased epithelial surface mucus amount. This could be due to an increase in mucus secretion induced by SNS. Indeed, previous studies have shown that neuromediators or activation of the ENS can induce mucus secretion.^{24,25} Consistently, this increase in surface epithelium mucus amount was correlated with the amount of mucus observed in the crypts, suggesting a secretory process. Altogether, increased mucus amount on surface epithelium could, besides reduced paracellular permeability, also enhance barrier protection by SNS.

The exact mechanism of action of SNS in treating fecal incontinence remains still largely unknown.⁶ Apart from a direct effect on sphincter tone, SNS has been shown to modify colonic motility,^{26,27} probably via the activation of central and peripheral nervous pathways.^{28,29} Our findings offer new insights into the possible mechanism of action, in which SNS reinforces the rectal mucosa barrier. In particular, the effects of SNS upon mucosal barrier functions could be involved in the success of SNS reported in patients with IBS, chronic constipation and chronic pelvic pain.^{29–32} In addition, recent reports highlight the need for a critical appraisal of the criteria for selecting patients for SNS.^{4,5} In this context, our findings set the basis for evaluating the effects of SNS upon paracellular permeability in patients treated for fecal incontinence. If correlated to improvement of anorectal functions, these

changes in paracellular permeability induced by SNS could be used as future new marker of response to SNS. Therefore, such a parameter could improve the early selection of responding patients during the peripheral nerve evaluation phase and the subsequent definitive pacemaker implantation. Provided reinforcement of the rectal barrier by SNS is confirmed in humans, its potential benefits in gastrointestinal pathologies with impaired mucosal barrier should be evaluated.

In conclusion, this study describes the first porcine model for percutaneous SNS that best replicates the technique routinely employed in humans for the treatment of severe fecal incontinence. We further demonstrate that SNS can reduce paracellular permeability of the rectal mucosa. These findings offer new

insights into the mechanisms of action of SNS on anorectal functions. Furthermore, SNS could offer new therapeutical perspectives for treatment of gastrointestinal pathologies with reduced mucosal barrier functions

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank David Minault, Jeremy Hervouet, and Pr Gilles Blanco for their expertise and help during the experiments. The authors also thank Julien Chevalier and Maxime Mahe for their technical assistance. The present study received supports by grants from 'La Fondation Benoit Malassagne' and 'La Fondation de l'Avenir' attributed to CB. Devices required for the experiments (pulse generator and PNE test-kit) were provided by Medtronic Inc.

REFERENCES

- Jarrett ME, Mowatt G, Glazener CM *et al.* Systematic review of sacral nerve stimulation for faecal incontinence and constipation. *Br J Surg* 2004; **91**: 1559–69.
- Matzel KE, Stadelmaier U, Hohenfellner M *et al.* Electrical stimulation of sacral spinal nerves for treatment of faecal incontinence. *Lancet* 1995; **346**: 1124–7.
- Leroi AM, Parc Y, Lehur PA *et al.* Efficacy of sacral nerve stimulation for fecal incontinence: results of a multicenter double-blind crossover study. *Ann Surg* 2005; **242**: 662–9.
- Maeda Y, Laurberg S. Sacral nerve stimulation: time for critical appraisal. *Ann Surg* 2011; **254**: 174–5.
- Wexner SD. Sacral nerve stimulation: time for critical appraisal. *Ann Surg* 2011; **254**: 175–6.
- Gourcerol G, Vitton V, Leroi A *et al.* How sacral nerve stimulation works in patients with faecal incontinence. *Colorectal Dis* 2011; **13**: e203–11.
- Ghia JE, Blennerhassett P, Kumar-Ondiveeran H *et al.* The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* 2006; **131**: 1122–30.
- Costantini TW, Bansal V, Krzyzaniak M *et al.* Vagal nerve stimulation protects against burn-induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; **299**: G1308–18.
- De Quelen F, Chevalier J, Rolli-Derinderen M *et al.* n-3 polyunsaturated fatty acids in the maternal diet modify the postnatal development of nervous regulation of intestinal permeability in piglets. *J Physiol* 2011; **589**: 4341–52.
- 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.
- Piche T, Barbara G, Aubert P *et al.* Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 2009; **58**: 196–201.
- Ait-Belgnaoui A, Bradesi S, Fioramonti J, Theodoram V, Bueno L. Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase. *Pain* 2005; **115**: 141–7.
- Arrieta MC, Madsen K, Doyle J, Meddings J. Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene deficient mouse. *Gut* 2009; **58**: 41–8.
- Ridolfi TJ, Tong WD, Takahashi T *et al.* Sympathetic and parasympathetic regulation of rectal motility in rats. *J Gastrointest Surg* 2009; **13**: 2027–33.
- Andersen IS, Rijkhoff NJ, Vukovic A *et al.* Anorectal motility responses to selective stimulation of the ventral sacral nerve roots in an experimental model. *Br J Surg* 2005; **92**: 1513–9.
- Kaufmann S, Naumann CM, Hamann MF *et al.* Unilateral vs bilateral sacral neuromodulation in pigs with formalin-induced detrusor hyperactivity. *BJU Int* 2009; **103**: 260–3.
- Lind NM, Moustgaard A, Jelsing J *et al.* The use of pigs in neuroscience: modeling brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2007; **31**: 728–51.
- Flamant M, Aubert P, Rolli-Dekindere M *et al.* Enteric glia protect against *Shigella Flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut* 2011; **60**: 473–84.
- Berthoud HR, Lynn PA, Blackshaw LA. Vagal and spinal mechanosensors in the rat stomach and colon have multiple receptive fields. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; **280**: R1371–81.
- Schemmann M, Grundy D. Electrophysiological identification of vagally innervated enteric neurons in guinea pig stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1992; **263**: G709–18.
- Nylander O, Wilander E, Larson GM *et al.* Vasoactive intestinal polypeptide reduces hydrochloric acid-induced duodenal mucosal permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1993; **264**: G272–9.
- 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.
- Matzel K, Stadelmaier U, Bittorf B *et al.* Bilateral sacral spinal nerve stimulation for fecal incontinence after low anterior rectum resection. *Int J Colorectal Dis* 2002; **17**: 430–34.

- 24 Toumi F, Neunlist M, Casagnau E *et al.* Human submucosal neurones regulate intestinal cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol Motil* 2003; **15**: 239–42.
- 25 Plaisancie P, Barcelo A, Moro F *et al.* Effects of neurotransmitters, gut hormones, and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon. *Am J Physiol* 1998; **275**(5 pt 1): G1073–84.
- 26 Dinning PG, Fuentealba SE, Kennedy ML *et al.* Sacral nerve stimulation induces pan-colonic propagating pressure waves and increases defecation frequency in patients with slow-transit constipation. *Colorectal Dis* 2007; **9**: 123–32.
- 27 Keneflick NJ, Emmanuel A, Nicholls RJ *et al.* Effects of sacral nerve stimulation on autonomic nerve function. *Br J Surg* 2003; **90**: 1256–60.
- 28 Giani I, Novelli E, Martina S *et al.* The effect of sacral nerve modulation on cerebral evoked potential latency in fecal incontinence and constipation. *Ann Surg* 2011; **254**: 90–96.
- 29 Griffin KM, Pickering M, O'Herlihy C *et al.* Sacral nerve stimulation increases activation of the primary somatosensory cortex by anal canal stimulation in an experimental model. *Br J Surg* 2011; **98**: 1160–9.
- 30 Lundby L, Krogh K, Buntzen S *et al.* Temporary sacral nerve stimulation for the treatment of irritable bowel syndrome: a pilot study. *Dis Colon Rectum* 2008; **51**: 1074–8.
- 31 Kamm MA, Dudding TC, Melenhorst J *et al.* Sacral nerve stimulation for intractable constipation. *Gut* 2010; **59**: 333–40.
- 32 Maeda Y, Lundby L, Buntzen S *et al.* Suboptimal outcome following sacral nerve stimulation for faecal incontinence. *Br J Surg* 2011; **98**: 140–7.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

Video S1. Assessment of anal contraction during bilateral SNS in pig. Right and left S3 stimulation lead to right side (first arrow) and left side (second arrow) anal sphincter contraction respectively. Bilateral stimulation causes a full sphincter contraction.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author of the article.

Annexe 4 : “Probe-based confocal laser endomicroscopy : A new method for quantitative analysis of pit structure in healthy and Crohn’s disease patients.”

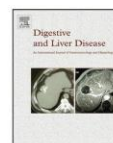
Digestive and Liver Disease 45 (2013) 487–492



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Digestive and Liver Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dld



Digestive Endoscopy

Probe-based confocal laser endomicroscopy: A new method for quantitative analysis of pit structure in healthy and Crohn's disease patients

Nicolas Musquer^{a,b,c}, Sabrina Coquenlorge^{b,c}, Arnaud Bourreille^{a,b,c}, Philippe Aubert^{b,c}, Tamara Matysiak-Budnik^{a,b,c}, Stanislas Bruley des Varannes^{a,b,c}, Gregory Lauwers^d, Michel Neunlist^{a,b,c}, Emmanuel Coron^{a,b,c,*}

^a Digestive Diseases Institute, Nantes University Hospital, F-44093, France

^b Nantes University Hospital, Nantes F-44093, France

^c INSERM, UMR913, Nantes F-44093, France

^d Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 October 2012

Accepted 6 January 2013

Available online 7 March 2013

Keywords:

Colonic crypt

Crohn's disease

Endomicroscopy

ABSTRACT

Background: Probe-based confocal laser endomicroscopy enables microscopic examination of the digestive mucosa.

Aims: (1) To identify and validate quantitative endomicroscopic criteria for evaluation of the colonic mucosa and (2) to compare these criteria between healthy and Crohn's disease patients in clinical remission.

Methods: Six healthy controls and ten Crohn's disease patients in clinical remission were included in this prospective study. Methylene blue-stained biopsies of the right colon and corresponding endomicroscopic images were analyzed. Major axis, minor axis, and major axis/minor axis ratio of crypt lumens were quantified.

Results: Quantitative assessment was performed on 21 ± 4 crypt lumens per patient. Major axis/minor axis ratio values measured with endomicroscopy or methylene blue-stained biopsies were linearly correlated ($r = 0.63$, $p = 0.01$). All macroscopically inflamed mucosa had values of major axis/minor axis ratio higher than the median of controls. Interestingly, 50% (3/6) of Crohn's disease patients with macroscopically normal mucosa had also a higher ratio than pooled controls. Histological analysis showed that 6/7 patients with major axis/minor axis ratio superior to 1.7 had microscopic inflammation.

Conclusion: Probe-based confocal laser endomicroscopy allows quantitative analysis of colonic pit structure. Endomicroscopic analysis of major axis/minor axis ratio allows the detection of microscopic residual inflammation with greater accuracy than standard endoscopy in Crohn's disease patients in clinical remission.

© 2013 Editrice Gastroenterologica Italiana S.r.l. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Various inflammatory gastrointestinal diseases are characterized by structural mucosal changes. These changes range from focal or diffuse crypt architectural irregularity to complete erosion or ulceration [1]. Interestingly, these changes are correlated with severity of disease, or can be predictive of disease evolution or response to treatment [2]. These observations fostered, at least in part, the development of new endoscopic tools aiming at increasing sensitivity to detect these changes.

Among key structural features used for diagnosis of colonic mucosal lesions is the pit pattern. Pit pattern is mainly a descriptive parameter reflecting the shape of the crypt lumen, and is currently the best validated endoscopic parameter to predict histology in mucosal neoplasia [3,4]. Pit pattern changes during neoplasia result in a more ellipsoidal shape of the crypt lumen, which is reflected by an increase in the ratio of the crypt major axis (Ma) by its minor axis (ma) as compared to healthy subjects.

Pit pattern detection is currently performed using chromoendoscopy. This method remains largely descriptive, although recent studies have shown that the quantification of pit pattern using computerized image analysis could (1) increase sensitivity of the classification and (2) reduce operator-dependent analysis [5,6]. Among methods that have been used to analyze pit pattern is probe based confocal laser endomicroscopy (pCLE). pCLE is an endoscopic imaging technique allowing examination of the digestive

* Corresponding author at: Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, 1, place Alexis Ricordeau, 44035 Nantes, France. Tel.: +33 0240087505/6.

E-mail addresses: emmanuel.coron@chu-nantes.fr, nicolas.musquer@chu-nantes.fr (E. Coron).

mucosa at a cellular and sub-cellular level with a magnification of about 1000-fold [7]. This method has been used successfully to describe various mucosal phenomena encompassing altered vascular permeability and crypt morphology, inflammatory infiltrates, epithelial gaps, or even the presence of single bacteria [8–10]. To date, few studies have performed quantitative analysis of these mucosal changes using pCLE. However, in a recent publication evaluating patients with ulcerative colitis (UC), the authors quantified crypt lumen density and showed that it correlated with the severity of inflammation [11]. Whether pCLE can be used to assess mucosal structural changes such as pit pattern in Crohn's disease (CD) remains unknown. In addition, the ability of pCLE to evaluate pit pattern using standard histological methods remains to be shown.

Therefore, the aims of this study were to (1) define and compare the pCLE analysis of pit pattern with standard histological analysis, and (2) apply this method to quantify the pit pattern in healthy patients and in CD patients in clinical remission.

2. Patients and methods

2.1. Patients

The study was approved by the local multidisciplinary review board. Full written informed consent was obtained from all study participants. Enrolled CD patients were in clinical remission, defined by a Crohn's Disease Activity Index (CDAI) < 150 at the time of enrollment, and referred for colonoscopy. Patients with no personal or family history of CD who were undergoing colonoscopy for screening or surveillance of polyps/cancer served as control group. Exclusion criteria were as follows: Unwillingness or inability to provide informed consent, patient age under 18 years old, history of allergy to fluorescein sodium, renal dysfunction, pregnancy or breast feeding, and insufficient colonic preparation hampering the endoscopic assessment. Between December 2009 and April 2010, 10 CD patients and 6 control patients were prospectively enrolled.

2.2. Endoscopic procedure

Twenty-four hours prior to the procedure, all patients underwent standard colonic preparation with 4L polyethylene glycol solution. All procedures were performed under general anaesthesia. The endoscopic appearance of the colonic mucosa was assessed meticulously during the withdrawal of a high-resolution endoscope (Fujinon EC530, Fujifilm Holdings Corporation, Tokyo, Japan). The endoscopic aspect was classified using the same criteria described from the Simplified Endoscopic Score of CD (SES-CD) put forth by Daperno et al. [12].

The pCLE procedure was performed by a single experienced endoscopist as follows: (1) the confocal miniprobe (ColoFlex UHD, Cellvizio, Mauna Kea Technologies, Paris, France) was positioned gently in the right colon onto a random mucosal area in controls and CD-ER patients (CD patients with endoscopic remission) or onto an inflamed mucosal area in CD-EI patients (CD patients with endoscopic inflammation) under endoscopic guidance. No cap was used for this procedure. Areas measured approximately 2 cm × 2 cm. Then (2) the optimal dose [13] of 5 mL of 10% fluorescein (Fluoresceine sodique 10%, Novartis Pharma, France), was injected intravenously, and (3) pCLE videos were recorded from the time of injection to 5 min post-injection for optimal analysis [14]. This protocol allowed post-procedure reviews and measurements from pCLE video clips (1 video clip per patient). After 5 min of recording, the confocal miniprobe was withdrawn, and biopsies for *ex vivo* analysis and routine histopathology were taken from the same area.

2.3. Quantitative analysis of *in vivo* obtained pCLE images

Following the procedure, all images from pCLE video clips were transferred to an external drive in .png format to preserve best quality. Each video clip was reviewed by one endoscopist (EC), and 15 still images of optimal quality per patients were selected at regular time-slots for further quantitative assessment. The dataset comprised 240 images from 16 patients, which were randomly assessed quantitatively by an independent investigator (NM) who measured Ma and ma of crypt lumens and the ratio (Ma/ma) that we defined as "pit pattern value". The quality of each image was also assessed using a score ranging from 0 to 4 (0 = no structure visible; 1 = poor; 2 = average; 3 = good; 4 = excellent) based on quality of visualization of crypts, crypts lumen, vascularization and lamina propria. 21 ± 4 crypt lumens were analyzed per patient from 15 images. The software used to obtain quantitative assessment was Image J (1.42q, National Institutes of Health, USA).

2.4. *Ex vivo* analysis of pit pattern on colonic biopsies

To ensure reproducibility of the results obtained from pCLE images, tissue architecture was also quantitatively assessed *ex vivo* on standard biopsies (one biopsy per patient) obtained at the site of pCLE imaging. These biopsies were specifically processed as follows: immediately following retrieval, the biopsies were gently stretched in a Petri dish under a binocular microscope and fixed in formalin. Then, they were stained with 1% methylene blue. The same investigator (NM), who was blinded to the pCLE measurements, quantitatively assessed on methylene blue stained biopsies (MBSB) the same parameters as described above (*i.e.*, Ma, ma, and Ma/ma ratio) with the same software (Image J).

2.5. Statistical analysis

Due to the limited sample size, we used non-parametric tests for all our statistical analysis. Comparisons of patient characteristics were made using Mann–Whitney and χ^2 tests. Comparisons between pCLE and MBSB measurements were made using Wilcoxon test. Correlation was tested using Spearman rank correlation test with linear regression. Analysis of pCLE measurements and quality of pCLE images were made using the Mann–Whitney test and the Kruskal–Wallis test followed by the Dunn test. We used a 95% confidence interval and considered a statistical significant difference to be $p < 0.05$. All statistical analysis was performed using Graphpad Prism 5.00 for Windows (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

3. Results

Six healthy patients and ten CD patients were included. The CD patients were stratified according to their SES-CD in the right colon, and, accordingly, 6 were in endoscopic remission (CD-ER), while 4 had endoscopically visible inflammation (CD-EI). The clinical, biological, and endoscopic characteristics of all the patients are summarized in Tables 1 and 2. Demographic characteristics were similar between controls and CD patients, except for age, which was significantly increased in control patients (Table 1). The median score assessing quality of pCLE images for all patients was good (3; $n = 16$). In addition, no difference in this score was noted between controls and CD patients (3 ± 1 versus 3 ± 1 , respectively, $p = 0.35$), and between the three subgroups (controls, CD-ER and CD-EI) ($p = 0.47$).

Table 1
Characteristics of patients.

	Controls (n=6)	Crohn's disease patients (n=10)	p
Age (year) ^a	61[43;79]	39[18;55]	<0.01
Gender - N (%)			
Male	3(50)	5(50)	
Female	3(50)	5(50)	1
Tobacco consumption (n)	0	2	0.50
C-reactive protein (mg/l) ^b	3.9[1.5;2.4]	2.6[1.7;5.4]	0.91

^a Values are expressed as median [range].^b Values are expressed as median [interquartiles].**Table 2**
Characteristics of Crohn's disease patients with or without endoscopic inflammation.

	CD-ER (n=6)	CD-EI (n=4)	p
Age (year) ^a	41[18;55]	30[20;39]	0.13
Gender N (%)			
Male	2 (33.3)	3 (75)	
Female	4 (66.7)	1 (25)	0.55
Tobacco consumption (n)	2	0	0.47
CDAI ^b	15[3;27]	50[32;72]	0.13
Duration of Crohn's disease (year) ^b	18.5[16.25;21.5]	15[11.25;20]	0.59
C-reactive protein (mg/l) ^b	1.9[1.5;2.4]	7.7[6.9;8.4]	0.17
SES-CD ^b (right colon)	0	3.5[2.75;4.25]	NC

Abbreviations: CD-ER: Crohn's Disease patients with Endoscopic Remission; CD-EI: Crohn's Disease patients with endoscopic inflammation; CDAI: Crohn's Disease Activity Index; SES-CD: Simplified Endoscopic activity Score for Crohn's disease.

^a Values are expressed as median [range].^b Values are expressed as median [interquartiles]/NC: non-calculated value.

3.1. Comparison between MBSB- and pCLE-based pit pattern measurements

For one patient, the biopsy dedicated to MBSB could not be analyzed therefore only 15 patients were included in this analysis. Comparison of *in vivo*-(pCLE) and *ex vivo*-(MBSB) obtained pooled values of this 15 patients (CD and controls) showed that Ma/ma values obtained with pCLE were larger than those obtained with MBSB ($p=0.002$; $n=15$) (Fig. 1D). However, Ma/ma values obtained with both methods were linearly correlated ($r=0.63$; $p=0.01$; $n=15$) (Fig. 1E).

3.2. Comparison of pCLE-based pit pattern measurements between healthy and CD patients

In control patients ($n=6$), Ma/ma ratio was overall significantly lower than in all CD patients ($n=10$) (medians: 1.62 versus 2.56; $p=0.016$). Furthermore, Ma/ma ratio in control patients was similar to those obtained in CD-ER, but significantly smaller than those obtained in CD-EI ($p<0.05$) (Fig. 2D). However, no significant difference was reported for Ma/ma values between CD-ER ($n=6$) and CD-EI ($n=4$) (medians: 2.16 versus 3.9, respectively).

3.3. Definition of healthy pit pattern cut-off value

Using the pool of control patients, we calculated the 95th percentile. According to this cut-off value (set at 1.7), none of the control patients, 3/6 (50%) of CD-ER, and 4/4 (100%) of CD-EI had an abnormal Ma/ma. While standard endoscopic examination showed that 4/10 (40%) of CD patients had macroscopically visible

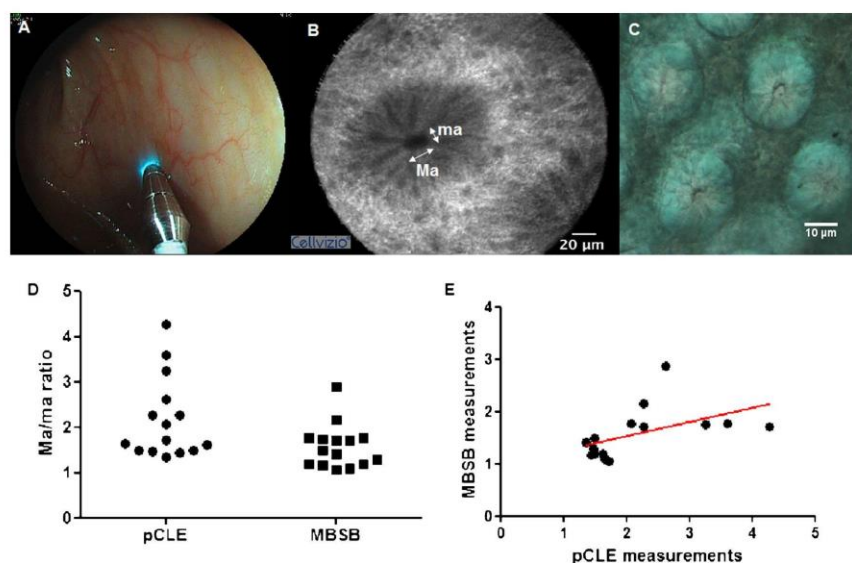


Fig. 1. Comparison and correlation between ratios of crypt lumen major axis over minor axis from endoscopic images and methylene blue stained biopsies. Endoscopic procedure showing (A) the macroscopic aspect of colonic mucosa by standard endoscopy and (B) the *in vivo* microscopic aspect with probe-based Confocal Laser Endomicroscopy. (C) Methylene blue stained biopsies after fixation allowed quantitative analysis of crypt lumen major axis over minor axis ratio. (White lines represent major and minor axis measurements.) (D) Major axis over minor axis ratios obtained from pCLE pictures were larger than the values obtained from methylene blue stained biopsies ($n=15$; Wilcoxon test; $p=0.002$). (E) However, values of ratios obtained by the two methods were linearly correlated ($n=15$; Spearman rank correlation test; $r=0.63$; $p=0.01$). Abbreviations: Ma: major axis; ma: minor axis; Ma/ma ratio: crypt lumen major axis over minor axis ratio; pCLE: probe-based Confocal Laser Endomicroscopy; MBSB: Methylene Blue Stained Biopsies.

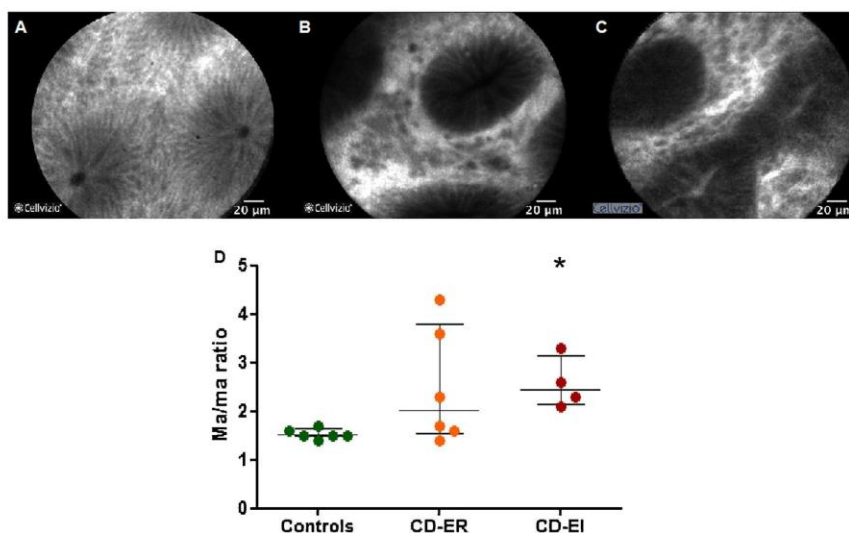


Fig. 2. Comparison of ratios of crypt lumen major axis over minor axis between the different groups. Endoscopic images of (A) control patients, (B) Crohn's disease patient with endoscopic remission, and (C) quiescent Crohn's disease patient with endoscopic inflammation. (D) The ratio of crypt lumen major axis over minor axis in control patients was significantly different from Crohn's disease patient with endoscopic remission but not from quiescent Crohn's disease patient with endoscopic inflammation (medians and interquartile/ $p < 0.05$ as compared to controls; Kruskal–Wallis followed by Dunn test). Abbreviations: Ma/ma ratio: crypt lumen major axis over minor axis ratio; CD-ER: Crohn's Disease patient with Endoscopic Remission; CD-EI: Crohn's Disease patient with endoscopic inflammation.

inflammation, pCLE Ma/ma cut-off value was larger than 1.7 in 7/10 (70%) of these patients.

Finally, we compared the values of Ma/ma obtained in each individual patient (control and CD) with the pooled individual Ma/ma values of all control patients (Table 3). For each individual control, the Ma/ma value was identical to that of all the pooled control patients. For CD-ER patients, 3/6 (50%) patients had a Ma/ma value different from that of the pooled control patients ($p < 0.05$), whereas all 4 CD-EI (100%) had a Ma/ma ratio significantly different from all controls.

Table 3
Comparison of ratios of crypt lumen major axis over minor axis of individual patients with the pool of 6 control patients.

	Patient	Ma/ma ratio (median)	p
Control patients	1	1.5	0.99
	2	1.7	0.32
	3	1.4	0.33
	4	1.5	0.29
	5	1.5	0.48
	6	1.6	0.90
CD-ER	7	1.6	0.90
	8	2.3	0.01
	9	1.4	0.16
	10	4.3	<0.01
	11	1.7	0.35
	12	3.6	<0.01
CD-EI	13	2.6	<0.01
	14	2.3	0.02
	15	2.1	0.03
	16	3.3	<0.01

Abbreviations: CD-ER: Crohn's Disease patients with Endoscopic Remission; CD-EI: Crohn's Disease patients with endoscopic inflammation; Ma/ma ratio: Crypt lumen major axis over minor axis ratio.

3.4. Comparison between Ma/ma ratio and standard histology

Among the nine patients with a normal Ma/ma ratio (all six controls and three CD-ER patients), no microscopic signs of inflammation on standard histology were found except for one CD-ER patient who present a moderate histological inflammation. Among the seven CD patients with abnormal Ma/ma ratio, six (all CD-EI patients and two CD-ER patients) had active mucosal inflammation proved by routine histopathology and one CD-ER patient had histologic evidence of scar tissue without active inflammation.

3.5. Safety

No severe adverse event was reported in our patients. Only one patient experienced a transient episode of bradycardia during endoscopic procedure which was immediately reversed by intravenous injection of atropin.

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study using a quantitative approach to characterize the pit pattern of the colonic mucosa by pCLE. Among the different morphological parameters that could be quantified, we focused on the evaluation of the Ma/ma ratio, corresponding to the pit pattern. This choice was justified by the fact that the pit pattern is a validated endoscopic criterion with good accuracy for detecting changes of the colonic architecture during precancerous stages [3]. The pCLE-based pit pattern values correlated well to the *ex vivo* quantitative analysis performed on MBSB, which mimicked the same “en face” view and level of magnification. However, although the correlation between pCLE and MBSB-based pit pattern values was good, the absolute values from pCLE study were higher than MBSB measurements.

This retraction might be artefactual, due to dehydration induced by para-formaldehyde fixation [15].

Applying this methodology to quantify the pit pattern in CD patients in clinical remission, we showed that a cut-off value was able to discriminate between control and CD patients. In contrast to UC, there is no study that has attempted to quantify morphological features of CD by confocal endomicroscopy using either pCLE or eCLE (endoscope-based Confocal Laser Endomicroscopy). However, one study used a quantitative evaluation of the pit pattern in colonic adenomas imaged with magnifying chromoendoscopy [5]. Notably, these authors found that a mean of Ma/ma of 1.6 was characteristic of normal colonic tissue, a value close to that obtained in our study.

The potential clinical relevance of this quantitative approach needs to be discussed. In accordance with previous studies, 4/10 (40%) of our CD patients in clinical remission according to the ECCO guidelines [1] at least had endoscopic inflammation using CDAI as the only marker for remission. However, there is poor correlation between CDAI and endoscopic scores of inflammation such as Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity (CDEIS) and SES-CD [16,17]. In addition, it is well established that patients in clinical remission showing endoscopic evidence of inflammation are at risk of relapse, not only after surgical resection [18] but also after immunosuppressive therapy [19]. In our study, pCLE-based values were able to distinguish all CD patients with endoscopic inflammation from controls. Changes in Ma/ma might reflect changes in crypt architecture and therefore mucosal inflammation. In fact, crypt distortion in IBD is caused by inflammatory infiltrates in lamina propria (neutrophils then mononuclear cells) [20] and release of pro-inflammatory cytokines (e.g. TNF α and INF γ) [21].

Comparison between histology analysis and results of pCLE-based Ma/ma found a good correlation. In fact, 6/7 (86%) patients with elevated Ma/ma had microscopic inflammation whereas all controls ($n=6$) had normal histopathologic examination. In contrast, one patient did not show microscopic inflammation but the presence of scar tissue. Scar tissue might have induced crypts distortion despite of the clearance of inflammatory infiltrate [22]. However, we decided to use only a qualitative histopathologic approach as no quantitative score of inflammation has been validated [1]. We noted important heterogeneity of pit pattern values within the subgroup of CD patients showing no endoscopic inflammation while control patients displayed homogeneous mean pit pattern values. Furthermore, 3/6 (50%) of CD patients with no endoscopic inflammation had significantly different pit pattern values from controls. Whether these patients with clinical and endoscopic remission but pCLE abnormalities are at higher risk of relapse remains to be determined. If this is the case, pCLE might help monitor therapy in CD patients with residual microscopic inflammation, since immunosuppressive therapy such as anti-TNF α antibodies and thiopurine have demonstrated their ability to achieve mucosal healing [23,24].

Our study has several limits. Firstly, the sample size is small, and therefore, it is difficult to extrapolate these results to a larger set of patients. Secondly, there were significant differences between controls and CD patients in age. We found no data suggesting a change in crypt morphology over time in humans, and consistently, there was no correlation between Ma/ma values and age in our study. Thirdly, we focused on one area, i.e., the right colon, and it might be necessary to perform a more complete mapping along the colon, as previously reported in a non-quantitative study performed in UC [25], to further reduce the risk of sampling error due to the patchiness of the disease. It might be of interest to determine whether the heterogeneity for Ma/ma ratio measured for CD-ER also affects other endomicroscopic parameters reported in previous studies (such as qualitative evaluation of vascularization). Lastly, the current approach is time-consuming and does not allow

real-time analysis during ongoing endoscopy. However, development of specific software and algorithms might lead to real-time quantification of pit pattern [5,6].

5. Conclusion

pCLE allows quantitative measurements of colonic crypt lumen and these measurements reliably reflect crypts' morphology. In addition, in patients with CD in clinical remission, pCLE-based analysis of Ma/ma allows the detection of microscopic residual inflammation with greater accuracy than standard endoscopy.

Disclosures

We confirm that all of the authors had no conflicts of interest to disclose except E. Coron as consultant for Mauna Kea Technologies.

References

- [1] Van Assche G, Dignass A, Panes J, et al. The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis* 2010;4:7–27.
- [2] Jenkins D, Balsitis M, Gallivan S, et al. Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. The British Society of Gastroenterology Initiative. *Journal of Clinical Pathology* 1997;50:93–105.
- [3] Kudo S, Tamura S, Nakajima T, et al. Diagnosis of colorectal tumorous lesions by magnifying endoscopy. *Gastrointestinal Endoscopy* 1996;44:8–14.
- [4] Huang Q, Fukami N, Kashida H, et al. Inter-observer and intra-observer consistency in the endoscopic assessment of colonic pit patterns. *Gastrointestinal Endoscopy* 2004;60:520–6.
- [5] Takemura Y, Yoshida S, Tanaka S, et al. Quantitative analysis and development of a computer-aided system for identification of regular pit patterns of colorectal lesions. *Gastrointestinal Endoscopy* 2010;72:1047–51.
- [6] Ficsor L, Varga VS, Tagscherer A, et al. Automated classification of inflammation in colon histological sections based on digital microscopy and advanced image analysis. *Cytometry A* 2008;73:230–7.
- [7] Neumann H, Kiesslich R, Wallace MB, et al. Confocal laser endomicroscopy: technical advances and clinical applications. *Gastroenterology* 2010;139:388–92.
- [8] Kiesslich R, Goetz M, Angus EM, et al. Identification of epithelial gaps in human small and large intestine by confocal endomicroscopy. *Gastroenterology* 2007;133:1769–78.
- [9] Moussata D, Goetz M, Gloeckner A, et al. Confocal laser endomicroscopy is a new imaging modality for recognition of intramucosal bacteria in inflammatory bowel disease in vivo. *Gut* 2011;60:26–33.
- [10] Liu JJ, Wong K, Thiesen AL, et al. Increased epithelial gaps in the small intestines of patients with inflammatory bowel disease: density matters. *Gastrointestinal Endoscopy* 2011;73:1174–80.
- [11] Li C-Q, Xie X-J, Yu T, et al. Classification of inflammation activity in ulcerative colitis by confocal laser endomicroscopy. *American Journal of Gastroenterology* 2010;105:1391–6.
- [12] Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, et al. Development and validation of a new, Simplified Endoscopic Activity Score For Crohn's Disease: the SES-CD. *Gastrointestinal Endoscopy* 2004;60:505–12.
- [13] Becker V, van den Broek FJ, Buchner AM, et al. Optimal fluorescein dose for intravenous application in miniprobe-based confocal laser scanning microscopy in pigs. *Journal of Biophotonics* 2011;4:108–13.
- [14] Becker V, von Delius S, Bajbouj M, et al. Intravenous application of fluorescein for confocal laser scanning microscopy: evaluation of contrast dynamics and image quality with increasing injection-to-imaging time. *Gastrointestinal Endoscopy* 2008;68:319–23.
- [15] Nakamura F. Biochemical, electron microscopic and immunohistological observations of cationic detergent-extracted cells: detection and improved preservation of microextensions and ultramicroextensions. *BMC Cell Biology* 2001;2:10.
- [16] Sipponen T, Nuutinen H, Turunen U, et al. Endoscopic evaluation of Crohn's disease activity: comparison of the CDEIS and the SES-CD. *Inflammatory Bowel Diseases* 2010;16:2131–6.
- [17] Regueiro M, Kip KE, Schraut W, et al. Crohn's Disease Activity Index does not correlate with endoscopic recurrence one year after ileocolonic resection. *Inflammatory Bowel Diseases* 2011;17:118–26.
- [18] Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, et al. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990;99:956–63.
- [19] Baert F, Moortgat L, Van Assche G, et al. Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology* 2010;138:463–8.
- [20] Carpenter HA, Talley NJ. The importance of clinicopathological correlation in the diagnosis of inflammatory conditions of the colon: histological patterns with clinical implications. *American Journal of Gastroenterology* 2000;95:878–96.
- [21] Amasheh M, Grotjohann I, Amasheh S, et al. Regulation of mucosal structure and barrier function in rat colon exposed to tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in vitro: a novel model for studying the pathomechanisms of inflammatory bowel disease cytokines. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2009;44:1226–35.
- [22] D'Haens G, Van Deventer S, Van Hogezaand R, et al. Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: a European multicenter trial. *Gastroenterology* 1999;116:1029–34.
- [23] D'Haens G, Baert F, van Assche G, et al. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet* 2008;371:660–7.
- [24] Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, et al. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *New England Journal of Medicine* 2010;362:1383–95.
- [25] Kiesslich R, Goetz M, Lammersdorf K, et al. Chromoscopy-guided endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007;132:874–82.

Annexe 5 : “Characterization of human, mouse and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells.”

Neurogastroenterology & Motility

Neurogastroenterol Motil (2013)

doi: 10.1111/nmo.12200

Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells

R. SORET,^{*,†,‡,§} S. COQUENLORGE,^{*,†,‡,§} F. COSSAIS,^{*,†,‡,§} G. MEURETTE,^{*,†,‡} M. ROLLI-
DERKINDEREN,^{*,†,‡,§,¶} & M. NEUNLIST^{*,†,‡,§,¶}

^{*}INSERM, U913, Nantes, France

[†]Université Nantes, Nantes, France

[‡]Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, CHU Nantes, Hôpital Hôtel-Dieu, Nantes, France

[§]Centre de Recherche en Nutrition Humaine, Nantes, France

Key Messages

- The lack of phenotypical and functional informations about Enteric glial cells (EGC) in physiological as well as pathological conditions is mainly due to technical difficulties.
- We have developed a simple method to isolate and culture human, rat or mouse EGC from longitudinal muscle and myenteric plexus preparations of rat, mouse or human intestine obtained by microdissection.
- This study sets the basis for exploring glial biology and functions in human health and diseases. Cultured EGC expressed the glial markers GFAP, S100 β and Sox10 over 4 consecutive passages, and the majority of them responded to ATP by an increase in intracellular Ca²⁺ concentration.
- In addition, EGC exhibit similar functional properties on the intestinal barrier independently of the species.

Abstract

Background Enteric glial cells (EGC) are major regulators of neuronal and intestinal epithelial cell (IEC) functions. Simple isolation methods of EGC, especially human tissues, remain scarce and limit their study. We present herein a method to isolate EGC and we characterize EGC phenotype and their functional impact on IEC. **Methods** Longitudinal muscle and myenteric plexus preparations of rat, mouse, or human intestine were obtained by microdissection. After mechanical and enzymatic dissociation, individual ganglionic or interganglionic structures were seeded into plates, maintained in culture several weeks and

passaged up to 4 times. Purity of cultures was assessed by immunocytochemistry using antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP), S100 β and Sox10 or smooth muscle actin. Effects of adenosine triphosphate (ATP) on intracellular Ca²⁺ signaling in EGC were studied. Co-cultures of EGC with IEC line, Caco-2, were performed for 2–6 days to analyze their impact on monolayer resistance, cell proliferation, and cell spreading. **Key Results** More than 80% of DAPI-positive cells were GFAP, S100 β , and Sox10-immunoreactive. EGC expressed these glial markers over 4 consecutive passages, and the majority of them responded to ATP by an increase in intracellular Ca²⁺ concentration. In addition, rat, mouse, and human EGC increased intestinal barrier resistance, IEC size, and reduced IEC number. **Conclusions & Inferences** We have developed a simple method to isolate and culture human, rat, or mouse EGC. EGC exhibit similar functional properties on the intestinal barrier independently of the species. This study sets the basis for exploring glial biology and functions in human health and diseases.

Address for Correspondence

Michel Neunlist, UMR INSERM U913, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, University of Nantes School of Medicine, 1, rue Gaston Veil, Nantes 44093, France.
Tel: ++33 (0)2 40 41 29 50; fax: ++33 (0)2 40 41 11 10;
e-mail: Michel.Neunlist@univ-nantes.fr

[¶]Equal contribution.

Received: 6 December 2012

Accepted for publication: 9 July 2013

Keywords calcium signaling, enteric glial cells, enteric nervous system, intestinal epithelial cells.

INTRODUCTION

The enteric nervous system (ENS) is an integrative neuronal network localized all along the gut and organized into two ganglionated plexi, the submucosal plexus, and the myenteric plexus. The ENS is composed of two main cell types, neurons and enteric glial cells (EGC).¹ Although the role of enteric neurons in the regulation of gastrointestinal functions is well described, the contribution of EGC has only started recently to be elucidated.^{2–7} Recent reviews highlight the current limitations of phenotypical and functional studies concerning EGC.^{8,9}

The lack of phenotypical and functional information about EGC in physiological and pathological conditions is mainly due to technical difficulties hampering the study of EGC. Two major complementary methods have been developed over the past years to study them. One approach used transgenic mice models of EGC ablation^{10–12} or *in vivo* pharmacological inhibition of EGC using the gliotoxin fluorocitrate.¹³ Isolation and culture methods of EGC were developed in parallel to obtain cells from newborn guinea pigs,¹⁴ adult rats¹⁵ or mouse¹⁶ and, more recently, from human tissues.³ These latter methods have allowed researchers to gain insight both into the functions of EGC and their interaction with the cellular components of their microenvironment, neurons, or intestinal epithelial cells (IEC).^{2,4,6,17,18}

However, especially in humans, the methods used to obtain EGC required purification steps to discard contaminating cells. These purification steps lead, in part, to the consequences that multiple passages (on average 5 passages) are required to obtain sufficient EGC in order to study their functions.^{3,19} Increasing passages might also enhance the risk of dedifferentiation of EGC. Therefore, increasing the yield of the purity of EGC cultures during the initial dissociation step might enhance the ability to obtain EGC cultures with few passages. Characterization of human EGC was mainly restricted to the analysis of the expression of glial markers.^{4,12,20,21} Functional data of EGC (such as their Ca^{2+} response to adenosine triphosphate [ATP]) or their impact on their cellular environment (IEC, neurons) remained scarce. Therefore, obtaining human EGC represents a first mandatory step to better characterize their functions and phenotype both in health and diseases. Furthermore, despite that many transgenic animal models of diseases have been developed

in mice, few data have been obtained using mice EGC.¹⁶ Therefore, development of an isolation technique of EGC easily adaptable for different species, including human, could greatly facilitate the development and use of syngenic EGC based co-culture models with different cell types (neurons, IEC...). Such a method should ideally be common for all species and be easily standardized.

Therefore, in the first part of this study, we developed a method for isolating, culturing, and characterizing EGC from rat, mouse, and human intestinal tissues. In the second part, we determined their functional role in major IEC functions and their intracellular Ca^{2+} response to ATP.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Patients (11 males and 7 females, age median [range]: 69.3 [19–84] years) undergoing surgery gave their informed consent to take part in the study. The study was approved by the “Fédération des Biothèques” (biobank) of the University Hospital of Nantes, according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Human, and registered under the no. DC-2008-402. Indications for intestinal resections were colorectal cancer ($n = 11$), polypes ($n = 1$), Hirschsprung ($n = 1$), fistula ($n = 1$), sigmoiditis ($n = 1$), volvulus ($n = 1$), and pancreatic adenoma ($n = 2$). Intestinal segments originated from jejunum ($n = 2$), ileum ($n = 1$), and colon ($n = 15$). Tissues used for EGC isolation were from macroscopically normal segments of uninvolved resection margins. Immediately after resection, tissues were transported to the laboratory and placed into sterile, ice-cold, oxygenated Krebs's solution containing (mM): 117 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgCl_2 , 1.2 NaH_2PO_4 , 25.0 NaHCO_3 , 2.5 CaCl_2 , and 11 glucose).

Animal models

The experiment was carried out in accordance with the local Animal Care and Use Committee of Nantes (France). Sprague-Dawley rats and C57BL/6 mice (Janvier Laboratories S.A., Le Genest-St-Isle, France) were housed under standard conditions. Animals were anesthetized with isoflurane and sacrificed by cervical dislocation. The entire small intestine was removed and dissected for isolation of primary EGC as described below.

Preparation of tissue for the isolation procedure

Dissection of human samples The specimens were pinned flat, mucosa up, in a dissection dish containing ice-cold, sterile, oxygenated Krebs solution that was changed every 15 min. The mucosa, submucosal and circular muscles were then carefully removed under a dissection microscope. The remaining longitudinal muscle/myenteric plexus (LMMP) layer was cut into small pieces ($\sim 0.5 \times 0.5$ cm).

Dissection of rat and mouse samples The entire small intestine was washed with sterile Krebs solution using a syringe and cut in

Enteric glial cell isolation and study

pieces (2 cm length each). Individual segments were slipped onto a sterile pipette. Longitudinal muscle/myenteric plexus associated with circular muscle layer was scarified with a scalpel and removed from the underlying mucosa with a pair of fine dissection forceps.

Procedure of enzymatic digestion The LMMP specimens were collected in GentleMACS tubes C (MiltenyiBiotec, Paris, France) containing 5 mL of DMEM/F12 complete medium (Dulbecco's modified Eagle's medium/F12; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 100 IU mL⁻¹ penicillin, 100 µg mL⁻¹ streptomycin, 1.1 µg mL⁻¹ amphotericin B, 20 µg mL⁻¹ gentamicin, 6 mM glutamine, and 2.1 g L⁻¹ NaHCO₃ (all from Invitrogen); 250 µL protease (type I from bovine pancreas; stock solution: 5 g L⁻¹), 250 µL collagenase (Clostridium histolyticum; stock solution: 20 g L⁻¹), and 400 µL bovine serum albumin (BSA; stock solution: 50 g L⁻¹) (all from Sigma-Aldrich, Paris, France) were added to each tube. The tubes were then placed in a GentleMACS dissociator (MiltenyiBiotec) and a mechanical dissociation procedure was performed (MiltenyiBiotec programs "m-brain 01-02": 30 s at 200 rpm for mouse and rat tissues, and "A-01": 25 s at cycles of 400 rpm clockwise and 300 rpm counter clockwise for human tissues). These programs were chosen in preliminary experiments among the different programs available as the ones giving the highest yield of ganglia. Next, the tubes were incubated under gentle agitation on a rocker (continuous rotation, highest speed of the Macsmix; MiltenyiBiotec) at 37 °C in a dry incubator for 12 min, 15 and 45 min for mouse, rat and human, respectively. At the end of the incubation, another dissociation program (identical to the initial one) was run prior to the addition of 10 mL of DMEM/F12 supplemented with 10% FCS to each preparation and centrifugation at 425 g for 5 min. The pellets were washed by pipetting up and down 3 times with ice-cold, sterile Krebs solution and after centrifugation were resuspended in 10 mL of DMEM/F12 complete medium. The suspension was then transferred in Petri dishes (Ø 10 cm).

Isolation of ganglia and interganglionic strands and cultures of EGC

Petri dishes were placed under a binocular microscope and individual ganglia or interganglionic fiber strands (Fig. 2A, D and G) were picked up using a pipette fitted with a 200 µL sterile round gel-loading tip (Starlab, Bagneux, France). Ganglionic structures numbering 10 to 20 were then seeded in gelatin (gelatin type A from Porcine skin 90-110; 0.5% in phosphate buffered saline [PBS], Sigma-Aldrich) coated 24-well plates and cultured in 500 µL of DMEM/F12 complete medium for 48 h at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. After a 48 h culture period, half of the medium was replaced with complete DMEM medium (Invitrogen), DMEM 4.5 g L⁻¹ glucose, supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 50 IU mL⁻¹ penicillin, 50 µg mL⁻¹ streptomycin). After 48-72 h, the medium was entirely replaced by complete DMEM medium and the cultures were maintained between 14 and 28 days (P0) with changes of half of the medium every 3 days. After 3-5 days of culture, only wells with clearly identified ganglia (Fig. 2B, E and H) were maintained in culture. Wells presenting too much isolated cells or patches of fibroblasts or smooth muscle cells were discarded. When cells reached between 1/2 and 3/4 confluency, they were passaged in adapted well plates for expansion and for experimental use up to a maximum of 4 passages (P4) during the following 4-12 weeks. At P1 to P4, some wells were fixed 24-

48 h after the passage in order to assess the purity by immunohistochemistry. Around 10% of the wells (at P1) were contaminated with more than 20% of DAPI-positive cells by other cell types (SMA-IR or not). These latter wells were discarded and not included in our study.

EGC/Caco-2 cell co-culture

A co-culture model was used as previously described.⁴ The human IEC line Caco-2 was cultured in DMEM medium. For co-culture experiments, Caco-2 cells (20 × 10³) were seeded on Transwell filters (Pore size 0.45 µm, surface area 0.33 cm²; Corning, Avon, France) and cultured in 24-well plates containing EGC (50 × 10³; at passages P1 to P4) (in DMEM medium) for 1 week. Half of apical and basolateral culture medium was replaced with fresh medium every 2 days. Transepithelial resistance was measured every 2 days with an epithelial voltammeter (EVOM, World Precision Instruments Inc, Sarasota, FL, USA).

Intestinal epithelial cell counting

At the end of the co-culture period, Caco-2 monolayer was dissociated with trypsin-EDTA (Invitrogen), washed, and resuspended in culture medium. The cell number was counted using a Malassez slide, as previously described.⁴ Counts were performed in triplicates.

Intestinal epithelial cell size measurement

At the end of the co-culture period, another set of Transwell filters of Caco-2 cells were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde, for 30 min at room temperature (RT). Filters were separated (cut with a scalpel blade) from the Transwell and then incubated for 30 min at RT with PBS containing 0.5% triton X-100 and 4% horse serum (PBS-TX-HS). Filters were then incubated with a mouse monoclonal antibody anti-ZO-1 diluted in PBS-TX-HS (1 : 500; Zymed, San Francisco, CA, USA) for 1 h at RT. After washing with PBS, filters were incubated with an antimouse CY-3 antibody (1 : 500; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, Suffolk, UK) for 30 min at RT. Filters were mounted on slides for fluorescence microscopy analysis. Images were acquired with a digital camera (Olympus DP 50, Hambourg, Germany) coupled to a fluorescence microscope (Olympus IX 50). Cell surface area was measured with DP-Soft software (Olympus). An average of 352 ± 41 (*n* = 18) IEC were analyzed for each experimental condition.

Immunohistochemical analysis of EGC in whole mounts and in culture

Longitudinal muscle/myenteric plexus or primary cultures of EGC were fixed at RT in PBS containing 4% paraformaldehyde for 3 or 0.5 h, respectively. Following incubation with PBS-TX-HS, the tissues or the cultures of EGC were incubated sequentially with primary (24 h for tissues and 3 h for cells) and secondary antibodies (3 h for tissues and 1 h for cells). The following combinations of primary and secondary antibodies were used: mouse antighial fibrillary acidic protein (GFAP; 1 : 500; Covance, Princeton, NJ, USA) and antimouse 488 (1 : 1000; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc); rabbit anti-S100β (1 : 10 000; Swant, Bellinzona, Switzerland) and antirabbit Cy3; mouse anti-HuC/HuD (1 : 200; Invitrogen) and antimouse CY3 (1 : 1000; Jackson ImmunoRe-

search Laboratories Inc); mouse anti-Sox10 (1 : 200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and antimouse CY5; mouse anti- α -smooth muscle actin (α SMA) (1 : 500; Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) and FITC-conjugated antimouse (1 : 500; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc). Nuclei were stained with 4' 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; 1 : 200; Sigma, Paris, France). An average of 1053 ± 52 DAPI-IR cells was characterized for every marker and for each culture.

Intracellular calcium measurements

The impact of ATP on intracellular Ca^{2+} concentration was analyzed in four human, four rat, and three mouse EGC cultures, coming from four patients, four rats, and three mice. Cultures of EGC (at passages P1–P3) were first washed three times with HBSS. Next, EGC were loaded with fluo-4 AM (final concentration $0.5 \mu\text{M}$ for human EGC and $5 \mu\text{M}$ for rat and mouse EGC; stock concentration in Dimethylsulfoxid 1 mM, Invitrogen) for one hour at 37°C . Enteric glial cells were then washed three more times with HBSS and observed using an epifluorescence microscope (Olympus IX 50). Acquisition started 10 s before the addition of $100 \mu\text{M}$ ATP and lasted until cells returned to baseline fluorescence (between 90 and 180 s). Images were acquired with a digital camera (Olympus DP 50) coupled to the microscope (exposure time 500 ms for human, and 100 ms for mouse and rat EGC) under a magnification objective of $20\times$ as audio video interleave. Movies were converted using VirtualDub in jpeg format for image (2 images per second for human, 10 images per second for mouse and rat EGC) analysis using ImageJ software. This software was used to characterize (i) the variation of the maximum amplitude of the Ca^{2+} response induced by ATP as compared to basal value (expressed in percentage) (ii) the durations (total, half maximum amplitude duration and ten percent maximum amplitude duration) of the Ca^{2+} response induced by ATP.

Statistics

Data are expressed as the mean $\pm$ SD. The significance of differences was determined using one-way ANOVA followed by a

Bonferroni test. Differences were considered statistically significant for $P < 0.05$.

RESULTS

In situ phenotypical characterization of rat, mouse, and human EGC of the myenteric plexus

After microdissection and prior to dissociation, preparations of LMMP of rat, mouse, and human intestine contained well organized enteric ganglia in which large number of both Hu-immunoreactive (IR), S100 β -IR, and GFAP-IR cells were observed (Fig. 1A–I).

Isolation of rat, mouse, and human myenteric ganglia and EGC cultures

After mechanical and enzymatic dissociation, individual ganglia could be morphologically identified under a binocular microscope. Rat, mouse, or human myenteric ganglia looked like a cellular accumulation with high birefringence property, often presenting branching (Fig. 2A, D and G). Human myenteric ganglia presented less branching and a more parallelepipedic shape. Using a pipet, identified ganglia were transferred in 24-well plates coated with gelatin. After 3–5 days of culture, cells began to proliferate around adherent ganglia and formed small round clusters of cells (Fig. 2B, E and H). In contrast to rat or mouse cells that spread rapidly, human cells tended to be organized longer as a spheric structure (Fig. 2H) before spreading. The cell clusters increased further in size over time (Fig. 2C, F and I).

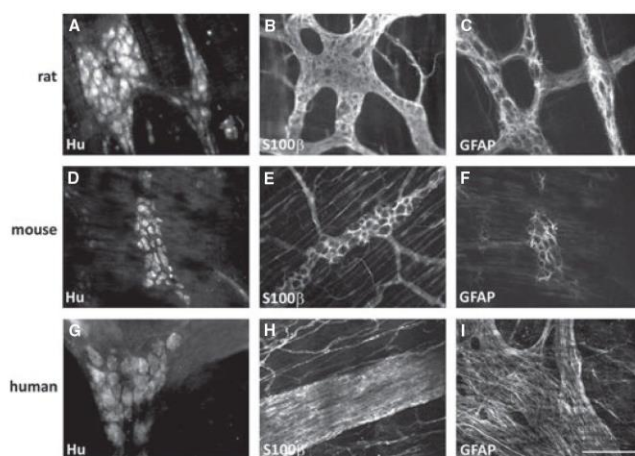


Figure 1 Enteric neurons and enteric glial cells in muscle/myenteric plexus. Immunohistochemical labeling of myenteric plexus of rat (A–C), mouse (D–F), or human (G–I) intestine. Myenteric neurons were identified using an anti-Hu antibody (A, D and G) and enteric glial cells (EGC) using anti-S100 β (B, E, H) and antigial fibrillary acidic protein (C, F, I) antibodies (scale bar: 200 μm).

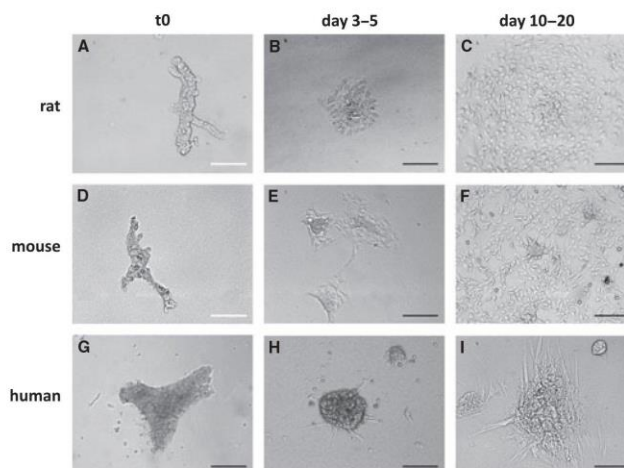


Figure 2 Isolation and culture of rat, mouse, and human enteric glial cells (EGC). Phase contrast picture of isolated myenteric ganglia of rat (A), mouse (D) (white scale bar: 100 μ m), or human (G) (black scale bar: 200 μ m) intestine. Phase contrast pictures of cultures of rat (B and C), mouse (E and F), and human (H and I) EGC at 3 to 5 (B, E and H) and 10 to 20 (C, F and I) days of culture (black scale bar: 200 μ m).

Phenotypical characterization of rat, mouse, and human EGC cultures

At P1, the phenotype of the cells in culture was assessed by immunoreactivity for the three glial markers GFAP, S100 β , and Sox10. Among the cells identified with DAPI staining, more than 80% (Fig. 3M–O) were GFAP-IR (Fig. 3A, E and I, rat $92.2 \pm 8.0\%$, mouse $81.5 \pm 7.7\%$, human $85.5 \pm 12.2\%$), S-100 β -IR (Fig. 3B, F and J, rat $82.8 \pm 13.5\%$, mouse $90.2 \pm 6.2\%$, human $88.5 \pm 4.7\%$), and Sox10 (Fig. 3C, G and K, rat $87.5 \pm 14.2\%$, mouse $89.2 \pm 3.2\%$, human $81.3 \pm 7.1\%$) ($n = 18$). Only $8.2 \pm 10.5\%$, $1.6 \pm 2.2\%$, $15.2 \pm 8.5\%$ of cells were α SMA-IR (Fig. 3M–O) for rat, mouse, and human cultures, respectively (Fig. 3D, H and L). Enteric glial cells retained their phenotypical characteristics over the different passages studied, i.e. up to passages 4 (P4) (data not shown). Concerning the presence of neurons, in rat cultures after 3–5 days of culture, some cells were Hu-IR (Fig. S1A and B). After 10–20 days of culture, NSE-IR (Fig. S1C and D) and Tuj-IR (Fig. 1E and F) but no HU-IR cells were observed. In human preparations, after 5 days of culture neither HU-, NSE- nor Tuj-IR cells were observed (data not shown). At P1, independent of the species, no cell was IR for any of the neuronal marker tested.

Rat, mouse, and human EGC intracellular Ca^{2+} response to extracellular ATP

Purines are intercellular messengers that have been previously used to activate EGC via a transient

increase in the concentration of intracellular calcium.^{22–24} In order to evaluate EGC functionality, we have characterized their intracellular Ca^{2+} response to extracellular ATP. In presence of 100 μ M of ATP, 55% of mouse EGC, 76% of rat EGC, and 88% of human EGC responded with a transient rise in intracellular Ca^{2+} concentration (Fig. 4 and Table 1). Whereas the duration of the intracellular Ca^{2+} transients was similar, their amplitude in rat EGC was almost twice the ones measured in human EGC (Table 1).

Functional characterization of rat, mouse, and human EGC on IEC

The effects of rat EGC have been previously well described on IEC resistance, proliferation, and spreading.^{4,6,17} We therefore used the same outcomes to validate our rat EGC cultures and to determine if mouse and human EGC have also the capabilities to regulate IEC functions. Co-culture of Caco-2 IEC with rat, mouse, or human EGC (P3) induced, in all cases, a significant time-dependent increase in Caco-2 monolayer resistance as compared to control (Caco-2 cultured alone) (Fig. 5A, D and G). After 6 days of co-culture with rat, mouse, or human EGC, the number of IEC was significantly reduced (Fig. 5B, E and H) and their surface area was significantly increased as compared to control (Fig. 5C, F and I).

DISCUSSION

In this study, we developed a simple and reproducible method of isolation and culture of adult EGC from

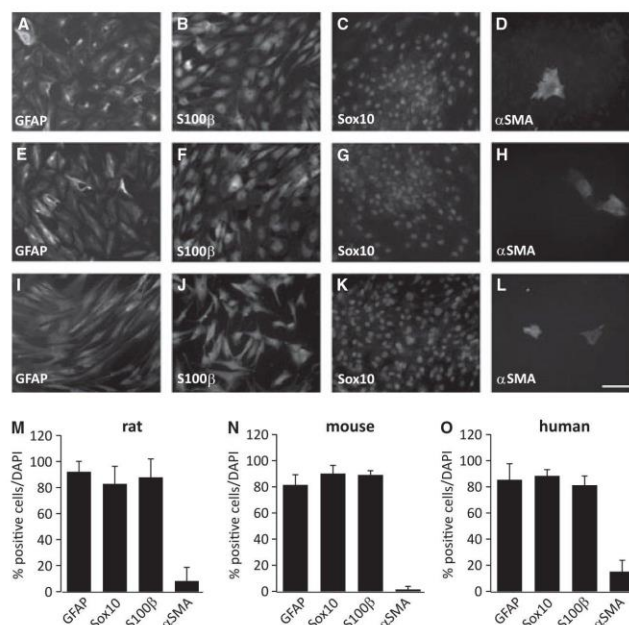


Figure 3 Characterization of cultures of rat, mouse, and human enteric glial cells (EGC) Immunocytochemical labeling of cultures of EGC from rat (A–D), mouse (E–H), and human (I–L) longitudinal muscle/myenteric plexus. EGC were identified using antifibrillary acidic protein (GFAP) (A, E and I), anti-S100β (B, F and J), and anti-Sox10 antibodies (C, G and K). Contamination of cultures with smooth muscle cells or myofibroblasts was assessed using anti-α smooth muscle actin (αSMA) antibodies (D, H and L). Quantifications in cultures (at passage P1) of cells immunoreactive for glial (GFAP, S100β, and Sox10) or smooth muscle or myofibroblasts (αSMA) markers are represented as a percentage of DAPI-positive cells (M, N and O; $n = 18$; data are presented as the mean $\pm$ SD (scale bar: 200 μ m)).

different species ranging from mouse to human. Mouse, rat, and human EGC expressed the three glial markers GFAP, S100β, and Sox10. Enteric glial cells from the different species also responded to extracellular ATP by a transient rise in intracellular Ca^{2+} concentration. Furthermore, using a non-contact co-culture model, we demonstrated that mouse, rat, and human EGC inhibited IEC proliferation and concomitantly enhanced cell spreading and epithelial resistance.

Although previous methods have successfully isolated EGC, they all encompassed mechanical and enzymatic dissociations combined with purification methods.^{3,14,15} In particular, antimetabolic inhibitors and complement-mediated lyses of fibroblasts were used to purify the EGC cultures.^{14,16,25} More recently, Cirillo *et al.* developed a Dynabead based method to isolate human EGC.³ However, probably due to the low yield of cells after the purification steps, different passages of EGC were required prior having EGC in sufficient

number in order to study their function. Contamination of cultures of EGC by fibroblasts was also reported in a recent study of human EGC obtained from mucosal biopsies.²⁶ In this context, an advantage of our method is that the use of a mechanical dissociator while allowing the preservation of ganglionic and interganglionic structures is able to get rid of a large proportion of adherent fibroblasts or muscle cells to the ganglia that cannot be removed with more gentle dissociating procedure. This method has also the advantage to enable the isolation of sufficient ganglionic structures to obtain large amounts of EGC with limited number of passages. Another advantage of this method over cell sorting-based approaches is that cell sorting strategies require that the epitope used to sort is either expressed or absent (for negative cell sorting) on EGC under both physiological or pathological conditions. However, this is still largely unknown and this study, by isolating the entire glial cell population (contained in ganglionic or interganglionic

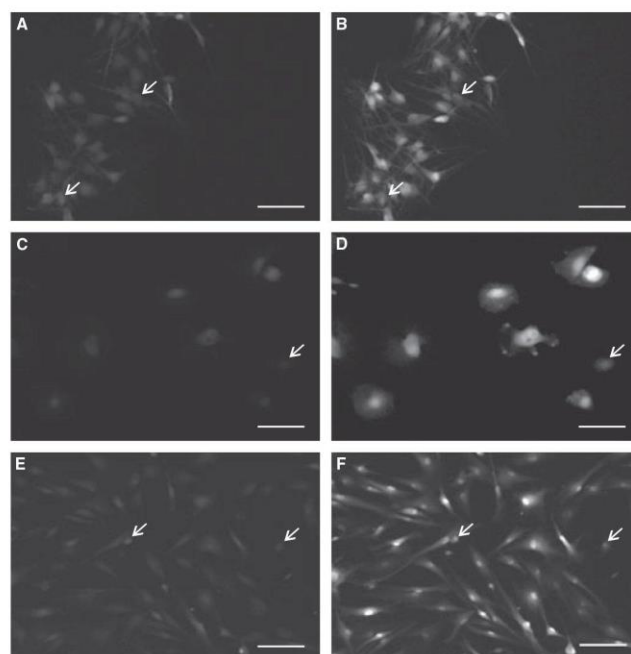


Figure 4 Adenosine triphosphate (ATP) induces Ca^{2+} transients in cultured rat, mouse, and human enteric glial cells (EGC). Representative picture of rat (A and B), mouse (C and D), and human (E and F) EGC (at passages P1 to P3) loaded with Fluo-4 AM at rest (left; A, C, and E) and upon activation (right; B, D, and F) with ATP (100 μM). EGC that did not respond to ATP were depicted with white arrowheads (scale bar: 200 μm for A, B, E, and F; 100 μm for C and D).

Table 1 Effect of adenosine triphosphate (ATP) on intracellular Ca^{2+} concentration measured using Fluo-4 AM-loaded rat, mouse, and human enteric glial cell (EGC) (at passages P1 to P3). The proportions of responding cells (% of total cell number identified using phase contrast microscopy) were analyzed in EGC cultures isolated from four human, four rat, and three mouse tissues (each culture consisting of 3 wells). The amplitude of ATP-induced Ca^{2+} transients and their durations were measured in 12 individual cells for each culture

	Responding cells (%)	Increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (%)	Half maximal amplitude duration (s)	Ten percent maximal amplitude duration (s)
Rat EGC	75.6 ± 8.2	207.8 ± 21.1	47.1 ± 2.8	90.4 ± 6.9
Mouse EGC	54.8 ± 10.8	149.0 ± 17.5	34.9 ± 1.9	79.0 ± 4.1
Human EGC	88.1 ± 3.3	107.5 ± 9.7	40.5 ± 3.2	71.6 ± 6.4

strands), allows all EGC populations to be considered initially.

Our results showed a high yield of EGC in our cultures with more than 80% of cells expressing the glial markers GFAP, S100 β , and Sox-10. Besides EGC, a few fibroblasts/muscle cells were present in cultures but they did not exceed 15% of cells. In addition, no neurons were observed in our cultures after 5 days for human preparations, and after 10–20 days for rat preparations. No immunoreactivity for pan-neuronal

markers was detected for mouse EGC. They might have degenerated following lesions, such as axotomy, induced by the dissociation procedure.²⁷ Concerning the characterization of our cultures over different passages, we showed that they preserved their phenotypical properties over multiple passages (at least up to 4), suggesting that no major dedifferentiation processes occurred in our system. This is in contrast to other glial cell types such as Muller cells that lose quickly their glial phenotype and express fibroblasts markers as

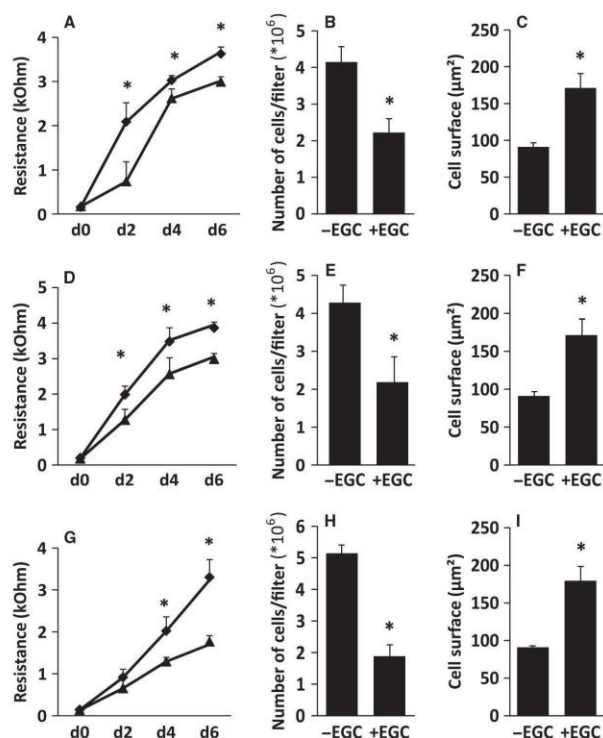


Figure 5 Rat, mouse, and human enteric glial cell (EGC) impact on intestinal epithelial cell functions. Intestinal epithelial cells (IEC; Caco-2) were co-cultured (●) or not (▲) with rat EGC at P3 (A–C), with mouse EGC at P1 (D–F) or with human EGC at P3–P4 (G–I). The resistance of Caco-2 monolayer was measured every 2 days from day 0 to day 6 (A, D and G). Caco-2 proliferation was quantified by counting the IEC after 6 days of co-culture (B, E and H). Caco-2 cell surface area was measured after 4 days of co-culture (C, F and I) ($n = 6$ for rat and human cultures, $n = 3$ for mouse cultures; * $P < 0.05$ compared to control values; one-way ANOVA; data are presented as the mean $\pm$ SD).

early as after 2 passages.²⁸ Sox10 has been identified as a general marker of mature EGC from humans and guinea pig tissues, but is also expressed in the central nervous system in oligodendrocytes.²⁹ Interestingly, the vast majority of Sox10 IR cells also expressed S100 β . This is consistent with reports showing that S100 β is a good general glial marker and that, in culture, EGC maintain their expression of S100 β .³⁰ The high proportion of GFAP-IR in our cultures of EGC is in contrast with other studies performed in rat.³¹ Such difference might be due, in part, to the high affinity of the antibody used to detect GFAP expression as compared to other studies or to the difference in culture condition used. Interestingly, in each EGC culture from different species, we could distinguish a small proportion of very high S100 β -IR cells as compared to the general population of S100 β -IR cells, suggesting the existence of different subpopulations of EGC, as previously described.³¹

An important task of our study was to demonstrate that the functionality of EGC was preserved in culture

for all species tested. We showed that in EGC cultures of the different species, the ATP-induced Ca^{2+} transients presented similar characteristics (duration and amplitude). In our study, ATP-induced Ca^{2+} transients in EGC seemed similar to the one induced by ATP in enteric glia of guinea pig myenteric plexus^{23,24} and also in mice,²⁴ although differences existed between the protocols used for ATP application. However, the ability of ATP to regulate Ca^{2+} transient in myenteric EGC of human remained unknown. Interestingly, our study suggests that a larger proportion of human myenteric EGC (88%) respond to ATP as compared to submucosal ones (50%).²⁶ This observation can be paralleled to previous reports showing that a larger proportion of fast excitatory postsynaptic potentials have a purinergic component in myenteric neurons as compared to submucosal ones (22%).^{32,33} In addition, we showed that a lower proportion of EGC responded to ATP in mice in our study as compared to the one of Gulbransen and Sharkey.²⁴ This might be due to differences in regions studied (small intestine in our

study vs distal colon) or also to the fact that *ex vivo* ATP might have activated neuron to glia signaling. Interestingly, Ach or 5-HT can directly induce Ca^{2+} transients in EGC from primary cultures.²⁶ We have also additionally described that impact of EGC upon key properties of IEC remained identical in the different species tested. These effects were similar to the ones reported in studies using transformed and non-transformed rat EGC. Indeed studies have shown that EGC increased intestinal epithelial barrier resistance,⁶ enhanced IEC spreading,¹⁷ and reduced IEC proliferation.⁴ Interestingly, functional properties of EGC upon IEC also remained similar during the different passages of EGC tested, consistent with absence of dedifferentiation of EGC during the passages.

Altogether, we have developed an isolation and culture method of myenteric EGC that can easily and reproducibly be adapted to different species, including humans. Such a method represents an important step to better characterize both phenotypical and functional changes in EGC during human diseases and in animal models of these diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Philippe Hulin (Cellular imaging platform MicroPiCell, IFR26, Nantes, France) for pictures of the myenteric plexus.

FUNDING

This work RS was a recipient of a doctoral fellowship from the CRNH and the Region of Pays de la Loire. SC is a recipient of a doctoral fellowship from Inserm-Pays de La Loire. MN is a recipient of a Contrat d'Interface from the University Hospital of Nantes. FC was supported by a postdoctoral Fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale. MRD was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique.

DISCLOSURE

The authors have no competing interests.

AUTHOR CONTRIBUTION

RS, SC, and FC performed the experiments; GM performed the clinical and pathological assessment of the patients and provided the human tissues; MN designed the research study; MRD and MN supervised the study and wrote the manuscript.

REFERENCES

- Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2004; **16**(Suppl. 1): 55–9.
- Abdo H, Derkinderen P, Gomes P *et al*. Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *Faseb J* 2011; **24**: 1082–94.
- Cirillo C, Samelli G, Turco F *et al*. Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglia cells and induces autocrine nitric oxide production. *Neurogastroenterol Motil* 2011; **23**: e372–82.
- Neunlist M, Aubert P, Bonnaud 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.
- Neunlist M, Van Landeghem L, Bourreille A, Savidge T. Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 2008; **263**: 577–83.
- 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.
- Savidge TC, Sofroniew MV, Neunlist M. Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. *Lab Invest* 2007; **87**: 731–6.
- Gulbransen BD, Sharkey KA. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; **9**: 625–32.
- Neunlist M, Van Landeghem L, Mahe MM, Derkinderen P, des Varannes SB, Rolli-Derkinderen M. The digestive neuronal-glial-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; **10**: 90–100.
- Aube 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.
- 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.
- 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 USA* 2001; **98**: 13306–11.
- Nasser Y, Fernandez E, Keenan CM *et al*. Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **291**: G912–27.
- Bannerman PG, Mirsky R, Jessen KR. Establishment and properties of separate cultures of enteric neurons and enteric glia. *Brain Res* 1988; **440**: 99–108.
- Ruhl A, Trotter J, Stremmel W. Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglia cell lines from the myenteric plexus of adult rat. *Neurogastroenterol Motil* 2001; **13**: 95–106.
- Bernstein CN, Vidrich A. Isolation, identification, and culture of normal mouse colonic glia. *Glia* 1994; **12**: 108–16.
- Van Landeghem L, Chevalier J, Mahe MM *et al*. Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; **300**: G976–87.
- Van Landeghem L, Mahe MM, Teusan R *et al*. Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: impact on intestinal epithelial barrier functions. *BMC Genomics* 2009; **10**: 507.
- Turco F, Samelli G, Cirillo C *et al*. Enteroglia-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like

- receptor signalling in human enteric glial cells. *Gut* 2013 (Online First).
- 20 Cirillo C, Sarnelli G, Esposito G *et al.* Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglial-derived S100B protein. *Neurogastroenterol Motil* 2009; **21**: 1209–e1112.
 - 21 Villanacci V, Bassotti G, Nascimbeni R *et al.* Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterol Motil* 2008; **20**: 1009–16.
 - 22 Gomes P, Chevalier J, Boesmans W *et al.* ATP-dependent paracrine communication between enteric neurons and glia in a primary cell culture derived from embryonic mice. *Neurogastroenterol Motil* 2009; **21**: 870–e862.
 - 23 Gulbransen BD, Bains JS, Sharkey KA. Enteric glia are targets of the sympathetic innervation of the myenteric plexus in the guinea pig distal colon. *J Neurosci* 2010; **30**: 6801–9.
 - 24 Gulbransen BD, Sharkey KA. Purinergic neuron-to-glia signaling in the enteric nervous system. *Gastroenterology* 2009; **136**: 1349–58.
 - 25 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**: G1163–71.
 - 26 Boesmans W, Cirillo C, Van den Abbeel V *et al.* Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells. *Neurogastroenterol Motil* 2013; **25**: e151–60.
 - 27 Koliatsos VE, Price DL. Axotomy as an experimental model of neuronal injury and cell death. *Brain Pathol* 1996; **6**: 447–65.
 - 28 Guidry C. Isolation and characterization of porcine Muller cells. Myofibroblastic dedifferentiation in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; **37**: 740–52.
 - 29 Hoff S, Zeller F, von Weyhern CW *et al.* Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J Comp Neurol* 2008; **509**: 356–71.
 - 30 von Boyen G, Steinkamp M. The role of enteric glia in gut inflammation. *Neuron Glia Biol* 2010; **6**: 231–6.
 - 31 Boesmans W, Vanden Berghe P, Pachnis V. Glial heterogeneity in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2012; **24**: 36.
 - 32 Galligan JJ, Bertrand PP. ATP mediates fast synaptic potentials in enteric neurons. *J Neurosci* 1994; **14**: 7563–71.
 - 33 Monro RL, Bornstein JC, Bertrand PP. Synaptic transmission from the submucosal plexus to the myenteric plexus in Guinea-pig ileum. *Neurogastroenterol Motil* 2008; **20**: 1165–73.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Analysis of rat, mouse, and human enteric glial cells (EGC) cultures for neuronal marker expression. Representative immunocytochemical labeling of primary cultures of EGC from rat following 3–5 (A, B) or 10–20 (C–F) days of culture. EGC were identified using an anti-Sox10 antibody (A, C, E) and neuronal cells using an anti-Hu (B), NSE (D) or beta-tubulin3 (Tuj, F) antibodies. Expression of neuronal markers was not detected in human cultures, but HU-IR was detected after 3–5 days of culture for rat cultures, and NSE- or Tuj-IR was detected after 10–20 days of culture for rat cultures, but not later. No immunoreactivity for pan-neuronal markers was detected in mouse EGC cultures (scale bar: 200 μ m).

Références

- Aamodt, G., Bukholm, G., Jahnsen, J., Moum, B., and Vatn, M.H. (2008). The association between water supply and inflammatory bowel disease based on a 1990-1993 cohort study in southeastern Norway. *Am. J. Epidemiol.* 168, 1065–1072.
- Abad, C., Martinez, C., Juarranz, M.G., Arranz, A., Leceta, J., Delgado, M., and Gomariz, R.P. (2003). Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 124, 961–971.
- Abdo, H., Derkinderen, P., Gomes, P., Chevalier, J., Aubert, P., Masson, D., Galmiche, J., Berghe, P. Vanden, Neunlist, M., Lardeux, B., et al. (2010). Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J.* 24.
- Abdo, H., Mah, M.M., Derkinderen, P., Bach-ngohou, K., Lardeux, B., and Neunlist, M. (2012). The omega-6 fatty acid derivative 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress. *J Physiol* 11, 2739–2750.
- Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 131–144.
- Adibi, S.A. (1997). The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology* 113, 332–340.
- Agoff, S.N., Brentnall, T. a, Crispin, D. a, Taylor, S.L., Raaka, S., Haggitt, R.C., Reed, M.W., Afonina, I. a, Rabinovitch, P.S., Stevens, a C., et al. (2000). The role of cyclooxygenase 2 in ulcerative colitis-associated neoplasia. *Am. J. Pathol.* 157, 737–745.
- Agulhon, C., Petravicz, J., McMullen, A.B., Sweger, E.J., Minton, S.K., Taves, S.R., Casper, K.B., Fiocco, T. a, and McCarthy, K.D. (2008). What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 59, 932–946.
- Ahlman, H., and Nilsson (2001). The gut as the largest endocrine organ in the body. *Ann. Oncol.* 12 Suppl 2, S63–8.
- Ahmad, T., Tamboli, C.P., Jewell, D., and Colombel, J.-F. (2004). Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology* 126, 1533–1549.
- Ajuebor, M.N., Singh, A., and Wallace, J.L. (2000). Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G238–44.
- Akira, S. (2006). TLR signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 311, 1–16.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511.
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors : critical proteins. *Nat. Immunol.* 2.
- Alarcón de la Lastra, C., Sánchez-Fidalgo, S., Villegas, I., and Motilva, V. (2004). New pharmacological perspectives and therapeutic potential of PPAR-gamma agonists. *Curr. Pharm. Des.* 10, 3505–3524.
- Aldhous, M.C., Noble, C.L., and Satsangi, J. (2009). Dysregulation of human beta-defensin-2 protein in inflammatory bowel disease. *PLoS One* 4, e6285.
- Alexiou, P., Pegklidou, K., Chatzopoulou, M., Nicolaou, I., and Demopoulos, V.J. (2009). Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21(st) century. *Curr. Med. Chem.* 16, 734–752.
- Alexopoulou, L., Holt, a C., Medzhitov, R., and Flavell, R. a (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738.
- Ali, T., Shakir, F., and Morton, J. (2012). Curcumin and inflammatory bowel disease: biological mechanisms and clinical implication. *Digestion* 85, 249–255.
- Allen, N.J., and Barres, B.A. (2009). Q & A Glia — more than just brain glue. *Nature* 457, 675–677.
- 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.
- Allescher, H.D., Daniel, E.E., Dent, J., Fox, J.E., and Kostolanska, F. (1989). Neural reflex of the canine pylorus to intraduodenal acid infusion. *Gastroenterology* 96, 18–28.

- Almeida, a, Almeida, J., Bolaños, J.P., and Moncada, S. (2001). Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 15294–15299.
- Al-Sadi, R.M., and Ma, T.Y. (2007). IL-1 Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability. *J. Immunol.* 178, 4641–4649.
- Al-Sadi, R., Ye, D., Dokladny, K., and Ma, T.Y. (2008). Mechanism of IL-1 -Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability. *J. Immunol.* 180, 5653–5661.
- Al-Sadi, R., Ye, D., Said, H.M., and Ma, T.Y. (2010). IL-1 β -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by MEKK-1 activation of canonical NF- κ B pathway. *Am. J. Pathol.* 177, 2310–2322.
- Al-Sadi, R., Guo, S., Ye, D., and Ma, T.Y. (2013). TNF- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier is regulated by ERK1/2 activation of Elk-1. *Am. J. Pathol.* 183, 1871–1884.
- Al-Sadi, R., Ye, D., Boivin, M., Guo, S., Hashimi, M., Ereifej, L., and Ma, T.Y. (2014). Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene. *PLoS One* 9, e85345.
- Ananthakrishnan, A.N. (2013a). Environmental triggers for inflammatory bowel disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 15, 302.
- Ananthakrishnan, A.N. (2013b). Antibiotic exposure is associated with development of inflammatory bowel disease. *J. Pediatr.* 162, 1077.
- Anderson, M. a, Ao, Y., and Sofroniew, M. V (2013). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci. Lett.*
- Andersson, R.E., Olaison, G., Tysk, C., and Ekblom, A. (2001). Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* 344, 808–814.
- Andoh, A., Fujino, S., Okuno, T., Fujiyama, Y., and Bamba, T. (2002). Intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammatory bowel diseases. *J. Gastroenterol.* 37 Suppl 1, 33–37.
- 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/ β -catenin signalling in Paneth cell differentiation. *Dev. Biol.* 324, 288–296.
- Andriantsitohaina, B.Y.R., and Surprenant, A. (1992). Guinea-pig submucosal. *J. Physiol.* 493–502.
- Anglade, P., Michel, C., and Rozé, 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, 568–577.
- Anitha, M., Chandrasekharan, B., Salgado, J.R., Grouzmann, E., Mwangi, S., Sitaraman, S. V, and Srinivasan, S. (2006). Glial-derived neurotrophic factor modulates enteric neuronal survival and proliferation through neuropeptide Y. *Gastroenterology* 131, 1164–1178.
- Anitha, M., Vijay-Kumar, M., Sitaraman, S. V, Gewirtz, A.T., and Srinivasan, S. (2012). Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling. *Gastroenterology* 143, 1006–1016.e4.
- Annese, V., Rogai, F., Settesoldi, A., and Bagnoli, S. (2012). PPAR γ in Inflammatory Bowel Disease. *PPAR Res.* 2012, 620839.
- Arafa, H.M.M., Hemeida, R.A., El-Bahrawy, A.I.M., and Hamada, F.M.A. (2009). Prophylactic role of curcumin in dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis murine model. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1311–1317.
- Araujo, E.G. De, da Silva, G., and Araujo, A. (2009). Neuronal Cell Survival The Role of Interleukins. *Neuroimmunomodulation* 64, 57–64.
- Arciszewski, M., Pierzynowski, S., and Ekblad, E. (2005). Lipopolysaccharide induces cell death in cultured porcine myenteric neurons. *Dig. Dis. Sci.* 50, 1661–1668.
- Arciszewski, M.B., Sand, E., and Ekblad, E. (2008). Vasoactive intestinal peptide rescues cultured rat myenteric neurons from lipopolysaccharide induced cell death. *Regul. Pept.* 146, 218–223.
- Arcuri, C., Giambanco, I., Bianchi, R., and Donato, R. (2002). Annexin V, annexin VI, S100A1 and S100B in developing and adult avian skeletal muscles. *Neuroscience* 109, 371–388.

- Arnott, I.D., Kingstone, K., and Ghosh, S. (2000). Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 35, 1163–1169.
- Arnott, I.D.R., Nimmo, E.R., Drummond, H.E., Fennell, J., Smith, B.R.K., MacKinlay, E., Morecroft, J., Anderson, N., Kelleher, D., O’Sullivan, M., et al. (2004). NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn’s disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun.* 5, 417–425.
- Arrieta, M.C., Madsen, K., Doyle, J., and Meddings, J. (2009). Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. *Gut* 41–48.
- Arundine, M., and Tymianski, M. (2004). Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 657–668.
- Ashida, H., Ogawa, M., Kim, M., Mimuro, H., and Sasakawa, C. (2012). Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nat. Chem. Biol.* 8, 36–45.
- Ashino, T., Yamanaka, R., Yamamoto, M., Shimokawa, H., Sekikawa, K., Iwakura, Y., Shioda, S., Numazawa, S., and Yoshida, T. (2008). Negative feedback regulation of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase gene expression by heme oxygenase-1 induction in macrophages. *Mol. Immunol.* 45, 2106–2115.
- Atreya, R., Mudter, J., and Finotto, S. (2000a). Specific targeting of IL-6 signalling pathway : a new way to treat IBD ? *Gut* 465–466.
- Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Müllberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schütz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., et al. (2000b). Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat. Med.* 6, 583–588.
- Aube, A., 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. *Neurogastroenterology* 630–637.
- Aviello, G., Corr, S.C., Johnston, D.G.W., O’Neill, L. a J., and Fallon, P.G. (2014a). MyD88 adaptor-like (Mal) regulates intestinal homeostasis and colitis-associated colorectal cancer in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 306, G769–78.
- Aviello, G., Corr, S.C., Johnston, D.G.W., O’Neill, L. a J., and Fallon, P.G. (2014b). MyD88 adaptor-like (Mal) regulates intestinal homeostasis and colitis-associated colorectal cancer in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 306, G769–78.
- Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2000). Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat. Immunol.* 1, 113–118.
- Ayabe, T., Satchell, D.P., Pesendorfer, P., Tanabe, H., Wilson, C.L., Hagen, S.J., and Ouellette, A.J. (2002a). Activation of Paneth cell alpha-defensins in mouse small intestine. *J. Biol. Chem.* 277, 5219–5228.
- Ayabe, T., Wulff, H., Darmoul, D., Cahalan, M.D., Chandy, K.G., and Ouellette, A.J. (2002b). Modulation of mouse Paneth cell alpha-defensin secretion by mIKCa1, a Ca²⁺-activated, intermediate conductance potassium channel. *J. Biol. Chem.* 277, 3793–3800.
- 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, 489–497.
- Bach-ngohou, K., Mah, M.M., Bourreille, A., Denis, M.G., Lardeux, B., Neunlist, M., and Masson, D. (2010). Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy- 12 , 14 -prostaglandin J2. *J Physiol* 14, 2533–2544.
- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915–1920.
- Baek, H.-S., Choi, J.-H., Oh, J.-W., and Lee, H.-B. (2013). Leptin and urinary leukotriene E4 and 9α,11β-prostaglandin F2 release after exercise challenge. *Ann. Allergy. Asthma Immunol.* 111, 112–117.
- Baeker, R., Haebel, S., Schlatterer, K., and Schlatterer, B. (2002). Lipocalin-type prostaglandin D synthase in milk: a new biomarker for bovine mastitis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 67, 75–88.
- Baert, F.J., and Rutgeerts, P.R. (1999). Anti-TNF strategies in Crohn’s disease: mechanisms, clinical effects, indications. *Int. J. Colorectal Dis.* 14, 47–51.

- Baert, F.J., D'Haens, G.R., Peeters, M., Hiele, M.I., Schaible, T.F., Shealy, D., Geboes, K., and Rutgeerts, P.J. (1999). Tumor necrosis factor alpha antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* 116, 22–28.
- De Baey, A., Mende, I., Baretton, G., Greiner, A., Hartl, W.H., Baeuerle, P.A., and Diepolder, H.M. (2003). A subset of human dendritic cells in the T cell area of mucosa-associated lymphoid tissue with a high potential to produce TNF-alpha. *J. Immunol.* 170, 5089–5094.
- Balda, M.S., and Matter, K. (2000). The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J.* 19, 2024–2033.
- Balda, M.S., Whitney, J. a, Flores, C., González, S., Cereijido, M., and Matter, K. (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J. Cell Biol.* 134, 1031–1049.
- Balda, M.S., Garrett, M.D., and Matter, K. (2003). The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J. Cell Biol.* 160, 423–432.
- Baldwin, A.S. (1996). THE NF- κ B AND I κ B PROTEINS : New Discoveries and Insights. *Annu. Rev. Immunol.*
- Balish, E., and Warner, T. (2002). Enterococcus faecalis induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice. *Am. J. Pathol.* 160, 2253–2257.
- Bamforth, S.D., Kniesel, U., Wolburg, H., Engelhardt, B., and Risau, W. (1999). A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 1, 1879–1888.
- Bandrés, E., Cubedo, E., Agirre, X., Malumbres, R., Zárata, R., Ramirez, N., Abajo, A., Navarro, A., Moreno, I., Monzó, M., et al. (2006). Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol. Cancer* 5, 29.
- Banks, C., Bateman, A., Payne, R., Johnson, P., and Sheron, N. (2003). Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J. Pathol.* 199, 28–35.
- Barajon, I., Serrao, G., Arnaboldi, F., Opizzi, E., Ripamonti, G., Balsari, A., and Rumio, C. (2009). Toll-like Receptors 3 , 4 , and 7 Are Expressed in the Enteric Nervous System and Dorsal Root Ganglia The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 57, 1013–1023.
- Barclay, A.R., Russell, R.K., Wilson, M.L., Gilmour, W.H., Satsangi, J., and Wilson, D.C. (2009). Systematic review: the role of breastfeeding in the development of pediatric inflammatory bowel disease. *J. Pediatr.* 155, 421–426.
- Barker, N., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev.* 22, 1856–1864.
- 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, 905–916.
- Barnich, N., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Abnormal CEACAM6 expression in Crohn disease patients favors gut colonization and inflammation by adherent-invasive E. coli. *Virulence* 1, 281–282.
- Barnich, N., Carvalho, F.A., Glasser, A.-L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J.-F., et al. (2007). CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J. Clin. Invest.* 117, 1566–1574.
- Baron, S., Turck, D., Leplat, C., Merle, V., Gower-Rousseau, C., Marti, R., Yzet, T., Lerebours, E., Dupas, J.-L., Debeugny, S., et al. (2005). Environmental risk factors in paediatric inflammatory bowel diseases: a population based case control study. *Gut* 54, 357–363.
- Barres, B. a (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60, 430–440.
- Barrett, J.C., Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Brant, S.R., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Barmada, M.M., et al. (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat. Genet.* 40, 955–962.

- Barski, O.A., Tipparaju, S.M., and Bhatnagar, A. (2008). The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab. Rev.* 40, 553–624.
- Bassaganya-Riera, J. (2002). Colonic anti-inflammatory mechanisms of conjugated linoleic acid. *Clin. Nutr.* 21, 451–459.
- Basson, M.D. (2003). Invited research review: Cell-matrix interactions in the gut epithelium. *Surgery* 133, 263–267.
- Basson, M.D., Turowski, G., and Emenaker, N.J. (1996). Regulation of human (Caco-2) intestinal epithelial cell differentiation by extracellular matrix proteins. *Exp. Cell Res.* 225, 301–305.
- Bassotti, G., and Villanacci, V. (2011). Can “functional” constipation be considered as a form of enteric neurogliopathy? *Glia* 59, 345–350.
- Bassotti, G., Villanacci, V., Antonelli, E., Morelli, A., and Salerni, B. (2007). Enteric glial cells : new players in gastrointestinal motility ? *Lab. Investig.* 87, 628–632.
- Baudry, C., Marchix, J., Schemann, M., Neunlist, M., and Bruley, S. (2012). Diet-induced obesity has neuroprotective effects in murine gastric enteric nervous system : involvement of leptin and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Physiol* 3, 533–544.
- Baumgart, D.C., and Carding, S.R. (2007). Inflammatory bowel disease : cause and immunobiology. *Gastro* 369, 1627–1640.
- Baumgart, D.C., and Sandborn, W.J. (2012). Crohn’s disease. *Lancet* 380, 1590–1605.
- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R.H., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S.G., et al. (2007). Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of *Clostridiales* in Crohn’s disease involving the ileum. *ISME J.* 1, 403–418.
- Baumgarten, H.G., Holstein, A.F., and Owman, C. (1970). Auerbach’s plexus of mammals and man: electron microscopic identification of three different types of neuronal processes in myenteric ganglia of the large intestine from rhesus monkeys, guinea-pigs and man. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 106, 376–397.
- Bayliss, W.M., and Starling, E.H. (1900). The movements and the innervation of the large intestine. *J. Physiol.* 26, 107–118.
- Baynash, a G., Hosoda, K., Giaid, 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, 1277–1285.
- Bazzoni, F., and Beutler, B. (1996). The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N. Engl. J. Med.* 334, 1717–1725.
- Beasley, C.R.W., Robinson, C., Featherstone, R.L., Varley, J.G., Hardy, C.C., Church, M.K., and Holgate, S.T. (1987). 9alpha,11beta-prostaglandinF2, a novel metabolite of prostaglandin D2 Is a Potent Contractile Agonist of Human and Guinea Pig Airways. 79, 978–983.
- Beasley, R., Hovel, C., Mani, R., Robinson, C., Varley, J., and Holgate, S.T. (1988). Comparative vascular effects of histamine, prostaglandin (PG) D2 and its metabolite 9 alpha,11 beta-PGF2 in human skin. *Clin. Allergy* 18, 619–627.
- Beaugerie, L., Massot, N., Carbonnel, F., Cattani, S., Gendre, J.P., and Cosnes, J. (2001). Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 2113–2116.
- 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, 219–224.
- Belai, A., and Burnstock, G. (1999). Distribution and colocalization of nitric oxide synthase and calretinin in myenteric neurons of developing, aging, and Crohn’s disease human small intestine. *Dig. Dis. Sci.* 44, 1579–1587.
- Belai, a., Cooper, S., and Burnstock, G. (1995). Effect of age on NADPH-diaphorase-containing myenteric neurones of rat ileum and proximal colon. *Cell Tissue Res.* 279, 379–383.
- Belai, A., Boulos, P.B., Robson, T., and Burnstock, G. (1997). Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn’s disease. *Gut* 40, 767–774.

- Bergles, D.E., and Jahr, C.E. (1998). Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. *J. Neurosci.* **18**, 7709–7716.
- Bernard, C.E., Gibbons, S.J., Gomez-Pinilla, P.J., Lurken, M.S., Schmalz, P.F., Roeder, J.L., Linden, D., Cima, R.R., Dozois, E.J., Larson, D.W., et al. (2009). Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. *Neurogastroenterol. Motil.* **21**, 746–e46.
- Bernardini, N., Segnani, C., Ippolito, C., De Giorgio, R., Colucci, R., Faussone-Pellegrini, M.S., Chiarugi, M., Campani, D., Castagna, M., Mattii, L., et al. (2012). Immunohistochemical analysis of myenteric ganglia and interstitial cells of Cajal in ulcerative colitis. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 318–327.
- Bernstein, C.N. (2010). New insights into IBD epidemiology: Are there any lessons for treatment? *Dig. Dis.* **28**, 406–410.
- Bernstein, C.N., Robert, M.E., and Eysselein, V.E. (1993). Rectal substance P concentrations are increased in ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* **88**, 908–913.
- Berthoud, H.R., and Neuhuber, W.L. (2000). Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton. Neurosci.* **85**, 1–17.
- Berthoud, H., Patterson, L.M., and zheng, huiyuan (2001). Vagal-Enteric Interface : Vagal Activation-Induced Expression of c-Fos and p-CREB in Neurons of the Upper Gastrointestinal Tract. *Anat. Rec.* **40**, 29–40.
- Berthouze, M., Laurent, A.-C., Breckler, M., and Lezoualc'h, F. (2011). New perspectives in cAMP-signaling modulation. *Curr. Heart Fail. Rep.* **8**, 159–167.
- Beuckmann, C.T., Lazarus, M., Gerashchenko, D., Mizoguchi, a, Nomura, S., Mohri, I., Uesugi, a, Kaneko, T., Mizuno, N., Hayaishi, O., et al. (2000). Cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* **428**, 62–78.
- Beutler, B. (2000). Tlr4 : central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr. Opin. Immunol.* **20**–26.
- Bevins, C.L., and Salzman, N.H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 356–368.
- Birrenbach, T., and Böcker, U. (2004). Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm. Bowel Dis.* **10**, 848–859.
- Bischoff, S.C., Lorentz, a, Schwengberg, S., Weier, G., Raab, R., and Manns, M.P. (1999). Mast cells are an important cellular source of tumour necrosis factor alpha in human intestinal tissue. *Gut* **44**, 643–652.
- Bishop, J.R., Schuksz, M., and Esko, J.D. (2007). Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **446**, 1030–1037.
- Le Bivic, a, Real, F.X., and Rodriguez-Boulan, E. (1989). Vectorial targeting of apical and basolateral plasma membrane proteins in a human adenocarcinoma epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 9313–9317.
- Le Bivic, a, Quaroni, a, Nichols, B., and Rodriguez-Boulan, E. (1990). Biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2, a human intestinal epithelial cell line. *J. Cell Biol.* **111**, 1351–1361.
- Bjarnason, I., Hayllar, J., MacPherson, A.J., and Russell, A.S. (1993). Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology* **104**, 1832–1847.
- Bjerknes, M., and Cheng, H. (2001). Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12497–12502.
- Bjerknes, M., and Cheng, H. (2006). Intestinal epithelial stem cells and progenitors. *Methods Enzymol.* **419**, 337–383.
- Björklund, H., Dahl, D., and Seiger, A. (1984). Neurofilament and glial fibrillary acid protein-related immunoreactivity in rodent enteric nervous system. *Neuroscience* **12**, 277–287.
- Björnsson, S., and Jóhannsson, J.H. (2000). Inflammatory bowel disease in Iceland, 1990-1994: a prospective, nationwide, epidemiological study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 31–38.
- Blair, S. a, Kane, S. V, Clayburgh, D.R., and Turner, J.R. (2006). Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Lab. Invest.* **86**, 191–201.

- Blais, A., Aymard, P., and Lacour, B. (1997). Paracellular calcium transport across Caco-2 and HT29 cell monolayers. *Pflügers Arch.* 434, 300–305.
- 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, 309–320.
- Blikslager, a T., Roberts, M.C., Rhoads, J.M., and Argenzio, R. a (1997). Prostaglandins I₂ and E₂ have a synergistic role in rescuing epithelial barrier function in porcine ileum. *J. Clin. Invest.* 100, 1928–1933.
- 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, 545–564.
- Bochenek, G. (2004). Plasma 9,11-PGF₂, a PGD₂ metabolite, as a sensitive marker of mast cell activation by allergen in bronchial asthma. *Thorax* 59, 459–464.
- Böcker, U., Nebe, T., Herweck, F., Holt, L., Panja, A., Jobin, C., Rossol, S., Sartor, R., and Singer, M. V (2003). Butyrate modulates intestinal epithelial cell-mediated neutrophil migration. *Clin. Exp. Immunol.* 131, 53–60.
- Boesmans, W., Lasrado, R., Vanden Berghe, P., and Pachnis, V. (2014). Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia* n/a–n/a.
- Bohórquez, D. V, Samsa, L. a, Roholt, A., Medicetty, S., Chandra, R., and Liddle, R. a (2014). An enteroendocrine cell-enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy. *PLoS One* 9, e89881.
- Boie, Y., Sawyer, N., Slipetz, D.M., Metters, K.M., and Abramovitz, M. (1995). Molecular cloning and characterization of the human prostanoïd DP receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 18910–18916.
- Bojarski, C., Gitter, A.H., Bendfeldt, K., Mankertz, J., Schmitz, H., Wagner, S., Fromm, M., and Schulzke, J.D. (2001). Permeability of human HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis. *J. Physiol.* 535, 541–552.
- Boltin, D., Boaz, M., Aizic, S., Sperber, A., Fass, R., Niv, Y., and Dickman, R. (2013). Psychological distress is not associated with treatment failure in patients with gastroesophageal reflux disease. *J. Psychosom. Res.* 75, 462–466.
- Bomsel, M., and Alfsen, A. (2003). Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 57–68.
- Bondurand, N., and Sham, M.H. (2013). The role of SOX10 during enteric nervous system development. *Dev. Biol.* 382, 330–343.
- Bonen, D.K., and Cho, J.H. (2003). The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 124, 521–536.
- Bonen, D.K., Ogura, Y., Nicolae, D.L., Inohara, N., Saab, L., Tanabe, T., Chen, F.F., Foster, S.J., Duerr, R.H., Brant, S.R., et al. (2003). Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 124, 140–146.
- Bonventre, V. (1992). A2 and Signal Transduction1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 3.
- Booth, C., and Potten, C.S. (2000). Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J. Clin. Invest.* 105, 1493–1499.
- Bornstein, J.C. (1994). Local neural control of intestinal motility: nerve circuits deduced for the guinea-pig small intestine. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 21, 441–452.
- Borovikova, L. V, Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., and Tracey, K.J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Lett. to Nat.* 405.
- Borruel, N., Carol, M., Casellas, F., and Antolin, M. (2002). Increased mucosal tumour necrosis factor α production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut*.
- Botting, R.M. (2000). Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? *Clin. Infect. Dis.* 31 Suppl 5, S202–10.

- Boudeau, J., Glasser, A., Masseret, E., Joly, B., and Darfeuille-michaud, A. (1999). Invasive Ability of an *Escherichia coli* Strain Isolated from the Ileal Mucosa of a Patient with Crohn's Disease. *Infect. Immun.* 67, 4499–4509.
- Bouguen, G., Langlois, A., Djouina, M., Branche, J., Koriche, D., Dewaeles, E., Mongy, A., Auwerx, J., Colombel, J.-F., Desreumaux, P., et al. (2014). Intestinal steroidogenesis controls PPAR γ expression in the colon and is impaired during UC. *Gut* 1–10.
- Boulet, L., Ouellet, M., Bateman, K.P., Ethier, D., Percival, M.D., Riendeau, D., Mancini, J.A., and Méthot, N. (2004). Deletion of microsomal prostaglandin E2 (PGE2) synthase-1 reduces inducible and basal PGE2 production and alters the gastric prostanoid profile. *J. Biol. Chem.* 279, 23229–23237.
- Bouma, G., and Strober, W. (2003). THE IMMUNOLOGICAL AND. *Nat. Rev.* 3.
- Bowie, A., and O'Neill, L. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol.* 67.
- Von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schäfer, K.-H., Adler, G., and Kirsch, J. (2004). Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* 53, 222–228.
- Von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Reinshagen, M., and Scha, K. (2006). Nerve Growth Factor Secretion in Cultured Enteric Glia Cells is Modulated by Proinflammatory Cytokines *Neuroendocrinology. J. Neuroendocrinol.* 820–825.
- Von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Geerling, I., Reinshagen, M., Schäfer, K.H., Adler, G., and Kirsch, J. (2006). Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 12, 346–354.
- Von Boyen, G.B.T., Degenkolb, N., Hartmann, C., Adler, G., and Steinkamp, M. (2010). The endothelin axis influences enteric glia cell functions. *Med. Sci. Monit.* 16, BR161–7.
- Von Boyen, G.B.T., Schulte, N., Pflüger, C., Spaniol, U., Hartmann, C., and Steinkamp, M. (2011). Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol.* 11, 3.
- Boyer, L., Sidpra, D., Jevon, G., Buchan, A.M., and Jacobson, K. (2007). Differential responses of VIPergic and nitrergic neurons in paediatric patients with Crohn's disease. *Auton. Neurosci.* 134, 106–114.
- Bradley, J., Parr, E., and Sharkey, K. (1997). Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res.* 455–461.
- Braegger, C.P., Nicholls, S., Murch, S.H., Stephens, S., and MacDonald, T.T. (1992). Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 339, 89–91.
- Brand, S. (2009). Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 58, 1152–1167.
- Branka, J.E., Vallette, G., Jarry, A., Bou-Hanna, C., Lemarre, P., Van, P.N., and Laboisse, C.L. (1997). Early functional effects of *Clostridium difficile* toxin A on human colonocytes. *Gastroenterology* 112, 1887–1894.
- Brash, a R., Boeglin, W.E., and Chang, M.S. (1997). Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6148–6152.
- Braun, N., Sévigny, 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, 124–132.
- Brehmer, a, Schrod, F., and Neuhuber, W. (1999). Morphological classifications of enteric neurons--100 years after Dogiel. *Anat. Embryol. (Berl).* 200, 125–135.
- Bresson, E., Boucher-Kovalik, S., Chapdelaine, P., Madore, E., Harvey, N., Laberge, P.Y., Leboeuf, M., and Fortier, M. a (2011). The human aldose reductase AKR1B1 qualifies as the primary prostaglandin F synthase in the endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 210–219.
- Brew, R., Erikson, J.S., West, D.C., Kinsella, a R., Slavov, J., and Christmas, S.E. (2000). Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* 12, 78–85.
- Breyer, R.M. (2001). Prostaglandin EP(1) receptor subtype selectivity takes shape. *Mol. Pharmacol.* 59, 1357–1359.
- Brierley, S.M., and Linden, D.R. (2014). Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*

- Britsch, S., Goerich, D.E., Riethmacher, D., Peirano, R.I., Rossner, M., Nave, K. a, Birchmeier, C., and Wegner, M. (2001). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* 15, 66–78.
- Brookes, S.J., Meedeniya, a C., Jobling, P., and Costa, M. (1997). Orally projecting interneurons in the guinea-pig small intestine. *J. Physiol.* 505 (Pt 2, 473–491.
- Broussard, D.L., Bannerman, P.G., Tang, C.M., Hardy, M., and Pleasure, D. (1993). Electrophysiologic and molecular properties of cultured enteric glia. *J. Neurosci. Res.* 34, 24–31.
- Brown, J.R., and DuBois, R.N. (2005). COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention. *J. Clin. Oncol.* 23, 2840–2855.
- Brown, M., Hughes, K.R., Moossavi, S., Robins, A., and Mahida, Y.R. (2014). Toll-like receptor expression in crypt epithelial cells, putative stem cells and intestinal myofibroblasts isolated from controls and patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* 178, 28–39.
- Bruewer, M., Luegering, a., Kucharzik, T., Parkos, C. a., Madara, J.L., Hopkins, a. M., and Nusrat, a. (2003). Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms. *J. Immunol.* 171, 6164–6172.
- Bruewer, M., Utech, M., Ivanov, A.I., Hopkins, A.M., Parkos, C. a, and Nusrat, A. (2005). Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB J.* 19, 923–933.
- Brun, P., Giron, M.C., Qesari, M., Porzionato, A., Caputi, V., Zoppellaro, C., Banzato, S., Grillo, A.R., Spagnol, L., De Caro, R., et al. (2013). Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system. *Gastroenterology* 145, 1323–1333.
- Brus, R., Herman, Z.S., Szkilnik, R., and Zabawska, J. (1979). Mediation of central prostaglandin effects by serotonergic neurons. *Psychopharmacology (Berl).* 64, 113–120.
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., and van Noort, J.M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 1013–1021.
- Buhner, S., Buning, C., Genschel, J., Kling, K., Herrmann, D., Dignass, a, Kuechler, I., Krueger, S., Schmidt, H.H.-J., and Lochs, H. (2006). Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 55, 342–347.
- 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.M. (2006). Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. *Lab. Invest.* 86, 1052–1063.
- Burns, A.J., and Le Douarin, N.M. (2001). Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. *Anat. Rec.* 262, 16–28.
- Burnstock, G. (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 575–590.
- Bush, T., Savidge, T., and Freeman, T. (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93, 189–201.
- Bushong, E. a, Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* 22, 183–192.
- Byrns, M.C., Jin, Y., and Penning, T.M. (2011). Inhibitors of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): overview and structural insights. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 125, 95–104.
- Cabarrocas, J., Savidge, T.C., and Liblau, R.S. (2003). Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41, 81–93.
- Cabral, M., Martín-Venegas, R., and Moreno, J.J. (2013). Role of arachidonic acid metabolites on the control of non-differentiated intestinal epithelial cell growth. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 1620–1628.
- Cacalano, G., Fariñas, I., Wang, L.C., Hagler, K., Forgie, a, Moore, M., Armanini, M., Phillips, H., Ryan, a M., Reichardt, L.F., et al. (1998). GFR α 1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. *Neuron* 21, 53–62.

- Calkins, B.M. (1989). A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **34**, 1841–1854.
- Cantarella, G., Uberti, D., Carsana, T., Lombardo, G., Bernardini, R., and Memo, M. (2003). Neutralization of TRAIL death pathway protects human neuronal cell line from beta-amyloid toxicity. *Cell Death Differ.* **10**, 134–141.
- Caprioli, F., Pallone, F., and Monteleone, G. (2008). Th17 immune response in IBD: A new pathogenic mechanism. *J. Crohns. Colitis* **2**, 291–295.
- Caradonna, L., Amati, L., Magrone, T., Pellegrino, N.M., Jirillo, E., and Caccavo, D. (2000). Invited review: Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J. Endotoxin ...* **2**.
- Cario, E. (2010). Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm. Bowel Dis.* **16**, 1583–1597.
- Cario, E., and Podolsky, D.K. (2006). Toll-like receptor signaling and its relevance to intestinal inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1072**, 332–338.
- Cario, E., Rosenberg, I.M., Brandwein, S.L., Beck, P.L., Reinecker, H.-C., and Podolsky, D.K. (2000). Lipopolysaccharide Activates Distinct Signaling Pathways in Intestinal Epithelial Cell Lines Expressing Toll-Like Receptors. *J. Immunol.* **164**, 966–972.
- Carlson, N.G., Wieggl, 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**, 3963–3968.
- Carroll, I.M., and Maharshak, N. (2013). Enteric bacterial proteases in inflammatory bowel disease-pathophysiology and clinical implications. *World J. Gastroenterol.* **19**, 7531–7543.
- Cascieri, M. a, and Springer, M.S. (2000). The chemokine/chemokine-receptor family: potential and progress for therapeutic intervention. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 420–427.
- Caspary, W.F. (1992). Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* **55**, 299S–308S.
- Castagliuolo, I., LaMont, J.T., Letourneau, R., Kelly, C., O’Keane, J.C., Jaffer, A., Theoharides, T.C., and Pothoulakis, C. (1994). Neuronal involvement in the intestinal effects of *Clostridium difficile* toxin A and *Vibrio cholerae* enterotoxin in rat ileum. *Gastroenterology* **107**, 657–665.
- Castell, T., Gómez de Segura, I.A., Vázquez, I., Mata, A., and De Miguel, E. (2001). Somatostatin blockade improves the proliferative response but not intestinal morphological growth after small bowel resection in rats. *Eur. J. Surg.* **167**, 54–59.
- Cavanaugh, J. (2006). NOD2: ethnic and geographic differences. *World J. Gastroenterol.* **12**, 3673–3677.
- Cells, T., Czerucka, D., Dahan, S., Mograbi, B., Rossi, B., and Rampal, P. (2000). *Saccharomyces boulardii* Preserves the Barrier Function and Modulates the Signal Transduction Pathway Induced in Enteropathogenic *Escherichia coli* -Infected *Saccharomyces boulardii* Preserves the Barrier Function and Modulates the Signal Transduction Pathwa.
- Cenac, N., Coelho, A.-M., Nguyen, C., Compton, S., Andrade-Gordon, P., MacNaughton, W.K., Wallace, J.L., Hollenberg, M.D., Bunnett, N.W., Garcia-Villar, R., et al. (2002). Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *Am. J. Pathol.* **161**, 1903–1915.
- Cetin, S., Ford, H.R., Sysko, L.R., Agarwal, C., Wang, J., Neal, M.D., Baty, C., Apodaca, G., and Hackam, D.J. (2004). Endotoxin inhibits intestinal epithelial restitution through activation of Rho-GTPase and increased focal adhesions. *J. Biol. Chem.* **279**, 24592–24600.
- Chalazonitis, a, Rothman, T.P., Chen, J., and Gershon, M.D. (1998a). Age-dependent differences in the effects of GDNF and NT-3 on the development of neurons and glia from neural crest-derived precursors immunoselected from the fetal rat gut: expression of GFRalpha-1 in vitro and in vivo. *Dev. Biol.* **204**, 385–406.
- Chalazonitis, a, Rothman, T.P., Chen, J., Vinson, E.N., MacLennan, a J., and Gershon, M.D. (1998b). Promotion of the development of enteric neurons and glia by neurotrophic cytokines: interactions with neurotrophin-3. *Dev. Biol.* **198**, 343–365.

- Chalazonitis, A., D'Autréaux, F., Guha, U., Pham, T.D., Faure, C., Chen, J.J., Roman, D., Kan, L., Rothman, T.P., Kessler, J. a, et al. (2004). Bone morphogenetic protein-2 and -4 limit the number of enteric neurons but promote development of a TrkC-expressing neurotrophin-3-dependent subset. *J. Neurosci.* 24, 4266–4282.
- 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, 337–346.
- Chan, J.Y., Cheung, M.C., Moi, P., Chan, K., and Kan, Y.W. (1995). Chromosomal localization of the human NF-E2 family of bZIP transcription factors by fluorescence in situ hybridization. *Hum. Genet.* 95, 265–269.
- Chandrasekharan, B., Bala, V., Kolachala, V.L., Vijay-Kumar, M., Jones, D., Gewirtz, A.T., Sitaraman, S. V, and Srinivasan, S. (2008). Targeted deletion of neuropeptide Y (NPY) modulates experimental colitis. *PLoS One* 3, e3304.
- Chandrasekharan, B., Jeppsson, S., Pienkowski, S., Belsham, D.D., Sitaraman, S. V, Merlin, D., Kokkotou, E., Nusrat, A., Tansey, M.G., and Srinivasan, S. (2013a). Tumor necrosis factor-neuropeptide Y cross talk regulates inflammation, epithelial barrier functions, and colonic motility. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 2535–2546.
- Chandrasekharan, B., Nezami, B.G., and Srinivasan, S. (2013b). Emerging neuropeptide targets in inflammation: NPY and VIP. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 304, G949–57.
- Chartier, N.T., Lainé, 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., 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.
- Cheadle, G. a, Costantini, T.W., Lopez, N., Bansal, V., Eliceiri, B.P., and Coimbra, R. (2013). Enteric glia cells attenuate cytomix-induced intestinal epithelial barrier breakdown. *PLoS One* 8, e69042.
- Cheadle, G.A., Costantini, T.W., Bansal, V., Eliceiri, B.P., and Coimbra, R. (2014). Cholinergic Signaling in the Gut: A Novel Mechanism of Barrier Protection through Activation of Enteric Glia Cells. *Surg. Infect. (Larchmt)*. 15, 387–393.
- Cheeseman, C.I. (1993). GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. *Gastroenterology* 105, 1050–1056.
- Chen, A., and Xu, J. (2005). Activation of PPAR{gamma} by curcumin inhibits Moser cell growth and mediates suppression of gene expression of cyclin D1 and EGFR. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288, G447–56.
- 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, 382–390.
- Chen, H., Hu, Y., Fang, Y., Djukic, Z., Yamamoto, M., Shaheen, N.J., Orlando, R.C., and Chen, X. (2014). Nrf2 deficiency impairs the barrier function of mouse oesophageal epithelium. *Gut* 63, 711–719.
- Chivukula, R.R., Shi, G., Acharya, A., Mills, E.W., Zeitels, L.R., Anandam, J.L., Abdelnaby, A. a, Balch, G.C., Mansour, J.C., Yopp, A.C., et al. (2014). An essential mesenchymal function for miR-143/145 in intestinal epithelial regeneration. *Cell* 157, 1104–1116.
- Cho, J.H. (2008). The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 458–466.
- Cho, H.-Y., Jedlicka, A.E., Reddy, S.P.M., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Zhang, L.-Y., and Kleeberger, S.R. (2002). Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 175–182.
- Chouraki, V., Savoye, G., Dauchet, L., Vernier-Massouille, G., Dupas, J.-L., Merle, V., Laberenne, J.-E., Salomez, J.-L., Lerebours, E., Turck, D., et al. (2011). The changing pattern of Crohn's disease incidence in northern France: a continuing increase in the 10- to 19-year-old age bracket (1988-2007). *Aliment. Pharmacol. Ther.* 33, 1133–1142.

- Chowers, Y., Cahalon, L., Lahav, M., Schor, H., Tal, R., Bar-Meir, S., and Levite, M. (2000a). Somatostatin Through Its Specific Receptor Inhibits Spontaneous and TNF- α and Bacteria-Induced IL-8 and IL-1 Secretion from Intestinal Epithelial Cells. *J. Immunol.* 165, 2955–2961.
- Chowers, Y., Cahalon, L., Lahav, M., Schor, H., Tal, R., Bar-Meir, S., and Levite, M. (2000b). Somatostatin through its specific receptor inhibits spontaneous and TNF- α and bacteria-induced IL-8 and IL-1 beta secretion from intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 165, 2955–2961.
- Christopherson, K.S., Ullian, E.M., Stokes, C.C. a, Mullaney, C.E., Hell, J.W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D.F., Bornstein, P., and Barres, B. a (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120, 421–433.
- Chung, S.W., Kang, B.Y., Kim, S.H., Pak, Y.K., Cho, D., Trinchieri, G., and Kim, T.S. (2000). Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor- γ and nuclear factor- κ B. *J. Biol. Chem.* 275, 32681–32687.
- Cimini, A., and Cerù, M.P. (2008). Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the regulation of neural stem cells proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev.* 4, 293–303.
- Cirillo, C., C., S., G., S., G., E., M., G., R., P., P., I., G., C., F.P., D., A., R., et al. (2009). Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. *Neurogastroenterol. Motil.* 21.
- Cirillo, C., Sarnelli, G., and Esposito, G. (2011). S100B protein in the gut: the evidence for enteroglia-sustained intestinal inflammation. *World J. ...* 17, 1261–1266.
- Citalán-Madrid, A.F., García-Ponce, A., Vargas-Robles, H., Betanzos, A., and Schnoor, M. (2013). Small GTPases of the Ras superfamily regulate intestinal epithelial homeostasis and barrier function via common and unique mechanisms. *Tissue Barriers* 1, e26938.
- Clark, E., Hoare, C., Tanianis-Hughes, J., Carlson, G.L., and Warhurst, G. (2005). Interferon γ Induces Translocation of Commensal Escherichia coli Across Gut Epithelial Cells via a Lipid Raft--Mediated Process. *Gastroenterology* 128, 1258–1267.
- Clarke, T.B., and Weiser, J.N. (2011). Intracellular sensors of extracellular bacteria. *Immunol. Rev.* 243, 9–25.
- Clements, J.D., Lester, R. a, Tong, G., Jahr, C.E., and Westbrook, G.L. (1992). The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258, 1498–1501.
- Cluny, N.L., Keenan, C.M., Lutz, B., Piomelli, D., and Sharkey, K. a (2009). The identification of peroxisome proliferator-activated receptor α -independent effects of oleoylethanolamide on intestinal transit in mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 21, 420–429.
- Coates, M.D., Mahoney, C.R., Linden, D.R., Sampson, J.E., Chen, J., Blaszyk, H., Crowell, M.D., Sharkey, K.A., Gershon, M.D., Mawe, G.M., et al. (2004). Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 126, 1657–1664.
- Colegio, O.R., Van Itallie, C.M., McCrea, H.J., Rahner, C., and Anderson, J.M. (2002). Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C142–7.
- Collins, S.M., Hurst, S.M., Main, C., Stanley, E., Khan, I., Blennerhassett, P., and Swain, M. (1992). Effect of inflammation of enteric nerves. Cytokine-induced changes in neurotransmitter content and release. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 664, 415–424.
- Collins, S.M., Surette, M., and Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 735–742.
- Cominelli, F., and Pizarro, T.T. (1996). Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10 Suppl 2, 49–53; discussion 54.
- Cominelli, F., Nast, C.C., Duchini, A., and Lee, M. (1992). Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. *Gastroenterology* 103, 65–71.

- Cook, R.D., and Burnstock, G. (1976). The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. II. Non-neuronal elements. *J. Neurocytol.* 5, 195–206.
- Cooke, H. (2000). Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 77–80.
- 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., Sidhu, M., and Wang, Y.Z. (1997). 5-HT activates neural reflexes regulating secretion in the guinea-pig colon. *Neurogastroenterol. Motil.* 9, 181–186.
- Cooke, H.J., Wunderlich, J., and Christofi, F.L. (2003). “The force be with you”: ATP in gut mechanosensory transduction. *News Physiol. Sci.* 18, 43–49.
- Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D.J.P., Campbell, B.J., Jewell, D., and Simmons, A. (2010). NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med.* 16, 90–97.
- Cornet, A., Savidge, T., Cabarrocas, J., Deng, W., 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.*
- Cornish, J.A., Tan, E., Simillis, C., Clark, S.K., Teare, J., and Tekkis, P.P. (2008). The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 2394–2400.
- Corr, S.C., Palsson-McDermott, E.M., Grishina, I., Barry, S.P., Aviello, G., Bernard, N.J., Casey, P.G., Ward, J.B.J., Keely, S.J., Dandekar, S., et al. (2014). MyD88 adaptor-like (Mal) functions in the epithelial barrier and contributes to intestinal integrity via protein kinase C. *Mucosal Immunol.* 7, 57–67.
- Cortot, A., Pineton de Chambrun, G., Vernier-Massouille, G., Vigneron, B., and Gower Rousseau, C. (2009). [Inflammatory bowel disease: genetic or environmental diseases?]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 33, 681–691.
- Cosnes, J. (2004). Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18, 481–496.
- Cosnes, J., Carbonnel, F., Carrat, F., Beaugerie, L., and Gendre, J.P. (1999). Oral contraceptive use and the clinical course of Crohn's disease: a prospective cohort study. *Gut* 45, 218–222.
- Cosnes, J., Beaugerie, L., Carbonnel, F., and Gendre, J.P. (2001). Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology* 120, 1093–1099.
- Cosnes, J., Carbonnel, F., Beaugerie, L., Blain, A., Reijasse, D., and Gendre, J.-P. (2002). Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis. *Gut* 51, 803–807.
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., and Cortot, A. (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 1785–1794.
- Costa, J.J., Matossian, K., Resnick, M.B., Beil, W.J., Wong, D.T.W., Gordon, J.R., Dvorak, A.M., Weller, P.F., and Galli, S.J. (1993). Human Eosinophils Can Express the Cytokines Tumor Necrosis Factor- α and Macrophage Inflammatory Protein-1 α . *J. Clin. Invest.* 91, 2673–2684.
- Covacu, R., Arvidsson, L., Andersson, Å., Khademi, M., Erlandsson-harris, H., Robert, A., Svensson, M.A., Olsson, T., Harris, R.A., and Brundin, L. (2010). TLR Activation Induces TNF- α Production from Adult Neural Stem/Progenitor Cells. *J. Immunol.*
- Cowen, T., Johnson, R.J., Soubeyre, V., and Santer, R.M. (2000). Restricted diet rescues rat enteric motor neurones from age related cell death. *Gut* 47, 653–660.
- Crosnier, C., Stamataki, D., and Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* 7, 349–359.
- Crowe, S.E., Soda, K., Stanisiz, A.M., and Perdue, M.H. (1993). Intestinal permeability in allergic rats: nerve involvement in antigen-induced changes. *Am. J. Physiol.* 264, G617–23.
- Cuesta, M.C., Quintero, L., Pons, H., and Suarez-Roca, H. (2002). Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 β , IL-6 and TNF α secretion from human peripheral blood mononuclear cells. *Neurochem. Int.* 40, 301–306.

- Cullinan, S.B., Gordan, J.D., Jin, J., Harper, J.W., and Diehl, J.A. (2004). The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8477–8486.
- Cummings, D.E., and Overduin, J. (2007). Review series Gastrointestinal regulation of food intake. *J. Clin. Invest.* 117.
- Cuzzocrea, S., Pisano, B., Dugo, L., Ianaro, A., Patel, N.S. a, Di Paola, R., Genovese, T., Chatterjee, P.K., Di Rosa, M., Caputi, A.P., et al. (2003a). Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut. *Br. J. Pharmacol.* 140, 366–376.
- Cuzzocrea, S., Pisano, B., Dugo, L., Ianaro, A., Patel, N.S. a, Di Paola, R., Genovese, T., Chatterjee, P.K., Di Rosa, M., Caputi, A.P., et al. (2003b). Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut. *Br. J. Pharmacol.* 140, 366–376.
- D'haens, G., Van Deventer, S., Van Hogezaand, R., Chalmers, D., Kothe, C., Baert, F., Braakman, T., Schaible, T., Geboes, K., and Rutgeerts, P. (1999). Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: A European multicenter trial. *Gastroenterology* 116, 1029–1034.
- D'Incà, R., Di Leo, V., Corrao, G., Martines, D., D'Odorico, A., Mestriner, C., Venturi, C., Longo, G., and Sturniolo, G.C. (1999). Intestinal permeability test as a predictor of clinical course in Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 2956–2960.
- Daig, R., Rogler, G., Aschenbrenner, E., Vogl, D., Falk, W., Gross, V., Schölmerich, J., and Andus, T. (2000). Human intestinal epithelial cells secrete interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 but not interleukin-1 or interleukin-6. *Gut* 46, 350–358.
- Dajani, E.Z., Shahwan, T.G., and Dajani, N.E. (2003). Prostaglandins and brain-gut axis. *J. Physiol. Pharmacol.* 54 Suppl 4, 155–164.
- Danese, S., and Gasbarrini, a (2005). Chemokines in inflammatory bowel disease. *J. Clin. Pathol.* 58, 1025–1027.
- Danielsson, K.N., Rydberg, E.K., Ingelsten, M., Akyürek, L.M., Jirholt, P., Ullström, C., Forsberg, G.-B., Borén, J., Wiklund, O., and Hultén, L.M. (2008). 15-Lipoxygenase-2 expression in human macrophages induces chemokine secretion and T cell migration. *Atherosclerosis* 199, 34–40.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Martino, P.D.I., Desreumaux, P., Gambiaez, L.U.C., Joly, B., Cortot, A., and Fre, J. (1998). Presence of Adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1405–1413.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127, 412–421.
- Daugherty, A., and Mrsny, R. (1999). Regulation of the intestinal epithelial paracellular barrier. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2, 281–287.
- Davé, S.H., Tilstra, J.S., Matsuoka, K., Li, F., Karrasch, T., Uno, J.K., Sepulveda, A.R., Jobin, C., Baldwin, A.S., Robbins, P.D., et al. (2007). Amelioration of chronic murine colitis by peptide-mediated transduction of the IkappaB kinase inhibitor NEMO binding domain peptide. *J. Immunol.* 179, 7852–7859.
- Deguchi, Y., Andoh, A., Inatomi, O., Yagi, Y., Bamba, S., Araki, Y., Hata, K., Tsujikawa, T., and Fujiyama, Y. (2007). Curcumin prevents the development of dextran sulfate Sodium (DSS)-induced experimental colitis. *Dig. Dis. Sci.* 52, 2993–2998.
- Dehouck, M.P., Méresse, S., Delorme, P., Fruchart, J.C., and Cecchelli, R. (1990). An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J. Neurochem.* 54, 1798–1801.
- Dejean, C., and Richard, D. (2013). [Mechanisms of action of glucocorticoids]. *Rev. Med. Interne* 34, 264–268.
- Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Fruchart, J.-C., Tedgui, a., Haegeman, G., and Staels, B. (1999). Peroxisome Proliferator-activated Receptor Negatively Regulates the Vascular Inflammatory Gene Response by Negative Cross-talk with Transcription Factors NF- B and AP-1. *J. Biol. Chem.* 274, 32048–32054.

- Delgado, M., and Ganea, D. (2001). Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 167, 966–975.
- Delgado, M., Martinez, C., Pozo, D., Calvo, J.R., Leceta, J., Ganea, D., and Gomariz, R.P. (1999). Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF-alpha and IL-6. *J. Immunol.* 162, 1200–1205.
- Deloulme, J.C., Raponi, E., Gentil, B.J., Bertacchi, N., Marks, A., Labourdette, G., and Baudier, J. (2004). Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 453–465.
- Demaude, J., Levêque, M., Chaumaz, G., Eutamène, H., Fioramonti, J., Bueno, L., and Ferrier, L. (2009). Acute stress increases colonic paracellular permeability in mice through a mast cell-independent mechanism: involvement of pancreatic trypsin. *Life Sci.* 84, 847–852.
- Deretzi, G., Kountouras, J., Grigoriadis, N., Zavos, C., Chatzigeorgiou, S., Koutlas, E., and Tsiptsios, I. (2009). From the “little brain” gastrointestinal infection to the “big brain” neuroinflammation: a proposed fast axonal transport pathway involved in multiple sclerosis. *Med. Hypotheses* 73, 781–787.
- Desreumaux, P., Dubuquoy, L., Nutten, S., Peuchmaur, M., Englaro, W., Schoonjans, K., Derijard, B., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P., et al. (2001). Attenuation of Colon Inflammation through Activators of the Retinoid X Receptor (Rxr)/Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (Ppar) Heterodimer: A Basis for New Therapeutic Strategies. *J. Exp. Med.* 193, 827–838.
- De Saussure, P., and Bouhnik, Y. (2007). Maladie de Crohn de l'adulte. *EMC Gastroenterologie*.
- Van Deventer, S.J. (1997). Review article: Chemokine production by intestinal epithelial cells: a therapeutic target in inflammatory bowel disease? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11 Suppl 3, 116–20; discussion 120–1.
- Dhakshinamoorthy, S., and Porter, A.G. (2004). Nitric oxide-induced transcriptional up-regulation of protective genes by Nrf2 via the antioxidant response element counteracts apoptosis of neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 279, 20096–20107.
- Dhandapani, K.M., and Brann, D.W. (2003). Transforming growth factor-beta: a neuroprotective factor in cerebral ischemia. *Cell Biochem. Biophys.* 39, 13–22.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529–1531.
- Diem, R., Hobom, M., Grötsch, P., Kramer, B., and Bähr, M. (2003). Interleukin-1 β protects neurons via the interleukin-1 (IL-1) receptor-mediated Akt pathway and by IL-1 receptor-independent decrease of transmembrane currents in vivo. *Mol. Cell. Neurosci.* 22, 487–500.
- Dignass, A., Lynch-devaney, K., Kondon, H., Thim, L., and Podolsky, D.K. (1994). Trefoil Peptides Promote Epithelial Migration through Factor fl-independent Pathway Transforming Growth. 94, 376–383.
- Dignass, A.U., Becker, A., Spiegler, S., and Goebell, H. (1998). Adenine nucleotides modulate epithelial wound healing in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* 28, 554–561.
- Dionne, S., Hiscott, J., D'Agata, I., Duhaime, A., and Seidman, E.G. (1997). Quantitative PCR analysis of TNF-alpha and IL-1 beta mRNA levels in pediatric IBD mucosal biopsies. *Dig. Dis. Sci.* 42, 1557–1566.
- Donato, R. (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 637–668.
- Donato, R. (2003). Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* 60, 540–551.
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., and Giambanco, I. (2009). S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1008–1022.
- Dourmashkin, R.R., Davies, H., Wells, C., Shah, D., Price, A., O'Morain, C., and Levi, J. (1983). Epithelial patchy necrosis in Crohn's disease. *Hum. Pathol.* 14, 643–648.
- Dringen, R., Gebhardt, R., and Hamprecht, B. (1993). Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res.* 623, 208–214.

- Dringen, R., Gutterer, J.M., and Hirrlinger, J. (2000). Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochem.* 267, 4912–4916.
- Dubuquoy, L., Bourdon, C., Peuchmaur, M., Leibowitz, M.D., Nutton, S., Colombel, J.F., Auwerx, J., and Desreumaux, P. (2000). [Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: a new target for the treatment of inflammatory bowel disease]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 24, 719–724.
- Dubuquoy, L., Jansson, E.Å., Deeb, S., Rakotobe, S., Karoui, M., Colombel, J.-F., Auwerx, J., Pettersson, S., and Desreumaux, P. (2003). Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124, 1265–1276.
- Duchmann, R., Kaiser, I., Hermann, E., Mayet, W., Ewe, K., and Meyer zum Büschenfelde, K.H. (1995). Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* 102, 448–455.
- Ducluzeau, R. (2002). Concept des probiotiques: histoire, définition et principales caractéristiques. *Antibiotiques* 4, 234–238.
- Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., et al. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461–1463.
- Dwinell, M.B., Eckmann, L., Leopard, J.D., Varki, N.M., and Kagnoff, M.F. (1999). Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 117, 359–367.
- Ebnet, K. (2008). Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochem. Cell Biol.* 130, 1–20.
- Echtenacher, B., Männel, D.N., and Hültner, L. (1996). Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381, 75–77.
- Eckardt, V.F., and LeCompte, P.M. (1978). Esophageal ganglia and smooth muscle in the elderly. *Am. J. Dig. Dis.* 23, 443–448.
- Economou, M., and Pappas, G. (2008). New global map of Crohn's disease: Genetic, environmental, and socioeconomic correlations. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 709–720.
- Economou, M., Trikalinos, T.A., Loizou, K.T., Tsianos, E. V, and Ioannidis, J.P.A. (2004). Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am. J. Gastroenterol.* 99, 2393–2404.
- Eguchi, Y., Eguchi, N., Oda, H., Seiki, K., Kijima, Y., Matsu-ura, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O. (1997). Expression of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in human heart and its accumulation in the coronary circulation of angina patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 14689–14694.
- Ekblad, E., and Bauer, A.J. (2004). Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. *Neurogastroenterol. Motil.* 16 Suppl 1, 123–128.
- Ekbom, A., and Montgomery, S.M. (2004). Environmental risk factors (excluding tobacco and microorganisms): critical analysis of old and new hypotheses. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18, 497–508.
- Ekbom, A., Wakefield, A.J., Zack, M., and Adami, H.O. (1994). Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease. *Lancet* 344, 508–510.
- Ekbom, A., Daszak, P., Kraaz, W., and Wakefield, A.J. (1996). Crohn's disease after in-utero measles virus exposure. *Lancet* 348, 515–517.
- Elamin, E., Masclee, A., Dekker, J., and Jonkers, D. (2014). Ethanol disrupts intestinal epithelial tight junction integrity through intracellular calcium-mediated Rho/ROCK activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 306, G677–85.
- Elinav, E., Nowarski, R., Thaïss, C. a, Hu, B., Jin, C., and Flavell, R. a (2013). Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat. Rev. Cancer* 13, 759–771.
- Ellis, R.D., Goodlad, J.R., Limb, G.A., Powell, J.J., Thompson, R.P., and Punchard, N.A. (1998). Activation of nuclear factor kappa B in Crohn's disease. *Inflamm. Res.* 47, 440–445.
- El-Salhy, M., Sandström, O., and Holmlund, F. (1999). Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* 107, 93–103.

- Enomoto, a, Itoh, K., Nagayoshi, E., Haruta, J., Kimura, T., O'Connor, T., Harada, T., and Yamamoto, M. (2001). High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol. Sci.* 59, 169–177.
- Evans, R.J., and Surprenant, a (1992). Vasoconstriction of guinea-pig submucosal arterioles following sympathetic nerve stimulation is mediated by the release of ATP. *Br. J. Pharmacol.* 106, 242–249.
- Faharat, K., Sobhani, I., Bonnaud, G., Vallot, T., Vissuzaine, C., and M., M. (1999). Rectocolite ulcérohémorragique: épidémiologie, physiopathologie, diagnostic, histoire naturelle et stratégie thérapeutique. *Encyclopedie médico-chirurgicale (Elsevier, Paris), Gastro-enterologie*, 24.
- Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, a.-M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J.-C., Deeb, S., et al. (1997). The Organization, Promoter Analysis, and Expression of the Human PPAR Gene. *J. Biol. Chem.* 272, 18779–18789.
- Fakhoury, M., Negrulj, R., Mooranian, A., and Al-Salami, H. (2014). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *J. Inflamm. Res.* 7, 113–120.
- Fantini, M.C., Monteleone, G., and Macdonald, T.T. (2007). New players in the cytokine orchestra of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 1419–1423.
- Faure, E., Thomas, L., Xu, H., Medvedev, a, Equils, O., and Arditi, M. (2001). Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J. Immunol.* 166, 2018–2024.
- Feinle-Bisset, C., Patterson, M., Ghatel, M.A., Bloom, S.R., and Horowitz, M. (2005). Fat digestion is required for suppression of ghrelin and stimulation of peptide YY and pancreatic polypeptide secretion by intraduodenal lipid. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289, E948–53.
- Felderbauer, P., Bulut, K., Hoeck, K., Deters, S., Schmidt, W.E., and Hoffmann, P. (2007). Substance P induces intestinal wound healing via fibroblasts—evidence for a TGF-beta-dependent effect. *Int. J. Colorectal Dis.* 22, 1475–1480.
- Feltrin, K.L., Patterson, M., Ghatel, M. a, Bloom, S.R., Meyer, J.H., Horowitz, M., and Feinle-Bisset, C. (2006). Effect of fatty acid chain length on suppression of ghrelin and stimulation of PYY, GLP-2 and PP secretion in healthy men. *Peptides* 27, 1638–1643.
- Ferretti, M., Casini-Raggi, V., Pizarro, T.T., Eisenberg, S.P., Nast, C.C., and Cominelli, F. (1994). Neutralization of endogenous IL-1 receptor antagonist exacerbates and prolongs inflammation in rabbit immune colitis. *J. Clin. Invest.* 94, 449–453.
- 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, 409–410.
- 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, 7551–7559.
- Fields, R.D., and Burnstock, G. (2007). Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7, 423–436.
- Filipenko, N.R., Attwell, S., Roskelley, C., and Dedhar, S. (2005). Integrin-linked kinase activity regulates Rac- and Cdc42-mediated actin cytoskeleton reorganization via alpha-PIX. *Oncogene* 24, 5837–5849.
- Fiocchi, C. (1998). Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115, 182–205.
- Fiocchi, C., Gastroenterology, D., and Western, C. (1997). invited review. 769–775.
- Fiorino, G., Cesarini, M., Indriolo, A., and Malesci, A. (2011). Mucosal healing in ulcerative colitis: where do we stand? *Curr. Drug Targets* 12, 1417–1423.
- Fischer, A., Gluth, M., Pape, U.-F., Wiedenmann, B., Theuring, F., and Baumgart, D.C. (2013). Adalimumab prevents barrier dysfunction and antagonizes distinct effects of TNF- α on tight junction proteins and signaling pathways in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 304, G970–9.
- Flamant, M., Aubert, P., Rolli-derkinderen, M., Bourreille, A., Neunlist, M.R., Mahe, M.M., Meurette, G., Marteyn, B., Savidge, T., Galmiche, J.P., et al. (2011). Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells : a role for. *Neurogastroenterology*.

- Flamenbaum, M., Zénut, M., Aublet-Cuvelier, B., Larpent, J.L., Fabre, P., Abergel, A., Dapoigny, M., and Bommelaer, G. (1997). [Incidence of inflammatory bowel diseases in the department of Puy-de-Dôme in 1993 and 1994. EPIMICI. Epidémiologie des Maladies Inflammatoires Cryptogenétiques de l'Intestin group]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 21, 491–496.
- 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, 339–346.
- Van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241–260.
- Flynn, A., and Kane, S. (2011). Mucosal healing in Crohn's disease and ulcerative colitis: what does it tell us? *Curr. Opin. Gastroenterol.*
- Font-Nieves, M., Sans-Fons, M.G., Gorina, R., Bonfill-Teixidor, E., Salas-Pédomo, A., Márquez-Kisinousky, L., Santalucia, T., and Planas, A.M. (2012). Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes. *J. Biol. Chem.* 287, 6454–6468.
- Forman, B.M., Tontonoz, P., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., and Evans, R.M. (1995). Factor PPAR γ . 83, 803–812.
- Förster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem. Cell Biol.* 130, 55–70.
- Franchi, L., Warner, N., Viani, K., and Nuñez, G. (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol. Rev.* 227, 106–128.
- Frangos, C.C., and Frangos, C.C. (2007). Inflammatory bowel disease: reviewing an old study under a new perspective. *Gut* 56, 1638–1639.
- Franke, A., McGovern, D.P.B., Barrett, J.C., Wang, K., Radford-Smith, G.L., Ahmad, T., Lees, C.W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., et al. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* 42, 1118–1125.
- Frieling, T., Rupprecht, C., Dobрева, G., Häussinger, D., and Schemann, M. (1995). Effects of prostaglandin F2 alpha (PGF2 alpha) and prostaglandin I2 (PGI2) on nerve-mediated secretion in guinea-pig colon. *Pflügers Arch.* 431, 212–220.
- Frieling, T., Rupprecht, C., Dobрева, G., and Schemann, M. (1997). Differential effects of inflammatory mediators on ion secretion in the guinea-pig colon. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* 118, 341–343.
- Frolova, L., Drastich, P., Rossmann, P., Klimesova, K., and Tlaskalova-Hogenova, H. (2008). Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis. *J. Histochem. Cytochem.* 56, 267–274.
- Fu, M., Tam, P.K.H., Sham, M.H., and Lui, V.C.H. (2004). Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: a topographical study. *Anat. Embryol. (Berl.)* 208, 33–41.
- Fujimori, S., Gudis, K., Mitsui, K., Seo, T., Yonezawa, M., Tanaka, S., Tatsuguchi, A., and Sakamoto, C. (2009). A randomized controlled trial on the efficacy of synbiotic versus probiotic or prebiotic treatment to improve the quality of life in patients with ulcerative colitis. *Nutrition* 25, 520–525.
- Fujitani, Y., Kanaoka, Y., Aritake, K., Uodome, N., Okazaki-Hatake, K., and Urade, Y. (2002). Pronounced eosinophilic lung inflammation and Th2 cytokine release in human lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice. *J. Immunol.* 168, 443–449.
- Fukata, M., Michelsen, K.S., Eri, R., Thomas, L.S., Hu, B., Lukasek, K., Nast, C.C., Lechago, J., Xu, R., Naiki, Y., et al. (2005). Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288, G1055–65.
- Fukata, M., Chen, A., Vamadevan, A.S., Cohen, J., Breglio, K., Krishnareddy, S., Hsu, D., Xu, R., Harpaz, N., Dannenberg, A.J., et al. (2007). Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology* 133, 1869–1881.
- Furness, J.B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 87–96.
- Furness, J.B. (2012). The enteric nervous system and. *Nat. Publ. Gr.* 9, 286–294.

- 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, 561–571.
- 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., Alex, G., Clark, M.J., and Lal, V. V (2003). Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 272, 475–483.
- Furness, J.B., Jones, C., Nurgali, K., and Clerc, N. (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.* 72, 143–164.
- Furrie, E., Macfarlane, S., Thomson, G., and Macfarlane, G.T. (2005). Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* 115, 565–574.
- Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., and Tsukita, S. (2001). Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J. Cell Biol.* 153, 263–272.
- Gabella (1971). Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J Anat* 81–95.
- Gabella, G. (1972). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J. Anat.* 111, 69–97.
- Gabella, G. (1981). OF THE NERVE PLEXUSES ~ TES ~ E : THE ENTERIC GLIAL CELLS. *Neuroscience* 6.
- Gabella, G. (1989). Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. *Gastroenterology* 96, 1487–1493.
- Gabella, G. (1990). On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. *J. Auton. Nerv. Syst.* 30 Suppl, S59–66.
- Gabella, G., and Trigg, P. (1984). Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. *J. Neurocytol.* 13, 49–71.
- Gadient, R.A., and Otten, Uw.H. (1997). I N T E R L E U K I N - 6 (IL-6)--A M O L E C U L E WITH BOTH BENEFICIAL A N D D E S T R U C T I V E POTENTIALS RETO A. GADIEN* and UWE H. OTTENT~: 52.
- Galligan, J.J., Jiang, M.M., Shen, K.Z., and Surprenant, A. (1990). Substance P mediates neurogenic vasodilatation in extrinsically denervated guinea-pig submucosal arterioles. *J. Physiol.* 420, 267–280.
- Ganusov, V. V, and De Boer, R.J. (2007). Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends Immunol.* 28, 514–518.
- 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.
- Gardet, A., Benita, Y., Li, C., Sands, B.E., Ballester, I., Stevens, C., Korzenik, J.R., Rioux, J.D., Daly, M.J., Xavier, R.J., et al. (2010). LRRK2 is involved in the IFN-gamma response and host response to pathogens. *J. Immunol.* 185, 5577–5585.
- Garrod, D.R., Merritt, A.J., and Nie, Z. (2002). Desmosomal cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 537–545.
- Gassler, N., Autschbach, F., Heuschen, G., Witzgall, R., Otto, H.F., and Obermüller, N. (2001). Expression of clusterin in Crohn’s disease of the terminal ileum. *Histol. Histopathol.* 16, 755–762.
- Gaulke, C. a, Porter, M., Han, Y.-H., Sankaran-Walters, S., Grishina, I., George, M.D., Dang, A.T., Ding, S.-W., Jiang, G., Korf, I., et al. (2014). Intestinal epithelial barrier disruption through altered mucosal microRNA expression in human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus infections. *J. Virol.* 88, 6268–6280.
- Gayard, M., Guilluy, C., Rousselle, A., Viollet, B., Henrion, D., Pacaud, P., Loirand, G., and Rolli-Derkinderen, M. (2011). AMPK alpha 1-induced RhoA phosphorylation mediates vasoprotective effect of estradiol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2634–2642.
- Geboes, K., and Collins, S. (1998). Structural abnormalities of the nervous system in Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol. Motil.*

- Gegg, M.E., Beltran, B., Salas-Pino, S., Bolanos, J.P., Clark, J.B., Moncada, S., and Heales, S.J.R. (2004). Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/neurodegeneration? *J. Neurochem.* 86, 228–237.
- Gerbe, F., van Es, J.H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N.F., Bourgaux, J.-F., Pignodel, C., et al. (2011). Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* 192, 767–780.
- Gerbe, F., Legraverend, C., and Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2907–2917.
- Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G.R., and Di Sabatino, A. (2014). Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun. Rev.* 13, 3–10.
- Gersemann, M., Becker, S., Kübler, I., Koslowski, M., Wang, G., Herrlinger, K.R., Griger, J., Fritz, P., Fellermann, K., Schwab, M., et al. (2009). Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation.* 77, 84–94.
- Gersemann, M., Becker, S., Nuding, S., Antoni, L., Ott, G., Fritz, P., Oue, N., Yasui, W., Wehkamp, J., and Stange, E.F. (2012). Olfactomedin-4 is a glycoprotein secreted into mucus in active IBD. *J. Crohns. Colitis* 6, 425–434.
- Gershon, M.D. (1997). Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 101–109.
- Gershon, M.D. (1998). Neural Injury, Repair, and Adaptation in the GI Tract V. Genes, lineages, and tissue interactions in the development of the enteric nervous system *. 869–873.
- Gershon, M.D. (2011). Behind an enteric neuron there may lie a glial cell. *J. Clin. Invest.* 121.
- Gershon, M., and Rothman, T. (2004). Enteric glia. *Glia.*
- Gershon, M.D., and Rothman, T.P. (1991). Enteric glia. *Glia* 4, 195–204.
- Gervais, F.G., Cruz, R.P., Chateauneuf, a, Gale, S., Sawyer, N., Nantel, F., Metters, K.M., and O'Neill, G.P. (2001). Selective modulation of chemokinesis, degranulation, and apoptosis in eosinophils through the PGD2 receptors CRTH2 and DP. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, 982–988.
- Gewirtz, a. T., Navas, T. a., Lyons, S., Godowski, P.J., and Madara, J.L. (2001). Cutting Edge: Bacterial Flagellin Activates Basolaterally Expressed TLR5 to Induce Epithelial Proinflammatory Gene Expression. *J. Immunol.* 167, 1882–1885.
- Ghia, J., Blennerhassett, P., Kumar-ondiveeran harry, Verdu, E.F., and Collins, S.M. (2006). The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* 1122–1130.
- Giaffer, M.H., Holdsworth, C.D., and Duerden, B.I. (1991). The assessment of faecal flora in patients with inflammatory bowel disease by a simplified bacteriological technique. *J. Med. Microbiol.* 35, 238–243.
- Gilbert, S., Zhang, R., Denson, L., Moriggl, R., Steinbrecher, K., Shroyer, N., Lin, J., and Han, X. (2012). Enterocyte STAT5 promotes mucosal wound healing via suppression of myosin light chain kinase-mediated loss of barrier function and inflammation. *EMBO Mol. Med.* 4, 109–124.
- Gillen, C.D., Walmsley, R.S., Prior, P., Andrews, H. a, and Allan, R.N. (1994a). Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* 35, 1590–1592.
- Gillen, C.D., Andrews, H.A., Prior, P., Allan, R.N., and Elizabeth, Q. (1994b). Crohn ' s disease and colorectal cancer. 651–655.
- Giovannucci, E., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Ascherio, A., and Willett, W.C. (1994). Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res.* 54, 2390–2397.
- Girardin, S.E., and Philpott, D.J. (2004). Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity. *Eur. J. Immunol.* 34, 1777–1782.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., and Sansonetti, P.J. (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 278, 8869–8872.

- Glasser, a.-L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M.-H., Colombel, J.-F., and Darfeuille-Michaud, a. (2001). Adherent Invasive Escherichia coli Strains from Patients with Crohn's Disease Survive and Replicate within Macrophages without Inducing Host Cell Death. *Infect. Immun.* 69, 5529–5537.
- Glocker, E.-O., Frede, N., Perro, M., Sebire, N., Elawad, M., Shah, N., and Grimbacher, B. (2010). Infant colitis-it's in the genes. *Lancet* 376, 1272.
- Goehler, L., Gaykema, R., and Hansen, M. (2000). Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. *Auton. Neurosci.* 85, 49–59.
- Göke, 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.
- Gomes, P., and Chevalier, J. (2009). ATP-dependent paracrine communication between enteric neurons and glia in a primary cell culture derived from embryonic mice. *Neurogastroenterol. Motil.*
- Gomes, O.A., de Souza, R.R., and Liberti, E.A. (1997). A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. *Gerontology* 43, 210–217.
- Gonzalez-Mariscal, Betanzos, A., Nava, P., Jaramillo, B.E., and Gonz, L. (2003). Tight junction proteins. *81*, 1–44.
- Gordon, B.J.R., and Galli, S.J. (1991). Release of Both Preformed and Newly Synthesized Tumor Necrosis Factor α (TNF- α)/Cachectin by Mouse Mast Cells Stimulated via the. *174*, 1–5.
- Gosu, V., Basith, S., Kwon, O.-P., and Choi, S. (2012). Therapeutic applications of nucleic acids and their analogues in Toll-like receptor signaling. *Molecules* 17, 13503–13529.
- Goto, Y., and Ivanov, I.I. (2013). Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk. *Immunol. Cell Biol.* 91, 204–214.
- Goto, Y., and Kiyono, H. (2011). Epithelial cell microRNAs in gut immunity. *Nat. Immunol.* 12, 195–197.
- Goto, Y., and Kiyono, H. (2012). Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol. Rev.* 245, 147–163.
- Gougeon, P.-Y., Lourens, S., Han, T.Y., Nair, D.G., Ropeleski, M.J., and Blennerhassett, M.G. (2013). The pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α are neurotrophic for enteric neurons. *J. Neurosci.* 33, 3339–3351.
- Gould, S.R., Brash, A.R., and Conolly, M.E. (1977). Increased prostaglandin production in ulcerative colitis. *Lancet* 2, 98.
- Gower-Rousseau, C., Vasseur, F., Fumery, M., Savoye, G., Salleron, J., Dauchet, L., Turck, D., Cortot, A., Peyrin-Biroulet, L., and Colombel, J.F. (2013). Epidemiology of inflammatory bowel diseases: new insights from a French population-based registry (EPIMAD). *Dig. Liver Dis.* 45, 89–94.
- Goyal and Hirano (1996). The Enteric Nervous System. *N. Engl. J. Med.* 1106–1116.
- Greene, M.E., Blumberg, B., McBride, O.W., Yi, H.F., Kronquist, K., Kwan, K., Hsieh, L., Greene, G., and Nimer, S.D. (1995). Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr.* 4, 281–299.
- Greenhough, A., Smartt, H.J.M., Moore, A.E., Roberts, H.R., Williams, A.C., Paraskeva, C., and Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 30, 377–386.
- Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.-W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F., and Karin, M. (2004). IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118, 285–296.
- Grimm, M.C., Elsbury, S.K., Pavli, P., and Doe, W.F. (1996). Interleukin 8: cells of origin in inflammatory bowel disease. *Gut* 38, 90–98.
- Groeger, D., O'Mahony, L., Murphy, E.F., Bourke, J.F., Dinan, T.G., Kiely, B., Shanahan, F., and Quigley, E.M.M. (2013). Bifidobacterium infantis 35624 modulates host inflammatory processes beyond the gut. *Gut Microbes* 4, 325–339.
- Groschwitz, K.R., and Hogan, S.P. (2011). Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 3–20.

- Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schäfer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Förster, I., and Ruland, J. (2006). Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 442, 651–656.
- Grünewald, S., Huyben, K., de Jong, J.G., Smeitink, J. a, Rubio, E., Boers, G.H., Conradt, H.S., Wendel, U., and Wevers, R. a (1999). beta-Trace protein in human cerebrospinal fluid: a diagnostic marker for N-glycosylation defects in brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1455, 54–60.
- Gruol, D.L., and Nelson, T.E. (1997). Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* 15, 307–339.
- Guan, Y., Zhang, Y., Davis, L., and Breyer, M.D. (1997). Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in urinary tract of rabbits and humans. *Am. J. Physiol.* 273, F1013–22.
- Gulbransen, B.D., and Sharkey, K. a (2012). Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 625–632.
- Gunesh, S., Thomas, G. a O., Williams, G.T., Roberts, a, and Hawthorne, a B. (2008). The incidence of Crohn's disease in Cardiff over the last 75 years: an update for 1996–2005. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 27, 211–219.
- Günther, C., Neumann, H., Neurath, M.F., and Becker, C. (2013). Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut* 62, 1062–1071.
- Günther, C., Buchen, B., Neurath, M.F., and Becker, C. (2014). Regulation and pathophysiological role of epithelial turnover in the gut. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1–11.
- Gupta, R.A., and Dubois, R.N. (2002). invited review. 266–269.
- Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F., Nunez, G., and Fernandez-Luna, J.L. (2002). Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J. Biol. Chem.* 277, 41701–41705.
- Hachem, S., Aguirre, a, Vives, V., Marks, a, Gallo, V., and Legraverend, C. (2005). Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage. *Glia* 51, 81–97.
- Hagiwara, C., Tanaka, M., and Kudo, H. (2002). Increase in colorectal epithelial apoptotic cells in patients with ulcerative colitis ultimately requiring surgery. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 758–764.
- Hailer, N.P., Wirjatijasa, F., Roser, N., Hischebeth, G.T., Korf, H.W., and Dehghani, F. (2001). Astrocytic factors protect neuronal integrity and reduce microglial activation in an in vitro model of N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur. J. Neurosci.* 14, 315–326.
- Halassa, M.M., Fellin, T., and Haydon, P.G. (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol. Med.* 13, 54–63.
- Hällgren, a, Flemström, G., and Nylander, O. (1998). Interaction between neurokinin A, VIP, prostanoids, and enteric nerves in regulation of duodenal function. *Am. J. Physiol.* 275, G95–103.
- Halttunen, T., Marttinen, A., Rantala, I., and Kainulainen, H. (1996). Fibroblasts and Transforming Growth Factor. 1252–1262.
- Hamelers, I.H.L., Olivo, C., Mertens, A.E.E., Pegtel, D.M., van der Kammen, R. a, Sonnenberg, A., and Collard, J.G. (2005). The Rac activator Tiam1 is required for (alpha)3(beta)1-mediated laminin-5 deposition, cell spreading, and cell migration. *J. Cell Biol.* 171, 871–881.
- Hamodeh, S. a, Rehn, M., Haschke, G., and Diener, M. (2004). Mechanism of butyrate-induced hyperpolarization of cultured rat myenteric neurones. *Neurogastroenterol. Motil.* 16, 597–604.
- Hampe, J., Cuthbert, A., Croucher, P.J., Mirza, M.M., Mascheretti, S., Fisher, S., Frenzel, H., King, K., Hasselmeier, A., MacPherson, A.J., et al. (2001). Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357, 1925–1928.
- Hampe, J., Grebe, J., Nikolaus, S., Solberg, C., Croucher, P.J.P., Mascheretti, S., Jahnsen, J., Moum, B., Klump, B., Krawczak, M., et al. (2002). Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 359, 1661–1665.
- Han, X., Osuntokun, B., Benight, N., Loesch, K., Frank, S.J., and Denson, L.A. (2006). Signal transducer and activator of transcription 5b promotes mucosal tolerance in pediatric Crohn's disease and murine colitis. *Am. J. Pathol.* 169, 1999–2013.

- Hanai, H., and Sugimoto, K. (2009). Curcumin has bright prospects for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr. Pharm. Des.* 15, 2087–2094.
- Hanani, M., and Reichenbach, A. (1994). Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 278, 153–160.
- Hanani, M., Zamir, O., and Baluk, P. (1989). Glial cells in the guinea pig myenteric plexus are dye coupled. *Brain Res.* 497, 245–249.
- Hanani, M., Francke, M., Härtig, 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., Fellig, Y., Udassin, R., and Freund, H.R. (2004). Age-related changes in the morphology of the myenteric plexus of the human colon. *Auton. Neurosci.* 113, 71–78.
- Hansen, M.B. (2003). The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol. Toxicol.* 92, 105–113.
- Hansen, M.B., and Skadhauge, E. (1997). Signal transduction pathways for serotonin as an intestinal secretagogue. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* 118, 283–290.
- Hansen, R., Thomson, J.M., Fox, J.G., El-Omar, E.M., and Hold, G.L. (2011). Could *Helicobacter* organisms cause inflammatory bowel disease? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 61, 1–14.
- Hardy, C.C., Robinson, C., Tattersfield, A.E., and Holgate, S.T. (1984). The bronchoconstrictor effect of inhaled prostaglandin D2 in normal and asthmatic men. *N. Engl. J. Med.* 311, 209–213.
- Hart, A.L., Al-Hassi, H.O., Rigby, R.J., Bell, S.J., Emmanuel, A. V., Knight, S.C., Kamm, M. a., and Stagg, A.J. (2005). Characteristics of Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 129, 50–65.
- Hasnain, S.Z., Wang, H., Ghia, J.-E., Haq, N., Deng, Y., Velcich, A., Grecis, R.K., Thornton, D.J., and Khan, W.I. (2010). Mucin gene deficiency in mice impairs host resistance to an enteric parasitic infection. *Gastroenterology* 138, 1763–1771.
- Hassan, A., Ibrahim, A., Mbodji, K., Coëffier, M., Ziegler, F., Bounoure, F., Chardigny, J.-M., Skiba, M., Savoye, G., Déchelotte, P., et al. (2010). An α -linolenic acid-rich formula reduces oxidative stress and inflammation by regulating NF- κ B in rats with TNBS-induced colitis. *J. Nutr.* 140, 1714–1721.
- Hassani, H., Lucas, G., Rozell, B., and Ernfors, P. (2005). Attenuation of acute experimental colitis by preventing NPY Y1 receptor signaling. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288, G550–6.
- Hassel, B., Paulsen, R.E., Johnsen, A., and Fonnum, F. (1992). Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res.* 576, 120–124.
- Hausmann, M., Kiessling, S., Mestermann, S., Webb, G., Spöttl, T., Andus, T., Schölmerich, J., Herfarth, H., Ray, K., Falk, W., et al. (2002). Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 122, 1987–2000.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, a, Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, a (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099–1103.
- 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.
- Hayes, J.D., and McMahon, M. (2006). The double-edged sword of Nrf2: subversion of redox homeostasis during the evolution of cancer. *Mol. Cell* 21, 732–734.
- Haynes, R.L., and van Leyen, K. (2013). 12/15-lipoxygenase expression is increased in oligodendrocytes and microglia of periventricular leukomalacia. *Dev. Neurosci.* 35, 140–154.
- Heanue, T.A., and Pachnis, V. (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung’s disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 466–479.
- Van Heel, D. a, Ghosh, S., Butler, M., Hunt, K., Foxwell, B.M.J., Mengin-Lecreulx, D., and Playford, R.J. (2005). Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *Eur. J. Immunol.* 35, 2471–2476.

- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526–1529.
- Heizmann, C.W. (2002). The multifunctional S100 protein family. *Methods Mol. Biol.* 172, 69–80.
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Bürgel, N., Fromm, M., et al. (2005). Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution. *Gastroenterology* 129, 550–564.
- Heller, F., Fromm, A., Gitter, A.H., Mankertz, J., and Schulzke, J.-D. (2008). Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunol.* 1 Suppl 1, S58–61.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740–745.
- Henckaerts, L., and Vermeire, S. (2007). NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 235–241.
- Heresbach, D., Alizadeh, M., Dabadie, A., Le Berre, N., Colombel, J.F., Yaouanq, J., Bretagne, J.F., and Semana, G. (1997a). Significance of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist genetic polymorphism in inflammatory bowel diseases. *Am. J. Gastroenterol.* 92, 1164–1169.
- Heresbach, D., Ababou, A., Bourienne, A., Alizadeh, M., Quelvennec, E., Pagenault, M., Dabadie, A., Berre, N.H., Campion, J.P., Launois, B., et al. (1997b). [Polymorphism of the microsatellites and tumor necrosis factor genes in chronic inflammatory bowel diseases]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 21, 555–561.
- Hering, N. a, Fromm, M., and Schulzke, J.-D. (2012). Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J. Physiol.* 590, 1035–1044.
- Herrmann, C., Göke, R., Richter, G., Fehmann, H.C., Arnold, R., and Göke, B. (1995). Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 56, 117–126.
- Hibi, M., Nakajima, K., and Hirano, T. (1996). IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J. Mol. Med. (Berl).* 74, 1–12.
- Hide, I., Tanaka, M., and Inoue, A. (2000). Extracellular ATP Triggers Tumor Necrosis Factor- α Release from Rat Microglia. *J. Neurochem.*
- Hiemstra, I.H., Bouma, G., Geerts, D., Kraal, G., and den Haan, J.M.M. (2012). Nod2 improves barrier function of intestinal epithelial cells via enhancement of TLR responses. *Mol. Immunol.* 52, 264–272.
- Hilsden, R., Meddings, J., and Sutherland, L. (1996). Intestinal permeability changes in response to acetylsalicylic acid in relatives of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 110, 1395–1403.
- Hirabayashi, T., and Shimizu, T. (2000). Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2). *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 124–138.
- 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.
- Hisamatsu, T., Kanai, T., Mikami, Y., Yoneno, K., Matsuoka, K., and Hibi, T. (2013). Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol. Ther.* 137, 283–297.
- Ho, S., Pothoulakis, C., and Koon, H.W. (2013). Antimicrobial peptides and colitis. *Curr. Pharm. Des.* 19, 40–47.
- Hoehner, J.C., Wester, T., Pålman, S., and Olsen, L. (1996). Alterations in neurotrophin and neurotrophin-receptor localization in Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* 31, 1524–1529.
- Hoff, S., Zeller, F., von weyhern, claus werner hann, 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.* 371, 356–371.
- Hokari, R., Nagata, N., Kurihara, C., Watanabe, C., Komoto, S., Okada, Y., Kawaguchi, A., Nagao, S., Hibi, T., Nagata, K., et al. (2009). Increased expression and cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in *Helicobacter pylori*-induced gastritis. *J. Pathol.* 219, 417–426.

- Hokari, R., Kurihara, C., Nagata, N., Aritake, K., Okada, Y., Watanabe, C., Komoto, S., Nakamura, M., Kawaguchi, A., Nagao, S., et al. (2011). Increased expression of lipocalin-type-prostaglandin D synthase in ulcerative colitis and exacerbating role in murine colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **300**, G401–8.
- Hokari, R., Matsunaga, H., and Miura, S. (2013). Effect of dietary fat on intestinal inflammatory diseases. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **28 Suppl 4**, 33–36.
- Holland-Cunz, S., Göppl, M., Rauch, U., Bär, C., Klotz, M., and Schäfer, K.-H. (2006). Acquired intestinal aganglionosis after a lytic infection with varicella-zoster virus. *J. Pediatr. Surg.* **41**, e29–31.
- Hons, I.M., Burda, J.E., Grider, J.R., Mawe, G.M., and Sharkey, K. a (2009). Alterations to enteric neural signaling underlie secretory abnormalities of the ileum in experimental colitis in the guinea pig. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **296**, G717–26.
- Hooper, L. V. (2001). Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. *Science* (80-.). **292**, 1115–1118.
- Hopfer, U., and Groseclose, R. (1980). The mechanism of Na⁺-dependent D-glucose transport. *J. Biol. Chem.* **255**, 4453–4462.
- Hopkins, D.A., Bieger, D., deVente, J., and Steinbusch, W.M. (1996). Vagal efferent projections: viscerotopy, neurochemistry and effects of vagotomy. *Prog. Brain Res.* **107**, 79–96.
- Hosoda, K., Hammer, R.E., Richardson, J. a, Baynash, a G., Cheung, J.C., Giaid, a, and Yanagisawa, M. (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* **79**, 1267–1276.
- Hotte, N.S.C., Salim, S.Y., Tso, R.H., Albert, E.J., Bach, P., Walker, J., Dieleman, L. a, Fedorak, R.N., and Madsen, K.L. (2012). Patients with inflammatory bowel disease exhibit dysregulated responses to microbial DNA. *PLoS One* **7**, e37932.
- Howe, K.L., Reardon, C., Wang, A., Nazli, A., and McKay, D.M. (2005). Transforming growth factor-beta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced increased permeability. *Am. J. Pathol.* **167**, 1587–1597.
- Hoyle, C.H., and Burnstock, G. (1989). Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *J. Anat.* **166**, 7–22.
- Hsi, L.C., Wilson, L.C., and Eling, T.E. (2002). Opposing effects of 15-lipoxygenase-1 and -2 metabolites on MAPK signaling in prostate. Alteration in peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* **277**, 40549–40556.
- Hua, F., Ma, J., Ha, T., Xia, Y., Kelley, J., Williams, D.L., Kao, R.L., Browder, I.W., Schweitzer, J.B., Kalbfleisch, J.H., et al. (2007). Activation of Toll-like receptor 4 signaling contributes to hippocampal neuronal death following global cerebral ischemia/reperfusion. *J. Neuroimmunol.* **190**, 101–111.
- Huang, Y., Erdmann, N., Zhao, J., and Zheng, J. (2005). The signaling and apoptotic effects of TNF-related apoptosis-inducing ligand in HIV-1 associated dementia. *Neurotox. Res.* **8**, 135–148.
- Hugot, J.-P., and Cho, J.H. (2002). Update on genetics of inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **18**, 410–415.
- Hugot, J., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Ce, J., Macrykk, J., and Thomas, G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **599**–603.
- Hugot, J.P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Olson, J.M., Lee, J.C., Beaugier, L., Naom, I., Dupas, J.L., Van Gossum, A., Orholm, M., et al. (1996). Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* **379**, 821–823.
- Humphries, M.J. (1996). Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 632–640.
- Hyams, J.S., Fitzgerald, J.E., Wyzga, N., Muller, R., Treem, W.R., Justinich, C.J., and Kreutzer, D.L. (1995). Relationship of interleukin-1 receptor antagonist to mucosal inflammation in inflammatory bowel disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **21**, 419–425.
- Hyun, E., Steinhoff, M., and Vergnolle, N. (2008). actor in intestinal inflammation Protease-activated receptor-2 activation : a major actor in intestinal inflammation. *Gut*.

- Iacucci, M., de Silva, S., and Ghosh, S. (2010). Mesalazine in inflammatory bowel disease: a trendy topic once again? *Can. J. Gastroenterol.* 24, 127–133.
- Ibba-Manneschi, L., Martini, M., Zecchi-Orlandini, S., and Faussone-Pellegrini, M.S. (1995). Structural organization of enteric nervous system in human colon. *Histol. Histopathol.* 10, 17–25.
- Igarashi, Y., Utsumi, H., Chiba, H., Yamada-Sasamori, Y., Tobioka, H., Kamimura, Y., Furuuchi, K., Kokai, Y., Nakagawa, T., Mori, M., et al. (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 108–112.
- Ina, K., Itoh, J., Fukushima, K., Kusugami, K., Yamaguchi, T., Kyokane, K., Imada, A., Binion, D.G., Musso, A., West, G.A., et al. (1999). Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J. Immunol.* 163, 1081–1090.
- Innamorato, N.G., Rojo, A.I., García-Yagüe, A.J., Yamamoto, M., de Ceballos, M.L., and Cuadrado, A. (2008). The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J. Immunol.* 181, 680–689.
- Irie, H., Harada, Y., Yoshihashi, H., Kimura, T., Kojima, M., Kataoka, M., Saito, M., Sugawara, Y., and Mori, W. (1989). Spread of herpes simplex virus type-1 (Miyama +GC strain) to the central nervous system after intraperitoneal inoculation: the role of the myenteric plexus of the gut. *Arch. Virol.* 105, 247–257.
- Irvine, E.J., and Marshall, J.K. (2000). Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* 119, 1740–1744.
- Ishikawa, H., Matsumoto, S., Ohashi, Y., Imaoka, A., Setoyama, H., Umesaki, Y., Tanaka, R., and Otani, T. (2011). Beneficial effects of probiotic bifidobacterium and galacto-oligosaccharide in patients with ulcerative colitis: a randomized controlled study. *Digestion* 84, 128–133.
- Van Itallie, C., Rahner, C., and Anderson, J.M. (2001). Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J. Clin. Invest.* 107, 1319–1327.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1999a). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13, 76–86.
- Itoh, K., Mochizuki, M., Ishii, Y., Ishii, T., Shibata, T., Kawamoto, Y., Kelly, V., Sekizawa, K., Uchida, K., and Yamamoto, M. (2004). Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin j(2). *Mol. Cell. Biol.* 24, 36–45.
- Itoh, M., Morita, K., and Tsukita, S. (1999b). Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J. Biol. Chem.* 274, 5981–5986.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S. (1999c). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell Biol.* 147, 1351–1363.
- Iwamoto, M., Koji, T., and Nobuyuki, K.M.A.K.I.Y.A.M.A. (1996). APOPTOSIS OF CRYPT EPITHELIAL CELLS IN. *180*, 152–159.
- Jl, W., H, V., W, H., T, W., and H., L. (1993). Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease.
- Jackson, A.C., Rossiter, J.P., and Lafon, M. (2006). Expression of Toll-like receptor 3 in the human cerebellar cortex in rabies, herpes simplex encephalitis, and other neurological diseases. *J. Neurovirol.* 12, 229–234.
- Jackson, S.M., Parhami, F., Xi, X.-P., Berliner, J. a., Hsueh, W. a., Law, R.E., and Demer, L.L. (1999). Peroxisome Proliferator Activated Receptor Activators Target Human Endothelial Cells to Inhibit Leukocyte Endothelial Cell Interaction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 2094–2104.
- Jacobsen, B. a, Fallingborg, J., Rasmussen, H.H., Nielsen, K.R., Drewes, A.M., Puho, E., Nielsen, G.L., and Sørensen, H.T. (2006). Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 601–606.
- Jacobson, K., McHugh, K., and Collins, S.M. (1995). Experimental colitis alters myenteric nerve function at inflamed and noninflamed sites in the rat. *Gastroenterology* 109, 718–722.
- Jäger, S., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2013). Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbecks. Arch. Surg.* 398, 1–12.

- Jakobsson, P.J., Thorén, S., Morgenstern, R., and Samuelsson, B. (1999). Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7220–7225.
- Jantchou, P., Morois, S., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.-C., and Carbonnel, F. (2010). Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: The E3N prospective study. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2195–2201.
- Janzer, R.C., and Raff, M.C. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325, 253–257.
- 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.
- Jeon, M.K., Klaus, C., Kaemmerer, E., and Gassler, N. (2013). Intestinal barrier: Molecular pathways and modifiers. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 4, 94–99.
- Jess, T., Winther, K. V., Munkholm, P., Langholz, E., and Binder, V. (2004). Intestinal and extra-intestinal cancer in Crohn's disease: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County, Denmark. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 19, 287–293.
- Jess, T., Riis, L., Jespersgaard, C., Hougs, L., Andersen, P.S., Orholm, M.K., Binder, V., and Munkholm, P. (2005). Disease concordance, zygosity, and NOD2/CARD15 status: follow-up of a population-based cohort of Danish twins with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 100, 2486–2492.
- Jessen, K.R. (2004). Glial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1861–1867.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1980). Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 286, 736–737.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1983). Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J. Neurosci.* 3, 2206–2218.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1985). Glial fibrillary acidic polypeptides in peripheral glia. Molecular weight, heterogeneity and distribution. *J. Neuroimmunol.* 8, 377–393.
- Jiang, M.M., and Surprenant, A. (1992). Re-innervation of submucosal arterioles by myenteric neurones following extrinsic denervation. *J. Auton. Nerv. Syst.* 37, 145–154.
- Jiang, Y., Liu, M., and Gershon, M.D. (2003). Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev. Biol.* 258, 364–384.
- Jijon, H., Allard, B., and Jobin, C. (2004). NF-kappaB inducing kinase activates NF-kappaB transcriptional activity independently of IkappaB kinase gamma through a p38 MAPK-dependent RelA phosphorylation pathway. *Cell. Signal.* 16, 1023–1032.
- Jijon, H.B., Panenka, W.J., Madsen, K.L., and Parsons, H.G. (2002). MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C31–41.
- Johansson, M.E. V, and Hansson, G.C. (2012). Preservation of mucus in histological sections, immunostaining of mucins in fixed tissue, and localization of bacteria with FISH. *Methods Mol. Biol.* 842, 229–235.
- Johansson, M.E. V, Gustafsson, J.K., Holmén-Larsson, J., Jabbar, K.S., Xia, L., Xu, H., Ghishan, F.K., Carvalho, F. a, Gewirtz, A.T., Sjövall, H., et al. (2014). Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut* 63, 281–291.
- Johansson, U., Walther-Jallow, L., Hofmann, A., and Spetz, A.-L. (2011). Dendritic cells are able to produce IL-12p70 after uptake of apoptotic cells. *Immunobiology* 216, 251–255.
- Jones, H.F., Butler, R.N., and Brooks, D.A. (2011). Intestinal fructose transport and malabsorption in humans. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G202–6.
- Joseph, N., He, S., and Quintana, E. (2011). Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. *J. Clin. ...* 4.
- Jung, H.C., Eckmann, L., Yang, S., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-wroblewska, E., and Kagnoff, M.F. (1995). *Sp.* 95, 55–65.

- Kabashima, K., Saji, T., Murata, T., Nagamachi, M., Matsuoka, T., Segi, E., Tsuboi, K., Sugimoto, Y., Kobayashi, T., Miyachi, Y., et al. (2002). The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J. Clin. Invest.* 109, 883–893.
- Kabeerdoss, J., Pugazhendhi, S., Subramanian, V., Binder, H.J., and Ramakrishna, B.S. (2011). Exposure to hookworms in patients with Crohn's disease: a case-control study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 34, 923–930.
- Kabututu, Z., Manin, M., Pointud, J.-C., Maruyama, T., Nagata, N., Lambert, S., Lefrançois-Martinez, A.-M., Martinez, A., and Urade, Y. (2009). Prostaglandin F2alpha synthase activities of aldo-keto reductase 1B1, 1B3 and 1B7. *J. Biochem.* 145, 161–168.
- Kamdar, K., Nguyen, V., and DePaolo, R.W. (2013). Toll-like receptor signaling and regulation of intestinal immunity. *Virulence* 4, 207–212.
- Kanaoka, Y., and Urade, Y. (2003). Hematopoietic prostaglandin D synthase. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* 69, 163–167.
- Kanaoka, Y., Ago, H., Inagaki, E., Nanayama, T., Miyano, M., Kikuno, R., Fujii, Y., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y., et al. (1997). Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell* 90, 1085–1095.
- Kaplan, G.G., Hubbard, J., Korzenik, J., Sands, B.E., Panaccione, R., Ghosh, S., Wheeler, A.J., and Villeneuve, P.J. (2010). The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2412–2419.
- Karatzas, P.S., Gazouli, M., Safioleas, M., and Mantzaris, G.J. (2014). DNA methylation changes in inflammatory bowel disease. *Ann. Gastroenterol. Q. Publ. Hell. Soc. Gastroenterol.* 27, 125–132.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431–436.
- Karin, M., and Greten, F.R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 749–759.
- Karmeli, F., Cohen, P., and Rachmilewitz, D. (2000). Cyclo-oxygenase-2 inhibitors ameliorate the severity of experimental colitis in rats. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 223–231.
- Kaser, A., and Tilg, H. (2012). “Metabolic aspects” in inflammatory bowel diseases. *Curr. Drug Deliv.* 9, 326–332.
- Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R.S. (2010). Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 573–621.
- Kaspar, M., Zardi, L., and Neri, D. (2006). Fibronectin as target for tumor therapy. *Int. J. Cancer* 118, 1331–1339.
- Katayama, K., Ueda, N., Kurahashi, Y., Suzuki, H., Yamamoto, S., and Kato, I. (1997). Distribution of anandamide amidohydrolase in rat tissues with special reference to small intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 1347, 212–218.
- 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, 514–519.
- Kaufmann, W.E., Andreasson, K.I., Isakson, P.C., and Worley, P.F. (1997a). Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins* 54, 601–624.
- Kaufmann, W.E., Worley, P.F., Taylor, C. V, Bremer, M., and Isakson, P.C. (1997b). Cyclooxygenase-2 expression during rat neocortical development and in Rett syndrome. *Brain Dev.* 19, 25–34.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 13, 460–469.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). Review The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : update on Toll-like receptors. *Nat. Publ. Gr.* 11, 373–384.
- Kawamoto, Y. (2000). Cyclopentenone Prostaglandins as Potential Inducers of Phase II Detoxification Enzymes. 15-DEOXY-Delta 12,14-PROSTAGLANDIN J2-INDUCED EXPRESSION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES. *J. Biol. Chem.* 275, 11291–11299.
- Keates, A.C., Castagliuolo, I., Qiu, B., Nikulasson, S., Sengupta, A., and Pothoulakis, C. (1998). CGRP upregulation in dorsal root ganglia and ileal mucosa during Clostridium difficile toxin A-induced enteritis. *Am. J. Physiol.* 274, G196–202.

- 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, 847–856.
- Kellum, J.M., Albuquerque, F.C., Stoner, M.C., and Harris, R.P. (1999). Stroking human jejunal mucosa induces 5-HT release and Cl⁻ secretion via afferent neurons and 5-HT₄ receptors. *Am. J. Physiol.* 277, G515–20.
- Kelsh, R.N. (2006). Sorting out Sox10 functions in neural crest development. *Bioessays* 28, 788–798.
- Keogh, B., and Parker, A.E. (2011). Toll-like receptors as targets for immune disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 435–442.
- Keshavarzian, a, Fusunyan, R.D., Jacyno, M., Winship, D., MacDermott, R.P., and Sanderson, I.R. (1999). Increased interleukin-8 (IL-8) in rectal dialysate from patients with ulcerative colitis: evidence for a biological role for IL-8 in inflammation of the colon. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 704–712.
- Kielian, T. (2006). Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J. Neurosci. Res.* 83, 711–730.
- Kikawa, Y., and Narumiya, S. (1984). prostaglandin D₂ formed in human plasma. 81, 1317–1321.
- Kiliaan, A.J., Saunders, P.R., Bijlsma, P.B., Berin, M.C., Taminiau, J.A., Groot, J.A., and Perdue, M.H. (1998). Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am. J. Physiol.* 275, G1037–44.
- Kim, E.-H., and Surh, Y.-J. (2006). 15-deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J₂ as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1516–1528.
- Kim, S.C., Tonkonogy, S.L., Albright, C.A., Tsang, J., Balish, E.J., Braun, J., Huycke, M.M., and Sartor, R.B. (2005). Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology* 128, 891–906.
- 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, 604–612.
- Kinoshita, M., Suzuki, Y., and Saito, Y. (2002). Butyrate reduces colonic paracellular permeability by enhancing PPAR α activation. 293, 827–831.
- Kirchgessner, A.L., and Gershon, M.D. (1988). Projections of submucosal neurons to the myenteric plexus of the guinea pig intestine: in vitro tracing of microcircuits by retrograde and anterograde transport. *J. Comp. Neurol.* 277, 487–498.
- Kirchgessner, A.L., and Gershon, M.D. (1989). Identification of vagal efferent fibers and putative target neurons in the enteric nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 285, 38–53.
- Kirchgessner, A.L., Gershon, M.D., and Biology, C. (1990). by Neurons in the Gut.
- Kirchhoff, F., Dringen, R., and Giaume, C. (2001). Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 251, 159–169.
- Kirsner, J.B. (2001). Historical origins of current IBD concepts. *World J. Gastroenterol.* 7, 175–184.
- Kitamura, S., Miyazaki, Y., Shinomura, Y., Kondo, S., Kanayama, S., and Matsuzawa, Y. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 90, 75–80.
- Klag, T., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2013). Defective antibacterial barrier in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis.* 31, 310–316.
- Klein, S., Seidler, B., Kettenberger, A., Sibaev, A., Rohn, M., Feil, R., Allescher, H.-D., Vanderwinden, J.-M., Hofmann, F., Schemann, M., et al. (2013). Interstitial cells of Cajal integrate excitatory and inhibitory neurotransmission with intestinal slow-wave activity. *Nat. Commun.* 4, 1630.
- Klement, E., Cohen, R. V, Boxman, J., Joseph, A., and Reif, S. (2004). Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1342–1352.
- Kliwer, S. a, Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C., and Lehmann, J.M. (1995). A prostaglandin J₂ metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83, 813–819.

- Kliwer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A., and Evans, R.M. (1992). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358, 771–774.
- Kobayashi, M., and Yamamoto, M. (2006). Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv. Enzyme Regul.* 46, 113–140.
- Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nuñez, G., and Flavell, R.A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307, 731–734.
- 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, 32965–32973.
- Kollias, G. (2005). TNF pathophysiology in murine models of chronic inflammation and autoimmunity. *Semin. Arthritis Rheum.* 34, 3–6.
- Kominsky, D.J., Campbell, E.L., Ehrentaut, S.F., Wilson, K.E., Kelly, C.J., Glover, L.E., Collins, C.B., Bayless, A.J., Saeedi, B., Dobrinskikh, E., et al. (2014). IFN- γ -mediated induction of an apical IL-10 receptor on polarized intestinal epithelia. *J. Immunol.* 192, 1267–1276.
- Koon, H.W., and Pothoulakis, C. (2006). Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1088, 23–40.
- Koskela, H., Purokivi, M., Nieminen, R., and Moilanen, E. (2012). The cough receptor TRPV1 agonists 15(S)-HETE and LTB4 in the cough response to hypertonicity. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 11, 102–108.
- Koslowski, M.J., Beisner, J., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2010). Innate antimicrobial host defense in small intestinal Crohn's disease. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 34–40.
- Kotlarz, D., Beier, R., Murugan, D., Diestelhorst, J., Jensen, O., Boztug, K., Pfeifer, D., Kreipe, H., Pfister, E.-D., Baumann, U., et al. (2012). Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology* 143, 347–355.
- Koutroubakis, I.E., and Vlachonikolis, I.G. (2000). Appendectomy and the development of ulcerative colitis: results of a metaanalysis of published case-control studies. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 171–176.
- Koutroubakis, I.E., Vlachonikolis, I.G., and Kouroumalis, E.A. (2002). Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm. Bowel Dis.* 8, 277–286.
- Krajina, T., Leithäuser, F., Möller, P., Trobonjaca, Z., and Reimann, J. (2003). Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4+ T cell-induced colitis. *Eur. J. Immunol.* 33, 1073–1083.
- Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., and Lee, G. (2007). Toll-like receptor signal transduction. *Exp. Mol. Med.* 39, 421–438.
- Krug, A., Luker, G.D., Barchet, W., Leib, D. a, Akira, S., and Colonna, M. (2004). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 103, 1433–1437.
- Krug, S.M., Amasheh, S., Richter, J.F., Milatz, S., Günzel, D., Westphal, J.K., Huber, O., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2009). Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol. Biol. Cell* 20, 3713–3724.
- Kubota, Y., Petras, R.E., Ottaway, C.A., Tubbs, R.R., Farmer, R.G., and Fiocchi, C. (1992). Colonic vasoactive intestinal peptide nerves in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 102, 1242–1251.
- Kucharzik, T., Walsh, S. V, Chen, J., Parkos, C. a, and Nusrat, a (2001). Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am. J. Pathol.* 159, 2001–2009.
- Kucher, B., and Neary, J. (2005). Bi-functional effects of ATP/P2 receptor activation on tumor necrosis factor- α release in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes. *J. Neurochem.* 525–535.
- Kugathasan, S., Loizides, A., Babusukumar, U., McGuire, E., Wang, T., Hooper, P., Nebel, J., Kofman, G., Noel, R., Broeckel, U., et al. (2005). Comparative phenotypic and CARD15 mutational analysis among African American, Hispanic, and White children with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 11, 631–638.

- 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*, 266–271.
- Kullberg, M.C., Ward, J.M., Gorelick, P.L., Caspar, P., Hieny, S., Cheever, A., Jankovic, D., and Sher, A. (1998). *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism. *Infect. Immun.* *66*, 5157–5166.
- Kundumani-Sridharan, V., Dyukova, E., Hansen, D.E., and Rao, G.N. (2013). 12/15-Lipoxygenase mediates high-fat diet-induced endothelial tight junction disruption and monocyte transmigration: a new role for 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid in endothelial cell dysfunction. *J. Biol. Chem.* *288*, 15830–15842.
- Kux, K., and Pitsouli, C. (2014). Tissue communication in regenerative inflammatory signaling: lessons from the fly gut. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *4*, 49.
- Lacy, E.R. (1988). Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. *J. Clin. Gastroenterol.* *10 Suppl 1*, S72–7.
- Laerum, O.D., Illemaan, M., Skarstein, A., Helgeland, L., Ovrebo, K., Danø, K., and Nielsen, B.S. (2008). Crohn's disease but not chronic ulcerative colitis induces the expression of PAI-1 in enteric neurons. *Am. J. Gastroenterol.* *103*, 2350–2358.
- Lafon, M., Megret, F., Lafage, M., and Prehaud, C. (2006). The Innate Immune Facet of Brain. *J. Mol. Neurosci.* *29*, 185–194.
- Lakatos, P.L., Szamosi, T., and Lakatos, L. (2007). Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J. Gastroenterol.* *13*, 6134–6139.
- Lala, S., Ogura, Y., Osborne, C., Hor, S.Y., Bromfield, A., Davies, S., Ogunbiyi, O., Nuñez, G., and Keshav, S. (2003). Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* *125*, 47–57.
- Landeghem, L. Van, Mahé, M.M., Teusan, R., Léger, J., Guisle, I., Houlgatte, R., and Neunlist, M. (2009). Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells : impact on intestinal epithelial barrier functions. *BMC Genomics* *20*, 1–20.
- Landeghem, L. Van, Chevalier, J., Mahé, M.M., Wedel, T., Urvil, P., Derkinderen, P., Savidge, T., and Neunlist, M. (2011). Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*
- Lang, R., Robine, S., Eckmann, L., Nebelsiek, T., Fingerle, A.A., Dann, S.M., Kagnoff, M.F., Schmid, R.M., Karin, M., Arkan, M.C., et al. (2008). Opposing functions of IKK α during acute and chronic.
- Langholz, E. (2010). Current trends in inflammatory bowel disease: the natural history. *Therap. Adv. Gastroenterol.* *3*, 77–86.
- Langley, J.N., and Magnus, R. (1905). Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves. *J. Physiol.* *33*, 34–51.
- Lapaquette, P., Bringer, M.-A., and Darfeuille-Michaud, A. (2012). Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell. Microbiol.* *14*, 791–807.
- Laranjeira, C., Sandgren, K., Kessaris, N., Richardson, W., Potocnik, A., Berghe, P. Vanden, and Pachnis, V. (2011). Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J. Clin. Invest.* *121*.
- Larrieu, P. (2012). La maladie de Crohn: Prise en charge thérapeutique, nutritionnelle et rôle du pharmacien d'officine. In Haute-garonne (Toulouse: Université Paul Sabatier), pp. 67.
- Lasserre, C., Colnot, C., Bréchet, C., and Poirier, F. (1999). HIP/PAP gene, encoding a C-type lectin overexpressed in primary liver cancer, is expressed in nervous system as well as in intestine and pancreas of the postimplantation mouse embryo. *Am. J. Pathol.* *154*, 1601–1610.
- Latorre, E., Mendoza, C., Layunta, E., Alcalde, A.I., and Mesonero, J.E. (2014). TLR2, TLR3, and TLR4 activation specifically alters the oxidative status of intestinal epithelial cells. *Cell Stress Chaperones* *19*, 289–293.

- Latour, P., Louis, E., and Belaiche, J. (1998). Incidence of inflammatory bowel disease in the area of Liège: a 3 years prospective study (1993-1996). *Acta Gastroenterol. Belg.* 61, 410–413.
- Laurenzi, M.A., Persson, M.A., Dalsgaard, C.J., and Haegerstrand, A. (1990). The neuropeptide substance P stimulates production of interleukin 1 in human blood monocytes: activated cells are preferentially influenced by the neuropeptide. *Scand. J. Immunol.* 31, 529–533.
- Lebouvier, T., Chaumette, T., Paillusson, S., Duyckaerts, C., Bruley des Varannes, S., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2009). The second brain and Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 30, 735–741.
- Lee, J.-M., Shih, A.Y., Murphy, T.H., and Johnson, J. a (2003). NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 278, 37948–37956.
- Lee, S.E., Kim, S.Y., Jeong, B.C., Kim, Y.R., Bae, S.J., Ahn, O.S., Lee, J.-J., Song, H.-C., Kim, J.M., Choy, H.E., et al. (2006). A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. *Infect. Immun.* 74, 694–702.
- Lefebvre, M., Paulweber, B., Fajas, L., Woods, J., McCrary, C., Colombel, J.F., Najib, J., Fruchart, J.C., Datz, C., Vidal, H., et al. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J. Endocrinol.* 162, 331–340.
- Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M., and Kliewer, S.A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J. Biol. Chem.* 270, 12953–12956.
- Lehmann, J.M., Lenhard, J.M., Oliver, B.B., Ringold, G.M., and Kliewer, S. a. (1997). Peroxisome Proliferator-activated Receptors and Are Activated by Indomethacin and Other Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. *J. Biol. Chem.* 272, 3406–3410.
- Lelièvre, V., Meunier, a C., Caigneaux, E., Falcon, J., and Muller, J.M. (1998). Differential expression and function of PACAP and VIP receptors in four human colonic adenocarcinoma cell lines. *Cell. Signal.* 10, 13–26.
- Lerebours, E., Savoye, G., and Guedon, C. (2003). [Epidemiology and natural history of chronic inflammatory bowel disease]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 27, S76–80.
- Leroi, A.M., Damon, H., Faucheron, J.L., Lehur, P.A., Siproudhis, L., Slim, K., Barbieux, J.P., Barth, X., Borie, F., Bresler, L., et al. (2009). Sacral nerve stimulation in faecal incontinence : position statement based on a collective experience. *Color. Dis.* 572–583.
- Leroy, a, Lauwaet, T., De Bruyne, G., Cornelissen, M., and Mareel, M. (2000). Entamoeba histolytica disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. *FASEB J.* 14, 1139–1146.
- Lesage, S., Zouali, H., Cézard, J.-P., Colombel, J.-F., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C., Gassull, M., Binder, V., et al. (2002). CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 845–857.
- Lesch, C.A., Kraus, E.R., Sanchez, B., Gilbertsen, R., and Guglietta, A. (1999). Lack of beneficial effect of COX-2 inhibitors in an experimental model of colitis. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 21, 99–104.
- Levonen, A.-L., Landar, A., Ramachandran, A., Ceaser, E.K., Dickinson, D. a, Zannoni, G., Morrow, J.D., and Darley-Usmar, V.M. (2004). Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem. J.* 378, 373–382.
- Levy, L.C. (2009). Advances in inflammatory bowel diseases. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 109–111.
- Li, C., and Keaney, J.F. (2010). AMP-activated protein kinase: a stress-responsive kinase with implications for cardiovascular disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 111–115.
- Li, M., Pascual, G., and Glass, C.K. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4699–4707.
- Li, Q., Zhang, Q., Wang, M., Zhao, S., Ma, J., Luo, N., Li, N., Li, Y., Xu, G., and Li, J. (2008). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction. *Clin. Immunol.* 126, 67–80.
- Lieverse, R.J., Jansen, J.B., Masclee, A.M., and Lamers, C.B. (1994). Satiety effects of cholecystokinin in humans. *Gastroenterology* 106, 1451–1454.

- Lin, a, Lourenszen, S., Stanzel, R.D.P., and Blennerhassett, M.G. (2005). Selective loss of NGF-sensitive neurons following experimental colitis. *Exp. Neurol.* 191, 337–343.
- Lin, T., Zhang, W., Fan, Y., and Mulholland, M. (2007). Interleukin-1 β and interleukin-6 stimulate matrix metalloproteinase-9 secretion in cultured myenteric glia. *J. Surg. Res.* 137, 38–45.
- Linden, D.R. (2012). Colitis is associated with a loss of intestinofugal neurons. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303, G1096–104.
- Little, a R., and O’Callagha, J.P. (2001). Astrogliosis in the adult and developing CNS: is there a role for proinflammatory cytokines? *Neurotoxicology* 22, 607–618.
- Liu, G.X., Yang, Y.X., Yan, J., Zhang, T., Zou, Y.P., Huang, X.L., and Gan, H.T. (2014). Glial-derived neurotrophic factor reduces inflammation and improves delayed colonic transit in rat models of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int. Immunopharmacol.* 19, 145–152.
- Liu, M., Seino, S., and Kirchgessner, a L. (1999). Identification and characterization of glucoresponsive neurons in the enteric nervous system. *J. Neurosci.* 19, 10305–10317.
- Liu, Y. a, Chung, Y.C., Pan, S.T., Shen, M.Y., Hou, Y.C., Peng, S.J., Pasricha, P.J., and Tang, S.C. (2013). 3-D imaging, illustration, and quantitation of enteric glial network in transparent human colon mucosa. *Neurogastroenterol. Motil.* 25, e324–38.
- Lomax, A.E., and Furness, J.B. (2000). Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res.* 302, 59–72.
- Lotz, M. (1993). Interleukin-6. *Cancer Invest.* 11, 732–742.
- Louis, E., and Marteau, P. (2010). *Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin*, Wolter Kluwer France edn (R. Zittoun).
- Louis, P., and Flint, H.J. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol. Lett.* 294, 1–8.
- Lu, L., and Walker, W.A. (2001). Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 1124–1130.
- Lu, W., Zhao, X., Zou, S., and Huang, J. (2012). A fluorimetric assay for human reticulocyte 15-lipoxygenase-1 activity. *Anal. Biochem.* 426, 66–68.
- Lu, Z., Ding, L., Lu, Q., and Chen, Y. (2013). Distribution and functional significance in health and diseases Claudins in intestines. *Tissue Barriers* 1–14.
- Ma, C., Li, Y., Ma, J., Liu, Y., Li, Q., Niu, S., Shen, Z., Zhang, L., Pan, Z., and Zhu, D. (2011a). Key role of 15-lipoxygenase/15-hydroxyeicosatetraenoic acid in pulmonary vascular remodeling and vascular angiogenesis associated with hypoxic pulmonary hypertension. *Hypertension* 58, 679–688.
- Ma, T.Y., Boivin, M.A., Ye, D., Pedram, A., Said, H.M., Costantini, T.W., Bansal, V., Krzyzaniak, M., Putnam, J.G., Peterson, C.Y., et al. (2005). Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier : role of myosin light-chain kinase protein expression Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier : role of myosin light-chain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288, G422–G430.
- Ma, T.Y., Iwamoto, G.K., Hoa, N.T., Akotia, V., Pedram, A., Boivin, M.A., Said, H.M., Amasheh, M., Fromm, A., Krug, S.M., et al. (2011b). TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.
- Ma, X., Fan, P.X., Li, L.S., Qiao, S.Y., Zhang, G.L., and Li, D.F. (2012). Butyrate promotes the recovering of intestinal wound healing through its positive effect on the tight junctions. *J. Anim. Sci.* 90 Suppl 4, 266–268.
- MacDermott, R.P. (1999). Chemokines in the inflammatory bowel diseases. *J. Clin. Immunol.* 19, 266–272.
- MacDonald, T.T., Di Sabatino, A., DiSabatino, A., and Gordon, J.N. (2005). Immunopathogenesis of Crohn’s disease. *JPEN. J. Parenter. Enteral Nutr.* 29, S118–24; discussion S124–5, S184–8.
- MacEachern, S.J., Patel, B. a, McKay, D.M., and Sharkey, K. a (2011). Nitric oxide regulation of colonic epithelial ion transport: a novel role for enteric glia in the myenteric plexus. *J. Physiol.* 589, 3333–3348.

- Macfarlane, G.T., Blackett, K.L., Nakayama, T., Steed, H., and Macfarlane, S. (2009a). The gut microbiota in inflammatory bowel disease. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1528–1536.
- Macfarlane, S., Steed, H., and Macfarlane, G.T. (2009b). Intestinal bacteria and inflammatory bowel disease. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 46, 25–54.
- Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004a). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303, 1662–1665.
- Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004b). Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1029, 36–43.
- Madara, J.L., and Stafford, J. (1989). Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest.* 83, 724–727.
- Madara, J.L., and Trier, J.S. (1982). Structure and permeability of goblet cell tight junctions in rat small intestine. *J. Membr. Biol.* 66, 145–157.
- Madsen, K.L. (2001). The use of probiotics in gastrointestinal disease. *Can. J. Gastroenterol.* 15, 817–822.
- Madsen, K.L., Lewis, S. a, Tavernini, M.M., Hibbard, J., and Fedorak, R.N. (1997). Interleukin 10 prevents cytokine-induced disruption of T84 monolayer barrier integrity and limits chloride secretion. *Gastroenterology* 113, 151–159.
- Maggiori, L., and Panis, Y. (2012). Laparoscopic approach for inflammatory bowel disease surgical management. *Acta Chir. Iugosl.* 59, 75–79.
- Magnusson, L.U., Lundqvist, A., Karlsson, M.N., Skålen, K., Levin, M., Wiklund, O., Borén, J., and Hultén, L.M. (2012). Arachidonate 15-lipoxygenase type B knockdown leads to reduced lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis. *PLoS One* 7, e43142.
- Mahid, S.S., Minor, K.S., Soto, R.E., Hornung, C.A., and Galandiuk, S. (2006). Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.* 81, 1462–1471.
- Mahida, Y.R., Wu, K., and Jewell, D.P. (1989). Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* 30, 835–838.
- Maka, M., Stolt, C.C., and Wegner, M. (2005). Identification of Sox8 as a modifier gene in a mouse model of Hirschsprung disease reveals underlying molecular defect. *Dev. Biol.* 277, 155–169.
- Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., and Abraham, S.N. (1996). Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 381, 77–80.
- Mammen, J.M. V, and Matthews, J.B. (2003). Mucosal repair in the gastrointestinal tract. *Crit. Care Med.* 31, S532–7.
- Manchanda, P.K., Bid, H.K., and Mittal, R.D. Ethnicity greatly influences the interleukin-1 gene cluster(IL-1b promoter, exon-5 and IL-1Ra) polymorphisms: a pilot study of a north Indian population. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 6, 541–546.
- Mancini, J. a, Blood, K., Guay, J., Gordon, R., Claveau, D., Chan, C.C., and Riendeau, D. (2001). Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin e synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J. Biol. Chem.* 276, 4469–4475.
- Mangell, P., Nejdfors, P., Wang, M., Ahrné, S., Weström, B., Thorlacius, H., and Jeppsson, B. (2002). *Lactobacillus plantarum* 299v inhibits *Escherichia coli*-induced intestinal permeability. *Dig. Dis. Sci.* 47, 511–516.
- Mangino, M.J., Brounts, L., Harms, B., and Heise, C. (2006). Lipoxin biosynthesis in inflammatory bowel disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 79, 84–92.
- Mankertz, J., and Schulzke, J.-D. (2007). Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23, 379–383.
- Manning, B.P., Sharkey, K.A., and Mawe, G.M. (2002). Effects of PGE2 in guinea pig colonic myenteric ganglia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, G1388–97.

- Manya, H., Sato, Y., Eguchi, N., Seiki, K., Oda, H., Nakajima, H., Urade, Y., and Endo, T. (2000). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human lipocalin-type prostaglandin D synthase purified from urine and amniotic fluid, and recombinantly expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biochem.* 127, 1001–1011.
- Marchionni, M.A., Goodearl, A.D., Chen, M.S., Bermingham-McDonogh, O., Kirk, C., Hendricks, M., Danehy, F., Misumi, D., Sudhalter, J., and Kobayashi, K. (1993). Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* 362, 312–318.
- Margolis, K.G., Stevanovic, K., Karamooz, N., Li, Z.I.S., Ahuja, A., Saurman, V., Chalazonitis, A., and Gershon, M.D. (2011). Enteric Neuronal Density Contributes to the Severity of Intestinal. 588–598.
- Mariadason, J.M., Kilias, D., Catto-smith, A., and Gibson, P.R. (1999). PATHOPHYSIOLOGY OF THE COLONIC MUCOSA , COLITIS AND COLON DUPLICATION Effect of butyrate on paracellular permeability in rat distal colonic mucosa ex vivo. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 873–879.
- Marshman, E., Booth, C., and Potten, C.S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24, 91–98.
- Marteau, P., and Jian, R. (2001). Maladie de Crohn. In *AKOS Encyclopédie pratique de medecine*, E. Masson, ed. (Paris), pp. 5.
- Marteau, P., Daniel, F., Seksik, P., and Jian, R. (2004). Inflammatory bowel disease: what is new? *Endoscopy* 36, 130–136.
- Martin, H.M., Campbell, B.J., Hart, C.A., Mpofu, C., Nayar, M., Singh, R., Englyst, H., Williams, H.F., and Rhodes, J.M. (2004). Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 127, 80–93.
- Martinez, C., Delgado, M., Pozo, D., Leceta, J., Calvo, J.R., Ganea, D., and Gomariz, R.P. (1998). VIP and PACAP enhance IL-6 release and mRNA levels in resting peritoneal macrophages: in vitro and in vivo studies. *J. Neuroimmunol.* 85, 155–167.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., González-Huix, F., López-Oliu, C., Dahbi, G., Blanco, J.E., Blanco, J., Garcia-Gil, L.J., and Darfeuille-Michaud, A. (2009). Molecular diversity of Escherichia coli in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 872–882.
- Marx, N., Mach, F., Sauty, a., Leung, J.H., Sarafi, M.N., Ransohoff, R.M., Libby, P., Plutzky, J., and Luster, a. D. (2000). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Activators Inhibit IFN- -Induced Expression of the T Cell-Active CXC Chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in Human Endothelial Cells. *J. Immunol.* 164, 6503–6508.
- Mase, M., Yamada, K., Iwata, a, Matsumoto, T., Seiki, K., Oda, H., and Urade, Y. (1999). Acute and transient increase of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) level in cerebrospinal fluid of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosci. Lett.* 270, 188–190.
- 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, 262–265.
- Matini, P., Mayer, B., and Faussone-Pellegrini, M.S. (1997). Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life. *Cell Tissue Res.* 288, 11–23.
- Matter, K., and Balda, M.S. (2003). Functional analysis of tight junctions. *Methods* 30, 228–234.
- Matthes, H., Krummenerl, T., Giensch, M., Wolff, C., and Schulze, J. (2010). Clinical trial: probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered Escherichia coli Nissle 1917 (EcN). *BMC Complement. Altern. Med.* 10, 13.
- Maudlej, N., and Hanani, M. (1992). Modulation of dye coupling among glial cells in the myenteric and submucosal plexuses of the guinea pig. *Brain Res.* 578, 94–98.
- Maunder, R.G., and Levenstein, S. (2008). The role of stress in the development and clinical course of inflammatory bowel disease: epidemiological evidence. *Curr. Mol. Med.* 8, 247–252.
- 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, 374–390.
- Mawe, G.M., Strong, D.S., and Sharkey, K.A. (2009). Plasticity of enteric nerve functions in the inflamed and postinflamed gut. *Neurogastroenterol. Motil.* 21, 481–491.

- Mazzucchelli, L., Hauser, C., Zraggen, K., Wagner, H., Hess, M., Laissue, J. a, and Mueller, C. (1994). Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. *Am. J. Pathol.* 144, 997–1007.
- McAllister, M.S., Krizanac-Bengez, L., Macchia, F., Naftalin, R.J., Pedley, K.C., Mayberg, M.R., Marroni, M., Leaman, S., Stanness, K.A., and Janigro, D. (2001). Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study. *Brain Res.* 904, 20–30.
- McCafferty, D.M., Sharkey, K.A., and Wallace, J.L. (1994). Beneficial effects of local or systemic lidocaine in experimental colitis. *Am. J. Physiol.* 266, G560–7.
- McCarthy, K.M., Skare, I.B., Stankewich, M.C., Furuse, M., Tsukita, S., Rogers, R. a, Lynch, R.D., and Schneeberger, E.E. (1996). Occludin is a functional component of the tight junction. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 9, 2287–2298.
- McClain, J.L., Grubišić, V., Fried, D., Gomez-Suarez, R. a, Leininger, G.M., Sévigny, J., Parpura, V., and Gulbransen, B.D. (2014). Ca²⁺ responses in enteric glia are mediated by connexin-43 hemichannels and modulate colonic transit in mice. *Gastroenterology* 146, 497–507.e1.
- McCole, D.F. (2012). Regulation of epithelial barrier function by the inflammatory bowel disease candidate gene, PTPN2. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1257, 108–114.
- McConalogue, K., and Furness, J.B. (1994). Gastrointestinal neurotransmitters. Baillieres. Clin. Endocrinol. Metab. 8, 51–76.
- McCormick, B.A., Colgan, S.P., Delp-Archer, C., Miller, S.I., and Madara, J.L. (1993). Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J. Cell Biol.* 123, 895–907.
- McCormick, D. a, Horton, L.W., and Mee, a S. (1990). Mucin depletion in inflammatory bowel disease. *J. Clin. Pathol.* 43, 143–146.
- McCullough, L.D., Zeng, Z., Li, H., Landree, L.E., McFadden, J., and Ronnett, G. V (2005). Pharmacological inhibition of AMP-activated protein kinase provides neuroprotection in stroke. *J. Biol. Chem.* 280, 20493–20502.
- McDermott, J.R., Bartram, R.E., Knight, P. a, Miller, H.R.P., Garrod, D.R., and Grecis, R.K. (2003). Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7761–7766.
- McElroy, S.J., Hobbs, S., Kallen, M., Tejera, N., Rosen, M.J., Grishin, A., Matta, P., Schneider, C., Upperman, J., Ford, H., et al. (2012). Transactivation of EGFR by LPS induces COX-2 expression in enterocytes. *PLoS One* 7, e38373.
- McKaig, 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.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.* 278, 21592–21600.
- Meciano Filho, J., Carvalho, V.C., and de Souza, R.R. (1995). Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age: a preliminary investigation. *Gerontology* 41, 18–21.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 135–145.
- Mei, N. (1985). Intestinal chemosensitivity. *Physiol. Rev.* 65, 211–237.
- Ménard, D., and Pothier, P. Differential distribution of digestive enzymes in isolated epithelial cells from developing human fetal small intestine and colon. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 6, 509–516.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, a, Bennett, B.L., Li, J., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, a, et al. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278, 860–866.
- Merga, Y., Campbell, B.J., and Rhodes, J.M. (2014). Mucosal barrier, bacteria and inflammatory bowel disease: possibilities for therapy. *Dig. Dis.* 32, 475–483.

- Metz, T., Haque, T., Chen, H., Prakash, S., Amre, D., and Das, S.K. (2006). Preparation and in vitro analysis of microcapsule thalidomide formulation for targeted suppression of TNF- α . *Drug Deliv.* 13, 331–337.
- Meurette, G., Blanchard, C., Duchalais-Dassonneville, E., Coquenlorge, S., Aubert, P., Wong, M., Lehur, P.-A., and Neunlist, M. (2012). Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum: results from a porcine model. *Neurogastroenterol. Motil.* 24, 267–73, e110.
- Meylan, E., Tschopp, J., and Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442, 39–44.
- Miampamba, M., Yang, H., Sharkey, K.A., and Taché, 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.
- Michetti, P. (2000). Intestinal pathogen or IBD, same T-cell response. *Inflamm. Bowel Dis.* 6, 63–64.
- Middendorp, S., and Nieuwenhuis, E.E.S. (2009). NKT cells in mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 2, 393–402.
- Miner, P.B. (1997). Factors influencing the relapse of patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 92, 1S–4S.
- Minich, T., Riemer, J., Schulz, J.B., Wielinga, P., Wijnholds, J., and Dringen, R. (2006). The multidrug resistance protein 1 (Mrp1), but not Mrp5, mediates export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes. *J. Neurochem.* 97, 373–384.
- Mirsky, R., and Jessen, K.R. (1983). A cell surface protein of astrocytes, Ran-2, distinguishes non-myelin-forming Schwann cells from myelin-forming Schwann cells. *Dev. Neurosci.* 6, 304–316.
- Misso, N.L. a, Aggarwal, S., Phelps, S., Beard, R., and Thompson, P.J. (2004). Urinary leukotriene E4 and 9 α , 11 β -prostaglandin F concentrations in mild, moderate and severe asthma, and in healthy subjects. *Clin. Exp. Allergy* 34, 624–631.
- Misso, N.L. a, Aggarwal, S., Thompson, P.J., and Vally, H. (2009). Increases in urinary 9 α ,11 β -prostaglandin f2 indicate mast cell activation in wine-induced asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149, 127–132.
- Mitchell, M.D., Chang, M.C., Chaiworapongsa, T., Lan, H.-Y., Helliwell, R.J. a, Romero, R., and Sato, T. a (2005). Identification of 9 α ,11 β -prostaglandin F2 in human amniotic fluid and characterization of its production by human gestational tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 4244–4248.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, a, and Kan, Y.W. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9926–9930.
- Molinie, F. (2004). Opposite evolution in incidence of Crohn’s disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut* 53, 843–848.
- Molinié, F., Gower-Rousseau, C., Yzet, T., Merle, V., Grandbastien, B., Marti, R., Lerebours, E., Dupas, J.-L., Colombel, J.-F., Salomez, J.-L., et al. (2004). Opposite evolution in incidence of Crohn’s disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut* 53, 843–848.
- Monk, J.M., Hou, T.Y., Turk, H.F., Weeks, B., Wu, C., McMurray, D.N., and Chapkin, R.S. (2012). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) decrease obesity-associated Th17 cell-mediated inflammation during colitis. *PLoS One* 7, e49739.
- Monneret, G., Gravel, S., Diamond, M., Rokach, J., and Powell, W.S. (2001). Prostaglandin D2 is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor. *Blood* 98, 1942–1948.
- Monneret, G., Li, H., Vasilescu, J., Rokach, J., and Powell, W.S. (2002). 15-Deoxy- 12,14,12,14-prostaglandins D2 and J2 Are Potent Activators of Human Eosinophils. *J. Immunol.* 168, 3563–3569.
- Montrose, M.H. (2003). The future of GI and liver research: editorial perspectives: I. Visions of epithelial research. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284, G547–50.
- Moore, M.W., Klein, R.D., Fariñas, 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, 76–79.

- Moriez, R., Abdo, H., Chaumette, T., Faure, M., Lardeux, B., and Neunlist, M. (2009). Neuroplasticity and neuroprotection in enteric neurons: role of epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382, 577–582.
- Morris, D.L., Montgomery, S.M., Thompson, N.P., Ebrahim, S., Pounder, R.E., and Wakefield, A.J. (2000). Measles vaccination and inflammatory bowel disease: a national British Cohort Study. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 3507–3512.
- Morrison, L.A., and Fields, B.N. (1991). Parallel Mechanisms in Neuropathogenesis of Enteric Virus Infections. *J. Virol.* 65.
- Morteau, O. (2000). Prostaglandins and inflammation: the cyclooxygenase controversy. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 48, 473–480.
- Morteau, O., Morham, S.G., Sellon, R., Dieleman, L. a, Langenbach, R., Smithies, O., and Sartor, R.B. (2000). Impaired mucosal defense to acute colonic injury in mice lacking cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest.* 105, 469–478.
- Motley, R.J., Rhodes, J., Kay, S., and Morris, T.J. (1988). Late presentation of ulcerative colitis in ex-smokers. *Int. J. Colorectal Dis.* 3, 171–175.
- Mueller, E., Smith, M., Sarraf, P., Kroll, T., Aiyer, a, Kaufman, D.S., Oh, W., Demetri, G., Figg, W.D., Zhou, X.P., et al. (2000). Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10990–10995.
- Mukaida, N., Matsumoto, T., Yokoi, K., Harada, A., and Matsushima, K. (1998). Inhibition of neutrophil-mediated acute inflammation injury by an antibody against interleukin-8 (IL-8). *Inflamm. Res.* 47 Suppl 3, S151–7.
- Mukherji, A., Kobiita, A., Ye, T., and Chambon, P. (2013). Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs. *Cell* 153, 812–827.
- Muñoz, U., de Las Cuevas, N., Bartolomé, F., Hermida, O.G., Bermejo, F., and Martín-Requero, A. (2005). The cyclopentenone 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 inhibits G1/S transition and retinoblastoma protein phosphorylation in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Exp. Neurol.* 195, 508–517.
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, a, Oh, S., et al. (2000). Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 275, 32783–32792.
- Murakami, M., Nakashima, K., Kamei, D., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Ohmiya, Y., Watanabe, K., and Kudo, I. (2003). Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 278, 37937–37947.
- Murphy, G.J., and Holder, J.C. (2000). PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 469–474.
- Musquer, N., Coquenlorge, S., Bourreille, A., Aubert, P., Matysiak-Budnik, T., des Varannes, S.B., Lauwers, G., Neunlist, M., and Coron, E. (2013). Probe-based confocal laser endomicroscopy: A new method for quantitative analysis of pit structure in healthy and Crohn's disease patients. *Dig. Liver Dis.*
- Muza-Moons, M.M., Schneeberger, E.E., and Hecht, G. a (2004). Enteropathogenic Escherichia coli infection leads to appearance of aberrant tight junctions strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 6, 783–793.
- Nagahama, M., Semba, R., Tsuzuki, M., and Aoki, E. (2001). L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol. Signals Recept.* 10, 336–340.
- Nagakura, T., Obata, T., Shichijo, K., Matsuda, S., Sigimoto, H., Yamashita, K., Masaki, T., and Maekawa, K. (1998). GC/MS analysis of urinary excretion of 9alpha,11beta-PGF2 in acute and exercise-induced asthma in children. *Clin. Exp. Allergy* 28, 181–186.
- 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, 203–217.
- Nakazawa, A., Dotan, I., Brimnes, J., Allez, M., Shao, L., Tsushima, F., Azuma, M., and Mayer, L. (2004). The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 126, 1347–1357.

- Narumiya, S., and Fukushima, M. (1986). Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. I. Active transport and intracellular accumulation of cyclopentenone prostaglandins, a reaction leading to growth inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239, 500–505.
- Narumiya, S., Ogorochi, T., Nakao, K., and Hayaishi, O. (1982). Prostaglandin D2 in rat brain, spinal cord and pituitary: basal level and regional distribution. *Life Sci.* 31, 2093–2103.
- Nasser, Y., Ho, W., and Sharkey, K.A. (2006). Distribution of adrenergic receptors in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse, and rat. *J. Comp. Neurol.* 495, 529–553.
- 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, 5151–5160.
- Neal, M.D., Leaphart, C., Levy, R., Prince, J., Billiar, T.R., Watkins, S., Li, J., Cetin, S., Ford, H., Schreiber, a., et al. (2006). Enterocyte TLR4 Mediates Phagocytosis and Translocation of Bacteria Across the Intestinal Barrier. *J. Immunol.* 176, 3070–3079.
- Neild, T.O., Shen, K.Z., and Surprenant, A. (1990). Vasodilatation of arterioles by acetylcholine released from single neurones in the guinea-pig submucosal plexus. *J. Physiol.* 420, 247–265.
- Nemetz, A., Nosti-Escanilla, M.P., Molnár, T., Köpe, A., Kovács, A., Fehér, J., Tulassay, Z., Nagy, F., García-González, M.A., and Peña, A.S. (1999). IL1B gene polymorphisms influence the course and severity of inflammatory bowel disease. *Immunogenetics* 49, 527–531.
- Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., van Loo, G., Danese, S., Huth, M., Nikolaev, A., Neufert, C., Madison, B., et al. (2007). Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 446, 557–561.
- Nerich, V., Monnet, E., Etienne, A., Louafi, S., Ramée, C., Rican, S., Weill, A., Vallier, N., Vanbockstael, V., Auleley, G.-R., et al. (2006). Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm. Bowel Dis.* 12, 218–226.
- 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, 539–550.
- Neunlist, M., Dobрева, G., and Schemann, M. (1999). Characteristics of mucosally projecting myenteric neurones in the guinea-pig proximal colon. *J. Physiol.* 517 (Pt 2, 533–546.
- 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., 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., Landeghem, L. Van, Bourreille, A., and Savidge, T. (2008). Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* 577–583.
- Neunlist, M., Coquenlorge, S., Aubert, P., Duchalais-dassonneville, E., Bruley, S., Meurette, G., and Coron, E. (2011). Colonic endoscopic full-thickness biopsies : from the neuropathological analysis of the myenteric plexus to the functional study of neuromuscular transmission. *Gastrointest. Endosc.* 73, 1029–1034.
- Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahé, M.M., Derkinderen, P., des Varannes, S.B., and Rolli-Derkinderen, M. (2013). The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 90–100.
- Neurath, M.F., and Meyer zum Büschenfelde, K.H. (1996). Protective and pathogenic roles of cytokines in inflammatory bowel diseases. *J. Investig. Med.* 44, 516–521.
- Neutra, M.R., Mantis, N.J., and Kraehenbuhl, J.P. (2001). Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* 2, 1004–1009.
- Newgreen, D., and Young, H.M. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 2. *Pediatr. Dev. Pathol.* 5, 329–349.
- Newman, E. a (2003). New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 26, 536–542.

- Ng, S.C., Bernstein, C.N., Vatn, M.H., Lakatos, P.L., Loftus, E. V, Tysk, C., O'Morain, C., Moum, B., and Colombel, J.-F. (2013). Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 62, 630–649.
- Nguyen, T., Sherratt, P.J., Huang, H.-C., Yang, C.S., and Pickett, C.B. (2003). Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.* 278, 4536–4541.
- Niedergang, F., and Kweon, M.-N. (2005). New trends in antigen uptake in the gut mucosa. *Trends Microbiol.* 13, 485–490.
- Niess, J.-H. (2008). Role of mucosal dendritic cells in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 14, 5138.
- Nikfar, S., Ehteshami-Ashar, S., Rahimi, R., and Abdollahi, M. (2010). Systematic review and meta-analysis of the efficacy and tolerability of nicotine preparations in active ulcerative colitis. *Clin. Ther.* 32, 2304–2315.
- Nishi, B.Y.S., and North, A.D.R.A. (1973). From the Neurophysiology Laboratory, Department of. 471–491.
- Nishihira, J. (2012). Molecular function of macrophage migration inhibitory factor and a novel therapy for inflammatory bowel disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1271, 53–57.
- Nishiyama, T., Mitsuyama, K., Toyonaga, A., Sasaki, E., and Tanikawa, K. (1994). Colonic mucosal interleukin 1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. *Digestion* 55, 368–373.
- Norenberg, M.D., and Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 161, 303–310.
- Novelli, a, Reilly, J. a, Lysko, P.G., and Henneberry, R.C. (1988). Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.* 451, 205–212.
- Nunes, T., Bernardazzi, C., and de Souza, H.S. (2014). Cell Death and Inflammatory Bowel Diseases: Apoptosis, Necrosis, and Autophagy in the Intestinal Epithelium. *Biomed Res. Int.* 2014, 218493.
- Nusrat, A., Parkos, C.A., Verkade, P., Foley, C.S., Liang, T.W., Innis-Whitehouse, W., Eastburn, K.K., and Madara, J.L. (2000a). Tight junctions are membrane microdomains. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 1, 1771–1781.
- Nusrat, A., Turner, J.R., and Madara, J.L. (2000b). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G851–7.
- O'Sullivan, S., Roquet, a, Dahlén, B., Dahlén, S., and Kumlin, M. (1998). Urinary excretion of inflammatory mediators during allergen-induced early and late phase asthmatic reactions. *Clin. Exp. Allergy* 28, 1332–1339.
- Oberste, M.S., Maher, K., Flemister, M.R., Kilpatrick, D.R., Pallansch, M.A., and Marchetti, G. (2000). Comparison of Classic and Molecular Approaches for the Identification of Untypeable Enteroviruses Comparison of Classic and Molecular Approaches for the Identification of Untypeable Enteroviruses †. *J. Clin. Microbiol.*
- Ogura, Y., Lala, S., Xin, W., Smith, E., Dowds, T.A., Chen, F.F., Zimmermann, E., Tretiakova, M., Cho, J.H., Hart, J., et al. (2003). Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 1591–1598.
- Ohata, A., Usami, M., and Miyoshi, M. (2005). Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxigenase activation. *Nutrition* 21, 838–847.
- Okamoto, R., and Watanabe, M. (2005). Cellular and molecular mechanisms of the epithelial repair in IBD. *Dig. Dis. Sci.* 50 Suppl 1, S34–8.
- Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nemoto, Y., Akiyama, J., Nakamura, T., Kanai, T., and Watanabe, M. (2009). Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G23–35.
- Oliva, S., Di Nardo, G., Ferrari, F., Mallardo, S., Rossi, P., Patrizi, G., Cucchiara, S., and Stronati, L. (2012). Randomised clinical trial: the effectiveness of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 rectal enema in children with active distal ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35, 327–334.
- Olson, A.D., Ayass, M., and Chensue, S. (1993). Tumor necrosis factor and IL-1 beta expression in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 16, 241–246.

- Ono, S., Karaki, S., and Kuwahara, A. (2004). Short-chain fatty acids decrease the frequency of spontaneous contractions of longitudinal muscle via enteric nerves in rat distal colon. *Jpn. J. Physiol.* 54, 483–493.
- Orholm, M., Munkholm, P., Langholz, E., Nielsen, O.H., Sørensen, T.I., and Binder, V. (1991). Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 324, 84–88.
- Ortega-Cava, C.F., Ishihara, S., Rumi, M. a. K., Kawashima, K., Ishimura, N., Kazumori, H., Udagawa, J., Kadowaki, Y., and Kinoshita, Y. (2003). Strategic Compartmentalization of Toll-Like Receptor 4 in the Mouse Gut. *J. Immunol.* 170, 3977–3985.
- Osburn, W.O., and Kensler, T.W. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat. Res.* 659, 31–39.
- Ott, C., Obermeier, F., Thiel, S., Kemptner, D., Bauer, A., Schölmerich, J., Rogler, G., and Timmer, A. (2008). The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 20, 917–923.
- Ouellette, A.J., and Bevins, C.L. (2001). Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflamm. Bowel Dis.* 7, 43–50.
- Van Overveld, F.J., Jorens, P.G., Rampart, M., de Backer, W., and Vermeire, P.A. (1991). Tumour necrosis factor stimulates human skin mast cells to release histamine and tryptase. *Clin. Exp. Allergy* 21, 711–714.
- Owen, R.L. (1999). Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches — a personal and historical perspective. 11.
- Pabst, R., Russell, M.W., and Brandtzaeg, P. (2008). Tissue distribution of lymphocytes and plasma cells and the role of the gut. *Trends Immunol.* 29, 206–8; author reply 209–10.
- Pagenault, M., Tron, I., Alexandre, J.L., Cruchant, E., Dabadie, A., Chaperon, J., Robaszkiewicz, M., and Bretagne, J.F. (1997). [Incidence of inflammatory bowel diseases in Bretagne (1994-1995). ABERMAD. Association Bertonne d'Etude et de Recherche des Maladies de l'Appareil Digestif]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 21, 483–490.
- Palade, F. and (1963). COMPLEXES IN VARIOUS EPITHELIA. 375–412.
- Paleolog, B.E.M., Delasalle, S.J., Buurnan, W.A., and Feldmann, M. (1994). Functional Activities of Receptors for Tumor Necrosis Factor- α on Human Vascular Endothelial Cells. 84, 2578–2590.
- Palli, D., Trallori, G., Saieva, C., Tarantino, O., Edili, E., D'Albasio, G., Pacini, F., and Masala, G. (1998). General and cancer specific mortality of a population based cohort of patients with inflammatory bowel disease: the Florence Study. *Gut* 42, 175–179.
- Pan, H., and Gershon, M.D. (2000). Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine. *J. Neurosci.* 20, 3295–3309.
- Parhar, K., Ray, A., Steinbrecher, U.R.S., Nelson, C., and Salh, B. (2003). The p38 mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-1 β -induced IL-8 expression via an effect on the IL-8 promoter in intestinal epithelial cells. *Immunology* 502–512.
- Parlato, M., and Yeretssian, G. (2014). NOD-like receptors in intestinal homeostasis and epithelial tissue repair. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 9594–9627.
- Pasparakis, M. (2009). Regulation of tissue homeostasis by NF- κ B signalling : implications for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 778–788.
- Pasparakis, M. (2012). Role of NF- κ B in epithelial biology. *Immunol. Rev.* 246, 346–358.
- Patsos, G., and Corfield, A. (2009). Management of the human mucosal defensive barrier: evidence for glycan legislation. *Biol. Chem.* 390, 581–590.
- Pei, L., Zhang, Y., Zhang, Y., Chu, X., Zhang, J., Wang, R., Liu, M., Zhu, X., and Yu, W. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes neuroprotection by modulating cyclin D1 expression after focal cerebral ischemia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88, 716–723.
- Penning, T.M., Burczynski, M.E., Jez, J.M., Hung, C., Lin, H., Ma, H., Moore, M., Palackal, N., and Ratnam, K. (2000). female sex hormones. 77, 67–77.
- Pettipher, R., and Hansel, T.T. (2008). Antagonists of the prostaglandin D2 receptor CRTH2. *Drug News Perspect.* 21, 317–322.

- Peyrin-Biroulet, L., Loftus, E. V., Colombel, J.-F., and Sandborn, W.J. (2010). The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 289–297.
- Pfriege, F.W., and Barres, Barbara A. (1997). Synaptic Efficacy Enhanced by Glial Cells in Vitro. *Science* (80-.). 277, 1684–1687.
- Phillips, R.J., Kieffer, E.J., and Powley, T.L. (2003). Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. *Auton. Neurosci.* 106, 69–83.
- Phillips, R.J., Kieffer, E.J., and Powley, T.L. (2004). Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat. *Anat. Embryol. (Berl)*. 209, 19–30.
- Phillips, R.J., Pairitz, J.C., and Powley, T.L. (2007). Age-related neuronal loss in the submucosal plexus of the colon of Fischer 344 rats. *Neurobiol. Aging* 28, 1124–1137.
- Phulwani, N.K., Esen, N., Syed, M.M., and Kielian, T. (2008). TLR2 expression in astrocytes is induced by TNF-alpha- and NF-kappa B-dependent pathways. *J. Immunol.* 181, 3841–3849.
- 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, 73–76.
- Pilichiewicz, A.N., Little, T.J., Brennan, I.M., Meyer, J.H., Wishart, J.M., Otto, B., Horowitz, M., and Feinle-Bisset, C. (2006). Effects of load, and duration, of duodenal lipid on antropyloroduodenal motility, plasma CCK and PYY, and energy intake in healthy men. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R668–77.
- Pinto, D., and Clevers, H. (2005). Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp. Cell Res.* 306, 357–363.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* 17, 1709–1713.
- Piront, P., Louis, E., Latour, P., Plomteux, O., and Belaiche, J. (2002). Epidemiology of inflammatory bowel diseases in the elderly in the province of Liège. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 26, 157–161.
- Planchon, S., Fiocchi, C., Takafuji, V., and Roche, J.K. (1999). Transforming growth factor-beta1 preserves epithelial barrier function: identification of receptors, biochemical intermediates, and cytokine antagonists. *J. Cell. Physiol.* 181, 55–66.
- Planchon, S.M., Martins, C.A., Guerrant, R.L., and Roche, J.K. (1994). Regulation of intestinal epithelial barrier function by TGF-beta 1. Evidence for its role in abrogating the effect of a T cell cytokine. *J. Immunol.* 153, 5730–5739.
- Plantinga, T.S., Crisan, T.O., Oosting, M., van de Veerdonk, F.L., de Jong, D.J., Philpott, D.J., van der Meer, J.W.M., Girardin, S.E., Joosten, L. a B., and Netea, M.G. (2011). Crohn's disease-associated ATG16L1 polymorphism modulates pro-inflammatory cytokine responses selectively upon activation of NOD2. *Gut* 60, 1229–1235.
- Playford, R.J., Marchbank, T., Goodlad, R. a, Chinery, R. a, Poulson, 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, 2137–2142.
- 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.
- Podolsky, D.K. (2002). Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 347, 417–429.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., and Van Huffel, C. (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* (80-.). 282, 2085–2088.
- Pompolo, S., and Furness, J.B. (1993). Origins of synaptic inputs to calretinin immunoreactive neurons in the guinea-pig small intestine. *J. Neurocytol.* 22, 531–546.
- Pompolo, S., and Furness, J.B. (1998). Quantitative analysis of inputs to somatostatin-immunoreactive descending interneurons in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* 294, 219–226.
- Ponder, A., and Long, M.D. (2013). A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clin. Epidemiol.* 5, 237–247.

- Pontell, L., Castelucci, P., Bagyánszki, M., Jovic, T., Thacker, M., Nurgali, K., Bron, R., and Furness, J.B. (2009). Structural changes in the epithelium of the small intestine and immune cell infiltration of enteric ganglia following acute mucosal damage and local inflammation. *Virchows Arch.* 455, 55–65.
- Porter, a J., Wattchow, D. a, Brookes, S.J., and Costa, M. (1997). The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in the human colon. *Gastroenterology* 113, 1916–1923.
- Pothoulakis, C., Castaglinuolo, I., LaMont, J.T., Jaffer, A., O’Keane, J.C., Snider, R.M., and Leeman, S.E. (1994). CP-96,345, a substance P antagonist, inhibits rat intestinal responses to *Clostridium difficile* toxin A but not cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 947–951.
- Potten, C.S. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353, 821–830.
- Potten, C.S., Booth, C., and Pritchard, D.M. (1997). Stem Cell Review The intestinal epithelial stem cell : the mucosal governor. *Int J Exp Path* 219–243.
- Pouokam, E., Rehn, M., and Diener, M. (2009). Effects of H₂O₂ at rat myenteric neurones in culture. *Eur. J. Pharmacol.* 615, 40–49.
- Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I., and West, A.B. (1999). Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am. J. Physiol.* 277, C1–9.
- Powell, J.J., Harvey, R.S., Ashwood, P., Wolstencroft, R., Gershwin, M.E., and Thompson, R.P. (2000). Immune potentiation of ultrafine dietary particles in normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. *J. Autoimmun.* 14, 99–105.
- Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K.L., Powell, R.M., MacDonald, T.T., and Collins, J.E. (2005). Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab. Invest.* 85, 1139–1162.
- Prato, M., Gallo, V., Giribaldi, G., Aldieri, E., and Arese, P. (2010). Role of the NF- κ B transcription pathway in the haemozoin- and 15-HETE-mediated activation of matrix metalloproteinase-9 in human adherent monocytes. *Cell. Microbiol.* 12, 1780–1791.
- Prochnow, N., and Dermietzel, R. (2008). Connexons and cell adhesion: a romantic phase. *Histochem. Cell Biol.* 130, 71–77.
- Pullan, R.D., Thomas, G.A., Rhodes, M., Newcombe, R.G., Williams, G.T., Allen, A., and Rhodes, J. (1994). Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* 353–359.
- Qureshi, S.T., Larivière, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K.J., Gros, P., and Malo, D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med.* 189, 615–625.
- Raddatz, D., Bockemühl, M., and Ramadori, G. (2005). Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 547–557.
- Radhakrishnan, P., Halagowder, D., and Devaraj, S.N. (2007). Altered expression of MUC2 and MUC5AC in response to *Shigella* infection, an in vivo study. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 884–889.
- Rajakariar, R., Hilliard, M., Lawrence, T., Trivedi, S., Colville-Nash, P., Bellingan, G., Fitzgerald, D., Yaqoob, M.M., and Gilroy, D.W. (2007). Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD₂ and 15-deoxyDelta¹² 14 PGJ₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20979–20984.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229–241.
- Ramana, K. V (2011). ALDOSE REDUCTASE: New Insights for an Old Enzyme. *Biomol. Concepts* 2, 103–114.
- Rambotti, M.G., Giambanco, I., Spreca, a, and Donato, R. (1999). S100B and S100A1 proteins in bovine retina: their calcium-dependent stimulation of a membrane-bound guanylate cyclase activity as investigated by ultracytochemistry. *Neuroscience* 92, 1089–1101.
- Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., and Kensler, T.W. (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3410–3415.

- Ray, K. (2011). IBD: Intestinal inflammation affected by density of enteric neurons. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 534.
- Regimbeau, J.M., Panis, Y., Pocard, M., Bouhnik, Y., Lavergne-Slove, A., Rufat, P., Matuchansky, C., and Valleur, P. (2001). Long-term results of ileal pouch-anal anastomosis for colorectal Crohn's disease. *Dis. Colon Rectum* 44, 769–778.
- Reid, L., Meyrick, B., Antony, V.B., Chang, L.-Y., Crapo, J.D., and Reynolds, H.Y. (2005). The mysterious pulmonary brush cell: a cell in search of a function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 136–139.
- Reier, P.J., and Houle, J.D. (1988). The glial scar: its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair. *Adv. Neurol.* 47, 87–138.
- Reinecker, H.C., Steffen, M., Witthoef, T., Pflueger, I., Schreiber, S., MacDermott, R.P., and Raedler, A. (1993). Enhanced secretion of tumour necrosis factor- α , IL-6, and IL-1 β by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 94, 174–181.
- Reinshagen, M., Rohm, H., Steinkamp, M., Lieb, K., Geerling, I., Von Herbay, A., Flämig, G., Eysselein, V.E., and Adler, G. (2000). Protective role of neurotrophins in experimental inflammation of the rat gut. *Gastroenterology* 119, 368–376.
- Rennekampff, H.O., Hansbrough, J.F., Kiessig, V., Doré, C., Sticherling, M., and Schröder, J.M. (2000). Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *J. Surg. Res.* 93, 41–54.
- Resnick, M.B., Colgan, S.P., Patapoff, T.W., Mrsny, R.J., Awtrey, C.S., Delp-Archer, C., Weller, P.F., and Madara, J.L. (1993). Activated eosinophils evoke chloride secretion in model intestinal epithelia primarily via regulated release of 5'-AMP. *J. Immunol.* 151, 5716–5723.
- Van der Rest, M., and Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5, 2814–2823.
- Reuter, B.K., Asfaha, S., Buret, a, Sharkey, K. a, and Wallace, J.L. (1996). Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest.* 98, 2076–2085.
- Ricart, E., and Sandborn, W.J. (1999). Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 117, 1247–1248.
- Richman, E., and Rhodes, J.M. (2013). Review article: evidence-based dietary advice for patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 38, 1156–1171.
- Richter, J.M., Schanbacher, B.L., Huang, H., Xue, J., Bauer, J.A., and Giannone, P.J. (2012). LPS-binding protein enables intestinal epithelial restitution despite LPS exposure. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 54, 639–644.
- Rickmann, M., and Wolff, J.R. (1995a). S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain. *Neuroscience* 67, 977–991.
- Rickmann, M., and Wolff, J.R. (1995b). S 100 immunoreactivity in a subpopulation of oligodendrocytes Ranvier's nodes of adult rat brain. *Neurosci. Lett.* 186, 13–16.
- Riegler, M., Castagliuolo, I., Wang, C., Wlk, M., Sogukoglu, T., Wenzl, E., Matthews, J.B., and Pothoulakis, C. (2000). Neurotensin stimulates Cl⁻ secretion in human colonic mucosa in vitro: Role of adenosine. *Gastroenterology* 119, 348–357.
- Riehl, T.E., Bass, N.M., and Stenson, W.F. (1990). Metabolism of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid by Caco-2 cells. *J. Lipid Res.* 31, 773–780.
- 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.
- Riordan, A.M., Ruxton, C.H., and Hunter, J.O. (1998). A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52, 229–238.
- Rioux, J.D., Xavier, R.J., Taylor, K.D., Silverberg, M.S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M.M., Datta, L.W., et al. (2007). Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat. Genet.* 39, 596–604.
- Rižner, T.L. (2012). Enzymes of the AKR1B and AKR1C Subfamilies and Uterine Diseases. *Front. Pharmacol.* 3, 34.

- Rodríguez-Lagunas, M.J., Martín-Venegas, R., Moreno, J.J., and Ferrer, R. (2010). PGE2 promotes Ca²⁺-mediated epithelial barrier disruption through EP1 and EP4 receptors in Caco-2 cell monolayers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 299, C324–34.
- Rogler, G., and Andus, T. (1998). Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Surg.* 22, 382–389.
- Rogler, G., Andus, T., Aschenbrenner, E., Vogl, D., Falk, W., Schölmerich, J., and Gross, V. (1997). Alterations of the phenotype of colonic macrophages in inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 893–899.
- Rogler, G., Hausmann, M., Vogl, D., Aschenbrenner, E., Andus, T., Falk, W., Andreesen, R., Schölmerich, J., and Gross, V. (1998a). Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 112, 205–215.
- Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P.A., Schölmerich, J., and Gross, V. (1998b). Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 115, 357–369.
- Rogler, G., Hausmann, M., Spöttl, T., Vogl, D., Aschenbrenner, E., Andus, T., Falk, W., Schölmerich, J., and Gross, V. (1999). T-cell co-stimulatory molecules are upregulated on intestinal macrophages from inflammatory bowel disease mucosa. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 1105–1111.
- Rothwell, N.J. (1999). Annual review prize lecture cytokines - killers in the brain? *J. Physiol.* 514 (Pt 1, 3–17.
- Rühl, A. (2005). Glial cells in the gut. 777–790.
- Rühl, A., Hurst, S., and Collins, S.M. (1994). Synergism between interleukins 1 beta and 6 on noradrenergic nerves in rat myenteric plexus. *Gastroenterology* 107, 993–1001.
- Rühl, A., Franzke, S., Collins, S.M., and Stremmel, W. (2001). Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280, G1163–71.
- Rumio, C., Besusso, D., Arnaboldi, F., Palazzo, M., Selleri, S., Gariboldi, S., Akira, S., Uematsu, S., Bignami, P., Balsari, A., et al. (2006). Activation of Smooth Muscle and Myenteric Plexus Cells of Jejunum via Toll-Like Receptor 4. *J. Cell. Physiol.* 54, 47–54.
- Russel, M.G., Engels, L.G., Muris, J.W., Limonard, C.B., Volovics, A., Brummer, R.J., and Stockbrügger, R.W. (1998). Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 243–249.
- Rutgeerts, P., D'Haens, G., Targan, S., Vasilias, E., Hanauer, S.B., Present, D.H., Mayer, L., Van Hogeand, R.A., Braakman, T., DeWoody, K.L., et al. (1999). Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology* 117, 761–769.
- Ryder, S.D., Raouf, A.H., Parker, N., Walker, R.J., and Rhodes, J.M. (1995). Abnormal mucosal glycoprotein synthesis in inflammatory bowel diseases is not related to cigarette smoking. *Digestion* 56, 370–376.
- Di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., Luinetti, O., Ricevuti, L., Morera, R., Cifone, M.G., Solcia, E., and Corazza, G.R. (2003). Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis. Colon Rectum* 46, 1498–1507.
- Saffrey, M.J. (2004). Ageing of the enteric nervous system. *Mech. Ageing Dev.* 125, 899–906.
- Saffrey, M.J. (2014). Aging of the mammalian gastrointestinal tract: a complex organ system. *Age (Dordr).* 36, 9603.
- Sánchez, M.P., Silos-Santiago, I., Frisén, J., He, B., Lira, S.A., and Barbacid, M. (1996). Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 70–73.
- Sanchez-Munoz, F., Dominguez-Lopez, A., and Yamamoto-Furusho, J.-K. (2008). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 14, 4280–4288.
- 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.

- Sandig, H., Andrew, D., Barnes, A. a, Sabroe, I., and Pease, J. (2006). 9alpha,11beta-PGF2 and its stereoisomer PGF2alpha are novel agonists of the chemoattractant receptor, CRTH2. *FEBS Lett.* 580, 373–379.
- Sansom, O.J., Reed, K.R., Hayes, A.J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I.P., Batlle, 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, 1385–1390.
- Santos, M.F., McCormack, S. a, Guo, Z., Okolicany, J., Zheng, Y., Johnson, L.R., and Tigyi, G. (1997). Rho proteins play a critical role in cell migration during the early phase of mucosal restitution. *J. Clin. Invest.* 100, 216–225.
- 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.
- Sarraf, P., Mueller, E., Jones, D., King, F., Deangelo, D., Partridge, J., Holden, S., Chen, L., Singer, S., Fletcher, C., et al. (1998). Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR γ . *Nat. Med.* 4.
- Sartor, R.B. (2004). Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 126, 1620–1633.
- Sartor, R.B. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 390–407.
- Sartor, R.B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134, 577–594.
- Sartor, R.B. (2009). Microbial-host interactions in inflammatory bowel diseases and experimental colitis. *Nestle Nutr. Workshop Ser. Pediatr. Program.* 64, 121–32; discussion 132–7, 251–7.
- Sasaki, M., Jordan, P., Welbourne, T., Minagar, A., Joh, T., Itoh, M., Elrod, J.W., and Alexander, J.S. (2005). Troglitazone, a PPAR-gamma activator prevents endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion mediated by TNF-alpha. *BMC Physiol.* 5, 3.
- Satoh, Y., Habara, Y., Ono, K., and Kanno, T. (1995). Calcium Dynamics of Epithelial Cells in Mouse Ileal Crypts. *Aliment. Tract* 1345–1356.
- Satoh, Y., Kobayashi, Y., Takeuchi, A., Pagès, G., Pouysségur, J., and Kazama, T. (2011). Deletion of ERK1 and ERK2 in the CNS causes cortical abnormalities and neonatal lethality: Erk1 deficiency enhances the impairment of neurogenesis in Erk2-deficient mice. *J. Neurosci.* 31, 1149–1155.
- Saunders, P.R., Hanssen, N.P., and Perdue, M.H. (1997). Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats. *Am. J. Physiol.* 273, G486–90.
- Savidge, T.C., Sofroniew, M. V, and Neunlist, M. (2007a). PATHOBIOLOGY IN FOCUS Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM AND ITS KNOWN. 87, 731–736.
- Savidge, T.O.R.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., and Sofroniew, M. V (2007b). Release of S-Nitrosoglutathione. 1344–1358.
- Saxena, M., and Yeretssian, G. (2014). NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer. *Front. Immunol.* 5, 327.
- Sayegh, A.I., Covasa, M., and Ritter, R.C. (2004). Intestinal infusions of oleate and glucose activate distinct enteric neurons in the rat. *Auton. Neurosci.* 115, 54–63.
- Scaldaferri, F., Gerardi, V., Lopetuso, L.R., Del Zompo, F., Mangiola, F., Boškoski, I., Bruno, G., Petito, V., Laterza, L., Cammarota, G., et al. (2013). Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility. *Biomed Res. Int.* 2013, 435268.
- Van Schaik, F.D.M., Oldenburg, B., Hart, A.R., Siersema, P.D., Lindgren, S., Grip, O., Teucher, B., Kaaks, R., Bergmann, M.M., Boeing, H., et al. (2013). Serological markers predict inflammatory bowel disease years before the diagnosis. *Gut* 62, 683–688.
- Scharl, M., and Rogler, G. (2012). Inflammatory bowel disease: dysfunction of autophagy? *Dig. Dis.* 30 Suppl 3, 12–19.
- Schemann, M., and Neunlist, M. (2004). The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* 16, 55–59.

- Scher, J.U., and Pillinger, M.H. (2005). 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin. Immunol.* 114, 100–109.
- Schicho, R., Schemann, M., Pabst, M.A., Holzer, P., and Lippe, I.T.H. (2003). Capsaicin-sensitive extrinsic afferents are involved in acid-induced activation of distinct myenteric neurons in the rat stomach. *Neurogastroenterol. Motil.* 15, 33–44.
- Schinke, S., Fellermann, K., Herlyn, K., Reichel, P.H., Fundke, R., Stange, E.F., Gross, W.L., and Schultz, H. (2004). Autoantibodies against the bactericidal/permeability-increasing protein from inflammatory bowel disease patients can impair the antibiotic activity of bactericidal/permeability-increasing protein. *Inflamm. Bowel Dis.* 10, 763–770.
- Schlegel, N., Meir, M., Spindler, V., Germer, C., and Waschke, J. (2010). Differential Role of Rho GTPases in Intestinal Epithelial Barrier Regulation In Vitro. *J. Cell. Physiol.* 1196–1203.
- Schmitz, H., Barmeyer, C., Fromm, M., Runkel, N., Foss, H.D., Bentzel, C.J., Riecken, E.O., and Schulzke, J.D. (1999). Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 116, 301–309.
- Schöbitz, B., Voorhuis, D.A., and De Kloet, E.R. (1992). Localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Neurosci. Lett.* 136, 189–192.
- Schreiber, S., Nikolaus, S., and Hampe, J. (1998). Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 42, 477–484.
- Schreiber, S., Nikolaus, S., Hampe, J., Hämling, J., Koop, I., Groessner, B., Lochs, H., and Raedler, A. (1999). Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet* 353, 459–461.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, 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, 380–383.
- Schultsz, C., Van Den Berg, F.M., Ten Kate, F.W., Tytgat, G.N., and Dankert, J. (1999). The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* 117, 1089–1097.
- Schulzke, J.D., Ploeger, S., Amasheh, M., Fromm, A., Zeissig, S., Troeger, H., Richter, J., Bojarski, C., Schumann, M., and Fromm, M. (2009). Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165, 294–300.
- 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, 5731–5735.
- See, N.A., Epstein, M.L., Dahl, J.L., and Bass, P. (1990). The myenteric plexus regulates cell growth in rat jejunum. *J. Auton. Nerv. Syst.* 31, 219–229.
- Segain, J.P., Raingeard, D., Ble, D.E.L.A., Pacaud, P., Galmiche, J.P., and Loirand, G. (2003). Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kB inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis. *Gastroenterology* 1180–1187.
- Seksik, P. (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52, 237–242.
- Seksik, P. (2010). [Gut microbiota and IBD]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 34 Suppl 1, S44–51.
- Seksik, P., Sokol, H., Grondin, V., Adrie, C., Duboc, H., Pigneur, B., Thomas, G., Beaugerie, L., Trugnan, G., Masliah, J., et al. (2010). Sera from patients with Crohn's disease break bacterial lipopolysaccharide tolerance of human intestinal epithelial cells via MD-2 activity. *Innate Immun.* 16, 381–390.
- Serra, M.C., Calzetti, F., Ceska, M., and Cassatella, M.A. (1994). Effect of substance P on superoxide anion and IL-8 production by human PMNL. *Immunology* 82, 63–69.
- Shappell, S.B., Gupta, R.A., Manning, S., Whitehead, R., Boeglin, W.E., Schneider, C., Case, T., Price, J., Jack, G.S., Wheeler, T.M., et al. (2001). 15S-Hydroxyeicosatetraenoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma and inhibits proliferation in PC3 prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* 61, 497–503.
- 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, 2755–2764.

- Sharon, P., Ligumsky, M., Rachmilewitz, D., and Zor, U. (1978). Role of prostaglandins in ulcerative colitis. Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine. *Gastroenterology* 75, 638–640.
- Shaw, S.Y., Blanchard, J.F., and Bernstein, C.N. (2011). Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 2133–2142.
- Sheibanie, A.F., Yen, J.-H., Khayrullina, T., Emig, F., Zhang, M., Tuma, R., and Ganea, D. (2007). The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23-->IL-17 axis. *J. Immunol.* 178, 8138–8147.
- Shepherd, I.T., Beattie, C.E., and Raible, D.W. (2001). Functional analysis of zebrafish GDNF. *Dev. Biol.* 231, 420–435.
- 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, 241–249.
- Sher, T., Yi, H.F., McBride, O.W., and Gonzalez, F.J. (1993). cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* 32, 5598–5604.
- Shibata, T., Kondo, M., Osawa, T., Shibata, N., Kobayashi, M., and Uchida, K. (2002). 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J. Biol. Chem.* 277, 10459–10466.
- Shibata, W., Maeda, S., Hikiba, Y., Yanai, A., Ohmae, T., Sakamoto, K., Nakagawa, H., Ogura, K., and Omata, M. (2007). Cutting edge: The IkappaB kinase (IKK) inhibitor, NEMO-binding domain peptide, blocks inflammatory injury in murine colitis. *J. Immunol.* 179, 2681–2685.
- Shimaoka, M., Takagi, J., and Springer, T. a (2002). Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31, 485–516.
- Shivananda, S., Lennard-Jones, J., Logan, R., Fear, N., Price, A., Carpenter, L., and van Blankenstein, M. (1996). Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 39, 690–697.
- Shureiqi, I., Wu, Y., Chen, D., Yang, X.L., Guan, B., Morris, J.S., Yang, P., Newman, R. a, Broaddus, R., Hamilton, S.R., et al. (2005). The critical role of 15-lipoxygenase-1 in colorectal epithelial cell terminal differentiation and tumorigenesis. *Cancer Res.* 65, 11486–11492.
- Sidebotham, E.L., Woodward, M.N., Kenny, S.E., Lloyd, D. a., Vaillant, C.R., and Edgar, D.H. (2002). Localization and endothelin-3 dependence of stem cells of the enteric nervous system in the embryonic colon. *J. Pediatr. Surg.* 37, 145–150.
- Sidhu, M., and Cooke, H.J. (1995). Role for 5-HT and ACh in submucosal reflexes mediating colonic secretion. *Am. J. Physiol.* 269, G346–51.
- Sigalet, D.L., Wallace, L., De Heuval, E., and Sharkey, K. a (2010). The effects of glucagon-like peptide 2 on enteric neurons in intestinal inflammation. *Neurogastroenterol. Motil.* 22, 1318–e350.
- Simmonds, N.J., Allen, R.E., Stevens, T.R., Van Someren, R.N., Blake, D.R., and Rampton, D.S. (1992). Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 103, 186–196.
- Simms, L. a, Doecke, J.D., Walsh, M.D., Huang, N., Fowler, E. V, and Radford-Smith, G.L. (2008). Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* 57, 903–910.
- Singh, N.K., Wang, D., Kundumani-Sridharan, V., Van Quyen, D., Niu, J., and Rao, G.N. (2011). 15-Lipoxygenase-1-enhanced Src-Janus kinase 2-signal transducer and activator of transcription 3 stimulation and monocyte chemoattractant protein-1 expression require redox-sensitive activation of epidermal growth factor receptor in vascular wall remodeli. *J. Biol. Chem.* 286, 22478–22488.
- Sitaraman, S. V, Klapproth, J.-M., Moore, D.A., Landers, C., Targan, S., Williams, I.R., and Gewirtz, A.T. (2005). Elevated flagellin-specific immunoglobulins in Crohn's disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288, G403–6.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 145–182.

- Smyth, D., McKay, C.M., Gulbransen, B.D., Phan, V.C., Wang, A., and McKay, D.M. (2012). Interferon-gamma signals via an ERK1/2-ARF6 pathway to promote bacterial internalization by gut epithelia. *Cell. Microbiol.* 14, 1257–1270.
- So, E.Y., and Ouchi, T. (2010). The application of Toll like receptors for cancer therapy. *Int. J. Biol. Sci.* 6, 675–681.
- Söderholm, J., Peterson, K., and Olaison, G. (1999). Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* 65–72.
- Söderholm, J.D., Olaison, G., Peterson, K.H., Franzén, L.E., Lindmark, T., Wirén, M., Tagesson, C., and Sjö Dahl, R. (2002). Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* 50, 307–313.
- Sokol, H., Lay, C., Seksik, P., and Tannock, G.W. (2008). Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: what has it revealed? *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 858–867.
- Solberg, I.C., Lygren, I., Cvancarova, M., Jahnsen, J., Stray, N., Sauar, J., Schreiber, S., Moum, B., and Vatn, M.H. (2009). Predictive value of serologic markers in a population-based Norwegian cohort with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 406–414.
- Sorci, G., Bianchi, R., Giambanco, I., Rambotti, M.G., and Donato, R. (1999). Replicating myoblasts and fused myotubes express the calcium-regulated proteins S100A1 and S100B. *Cell Calcium* 25, 93–106.
- Souza, D.G., Vieira, A.T., Pinho, V., Sousa, L.P., Andrade, A. a, Bonjardim, C. a, McMillan, M., Kahn, M., and Teixeira, M.M. (2005). NF-kappaB plays a major role during the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. *Br. J. Pharmacol.* 145, 246–254.
- De Souza, R.R., Moratelli, H.B., Borges, N., and Liberti, E.A. (1993). Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. *Gerontology* 39, 183–188.
- Spalinger, M.R., Rogler, G., and Scharl, M. (2014). Crohn's disease: loss of tolerance or a disorder of autophagy? *Dig. Dis.* 32, 370–377.
- Spencer, N., McCarron, S.L., and Smith, T.K. (1999). Sympathetic inhibition of ascending and descending interneurons during the peristaltic reflex in the isolated guinea-pig distal colon. *J. Physiol.* 519 Pt 2, 539–550.
- Spencer, N.J., Walsh, M., and Smith, T.K. (2000). Purinergic and cholinergic neuro-neuronal transmission underlying reflexes activated by mucosal stimulation in the isolated guinea-pig ileum. *J. Physiol.* 522 Pt 2, 321–331.
- Spiegelman, B.M. (1998). PPARγ: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*.
- Srisook, K., Kim, C., and Cha, Y.-N. (2005). Molecular mechanisms involved in enhancing HO-1 expression: de-repression by heme and activation by Nrf2, the “one-two” punch. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 1674–1687.
- Srivastava, S.K., Yadav, U.C.S., Reddy, A.B.M., Saxena, A., Tammali, R., Shoeb, M., Ansari, N.H., Bhatnagar, A., Petrash, M.J., Srivastava, S., et al. (2011). Aldose reductase inhibition suppresses oxidative stress-induced inflammatory disorders. *Chem. Biol. Interact.* 191, 330–338.
- Stack, W.A., Mann, S.D., Roy, A.J., Heath, P., Sopwith, M., Freeman, J., Holmes, G., Long, R., Forbes, A., and Kamm, M.A. (1997). Randomised controlled trial of CDP571 antibody to tumour necrosis factor-alpha in Crohn's disease. *Lancet* 349, 521–524.
- Stadnyk, A.W. (2002). Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can. J. Gastroenterol.* 16, 241–246.
- Stanchina, L., Baral, V., Robert, F., Pingault, V., Lemort, N., Pachnis, V., Goossens, M., and Bondurand, N. (2006). Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development. *Dev. Biol.* 295, 232–249.
- Steck, N., Mueller, K., Schemann, M., and Haller, D. (2012). Bacterial proteases in IBD and IBS. *Gut* 61, 1610–1618.
- Steckelbroeck, S., Jin, Y., Gopishetty, S., Oyesanmi, B., and Penning, T.M. (2004). Human cytosolic 3α-hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily display significant 3β-hydroxysteroid dehydrogenase activity: implications for steroid hormone metabolism and action. *J. Biol. Chem.* 279, 10784–10795.

- Stein, J., Ries, J., and Barrett, K.E. (1998). Disruption of intestinal barrier function associated with experimental colitis: possible role of mast cells. *Am. J. Physiol.* 274, G203–9.
- Steinhoff, M.M., Kodner, I.J., and DeSchryver-Kecsckemeti, K. (1988). Axonal degeneration/necrosis: a possible ultrastructural marker for Crohn's disease. *Mod. Pathol.* 1, 182–187.
- Steinkamp, M., Schulte, N., Spaniol, U., Pflüger, C., Hartmann, C., Kirsch, J., and von Boyen, G.B. (2012a). Brain derived neurotrophic factor inhibits apoptosis in enteric glia during gut inflammation. *Med. Sci. Monit.* 18, BR117–22.
- Steinkamp, M., Gundel, H., Schulte, N., Spaniol, U., Pflueger, C., Zizer, E., and Boyen, G.B.T. Von (2012b). GDNF protects enteric glia from apoptosis : evidence for an autocrine loop GDNF protects enteric glia from apoptosis : evidence for an autocrine loop. *BMC Gastroenterol.* 12, 6.
- Stenkamp-Strahm, C., Patterson, S., Boren, J., Gericke, M., and Balemba, O. (2013). High-fat diet and age-dependent effects on enteric glial cell populations of mouse small intestine. *Auton. Neurosci.* 177, 199–210.
- Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S., and Goodenough, D.A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* 103, 755–766.
- STOHR, P. (1952). [Synopsis of research results on the microscopic innervation of the gastrointestinal tract]. *Ergeb. Anat. Entwicklungsgesch.* 34, 250–401.
- Straus, D.S., and Glass, C.K. (2001). Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med. Res. Rev.* 21, 185–210.
- Stremmel, W., Strohmeyer, G., Borchard, F., Kochwa, S., and Berk, P.D. (1985). Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4–8.
- Strisciuglio, C., Miele, E., Wildenberg, M.E., Giugliano, F.P., Andreozzi, M., Vitale, A., Capasso, F., Camarca, A., Barone, M. V, Staiano, A., et al. (2013). T300A variant of autophagy ATG16L1 gene is associated with decreased antigen sampling and processing by dendritic cells in pediatric Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 2339–2348.
- Strohmeier, G.R., Lencer, W.I., Patapoff, T.W., Thompson, L.F., Carlson, S.L., Moe, S.J., Carnes, D.K., Mrsny, R.J., and Madara, J.L. (1997). Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* 99, 2588–2601.
- Stucchi, A.F., Shofer, S., Leeman, S., Materne, O., Beer, E., McClung, J., Shebani, K., Moore, F., O'Brien, M., and Becker, J.M. (2000). NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G1298–306.
- Stulnig, T.M. (2003). Immunomodulation by Polyunsaturated Fatty Acids: Mechanisms and Effects. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 132, 310–321.
- Sturm, A., and Dignass, A.U. (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 14, 348–353.
- Su, C.G., Wen, X., Bailey, S.T., Jiang, W., Rangwala, S.M., Keilbaugh, S. a, Flanagan, a, Murthy, S., Lazar, M. a, and Wu, G.D. (1999). A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J. Clin. Invest.* 104, 383–389.
- Su, L., Nalle, S.C., Shen, L., Turner, E.S., Singh, G., Breskin, L. a, Khramtsova, E. a, Khramtsova, G., Tsai, P.-Y., Fu, Y.-X., et al. (2013). TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology* 145, 407–415.
- Subbaramaiah, K., Yoshimatsu, K., Scherl, E., Das, K.M., Glazier, K.D., Golijanin, D., Soslow, R.A., Tanabe, T., Naraba, H., and Dannenberg, A.J. (2004). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in inflammatory bowel disease. Evidence for involvement of the transcription factor Egr-1. *J. Biol. Chem.* 279, 12647–12658.
- Sugawara, K., Olson, T.S., Moskaluk, C.A., Stevens, B.K., Hoang, S., Kozaiwa, K., Cominelli, F., Ley, K.F., and McDuffie, M. (2005). Linkage to peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in SAMP1/YitFc mice and in human Crohn's disease. *Gastroenterology* 128, 351–360.

- Sullivan, S.O., and Dahlen, B. (1996). Increased urinary excretion of the prostaglandin F₂ after aspirin challenge supports mast cell activation in aspirin-induced airway obstruction. 421–432.
- Suply, E., Vries, P. De, Soret, R., and Cossais, F. (2012). Butyrate enemas enhance both cholinergic and nitrergic phenotype of myenteric neurons and neuromuscular transmission in newborn rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 33.
- Suzawa, T., Miyaara, C., Inada, M., Maruyama, T., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ichikawa, a, Narumiya, S., and Suda, T. (2000). The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs. *Endocrinology* 141, 1554–1559.
- Suzuki, T. (2013). Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 631–659.
- 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, 348–352.
- Suzuki, T., Hide, I., Ido, K., Kohsaka, S., Inoue, K., and Nakata, Y. (2004). Production and Release of Neuroprotective Tumor Necrosis Factor by P2X₇ Receptor-Activated Microglia. *J. Neurosci.* 24, 1–7.
- Suzuki, T., Yoshinaga, N., and Tanabe, S. (2011). Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J. Biol. Chem.* 286, 31263–31271.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Theissig, F., Engelhardt, H., Bengmark, S., Koch, S., Lochs, H., and Dörffel, Y. (2007). Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* 56, 343–350.
- Szurszewski, J.H., Ermilov, L.G., and Miller, S.M. (2002). Prevertebral ganglia and intestinofugal afferent neurones. *Gut* 51 Suppl 1, i6–10.
- Takaki, M. (2003). Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). *J. Smooth Muscle Res.* 39, 137–161.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335–376.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2001). Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacol.* 1, 625–635.
- Takeuchi, O., Takeda, K., Hoshino, K., Adachi, O., Ogawa, T., and Akira, S. (2000). Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int. Immunol.* 12, 113–117.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L., and Akira, S. (2002). Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. *J. Immunol.* 169, 10–14.
- Tammali, R., Reddy, A.B.M., Saxena, A., Rychahou, P.G., Evers, B.M., Qiu, S., Awasthi, S., Ramana, K. V, and Srivastava, S.K. (2011). Inhibition of aldose reductase prevents colon cancer metastasis. *Carcinogenesis* 32, 1259–1267.
- Tanabe, T., and Tohnai, N. (2002). Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68–69, 95–114.
- Tanaka, K., Ogawa, K., Sugamura, K., Nakamura, M., Takano, S., and Nagata, K. (2000). Cutting Edge: Differential Production of Prostaglandin D₂ by Human Helper T Cell Subsets. *J. Immunol.* 164, 2277–2280.
- Tang, V.W., and Goodenough, D.A. (2003). Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys. J.* 84, 1660–1673.
- Tang, S.-C., Arumugam, T. V, Xu, X., Cheng, A., Mughal, M.R., Jo, D.G., Lathia, J.D., Siler, D. a, Chigurupati, S., Ouyang, X., et al. (2007). Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13798–13803.
- Tang, S.-C., Lathia, J.D., Selvaraj, P.K., Jo, D.-G., Mughal, M.R., Cheng, A., Siler, D.A., Markesbery, W.R., Arumugam, T. V, and Mattson, M.P. (2008a). Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Exp. Neurol.* 213, 114–121.

- Tang, Y., Banan, A., Forsyth, C.B., Fields, J.Z., Lau, C.K., Zhang, L.J., and Keshavarzian, A. (2008b). Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32, 355–364.
- Tanikawa, N., Ohmiya, Y., Ohkubo, H., Hashimoto, K., Kangawa, K., Kojima, M., Ito, S., and Watanabe, K. (2002). Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 884–889.
- Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M., and Kudo, I. (2000). Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 275, 32775–32782.
- Taraviras, S., and Pachnis, V. (1999). Development of the mammalian enteric nervous system. *Curr. Opin. Genet. Dev.*
- Targan, S.R. (2000). Biology of inflammation in Crohn's disease: mechanisms of action of anti-TNF- α therapy. *Can. J. Gastroenterol.* 14 Suppl C, 13C–16C.
- Targan, S.R., Hanauer, S.B., van Deventer, S.J., Mayer, L., Present, D.H., Braakman, T., DeWoody, K.L., Schaible, T.F., and Rutgeerts, P.J. (1997). A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor α for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N. Engl. J. Med.* 337, 1029–1035.
- Taupin, D., and Podolsky, D.K. (2003). Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 721–732.
- Temporin, K., Tanaka, H., Kuroda, Y., Okada, K., Yachi, K., Moritomo, H., Murase, T., and Yoshikawa, H. (2008a). IL-1 β promotes neurite outgrowth by deactivating RhoA via p38 MAPK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 375–380.
- Temporin, K., Tanaka, H., Kuroda, Y., Okada, K., Yachi, K., Moritomo, H., Murase, T., and Yoshikawa, H. (2008b). Interleukin-1 β promotes sensory nerve regeneration after sciatic nerve injury. *Neurosci. Lett.* 440, 130–133.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422–426.
- Thimmulappa, R.K., Fuchs, R.J., Malhotra, D., Scollick, C., Traore, K., Bream, J.H., Trush, M.A., Liby, K.T., Sporn, M.B., Kensler, T.W., et al. (2007). Preclinical evaluation of targeting the Nrf2 pathway by triterpenoids (CDDO-Im and CDDO-Me) for protection from LPS-induced inflammatory response and reactive oxygen species in human peripheral blood mononuclear cells and neutrophils. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 1963–1970.
- Thomas, S., and Baumgart, D.C. (2012). Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammopharmacology* 20, 1–18.
- Thrasivoulou, C., Soubeyre, V., Ridha, H., Giuliani, D., Giaroni, C., Michael, G.J., Saffrey, M.J., and Cowen, T. (2006). Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. *Aging Cell* 5, 247–257.
- 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, 331–340.
- Tiscornia, O.M. (1977). The neural control of exocrine and endocrine pancreas. *Am. J. Gastroenterol.* 67, 541–560.
- Tixier, E., Lalanne, F., Just, I., Galmiche, J.P., and Neunlist, M. (2005). Human mucosa/submucosa interactions during intestinal inflammation: involvement of the enteric nervous system in interleukin-8 secretion. *Cellular Microbiology* 7(12), 1798–1810.
- Tjwa, E.T.T.L., Bradley, J.M., Keenan, C.M., Kroese, A.B.A., and Sharkey, K.A. (2003). Interleukin-1 β activates specific populations of enteric neurons and enteric glia in the guinea pig ileum and colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G1268–76.
- Tomlinson, D.R., and Gardiner, N.J. (2008). Glucose neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 36–45.
- Toole, B.P. (2001). Hyaluronan in morphogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 79–87.

- Torihashi, S., Ward, S.M., Nishikawa, S., Nishi, K., Kobayashi, S., and Sanders, K.M. (1995). c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.* 280, 97–111.
- Torihashi, S., Nishi, K., Tokutomi, Y., Nishi, T., Ward, S., and Sanders, K.M. (1999). Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of cajal to a smooth muscle phenotype. *Gastroenterology* 117, 140–148.
- Toumi, F., Neunlist, M., Cassagnau, E., Parois, S., Labois, 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, 239–242.
- Toumi, F., Neunlist, M., Denis, M.G., Oreshkova, T., Labois, C.L., Galmiche, J.-P., and Jarry, A. (2004). Vasoactive intestinal peptide induces IL-8 production in human colonic epithelial cells via MAP kinase-dependent and PKA-independent pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 187–191.
- Tracey, K.J. (2007). Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest.* 117.
- Travassos, L.H., Carneiro, L. a M., Girardin, S., and Philpott, D.J. (2010). Nod proteins link bacterial sensing and autophagy. *Autophagy* 6, 409–411.
- Tsianos, E. V, Katsanos, K.H., and Tsianos, V.E. (2011). Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* 17, 5246–5259.
- Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001). MULTIFUNCTIONAL STRANDS IN tight junctions. *Nat. Rev.* 2.
- Tugwood, J.D., Issemann, I., Anderson, R.G., Bundell, K.R., McPheat, W.L., and Green, S. (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J.* 11, 433–439.
- 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.
- Turkcapar, N., Toruner, M., Soykan, I., Aydinoglu, O.T., Cetinkaya, H., Duzgun, N., Ozden, A., and Duman, M. (2006). The prevalence of extraintestinal manifestations and HLA association in patients with inflammatory bowel disease. *Rheumatol. Int.* 26, 663–668.
- Turner, J.R., and Madara, J.L. (1995). Physiological regulation of intestinal epithelial tight junctions as a consequence of Na⁽⁺⁾-coupled nutrient transport. *Gastroenterology* 109, 1391–1396.
- Tyagi, A., Kumar, U., Reddy, S., Santosh, V.S., Mohammed, S.B., Ehtesham, N.Z., and Ibrahim, A. (2012). Attenuation of colonic inflammation by partial replacement of dietary linoleic acid with α -linolenic acid in a rat model of inflammatory bowel disease. *Br. J. Nutr.* 108, 1612–1622.
- Tysk, C., Lindberg, E., Järnerot, G., and Flodérus-Myrhed, B. (1988). Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 29, 990–996.
- 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.
- Ubelmann, F., Chamaillard, M., El-Marjou, F., Simon, A., Netter, J., Vignjevic, D., Nichols, B.L., Quezada-Calvillo, R., Grandjean, T., Louvard, D., et al. (2013). Enterocyte loss of polarity and gut wound healing rely upon the F-actin-severing function of villin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E1380–9.
- Uguccioni, M., Gionchetti, P., Robbiani, D.F., Rizzello, F., Peruzzo, S., Campieri, M., and Baggiolini, M. (1999). Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in ulcerative colitis. *Am. J. Pathol.* 155, 331–336.
- Urade, Y., and Hayaishi, O. (1999). Prostaglandin D2 and sleep regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 606–615.
- Urade, Y., and Hayaishi, O. (2000). Prostaglandin D synthase: structure and function. *Vitam. Horm.* 58, 89–120.
- Urade, Y., Fujimoto, N., Kaneko, T., Konishi, a, Mizuno, N., and Hayaishi, O. (1987). Postnatal changes in the localization of prostaglandin D synthetase from neurons to oligodendrocytes in the rat brain. *J. Biol. Chem.* 262, 15132–15136.

- Uronen-Hansson, H., Allen, J., Osman, M., Squires, G., Klein, N., and Callard, R.E. (2004). Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 are present inside human dendritic cells, associated with microtubules and the Golgi apparatus but are not detectable on the cell surface: integrity of microtubules is required for interleukin-12 production in response. *Immunology* 111, 173–178.
- Usami, M., Muraki, K., Iwamoto, M., Ohata, a, Matsushita, E., and Miki, a (2001). Effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on tight junction permeability in intestinal monolayer cells. *Clin. Nutr.* 20, 351–359.
- Usami, M., Komurasaki, T., Hanada, A., Kinoshita, K., and Ohata, A. (2003). Effect of gamma-linolenic acid or docosahexaenoic acid on tight junction permeability in intestinal monolayer cells and their mechanism by protein kinase C activation and/or eicosanoid formation. *Nutrition* 19, 150–156.
- Ushikubi, F., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., and Narumiya, S. (2000). Roles of prostanoids revealed from studies using mice lacking specific prostanoid receptors. *Jpn. J. Pharmacol.* 83, 279–285.
- Vachon, P.H. (2006). Survie cellulaire : différences et différenciation. 423–429.
- Vachon, P.H., Cardin, E., Harnois, C., Reed, J.C., and Vézina, a (2000). Early establishment of epithelial apoptosis in the developing human small intestine. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 891–898.
- Vamadevan, A., Fukata, M., and Arnold, E. (2010). Regulation of Toll-like receptor 4-associated MD-2 in intestinal epithelial cells: a comprehensive analysis. *Innate Immun.* 016960.
- 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, 149–154.
- Vanner, S. (1994). Corelease of neuropeptides from capsaicin-sensitive afferents dilates submucosal arterioles in guinea pig ileum. *Am. J. Physiol.* 267, G650–5.
- Vanner, S., and Bolton, M. (1996). Neural circuitry of capsaicin-sensitive afferents innervating submucosal arterioles in guinea pig ileum. *Am. J. Physiol.* 270, G948–55.
- Vanner, S., and Surprenant, A. (1991). Cholinergic and noncholinergic submucosal neurons dilate arterioles in guinea pig colon. *Am. J. Physiol.* 261, G136–44.
- Vanner, S., and Surprenant, A. (1996). Neural reflexes controlling intestinal microcirculation. *Am. J. Physiol.* 271, G223–30.
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K., and Augenlicht, L. (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 295, 1726–1729.
- Ventura, R., and Harris, K.M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J. Neurosci.* 19, 6897–6906.
- Vergara, P., Saavedra, Y., and Juanola, C. (2002). Neuroendocrine control of intestinal mucosal mast cells under physiological conditions. *Neurogastroenterol. Motil.* 14, 35–42.
- Verkhatsky, a, Orkand, R.K., and Kettenmann, H. (1998). Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol. Rev.* 78, 99–141.
- Verkhatsky, A., Sofroniew, M. V, Messing, A., deLanerolle, N.C., Rempe, D., Rodríguez, J.J., and Nedergaard, M. (2012). Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism. *ASN Neuro* 4, 131–149.
- Vidal-Puig, A.J., Considine, R. V, Jimenez-Liñan, M., Werman, A., Pories, W.J., Caro, J.F., and Flier, J.S. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* 99, 2416–2422.
- Vietor, I., Bader, T., Paiha, K., and Huber, L. a (2001). Perturbation of the tight junction permeability barrier by occludin loop peptides activates beta-catenin/TCF/LEF-mediated transcription. *EMBO Rep.* 2, 306–312.
- Vijay-Kumar, M., Sanders, C.J., Taylor, R.T., Kumar, A., Aitken, J.D., Sitaraman, S. V, Neish, A.S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I.R., et al. (2007). Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3909–3921.

- 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, 1009–1016.
- Virta, L., Auvinen, A., Helenius, H., Huovinen, P., and Kolho, K.-L. (2012). Association of repeated exposure to antibiotics with the development of pediatric Crohn's disease--a nationwide, register-based finnish case-control study. *Am. J. Epidemiol.* 175, 775–784.
- Vives, V., Alonso, G., Solal, A.C., Joubert, D., and Legraverend, C. (2003). Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. *J. Comp. Neurol.* 457, 404–419.
- Vogelsang, H. (2008). Do changes in intestinal permeability predict disease relapse in Crohn's disease? *Inflamm. Bowel Dis.* 14 Suppl 2, S162–3.
- Volterra, A., and Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 626–640.
- Vonakis, B.M., and Vanderhoek, J.Y. (1993). Simultaneous determination of hydroxyeicosanoid (HETE) binding to cells and its cellular metabolism. *J. Lipid Res.* 34, 853–858.
- Vong, L., Ferraz, J.G.P., Panaccione, R., Beck, P.L., and Wallace, J.L. (2010). A pro-resolution mediator, prostaglandin D(2), is specifically up-regulated in individuals in long-term remission from ulcerative colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12023–12027.
- De Vries, P., Soret, R., Suply, E., Heloury, Y., and Neunlist, M. (2010). Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G539–47.
- Vucelić, B., Korać, B., Sentić, M., Milicić, D., Hadžić, N., Juresa, V., Božikov, J., Rotkvić, I., Buljevac, M., and Kovacević, I. (1991). Epidemiology of Crohn's disease in Zagreb, Yugoslavia: a ten-year prospective study. *Int. J. Epidemiol.* 20, 216–220.
- Vulchanova, L., Casey, M. a, Crabb, G.W., Kennedy, W.R., and Brown, D.R. (2007). Anatomical evidence for enteric neuroimmune interactions in Peyer's patches. *J. Neuroimmunol.* 185, 64–74.
- Wada, K., and Kamisaki, Y. (2003). [Role of PPARgamma in the development of the central nervous system]. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 122, 301–308.
- Wade, P.R., and Cowen, T. (2004). Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. *Neurogastroenterol. Motil.* 16 Suppl 1, 19–23.
- Walker, W.A., and Isselbacher, K.J. (1974). Uptake and transport of macromolecules by the intestine. Possible role in clinical disorders. *Gastroenterology* 67, 531–550.
- Wallace, J.L. (1992). Prostaglandins, NSAIDs, and cytoprotection. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 21, 631–641.
- Wallace, A.S., and Burns, A.J. (2005). Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.* 319, 367–382.
- Wang, D., and Dubois, R.N. (2006). Prostaglandins and cancer. *Gut* 55, 115–122.
- Wang, F., Graham, W.V., Wang, Y., Witkowski, E.D., Schwarz, B.T., and Turner, J.R. (2005). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am. J. Pathol.* 166, 409–419.
- Wang, S.-L., Wang, Z.-R., and Yang, C.-Q. (2012). Meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active inflammatory bowel disease. *Exp. Ther. Med.* 4, 1051–1056.
- Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G.-F., Peng, W.G., Han, X., Kang, J., Takano, T., and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat. Neurosci.* 9, 816–823.
- Ward, S.M. (2000). Interstitial cells of Cajal in enteric neurotransmission. *Gut* 47 Suppl 4, iv40–3; discussion iv52.
- Ward, S.M., McLaren, G.J., and Sanders, K.M. (2006). Interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus mediate enteric motor neurotransmission in the mouse small intestine. *J. Physiol.* 573, 147–159.
- Warhurst, A.C., Hopkins, S.J., and Warhurst, G. (1998). Interferon gamma induces differential upregulation of alpha and beta chemokine secretion in colonic epithelial cell lines. *Gut* 42, 208–213.

- Wasan, H.S., Novelli, M., Bee, J., and Bodmer, W.F. (1997). Dietary fat influences on polyp phenotype in multiple intestinal neoplasia mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3308–3313.
- Watson, A.J. (1995). Necrosis and apoptosis in the gastrointestinal tract. *Gut* 37, 165–167.
- Watson, A.J.M., and Hughes, K.R. (2012). TNF- α -induced intestinal epithelial cell shedding: implications for intestinal barrier function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1258, 1–8.
- Wedel, T., Roblick, U., Gleiss, J., Schiedeck, T., Bruch, H.P., Kühnel, W., and Krammer, H.J. (1999). Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus. *Ann. Anat.* 181, 327–337.
- Wedel, T., Spiegler, J., Soellner, S., Roblick, U.J., Schiedeck, T.H.K., Bruch, H.-P., and Krammer, H.-J. (2002). Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon. *Gastroenterology* 123, 1459–1467.
- Weersma, R.K., Zhernakova, A., Nolte, I.M., Lefebvre, C., Rioux, J.D., Mulder, F., van Dullemen, H.M., Kleibeuker, J.H., Wijmenga, C., and Dijkstra, G. (2008). ATG16L1 and IL23R are associated with inflammatory bowel diseases but not with celiac disease in the Netherlands. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 621–627.
- Wehkamp, J., and Stange, E.F. (2006). Paneth cells and the innate immune response. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 22, 644–650.
- Wehkamp, J., Fellermann, K., Herrlinger, K.R., Baxmann, S., Schmidt, K., Schwind, B., Duchrow, M., Wohlschläger, C., Feller, A.C., and Stange, E.F. (2002). Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 745–752.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Mueller, O., Herrlinger, K.R., Fellermann, K., Schroeder, J.M., and Stange, E.F. (2003). Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 9, 215–223.
- Wehkamp, J., Schmid, M., Fellermann, K., and Stange, E.F. (2005). Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* 77, 460–465.
- Wester, T., O'Briain, D.S., and Puri, P. (1999). Notable postnatal alterations in the myenteric plexus of normal human bowel. *Gut* 44, 666–674.
- Whiting, C. V, Bland, P.W., and Tarlton, J.F. (2005). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids reduce disease and colonic proinflammatory cytokines in a mouse model of colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 11, 340–349.
- Wild, G.E., Drozdowski, L., Tartaglia, C., Clandinin, M.T., and Thomson, A.B.R. (2007). Nutritional modulation of the inflammatory response in inflammatory bowel disease--from the molecular to the integrative to the clinical. *World J. Gastroenterol.* 13, 1–7.
- Williams, D.M., Magee, D.M., Bonewald, L.F., Smith, J.G., Bleicker, C.A., Byrne, G.I., and Schachter, J. (1990). A role in vivo for tumor necrosis factor alpha in host defense against *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 58, 1572–1576.
- Willson, T.M., Brown, P.J., Sternbach, D.D., and Henke, B.R. (2000). The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J. Med. Chem.* 43, 527–550.
- Wilson, a J., Byron, K., and Gibson, P.R. (1999). Interleukin-8 stimulates the migration of human colonic epithelial cells in vitro. *Clin. Sci. (Lond)*. 97, 385–390.
- Wolf, M., Schrödl, 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, 1273–1279.
- Wong, V. (1997). Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. *Am. J. Physiol.* 273, C1859–67.
- Wood, J.D. (1999). Neurotransmission at the interface of sympathetic and enteric divisions of the autonomic nervous system. *Chin. J. Physiol.* 42, 201–210.
- Wood, J.D. (2004). Enteric Neuroimmunophysiology and Pathophysiology. *Gastroenterology* 635–657.
- Wood, J.D., and Mayer, C.J. (1978). Intracellular study of electrical activity of Auerbach's plexus in guinea-pig small intestine. *Pflugers Arch.* 374, 265–275.

- Wood, J.D., Alpers, D.H., and Andrews, P.L. (1999). Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 45 Suppl 2, II6–II16.
- Woywodt, A., Neustock, P., Kruse, A., Schwarting, K., Ludwig, D., Stange, E.F., and Kirchner, H. (1994). Cytokine expression in intestinal mucosal biopsies. In situ hybridisation of the mRNA for interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in inflammatory bowel disease. *Eur. Cytokine Netw.* 5, 387–395.
- Woywodt, A., Ludwig, D., Neustock, P., Kruse, A., Schwarting, K., Jantschek, G., Kirchner, H., and Stange, E.F. (1999). Mucosal cytokine expression, cellular markers and adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 267–276.
- Wu, A., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2007). Omega-3 fatty acids supplementation restores mechanisms that maintain brain homeostasis in traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 24, 1587–1595.
- 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, 1161–1173.
- Xavier, R.J., and Podolsky, D.K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev.* 448.
- Xiao, W., Wang, W., Chen, W., Sun, L., Li, X., Zhang, C., and Yang, H. (2014). GDNF is Involved in the Barrier-Inducing Effect of Enteric Glial Cells on Intestinal Epithelial Cells Under Acute Ischemia Reperfusion Stimulation. *Mol. Neurobiol.*
- Xiao, X., Su, G., Brown, S.N., Chen, L., Ren, J., and Zhao, P. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha agonists stimulate cardiac glucose uptake via activation of AMP-activated protein kinase. *J. Nutr. Biochem.* 21, 621–626.
- Yamagata, K., Matsumura, K., Inoue, W., Shiraki, T., Suzuki, K., Yasuda, S., Sugiura, H., Cao, C., Watanabe, Y., and Kobayashi, S. (2001). Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J. Neurosci.* 21, 2669–2677.
- Yang, D. (1999). -Defensins: Linking Innate and Adaptive Immunity Through Dendritic and T Cell CCR6. *Science* (80-.). 286, 525–528.
- Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L.W., and Oppenheim, J.J. (2002). Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 23, 291–296.
- 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, 2155–2158.
- Yang, S., Yu, M., Sun, L., Xiao, M., Yang, X., Zhang, C., Ma, Y., Yang, H., Liu, Y., Lu, D., et al. (2014). Interferon-gamma-induced epithelial barrier dysfunction by NF-kB/HIF-1alpha pathway.
- Yang, S.K., Eckmann, L., Panja, a, and Kagnoff, M.F. (1997). Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology* 113, 1214–1223.
- Yang, W., Rachez, C., and Freedman, L.P. (2000). Discrete roles for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8008–8017.
- Yang, Y., Ma, Y., Shi, C., Chen, H., Zhang, H., Chen, N., Zhang, P., Wang, F., Yang, J., Yang, J., et al. (2013). Overexpression of miR-21 in patients with ulcerative colitis impairs intestinal epithelial barrier function through targeting the Rho GTPase RhoB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 746–752.
- Yaraee, R., Ebtekar, M., Ahmadiani, A., and Sabahi, F. (2003). Neuropeptides (SP and CGRP) augment pro-inflammatory cytokine production in HSV-infected macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 3, 1883–1887.
- Ye, D., Ma, I., and Ma, T.Y. (2006). Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G496–504.
- Ye, D., Guo, S., Al-Sadi, R., and Ma, T.Y. (2011). MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability. *Gastroenterology* 141, 1323–1333.
- Yoh, K., Itoh, K., Enomoto, A., Hirayama, A., Yamaguchi, N., Kobayashi, M., Morito, N., Koyama, A., Yamamoto, M., and Takahashi, S. (2001). Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis. *Kidney Int.* 60, 1343–1353.

- Yoshizumi, T., Ohta, T., Ninomiya, I., Terada, I., Fushida, S., Fujimura, T., Nishimura, G.-I., Shimizu, K., Yi, S., and Miwa, K. (2004). Thiazolidinedione, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, inhibits growth and metastasis of HT-29 human colon cancer cells through differentiation-promoting effects. *Int. J. Oncol.* 25, 631–639.
- Young, H.M., Bergner, A.J., and Müller, T. (2003). Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J. Comp. Neurol.* 456, 1–11.
- Young, H.M., Bergner, A.J., Anderson, R.B., Enomoto, H., Milbrandt, J., Newgreen, D.F., and Whittington, P.M. (2004). Dynamics of neural crest-derived cell migration in the embryonic mouse gut. *Dev. Biol.* 270, 455–473.
- Young, L.H., Li, J., Baron, S.J., and Russell, R.R. (2005). AMP-Activated Protein Kinase: A Key Stress Signaling Pathway in the Heart. *TCM* 15, 2599–2606.
- Youngman, K.R., Simon, P.L., West, G.A., Cominelli, F., Rachmilewitz, D., Klein, J.S., and Fiocchi, C. (1993). Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. *Gastroenterology* 104, 749–758.
- Yu, Y., and Chadee, K. (1998). Prostaglandin E2 stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. *J. Immunol.* 161, 3746–3752.
- Yu, X., Shao, X.-G., Sun, H., Li, Y.-N., Yang, J., Deng, Y.-C., and Huang, Y.-G. (2008). Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma exerts neuroprotection by inhibiting oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res.* 1200, 146–158.
- Yuan, J., Takahashi, A., Masumori, N., Uchida, K., Hisasue, S.-I., Kitamura, H., Itoh, N., and Tsukamoto, T. (2005). Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma have potent antitumor effect against human renal cell carcinoma. *Urology* 65, 594–599.
- Yui, S., Nakamura, T., Sato, T., Nemoto, Y., Mizutani, T., Zheng, X., Ichinose, S., Nagaishi, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., et al. (2012). Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5⁺ stem cell. *Nat. Med.* 18, 618–623.
- Zamuner, S.R., Warrier, N., Buret, a G., MacNaughton, W.K., and Wallace, J.L. (2003). Cyclooxygenase 2 mediates post-inflammatory colonic secretory and barrier dysfunction. *Gut* 52, 1714–1720.
- Zamuner, S.R., Bak, A.W., Devchand, P.R., and Wallace, J.L. (2005). Predisposition to colorectal cancer in rats with resolved colitis: role of cyclooxygenase-2-derived prostaglandin d2. *Am. J. Pathol.* 167, 1293–1300.
- Zaph, C., Troy, A.E., Taylor, B.C., Berman-Booty, L.D., Guild, K.J., Du, Y., Yost, E. a, Gruber, A.D., May, M.J., Greten, F.R., et al. (2007). Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature* 446, 552–556.
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, a J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.-D. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56, 61–72.
- Zelinkova, Z., Stokkers, P., and Hommes, D.W. (2005). NOD2 in Crohn's disease--loss or gain of function mutations? *Neth. J. Med.* 63, 286–287.
- Zenewicz, L. a, Antov, A., and Flavell, R. a (2009). CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. *Trends Mol. Med.* 15, 199–207.
- Zeng, L., and Childs, S.J. (2012). The smooth muscle microRNA miR-145 regulates gut epithelial development via a paracrine mechanism. *Dev. Biol.* 367, 178–186.
- Zhang, Y., and Gordon, G.B. (2004). A strategy for cancer prevention : Stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway Minireview A strategy for cancer prevention : Stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Mol. Cancer Ther.* 885–893.
- Zhang, L., Li, Y., Chen, M., Su, X., Yi, D., Lu, P., and Zhu, D. (2014). 15-LO/15-HETE mediated vascular adventitia fibrosis via p38 MAPK-dependent TGF-β. *J. Cell. Physiol.* 229, 245–257.
- 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, 252–262.
- Zhao, D., Kuhnt-Moore, S., Zeng, H., Pan, A., Wu, J.S., Simeonidis, S., Moyer, M.P., and Pothoulakis, C. (2002). Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic epithelial cells involves Rho family small GTPases. *Biochem. J.* 368, 665–672.

- Zhao, D., Kuhnt-Moore, S., Zeng, H., Wu, J.S., Moyer, M.P., and Pothoulakis, C. (2003). Neurotensin stimulates IL-8 expression in human colonic epithelial cells through Rho GTPase-mediated NF-kappa B pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, C1397–404.
- Zhao, J., O'Donnell, V.B., Balzar, S., St Croix, C.M., Trudeau, J.B., and Wenzel, S.E. (2011). 15-Lipoxygenase 1 interacts with phosphatidylethanolamine-binding protein to regulate MAPK signaling in human airway epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14246–14251.
- Zheng, X., Tsuchiya, K., Okamoto, R., Iwasaki, M., Kano, Y., Sakamoto, N., Nakamura, T., and Watanabe, M. (2011). Suppression of *hath1* gene expression directly regulated by *hes1* via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 2251–2260.
- Zhernakova, A., Festen, E.M., Franke, L., Trynka, G., van Diemen, C.C., Monsuur, A.J., Bevoa, M., Nijmeijer, R.M., van 't Slot, R., Heijmans, R., et al. (2008). Genetic analysis of innate immunity in Crohn's disease and ulcerative colitis identifies two susceptibility loci harboring CARD9 and IL18RAP. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 1202–1210.
- Zhou, X., and Galligan, J.J. (2000). GABA(A) receptors on calbindin-immunoreactive myenteric neurons of guinea pig intestine. *J. Auton. Nerv. Syst.* 78, 122–135.
- Zhu, L., Chen, H., Zhou, D., Li, D., Bai, R., Zheng, S., and Ge, W. (2012). MicroRNA-9 up-regulation is involved in colorectal cancer metastasis via promoting cell motility. *Med. Oncol.* 29, 1037–1043.
- Zhu, Y., Alvares, K., Huang, Q., Rao, M.S., and Reddy, J.K. (1993). Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *J. Biol. Chem.* 268, 26817–26820.
- Zucoloto, S., Diaz, J.A., Oliveira, J.S., Muccilo, G., Sales Neto, V.N., and Kajiwarra, J.K. (1988). Effect of chemical ablation of myenteric neurones on intestinal cell proliferation. *Cell Tissue Kinet.* 21, 213–219.
- Zuo, X., Peng, Z., Wu, Y., Moussalli, M.J., Yang, X.L., Wang, Y., Parker-Thornburg, J., Morris, J.S., Broaddus, R.R., Fischer, S.M., et al. (2012). Effects of gut-targeted 15-LOX-1 transgene expression on colonic tumorigenesis in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 104, 709–716.

Impact de l'inflammation intestinale sur la plasticité fonctionnelle des neurones et des cellules gliales entériques : exemple de la maladie de Crohn

Résumé: Le système nerveux entérique (SNE) constitué de neurones et de cellules gliales entériques (CGE) régule les fonctions gastro-intestinales dont celles de la barrière épithéliale intestinale (BEI). Néanmoins, son implication au cours de pathologies inflammatoires demeure peu connue. Nous avons d'abord montré que les neurones entériques, en réponse au LPS, produisaient du $\text{TNF}\alpha$ via des voies ERK, AMPK et que l'activation neuronale inhibait cette synthèse. Nous avons ensuite étudié l'impact de CGE de patients atteints de la maladie de Crohn (CGE pathologiques ; CGEp) sur les fonctions de la BEI en comparaison à des CGE de patients atteints de cancer (CGE contrôle; CGEc). Par rapport aux CGEc, les CGEp augmentaient la perméabilité paracellulaire, la prolifération des cellules épithéliales intestinales (CEI) et diminuaient la réparation de la BEI. Par rapport aux CGEc, l'expression de marqueurs gliaux clés et la sécrétion de médiateurs connus étaient identiques dans les CGEp. En revanche, leur production d'acides gras polyinsaturés (AGPI) tels que le 15HETE, le $11\beta\text{PGF}_2\alpha$ et la 15dPGJ_2 était diminuée. Nous avons aussi montré que le 15HETE, le $11\beta\text{PGF}_2\alpha$ et la 15dPGJ_2 régulaient la perméabilité paracellulaire, la réparation de la BEI et la prolifération des CEI, respectivement, en partie via une voie $\text{PPAR}\gamma$. Ces travaux démontrent que le SNE participe directement à la réponse inflammatoire intestinale. Ils ont conduit à l'identification de nouveaux AGPI produits par les CGE et impliqués dans l'homéostasie de la BEI. Enfin, ils suggèrent que des défauts de production de certains AGPIs pourraient contribuer aux dysfonctions de la BEI au cours de la maladie de Crohn.

Mots-Clés: neurones entériques, cellules gliales entériques, inflammation intestinale, $\text{TNF}\alpha$, maladie de Crohn, barrière épithéliale intestinale, acides gras polyinsaturés, $\text{PPAR}\gamma$.

Impact of intestinal inflammation on enteric neurons and glial cells functional plasticity: example of Crohn's disease

Abstract: The enteric nervous system (ENS) composed of neurons and enteric glial cells (EGC), regulates gastrointestinal functions and in particular, the intestinal epithelial barrier (IEB) functions. However its role during inflammatory diseases remains largely unknown. In the first part of this study we showed that enteric neurons, in response to LPS, produced $\text{TNF}\alpha$ via ERK, AMPK pathways and that neuronal activation inhibited this production. In the second part we studied the effect of EGC from Crohn's disease patients (pathological EGC; pEGC) on IEB functions compared to EGC from cancer patients (control EGC; cEGC). Compared to cEGC, pEGC increased paracellular permeability, intestinal epithelial cells (IEC) proliferation and decreased IEB healing. Compared to cEGC, pEGC expressed similar glial markers and produced same amount of well-known glia-mediators in a same manner, but produced a reduced amount of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as 15HETE, $11\beta\text{PGF}_2\alpha$ and 15dPGJ_2 . Then we showed that 15HETE, $11\beta\text{PGF}_2\alpha$ and 15dPGJ_2 regulated respectively paracellular permeability, IEB healing and IEC proliferation in part via a $\text{PPAR}\gamma$ -dependent pathway. Thus, our data demonstrated that ENS contributes directly to intestinal inflammatory response. They led to the identification of new PUFAs produced by EGC and involved in IEB homeostasis. Finally, they suggest that defects in PUFAs production could contribute to IEB dysfunctions observed during Crohn's disease.

Keywords: enteric neurons, enteric glial cells, intestinal inflammation, $\text{TNF}\alpha$, Crohn's disease, intestinal epithelial barrier, polyunsaturated fatty acids, $\text{PPAR}\gamma$.