

Thèse de Doctorat

Camille POCHARD

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Neurosciences
Spécialité : Biologie des organismes
Unité de recherche : UMR1235 (ex U913)

Soutenue le 24/10/2017

Identification et étude fonctionnelle de médiateurs gliaux impliqués dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques intestinales

JURY

Président du jury

Sophie LAYE, Directeur de Recherche, UMR1286 INRA/Bordeaux2

Rapporteurs :

Sophie LAYE, Directeur de Recherche, UMR1286 INRA/Bordeaux2
Jean-Luc CARRE, Praticien hospitalier, EA4685 Brest

Invité(s) :

Michel NEUNLIST, Directeur de Recherche, UMR1235 Nantes

Directeur de Thèse :

Arnaud BOURREILLE, Praticien hospitalier, CHU/UMR1235 Nantes

Co-directeur de Thèse :

Malvyne ROLLI-DERKINDEREN, Directeur de Recherche, UMR1235 Nantes

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Malvyne Rolli-Derkinderen. Merci pour ta confiance, tes idées foisonnantes et tes précieux enseignements. J'estime sans aucun doute être tombée sur la meilleure encadrante possible. Ta bonne humeur et ton enthousiasme à toute épreuve vont me faire regretter ces années avec toi si agréables à vivre... Outre les aspects scientifiques, j'ai beaucoup apprécié les moments que nous avons passés en dehors du labo, en France et ailleurs. Je mesure la chance que j'ai eu de faire ma thèse sous ta direction !

Je tiens également à remercier Arnaud Bourreille qui, de part sa position clinique, n'a pas été mon encadrant attitré durant cette thèse, mais qui a toujours su apporter un regard critique et nous accorder toute sa confiance.

Merci à Michel Neunlist pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein du laboratoire U1235, mais également pour tous les conseils avisés que vous avez pu apporter sur ces différents projets. Merci également de m'avoir permis de participer à de nombreux congrès et d'avoir eu l'opportunité de présenter mes résultats, d'en apprendre plus sur les thématiques de recherche environnantes et d'avoir pu voyager par la même occasion.

Merci bien sûr aux autres membres de l'équipe glie-MICI avec qui j'ai travaillé pendant ces années au laboratoire. Julie, toi qui maintenant t'épanouis en tant qu'ARC, et Elise : je suis bien contente que nous continuions à nous retrouver parfois autour d'un mojito. Merci également à Emilie, nouvelle remplaçante. Merci à Sabrina, pour ton aide durant mes années Master. Merci aux étudiants Master : Elodie (quel dommage que tu n'ai pas pu rester en thèse, mais quel plaisir de toujours te revoir dans tes contrées hostiles surtout au Boomshell après une truffade... mais aussi à tes retours à Nantes ou durant nos escapades à Paris ! Aaah ces verts...), Thomas (Thomette ! La liste des soirées interminables que nous avons passé ensemble prendrait probablement plusieurs pages de ce manuscrit... Finalement je ne sais pas si en dormant 1h avant d'aller travailler on peut dire que tu ai vraiment contribué au bon déroulement de ma thèse !), Charlène (Moi j'adore le couscous ! Ta passion pour François Damiens et l'accent parisien...).

Merci à tous les autres membres de l'équipe U1235. A Laurianne, Jeremy, Sophie, Hélène, Isabelle, Philippe... Merci également à Pascal, l'homme qui écrit les papiers plus vite que son ombre et qui aime débattre de la neuro-mytho-gastroentérologie ! Aux ITA bien sûr : Phil (pour toutes les manip d'exploration fonctionnelle, le gavage des animaux, le WAS et j'en passe !), Tony (l'expert des PCR), Julien, Catherine, Anne, Nadia, Marie, Pauline ! Au reste de la team des virées Clermontoises et maintenant parisiennes : Tiphaine bien sûr (Tiphâââne et sa passion sans limite pour tout ce qui se mange) et Pierre-Antoine (El manouche ! Conducteur hors pair de tracteurs et un moteur sans faille pour l'organisation de soirées). Aux autres étudiants : Thomas C, Laëtitia, Lilli, Emilie D, Anne-Gaga (DJ le weekend), Julie P, Simon C, Gaëlle, Cécile, Céline, Greg, Chloé, Aurélien, Farouk, Marie A et j'en oublie sûrement... A Alice, ma compagne de bureau, Bambi lors des soirées, chercheuse d' α -syn à ses heures perdues !

Un mot spécial pour Simon V et Mélissa, avec qui j'ai passé de très très bons moments. Ma Simone, ce ventre sur patte capable d'avaler tout au long des journées des quantités impressionnantes de snickers, madeleines, dragibus, financiers, dinosauros...le tout sans jamais

Remerciements

prendre un seul gramme ! Merci de m'avoir fait découvrir le palmarès des chansons les plus nazes de tous les temps, pour ces pauses canapés et pour tes blagues débiles qui m'ont beaucoup manqués lorsque vous êtes partis aux USA. Merci à toi ma petite Mélissa pour toutes les discussions, les moments de complicité et les soirées qui ont ponctuées notre vie au laboratoire. (Et du coup merci Skype pour les nouvelles !)

Merci à toi mon Zobby Zazack Boudin, ce paragraphe est une déclaration qui pourrait être mal interprétée par certains...mais surtout par certaines ! Très probablement la plus belle rencontre que j'ai faite au laboratoire, il faut dire qu'on en passe du temps ensemble (probablement à cause de notre passion commune pour les épinards). Merci de rendre ces journées de travail si drôles. S'il existait une carte VIP de l'embuscade, aucun doute que nous serions les premiers à l'avoir. Grâce à toi je ne serais plus jamais choquée de rien (enfin je pense), je sais ce qu'est une crise d'hypoglycémie, j'ai battu des records personnels (quasi 26 !), j'ai pu mangé indien quasiment une fois par semaine, je sais que le caca se centrifuge à 13000 g et j'ai trouvé quelqu'un encore plus nul que moi en anglais...

Pour finir, un énorme merci à mes parents, qui m'ont permis d'aller aussi loin dans mes études et qui m'ont toujours soutenue et encouragée !

Un énorme merci aussi à tous mes amis, plus particulièrement Anaïs, Camille, Ronan, Nadège, Jérôme et Nico, qui ont suivis de très près toutes ces avancées et qui n'ont pas arrêté de m'apporter encouragements et intérêt pour ce sujet passionnant mais parfois abstrait à leurs yeux qu'est la neurogastroentérologie.

Enfin, merci à toi Mathieu, pour avoir été un pilier durant toutes ces années. Nous ne finissons pas comme nous nous y attendions mais t'avoir à mes cotés a été et est toujours une force dans les moments difficiles.

Sommaire

Liste des publications et conférences	1
Liste des abréviations	3
Introduction générale.....	4
Etude bibliographique	6
I Les eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique	6
1) Phospholipase A2 et production d'acide arachidonique	7
2) La voie des lipoxygénases.....	7
a- Les acides hydroxyeicosatétraénoïques.....	8
b- Les leucotriènes.....	10
3) La voie des cyclooxygénases	10
a- Les prostaglandines	11
b- Les thromboxanes	14
II La barrière épithéliale intestinale.....	15
1) Généralités	15
2) Organisation	17
3) Les différents types de cellules	18
a - Les cellules souches épithéliales intestinales.....	19
b- Les entérocytes	20
c- Les cellules mucosécrétantes (ou cellules de Goblet).....	20
d- Les cellules de Paneth	20
e- Les cellules entéroendocrines	21
f- Les cellules Tuft.....	21
e- Les cellules M ou "Microfold"	21
4) L'homéostasie de l'épithélium digestif.....	22
a- Le renouvellement des cellules épithéliales intestinales.....	22
b- La migration et la différenciation des cellules épithéliales intestinales	24
c- La mort des cellules épithéliales intestinales	25
d- La réparation de l'épithélium digestif	26
e- Le maintien de l'épithélium digestif.....	28
➤ Les interactions cellule-cellule :	28
➤ Les interactions cellule-matrice :.....	30
5) Les rôles physiologiques de la barrière épithéliale intestinale	32
a- Le contrôle de la perméabilité intestinale	32
➤ La perméabilité paracellulaire :.....	32
➤ La perméabilité transcellulaire :.....	32
➤ Régulation de la perméabilité intestinale	34
➤ Méthodes d'étude de la perméabilité intestinale.....	35
b- Le contrôle des mécanismes immunitaires.....	36

Sommaire

c- Le contrôle du microbiote	38
d- Le contrôle des neurones entériques	38
III Le système nerveux entérique	38
1) Découverte	39
2) Organisation	39
3) Développement.....	40
a- Migration des précurseurs	40
b- Prolifération et différenciation	42
c- Contrôle du développement	42
d- Maturation post-natale.....	43
4) Communications avec le système nerveux extrinsèque	44
5) Les neurones entériques	45
a- Les différents types de neurones entériques.....	45
➤ Les neurones sensitifs :.....	47
➤ Les interneurones :.....	47
➤ Les neurones moteurs :	47
b- Rôles des neurones entériques.....	48
➤ Contrôle de la motricité intestinale :.....	48
➤ Contrôle des sécrétions intestinales :	50
➤ Contrôle du flux sanguin :.....	51
➤ Contrôle des fonctions de la BEI :.....	52
6) Les cellules gliales entériques	53
a- Origine et localisation.....	53
b- Développement.....	54
c- Morphologie et marqueurs	55
d- Les différents types de cellules gliales entériques.....	57
e- Rôles des cellules gliales entériques	58
➤ Contrôle des neurones entériques :.....	58
➤ Implication dans les mécanismes immunitaires :.....	61
➤ Contrôle de la motricité	62
➤ Contrôle des cellules endothéliales :.....	62
f- Comparaison aux astrocytes du système nerveux central	63
IV L'Unité glio-épithéliale en conditions physiologiques	65
1) Contrôle glial de la perméabilité	66
2) Contrôle glial de la réparation.....	67
3) Contrôle glial de la prolifération	67
V L'Unité glio-épithéliale en condition pathologique : le cas des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)	69

Sommaire

1) Rappels sur l'inflammation.....	69
2) Description générale des MICI	70
a- Signes cliniques et diagnostic.....	70
b- Epidémiologie.....	71
c- Physiopathologie	72
➤ Facteurs génétiques :	72
➤ Facteurs environnementaux :.....	74
➤ Facteurs microbiens :	78
d- Traitements	81
➤ Traitements médicamenteux :	81
➤ Mesures hygiéno-diététiques :.....	82
➤ Traitement chirurgical :	83
e- Modèles expérimentaux	83
3) Altérations de la barrière épithéliale intestinale	84
a- Défaut de protection	84
b- Défaut de perméabilité	87
c- Défaut de réparation	89
4) Altérations du système nerveux entérique.....	90
a- Altérations neuronales.....	90
➤ Altérations morphologiques et perte neuronale :	91
➤ Altérations fonctionnelles :	92
b- Altérations gliales.....	93
➤ Altérations phénotypiques :.....	94
➤ Altérations fonctionnelles :	94
5) Altérations du niveau de production d'eicosanoïdes.....	96
a- Les eicosanoïdes comme médiateurs de l'inflammation	96
b- Les eicosanoïdes comme agents protecteurs	97
Objectifs de l'étude	99
Résultats	101
Article 1 :	101
Défauts de production de 15-HETE et du contrôle de la perméabilité intestinale par les cellules gliales entériques de patients atteints par la maladie de Crohn.....	101
Article 2 :	122
La prostacycline prévient la colite et diminue la perméabilité intestinale via une régulation de l'occludine et de la Caspase-3	122
Discussion	163
Conclusion	178
Annexes	180

Sommaire

Annexe 1 : Maintien de la barrière intestinale : quelle contribution pour la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) dans l'épithélium intestinal ?.....	180
Annexe 2 : La cyclooxygénase 2 est augmentée dans le tractus gastrointestinal dans la maladie de Parkinson.....	198
Annexe 3 : Revue "Définir la Maladie de Crohn comme une gliopathie ?".....	204
Références.....	215

Liste des publications et conférences

Publications :

Articles présentés dans la thèse :

- Camille Pochard*, Sabrina Coquenlorge*, Julie Jaulin, Nicolas Cenac, Nathalie Vergnolle, Guillaume Meurette, Marie Freyssinet, Michel Neunlist and Malvyne Rolli-Derkinderen. **Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells From Patients With Crohn's Disease.** *Gastroenterology*. Jan;150(1):168-80. (2016) (* co-auteurs)
- Camille Pochard, Arnaud Bourreille, Philippe Aubert, Charlène Gesret, Jérémy Brégeon, Anne Jarry, Nicolas Cenac, Emmanuel Coron, Guillaume Meurette, Juliette Podevin, Michel Neunlist and Malvyne Rolli-Derkinderen. **Prostacyclin prevents colitis and decreases intestinal permeability through occludin and Caspase-3 regulation.** En préparation.

Articles présentés en annexe :

- Camille Pochard, Michel Neunlist, Jocelyne Leclerc, Marc Foretz, Benoit Viollet and Malvyne Rolli-Derkinderen. **The epithelial AMP-activated protein kinase regulates intestinal permeability.** En préparation.
- Camille Pochard, Laurène Leclair-Visonneau, Emmanuel Coron, Michel Neunlist, Malvyne Rolli-Derkinderen, and Pascal Derkinderen. **Cyclooxygenase 2 is upregulated in the gastrointestinal tract in Parkinson's disease.** Soumis à *Movement disorders* (Septembre 2017).
- Camille Pochard, Marie Freyssinet, Arnaud Bourreille, Michel Neunlist and Malvyne Rolli-Derkinderen. **Defining Crohn's disease as a gliopathy ?** En préparation.

Communications orales :

- **Les cellules gliales entériques produisent du 15-HETE qui régule les propriétés épithéliales intestinales : dérégulation dans la maladie de Crohn.** IMAD (Institut des maladies de l'appareil digestif) Juin 2014 - Nantes, France. GFNG (Groupe français de neurogastroentérologie) Juin 2014 – Bordeaux, France. CECED (Club d'étude des cellules épithéliales digestives) Mars 2015 – Nantes, France. PPB (Physiologie et physiopathologie des barrières) Juin 2015 – Nantes, France.
- **La PGI2 : un nouvel acteur dans la physiopathologie intestinale ?** IMAD (Institut des maladies de l'appareil digestif) Juin 2016 - Nantes, France.
- **Enteric glial cells reaction to inflammation is lost in Crohn's disease.** DHU2020 Autumn School Octobre 2016 - Nantes, France (Prix de la meilleure communication orale).

Posters :

- **Enteric glial cells produce 15-HETE to regulate intestinal epithelial permeability : dysregulation in Crohn's disease.** FNM (Federation of Neurogastroenterology and Motility)

Liste des publications et conférences

Septembre 2014 - Guangzhou, Chine. UEGW (United European Gastroenterology Week)

Octobre 2014 – Vienne, Autriche. NeuroGASTRO

Juin 2015 – Istanbul, Turquie. DHU2020

Autumn school Octobre 2015 - Nantes, France.

- **The AMPK regulates the intestinal permeability.** PPB (Physiologie et physiopathologie des barrières) Juin 2015 – Nantes, France.
- **Enteric glial cells from Crohn's disease patients are defective for eicosanoids production and for the control of epithelial permeability and healing.** JFHOD (Journées françaises d'hépatogastroentérologie et d'oncologie digestive) Mars 2015 - Paris, France. ewIMID (European Workshop on Immune Mediated inflammatory Diseases) Septembre 2015 – Amsterdam, Pays-Bas. Symposium Intestinal Stem Cells Novembre 2015 - Nantes, France. Journées scientifiques de l'école doctorale Décembre 2015 - Nantes, France (Prix de la meilleure présentation de poster).
- **Contribution of AMPK in the maintenance of intestinal epithelial barrier homeostasis.** 2nd European Workshop on AMPK Septembre 2015 - Maastricht, Pays-Bas.
- **Enteric glial cells reaction to inflammation is lost in Crohn's disease.** ASN (American Society of Neurochemistry) Mars 2016 - Denver, USA. FNM (Federation of Neurogastroenterology and Motility) Aout 2016 - San Francisco, USA.
- **Prostacyclin reverses colitis through the down regulation of intestinal epithelial permeability.** NeuroGASTRO Aout 2017 - Cork, Irlande. UEGW (United European Gastroenterology Week) Octobre 2017 - Barcelone, Espagne.

Liste des abréviations

5-HT	Sérotonine ou 5-hydroxytryptamine	PRR	Pattern recognition receptor
AA	Acide arachidonique	RCH	Rectocolite hémorragique
Ach	Acétylcholine	SNC	Système nerveux central
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens	SNE	Système nerveux entérique
AMPK	AMP-activated protein kinase	SP	Substance P
ATP/ADP	Adénosine triphosphate/diphosphate	TER	Résistance transépithéliale
BEI	Barrière épithéliale intestinale	TLR	Toll-like receptor
B-FABP	Brain fatty acid-binding protein	TNBS	Trinitrobenzenesulfonic acid
BMP	Bone morphogenetic protein	TNF	Tumor necrosis factor
ChAT	Choline acétyltransférase	TGF	Transforming growth factor
CEI	Cellules épithéliales intestinales	TX	Thromboxane
CGE	Cellules gliales entériques	VIP	Vasoactive intestinal peptide
CGRP	Calcitonin gene-related peptide	ZO	Zonula occludens
CIC	Cellules interstitielles de Cajal		
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité		
COX	Cyclooxygénase		
DSS	Dextran sodium sulfate		
EGF	Epidermal growth factor		
ERK	Extracellular signal-regulated kinase		
GABA	Acide gamma-aminobutyrique		
GDNF	Glial cell-derived neurotrophic factor		
GFAP	Glial fibrillary acidic protein		
GSNO	S-Nitrosoglutathione		
HETE	Hydroxyeicosatétraénoïque acide		
IFN	Interféron		
IL	Interleukine		
IPAN	Intrinsic primary afferent neurons		
LOX	Lipoxygénase		
LPS	Lipopolysaccharide		
LT	Leucotriène		
MAPK	Mitogen-activated protein kinase		
MC	Maladie de Crohn		
MICI	Maladies inflammatoires chroniques intestinales		
MLC	Myosine light chain		
NGF	Nerve growth factor		
NO	Nitric oxyde		
NPY	Neuropeptide Y		
PG	Prostaglandine		
PLP1	Proteolipid protein 1		
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor		

Introduction générale

Le tube digestif joue un rôle essentiel dans la survie de tout organisme pluricellulaire en participant à la digestion et en assurant l'absorption des nutriments et des électrolytes, mais également en représentant un organe de défense face aux agressions mécaniques, chimiques ou pathogènes. Outre l'importance d'une bonne coordination des fonctions motrices, sécrétrices et immunitaires assurée par l'ensemble des composants cellulaires du système digestif, la barrière épithéliale intestinale (BEI) représente un acteur central de l'homéostasie intestinale. Elle est située à l'interface entre la lumière intestinale et les tissus internes, et est formée par une monocouche de cellules épithéliales qui vont notamment contrôler la perméabilité intestinale en agissant comme un filtre sélectif. L'intégrité de cette BEI est assurée par un constant renouvellement grâce à un équilibre entre la prolifération, la différenciation, la migration et l'élimination des cellules qui la composent, mais également par une régulation efficace des propriétés de perméabilité et de réparation.

Toutes ces fonctions sont contrôlées par le système nerveux entérique (SNE). Si le SNE a longtemps été considéré comme un simple relai post-ganglionnaire faisant partie du système nerveux parasympathique, son caractère autonome vis-à-vis du système nerveux central n'est aujourd'hui plus à débattre. Il désigne l'ensemble du réseau nerveux qui s'étend le long du tube digestif, et depuis les années 90 son étude connaît un essor important. Ainsi, la neurogastroentérologie s'intéresse à la compréhension des mécanismes du contrôle nerveux des fonctions digestives, et représente désormais un sujet d'étude essentiel dans le contexte des maladies digestives. Le SNE est organisé en deux plexus ganglionnaires majeurs eux-mêmes composés de neurones et de cellules gliales entériques (CGE). Il contrôle notamment la motricité, le flux sanguin, les sécrétions intestinales ainsi que les propriétés de la BEI. Plus particulièrement, les CGE ont récemment été identifiées comme des composants clé du microenvironnement de la BEI, renforçant sa protection, sa cicatrisation et diminuant sa perméabilité.

Dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), le risque de rupture de cette BEI est aggravé du fait d'un déséquilibre des processus de prolifération et d'une accélération du turnover épithélial. Les MICI regroupent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), toutes deux caractérisées par une inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif. Leur prévalence est en constante augmentation, mais si on sait que différents facteurs génétiques et environnementaux entrent en compte, l'étiologie de ces maladies est encore mal comprise. De plus, il n'existe pas de traitement curatif, seulement des traitements palliatifs ayant pour but de limiter les symptômes d'où l'importance de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués. Plusieurs études ont mis en évidence des défauts de perméabilité et de réparation de la BEI chez ces patients qui pourraient concourir au développement de ces maladies. En effet, il a été montré que l'augmentation de perméabilité chez les patients MICI précédait les rechutes et le développement de l'inflammation, et était également présente chez un sous-ensemble de parents au premier degré non malades. A l'inverse, une réparation efficace de la muqueuse est associée au maintien en rémission de ces patients, et une diminution de la perméabilité protège du développement de l'inflammation dans un modèle génétique de MICI. Ainsi, une rupture de la BEI n'est peut être pas suffisante pour

Introduction générale

induire une MICI, mais le maintien de l'intégrité de la muqueuse correspond à un marqueur de bonne évolution de la maladie. De plus, des altérations morphologiques des CGE ont été rapportées dans ces pathologies, mais il reste encore à déterminer si les CGE pourraient directement contribuer aux dysfonctions de la BEI observées chez ces patients. Renforcer la BEI représente ainsi un enjeu thérapeutique majeur non seulement pour les MICI, mais également pour toutes les pathologies présentant un défaut de réparation de la BEI telles que le syndrome de l'intestin irritable, l'obésité ou encore le diabète.

Parmi les différentes classes de lipides existantes on retrouve les eicosanoïdes, des dérivés biologiquement actifs des oméga 3 et 6, qui regroupent plusieurs familles de molécules comme les prostanoïdes ou les leucotriènes pouvant avoir des rôles pro ou anti-inflammatoires. Dans le cas des MICI, des modifications de la production de plusieurs eicosanoïdes dérivés de la voie des oméga 6 sont retrouvées chez ces patients. Si des études suggèrent un rôle majoritairement pro-inflammatoire de ces composés, leur rôle sur les fonctions de la BEI reste peu étudié. Parmi les médiateurs gliaux régulant les propriétés de la BEI en conditions physiologiques on retrouve des médiateurs lipidiques comme le 15dPGJ2 qui régule la prolifération/différenciation des cellules épithéliales et le 11 β PGF2 α qui augmente la cicatrisation de la BEI. L'étude de l'impact des eicosanoïdes sur les fonctions de la BEI dans le cas des MICI représente ainsi une piste thérapeutique prometteuse.

Dans ce contexte, le but de ce travail était non seulement d'étudier l'implication des CGE dans la physiopathologie des MICI, mais également d'identifier un ou plusieurs médiateurs (en particulier les eicosanoïdes) capables de renforcer la BEI.

Etude bibliographique

I Les eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique

Lorsqu'on parle de lipides, on pense généralement au terme "graisses", mais les lipides jouent également de nombreux rôles essentiels au sein de l'organisme. Ce sont notamment des éléments de structure des membranes de nos cellules et ce sont les précurseurs de molécules impliquées dans la régulation de plusieurs fonctions physiologiques telles que la vasoconstriction ou encore l'inflammation. Il existe plusieurs types de lipides selon leur structure moléculaire : le cholestérol, les acides gras saturés (aucune liaison double), monoinsaturés (une seule liaison double) et polyinsaturés (plusieurs liaisons doubles). Ces derniers sont des acides gras dits essentiels puisque notre organisme en a absolument besoin. Toutefois il ne peut pas les synthétiser d'où l'importance d'en consommer régulièrement dans l'alimentation. On compte ainsi deux grandes familles d'acides gras polyinsaturés essentiels : les oméga 6 et les oméga 3 (dont le nom dépend de la position de la première double liaison, sur le 6^e ou le 3^e carbone respectivement), qui vont permettre la synthèse de nombreuses autres molécules. Ainsi, les eicosanoïdes sont un groupe de médiateurs lipidiques biologiquement actifs dérivés des acides gras polyinsaturés essentiels contenant 20 atomes de carbone (**Figure 1**). Parmi eux, on retrouve des prostanoides (prostaglandines PG et thromboxanes TX), des leucotriènes (LT) et des acides hydroxylés (HETE pour hydroxy-eicosatétraénoïque), issus de la voie des omega 3 ou des omega 6.

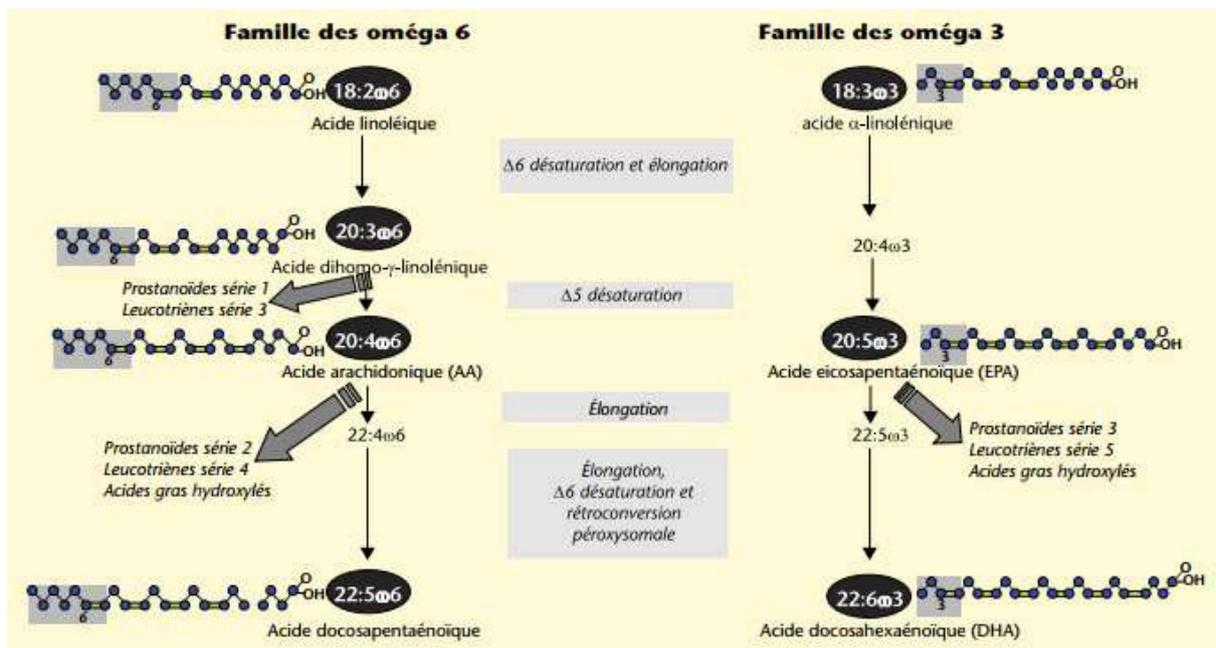


Figure 1 : Voies de synthèse des omega 3 et omega 6

Le précurseur de la famille des omega 3 est l'acide α -linoléique, qui permet notamment la synthèse d'acide eicosapentaénoïque (EPA) et d'acide docosahexaénoïque (DHA). Le précurseur de la famille des omega 6 est l'acide linoléique qui permet notamment la synthèse d'acide arachidonique (AA).
Par David Throop.

Etude bibliographique

Les omega 3 dérivent de l'acide α -linoléique qui est le précurseur de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) permettant la formation des prostanoides de série 3 et des leucotriènes de série 5. L'EPA est lui-même précurseur de l'acide docosahexaénoïque (DHA) connu pour son rôle structural en tant que constituant majeur des lipides de structure du système nerveux central. Les omega 6 dérivent de l'acide linoléique, le principal acide gras polyinsaturé retrouvé dans le régime alimentaire, et ayant un rôle majeur structural en tant que constituant des phospholipides membranaires. Il va permettre la synthèse des prostanoides de série 1 et des leucotriènes de série 3 à partir de l'acide dihomog- γ -linoléique. C'est également le précurseur majeur de l'acide arachidonique (AA) qui va permettre la synthèse des eicosanoïdes détaillés dans cette partie, à savoir des prostanoides de série 2, des leucotriènes de séries 4 et des acides hydroxylés.

1) Phospholipase A2 et production d'acide arachidonique

La phospholipase A2 (PLA2) est une hydrolase qui libère l'acide arachidonique (AA) à partir des phospholipides membranaires. Elle hydrolyse la liaison ester en position sn-2 du phospholipide ce qui génère la production d'un lysophospholipide et d'un acide gras libre tel que l'AA, le précurseur des eicosanoïdes (Balsinde et al., 2002).

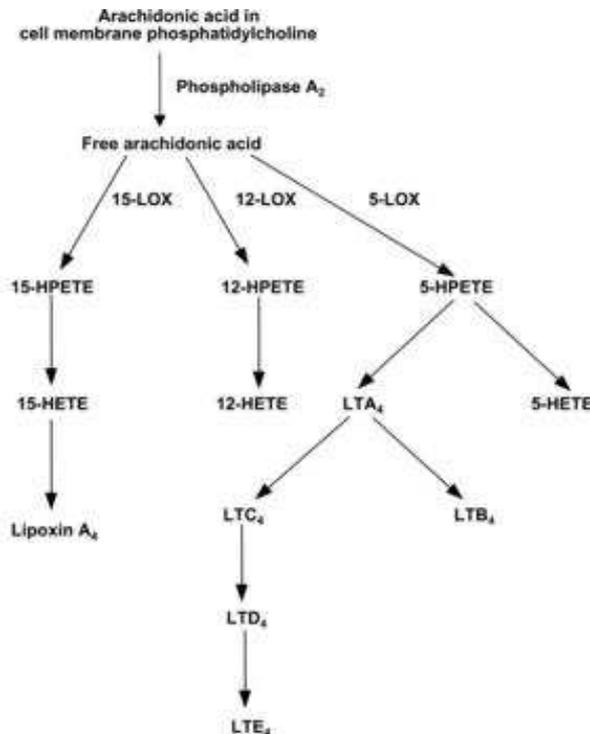
Les PLA2 sont réparties en 3 classes : les phospholipases sécrétées (sPLA2), intracellulaires (iPLA2) et cytosoliques (cPLA2). Les sPLA2 sont des petites enzymes (13-15 kDa) exprimées chez la souris, le rat et l'Homme dans le tractus digestif et les organes lymphoïdes. Le fonctionnement de leur site actif nécessite la présence d'un ion Ca^{2+} , et leur rôle est d'hydrolyser les phospholipides de la couche externe des membranes cellulaires. Parmi les fonctions biologiques qui lui sont associées on retrouve la digestion des phospholipides alimentaires et la défense de l'hôte contre les infections bactériennes, ainsi qu'une potentielle implication dans la promotion de l'athérosclérose et du cancer (Lambeau and Gelb, 2008). Les iPLA2 sont plus grosses que les sPLA2 (85-90 kDa) et sont exprimées de façon ubiquitaire dans la quasi totalité des tissus. Elles jouent un rôle dans le remodelage des phospholipides et dans les réparations membranaires, et ne sont pas dépendantes des ions Ca^{2+} . Elles semblent impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques, telles que l'apoptose, la sécrétion d'insuline, ou encore la régénération axonique après une lésion nerveuse (Burke and Dennis, 2008 ; López-Vales et al., 2008). Enfin, les cPLA2 sont les plus grandes (85-110 kDa) et sont également exprimées de façon ubiquitaire. Elles sont faiblement dépendantes du Ca^{2+} et semblent être à l'origine de la majorité de l'AA libéré et donc de la production d'eicosanoïdes, suggérant un rôle majeur de ces enzymes dans les maladies inflammatoires (Burke and Dennis, 2008).

2) La voie des lipoxygénases

La voie des lipoxygénases permet la synthèse des acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE) et des leucotriènes (LT). Ce sont des enzymes à fer non-hémunique qui contiennent des dioxygénases et qui sont exprimées de manière constitutive chez les plantes et les animaux. Dans l'intestin on retrouve les lipoxygénases 15-LOX, 12-LOX et 5-LOX (**Figure 2**). Elles sont constituées d'un petit domaine N-terminal en feuillets beta, d'un inter-domaine de liaison et d'un grand domaine catalytique C-terminal qui contient le fer non-hémunique indispensable à son activité enzymatique. Elles vont catalyser la réaction Acide gras polyinsaturé (AA par ex) + $\text{O}_2 \rightarrow$ Acide

Etude bibliographique

hydroperoxyeicosatétraénoïque (HPETE). Ces dérivés sont ensuite transformés en dérivés plus stables : les HETE et les LT (Rossi et al., 1985).



Les 15-LOX, 12-LOX et 5-LOX vont permettre la synthèse d'acides hydroperoxyeicosatétraénoïques (HPETE) qui pourront ensuite être réduits en acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE) et en leucotriènes (LT).
(D'après Calder, 2005)

Figure 2 : Voie de synthèse des lipoxycgénases

a- Les acides hydroxyeicosatétraénoïques

Le 15-HETE

La 15-LOX 1 (codée par le gène ALOX15A) et la 15-LOX 2 (codée par le gène ALOX15B) convertissent l'AA en 15-HPETE qui sera réduit en 15-HETE par la GPX (glutathion peroxydase). La 15-LOX 1 est exprimée par les cellules épithéliales intestinales, mais aussi par celles de la peau, les réticulocytes, les éosinophiles et les macrophages (Lu et al., 2012). Elle participe au développement et à la progression du carcinome hépatocellulaire en protégeant les cellules cancéreuses de l'apoptose et en favorisant leur dissémination par l'intermédiaire d'une voie de signalisation PI3K/Akt/HS 90 (Ma et al., 2013). A l'inverse, elle aurait des effets bénéfiques sur les cancers colorectaux puisque qu'elle est sous-exprimée dans ces pathologies alors que sa restauration rétablit les mécanismes d'apoptose (Shureiqi, 2005). La 15-LOX 2 est quant à elle décrite pour être exprimée par les cellules de la peau, la cornée, les poumons et la prostate ainsi qu'au sein des macrophages, des oligodendrocytes et de la microglie (Brash et al., 1997 ; Danielsson et al., 2008 ; Haynes and van Leyen, 2013). Elle est principalement connue pour son rôle dans l'induction d'événements athérotrombotiques, en augmentant l'agrégation des plaquettes et la production de thrombine (Magnusson et al., 2012 ; Vijil et al., 2014).

Le 15-HETE stimule la migration des cellules endothéliales des capillaires, régule la mitogénèse des lymphocytes et promeut la néovascularisation (Riehl et al., 1990). Dans le cas des cardiopathies ischémiques il pourrait participer à la thrombose et il a également été décrit pour

Etude bibliographique

entraîner l'agrégation plaquettaire et augmenter la perméabilité endothéliale (Kundumani-Sridharan et al., 2010 ; Lundqvist et al., 2016). Cependant, son rôle sur la BEI est encore inconnu.

Le métabolisme du 15-HETE permet également la synthèse de lipoxine A4 en particulier par les neutrophiles. Elle est associée à de nombreuses fonctions biologiques, telles que l'activation des leucocytes, l'inhibition des cellules NK ou encore la migration et l'adhésion des monocytes (Maddox and Serhan, 1996 ; Ramstedt et al., 1987).

Le 12-HETE

La 12-LOX (codée par le gène ALOX12) convertit l'AA en 12-HPETE qui sera lui aussi réduit en 12-HETE grâce à la GPX. Elle est principalement exprimée par les thrombocytes et les cellules de la peau.

Le 12-HETE est connu pour attirer les neutrophiles par chimiotactisme, induire la migration des cellules musculaires lisses aortiques et provoquer la rétraction des cellules endothéliales (Porro et al., 2014). Il est impliqué dans les phénomènes d'inflammation (par exemple via son rôle sur les neutrophiles), mais également dans les cancers puisqu'il augmente notamment la survie et la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate (Pidgeon et al., 2003 ; Yang et al., 2007). De plus, il est impliqué dans le diabète en réduisant la sécrétion d'insuline et en causant l'apoptose des cellules beta du pancréas (Ma et al., 2010).

Le 5-HETE

La 5-LOX (codée par le gène ALOX5) convertit l'AA en 5-HPETE qui sera réduit en 5-HETE par des MGST (Microsomal glutathione S-transferases). Elle est majoritairement exprimée par les cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les lymphocytes B ou encore les macrophages (Rådmark et al., 2015). On la retrouve également dans de nombreuses cellules cancéreuses comme celles du poumon, du colon ou du pancréas (Bishayee and Khuda-Bukhsh, 2013). L'interaction avec la protéine FLAP (5-lipoxygenase activating protein), codée par le gène ALOX5AP, est nécessaire à l'activation de la 5-LOX (Peters-Golden and Brock, 2003). Ainsi, FLAP favorise l'action de la 5-LOX en améliorant la livraison d'AA. Des polymorphismes des gènes ALOX5 et ALOX5AP ont été identifiés comme facteurs de risque élevés pour l'athérosclérose et la maladie d'Alzheimer (Manev and Manev, 2006).

De part sa forte expression par les cellules immunitaires, le 5-HETE participe aux réponses inflammatoires et allergiques. Il est également impliqué dans la production de stéroïdes en stimulant par exemple la production de progestérone et de testostérone par des cellules ovariennes ou testiculaires de rat (Reddy et al., 1993 ; Wang et al., 1989).

Les récepteurs de ces composés sont encore mal connus. Toutefois, il est admis qu'ils peuvent être des agonistes des récepteurs PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) (Naruhn et al., 2010 ; Shappell et al., 2001). De même, ils peuvent se lier aux récepteurs couplés aux protéines G BLT2 (leukotriene B4 receptor) (Yokomizo et al., 2001). Il a été montré que les 15-, 12- et 5-HETE pourraient aussi se lier au récepteur TXA2/PGH2 (platelet thromboxane A2/prostaglandin H2) (Mais et al., 1990). Le 12-HETE peut également se lier au récepteur GPR31 (G protein-coupled receptor 31) (Guo et al., 2011).

b- Les leucotriènes

Les leucotriènes dérivent du 5-HPETE et sont donc dépendants de l'expression de la 5-LOX et de FLAP. Le leucotriène A4 (LTA4) dérive du 5-HPETE et permet la synthèse de deux sous-classes de leucotriènes : les LTB4 et les LTC4,D4 et E4.

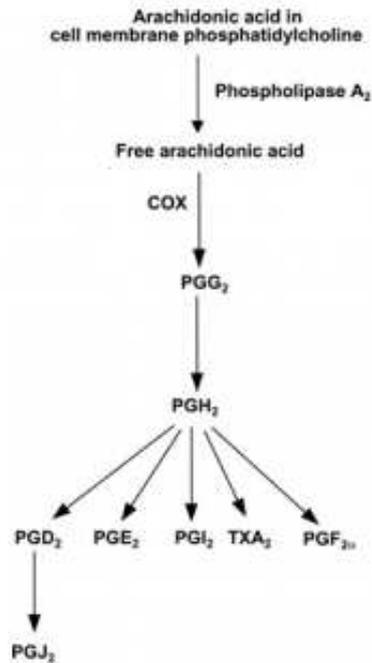
Le LTB4 est libéré par l'enzyme LTA4 hydrolase dans les leucocytes en réponse à l'inflammation et promeut le recrutement de cellules immunitaires par chimiotactisme ainsi que la production de cytokines proinflammatoires en se couplant aux récepteurs LTB4R (Tager and Luster, 2003).

Le LTC4 est synthétisé à partir du LTA4 sous l'action d'une glutathion S-transférase. Dans les cellules non-hématopoïétiques sa synthèse peut être activée par la chimiothérapie ou un stress du réticulum endoplasmique, et le LTC4 va pouvoir agir de manière autocrine en induisant la translocation nucléaire de la NOX4 (NADPH oxydase 4). Cela aura pour conséquence une accumulation de ROS (espèces réactives de l'oxygène) et une augmentation des dommages à l'ADN (Dvash et al., 2015). Dans les cellules d'origine myéloïde il est sécrété via le transporteur MRP1 et des protéases à la surface des cellules entraînent le clivage des résidus γ -glutamyl et glycine des segments glutathion afin de générer les composés plus stables LTD4 et LTE4. Ces 3 leucotriènes se lient ensuite aux récepteurs couplés aux protéines G CYSLTR1 et 2 et déclenchent la vasoconstriction et la bronchoconstriction, faisant ainsi de ces composés des molécules clés dans le contexte des allergies et de l'asthme (O'Byrne, 1997).

3) La voie des cyclooxygénases

Les cyclooxygénases (COX), aussi connues sous le nom de PTGS (Prostaglandin-endoperoxyde synthase) sont des oxydoréductases qui permettent la synthèse des prostaglandines et des thromboxanes (**Figure 3**). Leur action s'effectue en deux temps : premièrement elles soustraient un hydrogène du carbone 13 de l'AA puis elles ajoutent deux molécules d'oxygène, ce qui permet la formation de prostaglandine G2 (PGG2). Deuxièmement, cette PGG2 est réduite en PGH2 par le site actif peroxydase. La synthèse des prostaglandines (PG) et thromboxanes (TX) s'effectue ensuite grâce à des isomérases spécifiques.

Chez l'humain il existe deux isoformes des COX : COX-1 et COX-2. COX-1 participe à la synthèse basale d'eicosanoïdes et est exprimée de façon constitutive dans la plupart des tissus. A l'inverse l'expression de COX-2 est induite par des stimuli comme l'inflammation et on la retrouve principalement au niveau des cellules endothéliales et rénales ainsi que dans le système nerveux central (Tanabe and Tohnai, 2002).



Les COX vont permettre la synthèse de PGG₂ qui sera réduite en PGH₂ afin de permettre la synthèse des prostaglandines et des thromboxanes grâce à des isomérases spécifiques. (D'après Calder, 2005)

Figure 3 : Voie de synthèse de cyclooxygénases

a- Les prostaglandines

La PGD₂

La PGD₂ dérive de la PGH₂ grâce aux enzymes PGDS (Prostaglandines D synthases). Il existe deux isoformes de PGDS : la forme hématopoïétique H-PGDS et la forme lipocaline L-PGDS (ou β Trace). La H-PGDS est exprimée par les cellules présentatrices d'antigènes, les mastocytes et les lymphocytes Th2 alors que la L-PGDS est plutôt retrouvée dans le système nerveux central, dans le coeur et dans le tube digestif, notamment au niveau du SNE (Eguchi et al., 1997 ; Hokari et al., 2011 ; Le Loupp et al., 2015 ; Mase et al., 1999 ; Tanaka et al., 2000).

La PGD₂ se lie au récepteur couplé aux protéines G DP1 (PTGDR) et au récepteur chémoattractant DP2 (CRTH2). Elle joue un rôle essentiel notamment dans la régulation du sommeil, dans les réponses allergiques mais également dans le processus d'inflammation (Huang et al., 2007 ; Matsuoka et al., 2000 ; Schuligoj et al., 2005). Dans l'intestin, elle est produite par le système nerveux entérique en réponse à l'inflammation chez les patients atteints par la maladie de Crohn, et son rôle a aussi été mis en évidence dans la protection contre les colites et les cancers colorectaux associés (Iwanaga et al., 2014 ; Le Loupp et al., 2015).

La PGD₂ peut donner de la PGJ₂ suite à sa déshydratation. En absence d'albumine elle subira une nouvelle déshydratation afin de former le 15d-PGJ₂ (Scher and Pillinger, 2005). Il a été montré que ce dérivé était impliqué dans de nombreuses réponses immunitaires et inflammatoires. En particulier, sa liaison aux récepteurs PPARγ a été montrée pour réprimer la transcription de gènes proinflammatoires et elle est aussi connue pour bloquer les voies de signalisation proinflammatoires NFκB (Kim et al., 2007). De même, elle est impliquée dans la cytoprotection et l'inhibition de la prolifération cellulaire (Pereira et al., 2006). Dans l'intestin, sa production par les cellules gliales entériques régule la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales intestinales (Bach-Ngohou et al., 2010).

Etude bibliographique

La PGE2

La PGE2 est obtenue grâce à l'action des PGES (Prostaglandines E synthases). Il existe trois isoformes de PGES : les formes microsomales mPGES1 et 2 et la forme cytosolique cPGES3. La mPGES1 requiert la présence de glutathion et est retrouvée à la membrane périnucléaire associée à COX-2 (Jakobsson et al., 1999). Son expression est augmentée par les stimulus pro-inflammatoires et diminuée par les glucocorticoïdes (Stichtenoth et al., 2001). *In vivo*, son expression est reportée pour être associée à l'inflammation, aux cancers ou encore à la reproduction (Filion et al., 2001 ; Kamei et al., 2003 ; Mancini et al., 2001). La mPGES2 est également retrouvée à la membrane, mais elle est associée aux enzymes COX-1 et -2 (Murakami et al., 2003). On la retrouve dans de nombreux tissus dont le cœur, le cerveau et l'intestin, mais son rôle reste encore peu connu (Tanikawa et al., 2002). La cPGES3 est retrouvée de façon ubiquitaire et est constitutivement exprimée dans les cellules. Elle assure, en coopération avec la protéine Hsp90, la production de PGE2 quand des fortes concentrations d'AA sont rapidement produites suite à une forte activation de la PLA2 cytosolique (Tanioka et al., 2003).

La PGE2 se fixe aux récepteurs membranaires couplés aux protéines G EP1 à EP4. Ces récepteurs présentent une localisation tissulaire bien différente : EP1 est notamment exprimé par les cellules mastocytaires, les kératinocytes et les muscles longitudinaux coliques ; EP2 est très largement distribué et on le retrouve ainsi dans l'intestin, les poumons, les reins, l'utérus, le cerveau, la peau et dans de nombreuses cellules immunitaires ; EP3 est retrouvé dans le SNC notamment au niveau des neurones, mais aussi dans le système cardio-vasculaire, les reins ou encore la vessie et enfin EP4 est majoritairement exprimé dans le cœur et l'intestin (Woodward et al., 2011). Ces récepteurs ont également une transduction du signal différente, faisant de la PGE2 la prostaglandine la plus polyvalente en fonction du récepteur auquel elle se fixe (Sugimoto and Narumiya, 2007). Ainsi la PGE2 est impliquée dans de nombreux phénomènes immunitaires et inflammatoires, notamment via sa capacité à activer les lymphocytes T (Sreeramkumar et al., 2012). Elle joue également un rôle dans la régulation de la prolifération de nombreux types cellulaires. Il a par exemple été montré qu'elle inhibait la prolifération des cellules souches mésenchymateuses et des lymphocytes T (Kleiveland et al., 2008 ; Vercaemmen and Ceuppens, 1987). A l'inverse, elle promeut la prolifération et la différenciation neuronale dans le SNC, faisant de la PGE2 une cible thérapeutique potentielle pour des pathologies neuro-développementales telles que l'autisme (Wong et al., 2016). Au niveau du cœur elle a un rôle protecteur contre l'ischémie-reperfusion, via son récepteur EP4 (Xiao et al., 2004). La PGE2 est aussi connue pour avoir un rôle dans la promotion de tumeurs, en particulier au niveau de l'intestin. Ainsi, une délétion génétique de la mPGES1 entraîne une diminution de la tumorigénèse intestinale (Nakanishi et al., 2008 and 2011 ; Sasaki et al., 2012). Le même type de résultat est également observé chez des souris délétées pour les récepteurs EP1 à EP4 (Nakanishi and Rosenberg, 2013). Au niveau de l'intestin, la PGE2 a aussi un rôle dans l'inhibition de la sécrétion gastrique et dans la stimulation de la sécrétion de mucus (Dajani et al., 2003). Une étude a également montré son rôle synergique avec la PGI2 dans la restauration des fonctions de la barrière épithéliale intestinale dans l'iléon de porcs ischémiques (Blikslager et al., 1999).

La PGI2 ou prostacycline

La PGI2 dérive de la PGH2 grâce à la PTGIS (Prostaglandine I Synthase). Cette enzyme fait partie de la superfamille des cytochromes P450 qui sont des monooxygénases. Elle est

Etude bibliographique

majoritairement exprimée par les cellules musculaires lisses au niveau de la membrane plasmique et nucléaire et par les cellules endothéliales au niveau du réticulum endoplasmique (Spisni et al., 2001).

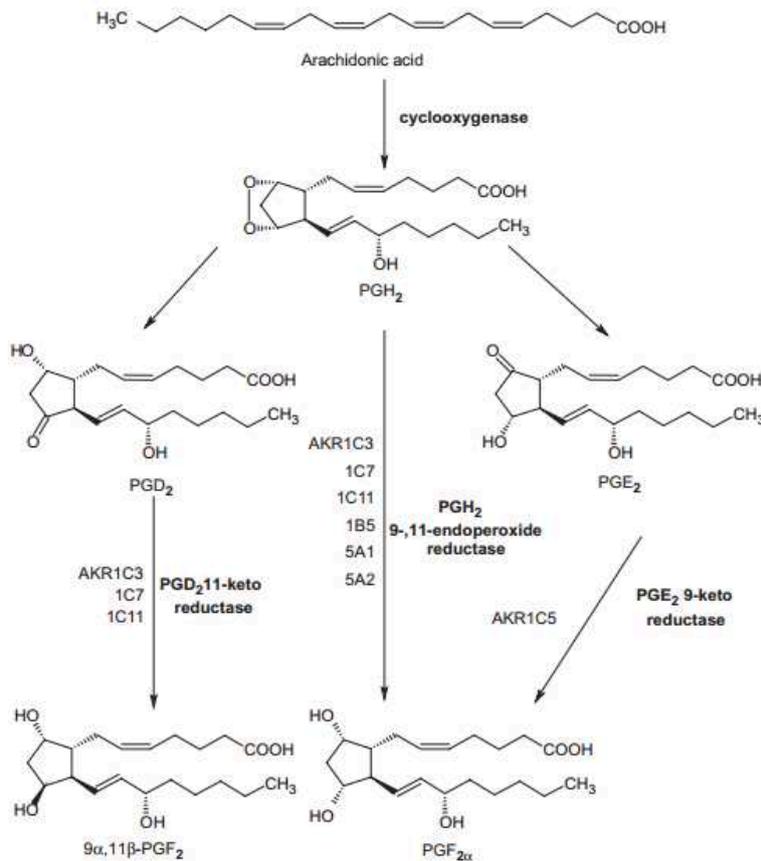
La PGI₂ se lie à son récepteur IP, un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G, notamment exprimé par les cellules musculaires lisses et les plaquettes (Katsuyama et al., 1994). Elle peut également se lier aux récepteurs nucléaires PPAR (Lim and Dey, 2002). La PGI₂ est un puissant vasodilatateur capable d'inhiber l'agrégation plaquettaire et la prolifération/différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires (Fetalvero et al., 2006 ; Smyth et al., 2009). Son rôle a également été mis en avant dans des maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose et l'allergie (Stitham et al., 2011 ; Takahashi et al., 2002). En ce qui concerne son rôle dans l'intestin il a par exemple été montré qu'elle réduisait la colite induite par un stress oxydatif, qu'elle améliorait la néo angiogénèse et la réparation tissulaire après une résection colique chez des rats et qu'elle diminuait l'adhérence des leucocytes et améliorait le flux sanguin microvasculaire (Aytaç et al., 2013 ; Lehmann et al., 2001 ; Vasiliadis et al., 2007). De plus, l'infusion continue de PGI₂ protégeait la muqueuse de l'intestin grêle après une auto transplantation chez des chiens (Kim et al., 2012). Enfin, elle pourrait être impliquée dans la maladie de Crohn puisqu'il a été montré chez ces patients que le promoteur codant pour la PTGIS était hyperméthylé, ce qui était associé à un défaut de son expression (Sadler et al., 2016).

Du fait de sa très faible demi-vie (inférieure à 3 minutes) et de sa dégradation en un composé inactif, le 6-ketoPGF_{1α}, plusieurs analogues stables sont couramment utilisés en clinique afin d'améliorer la circulation sanguine. Ainsi, on retrouve l'iloprost, l'epoprosténol (commercialisé sous les noms de Flolan et Veletri) et le cicaprost. Ces analogues peuvent être administrés par voie intraveineuse, sous-cutanée ou par inhalation dans des pathologies telles que le syndrome de Raynaud et l'ischémie des membres inférieurs, ou encore dans l'hypertension artérielle pulmonaire (Haché et al., 2003 ; McHugh et al., 1988).

La PGF_{2α}

La synthèse de PGF_{2α} se fait en réalité via trois voies de synthèse différentes (**Figure 4**). La première est issue d'une réduction du groupe 9,11-endopéroxyde de la PGH₂, la seconde d'une réduction du groupe 9-keto de la PGE₂ et enfin la troisième d'une réduction du groupe 11-keto de la PGD₂ (Watanabe, 2002). Cette dernière permet la synthèse d'un stéréoisomère : la 9α,11β-PGF₂. Ces voies de synthèse sont possibles grâce à l'action de PGFS (Prostaglandine F Synthases) qui appartiennent à la superfamille des Aldo-Keto Réductases AKR (Jez et al., 1997). Ainsi chez les mammifères on retrouve les AKR1C (kéto réductases) et les AKR1B (aldo réductases), qui sont des protéines monomériques liant des cofacteurs nicotinamides. Chez l'humain, l'enzyme AKR1C3 catalyse la formation de PGF_{2α} et 9α,11β-PGF₂ à partir de la PGD₂ et PGH₂, mais pas de la PGE₂ (Kabutu et al., 2009).

Etude bibliographique



La PGF₂α peut être synthétisée à partir d'une réduction des groupements 9,11-endopéroxyde de la PGH₂ et 9-keto de la PGE₂. La réduction du groupement 11-keto de la PGD₂ permet la synthèse d'un stéréoisomère de la PGF₂α : le 9α,11β-PGF₂. (Kabutu et al., 2009)

Figure 4 : Les trois voies de synthèse de la PGF₂α

La PGF₂α se lie au récepteur FP, très exprimé au niveau de l'utérus et des ovaires. Sa production est stimulée par l'ocytocine, et elle est connue pour avoir un rôle vaso- et broncho-constricteur, ainsi que pour stimuler les muscles lisses. On la retrouve en quantité supérieure chez les femmes atteintes d'endométriose (Sharma et al., 2010). Sa production est également augmentée dans de nombreuses pathologies impliquant une inflammation chronique telles que l'arthrite rhumatoïde, mais aussi dans le diabète ou encore l'obésité (Basu, 2007). Au niveau intestinal, la PGF₂α augmente la motilité et il a été montré qu'elle était augmentée dans la muqueuse rectale des patients atteints d'une MICI (Burakoff et al., 1990 ; Pacheco et al., 1987).

En ce qui concerne la 9α,11β-PGF₂, elle est retrouvée dans le liquide amniotique humain et augmentée par les composants des parois bactériennes et par certaines cytokines proinflammatoires, suggérant un rôle de cette prostaglandine dans les mécanismes d'accouchement (Mitchell et al., 2005). Dans l'intestin elle augmente l'étalement des CEI et favorise la réparation de la muqueuse, mais elle est sous-produite par les cellules gliales entériques de patients atteints par la maladie de Crohn (Coquenlorge et al., 2016).

b- Les thromboxanes

La TBXAS1 (Thromboxane A Synthase 1) est ancrée au réticulum endoplasmique et retrouvée principalement dans les plaquettes et les monocytes (Ruan et al., 1994). Elle permet, à partir de la PGH₂, la synthèse de quantités équivalentes de TXA₂ et 12-HHT (12-Hydroxyheptadecatrienoic acid). Ce 12-HHT, longtemps considéré comme inactif, a récemment été présenté comme étant un agoniste

Etude bibliographique

du récepteur B4 des leucotriènes impliqué dans le chimiotactisme des cellules mastocytaires (Okuno et al., 2008).

Le TXA2 se lie au récepteur TP et est majoritairement produit par les plaquettes activées afin de stimuler l'activation de nouvelles plaquettes ainsi que leur agrégation (Arita et al., 1989). Il est également impliqué dans la contraction des muscles lisses (Wilson et al., 2005). En solution aqueuse, le TXA2 est très instable et est donc rapidement hydrolysé en TXB2, un métabolite inactif presque entièrement éliminé par voie urinaire.

Ainsi, les eicosanoïdes dérivés des oméga 6 sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques. Leur action dépend surtout de l'expression tissulaire de leurs enzymes de production et de celle de leurs récepteurs. Ils peuvent avoir des effets opposés, et un même eicosanoïde peut également moduler son action en fonction du sous-type de récepteur qu'il cible. Ils peuvent être associés à des effets bénéfiques pour l'organisme, notamment via leur rôle structural des membranes cellulaires, mais ils peuvent aussi moduler le système cardio-vasculaire, le système immunitaire ou encore le système nerveux. Certains dérivés sont également associés à des effets délétères, en participant notamment aux réactions allergiques ou inflammatoires, d'où l'importance de ne pas consommer des oméga 6 en excès.

II La barrière épithéliale intestinale

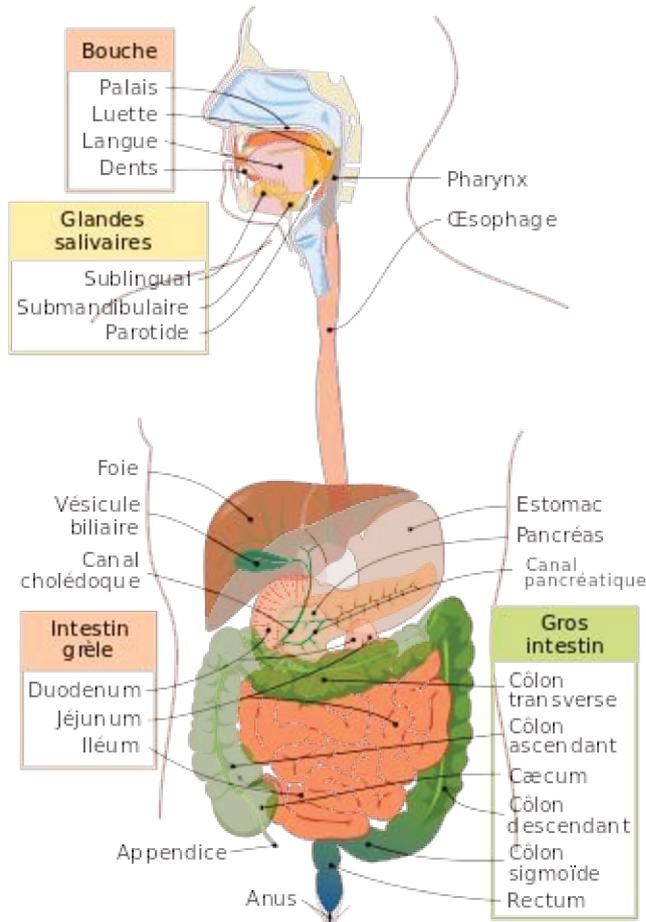
1) Généralités

Le tube digestif s'étend de la bouche à l'anus sur environ 8 mètres chez l'homme, et correspond à un ensemble d'organes : la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'intestin grêle, le gros intestin et l'anus (**Figure 5**). Lorsque le terme d'appareil digestif est employé, il comprend également plusieurs organes annexes tels que les dents, la langue, les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire ou encore le pancréas. L'ensemble de ces organes permet ainsi d'assurer différentes fonctions comme la transformation des aliments en nutriments, la digestion, l'absorption dans la circulation sanguine, l'élimination des déchets ou encore la protection de l'organisme. Il possède également différentes propriétés, notamment de perméabilité, de sécrétion, de motilité, de résistance et de renouvellement.

D'un point de vue histologique la paroi du tube digestif est composée de quatre couches successives (**Figure 6**) :

- la tunique externe, sous-divisée en deux parties : l'adventice aux extrémités orale et anale du tube digestif qui est formée par un tissu conjonctif lâche qui permet son maintien avec les autres organes et la séreuse entre ces deux extrémités formée par un tissu conjonctif tapissé d'un épithélium qui correspond au péritoine
- la musculuse, composée de fibres musculaires lisses longitudinales et circulaires
- la sous-muqueuse, formée par un tissu conjonctif lâche fortement vascularisé
- la muqueuse, couche la plus interne, composée par la barrière épithéliale intestinale qui repose sur un tissu conjonctif : la lamina propria, et sur la muqueuse musculuse

Etude bibliographique



L'appareil ou système digestif est composé du tube digestif (bouche pharynx, œsophage, intestin grêle, gros intestin et anus) associé aux organes digestifs annexes (dents, glandes salivaires, foie et pancréas). (Mariana Ruiz, 2006).

Figure 5 : Anatomie du système digestif chez l'homme

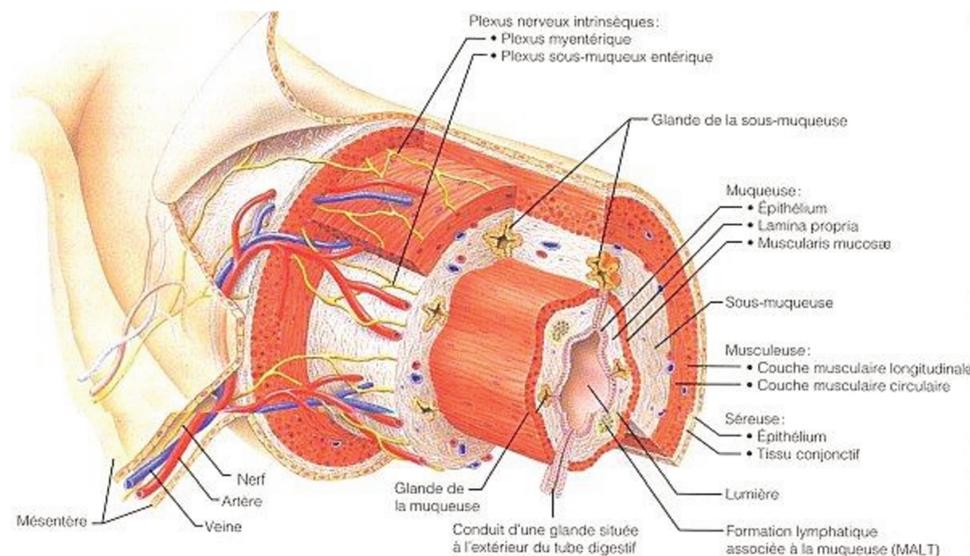


Figure 6 : Schéma de la paroi du tube digestif chez l'homme

La paroi intestinale est composée de 4 couches successives, de l'intérieur vers l'extérieur : la muqueuse, la sous-muqueuse, la muscleuse et la tunique externe (séreuse). (Marieb E.N. Anatomie et Physiologie humaines, Edition Pearson Education, 2005).

Etude bibliographique

Les muscles lisses sont impliqués dans la motricité digestive, puisque leur contraction ou relaxation va permettre la progression du bol alimentaire. Les cellules musculaires lisses sont activées par des potentiels d'action qui vont provoquer l'afflux de calcium dans ces cellules, entraînant la phosphorylation des filaments de myosine qui interagissent avec les filaments d'actine. C'est cette liaison actine-myosine qui va permettre la contraction des muscles lisses. Le contrôle nerveux de la motricité sera abordé dans les parties **III 5) et 6)**.

L'épithélium qui tapisse la bouche, l'œsophage et l'anus est un épithélium stratifié squameux constitué d'une épaisse membrane faite de plusieurs couches de cellules non kératinisées afin de protéger le tube digestif du bol alimentaire. Quand on parle de BEI, on parle de l'épithélium digestif qui tapisse la quasi totalité du tube digestif, de l'œsophage jusqu'au rectum et constitue ainsi une barrière physique entre la lumière intestinale et l'organisme. C'est un épithélium simple prismatique, constitué d'une couche unique de cellules hautes. Cependant, en fonction de sa localisation dans le tube digestif, l'épithélium digestif présente une organisation et des types cellulaires particuliers. L'épithélium gastrique, au niveau de l'estomac, est composé d'un épithélium simple formé de cellules à pôle muqueux fermé qui vont permettre la sécrétion de mucus afin de lubrifier la paroi gastrique et de la protéger des sucs gastriques.

Au niveau de l'intestin grêle, l'épithélium doit permettre l'absorption des nutriments, des électrolytes, des vitamines et de l'eau tout en empêchant le passage d'agents pathogènes ou toxiques. Au niveau du colon, les aliments non digestibles sont transformés en fèces après une réabsorption de l'eau, avant d'être propulsés vers le rectum. Ces différentes fonctions sont possibles grâce aux différences morphologiques et cellulaires qu'il existe entre ces deux parties, et qui sont détaillées dans le paragraphe suivant.

2) Organisation

C'est au niveau de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) que l'absorption de nutriments depuis la lumière intestinale va se faire grâce à la muqueuse intestinale. Celle-ci est caractérisée par une grande surface d'échange avec la lumière digestive de part sa longueur (4 à 6 mètres), mais également grâce à la présence de replis circulaires de la muqueuse (ou valvules conniventes), de villosités intestinales formées par des projections de la muqueuse dans lesquelles on trouve les capillaires sanguins et de microvillosités à la surface apicale des entérocytes (**Figure 7**).

Au niveau du colon, la muqueuse est plus épaisse et a pour but principal d'absorber l'eau et les électrolytes des résidus non digérés. Ainsi, l'épithélium est uniquement composé de cryptes et ne possède ni replis circulaires, ni villosités.

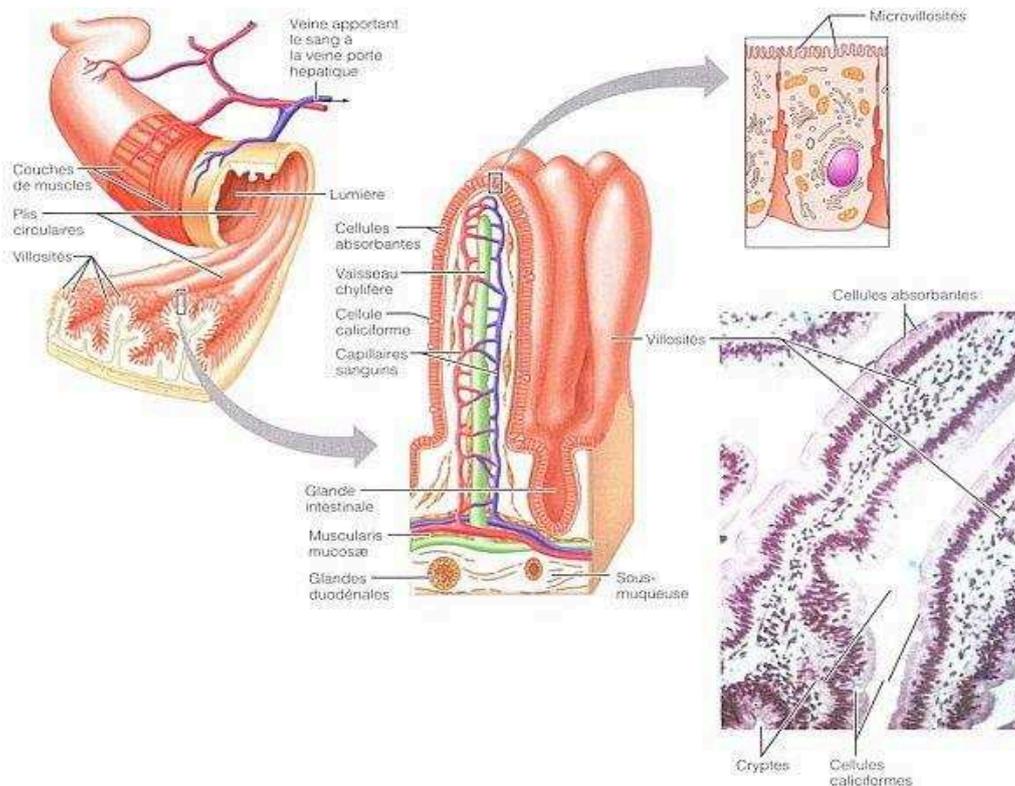


Figure 7 : Organisation de l'épithélium de l'intestin grêle

La longueur de l'intestin grêle, les replis circulaires, les villosités et les microvillosités accroissent la surface d'échange de l'épithélium intestinal, lui conférant une plus grande surface d'échange avec la lumière digestive. (Marieb E.N., 1993).

3) Les différents types de cellules

La BEI est composée par différents types cellulaires, tous issus de la différenciation des cellules souches intestinales situées au fond des cryptes (**Figure 8**). Le renouvellement continu de la BEI est assuré par l'équilibre entre différenciation, prolifération et mort par apoptose des CEI qui sont alors exfoliées dans la lumière intestinale. Ainsi, les cellules épithéliales différenciées (à l'exception des cellules de Paneth qui restent au fond des cryptes) migrent vers le haut de l'axe crypto-villositaire (Peterson and Artis, 2014).

Au niveau de l'épithélium intestinal, on retrouve sept types de CEI : les cellules souches, les entérocytes, les cellules de Paneth, les cellules mucosécrétantes (ou cellules de Goblet), les cellules entéroendocrines, les cellules Tuft et les cellules M (Barker, 2013).

Au niveau colique, le renouvellement de la BEI est également assuré par une migration des CEI vers le haut des cryptes, mais on y retrouve un nombre plus important de cellules mucosécrétantes afin de protéger la muqueuse des résidus alimentaires de plus en plus deshydratés (Sellers and Morton, 2014). Contrairement à l'épithélium intestinal, l'épithélium colique ne contient pas de cellules de Paneth.

Etude bibliographique

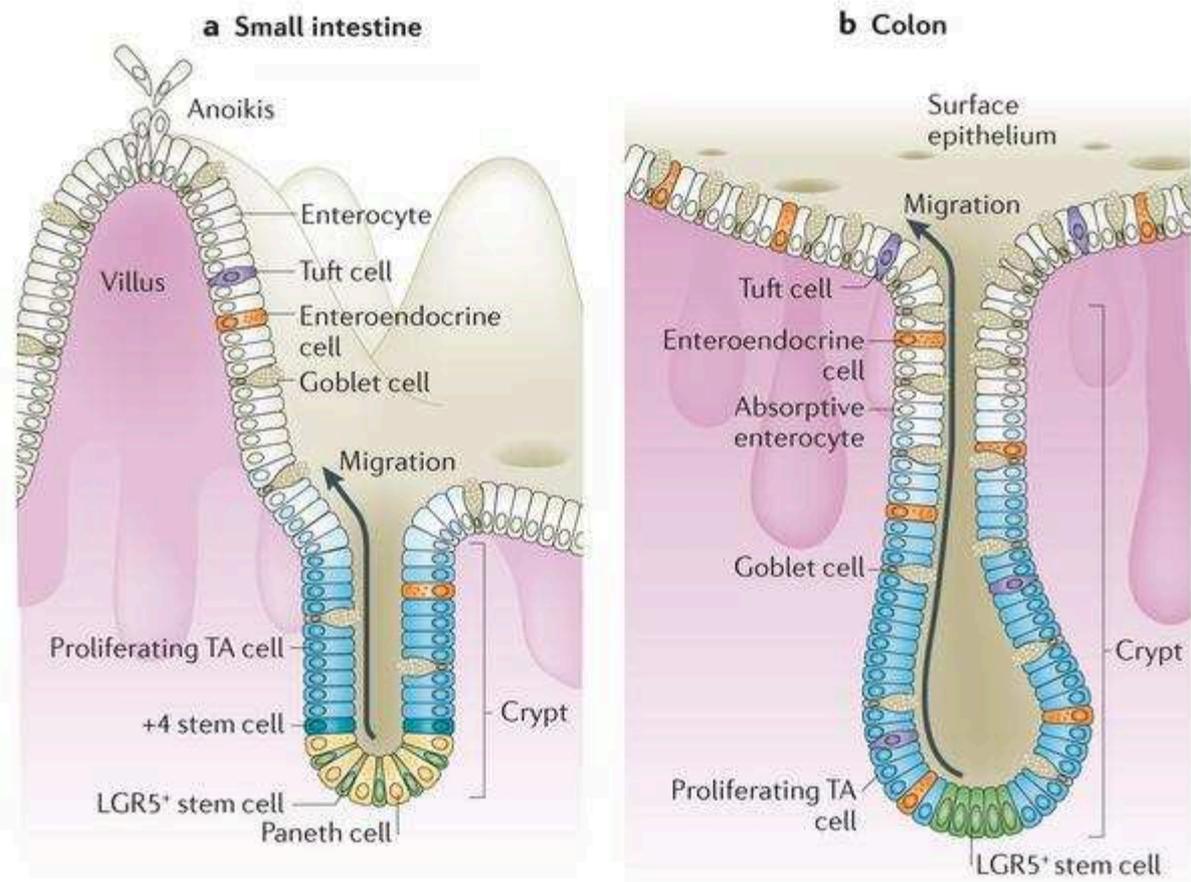


Figure 8 : Les différents types de cellules de la barrière épithéliale intestinale
Organisation et localisation des différents types de cellules épithéliales de la muqueuse intestinale (a) et colique (b). TA = transit-amplifying progenitors. (D'après Barker, 2013).

a - Les cellules souches épithéliales intestinales

Les cellules souches intestinales produisent des cellules filles, les progéniteurs TA (pour transit-amplifying) qui subissent 4 à 5 divisions et migrent le long de l'axe crypto-villositaire (Cui and Chang, 2016). Il existe deux types de cellules souches, celles situées au fond de la crypte et celles situées en position +4, mais leur implication dans l'homéostasie et la régénération épithéliale n'est pas encore claire à ce jour.

En 1974, Cheng et Leblond ont montré que les cellules souches situées au fond des cryptes entre les cellules de Paneth avaient une prolifération rapide, pensant ainsi avoir identifié les cellules progénitrices des CEI (Barker et al., 2012). Ces cellules sont aussi appelées cellules CBC (pour crypt basement column cells) et caractérisées par l'expression du marqueur Lgr5. Il a été montré que leurs cellules filles qui recevaient les ressources nécessaires par les cellules de Paneth restaient au fond des cryptes en temps que cellules souches, alors que les autres se développaient en progéniteurs TA (Schepers et al., 2011).

A l'inverse, Potten pense que ce sont les cellules souches exprimant le marqueur Bmi situées en position +4 qui seraient les cellules progénitrices actives, puisqu'elles se renouvellent toutes les 24 heures. De plus, il a montré par un double marquage de l'ADN que les brins d'ADN parentaux étaient retrouvés dans leurs cellules filles après division cellulaire (permettant ainsi aux cellules souches de garder leur stabilité génomique) alors que les brins nouvellement synthétisés étaient retrouvés dans

Etude bibliographique

les progéniteurs TA afin de remplacer les cellules mortes de l'épithélium (Potten, 1998). Il a également été montré que ces cellules souches étaient plus sensibles aux stimuli extérieurs induisant l'apoptose, notamment à l'irradiation (Zhu et al., 2013). De plus, les cellules souches exprimant faiblement Sox9 (Sox9 Low) sont les plus actives après une irradiation puisqu'elles s'expandent rapidement et présentent des capacités accrues de prolifération afin de participer à la régénération des cryptes (Van Landeghem et al., 2012).

b- Les entérocytes

Les entérocytes sont les CEI les plus abondantes, puisqu'elles représentent 80% des cellules de la BEI. Ce sont les cellules absorbantes de l'intestin et elles sont donc situées au sommet des cryptes et des villosités, avec des microvillosités à leur pôle apical (aussi appelé bordure en brosse). Ce sont ces microvillosités qui vont permettre d'augmenter la surface d'échange, ainsi que la composition de leur membrane riche en glycoprotéines et en certaines enzymes favorisant l'absorption des nutriments. Outre leur rôle dans les processus digestifs, les entérocytes jouent également un rôle dans la protection de la BEI via l'absorption et le traitement des antigènes, soit via une dégradation lysosomale, soit via une présentation aux cellules immunitaires (Snoeck et al., 2005). Enfin, les entérocytes sont capables de produire des peptides anti-microbiens tels que les β -défensines (Kopp et al., 2015).

c- Les cellules mucosécrétantes (ou cellules de Goblet)

Aussi appelées cellules caliciformes, les cellules mucosécrétantes sont souvent surnommées "glandes unicellulaires", même si elles ne sont pas des glandes au sens strict. Elles sont responsables de la sécrétion de mucus et sont caractérisées par un large pôle apical renfermant des globules remplis de glycoprotéines appelées mucines. Leur nombre augmente du duodénum jusqu'au colon distal, et elles sont surtout retrouvées au niveau des cryptes. Elles assurent la lubrification de l'épithélium afin de le protéger du passage du bol alimentaire et jouent également un rôle de barrière dans la protection de la BEI contre les agents pathogènes et toxiques. Au niveau de l'intestin grêle, elles forment une seule couche de mucus, facilement pénétrable par les bactéries qui sont toutefois gardées à distance de l'épithélium grâce à la sécrétion de médiateurs antibactériens. En revanche, au niveau du colon, on retrouve une double couche de mucus, avec un mucus interne accolé à l'épithélium impénétrable par les bactéries alors que le mucus extérieur sert d'habitat pour ces bactéries (Johansson and Hansson, 2016). Il existe deux types de mucines sécrétées par les cellules mucosécrétantes : les mucines transmembranaires et les mucines sécrétées, aussi appelées "gel-forming mucins".

d- Les cellules de Paneth

Ces cellules sont exclusivement présentes au fond des cryptes de l'intestin grêle, de taille volumineuse avec une structure pyramidale et renfermant à leur pôle apical des granules de sécrétion. Les cellules de Paneth représentent la source principale de peptides antimicrobiens, dont la famille des α -défensines connues pour leur rôle protecteur contre les bactéries Gram positives et négatives, mais aussi pour leur rôle dans l'établissement d'une symbiose avec le microbiote intestinal

Etude bibliographique

normal (Nakamura et al., 2016). Elles sécrètent également le lysozyme C, la phospholipase A2 et la lectine de type C (Reg3A) capables de détruire la membrane bactérienne des bactéries Gram positives (Bevins and Salzman, 2011).

e- Les cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines sont très peu nombreuses au niveau de l'intestin, puisqu'elles représentent entre 0.1 et 1% des CEI, mais on en retrouve de l'estomac au rectum. Leur rôle est de produire les hormones nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme après l'ingestion de nourriture, notamment par la détection de la composition et du niveau de nutriments absorbés (Gribble and Reimann, 2017). Plusieurs sous-types ont été identifiés, le sous-type prédominant étant celui des cellules entérochromaffines capables de sécréter de la sérotonine, un neurotransmetteur impliqué notamment dans la motilité digestive (Gershon, 2013). Parmi les autres sous-types on retrouve les cellules K qui sécrètent le peptide GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide) inhibant les sécrétions gastriques, les cellules L sécrétant le GLP-1 (Glucagon-like peptide 1) un peptide orexigène, ou encore des cellules qui sécrètent la cholécystokinine, une hormone anorexigène.

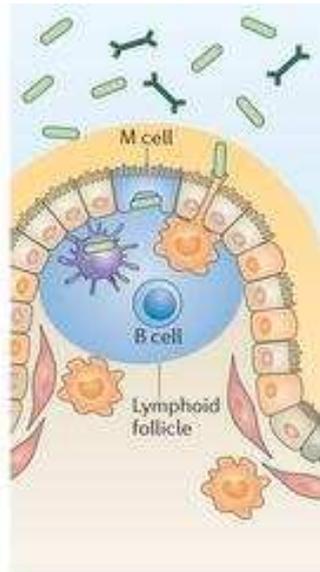
f- Les cellules Tuft

Les cellules Tuft ("touffues" en français) tirent leur nom de leur morphologie particulière, due à un système tubulovésiculaire unique et à un faisceau apical de microfilaments reliés à des microvillosités longues et épaisses que l'on retrouve dans la lumière intestinale. S'il est admis qu'elles représentent un type de CEI particulier, leur fonction précise est encore inconnue. La présence d' α -gustducine et de d'autres membres de la voie de transduction du goût suggère cependant un rôle de ces cellules dans la chimioréception. Il a également été montré qu'en conditions normales, les cellules Tuft étaient les seules CEI à exprimer de manière constitutive les enzymes nécessaires à la production de PGD2 (Gerbe et al., 2012).

e- Les cellules M ou "Microfold"

Les cellules M sont associées aux follicules lymphoïdes et sont spécialisées dans l'endocytose d'antigènes afin de les transporter de la lumière intestinale jusqu'au système immunitaire (**Figure 9**). Afin de faciliter cette endocytose la couche de mucus est souvent moins épaisse au niveau de ces cellules. Le contenu est ensuite capturé par les cellules dendritiques résidant sous ces cellules afin d'initier les réponses immunitaires de la muqueuse, permettant ainsi la production d'immunoglobulines spécifiques des antigènes par les lymphocytes B (Wang et al., 2014).

Etude bibliographique



Les cellules M capturent les antigènes à la surface de l'épithélium afin de les délivrer aux cellules dendritiques résidentes dans le follicule lymphoïde. Cela permet d'initier les réponses immunitaires spécifiques des antigènes. (D'après Peterson and Artis, 2014)

Figure 9 : Les cellules M ou "Microfold"

4) L'homéostasie de l'épithélium digestif

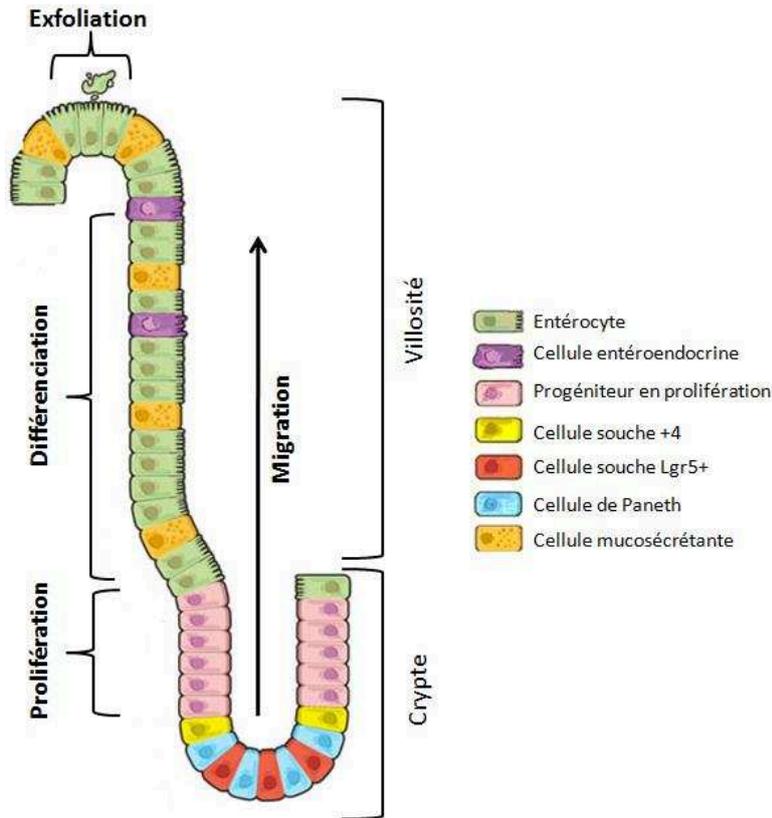
L'homéostasie, terme créé par Claude Bernard vers 1860, se définit comme « la capacité de l'organisme à maintenir un état de stabilité relative des différentes composantes de son milieu interne et ce malgré les variations constantes de l'environnement externe » (Zouiten-Mekki et al., 2013). Afin d'assurer son rôle de barrière de manière efficace, l'épithélium intestinal est renouvelé tous les 3 à 5 jours chez l'homme, et chaque jour environ 10 milliards de cellules sont produites. L'homéostasie de la BEI résulte ainsi d'un équilibre entre le renouvellement, la migration/différenciation des cellules souches dans les cryptes, la mort, la réparation et le maintien des CEI entre elles (**Figure 10**). Ce mécanisme de turnover sert également à protéger l'organisme en éliminant les cellules infectées ou endommagées (Wells et al., 2017).

α - Le renouvellement des cellules épithéliales intestinales

C'est la voie WNT qui contrôle la prolifération et le maintien des cellules souches intestinales au fond des cryptes (**Figure 11**). Les ligands WNT sont sécrétés par de nombreux types cellulaires dont les cellules mésenchymateuses. Il a toutefois été montré que les cellules de Paneth constituent la source principale de ces ligands, ce qui expliquerait pourquoi les cellules souches sont retrouvées au fond des cryptes (Sato et al., 2011).

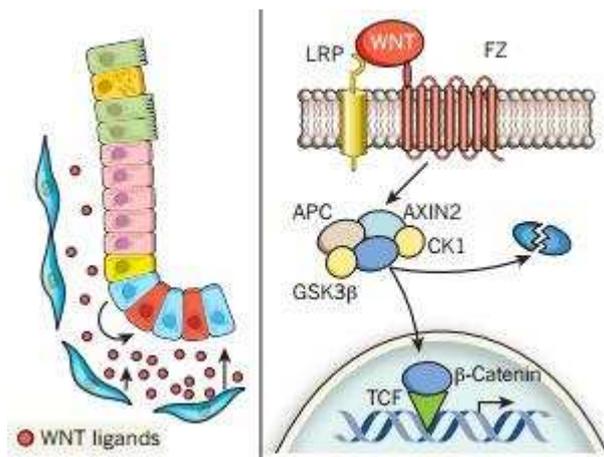
Au niveau de la base des cryptes se trouve un complexe de dégradation (composé des protéines APC, AXIN2, CK1 et GSK3 β) entraînant la phosphorylation directe de la β -caténine qui est alors dégradée par le protéasome. Les ligands WNT se fixent à leurs récepteurs provoquant la dissociation du complexe de dégradation. Cela permet l'accumulation de la β -caténine sous sa forme stable non phosphorylée, qui va pouvoir être adressée au noyau. Elle peut alors s'associer à des facteurs de transcription et ainsi permettre la transcription de gènes cibles de la voie WNT codant pour des protéines capables d'induire la prolifération cellulaire (Kikuchi et al., 2006 ; Medema and Vermeulen, 2011).

Etude bibliographique



L'homéostasie de l'épithélium digestif est assuré par un équilibre permanent entre les compartiments de prolifération, migration et différenciation et l'apoptose des CEI éliminées par exfoliation. (D'après Medema and Vermeulen, 2011).

Figure 10 : Les différents compartiments dans l'intestin grêle



En présence de ligands WNT le complexe de dégradation de la β -caténine est dissocié, permettant à celle-ci d'aller activer des gènes cibles dans le noyau et entraînant ainsi la prolifération cellulaire. (D'après Medema and Vermeulen, 2011)

Figure 11 : La voie WNT régule la prolifération des CEI

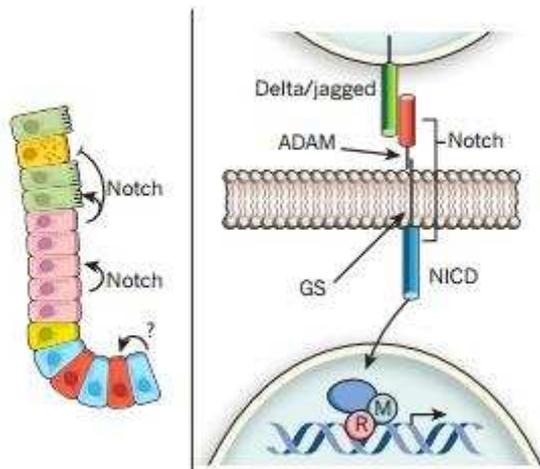
Etude bibliographique

b- La migration et la différenciation des cellules épithéliales intestinales

Cette étape de migration/différenciation est possible grâce à plusieurs voies de signalisation interagissant les unes avec les autres : les voies Notch, WNT, BMP et Hedgehog.

La voie Notch

L'activation du récepteur Notch dépend normalement d'un contact direct cellule-cellule, mais la sécrétion de ligands existe également. Le récepteur Notch interagit avec les ligands exprimés par la cellule voisine et est alors clivé (**Figure 12**). Cela entraîne la libération du domaine intracellulaire de Notch (NICD) qui va être transloqué au noyau où il va se lier à des gènes cibles. Parmi les gènes ainsi transcrits on retrouve ceux codant pour les Hes (Hairy/Enhancer of Split), qui sont des répresseurs d'autres facteurs de transcription appelés bHLH (basic helix-loop-helix). Quand ces bHLH ne sont plus réprimés, ils induisent la différenciation des CEI (van der Flier and Clevers, 2009). Dans les gènes ainsi activés, on retrouve notamment le facteur de transcription Math-1 et il a été montré que des souris déficientes pour ce gène présentaient un épithélium sans cellules de Paneth, ni cellules mucosécrétantes et cellules entéroendocrines (Yang, 2001).



La liaison de ligands au récepteur Notch entraîne le clivage et la libération de son domaine intracellulaire NICD qui va pouvoir aller activer des gènes cibles dans le noyau, dont fait partie la famille Hes. (D'après Medema and Vermeulen, 2011)

Figure 12 : La voie Notch régule la différenciation des CEI

La voie WNT

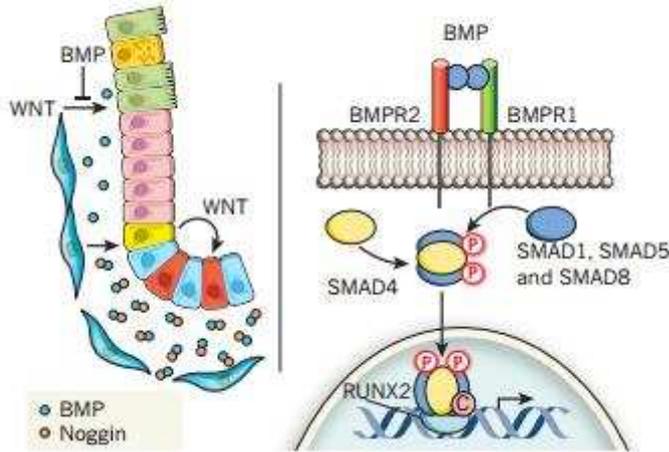
La voie WNT semble également essentielle puisqu'il a été montré que chez des souris déficientes pour le gène APC, on observait une accumulation de β -caténine au niveau des CEI de l'épithélium colique. Cela entraînait une perturbation de la prolifération et de la migration/différenciation des CEI, notamment via une augmentation de la proportion de cellules de Paneth (Andreu et al., 2008 ; Sansom, 2004). Cependant, les données de la littérature suggèrent un modèle selon lequel la voie Notch induirait une prolifération quand la voie WNT serait fortement activée, alors qu'elle induirait plutôt une différenciation en entérocytes quand l'activité de la voie WNT diminuerait vers le haut des cryptes (Medema and Vermeulen, 2011).

La voie BMP

BMP, un ligand exprimé par les cellules mésenchymateuses, pourrait aussi avoir un rôle en arrêtant la prolifération induite par la voie WNT au niveau de la bordure crypte-villosité, permettant alors la différenciation (**Figure 13**). Au fond des cryptes, BMP est inactif car il est lié à des inhibiteurs tel que la noggine produite spécifiquement par les cellules mésenchymateuses dans la région des

Etude bibliographique

cellules souches. Quand BMP n'est plus lié à la noggine, il peut alors se lier aux récepteurs BMPR2 et BMPR1, provoquant la phosphorylation des protéines SMAD qui sont alors transloquées au noyau où elles activent des gènes de transcription.

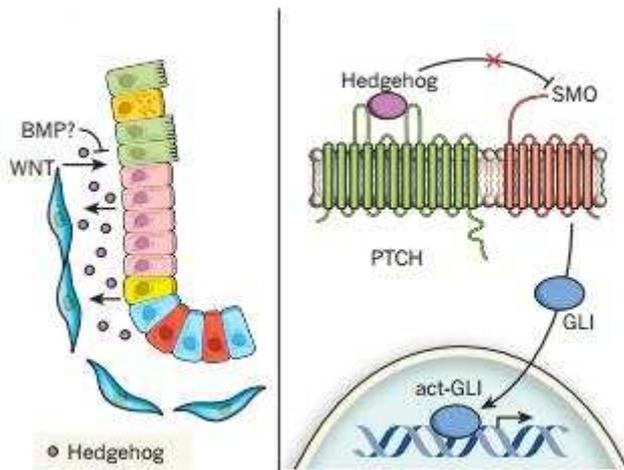


La production de noggine par les cellules mésenchymateuses du fond des cryptes permet l'inhibition de BMP, qui est active en haut des cryptes où elle stoppe la prolifération induite par la voie WNT. BMP induit la phosphorylation des protéines SMAD qui vont pouvoir activer des gènes cibles dans le noyau. (D'après Medema and Vermeulen, 2011)

Figure 13 : La voie BMP/SMAD régule la différenciation des CEI

La voie Hedgehog

De la même manière, les CEI différenciées produisent les protéines Hedgehog afin de contrer la prolifération induite par la voie WNT, probablement via l'induction de sécrétion de BMP par les cellules mésenchymateuses (Figure 14). La voie de signalisation des protéines Hedgehog agit via les protéines membranaires PTCH (patched) et SMO (smoothened). PTCH inhibe SMO, mais la liaison de Hedgehog à PTCH va permettre à SMO d'activer le facteur de transcription GLI. Il a notamment été montré qu'une délétion conditionnelle de PTCH induisait une inhibition de la voie WNT, provoquant une différenciation prématurée des entérocytes (van Dop et al., 2009).



La production de Hedgehog par les cellules épithéliales différenciées permet la perte d'inhibition des protéines membranaires SMO qui vont activer le facteur de transcription GLI. Son rôle dans la différenciation des CEI passe probablement par une inhibition de la prolifération induite par la voie WNT, via la sécrétion de BMP par les cellules mésenchymateuses. (D'après Medema and Vermeulen, 2011)

Figure 14 : La voie Hedgehog régule la différenciation des CEI

c- La mort des cellules épithéliales intestinales

Une fois arrivées en haut des villosités, les CEI sont éliminées par exfoliation dans la lumière intestinale afin de préserver l'architecture du tissu. Les cellules entrent en anoïkose, une forme spécifique d'apoptose due à un défaut d'interaction entre la cellule et la matrice extracellulaire ou les

Etude bibliographique

fibroblastes (Kaeffer, 2011). Les intégrines de la cellule envoient alors des signaux de mort cellulaire, notamment via l'activation rapide de la Caspase-8 initiatrice, mais également la perte des signaux de survie. De la même manière, les CEI indifférenciées au fond des cryptes peuvent entrer spontanément en apoptose lorsqu'elles sont endommagées ou défectueuses. Il existe donc, en fonction de l'état de différenciation, une régulation distincte de la survie des CEI, en particulier due à l'expression différentielle d'homologues de Bcl-2 le long de l'axe crypto-villositaire ainsi qu'à l'expression de protéines anti-apoptotiques par les CEI différenciées (Vachon, 2006).

d- La réparation de l'épithélium digestif

Le tube digestif est soumis en permanence à un mélange d'agents potentiellement néfastes tels que les acides, bactéries et dérivés bactériens. Ainsi, l'épithélium se doit d'assurer un rôle de protection en constituant une barrière efficace. Certaines agressions peuvent néanmoins entraîner des lésions de la BEI générant des défauts de continuité. Le rétablissement d'un épithélium normal passe alors par deux phases de réparation : la restitution et la régénération (Taupin and Podolsky, 2003).

La restitution a lieu avant l'étape de régénération et suffit à restaurer une continuité mucosale sur de larges zones endommagées en quelques heures seulement (**Figure 15**). Durant cette étape, les CEI adjacentes à la lésion s'étalent et migrent afin de rétablir une continuité cellulaire, indépendamment de leur prolifération (Lacy, 1988 ; Mammen and Matthews, 2003). Mécaniquement, la migration des cellules épithéliales implique l'extension de la membrane plasmique dans la direction de la migration cellulaire, l'assemblage de nouveaux contacts focaux au bord avant de la cellule, la génération d'une traction pour faciliter le mouvement vers l'avant et le détachement des contacts focaux au bord arrière de la cellule (Taupin and Podolsky, 2003).

Cette restitution épithéliale peut être modulée par de nombreux facteurs, dont des facteurs de croissance (EGF, HGF, TGF- α) ou encore par les TFF (Trefoil Factor) (Taupin and Podolsky, 2003).

La régénération a lieu après la phase de restitution (**Figure 16**). Elle commence par une phase d'élongation du compartiment prolifératif de la crypte afin que le tissu épithélial rétablisse le nombre de CEI nécessaires à la reconstruction de sa structure. A la suite de cette étape, la crypte elle-même peut subir une étape de division, avant de terminer la phase de régénération par les mécanismes de différenciation.

Lorsque les lésions sont superficielles la réparation de la BEI prend quelques heures à quelques jours selon la taille (Podolsky, 1999). Cependant, lorsque les lésions sont sévères et profondes cette réparation peut aller de quelques jours à quelques semaines, et implique le remodelage de la matrice extracellulaire, de la sous-muqueuse voir même des couches inférieures.

Etude bibliographique

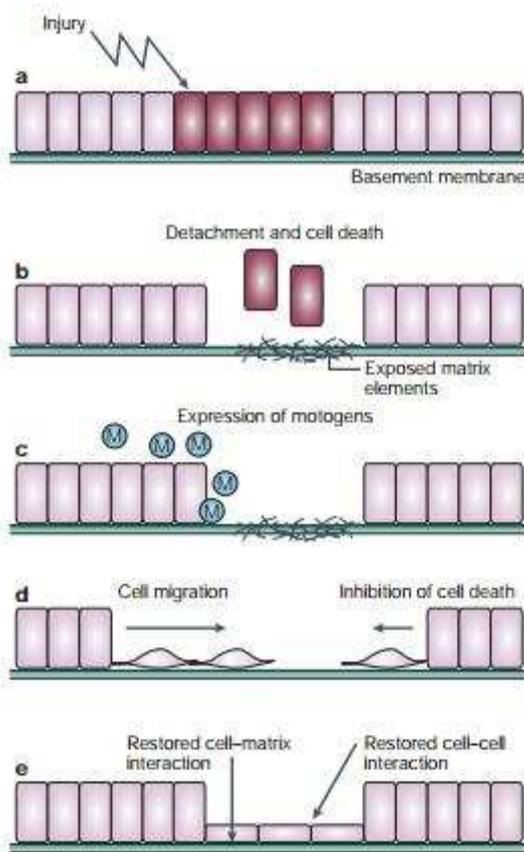


Figure 15 : Les différentes étapes de la restitution épithéliale

La lésion de l'épithélium (a) induit le détachement et la mort des CEI, entraînant l'exposition des protéines de la matrice (b).

Les cellules adjacentes libèrent des molécules (M = motogens) favorisant la réparation (c) et entraînant l'étalement et la migration des cellules adjacentes (d). La restauration de la continuité de la BEI est permise grâce à la restauration des interactions cellule-matrice et cellule-cellule (e). (Taupin and Podolsky, 2003)

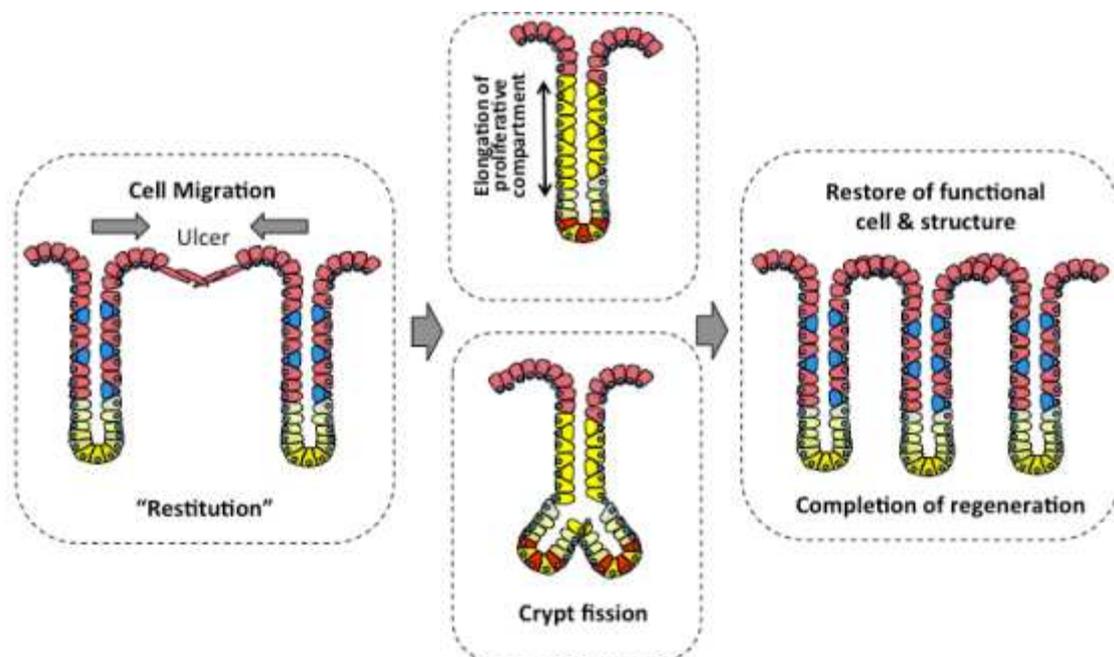


Figure 16 : Les différentes étapes de la régénération épithéliale

L'étape de régénération consiste en une élongation du compartiment prolifératif, voir d'une division de la crypte elle-même. Elle se termine par la restauration de la structure des cellules ainsi que de leur fonction. (D'après Okamoto, Epithelial regeneration in inflammatory bowel diseases. *Inflammation and Regeneration*, 2011)

e- Le maintien de l'épithélium digestif

La BEI doit protéger l'organisme des agents toxiques ou pathogènes tout en permettant l'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes. Cette action de barrière est possible grâce à des interactions cellule-cellule et cellule-matrice.

➤ Les interactions cellule-cellule :

Il existe quatre types de complexes reliant les CEI voisines entre elles : les jonctions serrées, les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions communicantes (GAP junctions).

Les jonctions serrées constituent le complexe le plus apical et régulent le passage des ions, de l'eau et des macromolécules entre les cellules (**Figure 17**). Elles ont également un rôle dans l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire en limitant la distribution des lipides à la membrane (Campbell et al., 2017). Elles sont composées par plus de 40 protéines transmembranaires (chargées de lier les cellules entre elles) ou cytoplasmiques liées à l'actine (servant de lien avec le cytosquelette). Parmi les protéines les plus étudiées, on retrouve les JAM (Junctional Adhesion Molecule), les claudines, l'occludine, la cinguline et les ZO (Zonula Occludens). Plus récemment, il a été montré que la tricelluline avait également un rôle important dans le contrôle des jonctions serrées, puisqu'elle permet la jonction entre trois CEI voisines en se liant au niveau de l'occludine et des claudines (Krug et al., 2009).

L'implication de ces jonctions serrées dans la régulation de la perméabilité paracellulaire est détaillée dans la partie 5) a.

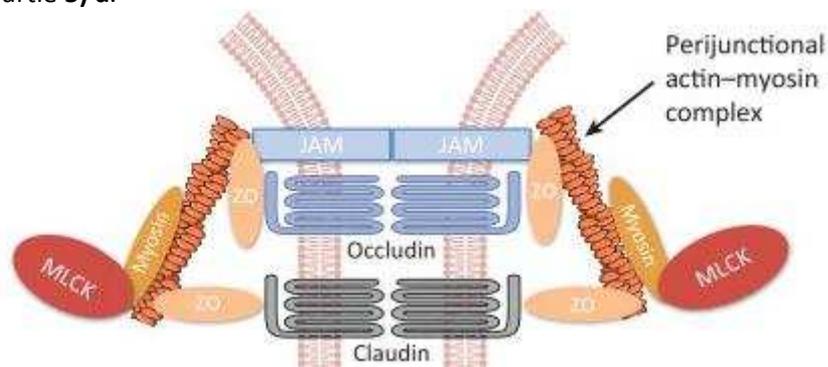


Figure 17 : Organisation des jonctions serrées

Les jonctions serrées s'établissent entre deux cellules voisines et régulent le passage des ions, de l'eau et des macromolécules. On retrouve des protéines transmembranaires (JAM, Occludin, Claudin) et cytoplasmiques associées au cytosquelette d'actine (ZO). (D'après Mittal and Coopersmith, 2014)

Les desmosomes permettent de relier les CEI entre elles via l'interaction avec le cytosquelette d'actine, et confèrent ainsi sa solidité à l'épithélium en lui permettant de résister aux forces de pression et de tiraillement (**Figure 18**). Les filaments intermédiaires composés de cytokératine se lient à la desmoplakine, elle-même reliée à des glycoprotéines de la famille des cadhérines : la desmocolline et la desmogléine. Ces protéines sont stabilisées grâce à des protéines de la famille des caténines : la plakoglobine et la plakophiline.

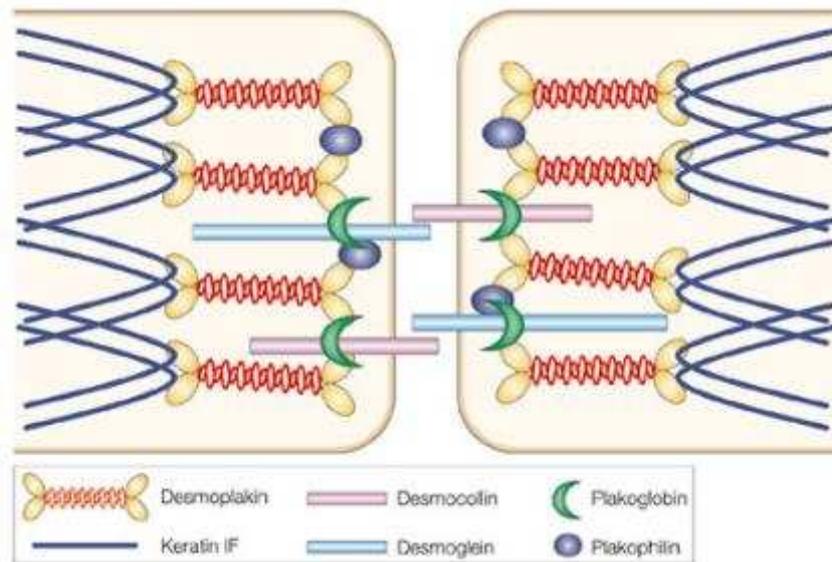


Figure 18 : Organisation des desmosomes

Les desmosomes relient les CEI entre elles via la liaison d'un complexe protéique, composé notamment de cadhérines et caténines, au cytosquelette d'actine. (D'après Fuchs and Raghavan, 2002)

Les jonctions adhérentes permettent également l'adhésion des CEI entre elles via des interactions calcium-dépendantes réalisées par la protéine transmembranaire E-cadhérine (**Figure 19**). Celle-ci est reliée à la β -caténine par son domaine cytoplasmique via les protéines p120ctn (caténine p120) et ce complexe est lui-même relié au cytosquelette d'actine grâce à l' α -caténine. La rupture de ces jonctions peut être médiée par les protéines PTP1B (protéine tyrosine phosphatase 1B) et C-SRC.

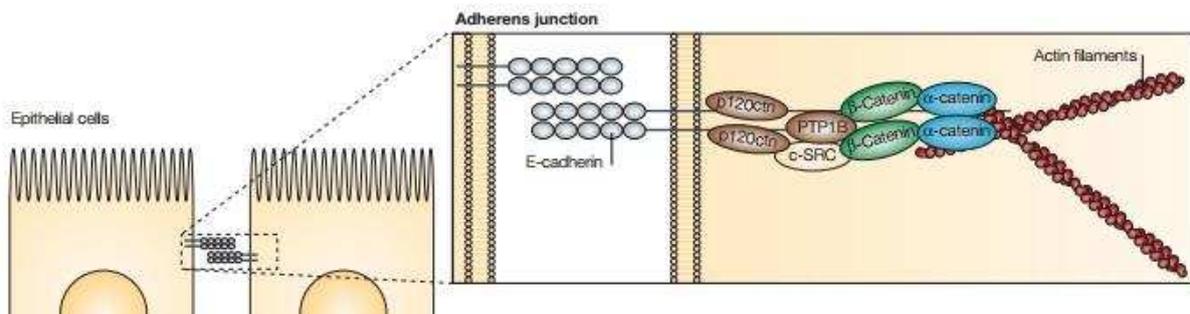


Figure 19 : Organisation des jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes permettent l'adhésion des CEI entre elles via la liaison de deux molécules d'E-cadhérine entre deux cellules voisines. Elles sont elles-mêmes reliées au cytosquelette d'actine par un complexe protéique cytoplasmique. (D'après Yeatman, 2004)

Enfin, les jonctions communicantes (ou GAP junctions) permettent de mettre en communication le cytoplasme de deux cellules voisines (**Figure 20**). Elles sont composées de canaux, eux-mêmes formés de deux connexons (un par membrane cellulaire). Chaque connexon correspond à un hexamère, formé de six protéines transmembranaires appelées connexines. Le pore de ces canaux est d'environ 2 nm de diamètre, et permet donc le passage de toutes les molécules inférieures à cette taille.

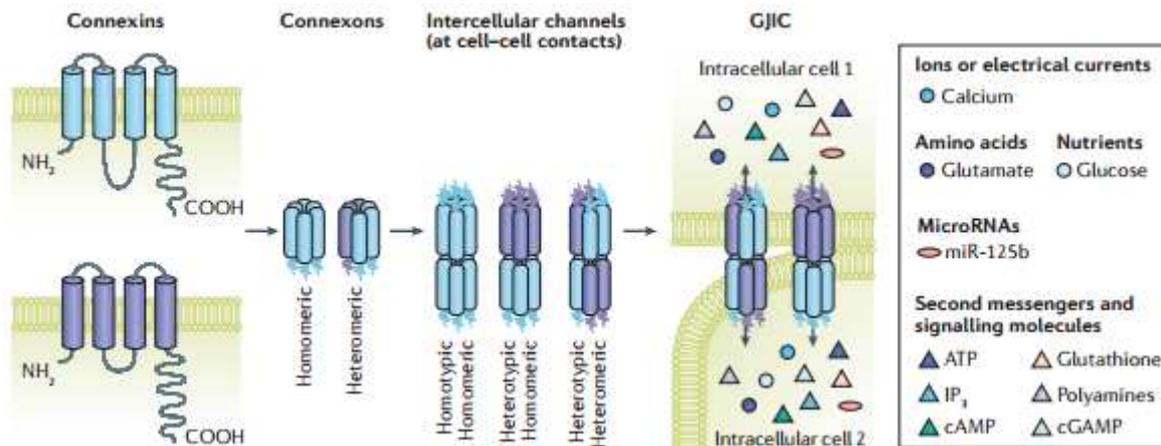


Figure 20 : Organisation des jonctions communicantes (ou GAP junctions)

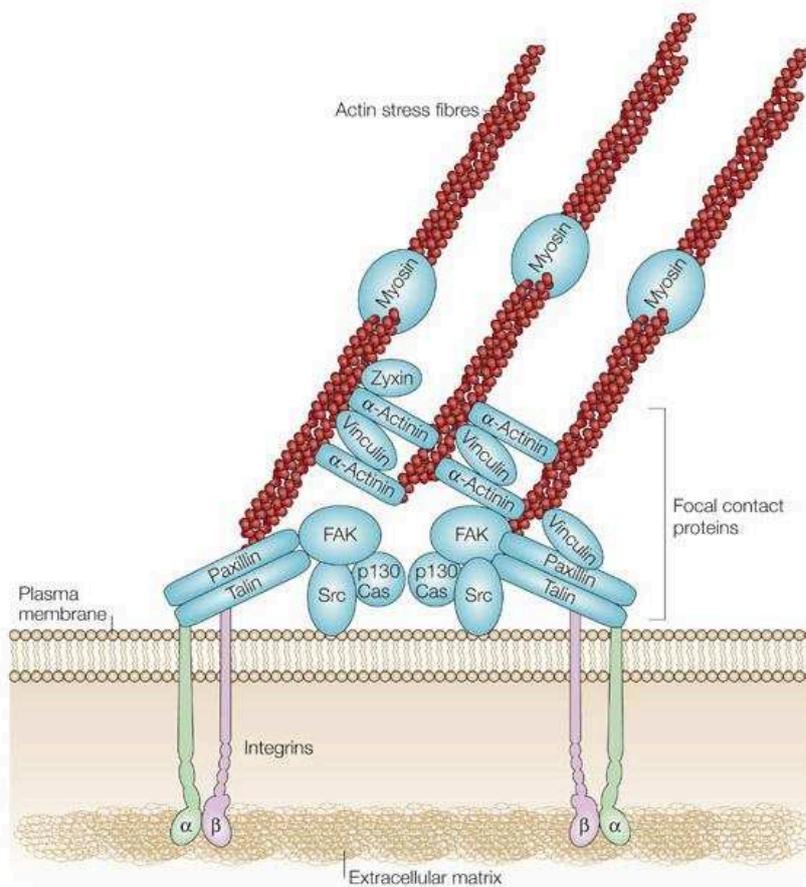
L'association de 6 connexines permet la formation de connexons, qui vont s'associer entre deux cellules voisines afin de permettre le passage de petites molécules entre les cytoplasmes. (D'après Aasen et al., 2016)

➤ Les interactions cellule-matrice :

La matrice extracellulaire sert de "ciment biologique" aux CEI et se décompose en deux couches : la lame basale, d'origine épithéliale, et la lame réticulaire. La lame basale, située au pôle basolatéral des CEI, est un assemblage de glycoprotéines extracellulaires telles que les intégrines, la laminine, le collagène IV ou encore la fibronectine. La lame réticulaire, située en-dessous de la lame basale, est surtout constituée de collagènes fibrillaires (tels que le collagène VII) produits par les fibroblastes des tissus conjonctifs. La matrice extracellulaire peut également modifier les fonctions de la BEI : par exemple la laminine-1 induit la différenciation des CEI (Turck et al., 2005).

Les complexes liant les CEI à la matrice extracellulaire sont appelés adhésions focales (**Figure 21**). Elles représentent des groupes dynamiques de protéines structurales ou régulatrices qui transmettent des signaux externes à l'intérieur de la cellule et qui peuvent également relayer des signaux intracellulaires afin d'activer les intégrines à la surface cellulaire (Mitra et al., 2005). Les intégrines sont reliées à la lame basale par leur domaine extracellulaire et sont liées aux protéines paxilline et taline. Celles-ci recrutent la FAK (Focal Adhesion Kinase) et la vinculine aux contacts focaux. L' α -actinine, une protéine du cytosquelette, est phosphorylée par FAK et se lie à la vinculine pour interagir avec les fibres de stress d'actomyosine afin de les rattacher aux points focaux. On retrouve la protéine Zyxine au niveau des contacts matures, où elle se lie à l' α -actinine et aux fibres de stress. Les intégrines peuvent également interagir avec d'autres molécules de signalisation telles que la protéine tyrosine kinase Src ou les protéines adaptatrices p130Cas.

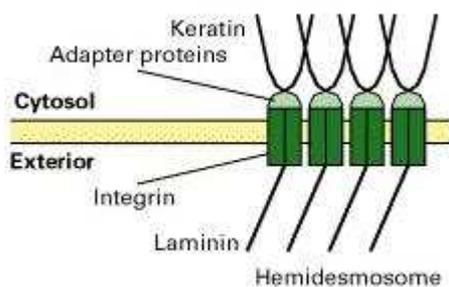
Etude bibliographique



Les adhésions focales permettent l'ancrage des CEI à la matrice extracellulaire via des protéines transmembranaires, les intégrines, ainsi que d'autres protéines cytoplasmiques (vinculine, paxilline...) et de signalisation (FAK, Src...). Elles permettent alors la liaison de la matrice extracellulaire avec le cytosquelette d'actine des CEI. (Mitra et al., 2005)

Figure 21 : Organisation des adhésions focales

Il existe un autre type de jonction entre les CEI et la matrice extracellulaire : les hémidesmosomes (Figure 22). Le côté cytosolique d'un hémidesmosome consiste en une plaque composée de protéines adaptatrices qui sont attachées aux extrémités des filaments de kératine. Les intégrines se lient aux protéines adaptatrices à l'intérieur des plaques et à la laminine de la matrice extracellulaire. En interconnectant les filaments intermédiaires du cytosquelette avec les fibres de la lame basale, ces jonctions cellule-matrice augmentent la rigidité globale des tissus épithéliaux.



Les hémidesmosomes permettent l'ancrage des CEI à la matrice extracellulaire via les intégrines qui se lient à des protéines adaptatrices dans le cytosol (rattachées aux filaments de kératine) ainsi qu'à la protéine laminine de la matrice extracellulaire. (D'après Lodish et al., 2002)

Figure 22 : Organisation des hémidesmosomes

5) Les rôles physiologiques de la barrière épithéliale intestinale

a- Le contrôle de la perméabilité intestinale

Il existe deux types de perméabilité à travers la BEI : la perméabilité paracellulaire et la perméabilité transcellulaire.

➤ **La perméabilité paracellulaire :**

Elle permet le passage dans la circulation sanguine de petites molécules (généralement avec une taille inférieure à 600 Da) telles que les ions et l'eau entre les CEI grâce à l'existence de pores sélectifs : les jonctions serrées (Suzuki, 2013). Ainsi, la régulation des protéines de ces jonctions permet de moduler la perméabilité paracellulaire de la BEI. Des modifications de leur expression, de leur localisation ou encore de leur phosphorylation entraînent des changements directs de la perméabilité paracellulaire. Il a par exemple été montré que la phosphorylation des claudines pouvait conduire à une diminution ou une augmentation de la perméabilité en fonction de la protéine ciblée : une phosphorylation de la claudine-3 va diminuer son assemblage aux jonctions serrées, alors qu'une phosphorylation des claudines 1 et 4 est nécessaire à leur assemblage à ces mêmes jonctions (Findley and Koval, 2009). L'ouverture des jonctions peut également être causée par la contraction de l'anneau périjonctionnel d'actine-myosine. La MLCK (Myosin Light Chain Kinase) entraîne la phosphorylation de la MLC (Myosin Light Chain), ce qui aboutit à la contraction de l'anneau périjonctionnel d'actine-myosine entraînant la rupture des jonctions. Cette phosphorylation de la MLCK peut être médiée par la liaison de Calcium/Calmoduline ou par l'activation de d'autres voies de signalisation (Van Spaendonk et al., 2017). En particulier, il a été montré que ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase) pouvait activer la MLCK et que la PKC favorisait la phosphorylation de la MLC en inhibant la MLCP (Myosin Light Chain Phosphatase) responsable de sa déphosphorylation (Jacob et al., 2005 ; Weber et al., 2000). De la même manière, la protéine ROCK (Rho-associated protein kinase) peut augmenter la contractilité en activant la MLCK et en inhibant la MLCP (Riento and Ridley, 2003).

➤ **La perméabilité transcellulaire :**

Cette voie permet le passage dans la circulation sanguine de plus grosses molécules qui entrent dans la cellule du côté luminal. La voie transcellulaire est possible grâce à trois mécanismes majeurs : le transport passif, le transport actif ou le transport par exocytose/endocytose.

Le transport passif se fait grâce à des gradients de concentration, permettant à la molécule de diffuser à travers la membrane plasmique jusqu'à atteindre un équilibre de concentration. Les molécules non polaires (et donc hydrophobes) diffusent simplement à travers la membrane sans utiliser de transporteurs. A l'inverse les molécules polaires et les ions diffusent à travers la membrane par un phénomène nommé diffusion facilitée, grâce à des protéines-canaux ou des perméases.

Le transport actif désigne le passage d'une molécule à travers la membrane contre son gradient de concentration. Le transport actif primaire utilise de l'énergie chimique (hydrolyse de

Etude bibliographique

l'ATP par exemple) et le transport actif secondaire utilise un gradient électrochimique ou des symports/antiports. Les symports transportent deux molécules dans le même sens alors que les antiports les transportent dans des sens opposés.

Absorption de l'eau et des électrolytes

Le passage de l'eau s'effectue de manière passive à travers la membrane par phénomène d'osmose. L'osmose n'est possible que si les solvants sont séparés par une membrane semi-perméable, et correspond à un mouvement spontané vers le compartiment hypertonique (avec la plus grande concentration). Ainsi l'absorption des nutriments rend le contenu du tube digestif hypotonique, permettant à l'eau d'être absorbée. Outre ce mouvement perpétuel de l'eau à travers les membranes par osmose, l'absorption de l'eau par les entérocytes dépend aussi de l'absorption de solutés. Le sodium Na⁺ entre par le pôle apical de la cellule grâce à un co-transporteur Na⁺/glucose ou Na⁺/acide aminé. Le sodium ainsi absorbé est ensuite pompé hors de la cellule ce qui crée un gradient osmotique élevé dans les petits espaces intercellulaires entre les cellules voisines. L'eau peut alors diffuser vers la circulation sanguine en réponse à ce gradient établi par le sodium.

Absorption des lipides

Les lipides (acides gras libres, cholestérol, monoglycérides) sont contenus dans des micelles et sont absorbés par la bordure en brosse des entérocytes par endocytose, essentiellement au niveau de l'intestin grêle. Une fois pénétrés dans la cellule, les acides gras à chaîne longue ont besoin de la protéine de transport FABP (fatty acid binding protein), afin de gagner le réticulum endoplasmique où ils seront réestérifiés en triglycérides. Les triglycérides s'accumulent et s'entourent de lipoprotéines, formant ainsi des chylomicrons, puis sont éliminés par exocytose (Hussain, 2014). Ils rejoignent ensuite la lymphe via les capillaires lymphatiques des villosités intestinales. Une fois parvenus aux tissus, les chylomicrons sont dégradés par la lipoprotéine-lipase. En revanche les acides gras à chaîne courte ne nécessitent pas de transport particulier une fois absorbés par l'entérocyte et peuvent diffuser directement vers la veine porte.

Absorption des monosaccharides

Les monosaccharides (glucose et fructose par exemple) ont besoin de transporteurs pour passer la membrane plasmique des entérocytes. Au niveau de la membrane apicale on retrouve les transporteurs GLUT5 (pour le fructose) qui permet une diffusion facilitée et SGLT1 (pour le glucose et le galactose) qui permet une absorption active dépendante du sodium. Au niveau de la membrane basolatérale le transporteur GLUT2 permet la sortie des monosaccharides vers le sang par diffusion facilitée (Chen et al., 2016).

Absorption des protéines

Les protéines sont digérées par des peptidases qui clivent les liaisons peptidiques. Les acides aminés utilisent des transporteurs spécifiques de certains acides aminés qui peuvent être dépendants ou non du gradient de sodium (transporteurs pour acides aminés neutres, acides, basiques...) (Silk et al., 1985). Les dipeptides et tripeptides sont absorbés par un transport actif secondaire puis sont hydrolysés en acides aminés dans les entérocytes avant leur passage dans la circulation sanguine.

➤ Régulation de la perméabilité intestinale

Régulation des jonctions serrées par les cytokines et facteurs de croissance

Plusieurs cytokines pro-inflammatoires sont responsables d'une augmentation de perméabilité paracellulaire. Par exemple, il a été montré que l'IFN γ (Interferon gamma) entraîne l'internalisation des protéines des jonctions serrées par un mécanisme proche de la macropinocytose (Bruewer, 2005). Le TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha) entraîne une diminution de l'expression de la protéine ZO-1 ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de la MLC (Ma, 2004). De la même manière, l'IL1 β (Interleukin 1 beta) diminue l'expression de l'occludine et active la MLCK (Al-Sadi and Ma, 2007 ; Al-Sadi et al., 2008). A l'inverse, certaines cytokines sont responsables d'une diminution de la perméabilité paracellulaire. Parmi elles, le TGF β (transforming growth factor beta) augmente l'expression des claudines 1 et 4 et neutralise les effets de l'IFN γ (Hering et al., 2011 ; Howe et al., 2005). L'IL-17 augmente également l'expression des claudines 1 et 2 (Kinugasa et al., 2000) et l'IL-10 neutralise l'IFN γ (Madsen et al., 1997). De même, le facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) neutralise les peroxydes d'hydrogène, permettant la restauration de la distribution de l'occludine et de ZO-1, ainsi que l'assemblage du cytosquelette d'actine (Banan et al., 2001 ; Basuroy et al., 2006).

Régulation des jonctions serrées par des nutriments ou des facteurs alimentaires

La privation en glutamine est connue pour induire une augmentation de la perméabilité paracellulaire, notamment via une diminution de l'expression de l'occludine et une réorganisation de la localisation des protéines ZO-1 et claudine-1 (Li, 2004 ; Li and Neu, 2009). Certains acides gras sont également responsable d'une augmentation de perméabilité tels que les acides eicosapentaénoïque (EPA), docosahexaénoïque (DHA) et gamma-linolénique (γ -LA), même si le mécanisme d'action n'est pas encore clair (Usami et al., 2001 ; Usami et al., 2003). D'autres composés ont également un effet néfaste sur la BEI, comme l'éthanol qui altère la distribution de l'occludine et de ZO-1 tout en augmentant la phosphorylation de la MLC (Ma et al., 1999).

Régulation des jonctions serrées par des pathogènes

Les pathogènes perturbent la BEI par leur liaison directe aux CEI ou par la sécrétion de toxines. Par exemple, l'infection à *Vibrio Cholerae* entraîne une augmentation de la perméabilité paracellulaire via la production de la toxine ZOT (Zona Occludens Toxin) qui induit la redistribution des protéines occludine et ZO-1 (Goldblum et al., 2011). De la même manière la bactérie *Clostridium perfringens* sécrète une toxine qui se lie directement aux domaines extracellulaires des claudines, provoquant leur internalisation (Sonoda et al., 1999) alors que la bactérie pathogène *E. coli* se lie directement aux CEI et induit une distribution aberrante des protéines des jonctions serrées (Muza-Moons et al., 2004).

Comme décrit précédemment, de nombreux facteurs peuvent moduler la perméabilité paracellulaire intestinale, tels que des cytokines, des nutriments ou encore certains pathogènes. Ainsi, on retrouve une altération de cette perméabilité dans de nombreuses pathologies. On retrouve par exemple une augmentation de perméabilité dans les MICI (détails dans la partie **V.2**)

Etude bibliographique

mais également dans la maladie céliaque, le syndrome de l'intestin irritable ou encore dans les allergies alimentaires (König et al., 2016).

Par ailleurs, des variations de la perméabilité intestinale sont également retrouvées en conditions physiologiques. En particulier, il a été montré que la perméabilité variait au cours de la vie. En effet la BEI est très perméable à la naissance, et diminue pendant la période post-natale, correspondant à une "clôture de l'intestin" ("gut closure") (Vukavić, 1984). Des études montrent notamment que les nouveau-nés prématurés ont une perméabilité paracellulaire intestinale plus élevée que ceux nés à terme (Weaver et al., 1984). La perméabilité de nouveau-nés diminue majoritairement pendant la première semaine, et se poursuit jusqu'à un mois après la naissance (Catassi et al., 1995). A l'inverse il a été montré chez les rongeurs, mais également chez les babouins et l'Homme que le vieillissement était associé à une augmentation de cette perméabilité (Man et al., 2015 ; Mullin et al., 2002 ; Tran and Greenwood-Van Meerveld, 2013). L'exercice physique, pratiqué de façon prolongée et intense ou par forte température, entraîne également une augmentation de la perméabilité intestinale, en affectant probablement les voies para et transcellulaires (Pires et al., 2016 ; Vargas and Marino, 2016). En effet durant l'effort physique le sang est préférentiellement distribué loin de la zone intestinale afin d'alimenter en oxygène les muscles et le cerveau. La BEI devient alors plus perméable permettant notamment aux endotoxines lumineales de passer à travers et de rejoindre la circulation sanguine. Ainsi, les complications intestinales sont fréquentes chez les athlètes d'endurance comme les marathonien, les symptômes les plus courant étant des diarrhées ou des saignements intestinaux (Gisolfi, 2000).

➤ Méthodes d'étude de la perméabilité intestinale

In vitro, la perméabilité est mesurée après culture de lignées de CEI (par exemple les Caco-2, HT29 ou T84) dans des filtres Transwell. Ce sont des lignées tumorales obtenues à partir d'adénocarcinomes coliques humains qui vont pouvoir reformer une monocouche de cellules différenciées, avec un pôle apical et basolatéral. Il est ainsi possible d'étudier l'impact d'un traitement ou d'une coculture avec un autre type cellulaire (**Figure 23**). La perméabilité est souvent inversement corrélée à la résistance transépithéliale (TER) que l'on peut mesurer à l'aide d'un ohmètre fait de deux électrodes qui vont mesurer la différence de potentiel électrique : la première électrode est placée dans la chambre apicale du filtre et la seconde dans la chambre basolatérale du filtre. La perméabilité paracellulaire peut être mesurée en utilisant des molécules couplées à des fluorochromes telles que l'acide sulfonique-FITC ou le dextran-FITC, avec des tailles variables allant généralement de 0.4 à 10 kDa. De même, la perméabilité transcellulaire peut être mesurée avec la HRP (Horseradish Peroxydase). La quantité de ces traceurs capables de passer au travers de la monocouche de CEI donne une estimation de la perméabilité *in vitro*.

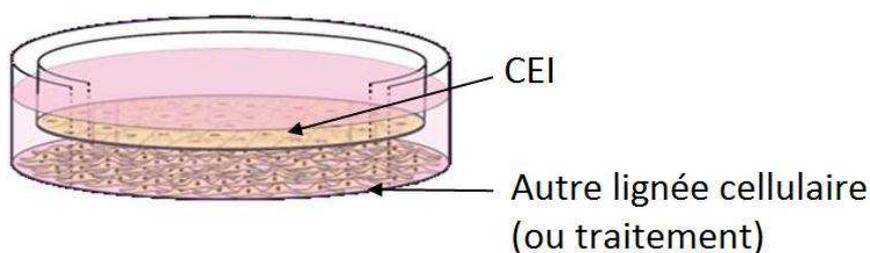


Figure 23 : Culture de CEI sur des filtres Transwell

Etude bibliographique

Ex vivo, la perméabilité est mesurée à l'aide de chambres de Ussing. Pour cela des fragments de muqueuse ou des biopsies sont montés dans des cassettes elles-mêmes placées entre les deux cuves de la chambre (**Figure 24**). Dans la cuve du côté apical on ajoute un traceur (fluorescent ou HRP), et la perméabilité est déterminée de la même façon qu'*in vitro* en mesurant la quantité capable de passer au travers du tissu en prélevant le milieu dans la chambre basolatérale. Il existe également des systèmes adaptables à ce modèle afin de mesurer directement la TER.

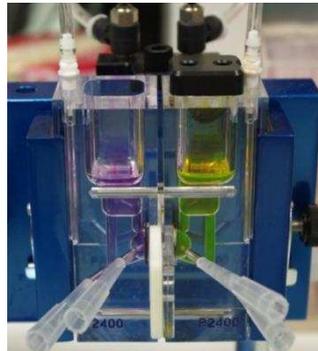


Figure 24 : Chambre de Ussing (Insert U1235)

Enfin, *in vivo*, la perméabilité peut être évaluée par des traceurs administrés dans l'eau de boisson et dont le taux est ensuite mesuré dans le sang ou les urines. Les traceurs couramment utilisés sont des petits sucres comme le lactulose et le mannitol, mais leur dégradation par les bactéries de la flore intestinale ne permet pas d'estimer la perméabilité colique. Pour la mesure de celle-ci le Cr-EDTA ou le sucralose sont alors utilisés (Arrieta, 2006). Chez les rongeurs la perméabilité *in vivo* peut également être mesurée par gavage des animaux avec une solution contenant des traceurs fluorescents ou de la HRP. Grâce à un prélèvement caudal il est ensuite possible de mesurer la perméabilité paracellulaire ou transcellulaire en évaluant la quantité de traceurs retrouvés dans le sang.

b- Le contrôle des mécanismes immunitaires

La BEI constitue une barrière physique afin de protéger l'organisme des bactéries commensales ou pathogènes, mais elle doit également être capable de faire le lien avec le système immunitaire afin de l'informer du contenu luminal. Ainsi les CEI sont capables de recevoir des signaux et de les intégrer afin de permettre la communication bactéries-hôte, faisant de la BEI un acteur indispensable dans l'immunité innée et adaptative (**Figure 25**).

La BEI comme acteur de l'immunité innée

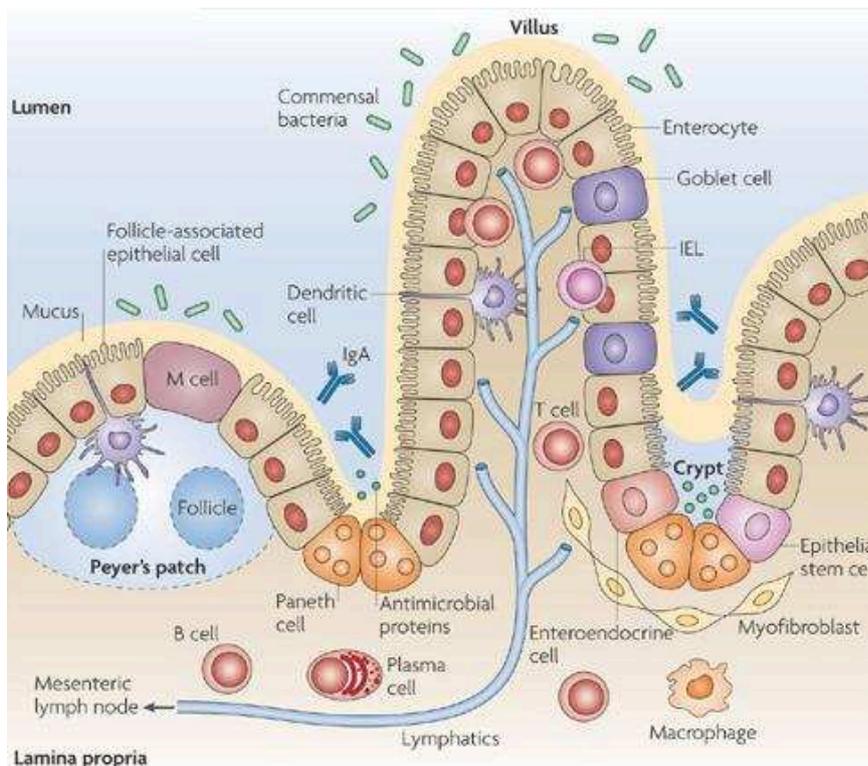
La première barrière physique contre les agents pathogènes est assurée par la sécrétion de mucus et de protéines antimicrobiennes (AMP). Le rôle essentiel des mucines a notamment été mis en évidence dans une étude montrant le développement spontané de colites chez des souris déficientes pour MUC2, la mucine la plus abondante (Van der Sluis et al., 2006). Parmi les protéines antimicrobiennes sécrétées on retrouve la lectine de type C Reg3A, les défensines ou encore le lysozyme. Toutes ces protéines permettent une large régulation des bactéries commensales (via le contrôle de leur croissance) et pathogènes et limitent leur résistance aux réponses antimicrobiennes. L'autophagie des CEI limite également la diffusion de bactéries invasives traversant l'épithélium

Etude bibliographique

(Benjamin et al., 2013). De même, les CEI expriment des PRR (pattern-recognition receptors) qui reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes et qui activent des voies de signalisation permettant la synthèse de cytokines nécessaires aux réponses inflammatoires (Fukata and Arditi, 2013).

La BEI comme acteur de l'immunité adaptative

Les CEI sont également capables de transporter directement des immunoglobulines produites par les cellules plasmiques dans la lame basale à travers la BEI. Pour cela, elles possèdent un récepteur aux immunoglobulines à leur surface basolatérale, et les immunoglobulines peuvent ensuite transcytoser activement à travers la cellule (Johansen and Kaetzel, 2011). De la même manière les cellules M ou "Microfold" sont étroitement associées aux follicules lymphoïdes et permettent l'endocytose d'antigènes du contenu luminal. Ils sont ensuite recapturés par les cellules dendritiques afin de les présenter au système immunitaire adaptatif, et les lymphocytes B pourront ainsi produire les anticorps spécifiques. Enfin, les CEI participent à l'immunité adaptative via leur communication étroite avec les cellules immunitaires, notamment via la sécrétion de chimiokines. On retrouve d'ailleurs de nombreuses cellules immunitaires enchassées entre les CEI elles-mêmes. De nombreuses chimiokines sont ainsi produites de manière constitutive, par exemple RANTES et MIP-3 α qui attirent les lymphocytes (Mazzucchelli et al., 1996 ; Sibartie et al., 2009). En conditions inflammatoires, la production de certaines de ces chimiokines est augmentée comme GRO α , β ou γ qui attirent les neutrophiles, MCP-1 qui recrute les monocytes ou encore l'IL-8 qui favorise le recrutement des polynucléaires neutrophiles sur le site d'infection (Mazzucchelli et al., 1994 ; Puleston et al., 2005 ; Reinecker et al., 1995). De même, les cellules de Goblet sécrètent la protéine REML β (Resistin-like molecule beta) qui régule les réponses des lymphocytes T et des macrophages (Nair et al., 2008).



Les CEI produisent notamment des protéines antimicrobiennes et du mucus et sont capables de transporter les immunoglobulines (IgA) produites par les cellules plasmiques. Elles sont en étroite relation avec les cellules immunitaires et produisent des chimiokines afin de faciliter leur recrutement. Les cellules M sont associées aux follicules lymphoïdes et permettent la présentation d'antigènes de la lumière intestinale aux cellules du système immunitaire adaptatif. (D'après Abreu, 2010).

Figure 25 : Régulation des mécanismes immunitaires innés et adaptatifs par les CEI

c- Le contrôle du microbiote

Les CEI expriment des facteurs tels que l'IAP (Intestinal Alkaline Phosphatase) au niveau de la bordure en brosse qui modifie les LPS bactériens afin d'atténuer leur potentiel pro-inflammatoire. Cela permet aux CEI de contrôler les concentrations de LPS nécessaires à l'activation du système immunitaire (Lallès, 2016). De même, les CEI produisent des protéines HSP (Heat Shock Protein) quand elles sont en contact avec des bactéries. Par exemple, les bactéries commensales activent HSP72 qui est impliquée dans le ciblage de protéines mal repliées au protéasome. Le LPS d'*E. Coli* active HSP25 qui va stabiliser les contacts entre les cellules, notamment au niveau des jonctions serrées et certaines bactéries activent les HSP70 qui favorise la présentation d'antigènes aux cellules immunitaires (Petrof et al., 2004).

d- Le contrôle des neurones entériques

Les CEI sont capables de transduire des signaux luminaux aux neurones entériques via la libération de sérotonine (5-HT) dans le but d'activer les réflexes neuronaux qui contrôlent le péristaltisme intestinal (Neunlist et al., 2012). De plus, les CEI expriment ErbB2, un récepteur nécessaire à la survie postnatale des neurones entériques (Crone et al., 2003). Les CEI sont également capables, en cas de réaction infectieuse ou inflammatoire, de stimuler la production de chimiokines par les neurones (Tixier et al., 2006). Enfin, les CEI sécrètent du NGF (Nerve Growth Factor) impliqué dans la neuroprotection et dans la régulation du phénotypique neurochimique (Moriez et al., 2009).

Ainsi, la BEI représente un acteur central de l'homéostasie intestinale, dont la fonction majeure va être d'empêcher le passage d'agents pathogènes ou toxiques tout en permettant l'absorption des nutriments, des électrolytes et de l'eau. Elle est composée de différents types cellulaires, chacun ayant un rôle bien précis participant à la bonne réalisation de ces fonctions. Elle se doit d'être renouvelée continuellement afin d'assurer son rôle de manière efficace, ce qui est rendu possible grâce à un équilibre entre les compartiments de renouvellement, de migration/différenciation et de mort épithéliale. En cas de lésions, la bonne réparation de la BEI représente également un enjeu majeur pour la santé de l'organisme. La BEI joue différents rôles physiologiques, le principal étant la régulation de la perméabilité intestinale. Elle interagit également avec les cellules de son microenvironnement (système immunitaire, microbiote, système nerveux) et participe ainsi à la régulation de nombreuses autres fonctions intestinales.

III Le système nerveux entérique

Les fonctions digestives sont contrôlées par le SNE, un système autonome et intégratif composé de neurones et de cellules gliales. Il serait composé, selon les estimations, d'environ 100 à 500 millions de neurones tapissant la paroi intestinale (1 à 5 fois plus que dans la moelle épinière), ce qui lui vaut le nom de "cerveau viscéral" ou "deuxième cerveau" (Grundy and Schemann, 2007 ; Wood et al., 1999). Il régule notamment la motricité digestive et les fonctions de la BEI. De plus, il est

Etude bibliographique

connecté au SNC, notamment via le nerf vague, ce qui lui permet de relier les centres cognitifs du cerveau aux fonctions digestives périphériques.

1) Découverte

Le système nerveux entérique (SNE), aussi appelé "second cerveau" est également considéré comme le cerveau originel, puisque les organismes pluricellulaires primitifs n'avaient qu'un tube digestif innervé. C'est uniquement au cours de l'évolution que l'encéphale a pu se développer, dans le but d'améliorer les systèmes sensoriels tels que la vue ou l'odorat. Son identification débute par la description par G. Meissner et L. Auerbach de deux plexus nerveux au sein de la paroi intestinale : le plexus sous-muqueux ou plexus de Meissner et le plexus myentérique ou plexus d'Auerbach (Auerbach, 1864 ; Meissner, 1857). Des expériences réalisées par S. R. y Cajal lui ont ensuite permis d'identifier différents types de neurones dans la paroi intestinale, et il faudra attendre 1899 pour que A. S. Dogiel établisse leur classification selon leur morphologie (Cajal, 1893 ; Dogiel, 1899). C'est également lui qui observera pour la première fois les CGE, les décrivant comme des cellules satellites nucléées à proximité des neurones entériques (Dogiel, 1899). S'ensuit l'identification du rôle fonctionnel du SNE, grâce à la découverte du péristaltisme par W. Bayliss et E. Starling. Ils ont ainsi pu observer que l'intestin grêle et le colon isolé de chien présentaient des contractions spontanées en réponses à des stimulations mécaniques, et identifient le plexus d'Auerbach comme responsable de ce type de réflexe (Bayliss and Starling, 1899 et 1900). Enfin, le caractère intrinsèque de ce réflexe nerveux fut confirmé par les expériences de J. N. Langley qui montrèrent que les contractions persistaient même après dégénérescence des afférences nerveuses (Langley and Magnus, 1905).

2) Organisation

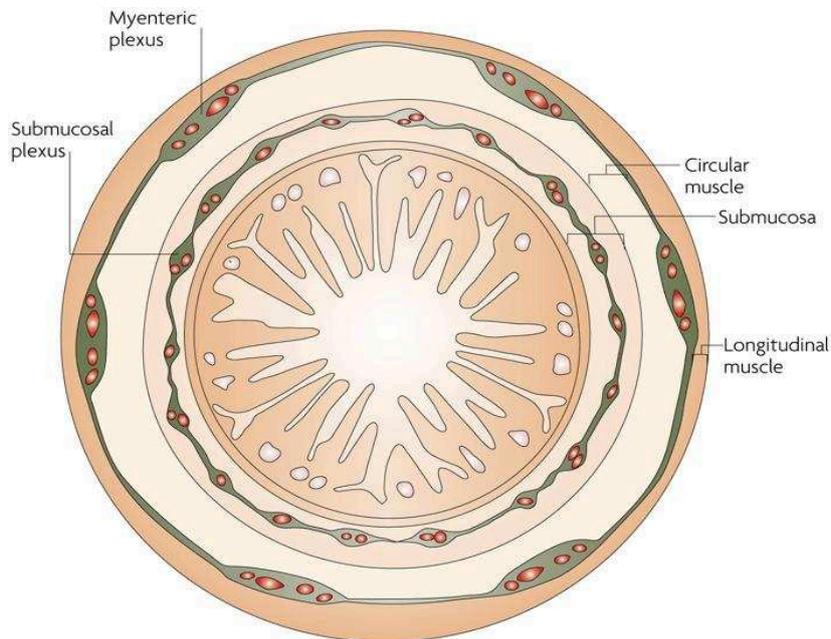
Le SNE s'étend tout le long du tube digestif où il constitue un réseau de ganglions connectés par des fibres interganglionnaires, mais on le retrouve également dans le pancréas et le système biliaire (Costa et al., 2000 ; Furness, 2000). Il est organisé en deux plexus majeurs : le plexus sous-muqueux situé entre la muqueuse et la couche musculaire circulaire, et le plexus myentérique (ou plexus d'Auerbach) situé entre les couches musculaires lisses longitudinales et circulaires (**Figure 26**). Le plexus sous-muqueux est lui-même divisé en 3 plexus : directement sous la muqueuse on retrouve le plexus interne de Meissner, accolé aux muscles circulaires se trouve le plexus externe de Henle (ou Schabadasch) et entre les deux un plexus intermédiaire (Hoyle and Burnstock, 1989). Dans les différentes couches de la paroi digestive on retrouve également plusieurs plexus aganglionnaires.

Cette organisation a un rôle fonctionnel puisque le plexus myentérique, présent de l'œsophage au rectum, régule l'activité musculaire alors que le plexus sous-muqueux, principalement développé au niveau de l'intestin grêle, régule les fonctions de la muqueuse (Goyal and Hirano, 1996). Il existe cependant des exceptions car certains neurones du plexus sous-muqueux externe innervent les muscles circulaires et à l'inverse des neurones du plexus myentérique ont des projections qui s'étendent jusqu'à la muqueuse (Domoto et al., 1990 ; Hens et al., 2001).

Chaque ganglion est formé d'un étroit enchevêtrement de neurones et de cellules gliales entériques. En terme de composition chez l'Homme, on retrouve environ 1 à 5 fois plus de neurones dans le SNE que dans la moelle épinière, soit plus de 100 millions (Wood et al., 1999). Les cellules

Etude bibliographique

gliales entériques (CGE), 3 à 4 fois plus nombreuses, sont en contact direct avec la membrane des neurones, à la fois dans les ganglions mais également au niveau des fibres nerveuses (Coelho-Aguiar et al., 2015 ; Gabella and Trigg, 1984).



Le SNE est organisé en deux plexus principaux : le plexus sous-muqueux entre la muqueuse et la couche musculaire circulaire, et le plexus myentérique entre les couches musculaires circulaires et longitudinales.
(Heanue and Pachnis, 2007)

Nature Reviews | Neuroscience

Figure 26 : Schéma d'une coupe transversale d'intestin grêle

3) Développement

a- Migration des précurseurs

La majorité des cellules du SNE dérivent des cellules de la crête neurale qui migrent à partir du segment vagal, avec différents sous-groupes contribuant à différentes parties de l'intestin (Burns et al., 2000). Au 9^e jour embryonnaire chez la souris (après 4 semaines de gestation pour l'Homme), les cellules de la crête neurale entrent dans la partie antérieure de l'intestin et sont alors appelées cellules entériques dérivées de la crête neurale (ENCC). Ces progéniteurs du SNE migrent dans le sens rostro-caudal et colonisent le tube digestif de façon séquentielle : elles commencent par la partie antérieure (œsophage, estomac et duodenum), puis la partie moyenne (intestin grêle, caecum, colon ascendant, colon transverse rostral et appendice) et enfin la partie postérieure (colon transverse caudal, colon descendant, sigmoïde et rectum) (**Figure 27**) (Heanue and Pachnis, 2007). Cette colonisation s'achève au 15^e jour embryonnaire chez la souris, correspondant à la 7^e semaine chez l'Homme (Druckenbrod and Epstein, 2005 ; Fu et al., 2003). Les cellules de la crête neurale qui migrent à partir du segment sacré commencent leur migration plus tard et contribuent uniquement à la formation d'une petite fraction de neurones et CGE dans les parties distales post-ombilicales de l'intestin (Burns and Douarin, 1998 ; Kapur, 2000). De la même manière, les cellules de la crête neurale qui migrent à partir du segment rostro-troncal vont coloniser la partie antérieure du tube digestif, à savoir œsophage et estomac supérieur (Gershon, 1997).

Le front de migration se présente sous la forme de cellules interconnectées constituant des chaînes qui avancent caudalement, mais on trouve également des cellules isolées en avant de ce

Etude bibliographique

front de migration (Young et al., 2004). Une fois qu'elles atteignent le caecum, les ENCC marquent une pause dans leur migration de plusieurs heures, et les chaînes de cellules se fragmentent afin d'augmenter le nombre de cellules en avant qui présentent des niveaux accrus de comportement exploratoire. A l'inverse, les cellules à l'arrière du front de migration présentent des mouvements plus restreints (Druckenbrod and Epstein, 2007). Elles reprennent ensuite leur migration continue vers les parties postérieures de l'intestin en tant que réseau d'ENCC migratrices.

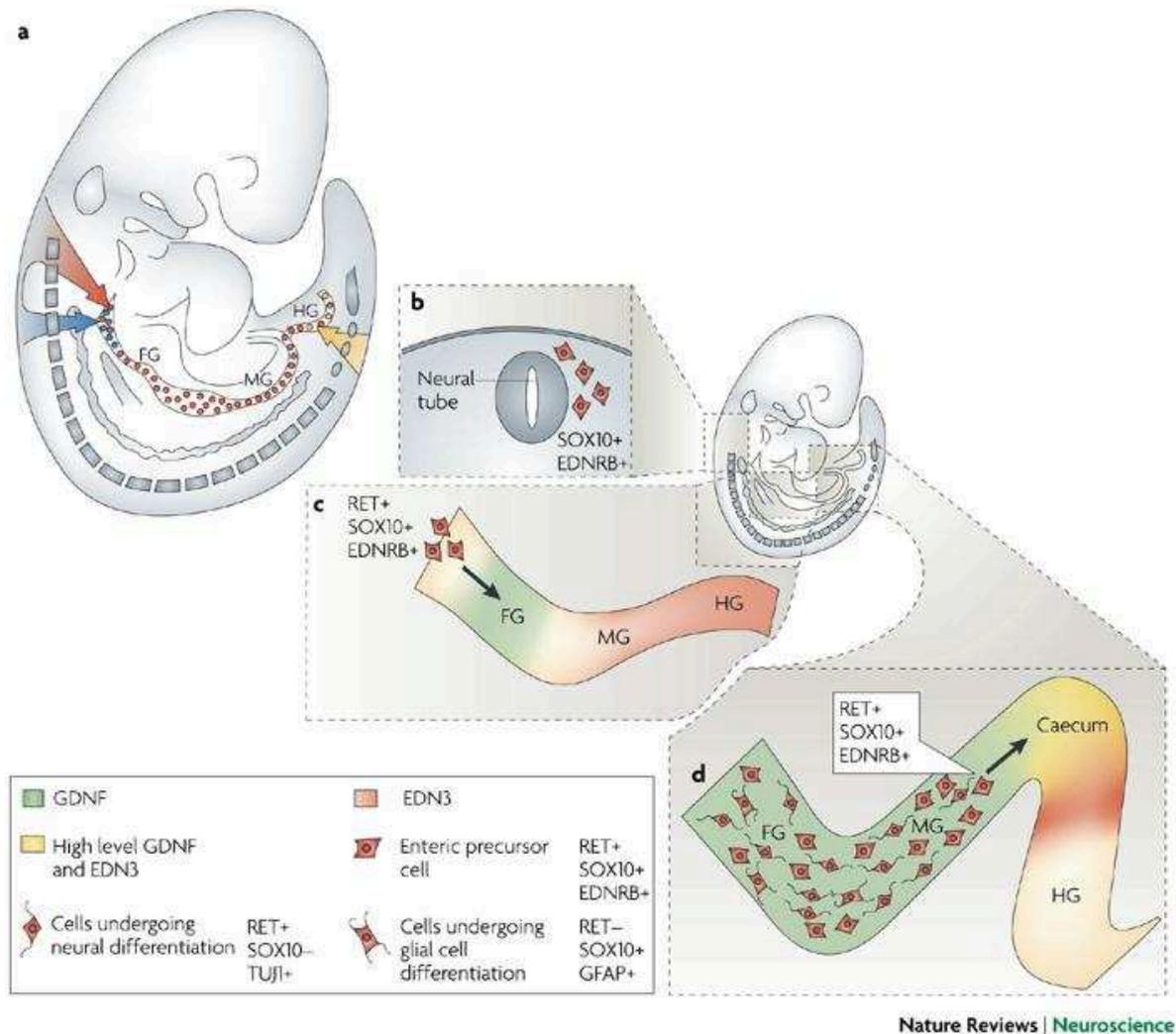


Figure 27 : Développement du système nerveux entérique

(a) Au stade E9 chez l'embryon de souris, les cellules entériques dérivées de la crête neurale (ENCC) migrent à partir du segment vagal (flèche rouge) dans le sens rostro-caudal afin de coloniser les différentes parties de l'intestin (intestin antérieur FG, intestin moyen MG et intestin postérieur HG ; pointillés rouges). Les ENCC qui migrent à partir du segment rostral (flèche bleue) colonisent la partie antérieure de l'intestin, et celles qui migrent à partir du segment sacré (flèche jaune) colonisent le colon. (b) Les ENCC issues du segment vagal qui émigrent à partir du tube neural expriment Sox10 et EDNRB. (c) En entrant dans l'intestin les ENCC expriment Ret et le mésenchyme intestinal produit des niveaux élevés de son ligand, le GDNF, au niveau de l'estomac (vert). Au niveau de l'intestin moyen et postérieur, le mésenchyme produit beaucoup d'EDN-3 (rose), le ligand d'EDNRB. (d) Au niveau du caecum les ENCC rencontrent des niveaux élevés de GDNF et EDN3 (jaune). Les cellules à l'arrière du front de migration se différencient progressivement en neurones et en cellules gliales. (Heanue and Pachnis, 2007)

b- Prolifération et différenciation

Les ENCC prolifèrent activement afin d'accroître le pool de progéniteurs pour coloniser l'intestin antérieur et générer les millions de neurones et CGE présents dans l'intestin adulte. Les niveaux de prolifération sont égaux dans les différentes parties du SNE, indépendamment de la position du front de migration (Young et al., 2005). Les marqueurs d'une différenciation neuronale progressive, telle que la protéine pan-neuronale Hu, sont rapidement observés pendant que les ENCC migrent dans l'intestin, juste à l'arrière du front de migration. Les précurseurs gliaux expriment la protéine B-FABP (Brain-Fatty Acid-Binding Protein), mais bien en arrière du front de migration, reflétant un retard de la différenciation gliale par rapport à la différenciation neuronale (Young et al., 2003). Durant le développement du SNE, les cellules exprimant les marqueurs pan-neuronaux (neurofilaments M et Hu) et gliaux (S100 β) continuent de proliférer tout en se différenciant progressivement. Malgré la prolifération continue de certains précurseurs entériques, des marqueurs de neurones pleinement différenciés tel que le neuropeptide Y peuvent être observés durant les phases de migration, alors que d'autres sous-populations ne naissent que pendant le développement post-natal, plusieurs jours après la migration complète des ENCC (Pham et al., 1991). De manière intéressante, les projections axonales des premiers neurones différenciés s'étendent caudalement, dans le même sens de migration que leurs progéniteurs vagues, suggérant un guidage commun qui contrôle à la fois la migration cellulaire et la croissance axonale (Young et al., 2002).

Les différentes classes de neurones naissent en vagues successives : la première génère tous les neurones sérotoninergiques, puis viennent les neurones peptidergiques et enfin les plus récentes génèrent les neurones exprimant CGRP (Pham et al., 1991). Les CGE expriment d'abord S100 β , et les CGE complètement différenciées exprimant la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) n'apparaissent pas avant le 16^e jour embryonnaire chez la souris (Rothman et al., 1986). Les cellules différenciées se regroupent ensuite en ganglions : on estime que la formation du plexus sous-muqueux a lieu 2 à 3 jours après celle du plexus myentérique chez la souris (2 à 3 semaines chez l'Homme), et que les cellules du plexus sous-muqueux dérivent du plexus myentérique (Wallace and Burns, 2005).

c- Contrôle du développement

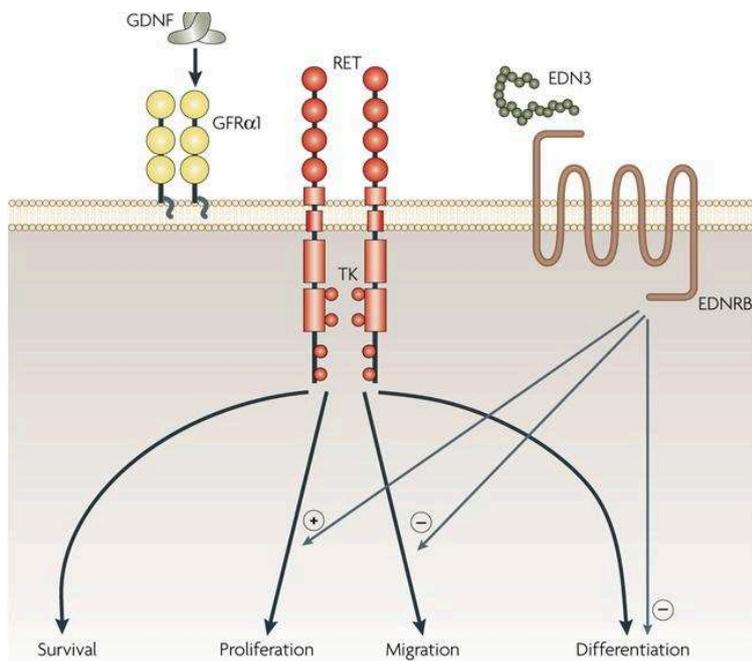
Il existe deux voies de signalisation majeures impliquées dans le contrôle de la formation et de la différenciation du SNE : la voie GDNF/GFR α 1/Ret et la voie EDN-3/EDNRB (**Figure 28**). Le récepteur Ret est exprimé par les ENCC et activé par la formation du complexe d'un dimère de GDNF (Glial cell-line-Derived Neurotrophic Factor) produit par les cellules du mésenchyme, avec le co-récepteur GFR α 1 exprimé par les ENCC (Natarajan et al., 2002). Cette activation promeut la survie, la prolifération, la migration et la différenciation des neurones du SNE (Flynn et al., 2007 ; Heanue and Pachnis, 2007 ; Natarajan et al., 2002). Les ENCC expriment également le récepteur EDNRB (endothelin receptor B) activé par la liaison d'EDN-3 (endothelin 3). Cette voie est impliquée dans le maintien de l'état prolifératif des ENCC et dans l'inhibition de la différenciation et de la migration (Nagy and Goldstein, 2006).

Certains facteurs de transcription sont aussi impliqués dans la différenciation des cellules entériques. Ainsi, le facteur de transcription Mash-1 est nécessaire à la différenciation en neurones sérotoninergiques (Blaugrund et al., 1996). De la même manière, le facteur de transcription Sox10, exprimé par les CGE dans les dernières phases du développement du SNE et nécessaire à leur

Etude bibliographique

différenciation, jouerait également un rôle crucial dans le maintien de la multipotence des cellules dérivées de la crête neurale (Kelsh, 2006). Enfin, le facteur de transcription Phox2B influence l'expression de Ret (Lake and Heuckeroth, 2013).

Les protéines BMP (Bone Morphogenic Protein), produites par le mésenchyme intestinal, sont également impliquées dans la différenciation des cellules entériques. Il a ainsi été montré que des faibles concentrations de BMP-2 et -4 augmentaient le nombre de neurones entériques, alors que des fortes concentrations inhibaient leur formation. A l'inverse, ils induisaient l'apparition précoce des neurones exprimant la tyrosine Kinase C (TrKC) et donc dépendants de la neurotrophine-3 pour leur survie (Chalazonitis et al., 2004). De la même manière, une inhibition de l'activité BMP inhibait la migration des cellules de la crête neurale et empêchait la formation de ganglions (Goldstein et al., 2005).



Les ENCC expriment Ret, GFR α et EDNRB. Le mésenchyme intestinal produit du GDNF qui se complexe avec GFR α afin d'activer Ret, dans le but de contrôler la survie, la prolifération, la migration et la différenciation des ENCC. De la même manière, le mésenchyme intestinal produit de l'EDN-3 qui active EDNRB afin de maintenir la prolifération tout en inhibant la migration et la différenciation. (Heanue and Pachnis, 2007)

Figure 28 : Les voies de signalisation GDNF/GFR α 1/Ret et EDN-3/EDNRB régulent le développement du SNE

d- Maturation post-natale

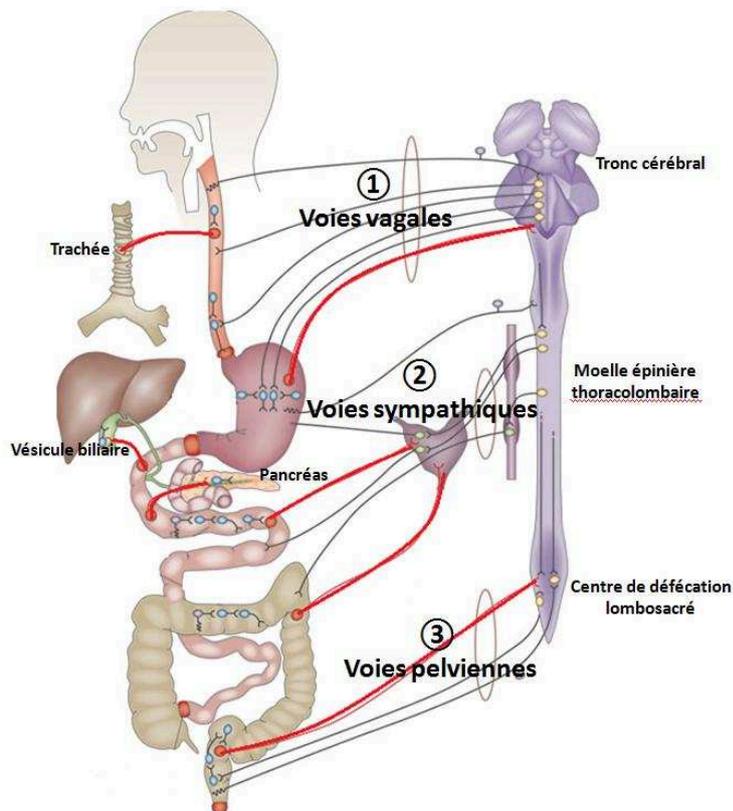
La maturation des plexus se poursuit pendant la période post-natale, qui représente ainsi une étape clé dans le développement des fonctions digestives telles que la motilité ou la fonction de barrière intestinale. En particulier, il a été montré chez le raton une augmentation de la proportion de neurones cholinergiques au niveau du plexus myentérique, associée au développement de la transmission musculaire cholinergique (de Vries et al., 2010). Cette étude a également démontré une augmentation du nombre de neurones nitrergiques durant les premiers jours de la période post-natale. De la même manière, des contractions coliques spontanées étaient observées chez la souris parallèlement au développement de l'innervation cholinergique (Roberts et al., 2006). Des études montrent également une diminution du nombre de cellules nerveuses par ganglion avec l'âge chez le rat, combinée à une augmentation de leur diamètre (Schäfer et al., 1999).

La maturation des CGE a également été étudiée durant cette période post-natale. Ainsi, durant la première semaine, l'expression des marqueurs gliaux GFAP et S100 β est augmentée chez le

rat (Cossais et al., 2016). L'augmentation de l'expression de la GFAP est également retrouvée chez l'Homme (Khen et al., 2004). Enfin, il a été montré chez la souris que la colonisation de la lamina propria par les CGE commençait durant les stades précoces de la période post-natale et n'atteignait des niveaux stables qu'une fois le sevrage terminé (Kabouridis et al., 2015).

4) Communications avec le système nerveux extrinsèque

Le contrôle nerveux des fonctions digestives ne dépend pas uniquement du SNE mais est en réalité un système intégratif qui implique des interactions entre les réflexes locaux du SNE, les réflexes qui passent par les ganglions sympathiques et les réflexes qui passent par l'intestin pour retourner vers le SNC (Furness, 2012). Ainsi, les informations du SNC sont transmises au tractus digestif par trois voies : la voie vagale, la voie sympathique et la voie pelvienne (**Figure 29**). A l'inverse, le SNE comprend des neurones intestinaux qui se projettent vers le SNC (tronc cérébral, moelle épinière et centre de défécation), vers les ganglions sympathiques, et même vers le pancréas, la vésicule biliaire et la trachée. Au niveau des ganglions sympathiques les neurones reçoivent donc des informations à la fois du SNE et du SNC. En ce qui concerne les informations sensorielles, elles vont à la fois vers le SNE via des neurones afférents primaires intrinsèques (IPAN), mais aussi vers le SNC via des neurones afférents primaires extrinsèques qui suivent les routes afférentes vagale et spinale (Grundy et al., 2006).



*L'innervation extrinsèque se fait par 3 voies : la voie vagale, sympathique et pelvienne. L'innervation intrinsèque est assurée par le SNE, qui projette également des neurones vers le SNC et les ganglions sympathiques mais aussi vers le pancréas, la vésicule biliaire et la trachée (en rouge).
(D'après Furness, 2012)*

Figure 29 : Innervation intrinsèque et extrinsèque du tractus digestif

Ces communications entre SNE et SNC vont ainsi permettre de moduler les fonctions digestives, mais également de relier les centres émotionnels et cognitifs du cerveau aux fonctions et mécanismes intestinaux périphériques (Carabotti et al., 2015). Elles vont notamment permettre de

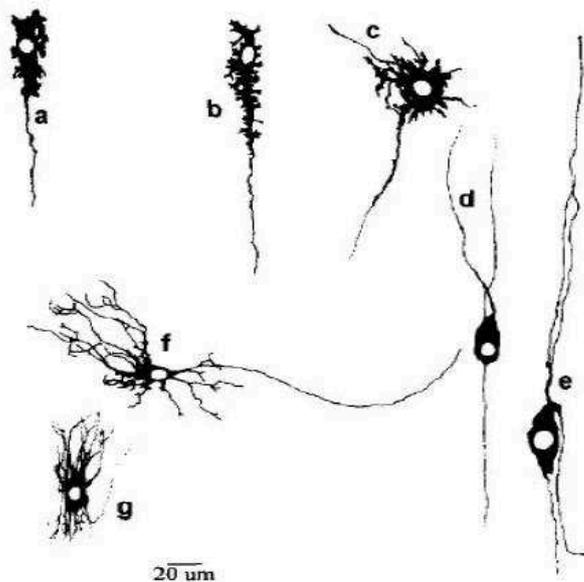
Etude bibliographique

réguler la sensation d'appétit ou encore de moduler la motilité digestive durant le sommeil (Cummings and Overduin, 2007 ; Husebye, 1997). De plus, il a été montré qu'une pré ou post-stimulation du nerf vague empêchait les lésions de la BEI induite par des brûlures à la vapeur d'eau chez des souris, probablement via une activation des CGE (Costantini et al., 2010 ; Krzyzaniak et al., 2011). De la même manière, la stimulation des racines sacrées est déjà utilisée en tant que traitement pour l'incontinence, mais elle améliore également la réparation de la muqueuse intestinale induite par une inflammation (Brégeon et al., 2016 ; Leroi et al., 2009). Elle représente ainsi une potentielle piste thérapeutique dans les pathologies impliquant des défauts de BEI, telles que les MICI. A l'inverse, une hypothèse formulée par Braak suggère que cette communication SNE - SNC pourrait être impliquée dans la maladie de Parkinson : selon lui, les atteintes neuronales débuteraient au niveau de l'intestin suite à une infection par un pathogène neurotrophique, et pourraient remonter jusqu'au cerveau notamment via le nerf vague (Hawkes et al., 2007).

5) Les neurones entériques

a- Les différents types de neurones entériques

Plusieurs classifications ont été proposées afin de différencier les neurones entériques. La plus ancienne classification a été proposée par Dogiel et était basée sur des critères morphologiques des neurones retrouvés dans les plexus myentérique et sous-muqueux, notamment chez l'Homme (Dogiel, 1899). Il a ainsi décrit 3 types de neurones, appelés Dogiel I, II et III, en se basant sur les différentes formes et longueurs de leurs dendrites. Il faudra attendre une centaine d'années pour que 4 autres types de neurones soient identifiés, classés de I à VII (Brehmer et al., 2002 ; Furness, 2006 ; Timmermans et al., 1997). Toutefois, la majorité des neurones appartiennent aux classes I à III (Figure 30).



Neurones entériques retrouvés dans l'intestin grêle chez le cobaye.

(a-c) Neurones de type Dogiel I, avec un seul axone et de nombreuses dendrites courtes.

(d-e) Neurones de type Dogiel II, pluriaxonaux adendritiques.

(f-g) Neurones de type Dogiel III, uniaxonaux avec de longues dendrites.

(Furness, 2006)

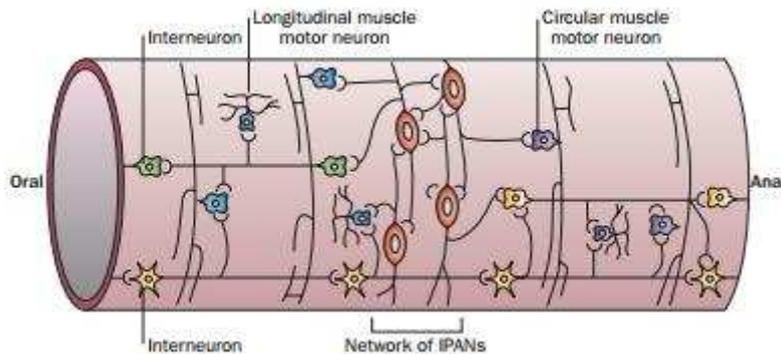
Figure 30 : Classification des neurones entériques selon Dogiel

Les neurones entériques ont également été classés en se basant sur leurs propriétés électrophysiologiques. 3 types de neurones ont ainsi été identifiés : les neurones S (synaptic) avec des potentiels d'action et des phases d'hyperpolarisation courts, les neurones AH (After

Etude bibliographique

Hyperpolarisation) caractérisés par une longue phase d'hyperpolarisation et les neurones LT (Low Threshold) très facilement excitables et parfois capables de déclencher des potentiels d'action sans stimulation (Lomax et al., 2001).

Ces classifications ont aujourd'hui laissé la place à une classification fonctionnelle des neurones entériques. Elle est basée sur leur implication dans l'activité réflexe entérique, sur leurs projections ou encore sur l'expression des différents neurotransmetteurs et de leurs récepteurs. On parle alors de neurones sensitifs, d'interneurones et de neurones moteurs (**Figure 31**).



Les neurones sensitifs intrinsèques (IPAN) apparaissent en rouge, les interneurones descendants sont en jaune et les ascendants en vert. Les neurones moteurs excitateurs sont en bleu et les inhibiteurs en violet. (Furness, 2012)

Figure 31 : Les différents types de neurones entériques selon leurs propriétés fonctionnelles

Ainsi, les neurones entériques sécrètent plus de 30 neurotransmetteurs différents, qui peuvent être soit des petites molécules (par exemple norepinephrine et 5-HT), des grosses molécules (peptides) ou encore des gaz (oxyde nitrique et monoxyde de carbone). L'acétylcholine (ACh) est le neurotransmetteur excitateur majeur dans le SNE (Hansen, 2003). De plus, la sécrétion de ces neuromédiateurs dépend généralement de leur fonction (**Figure 32**). Par exemple, les neurones moteurs excitateurs responsables d'une stimulation musculaire sécrètent Chat et SP, des substances excitatrices, alors que les neurones moteurs inhibiteurs sécrètent NOS et VIP, des médiateurs ayant une action inhibitrice sur les cellules cibles.

Function	Neurochemical coding
Sensory	Chat, Calb, CGRP, and SP
Interneurones, orally directed	Chat, Calret, ENK, and SP
Interneurones, aborally directed	5-HT, DYN, GRP, NOS, somatostatin, and VIP
Short excitatory muscle motor neurones	Chat and SP
Long excitatory muscle motor neurones	Chat, Calret, and SP
Inhibitory muscle motor neurones	DYN, ENK, GRP, NOS, and VIP
Secretomotor neurones	Chat, CCK, CGRP, DYN, NPY, somatostatin, and VIP

Chat = choline acetyltransferase
 NOS = nitric oxide synthetase
 Calb = calbindin
 Calret = calretinin
 DYN = dynorphin,
 GRP = gastrin releasing peptide
 CGRP = calcitonin generelated peptide
 SP = substance P
 ENK = enkephalins
 5-HT = 5-hydroxytryptamine
 NPY = neuropeptide Y
 VIP = vasoactive intestinal polypeptide
 (Hansen, 2003)

Figure 32 : Codage chimique fonctionnel des neurones entériques

➤ **Les neurones sensitifs :**

Ils représentent 20% des neurones entériques et ont un rôle majeur dans la détection et le contrôle de l'état du tube digestif en réponse à différents stimuli, tels qu'une distension de la paroi intestinale ou une agression chimique. Ils transmettent les informations qu'ils reçoivent aux autres neurones afin de contrôler les fonctions physiologiques de l'intestin telles que le flux sanguin, la motricité ou la sécrétion de fluide à travers l'épithélium (Furness et al., 2004).

On distingue deux types de neurones sensitifs : ceux qui ont une origine intrinsèque avec leurs corps cellulaires, leurs prolongements et leurs synapses au niveau du tube digestif (appelés IPAN pour neurones primaires afférents intrinsèques), et ceux qui ont une origine extrinsèque et donc les corps cellulaires sont situés dans les ganglions des afférences vagales et sacrées (Hansen, 2003). D'un point de vue morphologique ce sont des neurones de type Dogiel II, et ils appartiennent à la classe électrophysiologique AH (Furness et al., 1998). Ils agissent en coopération avec les cellules endocrines (qui sécrètent notamment du 5-HT ou de la cholécystokinine) et immunitaires comme un réseau de surveillance. Les IPAN sont essentiels au SNE pour le contrôle de la digestion, alors que les neurones afférents extrinsèques informent le cerveau des procédés pertinents pour l'énergie et l'homéostasie des fluides, ainsi que les sensations d'inconfort et de douleur (Holzer, 2002). Ainsi, ces neurones sensitifs sont des mécano-, chimio- et thermo-récepteurs, qui représentent des nocicepteurs pouvant être activés par de nombreuses substances produites notamment dans les cas d'ischémie, de lésion ou d'inflammation.

➤ **Les interneurones :**

Ce sont les neurones les plus abondants dans l'intestin, dont le rôle est de transmettre les messages sensitifs aux neurones moteurs. D'un point de vue morphologique ce sont surtout des neurones de type Dogiel II, et ils appartiennent aux classes électrophysiologiques S et AH. Au moins un type d'interneurones ascendants et trois types d'interneurones descendants ont été caractérisés (Hansen, 2003). Les interneurones ascendants sont principalement des neurones cholinergiques alors que les interneurones descendants ont un codage neurochimique complexe. En particulier, les interneurones Ach/NO/VIP/somatostatine sont impliqués dans les réflexes locaux de motricité et les interneurones Ach/5-HT sont impliqués dans les réflexes locaux sécrétomoteurs. Deux potentiels post-synaptiques non cholinergiques rapidement excitables, l'un médié par l'ATP et l'autre par 5-HT, permettent la transmission interneuronale (Furness, 2000).

➤ **Les neurones moteurs :**

On distingue 3 grandes classes de neurones moteurs : les neurones moteurs musculaires (excitateurs ou inhibiteurs), les neurones sécrétomoteurs (vasodilatateurs ou non) et les neurones qui innervent les cellules endocrines (Hansen, 2003). Ce sont des neurones de type Dogiel I, appartenant à la classe électrophysiologique S.

Les neurones moteurs musculaires innervent les muscles longitudinaux et circulaires ainsi que la muqueuse musculée tout le long du tractus digestif. Ils peuvent être excitateurs ou inhibiteurs, et sécrètent donc des neurotransmetteurs responsables de la contraction ou de la relaxation des muscles. Ainsi, la transmission des neurones excitateurs est majoritairement

Etude bibliographique

cholinergique muscarinique et tachykinergique (SP et neurokinine A) (Furness, 2000). La transmission des neurones inhibiteurs est quant à elle principalement médiée par les neurotransmetteurs NO, VIP, ATP et potentiellement GABA, neuropeptide Y et monoxyde de carbone.

Les neurones sécrétomoteurs et vasomoteurs contrôlent les sécrétions d'eau et d'électrolytes et le débit sanguin, respectivement (Hansen, 2003). Les IPAN de la muqueuse, activés par des stimuli locaux, exercent un contrôle direct de ces neurones via la production d'Ach et VIP (Hansen et al., 1998). La plupart des neurones sécrétomoteurs et vasomoteurs ont leurs corps cellulaires situés dans le plexus sous-muqueux et peuvent être cholinergiques ou non. L'Ach sécrétée par les neurones cholinergiques agit sur les récepteurs muscariniques des cellules épithéliales de la muqueuse alors que les neurones non cholinergiques médient la plupart des réponses réflexes via la sécrétion de VIP.

De la même manière, les cellules endocrines sont directement innervées par des neurones cholinergiques qui contrôlent la production de 5-HT dans la lumière intestinale (Hansen, 2003). Ce 5-HT va ensuite pouvoir activer les IPAN et les afférences vagales extrinsèques (Gershon, 1999).

b- Rôles des neurones entériques

➤ **Contrôle de la motricité intestinale :**

La motricité digestive est un processus intégré qui va permettre le transport des aliments le long du tube digestif. Elle est due à l'automatisme des muscles lisses possible grâce aux cellules interstitielles de Cajal (CIC) et au réflexe péristaltique induit par le SNE.

La découverte de l'implication des CIC dans la motricité digestive a été possible après qu'il ait été montré que l'intestin continuait de présenter une activité rythmique même après la dénervation totale de l'intestin (Huizinga et al., 2000). De plus, il a été mis en évidence que les CIC isolées présentaient des contractions spontanées et un courant rythmique intérieur insensible aux bloqueurs calciques (Thomsen et al., 1998). Les CIC sont des cellules étoilées intercalées entre les couches musculaires lisses longitudinales et circulaires, accolées au plexus myentérique, qui forment un réseau grâce à leurs nombreuses ramifications. Leur distribution dépend de l'âge, de la région du tube digestif mais aussi de l'espèce (**Figure 33**). Elles forment des régions "pacemaker" responsables de la génération d'ondes électriques lentes (Ward et al., 2006). Elles interagissent avec les cellules musculaires lisses via l'établissement de GAP jonctions et possèdent les récepteurs aux neurotransmetteurs inhibiteurs tels que le VIP ou le NO ainsi que des récepteurs aux transmetteurs excitateurs comme les récepteurs muscariniques ou les récepteurs aux tachykinines (Hansen, 2003 ; Lee et al., 1999 ; Sanders et al., 1999). Une altération des CIC entraîne donc des altérations de la motricité intestinale, comme on peut retrouver chez les patients atteints de constipation associée à un transit lent ou avec un mégacolon (Camilleri, 2001).

L'intégrité neuronale est également essentielle au bon fonctionnement de la motricité digestive et implique les voies nerveuses intrinsèques et extrinsèques. Les neurones extrinsèques des systèmes sympathique et parasympathique influencent les muscles lisses indirectement en agissant sur les neurones des plexus myentériques. Toutefois, les neurones des plexus sous-muqueux peuvent également innerver les couches intérieures des muscles circulaires (Hansen, 2003). Les cellules musculaires lisses sont innervées par des centaines de neurones moteurs excitateurs et inhibiteurs.

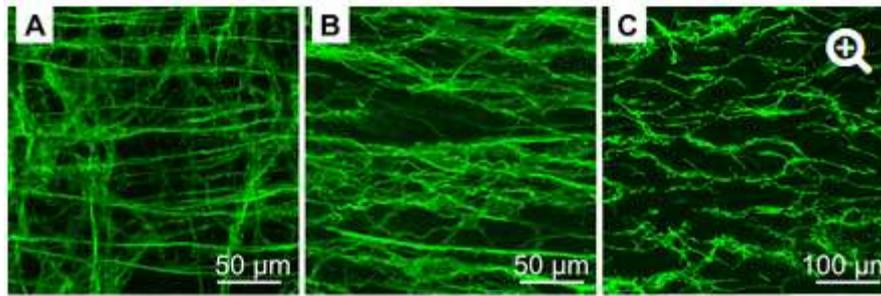


Figure 33 : Réseaux de cellules interstitielles de Cajal

Visualisation du marqueur c-Kit des cellules interstitielles de Cajal dans l'estomac de souris (A), de singe (B) et d'humain (C). (D'après Sanders et al., 2014)

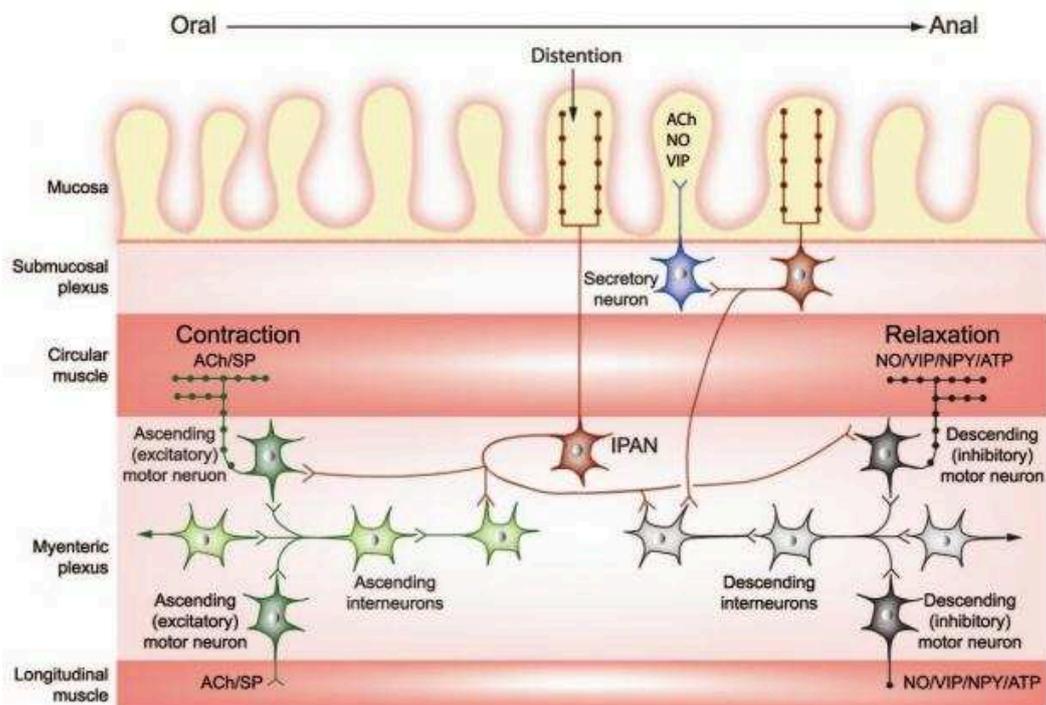


Figure 34 : Connexions neuronales impliquées dans les réflexes entériques locaux

Les neurones afférents primaires intrinsèques (IPAN) sont activés par exemple par une distension locale de la paroi intestinale. Ils peuvent être localisés au niveau des plexus myentérique ou sous-muqueux et ont des projections à la fois dans la direction orale ou anale. Ils font synapse avec les interneurons et les neurones moteurs. Le réflexe péristaltique comprend un réflexe excitateur ascendant médié par les neurones moteurs myentériques qui utilisent l'acétylcholine (ACh) et la substance P (SP) et provoquent une contraction des muscles circulaires et longitudinaux. Le réflexe inhibiteur descendant implique des neurones moteurs inhibiteurs qui utilisent l'oxyde nitrique (NO), le polypeptide intestinal vasoactif (VIP), le neuropeptide Y (NPY) et l'adénosine triphosphate (ATP) afin d'entraîner la relaxation des muscles. Ce réflexe est coordonné grâce aux interneurons cholinergiques qui reçoivent les informations des IPAN et les transmettent aux neurones moteurs excitateurs ou inhibiteurs. Les réflexes sécrétomoteurs et vasodilatateurs sont médiés par les neurones situés dans le plexus sous-muqueux qui libèrent ACh, VIP ou NO. (Benarroch, 2007)

Etude bibliographique

Ainsi, le réflexe péristaltique va permettre l'avancée du bol alimentaire grâce à une contraction du côté oral et une relaxation du côté anal (**Figure 34**). Il est initié par un stimulus au niveau de la lumière intestinale (distension locale de la paroi intestinale lors du passage des aliments, diminution du PH ou changement d'osmolarité, présence de certains nutriments...) qui vont activer les cellules endocrines. Celles-ci vont sécréter du 5-HT et activer les neurones sensitifs (IPAN), qui à leur tour vont transmettre l'information aux interneurones via la sécrétion de différents neurotransmetteurs (Ach, SP, calbindine, CGRP) (Furness, 2000). Les interneurones font synapse avec des neurones moteurs excitateurs ascendants responsables de la contraction des muscles du côté oral grâce à la production de neuromédiateurs tels que l'Ach et SP. De même ils sont connectés avec des neurones moteurs descendants inhibiteurs qui utilisent le NO, VIP, NPY ou l'ATP pour induire la relaxation des muscles du côté anal.

➤ **Contrôle des sécrétions intestinales :**

Les réflexes sécrétomoteurs sont initiés physiologiquement par une interaction chimique et mécanique avec le contenu luminal, mais peuvent également être induits en conditions pathologiques (par des toxines par exemple). Un des stimulus physiologique majeur pour la sécrétion dans l'intestin grêle semble être la présence d'une absorption active de nutriments, tel que le glucose (Kunze and Furness, 1999). Ce circuit réflexe est composé d'IPAN avec leurs terminaisons dans la muqueuse et d'un réseau intégré dans les plexus myentérique et sous-muqueux qui retransmet les informations aux neurones sécrétomoteurs ayant leurs corps cellulaires dans les ganglions sous-muqueux (**Figure 35**).

Les neurones non cholinergiques médient la plupart du temps ce réflexe en utilisant VIP et des tachykinines (SP par exemple) comme neurotransmetteurs primaires. Un des neurotransmetteurs secondaires impliqué dans la sécrétion est l'ATP libéré par la muqueuse qui provoque la sécrétion de chlorure après activation des récepteurs P2Y (Hansen, 2003). Le 5-HT produit par les cellules endocrines est également impliqué dans la sécrétion intestinale. En effet, il active les IPAN qui à leur tour activent les neurones sécrétomoteurs cholinergiques localisés dans les plexus sous-muqueux via les récepteurs nicotiniques et les récepteurs aux neurokinines (Hansen and Skadhauge, 1995). De la même manière les neurones cholinergiques sécrètent de l'Ach et VIP qui se lient ensuite à des récepteurs épithéliaux et stimulent la production d'ions chlorure dans la lumière intestinale tout en inhibant l'absorption de sodium (Hansen and Skadhauge, 1997). L'activité des neurones sécrétomoteurs peut être modulée par de nombreuses substances, telles que le PACAB (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) ou le glutamate (Kirchgessner, 2001 ; Tornøe et al., 2001).

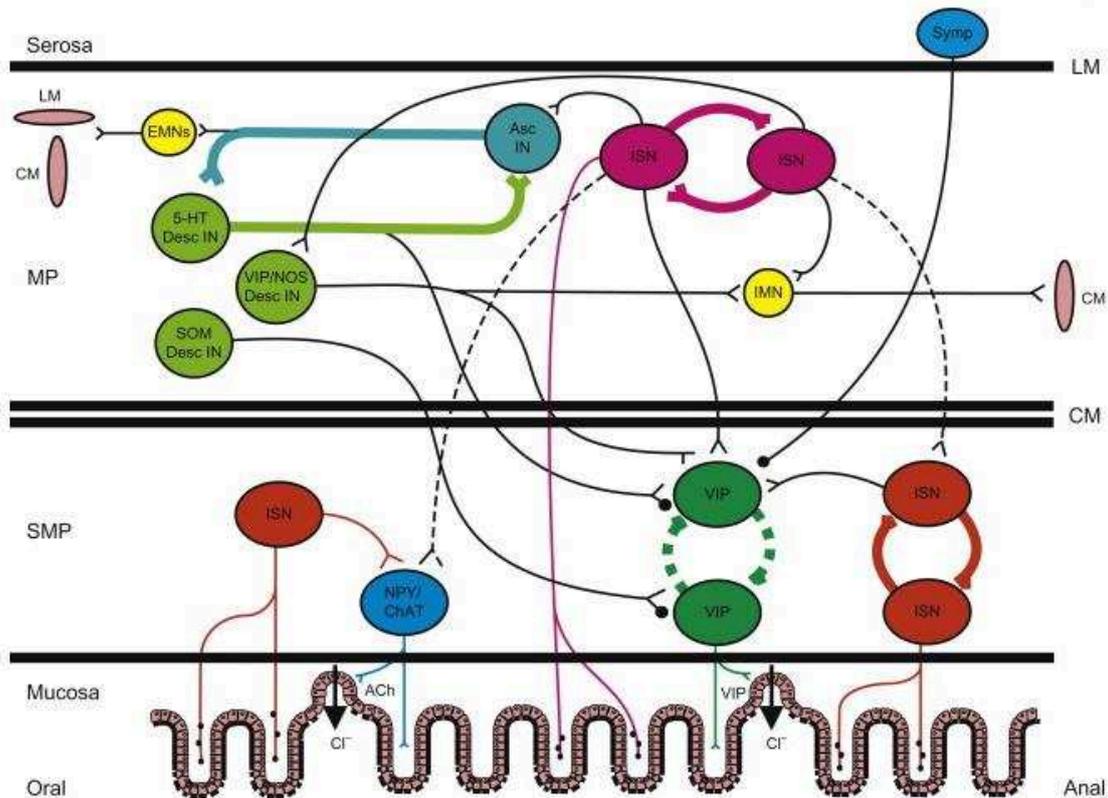


Figure 35 : Contrôle neuronal des sécrétions intestinales

Des stimuli chimiques ou mécaniques activent les IPAN (ISN en rouge et rose) qui à leur tour activent des réseaux neuronaux dans le plexus myentérique (Interneurones ascendants en bleu clair, Interneurones descendants en vert clair, Neurones moteurs excitateurs ou inhibiteurs en jaune) ou activent directement les neurones sécrétomoteurs cholinergiques (en bleu foncé) et non cholinergiques (en vert foncé). Via la production de VIP et ACh, les neurones sécrétomoteurs stimulent la sécrétion d'ions chlorure dans la lumière intestinale. (Bornstein et al., 2012)

➤ Contrôle du flux sanguin :

Le flux sanguin est contrôlé à la fois par des neurones extrinsèques et intrinsèques. Ainsi, les vaisseaux sont innervés par des fibres vasoconstrictrices sympathiques et vasodilatatrices parasympathiques (Hansen, 2003). La vasoconstriction des artéioles est contrôlée par les fibres nerveuses extrinsèques sympathiques qui produisent majoritairement de l'ATP qui active P2X (Evans and Surprenant, 1992 ; Vanner and Surprenant, 1996). A l'inverse, la vasodilatation est contrôlée par une innervation extrinsèque provenant des ganglions rachidiens (qui libèrent SP et CGRP) et par une innervation intrinsèque grâce au SNE (Vanner, 1994 ; Vanner and Surprenant, 1991). En effet, on retrouve de nombreux capillaires au niveau des plexus myentérique et sous-muqueux, connectés fonctionnellement au SNE. Ainsi les neurones sous-muqueux sont les effecteurs primaires vasomoteurs et leur excitation entraîne une vasodilatation et donc une augmentation du débit vers la muqueuse (Hansen et al., 1998). Au niveau de l'intestin grêle les neurones cholinergiques produisent de l'ACh qui se fixe aux récepteurs muscariniques des cellules endothéliales. Celles-ci vont alors produire du NO qui diffuse dans les muscles lisses vasculaires et entraîne la relaxation et la vasodilatation (Andriantsitohaina and Surprenant, 1992). Il a également été mis en évidence au niveau du colon une implication des neurones non cholinergiques par la libération de VIP et SP

Etude bibliographique

(Vanner and Surprenant, 1991). De plus, les neurones afférents servent de senseur et régulent le flux sanguin par la production de substances neuroendocrines. L'augmentation du flux sanguin local résulte d'une activation des synapses inhibitrices des ganglions myentériques et sympathiques et de l'activation synaptique des neurones sous-muqueux VIPergiques (Hansen, 2003).

➤ Contrôle des fonctions de la BEI :

Le rôle des neurones entériques dans le renforcement des fonctions de la BEI a été démontré dans de nombreuses études, du fait de leur étroite proximité avec l'épithélium : en effet, la muqueuse est très innervée par des neurones sous-muqueux et myentériques (**Figure 36**). Il a par exemple été montré chez le cochon d'inde que chaque villosité était innervée par 70 à 92 neurones sous-muqueux, et des niveaux similaires d'innervation ont également été reportés chez l'Homme (Neunlist et al., 2003 ; Song et al., 1995). Les axones qui innervent la muqueuse intestinale contiennent un large éventail de neuromédiateurs, tels que l'Ach, le VIP ou encore la SP. Ainsi, les neurones entériques sont capables de réguler la perméabilité paracellulaire de la BEI, ainsi que la prolifération/différenciation des CEI.



*Coupe transverse d'intestin grêle de souris marqué au PGP9.5 (neurones, rouge) et DAPI (bleu) révélant des neurones entériques principalement autour des cryptes épithéliales.
(D'après Neunlist et al., 2013)*

Figure 36 : Les neurones entériques sont retrouvés à proximité de la barrière épithéliale intestinale

Contrôle de la perméabilité

L'implication du contrôle nerveux dans la régulation de la perméabilité intestinale a notamment été mis en évidence par une étude démontrant qu'une stimulation électrique des racines sacrées entraînait une diminution de la perméabilité paracellulaire (Meurette et al., 2012). De plus, il a été montré avec un modèle de coculture de CEI et de sous-muqueuse humaine contenant le plexus sous-muqueux qu'une stimulation électrique de ce réseau neuronal entraînait une diminution de la perméabilité et une augmentation de l'expression de la protéine ZO-1 via une activation VIPergique (Neunlist et al., 2003).

Plusieurs neurotransmetteurs sont capables de réguler la perméabilité intestinale. Ainsi, il a été montré que l'Ach augmentait la perméabilité paracellulaire et transcellulaire, et que la SP augmentait la perméabilité paracellulaire (Boudry et al., 2011 ; Cameron and Perdue, 2007 ; Neunlist et al., 2013). De plus, une augmentation de la perméabilité induite par une séparation maternelle est associée à une augmentation de l'expression de ChAt et peut être empêchée par un traitement avec des antagonistes muscariniques et nicotiques (Gareau et al., 2007). Enfin, une perfusion avec de la neurokinine A induit une augmentation rapide de la perméabilité chez des rats (Hällgren et al.,

1998). A l'inverse, le VIP est reconnu comme un neuromédiateur clé impliqué dans le maintien des fonctions de la BEI, et diminue la perméabilité paracellulaire (Conlin et al., 2009).

Contrôle de la prolifération/différenciation

De la même manière, les neurones entériques sont capables de réguler la prolifération et la différenciation des CEI via la sécrétion de neuromédiateurs. Il a par exemple été montré que les effets bénéfiques de GLP-2 (glucagon-like peptide 2) sur la croissance et la réparation de l'épithélium étaient médiés par l'activation des neurones entériques *in vivo* (Bjerknes and Cheng, 2001). De plus, les neurones entériques ont un effet anti-prolifératif sur les CEI via la sécrétion de VIP, d'Ach ou de SP (Cheng et al., 2008 ; Goode et al., 2003 ; Toumi et al., 2003). Enfin, les neurones entériques favorisent la croissance et le turnover de l'épithélium muqueux intestinal via la production de 5-HT (Gross et al., 2012).

6) Les cellules gliales entériques

a- Origine et localisation

La première observation des CGE a été reportée par Dogiel en 1899, qui décrivait alors des cellules satellites nucléées à proximité des neurones entériques (Dogiel, 1899). Pendant les 70 années qui ont suivies, elles ont été considérées comme des cellules de Schwann non myélinisées et il a fallu attendre le début des années 1970 pour que Gabella les considère comme un type de cellules gliales à part différent de celles retrouvée ailleurs dans le système nerveux périphérique (Gabella, 1972). Elles possèdent des caractéristiques structurales uniques, avec de longues excroissances lamellaires qui s'étendent jusqu'aux neurones et recouvrent les axones (Gabella, 1981). On les distingue des cellules de Schwann d'un point de vue morphologique par leur forme beaucoup plus irrégulière, semblable à celle des astrocytes du SNC (Gershon and Rothman, 1991). Les CGE communiquent entre elles par des GAP jonctions, leur permettant de former un véritable réseau fonctionnel (Hanani et al., 1999). Historiquement, ces cellules étaient supposées être des éléments nutritifs ou de soutien pour les neurones entériques, et leur rôle physiologique dans l'intestin avait été peu étudié. Cependant, plusieurs études récentes suggèrent qu'elles pourraient jouer un rôle actif dans les états physiologiques et pathologiques du tube digestif (ruhl, 2005).

Les CGE sont environ 3 à 4 fois plus nombreuses que les neurones, mais leur densité varie en fonction de l'espèce et de leur localisation dans le tube digestif (Gabella and Trigg, 1984). La majorité des CGE est retrouvée au niveau des plexus myentérique et sous-muqueux mais on les retrouve également au niveau des fibres nerveuses interconnectées des ganglions et des plexus aganglionnaires où elles représentent les seuls éléments cellulaires (Gershon and Rothman, 1991) (**Figure 37**). Les CGE sont également retrouvées à proximité d'autres types cellulaires (cellules épithéliales ou cellules endothéliales par exemple) à des distances de l'ordre du μm , permettant une communication paracrine.

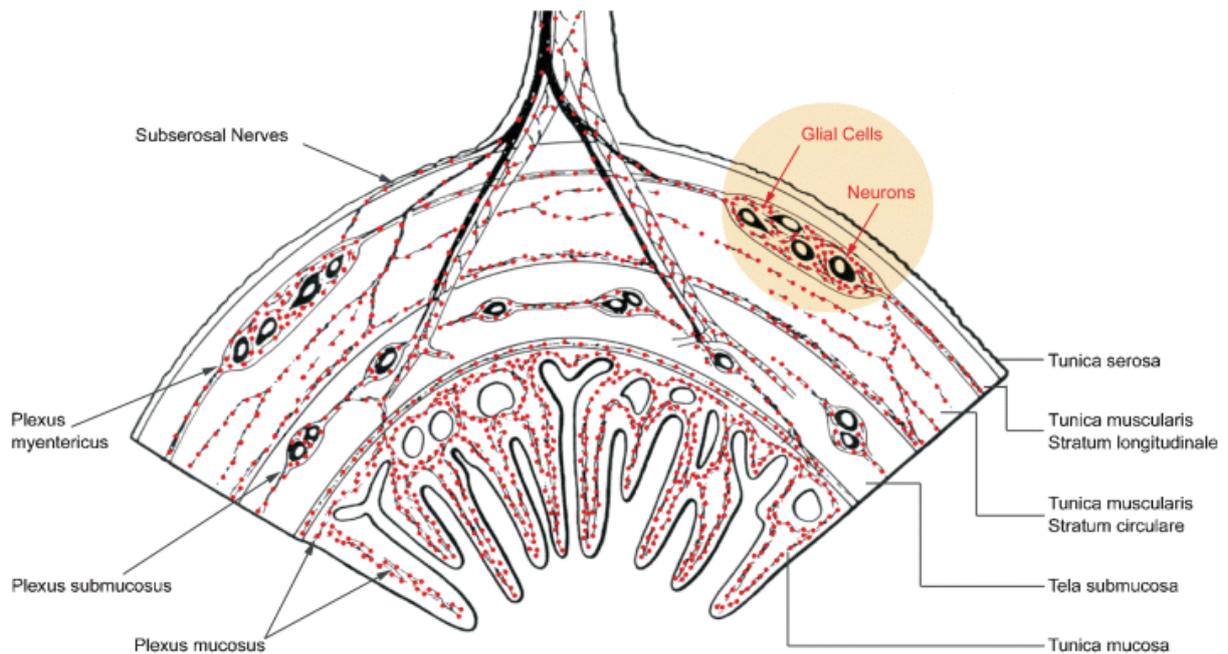


Figure 37 : Localisation des cellules gliales entériques dans l'intestin

Les cellules gliales entériques forment un large réseau répandu dans toutes les couches de la paroi digestive, de la muqueuse à la séreuse. Elles sont représentées par les points rouge sur cette représentation schématique de coupe transversale d'intestin. (ruhl, 2005)

b- Développement

Les CGE dérivent des cellules progénitrices de la crête neurale qui migrent dans le sens rostro-caudal avant de donner naissance aux précurseurs neuronaux et gliaux (voir partie III. 2) (**Tableau I**). La glie entérique dérive d'une population pluripotente de précurseur dont la différenciation terminale se produit dans l'intestin lui-même. Chez la souris, le précurseur glial apparaît le plus tôt au jour embryonnaire 11.5 (Young et al., 2003). Elles suivent la vague de migration des neurones entériques et ne semblent pas impliquées dans leur différenciation (Heanue and Pachnis, 2007).

Type cellulaire	Marqueurs associés
ENCC (cellules progénitrices)	Sox10 + EDNRB + RET + Phox2B +
Neurones entériques	RET + PHOX2B + Tuj1 + HuC/D + Sox10 -
CGE primaires	Sox10 + B-FABP + S100β + RET - Phox2B très bas
CGE matures	Sox10 + S100β + GFAP +

Tableau I : Principaux marqueurs de différenciation des neurones et de la glie entérique

Etude bibliographique

Les précurseurs gliaux sont soutenus par différents gènes et facteurs dont la neurotrophine 3 (NT-3) qui active le récepteur tyrosine kinase TrkC (Chalazonitis, 2004). Les effets de NT-3 sont régulés par les protéines BMP (Chalazonitis et al., 2004). Le développement glial est également favorisé par le CNTF (ciliary neurotrophic factor) qui agit sur la sous-unité α du récepteur CNTFR, et le LIF (leukemia inhibitory factor) qui agit sur la sous-unité β du même récepteur, aussi appelée LIFR β (Chalazonitis et al., 1998). De la même manière, les neurégulines (NRG) appartenant à la superfamille des facteurs de croissance épidermiques (EGF) sont essentielles au développement glial. Ces molécules dérivant des neurones interagissent avec le récepteur tyrosine kinase transmembranaire erbB3 et son corécepteur erbB2 (Marchionni et al., 1993). Le facteur de croissance glial est une isoforme soluble NRG1 qui supprime fortement la différenciation neuronale tout en favorisant la différenciation gliale périphérique, dont les CGE (Shah, 1994). La protéine Lgi4 et son récepteur ADAM22 sont aussi impliqués dans la prolifération et la différenciation des CGE (Nishino et al., 2010). De même, les facteurs de transcription Sox10 et Sox8 ont un rôle vital dans la différenciation gliale. Il a en effet été montré que les souris déficientes pour le gène Sox10 n'avaient pas de glie périphérique, et donc pas de CGE (Britsch, 2001 ; Paratore et al., 2001). De plus, les effets néfastes d'une hétérozygotie pour le gène codant pour Sox10 sont aggravés par des mutations de Sox8, suggérant que ce dernier serait un gène modificateur de Sox10 (Maka et al., 2005). Comme Sox10 contrôle l'expression de erb3 dans les cellules de la crête neurale, son ablation mime une délétion de NRG1/erbB3.

c- Morphologie et marqueurs

Les CGE sont des petites cellules étoilées avec de nombreux prolongements de taille et de forme variée (Hanani and reichenbach, 1994). Au niveau des fibres nerveuses les prolongements des CGE entourent les faisceaux axonaux et au niveau des ganglions les CGE sont retrouvées serrées autour des neurones avec un espace extracellulaire composé d'espaces étroits de 20 nm (Barthel and Markwardt, 1975 ; Cook and Burnstock, 1976). Contrairement aux cellules de Schwann qui sont recouvertes de laminine sur toute leur surface, les CGE ne semblent pas synthétiser de lame basale. Elles sont pour la plupart dépourvues de laminine et n'entrent en contact avec cette protéine que lorsque leurs extrémités sont à la base de la lame basale périganglionique (Bannerman et al., 1986). De plus, leur structure interne est caractérisée par une forte concentration et un emballage dense de filaments intermédiaires de 10 nm appelés "glio-filaments" (Komuro et al., 1982). Ceux-ci se croisent dans la cellule et forment des faisceaux axiaux dans les prolongements qui semblent ancrer fermement les CGE aux surfaces ganglionnaires (Gabella, 1981). Ainsi, les CGE expriment fortement la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), une protéine associée aux filaments intermédiaires de la glie (Anderton, 1981). En plus de la GFAP, il existe de nombreux autres marqueurs des CGE, dont les plus connus sont S100 β et Sox10 (**Figure 38**). Il est toutefois important de noter que l'expression d'un marqueur unique ne suffit pas à identifier les CGE, du fait de la modulation de leur expression par de nombreux facteurs.

Etude bibliographique



Figure 38 : Les marqueurs principaux des cellules gliales entériques

Immunomarquages de CGE de plexus myentérique de rat en culture avec des anticorps spécifiques de la GFAP (A), S100 β (B) et SOX10 (C). (D'après Soret et al., 2013)

Les CGE matures, tout comme les astrocytes centraux, expriment de fort taux de GFAP (Jessen and Mirsky, 1980). Cependant, ce marqueur ne permet pas de faire une distinction nette entre la glie intrinsèque et extrinsèque puisqu'elle peut également être induite dans les cellules de Schwann non myélinisantes (Feinstein et al., 1992). Il a toutefois été montré que les CGE semblaient exprimer la même isoforme de la GFAP que celle exprimée par les astrocytes, tandis que celle exprimée par les cellules de Schwann non myélinisantes est un polypeptide différent (Jessen and Mirsky, 1985). Plusieurs études ont démontré une augmentation de l'expression de la GFAP dans des conditions d'inflammation systémique après l'administration de LPS à des rats, et des altérations de son expression sont également observées chez les patients atteints de MICI (da Cunha Franceschi et al., 2017 ; Rosenbaum et al., 2016).

Les protéines S100 sont de petites protéines de liaison de calcium. Les protéines S100 gliales sont localisées dans le cytoplasme où elles régulent la fonction et la structure du cytosquelette ainsi que l'homéostasie calcique (Heizmann, 2002). Cependant, elles peuvent aussi être sécrétées. Au niveau du tractus gastrointestinal, on considère que la protéine S100 β est principalement retrouvée au niveau de la glie (Ferri et al., 1982). Toutefois, il a été montré que les protéines S100 étaient exprimées par de nombreux autres types cellulaires tels que les oligodendrocytes, des cellules musculaires, des neurones et des cellules gliales du SNC ou encore les myofibroblastes (Arcuri et al., 2002 ; Hachem et al., 2005 ; Rickmann and Wolff, 1995 ; Sorci et al., 1999 ; Vives et al., 2003). De plus, de nombreux membres de la superfamille des protéines S100 sont exprimés par plusieurs tissus humains normaux et néoplasiques, d'origine épithéliale en particulier (Gonzalez-Martinez et al., 2003).

Sox10, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des CGE, est aussi considéré comme un marqueur majeur des CGE (Hoff et al., 2008). Les CGE peuvent également être identifiées par d'autres marqueurs. Parmi eux on retrouve la Glutamine Synthétase (GS), l'antigène de surface Ran-2 ou encore la protéine B-FABP (Brain-specific Fatty Acid Binding Protein) (Jessen and Mirsky, 1983 ; ruhl, 2005 ; Young et al., 2003). De plus, les CGE sont riches en vimentine, mais cette protéine n'est pas spécifique des CGE car elle est aussi exprimée par les myofibroblastes (Ruhl et al., 2001).

Plus récemment, il a été montré que les CGE de l'intestin adulte de souris exprimaient la protéine protéolipide 1 (PLP1), une protéine connue pour être exprimée par les oligodendrocytes du SNC en tant que composant majeur de la myéline (Rao et al., 2015). Les CGE étant des cellules non myélinisées, PLP1 pourrait jouer un rôle dans l'organisation de microdomaines de signalisation afin de rassembler des protéines spécifiques entre elles. L'expression de PLP1 semblait restreinte aux CGE

Etude bibliographique

dans l'intestin adulte. Dans cette étude, il a également été montré que certains sous-types de CGE intramusculaires et retrouvées dans la muqueuse et la sous-muqueuse n'exprimaient pas GFAP, mais exprimaient S100 β et PLP1. L'identification de nouveaux marqueurs comme PLP1, spécifique des CGE, pourrait ainsi permettre d'envisager de nouvelles stratégies afin d'isoler spécifiquement les CGE puisque les autres marqueurs les plus exprimés par les CGE tels que GFAP, S100 β ou Sox10 ne sont jamais entièrement spécifiques des CGE.

d- Les différents types de cellules gliales entériques

Grâce à l'utilisation de souris mosaïques, 4 sous-populations distinctes de CGE ont été identifiées, basées sur leurs différences morphologiques et sur leur localisation (Boesmans et al., 2015) (Figure 39).

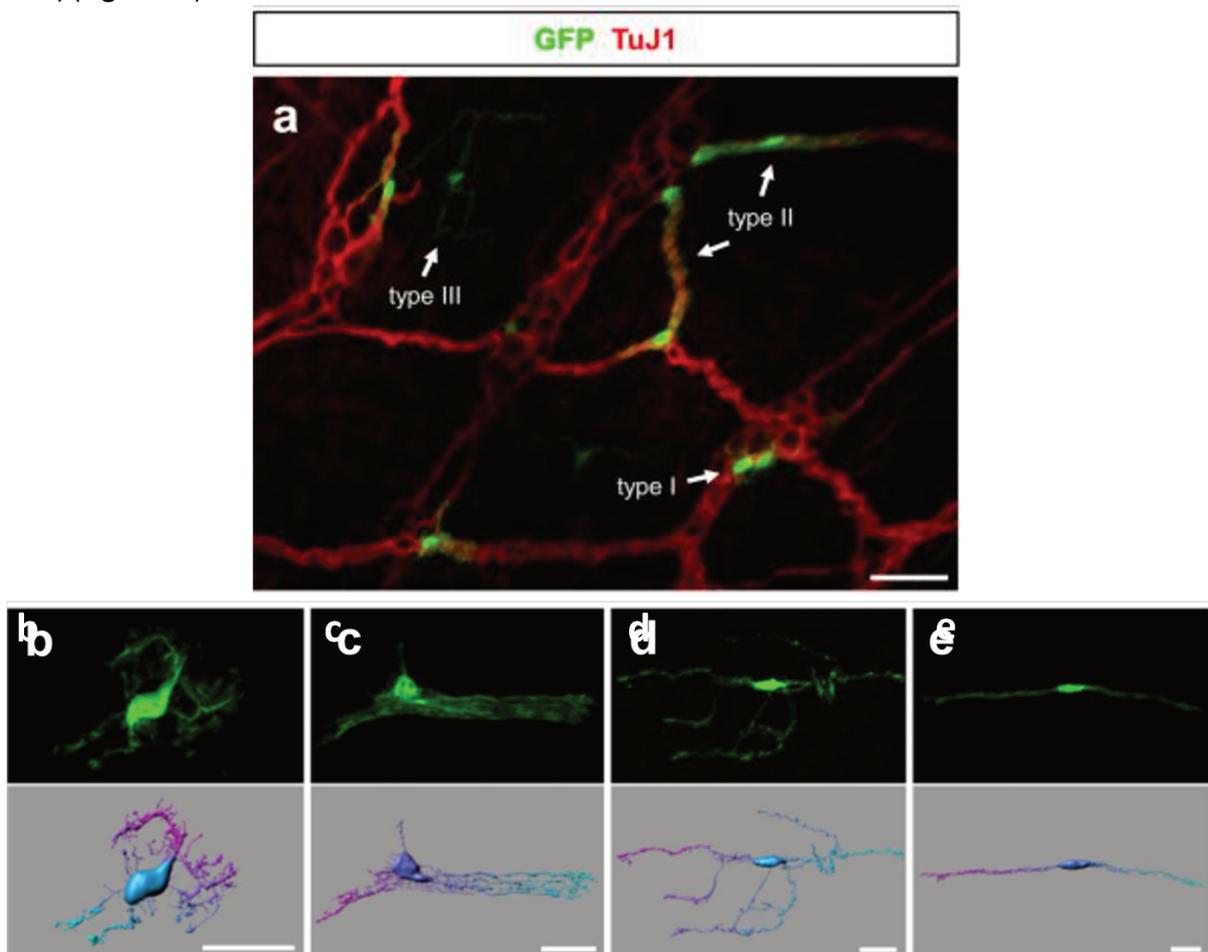


Figure 39 : Les différents types de cellules gliales entériques

(a) Marquage des CGE exprimant la GFP (vert) au sein des ganglions et au niveau des fibres interganglionnaires (marquage neuronal Tuj1 en rouge). (b-e) Projections maximales déconvoluées (haut) et reconstruction 3D (bas) des type I (b), type II (c), type III (d) et type IV (e) de CGE. Echelle (a) 50 μ m et (b-e) 20 μ m. (D'après Boesmans et al., 2015)

Ainsi les cellules de type I ou protoplasmique (aussi appelé "astrocyte-like") sont caractérisées par un gros corps cellulaire et des petits prolongements qui partent dans tous les sens, et sont retrouvées au niveau des ganglions myentérique et sous-muqueux. Les CGE de type II ou

Etude bibliographique

fibreuses sont retrouvées dans les fibres interganglionnaires et sont caractérisées par des prolongements longilignes qui émergent principalement d'un seul côté de la cellule, parallèles entre eux et parallèles aux fibres neuronales des connexions inter ganglionnaires. Le type III correspond à des CGE possédant 4 prolongements majeurs avec des ramifications secondaires. Il en existe deux sous-types : celles retrouvées au niveau des plexus myentérique et sous-muqueux, mais pas au niveau des ganglions ni des fibres interganglionnaires, et celles retrouvées dans la muqueuse. Elles sont néanmoins associées aux fibres nerveuses et entourent généralement des petits vaisseaux sanguins. Enfin, les CGE de type IV sont des cellules allongées le long des fibres musculaires circulaires et longitudinales.

Généralement, les cellules GFAP-/S100 β + sont surtout des cellules de type II et III, et la majorité des cellules qui expriment S100 β coexpriment également Sox10. Il est important de noter qu'aucun de ces trois marqueurs ne permet d'identifier un type de CGE en particulier. De plus, même si l'expression globale de GFAP reste la même dans les ganglions myentériques, l'expression individuelle de la GFAP par une CGE varie considérablement au cours du temps.

e- Rôles des cellules gliales entériques

Longtemps considérées comme de simples éléments de soutien pour les neurones entériques, les CGE sont désormais considérées comme des acteurs majeurs de l'homéostasie intestinale (Gulbransen and Sharkey, 2012). Ainsi, outre leur rôle neuroprotecteur, la proximité des CGE avec d'autres types cellulaires a fait d'elles un sujet d'étude croissant ces dernières années.

Dans cette partie, seul le contrôle glial des neurones entériques, des mécanismes immunitaires, de la motricité et des cellules endothéliales sera abordé. Le contrôle des CEI et des fonctions de la BEI par les CGE sera détaillé dans la partie IV.

➤ Contrôle des neurones entériques :

Rôle de soutien

Le premier rôle à avoir été attribué aux CGE était le rôle de support afin d'englober et de maintenir les structures du SNE ensemble, ce qui leur a d'ailleurs valu leur nom (glia dérive du mot grec "glue") (Ruhl, 2005). Ainsi, les CGE stabilisent la structure du SNE via leur ancrage ferme à la surface des ganglions et aux fibres nerveuses grâce à leurs filaments intermédiaires (Gabella, 1990) (**Figure 40**).

De plus, les CGE répondent activement aux stimulations mécaniques via une augmentation de l'expression du gène *c-fos* en parallèle d'une augmentation du niveau de calcium intracellulaire et de la propagation intercellulaire des ondes calciques (Sharkey et al., 1999 ; Zhang et al., 2003). Cela suggère que les CGE s'adaptent en permanence aux déficiences structurelles et métaboliques résultant d'un stress mécanique dans la paroi intestinale.

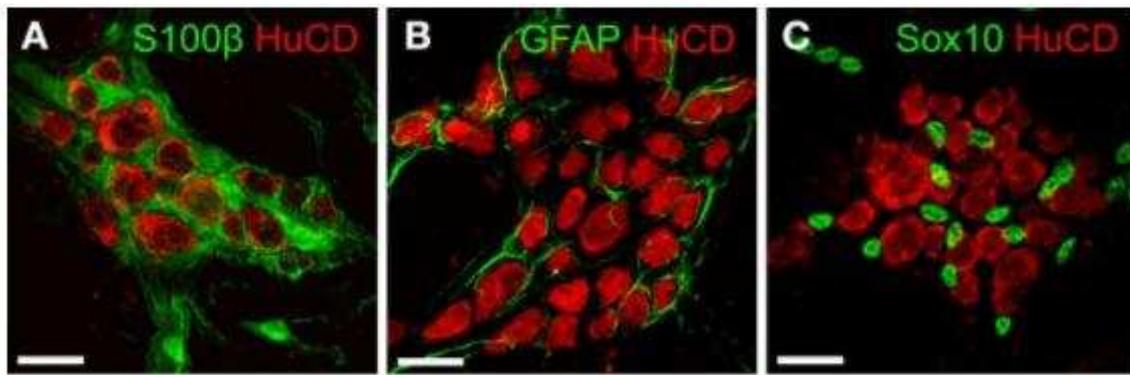


Figure 40 : Interactions entre les neurones entériques et les CGE

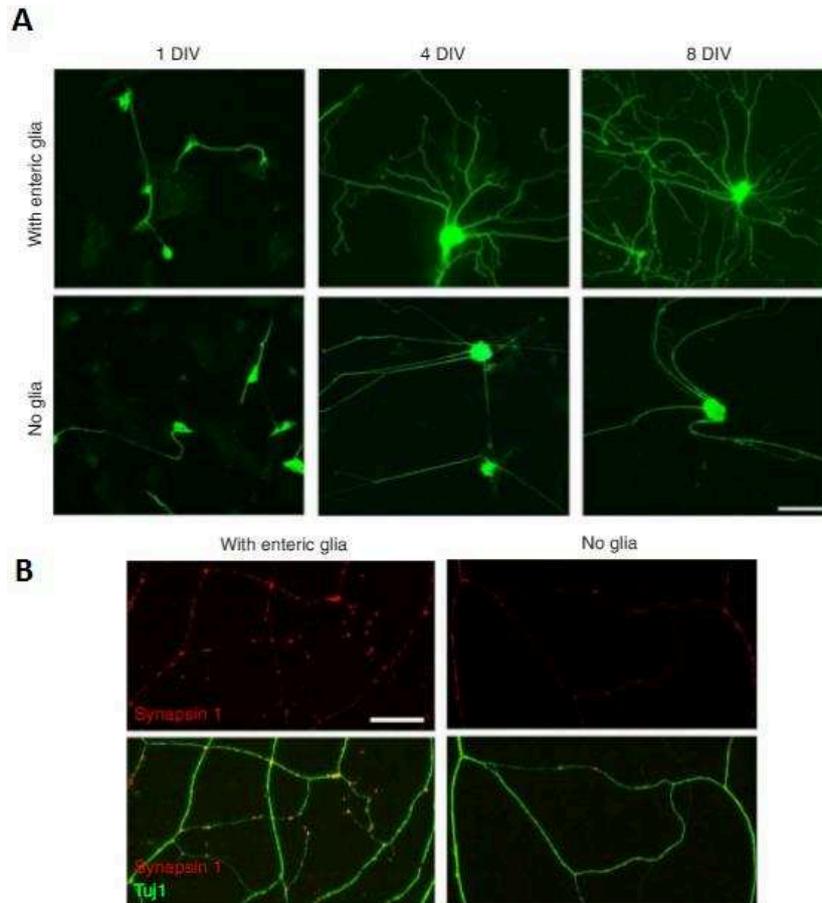
Ganglions myentériques de colons de souris. Les neurones apparaissent en rouge pour le marqueur HuCD et les CGE apparaissent en vert pour les marqueurs S100 β (A), GFAP (B) et Sox10 (C). (D'après Boesmans et al., 2013)

Contrôle de la survie neuronale

Le contrôle glial de la survie neuronale a été mis en évidence grâce à un modèle génétique de délétion gliale. Il a ainsi été montré chez des souris exprimant la thymidine kinase du virus Herpes simplex sous le promoteur de la GFAP qu'une ablation gliale induite par l'injection sous-cutanée d'un agent antiviral entraînait une dégénérescence des neurones myentériques (Bush et al., 1998). De la même manière il a été montré *in vitro* avec des modèles de culture primaire que les CGE augmentaient la survie neuronale et diminuaient la mort induite par un stress oxydatif (Abdo et al., 2010). En effet, les CGE matures produisent des facteurs neurotrophiques tels que le GDNF (glial-derived neurotrophic factor) et la NT-3 (Bar et al., 1997 ; Hoehner et al., 1996). Plus récemment, d'autres médiateurs gliaux comme le 15dPGJ2 et la glutathionne ont été identifiés comme ayant des effets neuroprotecteurs (Neunlist et al., 2014). De même, la forme sécrétée de la protéine S100 β pourrait jouer un rôle sur la survie et l'apoptose des neurones, ainsi que sur l'extension de leurs neurites (Donato et al., 2009). Enfin, une étude qui vient d'être publiée a mis en évidence l'importance des CGE dans le développement neuronal via des voies purinergiques et dépendantes du GDNF (Le Berre-Scoul et al., 2017). Ces résultats ont ainsi montré que les CGE façonnent la complexité axonale et la densité des synapses des neurones entériques (**Figure 41**).

De plus, les CGE, tout comme les astrocytes du SNC, créent un microenvironnement local protecteur pour les neurones en tamponnant le milieu extracellulaire via la capture de cations (Rühl et al., 2004). En particulier, durant l'activité neuronale, de grandes quantités d'ions potassium K⁺ sont relarguées dans l'espace extracellulaire où ils peuvent affecter la cinétique des canaux ioniques et la transmission synaptique. Ainsi, les ions K⁺ ont besoin d'être éliminés rapidement et efficacement, et il a été montré dans le SNC que les astrocytes pourraient participer à leur recapture (Hertz, 1965). De la même manière dans le SNE les CGE expriment des canaux potassiques entrants et sortants voltage-dépendants, et pourraient donc empêcher l'accumulation d'ions K⁺ (Hanani et al., 2000).

Etude bibliographique



(A) Neurons entériques marqués par Tuj1, cultivés en présence ou non de CGE, à 1, 4 et 8 DIV.
Echelle = 40 μ m.

(B) Double marquage synapsine 1 (rouge) et Tuj1 (vert) de neurones entériques cultivés en présence ou non de CGE.
Echelle = 20 μ m.

(D'après Le Berre-Scoul et al., 2017)

Figure 41 : Les CGE contrôlent le développement neuronal

Contrôle de la neurotransmission

De la même manière, les CGE participent à la synthèse et/ou à l'inactivation de neurotransmetteurs, et participent à la transmission synaptique. Les premières preuves viennent d'études immunohistologiques qui ont montré que seules les CGE exprimaient la Glutamine Synthase (GS) au sein du SNE de nombreux mammifères, dont l'Homme (Jessen and Mirsky, 1983 ; Kato et al., 1990). En effet, la GS catalyse la conversion du glutamate et de l'ammoniac en l'acide aminé inoffensif qu'est la glutamine. Ainsi, les CGE joueraient un rôle dans les voies de signalisation glutamatergiques par une détoxification de l'ammoniac résiduel et la production neuronale de glutamate. De plus, les CGE serviraient de source de glutamine pour les neurones entériques afin de leur permettre la production neuronale de glutamate et de GABA (l'Acide Gamma Amino-Butyrique) (Galligan et al., 2000). De la même manière, le transporteur à haute affinité du GABA, GAT-2, est exprimé par les CGE, ce qui pourrait suggérer qu'elles sont impliquées dans la détoxification GABAergique (Fletcher et al., 2002). Les CGE sont également impliquées dans la transmission neuropeptidergique via l'inactivation et l'élimination de neuropeptides, par exemple grâce à l'expression du transporteur PEPT2 qui permet de capter rapidement les produits de dégradation de dipeptides neuronaux (Rühl et al., 2005 B). De même, les CGE participent à la neurotransmission nitreurgique puisque la L-arginine, le précurseur essentiel du NO, est uniquement retrouvée dans les CGE (Nagahama et al., 2001). Il a aussi été montré chez des souris exprimant l'hémagglutinine (HA) dans la glie que la délétion gliale induite par l'injection de cellules T CD8+ spécifiques de HA

Etude bibliographique

provoquait une diminution de la proportion des neurones produisant VIP et SP dans le plexus sous-muqueux (Aubé et al., 2006). Au niveau du plexus myentérique, cette délétion entraînait une augmentation des neurones ChAt et une diminution des neurones NOS. Enfin, les CGE sont impliquées dans la signalisation nucléotidique, puisqu'il a notamment été montré que l'ecto-nucléotidase NTPDase2 était uniquement localisée à la surface des CGE (Braun et al., 2004). Ces résultats suggèrent que les CGE seraient impliquées dans le contrôle de la disponibilité des agonistes purinergiques ATP et ADP. De plus, les CGE expriment des récepteurs purinergiques, tel que le P2X7 (Vanderwinden et al., 2003). De même, les CGE peuvent être activées par différents neuroligands via une augmentation du calcium intracellulaire ou de l'expression du gène *c-fos* (Kimball and Mulholland, 2002). Parmi les molécules activant ainsi les CGE, on retrouve la sérotonine, les membres de la famille de l'endothéline ou encore des molécules comme l'histamine (ruhl, 2005 ; Zhang et al., 1997). De même, une stimulation du centre vagal entraîne une augmentation de l'expression de Fos via des récepteurs nicotiques à l'Ach dans les CGE d'estomac de rat (Miampamba et al., 2001). Enfin, il a été démontré que les CGE du plexus myentérique de colons de souris et de rat exprimaient des α 2a-adrenocepteurs (Nasser et al., 2006).

➤ Implication dans les mécanismes immunitaires :

Les CGE représentent un composant crucial du système immunitaire de défense de la muqueuse intestinale, et plusieurs observations suggèrent que la glie entérique est activée spécifiquement et participe activement au développement de l'inflammation intestinale.

En particulier, une augmentation de l'activation gliale est observée grâce à une augmentation de l'expression de Fos dans des modèles de colites induits par la formaline chez le rat ou par l'acide acétique chez le cochon d'inde (Miampamba and Sharkey, 1999 ; Sharkey et al., 1999). Le même type d'activation est retrouvé *in vitro* après un traitement à l'IL-1 β (Tjwa et al., 2003). De plus, les CGE répondent à des stimuli immunitaires en produisant l'IL-1 β , le TNF α et l'IL-6 (Rühl et al., 2001 and 2005). Des études fonctionnelles indiquent que l'IL-1 β agit à travers les récepteurs de l'IL-1 afin d'améliorer la production gliale d'IL-6 qui, à son tour, va jouer un rôle de feedback afin d'inhiber sa propre sécrétion. A l'inverse, on connaît peu les mécanismes sous-jacents à l'expression gliale d'IL-1 β ou de TNF α . L'impact de l'inflammation sur les propriétés phénotypiques et fonctionnelles des CGE sera abordé plus en détail dans la partie traitant des MICI (**V. 3 b**).

De la même manière, l'interaction fonctionnelle des CGE avec le système immunitaire a été confirmé par des études *in vitro* qui ont démontré la capacité de phagocytose et l'expression induite par certaines cytokines de CMH II et d'ICAM-1 par les CGE. En outre, la stimulation de la glie entérique avec un mélange de TNF α et d'IFN γ en présence d'un antigène spécifique suivi d'une culture avec des lymphocytes T spécifiques de cet antigène induit une augmentation de la prolifération des lymphocytes T, qui peut être supprimée par des anticorps neutralisants anti-CMH II (Hollenbach et al., 2000). Cornet et al. avaient également démontré que des CGE génétiquement modifiées exprimaient un neo-antigène via leurs CMH I aux lymphocytes T autoréactifs CD8+, ce qui engendrait leur apoptose (Cornet et al., 2001). Les CGE sont également capables d'exprimer des TLR, notamment le TLR4 impliqué dans la perception de bactéries (Barajon et al., 2009). Il a d'ailleurs été montré que le microbiote était nécessaire au bon développement des CGE, et qu'il contrôlait l'influx de CGE dans la lamina propria (Kabouridis et al., 2015). Enfin, il a récemment été montré que les CGE stimulaient la production d'IL-22 par des cellules lymphoïdes innées via la production de

neurorégulateurs (GDNF par exemple), participant ainsi aux mécanismes de défense intestinaux (Ibiza et al., 2016).

➤ **Contrôle de la motricité**

Contrairement aux neurones capables de générer des potentiels d'action, les CGE ne présentent que des courants "passifs", ce qui en fait des cellules non excitables électriquement (Hanani et al., 2000). Cependant, l'excitabilité des CGE est médiée par des signaux cytosoliques calciques qui peuvent être transmis aux CGE voisines de manière autocrine/paracrine (Zhang et al., 2003). En effet, les CGE relarguent notamment de l'ATP via leurs GAP jonctions, composées de Cx43, qui vont activer les cellules environnantes (on parle alors de "flux calciques"). Il a par exemple été montré que l'ATP et l'ADP augmentaient la concentration de calcium intracellulaire de CGE cultivées, et qu'une stimulation électrique du SNE *in situ* avait le même effet, indiquant une signalisation neuro-gliale fonctionnelle (Gulbransen and Sharkey, 2009 ; Kimball and Mulholland, 2002). Il a ainsi été montré que l'excitabilité des CGE était nécessaire à la motricité intestinale. Ainsi, interférer avec la signalisation calcique gliale grâce à une ablation des Cx43 gliales réduisait la contraction des muscles lisses *ex vivo* et réduisait la motilité intestinale et le transit *in vivo* (McClain et al., 2014 and 2015). Cette étude a également démontré qu'une stimulation électrique entraînait des contractions musculaires induites par l'activation des neurones entériques, qui étaient considérablement réduites chez les souris avec une expression gliale de Cx43 diminuée. L'hypothèse d'une implication des CGE dans le contrôle de la motricité est également supportée par différents modèles d'ablation gliale entraînant une altération de la motricité intestinale, notamment via une réduction de la vidange gastrique et du transit intestinal (Aubé et al., 2006 ; Nasser et al., 2006 ; Rao et al., 2017). Le mécanisme impliqué n'est cependant pas clair, mais on suppose que les CGE pourraient participer à la motricité intestinale soit en agissant directement sur l'intégration des informations ou la transmission synaptique des neurones, soit en interagissant directement avec les cellules musculaires lisses afin de moduler leur contraction (Grubišić and Gulbransen, 2017).

➤ **Contrôle des cellules endothéliales :**

Les capillaires sanguins alimentant les tissus neuronaux sont situés à l'extérieur des ganglions entériques et des fibres nerveuses, mais les CGE étendent plusieurs de leurs prolongements jusqu'aux vaisseaux afin de former une sorte de gaine autour d'eux (ruhl, 2005) (**Figure 42**). Histomorphologiquement, ces capillaires sont différents des autres capillaires situés dans l'intestin : ils sont beaucoup plus épais, ont des endothéliums non-fenêtrés et ressemblent étroitement aux capillaires cérébraux qui constituent un composant majeur de la barrière hémato-encéphalique (BBB) (Gershon and Bursztajn, 1978). Il a été proposé une hypothèse selon laquelle les CGE pourraient interagir avec ces capillaires afin de moduler la perméabilité endothéliale, puisqu'il a été montré dans deux modèles de souris transgéniques qu'une ablation des CGE était accompagnée de lésions vasculaires (par exemple une vascularite sous-muqueuse, c'est à dire une inflammation de la paroi des vaisseaux), indiquant une rupture de la barrière endothéliale vasculaire (Bush et al., 1998 ; Cornet et al., 2001). Cependant, les mécanismes précis par lesquels les CGE pourraient réguler la perméabilité endothéliale nécessitent une étude plus approfondie.

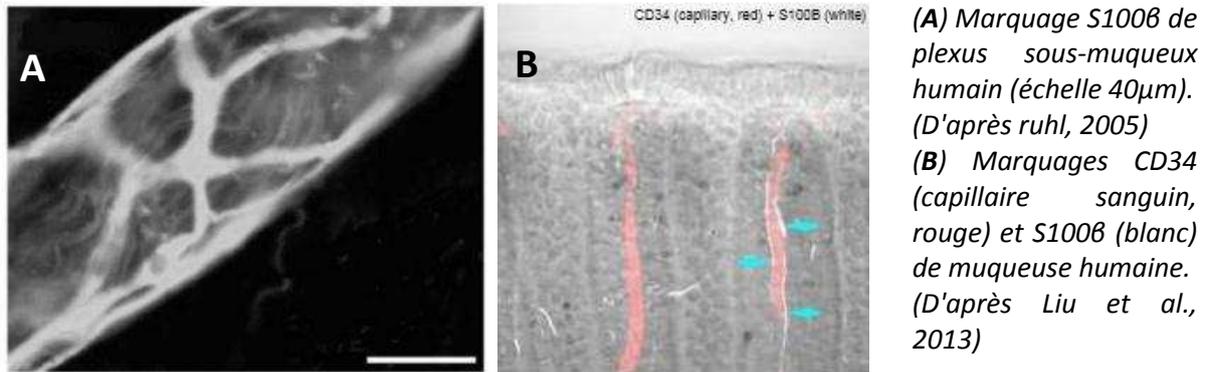


Figure 42 : Les CGE entourent les capillaires sanguins

Les fonctions gliales peuvent être modifiées par de nombreux stimuli des cellules du microenvironnement des CGE. Ainsi, plusieurs cytokines peuvent modifier leur phénotype et leur fonction, notamment des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α ou l'IL1 β (détail partie **V 4 b**). De plus, les CGE expriment des TLR, suggérant une régulation des CGE par des bactéries (Kabouridis et al., 2015). L'expression gliale de récepteurs α 2-adrénergiques suggère également un contrôle neural des fonctions gliales (Nasser et al., 2006). De même, les CGE sont activées par l'ATP mais également par d'autres neuromédiateurs comme la sérotonine ou la bradykinine (Kimball and Mulholland, 2002).

Enfin, des facteurs environnementaux comme les nutriments peuvent également moduler les CGE. En particulier, il a été montré dans un modèle néonatal chez le porc que des modifications de la composition des éléments nutritifs augmentaient l'expression du marqueur glial GFAP (van haver et al., 2008). De la même manière, l'administration d'un régime riche en matières grasses augmentait le nombre de CGE dans un modèle de souris juvéniles (Baudry et al., 2012).

f- Comparaison aux astrocytes du système nerveux central

Au niveau du SNC, les cellules gliales représentent 90% des cellules et on retrouve 3 types distincts : les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie. La microglie, d'origine macrophagique, correspond à des cellules immunitaires qui assurent la fonction de phagocytose. Les oligodendrocytes (qui correspondent aux cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique) produisent la myéline qui entoure les axones afin de protéger les neurones et d'augmenter la vitesse de transmission des signaux. Enfin, les astrocytes représentent la majorité des cellules gliales du SNC, et sont des cellules avec de nombreux prolongements rayonnants qui s'entrecroisent de manière complexe entre les corps cellulaires et les fibres neuronales (Jessen, 2004).

La première comparaison entre les astrocytes et les CGE repose sur leur ressemblance morphologique (**Figure 43**). En effet, comme les CGE, il existe différents types d'astrocytes : ainsi les CGE de type I ressemblent aux astrocytes protoplasmiques et les CGE de type II aux astrocytes fibreux de la matière blanche du cerveau (Hanani and reichenbach, 1994). De plus, elles expriment les mêmes marqueurs GFAP, S100 β , GS et FAPB (Coelho-Aguiar et al., 2015).

Etude bibliographique

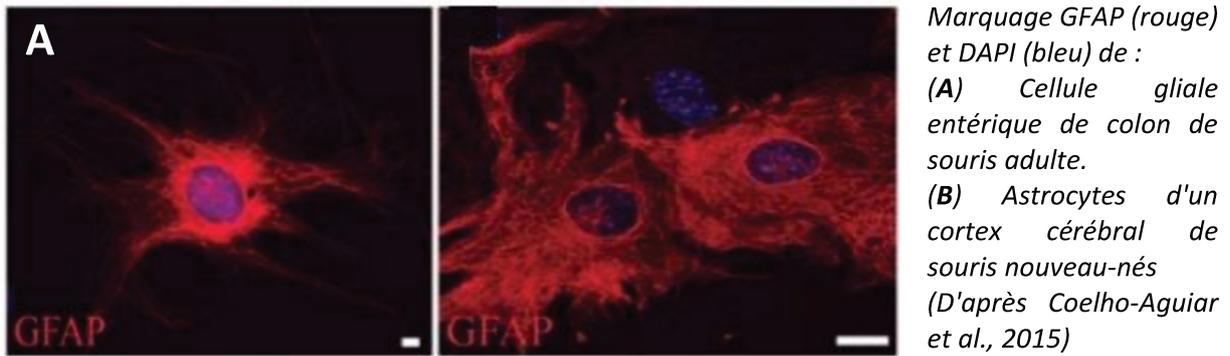


Figure 43 : Similarité morphologique entre les cellules gliales entériques et les astrocytes du SNC

Au niveau du SNC, les astrocytes modulent la plasticité et la transmission synaptique neuronale de manière semblable aux CGE (Bezzi and Volterra, 2001 ; Diniz et al., 2012). Ils participent également à la signalisation entre les cellules via la libération de gliomédiateurs déclenchée par une augmentation des taux de calcium intracellulaire, et ils participent à la différenciation neuronale (Coelho-Aguiar et al., 2015). Cependant, le rôle majeur des astrocytes centraux reste la protection des neurones contre le stress oxydant ou aux espèces réactives de l'oxygène, à l'azote ou à l'excitotoxicité du glutamate (Arundine and Tymianski, 2004 ; Gegg et al., 2003). Ainsi, tout comme les CGE, les astrocytes assurent la survie et la prolifération des neurones via l'élimination du glutamate, la production de glutathion ou encore la production de facteurs neurotrophiques (Bergles and Jahr, 1998 ; Dringen et al., 2000 ; Hailer et al., 2001).

De même, tout comme les astrocytes contrôlent l'adhésion des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins formant la barrière hémato-encéphalique, les CGE régulent les fonctions de la BEI (détail partie IV) (Figure 44) (Abbott et al., 2006 ; Savidge et al., 2007).

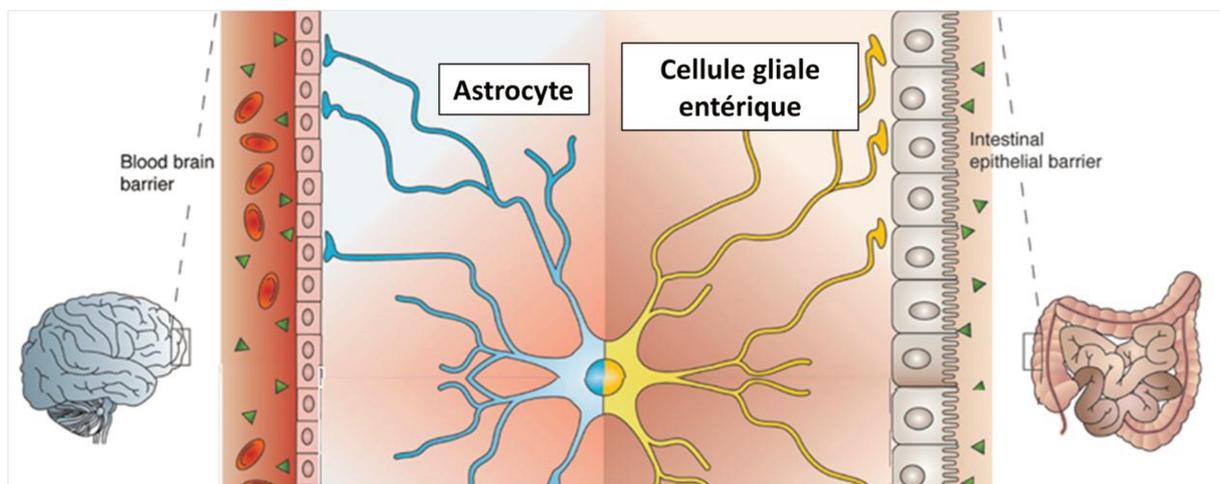


Figure 44 : Régulation des fonctions de barrière dans l'intestin et le SNC par les cellules gliales
(D'après Savidge et al., 2007)

Cependant, en conditions inflammatoires, les astrocytes peuvent être impliqués dans des phénomènes de réparation mais aussi de neuro-dégénérescence en devenant "réactifs", ce qui se traduit par une hypertrophie, une hyper-prolifération ainsi qu'une augmentation de l'expression du marqueur glial GFAP et d'une libération accrue de facteurs (Anderson et al., 2014). Le même type de

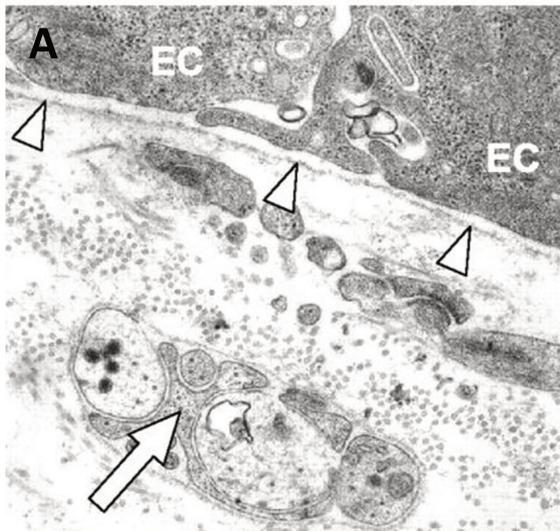
Etude bibliographique

réaction est observé pour les CGE en réponse à l'inflammation intestinale, comme dans le cas des MICI (détail partie **V 3) b**).

Ainsi, les astrocytes et les CGE partagent de nombreux points communs, tels que leur ressemblance morphologique, leurs marqueurs, leurs fonctions de neuroprotection ou encore la régulation des barrières hémato-encéphalique et épithéliale, respectivement. Il a également été montré que les astrocytes, tout comme les CGE, étaient capables de former des jonctions communicantes composées de Cx43 (Houades et al., 2006). De plus, elles produisent toutes deux des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL1 β) ou encore des facteurs neurotrophiques (NGF, BDNF, GDNF) (Didier et al., 2003 ; Toyomoto et al., 2005 ; Van Wagoner et al., 1999). Les CGE sont ainsi considérées comme les analogues périphériques des astrocytes centraux, et ouvrent de nouvelles pistes d'étude des phénomènes gliaux en physiopathologie, comme une fenêtre ouverte sur le cerveau. Les différences majeures qui semblent exister entre ces deux populations cellulaires résident dans leur origine embryonnaire (les CGE dérivent de la crête neurale alors que les astrocytes dérivent du tube neural) et leur microenvironnement (Coelho-Aguiar et al., 2015). De plus, elles semblent répondre différemment à certaines cytokines. En effet, l'IL1 β inhibe la prolifération des CGE et l'IL10 inhibe leur prolifération à faible dose mais l'augmente à forte concentration (Ruhl et al., 2001). Cependant, l'IL10 et l'IL1 β ont toutes les deux un effet lié à leur concentration sur les taux de prolifération d'astrocytes en culture. Enfin, seules les CGE expriment Sox10 et PLP1 (Coelho-Aguiar et al., 2015).

IV L'Unité glio-épithéliale en conditions physiologiques

De nombreuses études ont démontré l'importance du maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale afin d'assurer une bonne santé. Comme évoqué précédemment, les neurones entériques sont capables de réguler la perméabilité et la prolifération/différenciation des CEI. Par analogie aux astrocytes du SNC capables de réguler les fonctions de la barrière hémato-encéphalique, l'impact des CGE sur les fonctions épithéliales est un sujet d'étude en plein essor. En particulier, il a été montré qu'elles protégeaient la BEI et régulaient les fonctions de perméabilité, de réparation et de prolifération/différenciation des CEI. En effet, la proximité étroite qui existe entre les CGE et les cellules épithéliales, de l'ordre de 0.5 à 2 μ m, permet de nombreux échanges paracrines (**Figure 45**) (Liu et al., 2013 ; Neunlist et al., 2006).



(A) Photographie de microscopie électronique (x20000) confirmant l'étroite proximité entre les CGE (flèche) et les cellules épithéliales (EC, entérocytes). La distance entre la lame basale épithéliale (tête de flèche) et les CGE est de l'ordre d' $1.2 \mu\text{m}$. (D'après Neunlist et al., 2006)

Muqueuse humaine avec en (B) les cellules gliales entériques marquées par S100 β (blanc), en (C) les cellules épithéliales visualisées par un marquage nucléaire SYTO16 et (D) la superposition des images. (D'après Liu et al., 2013)

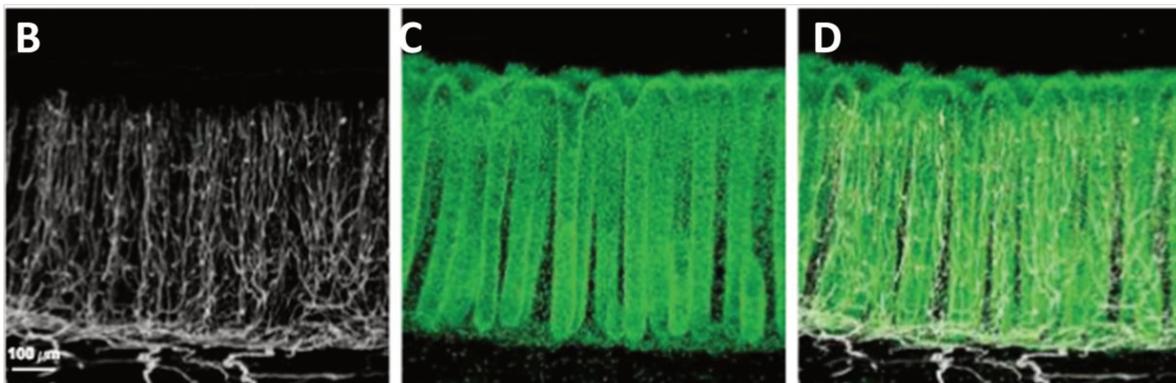


Figure 45 : Les CGE sont retrouvées à proximité des cellules épithéliales intestinales

1) Contrôle glial de la perméabilité

L'implication des CGE dans le maintien de l'intégrité de la BEI a été mise en évidence grâce à des modèles *in vivo* qui ont montré qu'une ablation sévère de la glie entraînait une jéjunolite fulminante, caractérisée par une rupture de l'intégrité de la BEI (Bush et al., 1998 ; Cornet et al., 2001). De la même manière, une ablation moins sévère des CGE entraînait une augmentation de la perméabilité paracellulaire, et ce en l'absence d'inflammation intestinale ou avant son développement (Aubé et al., 2006 ; Savidge et al., 2007). Dans un modèle de coculture indirecte de CGE avec une monocouche de CEI à confluence, il a également été montré que les CGE augmentaient la résistance transépithéliale et réduisaient la perméabilité paracellulaire, grâce à l'augmentation de l'expression des protéines des jonctions serrées telles que l'occludine et ZO-1 (Savidge et al., 2007). Ces effets semblaient être médiés par le GSNO (S-nitrosoglutathione) puisqu'il reproduisait les effets des CGE, suggérant une voie dépendante de la nitrosylation dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire (**Figure 46d**). La capacité des CGE et du GSNO à réguler la perméabilité a également été mise en évidence dans une étude démontrant leur effet protecteur vis-à-vis d'une augmentation de la perméabilité paracellulaire *in vitro* et des lésions de la muqueuse *in vivo* induites par *Shigella flexneri* (**Figure 46b**). En effet, les CGE et le GSNO réduisent sensiblement l'expression épithéliale de petites protéines G, telle que CDC42, qui ont un rôle crucial dans le recrutement du cytosquelette pendant le

Etude bibliographique

processus d'invasion bactérienne (Flamant et al., 2011). De la même manière, les CGE renforcent la résistance de la BEI face à des cytokines proinflammatoires. En particulier, il a été montré que les CGE empêchaient l'augmentation de la perméabilité induite par un cocktail inflammatoire composé de TNF α , IL-1 β et IFN γ en améliorant l'expression et la localisation des protéines des jonctions serrées ZO-1 et occludine (Cheadle et al., 2013). Le même type de résultat a été obtenu en présence de lipopolysaccharide (Xiao et al., 2011). Une étude suggère également un rôle des CGE dans le contrôle du transport épithélial colique d'ions, via la production de NO (MacEachern et al., 2011).

2) Contrôle glial de la réparation

Tout comme l'implication des CGE dans le contrôle de la perméabilité intestinale, la capacité des CGE à réguler les phénomènes de réparation de la BEI a été mis en évidence grâce à des modèles *in vivo* qui ont démontré qu'une ablation des CGE inhibait fortement la réparation de la muqueuse après l'induction de lésions par du diclofénac ou un traitement DSS (Van Landeghem et al., 2011). De même, *in vitro*, les CGE stimulent la réparation de monocouches de CEI lésées mécaniquement ou par des stimuli inflammatoires, via une augmentation de leur étalement autour de la lésion. L'augmentation de la restitution épithéliale et de l'étalement des CEI est médié en partie par la production gliale de proEGF qui augmente l'expression et l'activité épithéliale de FAK (Focal Adhesion Kinase), qui a également un rôle majeur dans la régulation de la motilité des CEI (**Figure 46a**). Une étude plus récente a également démontré l'implication d'un médiateur lipidique produit par les CGE, le 11 β PGF2 α , sur la réparation épithéliale via l'activation de PPAR γ (Coquenlorge et al., 2016). D'autres médiateurs gliaux, tels que le GDNF, aident à maintenir l'homéostasie de la muqueuse intestinale durant les colites, notamment en empêchant la mort des CEI induite par le TNF (Steinkamp et al., 2003). Le GDNF restaure également les fonctions de la BEI *in vivo* après l'induction d'une colite au DSS en exerçant directement un effet protecteur sur les neurones (Anitha et al., 2006 ; Baudry et al., 2012 ; Zhang et al., 2010). De même, des études suggèrent que les CGE pourraient être impliquées dans l'effet préventif d'une neurostimulation du nerf vague chez la souris sur les dysfonctions de la BEI induites par une brûlure (Costantini et al., 2010). Effectivement, ces effets *in vivo* étaient associés à une augmentation précoce de l'expression gliale de GFAP, un possible marqueur de l'activation gliale. De même, une stimulation nicotinique utilisée en tant que médiateur afin de mimer la communication nerf vague-SNE renforçait la BEI uniquement en présence de CGE (Costantini et al., 2012).

3) Contrôle glial de la prolifération

Les CGE régulent également la prolifération des CEI en exerçant un fort effet antiprolifératif. Des cocultures de CEI prolifératives avec des CGE ont révélé que cet effet antiprolifératif n'était pas associé à une augmentation de l'apoptose, mais plutôt à une augmentation de la surface épithéliale, favorisant ainsi l'inhibition de contact cellule-cellule et bloquant le cycle cellulaire au stade G0-G1 (Neunlist et al., 2006). Il a d'ailleurs été montré que l'ablation des CGE *in vivo* entraînait une hyperplasie des cryptes intestinales (Aubé et al., 2006). Plusieurs médiateurs gliaux sont impliqués dans le contrôle de la prolifération épithéliale comme le TGF β 1 ou le médiateur lipidique 15dPGJ2 (**Figure 46c**) (Bach-Ngohou et al., 2010 ; Neunlist et al., 2006). Tout comme le 11 β PGF2 α , l'effet protecteur du 15dPGJ2 passerait par une activation du récepteur PPAR γ . Les CGE augmentent

Etude bibliographique

également la différenciation épithéliale en augmentant leur adhésion à la matrice *in vitro* (Van Landeghem et al., 2009). Tous ces effets participent ainsi au renouvellement continu de l'épithélium intestinal.

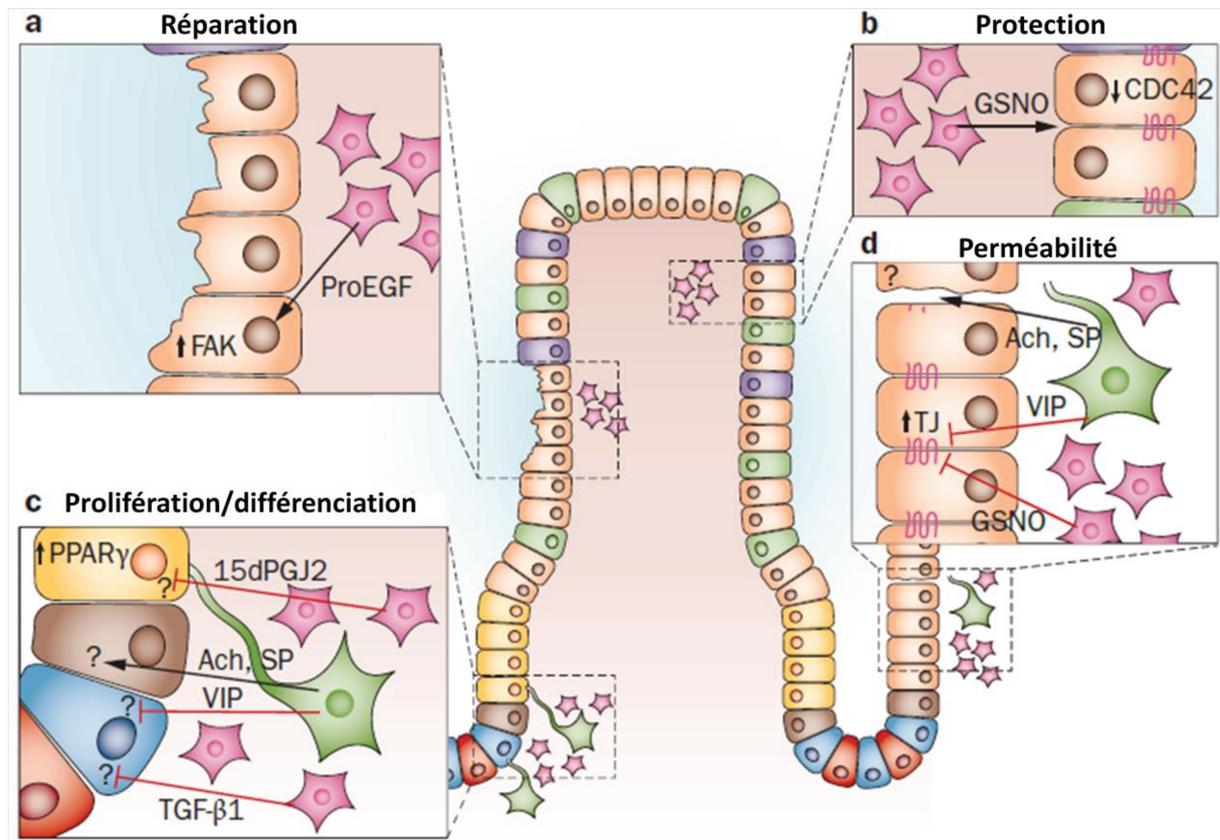


Figure 46 : Régulation des fonctions de la BEI par les neurones et les cellules gliales entériques

Les neurones entériques (vert) et les CGE (rose) produisent différents facteurs solubles qui régulent les fonctions de la BEI. (a) Les CGE augmentent la réparation de la BEI via la production de proEGF qui augmente l'expression et l'activité de FAK. (b) Les CGE protègent la BEI durant des infections par un pathogène via la production de GSNO qui réduit l'expression de CDC42 et augmente la résistance. (c) Les neurones entériques produisent du VIP et les CGE du TGF- β 1 et du 15dPGJ2 qui inhibent la prolifération épithéliale. À l'inverse, les neurones peuvent également produire de l'Ach et de la SP pour l'augmenter. (d) Les neurones entériques produisent du VIP et les CGE du GSNO afin de réduire la perméabilité paracellulaire. Là encore, les neurones peuvent également produire de l'Ach et de la SP qui l'augmentent. (D'après Neunlist et al., 2013)

Ainsi, les CGE contrôlent différentes propriétés de la BEI en conditions physiologiques et participent au maintien de l'homéostasie épithéliale. Renforcer l'impact bénéfique des CGE sur la BEI et identifier les médiateurs gliaux ainsi que les mécanismes d'action à l'origine de leurs effets bénéfiques sur les cellules épithéliales représente donc une cible d'intérêt thérapeutique pour les maladies caractérisées par des défauts d'intégrité de la BEI, telles que le syndrome de l'intestin irritable, l'obésité ou encore le diabète. Plus particulièrement, leur intérêt dans la prise en charge des MICI fait l'objet d'un sujet d'étude en pleine expansion depuis que des altérations gliales phénotypiques et fonctionnelles ont été rapportées dans ces pathologies (détails partie **V 4**) **b**).

V L'Unité glio-épithéliale en condition pathologique : le cas des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

1) Rappels sur l'inflammation

La réaction inflammatoire est la toute première réponse à se produire dans les tissus vascularisés suite à une agression, comme par exemple dans le cas d'une infection bactérienne. Elle est caractérisée par 5 signes cardinaux : la chaleur, la rougeur, l'œdème, la douleur et la perte de fonction. Il s'agit d'un processus généralement bénéfique et essentiel à l'organisme, qui va permettre la mise en place d'une réponse immunitaire afin d'éliminer le pathogène et de réparer les tissus lésés.

Cette réaction inflammatoire fait intervenir le système immunitaire inné et adaptatif. Le système immunitaire inné permet une réponse locale et rapide, mais peu spécifique. Il comprend les macrophages et les cellules dendritiques qui phagocytent les agents pathogènes et pourront les présenter aux cellules de l'immunité adaptative. On retrouve également le complément qui est un ensemble de protéines capables de recouvrir les bactéries et d'activer les cellules phagocytaires. Les cellules phagocytaires activées peuvent ensuite migrer dans des organes spécifiques comme les ganglions où va s'élaborer la réponse adaptative. Ce système adaptatif permet une réponse immunitaire très spécifique, mais plus lente. Il implique les lymphocytes T et B (avec des lymphocytes mémoires) activés par les cellules présentatrices d'antigènes, et vont permettre une réponse immunitaire plus rapide lors d'une nouvelle rencontre avec le pathogène. Les lymphocytes B produisent des anticorps et les lymphocytes T peuvent être cytotoxiques (détectent les cellules infectées ou tumorales exprimant des antigènes particuliers) ou auxiliaires ("helper" qui stimulent les macrophages et coopèrent avec les lymphocytes B, ou régulateurs nécessaires au maintien de l'homéostasie immunitaire qui empêchent l'apparition de lymphocytes auto-réactifs).

Schématiquement, la réponse inflammatoire se déroule en deux phases : une phase d'initiation et une phase d'amplification. Durant la phase d'initiation, le complément est activé et va attirer les cellules circulantes sur le site lésé. Le système des kinines est également activé et va notamment être responsable de la sensation de douleur en interagissant avec les neurones sensoriels. De plus, les macrophages et les cellules dendritiques sont activés et vont sécréter des cytokines pro inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6) qui attirent les cellules du système immunitaire inné circulant dans le sang (surtout des neutrophiles) et favorisent leur passage du sang vers le tissu lésé. Durant la phase d'amplification, les neutrophiles déversent leurs granules sur les pathogènes afin de les tuer et les macrophages continuent de phagocyter. Ils sécrètent également des facteurs servant au remodelage du tissu lésé et migrent dans les ganglions lymphatiques pour activer les lymphocytes T.

Cependant, lorsque cette réponse immunitaire persiste dans la durée, elle entraîne des situations pathologiques comme l'inflammation chronique. Ce mécanisme de chronicité peut être dû à une persistance du stimulus inflammatoire ou à une perte de contrôle du système immunitaire. Généralement, l'inflammation chronique est caractérisée par un infiltrat de lymphocytes T et B en plus des macrophages qui reflète la mise en place d'une immunité adaptative.

Ainsi, il existe deux grands types de maladies inflammatoires intestinales : les pathologies d'origine infectieuse et les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI).

2) Description générale des MICI

Les MICI sont des affections inflammatoires chroniques du tractus gastro-intestinal englobant deux entités cliniques principales : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite ulcérate (RCH). Bien que la MC et la RCH aient été historiquement étudiées ensemble parce qu'elles partagent des caractéristiques communes (comme les symptômes, les dommages structurels et la thérapie), il est maintenant clair qu'elles représentent deux entités pathophysiologiques distinctes. En effet, tandis que la RCH n'affecte que le colon et le rectum, la MC peut être localisée sur toute la hauteur du tube digestif (Fakhoury et al., 2014). De plus, dans la MC, les lésions du tube digestif observées sont transmursales, alors qu'elles ne touchent que la muqueuse dans le cas de la RCH (Kaser et al., 2010). Elles évoluent par poussées inflammatoires de durée et de fréquence variables, en alternance avec des phases de rémission.

a- Signes cliniques et diagnostic

Les MICI n'affectent pas l'espérance de vie des patients, mais altèrent considérablement leur qualité de vie à cause des nombreux symptômes qu'elles engendrent. De plus, si elles n'augmentent pas la mortalité, elles sont tout de même associées à des effets secondaires lourds et à un risque accru de développer d'autres pathologies comme le cancer colorectal (Choi et al., 2017).

Les signes cliniques les plus courants sont des diarrhées chroniques pouvant contenir du sang et du mucus, accompagnées de douleurs abdominales dépendantes de la localisation des atteintes digestives. Certains patients, majoritairement atteints par la MC, présentent également des manifestations ano-périnéales telles que des fissures, des fistules et des ulcérations. Les douleurs engendrées, les nausées et le retard de la vidange gastrique poussent généralement les patients à limiter leur apport calorique afin de diminuer leur malaise. En association avec la malabsorption des nutriments par les segments intestinaux lésés, il est courant que ces patients souffrent de carence nutritionnelle (anémie, déficit vitaminique) et de perte de poids. De même, des sténoses (rétrécissements permanents) du grêle et du côlon peuvent survenir après quelques années d'évolution de la maladie. Ces sténoses sont généralement dues à un épaississement de la paroi à cause de la fibrose qui survient là où les tissus ne se régénèrent pas. Enfin, des lésions dysplasiques et une aneuploïdie (cellules qui ne possèdent pas le bon nombre de chromosomes) peuvent conduire au développement d'un cancer colorectal (Söderlund et al., 2011). Les MICI entraînent également des lésions extra-intestinales (Hendrickson et al., 2002). Par exemple, les enfants atteints par la MC peuvent présenter un retard de croissance et de la maturation sexuelle, probablement à cause d'une malnutrition et de l'utilisation de corticoïdes. Certains patients MICI développent également de l'arthrite, des complications ophtalmologiques ou encore des maladies hépato-biliaires.

Avant de confirmer un diagnostic de MICI, il est important d'exclure une éventuelle infection par un pathogène entérique qui provoque le même type de symptômes comme *Shigella*, *Salmonella* ou *Clostridium difficile*. Une fois les infections entériques exclues, différents tests sont mis en œuvre dans le but de diagnostiquer une MICI. Des tests hématologiques permettent d'analyser le nombre de globules sanguins, de marqueurs d'inflammation ou d'établir un profil métabolique, notamment en regardant les enzymes du foie. Une augmentation de ces marqueurs suggère généralement une MICI, mais il est important de confirmer ces résultats avec une évaluation endoscopique (Hendrickson et al., 2002). Celle-ci va permettre le diagnostic de lésions caractéristiques et la

Etude bibliographique

réalisation de biopsies qui vont permettre une analyse histologique plus approfondie, notamment du SNE (Neunlist et al., 2011). Un score d'activité clinique (Crohn disease activity index - CDAI pour la MC et Lichtiger pour la RCH) et endoscopique (CDEIS pour la MC et UCEIS pour la RCH) est également établi lors du premier bilan de la maladie, et tout au long du suivi des patients. Dans le cas de la MC, des évaluations radiologiques sont parfois nécessaires afin d'évaluer les atteintes des boucles de l'intestin grêle. Enfin, de nouvelles techniques telles que l'endoscopie par vidéo-capsule ou l'endomicroscopie confocale sont de plus en plus utilisées. Cette dernière technique permet, entre autres, une analyse plus fine de l'état de la muqueuse intestinale (Musquer et al., 2013).

b- Epidémiologie

Les MICI se développent majoritairement chez les jeunes adultes, cependant environ 20% des patients développent des symptômes durant l'enfance (Rogers et al., 1971). Le pic d'incidence des MICI se situe entre 15 et 30 ans, mais le développement de la maladie peut se produire à tout âge (Hanauer, 2006). La RCH touche légèrement plus d'hommes, alors que la MC est plus fréquente chez les femmes (ratio femmes/hommes 1,8:1).

Les taux les plus élevés ont été enregistrés en Amérique du nord, en Europe du nord, au Royaume-Uni, en Australie et en Nouvelle-Zélande (**Figure 47**). En effet, ces pays industrialisés partagent les mêmes facteurs génétiques et environnementaux, et on retrouve des taux d'incidence d'environ 5 à plus de 10 pour 100000 habitants (Ng et al., 2013). Au cours des dernières années, on pensait que les MICI touchaient surtout la population caucasienne, mais on observe désormais une incidence croissante dans les pays en voie d'occidentalisation comme la Chine ou l'Afrique du Nord (Cosnes et al., 2011). De plus, les MICI ont tendance à se développer dans les groupes socio-économiques plus élevés (Loftus and Sandborn, 2002).

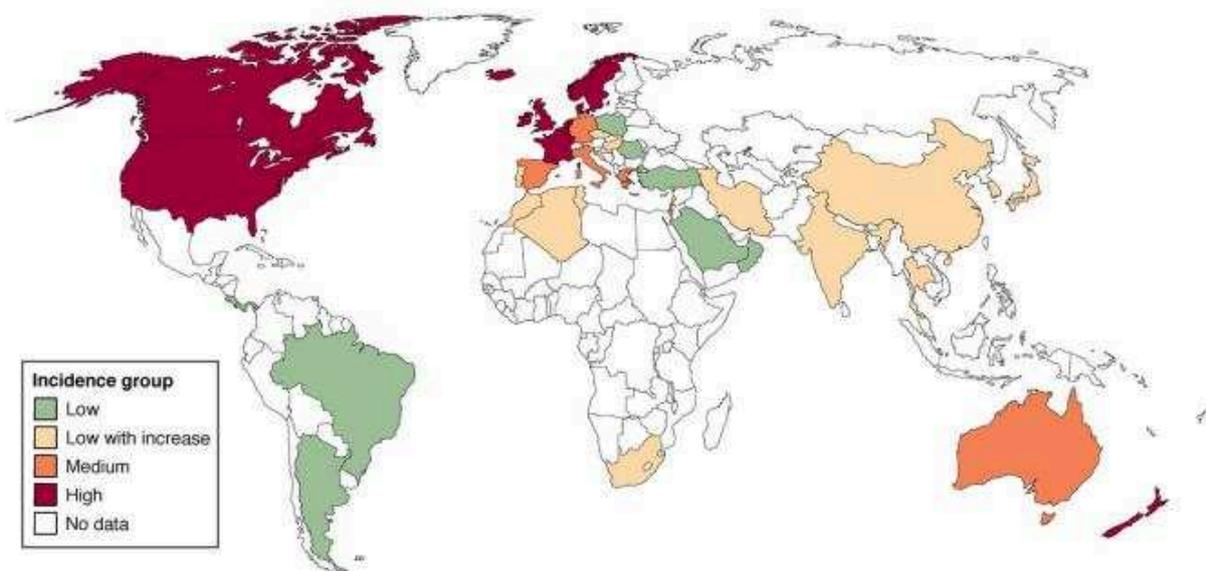


Figure 47 : Incidence des MICI dans le monde

Carte globale de l'incidence des MICI dans le monde. Rouge = incidence annuelle supérieure à $10/10^5$, orange = $5-10/10^5$, vert = moins de $4/10^5$, jaune = faible incidence mais toujours en augmentation et absence de couleur = absence de données. (Cosnes et al., 2011)

c- Physiopathologie

Les MICI sont des maladies dont l'étiologie est encore mal connue. Il est toutefois admis que ce sont des pathologies multifactorielles faisant intervenir des facteurs génétiques et environnementaux qui pourraient interagir avec la flore commensale intestinale et seraient responsables d'une sur-activation du système immunitaire (Dupaul-Chicoine et al., 2013 ; Frolkis et al., 2013). Ainsi, chez ces patients, un grand nombre de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires sont relarguées dans la muqueuse intestinale, et on retrouve un nombre accru de lymphocytes T qui apparaissent comme les effecteurs essentiels de la réponse inflammatoire.

➤ **Facteurs génétiques :**

De nombreuses observations basées sur les premières données épidémiologiques, et surtout sur la concordance entre les jumeaux, ont montré l'importance d'étudier les mécanismes génétiques mis en jeu dans la physiopathologie des MICI. En effet, la concordance entre deux jumeaux homozygotes est d'environ 50%, et il a également été montré que les apparentés au premier degré avec un patient avaient un risque accru de développer une MICI (2-14% pour la MC, 7-11% pour la RCH) (Halme, 2006). Grâce à des études d'association pangénomiques (GWAS pour Genome Wide Association Study) 7 loci de prédisposition aux MICI ont été identifiés, nommés IBD1 à 7 (Weersma et al., 2007). Cette méthode permet de rechercher des petites variations appelées SNP (single nucleotide polymorphisms) qui représentent la variation d'une seule paire de base du génome entre deux individus d'une même espèce. Ainsi, plus de 150 gènes de prédisposition ont été mis en évidence chez les patients MICI. Cependant, outre quelques rares cas, leur impact sur la survenue de MICI est modéré, et le mécanisme impliqué est bien souvent inconnu.

Le premier gène de susceptibilité pour la MC à avoir été identifié en 2001 était le gène NOD2 (Nuclear-binding Oligomerization Domain containing protein 2), aussi appelé CARD15 (Caspase Recruitment Domain containing protein 15) situé sur le chromosome 16q12 dans le locus IBD1 (Hugot et al., 2001 ; Ogura et al., 2001). Ce gène code pour un récepteur PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) qui reconnaît les peptidoglycanes bactériens, et qui est exprimé par les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les cellules de Paneth (Ogura et al., 2001 ; Ogura et al., 2003). Trois mutations associées à la MC ont été identifiées : deux mutations non-sens R702W (ou SNP8) et G908R (ou SNP12) qui multiplient par 2 et 3 le risque de développer une MC, respectivement, et une mutation d'insertion décalant le cadre de lecture L1007 (ou SNP13) qui multiplie le risque par 4 (Economou et al., 2004). Cette dernière mutation induit la production d'une protéine tronquée, suggérant qu'un défaut de la reconnaissance bactérienne pourrait être impliqué dans la MC. De plus, ces mutations de NOD2 sont associées à une activation de la voie NFκB, qui joue un rôle majeur dans les réponses inflammatoires déclenchées par des bactéries (Hampe et al., 2001). Il a également été montré dans des modèles murins qu'une mutation de NOD2 augmentait l'activité NFκB, la sécrétion d'IL-1β et était associée à une susceptibilité accrue à l'inflammation intestinale induite par des bactéries (Maeda et al., 2005). De plus, des souris déficientes pour NOD2 présentent un défaut de production d'α-defensines par les cellules de Paneth, un défaut également retrouvé chez les patients MC et exacerbé par une mutation NOD2 (Wehkamp et al., 2004 and 2005). Ainsi, la perte de fonction de NOD2 pourrait conduire à une augmentation de l'invasion de la muqueuse par

Etude bibliographique

des bactéries, résultant en un recrutement excessif de cellules immunitaires et donc en une augmentation de la réponse inflammatoire.

Depuis l'identification du gène NOD2 dans la susceptibilité à la MC, de nombreuses autres études de gènes candidats ont été réalisées sur des gènes impliqués dans l'immunité innée. Les résultats les plus prometteurs, bien que les données ne soient pas solidement reproduites, suggèrent une association de NOD1 et de TLR4 avec le développement de MICI. NOD1 est exprimé par l'épithélium intestinal et permet la reconnaissance des peptidoglycanes de bactéries Gram négatives (Chamaillard et al., 2003). Tout comme NOD2, une activation de NOD1 active NFκB et augmente également l'apoptose, et il a été montré que la délétion de son allèle était associée à un développement précoce de MICI (McGovern et al., 2005). De même, le TLR-4 reconnaît le LPS qui compose les parois des bactéries Gram négatives et a été montré pour être régulé à la hausse durant une inflammation intestinale (Hausmann et al., 2002). Lors de sa liaison avec le LPS il active NFκB et la production de cytokines inflammatoires, et des mutations du gène codant pour le TLR4 ont été retrouvées chez les patients MICI (Franchimont et al., 2004).

De même, la région HLA (ou CMH) correspondant au locus de susceptibilité IBD3 abrite 224 gènes hautement polymorphes qui, pour la plupart, semblent avoir des fonctions immunorégulatrices (Weersma et al., 2007). Ces protéines CMH présentent les antigènes aux récepteurs des lymphocytes T et il a été montré que ces gènes déterminaient la susceptibilité à l'inflammation colique à la fois dans la MC et la RCH (Yap et al., 2004). Ces études GWAS ont également permis d'identifier de nombreux autres gènes de susceptibilité associés aux MICI, résumés **Figure 48**. On retrouve ainsi des gènes essentiels aux fonctions gastro-intestinales telles que les fonctions de barrière et de restitution, des gènes impliqués dans l'immunité innée et adaptative ou encore des gènes impliqués dans les réponses cellulaires comme l'autophagie ou le stress du réticulum endoplasmique (Khor et al., 2011).

Enfin, une étude plus récente a réalisé une analyse génomique de la méthylation de l'ADN de fibroblastes issus d'individus sains ou de patients atteints par la MC et présentant une fibrose (Sadler et al., 2016). Les résultats ont montré chez les patients MC une hyper-méthylation des gènes codant pour les protéines WNT2B (impliquées dans la voie WNT qui régule la prolifération des CEI) et PTGIS (enzyme de synthèse de la PGI2), associée à une diminution de l'expression de leurs ARNm. A l'inverse, le gène de la PGDS (enzyme de synthèse de la PGD2) était hypo-méthylé, ce qui était associé à une augmentation de l'expression de son transcrit.

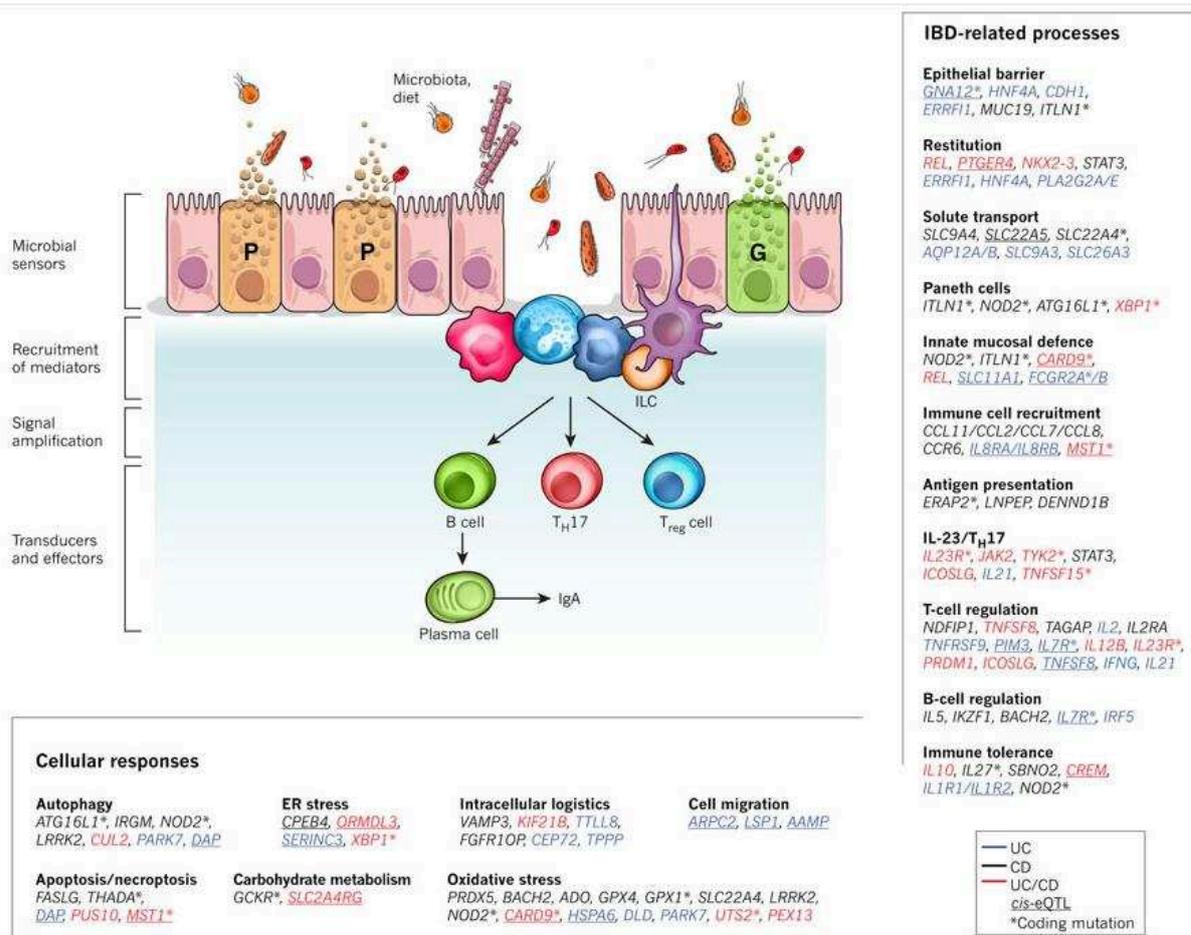


Figure 48 : Modèle de développement des MICI basé sur des études GWAS

L'homéostasie intestinale implique une action coordonnée des cellules épithéliales et immunitaires innées et adaptatives. Une augmentation de la perméabilité de la BEI permet une invasion microbienne, détectée par le système immunitaire inné. Celui-ci orchestre les réponses tolérogènes, inflammatoires et restitutives appropriées, en partie via la libération de médiateurs extracellulaires qui recrutent d'autres composants cellulaires, y compris des cellules immunitaires adaptatives. Les variants génétiques, le microbiote et les facteurs immunitaires affectent l'équilibre de ces signaux. Les gènes impliqués dans ces fonctions avec des SNP (single nucleotide polymorphisms) associés aux MICI ont été classés selon leur(s) fonction(s) dans l'homéostasie intestinale et l'immunité. La couleur du texte indique si les gènes sont liés aux loci de risque associés à la MC (CD, noir), à la RCH (UC, bleu) ou aux deux (rouge). L'astérisque indique les mutations codantes et les effets cis-eQTL (cis-expression quantitative trait loci, correspond à des loci dont l'expression est associée à une variation des ARNm) sont soulignés. G = cellule de goblet ; P = cellule de Paneth. (Khor et al., 2011)

➤ Facteurs environnementaux :

Si de nombreux gènes de susceptibilité à développer une MICI ont été identifiés, ils sont toutefois responsables de moins d'un tiers des MICI (Ananthakrishnan, 2013). En effet, le fait que le taux de concordance de la maladie chez des jumeaux monozygotes soit, au mieux, de 50%, et que le risque de MICI dans une population immigrante ressemble à celui du pays de résidence plutôt que le pays d'origine suggère un rôle majeur de l'environnement sur la physiopathologie des MICI (Williams, 2008). Ainsi, de nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence une implication majeure

Etude bibliographique

des facteurs environnementaux dans le développement des MICI, les deux facteurs majeurs étant le tabagisme et l'appendicectomie.

Tabagisme

Le rôle du tabac dans le développement des MICI a des effets inverses entre la MC et la RCH. En effet, le fait de fumer agit comme un facteur protecteur sur le développement de la RCH et diminue le taux de rechute et la nécessité de réaliser des colectomies (Cosnes, 2004 ; Lakatos et al., 2007). Ainsi, chez ces patients, l'arrêt de la cigarette est associé à un risque accru de développer une RCH dans les 2 à 5 ans qui suivent, et ce jusqu'à 20 ans après (Higuchi et al., 2012). A l'inverse, le tabagisme double le risque de développer la MC, augmente le nombre de poussées de la maladie et la nécessité d'utiliser des corticoïdes et est associé à un taux plus élevé de récurrences post-opératoires, chez les femmes en particulier (Birrenbach and Böcker, 2004 ; Cosnes, 2001 ; 2004a and 2008). Ainsi, le sevrage tabagique fait partie intégrante du traitement de la MC, et s'avère efficace dès la première année. Malgré de nombreuses études épidémiologiques, le mécanisme selon lequel le tabagisme affecte les MICI reste incertain, tout comme la raison de son effet protecteur sur la RCH mais néfaste sur la MC. Un des composants de la fumée de cigarette hypothétiquement responsable de ces effets pourrait être la nicotine, puisqu'il a été montré que son administration augmentait l'inflammation du jejunum mais diminuait celle du colon chez des rats (Eliakim et al., 2001). Cependant, les essais d'une supplémentation nicotinique chez des patients RCH ont donné des résultats divergents mais suggèrent que le remplacement de la nicotine pourrait avoir un faible effet sur le cours de la maladie (Nikfar et al., 2010). Une étude plus récente a également démontré que les cellules mononucléées de fumeurs atteints par la MC sécrétaient moins de chimiokines et cytokines anti-inflammatoires (IL-10 par exemple) que les non-fumeurs, alors que les patients RCH n'étaient pas affectés. De plus, les cellules de fumeurs MC étaient défectueuses pour la protection anti-inflammatoire et anti-oxydante, notamment à cause d'une diminution de la production des protéines cytoprotectrices Hsp70 (Bergeron et al., 2012).

Appendicectomie

L'appendicectomie diminue d'environ 70% le risque de développer la RCH, en particulier chez les patients qui ont subi une chirurgie avant leurs 20 ans (Andersson et al., 2001 ; Koutroubakis et al., 2002 ; Koutroubakis and Vlachonikolis, 2000). A l'inverse, l'association entre une appendicectomie et la MC est moins claire, même si une méta-analyse a démontré un risque prématuré accru de développer la MC dans l'année qui suit la chirurgie, qui diminue par la suite (Kaplan et al., 2008 ; Molodecky and Kaplan, 2010). Cependant, le fait que les patients atteints par la MC avec une atteinte iléo-caecale ont plus souvent une appendicectomie dans les mois ou les années précédant le diagnostic suggère que l'indication chirurgicale pourrait en fait résulter d'une MC naissante encore ignorée. Le mécanisme par lequel l'appendicectomie protège contre le développement de la RCH n'est pas connu, mais plusieurs hypothèses ont été proposées (Molodecky and Kaplan, 2010). En effet, l'appendice pourrait servir de réservoir de bactéries entériques et pourrait être impliqué dans l'échantillonnage antigénique qui régule la réponse immunologique à la microflore intestinale. En outre, les MICI sont caractérisées par un décalage de l'équilibre vers une réponse inflammatoire médiée par les lymphocytes Th1 dans la MC et une réponse Th2 dans la RCH.

Etude bibliographique

Une étude d'Andersson et al. suggère que l'appendicite serait médiée par les cellules Th1, ce qui peut expliquer l'association inverse entre l'appendicite et la RCH (Andersson et al., 2003).

Hormones et AINS

Les contraceptifs oraux et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont les deux principales classes de médicaments à avoir été intensément étudiées pour une possible relation de cause à effet dans le développement des MICI.

Chez les femmes prenant des contraceptifs oraux, le risque de développer une MC est environ deux à trois fois supérieur à celui des témoins, bien qu'il n'y ait aucune preuve directe d'une relation causale (Godet et al., 1995 ; Khalili et al., 2013). Le rôle néfaste des contraceptifs oraux sur le développement de RCH a également été montré, même s'il reste plus faible que pour la MC (Cornish et al., 2008). Ainsi, Corrao et al. postulent que jusqu'à 7% des cas de RCH et 11% des cas de MC pourraient être attribués à l'utilisation de contraceptifs oraux (Corrao et al., 1998). L'hypothèse pour expliquer cet effet délétère repose sur la présence d'œstrogènes dans ces traitements puisqu'ils agissent comme des amplificateurs immunitaires, notamment sur l'immunité humorale impliquant les anticorps et le complément, ainsi que sur la prolifération des macrophages (Cutolo et al., 2006). Les résultats concernant l'effet négatif de ces contraceptifs sur la sévérité de la maladie chez des patientes atteintes de MICI sont controversés, toutefois leur utilisation à faible dose ne semble pas affecter l'activité clinique de la maladie, au moins dans la MC (Danese et al., 2004). Cependant, compte tenu de l'état d'hyper-coagulation présent dans les MICI actives, l'utilisation concomitante de contraceptifs oraux pourrait aggraver le risque d'événements thromboemboliques (Alstead, 1999). A l'inverse, les traitements hormonaux utilisés en période de post-ménopause sont associés à un risque élevé de RCH, mais pas de MC (Khalili et al., 2012). Dans une étude de cohorte danoise, il a également été montré une association entre les MICI et l'endométriose, soutenant là encore le rôle des facteurs hormonaux dans les MICI (Jess et al., 2012).

En ce qui concerne les AINS, leurs effets délétères gastro-intestinaux sont bien reconnus. Les AINS sont connus pour induire une rupture de la muqueuse de l'estomac, de l'intestin et du colon, et augmentent également la perméabilité intestinale via une inhibition des cyclooxygénases, résultant en une réduction de la production de prostaglandines (Ananthakrishnan, 2013 ; Cipolla et al., 2002). Il a été montré chez des souris déficientes pour l'IL-10 qui développent spontanément une colite que l'administration d'AINS entraînait une forme beaucoup plus rapide et sévère d'inflammation colique associée au blocage des prostaglandines protectrices et à une modification de la réactivité immunitaire dans la muqueuse (Berg et al., 2002). Ainsi, une étude cas-contrôles a montré une association positive entre l'utilisation d'AINS et le développement de MICI (Felder et al., 2000). Il a également été montré que les patients MICI en rémission clinique pouvaient rechuter après un traitement aux AINS (Danese et al., 2004). De même, la prise régulière d'aspirine est associée à une augmentation du risque de développer une MC environ six fois supérieure aux patients témoins, mais pas pour les patients RCH (Chan et al., 2011). Le rôle néfaste des AINS sur le développement d'une RCH a toutefois été mis en évidence dans d'autres études de cohortes (Ananthakrishnan et al., 2012). De plus, l'augmentation du risque de maladie était plus forte chez les patients avec une fréquence et une dose plus élevée, ainsi qu'une durée d'utilisation plus longue.

Stress

La conviction selon laquelle le stress pourrait provoquer une MICI est populaire chez les malades souffrant de MC et RCH, mais en réalité il est plus susceptible de moduler les manifestations de la maladie plutôt que d'être un facteur initiateur. En effet, une augmentation de l'activité clinique est observée durant un stress soutenu, mais pas à court terme (Levenstein et al., 2000). Les mécanismes sous-jacents à cette exacerbation sont inconnus, mais impliquent probablement des facteurs nerveux, endocriniens et immunitaires (Hart and Kamm, 2002).

Alimentation

Compte tenu de la localisation des MICI, une relation potentielle entre les composants du régime alimentaire et la pathophysiologie de ces maladies a longtemps été prise en compte, et il a été suggéré un lien par des mécanismes immunologiques entre les antigènes alimentaires et le développement de l'inflammation intestinale (Danese et al., 2004). Cette explication logique et attrayante est loin d'être prouvée, et les études de ce lien sont peu nombreuses et non convaincantes, principalement parce qu'elles ne fournissent que des preuves indirectes d'une relation possible de cause à effet entre des facteurs diététiques spécifiques et les MICI. À titre d'exemple, une étude récente évaluant le flux sanguin rectal et la prolifération des lymphocytes lors de l'exposition à des aliments spécifiques (citron, lait, céréales...) a démontré une sensibilisation *in vivo* et *in vitro* à certains antigènes alimentaires chez les patients atteints de MC (Van Den Bogaerde et al., 2002). Les études visant à trouver une relation de causalité entre le régime alimentaire et les MICI font face à d'importantes difficultés telles que la définition de la vraie composition de chaque régime. Parmi les facteurs alimentaires analysés, certaines études suggèrent que la consommation de sucre raffiné pourrait être un facteur de risque pour la MC, mais pas pour la RCH (Sonnenberg, 1988). L'apport en matières grasses a été associé positivement à la RCH, alors que les fruits, les légumes et la consommation de fibres semblent diminuer le risque de MICI (Hou et al., 2011 ; Reif et al., 1997). De même, la consommation de curcumin aurait des effets bénéfiques sur les MICI, du à son rôle anti-inflammatoire et anti-oxydant (Vecchi Brumatti et al., 2014). L'allaitement a également été montré pour avoir un rôle protecteur sur la survenue de MICI, notamment via l'acquisition d'une tolérance orale à la microflore et aux antigènes alimentaires (Klement et al., 2004). Enfin, de nombreuses études se sont intéressées à la vitamine D, puisqu'elle est retrouvée diminuée chez les patients MICI (Ardesia et al., 2015). De plus, des souris déficientes pour le récepteur à la vitamine D présentent une expression accrue de cytokines inflammatoires dans le colon et sont plus sensibles aux modèles expérimentaux de colite (Froicu et al., 2003 ; Froicu and Cantorna, 2007). Dans ce sens, une étude a montré qu'une supplémentation en vitamine D chez des patients MC en rémission était associée à un risque plus faible de rechute au cours des 12 mois suivants, en comparaison à ceux qui avaient reçu le placebo (Jørgensen et al., 2010).

Concernant les oméga 3 et 6, leur impact a été étudié dans de nombreuses études dans le but d'améliorer les symptômes des patients atteints de MICI, en raison de leurs rôles pro- ou anti-inflammatoires. La littérature suggère un rôle bénéfique des oméga 3 via la production de molécules anti-inflammatoires telles que les résolvines ou les protectines (Barbalho et al., 2016). Cependant, si la supplémentation en oméga-3 entraîne une diminution des paramètres inflammatoires chez les patients MICI, aucun effet n'a été reporté sur l'activité de la maladie ou les taux de rechute (Dixon et al., 2015). À l'inverse, les oméga-6 sont plutôt associés à des effets pro-inflammatoires et sont

Etude bibliographique

corrélés avec un risque accru de développer une MICI (Hou et al., 2011 ; Shoda et al., 1996). Cependant, l'existence de nombreux dérivés et leurs effets parfois opposés suggèrent qu'il s'agirait plutôt d'un équilibre efficace entre les oméga 3 et 6 qui permettrait le maintien de l'homéostasie intestinale, d'où l'importance d'étudier la production d'eicosanoïdes dans les MICI.

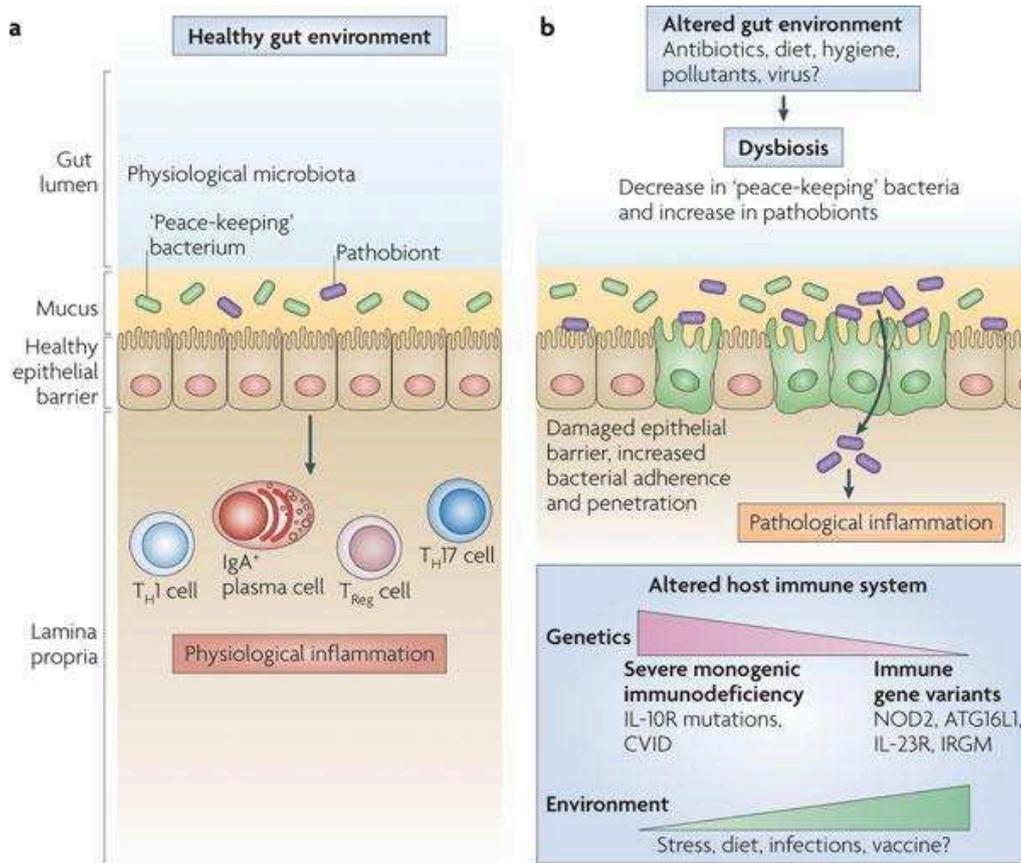
Mode de vie

Au cours des dernières années il est devenu clair que le processus d'occidentalisation était intimement lié à l'émergence des MICI, illustré par ce gradient Nord-Sud d'incidence des MICI, avec une augmentation des cas de MC et RCH dans les pays les plus développés. Ces différences s'expliqueraient notamment par une exposition plus faible à des pathogènes entériques durant l'enfance, du fait d'une meilleure hygiène de vie (eau potable, médication...) (Bernstein and Shanahan, 2008 ; Shanahan and Bernstein, 2009). Cela conduirait alors à une plus grande susceptibilité de développer une réponse immunologique inappropriée lors de l'exposition à de nouveaux antigènes, plus tard dans la vie (Gent et al., 1994). Ainsi, il a par exemple été montré que les MICI étaient plus répandues dans les pays développés où l'infection à *Helicobacter Pylori* est moins fréquente, une bactérie dont la colonisation est corrélée à des mauvaises installations sanitaires (Feeney et al., 2002 ; Luther et al., 2010). Parmi les autres facteurs qui supportent cette hypothèse, on retrouve une diminution du risque de développer une MICI chez les patients vivant en milieu rural, consommant du lait non pasteurisé ou encore vivant dans des logements avec une forte densité de population (Bernstein et al., 2006 ; Lashner and Loftus, 2006). Il est également intéressant de noter que les travailleurs en extérieur ont moins de risque de développer une MICI que les travailleurs sédentaires ou ayant des occupations en intérieur (Danese et al., 2004). De nombreuses théories ont été avancées pour expliquer ces différences, comme par exemple le retard de transit chez les personnes les plus sédentaires associé à un temps de contact prolongé des antigènes alimentaires avec la paroi intestinale qui pourrait entraîner une stimulation inappropriée et une réaction inflammatoire. Enfin, certaines études se sont intéressées à l'impact de la pollution atmosphérique des pays industrialisés sur l'incidence des MICI. Si, dans l'ensemble, l'exposition à la pollution atmosphérique ne semblait pas avoir d'effet, il a toutefois été montré qu'une exposition au dioxyde de soufre augmentait le risque de développer une RCH, et que le dioxyde d'azote augmentait celui de développer une MC (Kaplan et al., 2010).

➤ **Facteurs microbiens :**

Les interactions entre le microbiote intestinal, le système immunitaire et les fonctions de barrière intestinale jouent un rôle clé dans la physiopathologie des MICI. Ainsi, une infection par des agents pathogènes spécifiques et/ou une altération de la flore commensale, par exemple à la suite d'un traitement antibiotique, pourraient entraîner une augmentation du risque de développer une MICI (**Figure 49**).

Etude bibliographique



Nature Reviews | Immunology

Figure 49 : Altérations des interactions hôte-microbiote en conditions inflammatoires

(a) Chez les individus sains une barrière immunitaire efficace contient le microbiote dans la lumière intestinale et des mécanismes de "feedback" évitent une activation excessive des réponses immunitaires de l'hôte. Les bactéries "saines" libèrent des produits anti-inflammatoires et participent à l'ajustement des réponses de l'hôte et aident à prévenir les effets pro-inflammatoires de tous les pathobiontes présents dans le microbiote. (b) Les patients immunodéficients développent spontanément une inflammation intestinale lorsqu'ils sont exposés au microbiote. Dans la plupart des cas, un fond génétique complexe en association avec des changements de style de vie ou des pratiques médicales (antibiotiques, alimentation, stress, polluants, virus...) favorisent l'apparition d'une inflammation intestinale en affectant l'équilibre immunitaire et celui du microbiote intestinal. En particulier, le nombre d'agents pathogènes est augmenté chez ces patients, en association avec une diminution des bactéries "saines". (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010)

Infection par des agents pathogènes spécifiques

L'histoire des MICI est parsemée d'études rapportant l'isolement d'agents infectieux qui pourraient être responsables de la MC ou de la RCH. Ainsi, plusieurs microorganismes, tels que *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia tracomatis*, *Escherichia coli*, *Cytomegalovirus*, *Saccharomyces cerevisiae*, et beaucoup d'autres, ont été proposés comme ayant un rôle étiologique potentiel (Danese et al., 2004). Parmi eux, le rôle de *Mycobacterium paratuberculosis* dans le développement de la MC a été le centre d'une controverse majeure, puisque cette bactérie est responsable de la maladie de Johne, une iléite granulomateuse chronique chez les ruminants qui ressemble beaucoup à la MC. En effet, cette bactérie a initialement été retrouvée dans les tissus de patients MC, et

Etude bibliographique

pouvait être cultivée à partir des cellules mononuclées périphériques de patients dans 50 à 100% des cas (Chiodini et al., 1984 ; McNees et al., 2015). Cependant, les essais contrôlés n'ont pas montré d'effet bénéfique de la thérapie antituberculeuse chez les patients atteints par la MC (Thomas et al., 1998). Il a également été montré une augmentation du risque de développer une MICI trois fois supérieure après une gastro-entérite suite à l'infection par *Salmonella* ou *Campylobacter*, qui s'atténue après la première année post-infection (Gradel et al., 2009).

Une étiologie virale a également été proposée comme cause des MICI, en particulier pour la MC. La découverte de particules de type paramixovirus dans les granulomes endothéliaux de patients atteints par la MC suggérait qu'elle pouvait être due à une vascularite chronique provoquée par la persistance du virus de la rougeole dans la muqueuse (Wakefield et al., 1993). Certaines données épidémiologiques et sérologiques suggèrent également une association entre l'infection périnatale par le virus de la rougeole et la prédisposition à la MC (Ekbohm et al., 1996). Cependant, il est important de noter que le déclin progressif de l'infection par le virus de la rougeole au cours des dernières décennies avec l'augmentation concomitante de la MC pendant la même période va à l'encontre d'un rôle étiologique de ce virus dans la MC. L'hypothèse selon laquelle la vaccination contre la rougeole, plutôt que son infection, pourrait être un facteur de risque de la MC a également été soulevée, mais les études ultérieures n'ont pas confirmé cette association (Ghosh et al., 2001).

Dérégulation de la flore commensale intestinale

Au cours des vingt dernières années, l'idée d'une étiologie microbienne due en réalité à une altération de la flore commensale a été appuyée par de nombreuses études (Guarner and Malagelada, 2003). Ainsi, il a été montré que l'utilisation d'antibiotiques durant les premières années de la vie était plus fréquente chez les patients MICI (58%) que chez les contrôles (39%) (Shaw et al., 2010). Cependant, il est difficile d'attribuer un rôle causal direct de l'utilisation précoce d'antibiotiques car il est difficile d'identifier s'ils étaient utilisés pour traiter les symptômes avant le diagnostic formel d'une MICI ou si une infection sous-jacente justifiait leur prescription, ce qui aurait été le véritable déclencheur du développement de la maladie (Ananthakrishnan, 2013). A l'inverse, il a été montré que l'utilisation d'antibiotiques durant la maladie améliorait l'état des patients MICI (Wang et al., 2012). L'administration de prébiotiques (principalement des bactéries lactiques), définis comme des aliments microbiens vivants ayant un rôle bénéfique en modulant l'équilibre du microbiote intestinal, a également montré une amélioration chez les patients MICI et dans des modèles expérimentaux de colites (Campieri and Gionchetti, 1999). De plus, il a été rapporté une augmentation du nombre de bactéries qui composent le bio-film recouvrant l'épithélium chez les patients MICI, et une perte de la tolérance immunitaire contre la flore entérique chez ces patients (Duchmann et al., 1995 ; Swidsinski et al., 2002). Enfin, il a été montré dans de nombreux modèles animaux que l'inflammation intestinale ne se développait pas lorsque les animaux étaient gardés en conditions axéniques ("germ-free") (Peloquin and Nguyen, 2013 ; Taurog et al., 1994). L'hypothèse de l'implication d'un lien entre l'inflammation intestinale et la détection anormale de bactéries est également appuyée par la découverte de certaines mutations génétiques dans le cas des MICI, comme celle du gène NOD2 codant pour une protéine impliquée dans la reconnaissance bactérienne (Girardin et al., 2003).

d- Traitements

Le traitement des MICI se fait au cas par cas en fonction de la sévérité des symptômes, du site et de l'étendue des lésions ainsi que de la durée d'évolution de la maladie. Leur objectif est de contrôler les poussées, de soulager la douleur et de prévenir les récurrences afin d'éviter le recours à la chirurgie.

➤ **Traitements médicamenteux :**

Les anti-inflammatoires

Les traitements anti-inflammatoires sont souvent les premiers à être utilisés dans le traitement des MICI : ils incluent les dérivés salicylés et les corticoïdes.

Les dérivés salicylés sont les plus anciens médicaments utilisés dans le traitement des MICI, le premier étant la sulfasalazine qui consiste en 5-ASA (acide 5-aminosalicylique ou mésalazine) couplé à la sulfapyridine par une liaison azoïque, mais de nombreux autres dérivés sont également utilisés. Une fois dans le colon, cette liaison est clivée par les azoréductases bactériennes et libère le 5-ASA et la sulfapyridine, alors qu'il est rapidement absorbé dans le grêle et éliminé dans les selles ou par voie hépatique. Ainsi ces dérivés sont majoritairement utilisés dans le cas de la RCH du à leur effet thérapeutique local au niveau du colon, et constituent le traitement majeur pour le maintien en rémission des formes quiescentes. Leur mécanisme d'action implique une inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 et TNF- α , une inhibition de la voie des lipoxigénases, une élimination des radicaux libres et des oxydants ainsi qu'une inhibition de la voie NF κ B (Barnes and Karin, 1997 ; Pithadia and Jain, 2011).

Les corticoïdes peuvent être utilisés en association avec les dérivés salicylés et représentent le traitement de référence durant les poussées inflammatoires d'intensité moyenne à sévère. Ils peuvent être administrés oralement, sous forme de lavements ou par voie systémique. Les corticoïdes suppriment l'inflammation en bloquant les premières manifestations de l'inflammation, y compris l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la vasodilatation et l'infiltration par les neutrophiles, ainsi que les conséquences ultérieures de l'inflammation telle que l'activation des fibroblastes, la prolifération vasculaire et le dépôt de collagène. Ils influencent également les réponses immunologiques telles que les réponses des lymphocytes T aux antigènes, diminuent la production de cytokines inflammatoires et interfèrent avec la production de NF κ B, bloquant ainsi la réaction inflammatoire (Ito et al., 2006 ; Triantafillidis, 2011). Les corticoïdes classiques induisent de nombreux effets secondaires, mais la recherche a permis la mise au point d'un corticoïde de synthèse, le budésonide, ayant des effets systémiques limités. Cependant, environ 1/3 des patients ne répondent pas à ce traitement et sont considérés comme stéroïdes-résistants, même si les mécanismes impliqués sont encore flous (Pithadia and Jain, 2011).

Les immunosuppresseurs

Les immunosuppresseurs occupent aujourd'hui une place importante dans le traitement des MICI, puisqu'on estime que près de 56% des patients sont actuellement traités par ces molécules. Ces médicaments réduisent également l'inflammation, mais plutôt via un ciblage du système immunitaire en inhibant par exemple la prolifération et l'activation des lymphocytes (Triantafillidis, 2011). On retrouve ainsi des molécules comme l'azathioprine et son dérivé la 6-mercaptopurine qui

Etude bibliographique

sont des analogues de purines inhibant la prolifération des lymphocytes ainsi que la synthèse de molécules pro-inflammatoires et d'anticorps. Les patients atteints par la MC qui ne répondent pas à ces différents médicaments peuvent également être traités par du méthotrexate afin d'induire ou de maintenir une rémission (Hendrickson et al., 2002). En effet, cet anti-métabolite induit une inhibition de l'activation des lymphocytes T et de l'expression de molécules d'adhésion (Johnston et al., 2005). Concernant la cyclosporine elle est majoritairement utilisée dans le cas de la RCH, principalement lors de poussées inflammatoires sévères, et inhibe la transcription de gènes codant pour des cytokines inflammatoires dans les lymphocytes T activés (D'Haens et al., 2001 ; Matsuda and Koyasu, 2000).

Parmi les immunosuppresseurs on retrouve également les anti-TNF α tels que l'infliximab ou l'adalimumab utilisés dans le traitement de la MC et de la RCH, ou encore le golimumab utilisé pour traiter la RCH. En effet, une production accrue de TNF α est retrouvée chez les patients MICI, et une inhibition de cette cytokine par ces anticorps monoclonaux s'est révélée être une stratégie de traitement efficace (Pithadia and Jain, 2011). Ainsi, leur utilisation limite les recours à la chirurgie, permet une cicatrisation de la muqueuse et améliore la qualité de vie des patients en plus d'entraîner une rémission de la maladie chez environ un tiers des patients après un an de traitement. Toutefois, il est important de noter que certains patients ne peuvent pas prendre ce type de thérapie biologique, notamment ceux ayant eu la tuberculose, une infection fongique ou encore l'hépatite B, à cause d'une possible réactivation.

Autres

Les antibiotiques à large spectre tel que le metronidazole sont notamment utilisés lors des poussées d'intensité légère à modérée, en particulier chez les patients avec une atteinte péri-anale et lors de complications infectieuses (Hendrickson et al., 2002). L'administration de probiotiques afin d'améliorer l'équilibre microbien semble également prometteuse pour la prise en charge des patients MICI. De nouveaux traitements émergents font aussi leur apparition, en partie du fait que certains patients ne répondent pas ou plus aux traitements existants (Triantafillidis, 2011). Parmi eux on retrouve des molécules anti-adhésion (anti-intégrines) qui empêchent le recrutement de cellules immunitaires depuis la circulation sanguine, ainsi que des anticorps bloquant le récepteur de l'IL-6 afin de bloquer les effets inflammatoires de cette cytokine. De même, des facteurs stimulant les réponses immunitaires innées ainsi que des facteurs de croissance peuvent être utilisés afin de moduler l'inflammation intestinale et la réparation de la muqueuse.

➤ **Mesures hygiéno-diététiques :**

Outre les traitements médicamenteux, un certain nombre de mesures diététiques et de changements dans le mode de vie peuvent permettre une amélioration des symptômes et diminuer le risque de rechutes. Ainsi, une alimentation pauvre en graisses et en sucres est associée à des effets bénéfiques chez certains patients MICI. La consommation d'alcool, de plats épicés ou encore de caféine peut également aggraver les symptômes. De plus, du fait des nombreuses carences engendrées par une malabsorption chez ces patients, une supplémentation en fer, en calcium et en vitamines B12 et D peut être prescrite. Une nutrition parentérale peut également être réalisée durant les poussées inflammatoires aiguës afin de limiter les stimuli de la muqueuse tout en permettant un apport en nutriments efficace (Rajendran, 2010). Les prébiotiques, des sucres non

digestibles qui stimulent la croissance de bactéries particulières de la microflore, ont montré leur effet bénéfique sur les fonctions entériques (Damaskos and Kolios, 2008). Enfin, pour les patients atteints d'une MC, le sevrage tabagique fait partie intégrante du traitement. De plus, l'activité physique est conseillée et une réduction du stress, souvent à l'origine d'une exacerbation des symptômes, permet une meilleure gestion de la maladie par les patients.

➤ **Traitement chirurgical :**

Malgré ces avancées thérapeutiques, 70 à 80% des patients avec une MC et 30 à 40% des patients avec une RCH ont recours à la chirurgie durant leur vie (Hancock and Mortensen, 2008). Pour les patients atteints par la RCH, la chirurgie est curative et est indiquée lors d'un échec de la prise en charge médicale, de complications aiguës telles qu'une colite fulminante, de perforations, de saignements sévères ou encore d'affections chroniques telles que le développement d'un cancer (Ferrari et al., 2016). Dans ce cas, la chirurgie consiste le plus souvent en une colectomie abdominale totale (ablation du colon et du rectum) avec une iléostomie terminale qui va permettre le raccord de l'intestin grêle à la paroi abdominale afin de recueillir à l'extérieur le contenu du transit intestinal (Cohen et al., 2005). Chez les patients atteints par la MC, la chirurgie n'est pas curative mais est nécessaire lorsque la thérapie médicale est incapable de contrôler les symptômes ou lors de complications comme des fistules, des abcès ou des sténoses (Gardiner and Dasari, 2007). Elle dépend de la localisation de la maladie mais conduit généralement à la résection du segment intestinal malade suivie d'une anastomose afin de reconnecter les deux extrémités intestinales. D'autres options sont également possibles telles qu'un contournement intestinal, la création d'une iléostomie ou encore une stricturoplastie qui consiste en une plastie d'élargissement des sténoses (Hwang, 2008).

e- Modèles expérimentaux

Schématiquement, les modèles animaux de MICI peuvent être classés dans différentes catégories selon le mode d'induction de l'inflammation intestinale (Neurath, 2012) (**Figure 50**). Ainsi, on retrouve des modèles spontanés, comme le Cotton Top Tamarin qui est un primate de Nouvelle Zélande développant spontanément une colite ulcéreuse très proche des caractéristiques histologiques de la RCH. De nombreuses études utilisent plutôt des modèles de colites induits chimiquement avec des agents comme le DSS (Dextran Sodium Sulfate), le TNBS (Trinitrobenzenesulfonic acid) ou encore l'acide acétique. Ces modèles ont l'avantage de créer une inflammation dans des souches de souris consanguines avec un système immunitaire normal. Il existe également des modèles de transfert adoptif où les cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ sont transférées à des souches de souris immunodéprimées telles que les souris KO RAG ou SCID. Le modèle prototypique de ce groupe est le modèle dit CD4⁺CD45RB^{high} dans lequel des cellules T naïves sont transférées à des souris immunodéficientes. Ce modèle a l'avantage d'avoir une grande reproductibilité dans l'induction d'une inflammation chronique dépendante des lymphocytes T. Enfin, il existe des modèles génétiquement modifiés comprenant des souris transgéniques et des souris avec un KO conditionnel ou avec une délétion générale. En exemple, on retrouve notamment les souris transgéniques IL-7 et STAT4, les souris avec un KO conditionnel LysMCre STAT3 ou encore les souris KO IL-10.

Etude bibliographique

Spontaneous models	Genetically engineered (knockout mice)
Cotton-top tamarin	<i>STAT3</i> (<i>LysMCre conditional KO</i>)
SAMP1/Yit	<i>TGFβ-1</i>
C3H/HeJBir mouse substrain	<i>ITF</i>
Chemically-induced models	<i>IL-2/IL-2R</i>
DSS, AOM/DSS	<i>IL-10</i>
Oxazolone	<i>TNF^{DARE}</i>
TNBS (DNBS)	<i>TCRα/β</i>
Peptidoglycan polysaccharide	<i>Caspase-8 (IEC specific)</i>
Immune complex	<i>FADD (IEC specific)</i>
Indomethacin	<i>NEMO (IEC specific)</i>
Carrageenan	<i>Gai2</i>
Acetic acid	<i>Keratin-8</i>
Cyclosporin A	<i>Mdr1α</i>
Genetically engineered models (transgenic animals)	<i>CRF2-4</i>
STAT4 transgenic (CMV promoter)	<i>WASP</i>
IL-7 transgenic (SR promoter)	<i>XBP-1</i>
HLA-B27/β ₂ -microglobulin transgenic	<i>T-bet(-/-)RAG2(-/-)(TRUC)</i>
HSV-thymidine kinase (GFAP astroglia-specific promoter)	T cell transfer models
<i>N-cadherin</i> dominant negative	CD45RB-high cells into RAG/SCID mice
Gp39 overexpression	CD62L-high cells into RAG/SCID mice
<i>TGF-RII</i> dominant negative (villin IEC-specific promoter)	CD45RB cells transfer into Tgε26
	Hsp60 CD8+ T cells

Figure 50 : Les principaux modèles animaux de MICI (D'après Neurath, 2012)

Bien qu'aucun de ces modèles ne reflète exactement tous les aspects des MICI chez l'Homme (par exemple les poussées spontanées de la maladie), ils ont toutefois permis la découverte de la plupart des principes clés de la pathogénèse des MICI (Neurath, 2012). Ils ont ainsi permis de mettre en évidence que des modifications génétiques influençaient fortement le développement d'une inflammation chronique intestinale. De plus, ils ont permis de mettre en évidence qu'une altération de la BEI semblait concourir à l'inflammation, et plus particulièrement des altérations des propriétés de protection, de perméabilité et de réparation, détaillées ci-après.

3) Altérations de la barrière épithéliale intestinale

Une des caractéristiques des MICI est un défaut des fonctions de la BEI qui peut affecter différents mécanismes de protection. Une altération des mécanismes immunitaires innés pour la défense de l'épithélium ainsi qu'une augmentation de la perméabilité intestinale en association avec un défaut de réparation entraînent alors des réactions immunitaires excessives, conduisant à une inflammation chronique chez ces patients.

α- Défaut de protection

Il est désormais admis que la communauté microbienne intestinale semble être fortement impliquée dans la pathogénèse des MICI. Des études montrant une augmentation du marquage de bactéries associées à la surface de la muqueuse et de bactéries intracellulaires chez ces patients confirment une déficience dans les mécanismes de protection de l'épithélium (Kleessen et al., 2002 ; Swidsinski et al., 2009). Ainsi, chez les patients MICI, une altération des mécanismes innés de protection semblent être impliquée dans le développement de l'inflammation chronique (**Figure 51**).

Etude bibliographique

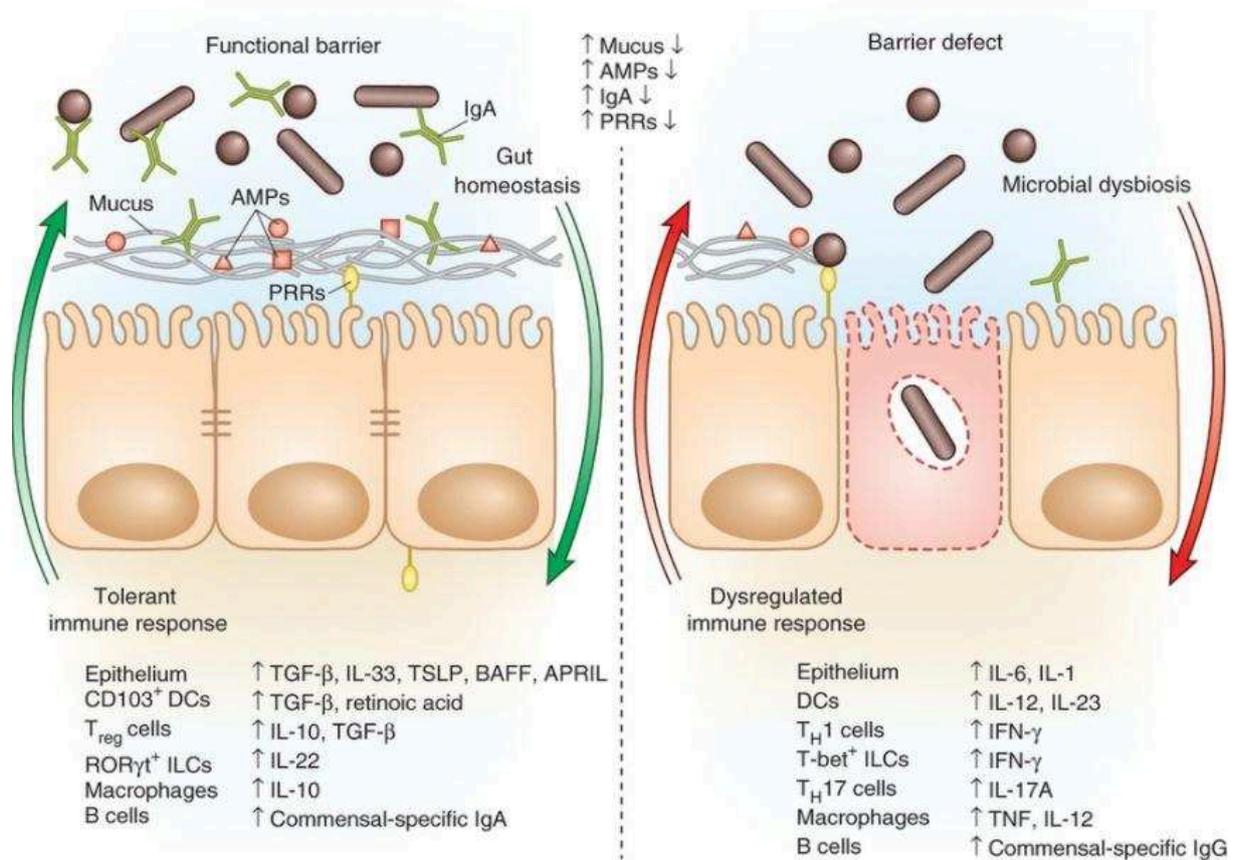


Figure 51 : Altérations des mécanismes innés de protection de la BEI conduisant à une inflammation chronique

Lorsque la BEI est fonctionnelle on retrouve des quantités normales de mucus, de peptides anti-microbiens (AMP), d'immunoglobulines (IgA) et de PRR (Pattern Recognition Receptor). Le système immunitaire dirige une réponse tournée vers la tolérance du microbiote. Les PAMPs (Pathogens Associated Molecular Patterns) stimulent la sécrétion épithéliale de TGFβ, d'IL-33, de TSLP, de BAFF ou encore d'APRIL afin d'améliorer la réponse immunitaire tolérogène au microbiote. Les cellules dendritiques CD103+ aident au développement de cellules Treg qui produisent de l'IL-10 et du TGFβ. Elles vont également promouvoir la sécrétion d'IgA spécifiques des bactéries commensales. L'intégrité épithéliale est également augmentée par la sécrétion d'IL-22. En conditions inflammatoires comme dans le cas des MICI, les mécanismes de protection innés sont altérés et entraînent une BEI défectueuse. Le système immunitaire dirige alors une réponse pro-inflammatoire afin d'éliminer les bactéries envahissantes. En cas de dysbiose, l'épithélium sécrète de l'IL-6 et de l'IL-1. La sécrétion d'IL-12 et d'IL-23 par les cellules dendritiques et les macrophages favorise les réponses Th1 et Th17 qui vont sécréter de forts taux d'IFNγ. (Brown et al., 2013)

Des variations dans l'épaisseur, la continuité ou encore dans la composition de la couche de mucus ont été rapportées chez les patients MICI, en particulier dans le cas de la RCH. Ainsi, il a été montré que l'épaisseur de mucus était plus fine chez ces patients, et présentait un aspect discontinu (Pullan et al., 1994). De plus, une diminution de la concentration en phosphatidylcholine et une réduction d'une fraction spécifique de glycoprotéines de mucines dans la muqueuse colique ont également été rapportées (Braun et al., 2009 ; Podolsky and Isselbacher, 1984 ; Tysk et al., 1991). Une réduction de la sulfation des mucines est aussi observée, les sulfates conférant une charge négative aux mucines et augmentant leur résistance contre la dégradation enzymatique par les

Etude bibliographique

bactéries (Raouf et al., 1992). La déplétion de mucine 2 dans un modèle génétique de souris MUC2-/- induit d'ailleurs une colite spontanée (Van der Sluis et al., 2006). Une dérégulation de la voie Notch est également décrite dans le contexte de la RCH, conduisant à une déplétion des cellules de Goblet productrices de mucus (Zheng et al., 2011).

Les patients MICI présentent une expression anormale de peptides anti-microbiens (Wehkamp et al., 2007). En particulier, une réduction de l'activité anti-microbienne a été retrouvée dans la muqueuse intestinale de patients MC avec une diminution de la production d' α -défensines par les cellules de Paneth, en association avec des mutations du gène NOD2 (Wehkamp et al., 2004). De nombreux autres peptides anti-microbiens ont été décrits pour être réduits dans les MICI, tels que des β -défensines ou des cathélicidines (Fahlgren et al., 2004 ; Schaubert et al., 2006 ; Wehkamp et al., 2003). Chez ces patients, une augmentation de la production d'IgG plutôt que d'IgA spécifiques des bactéries commensales est également décrite (Macpherson et al., 1996).

Des altérations dans la reconnaissance des pathogènes par des PRR (Pathogen Recognition Receptor) semblent également impliquées dans la pathogénèse des MICI. En particulier, des mutations du gène NOD2/CARD15 codant pour un PRR sont associées à une augmentation de la susceptibilité à développer une MICI. De même, les animaux NOD2-/- développent plus facilement une infection bactérienne et ont une production diminuée d' α -défensines par les cellules de Paneth (Kobayashi et al., 2005). De plus, une augmentation de l'expression des TLR2 et 4 est observée dans la muqueuse enflammée de patients MICI, qui reconnaissent respectivement les peptidoglycanes et le LPS bactérien (Szebeni et al., 2008). Ces altérations pourraient ainsi compromettre la capacité des CEI à distinguer les bactéries commensales et pathogènes ou amplifier des réponses immunitaires non appropriées. Enfin, il a été montré que la souche *E coli* invasive adhérente (AIEC) adhérait aux entérocytes isolés de patients MC mais pas de patients contrôles, grâce à l'expression épithéliale de la molécule d'adhésion CEACAM6 (Barnich et al., 2007).

Plus récemment, l'implication dans les MICI du stress du réticulum endoplasmique (RE) et de la réponse aux protéines mal repliées (UPR : unfolded protein response) a été le sujet de nombreuses études. En particulier, des souris IRE1 β -/-, déficientes pour un transducteur du stress du RE, sont plus sensibles à l'induction d'une colite (Bertolotti et al., 2001). De même, la délétion épithéliale de XBP1, un facteur de transcription impliqué dans la réponse du stress du RE, augmente ce stress ainsi que l'inflammation intestinale spontanée mais aussi la sensibilité à l'induction d'une colite. Chez ces souris, les cellules de Paneth sont absentes et le nombre de cellules de Goblet est réduit dans l'intestin grêle, résultant en une diminution de la sécrétion de mucus et de peptides anti-microbiens (Kaser et al., 2008). Il a également été montré qu'une protéine chaperonne de la réponse au stress retrouvée dans le RE, la protéine Gp96, était surexprimée à la surface apicale des CEI chez les patients MC, et était utilisée comme récepteur par la souche AIEC afin de permettre son invasion (Rolhion et al., 2010).

Enfin, il a été montré une altération des processus d'autophagie, impliqués dans l'homéostasie cellulaire mais aussi dans la protection anti-bactérienne en éliminant les pathogènes intracellulaires (Noda and Yoshimori, 2009). Ainsi, plusieurs gènes de susceptibilité ont été mis en évidence dans les MICI, notamment ATG16L1 et IRGM, qui conduisent à des défaut d'exocytose des granules des cellules de Paneth et sont associés à des défaut d'autophagie (Hampe et al., 2007 ; Parkes et al., 2007). De plus, il a été montré que les PRR NOD1 et NOD2 induisaient l'autophagie de bactéries invasives en recrutant ATG16L1 à la membrane plasmique au niveau du site d'entrée de la

Etude bibliographique

bactérie (Travassos et al., 2010). Le fait qu'une mutation des gènes codant pour ces protéines soit retrouvée chez certains patients MICI suggère ainsi une implication d'un défaut de reconnaissance et d'élimination des bactéries dans la pathogénèse des MICI.

b- Défaut de perméabilité

Outre le rôle central des CEI dans le maintien des fonctions de barrière grâce à une activation précoce des mécanismes immunitaires innés, l'épithélium constitue également une couche imperméable empêchant le passage de pathogènes et de molécules nocives. Une perturbation de cette barrière, entraînant une augmentation de la perméabilité intestinale, peut induire une hyperactivation du système immunitaire et une inflammation intestinale chronique (Pastorelli et al., 2013). Depuis 1972, il a été postulé qu'un défaut primaire de perméabilité intestinale pourrait conduire au développement d'une inflammation persistante, comme c'est le cas dans les MICI (Shorter et al., 1972). Ainsi, au début des années 80, il a été reporté une augmentation de la perméabilité intestinale chez des enfants atteints d'une MC active (Pearson et al., 1982). Depuis, cette augmentation de perméabilité a été observée chez de nombreux patients MC et RCH (Arslan et al., 2001 ; Meddings et al., 1994 ; Welcker et al., 2004). De plus, plusieurs études ont rapporté une augmentation de perméabilité pas seulement chez les patients MICI, mais également dans un sous-ensemble de leurs parents au premier degré, suggérant que cette perméabilité accrue pourrait être un facteur primaire dans la pathogénèse de la maladie, précédant le développement de l'inflammation (Hollander et al., 1986 ; May et al., 1993). Des études animales supportent également une tendance au développement de l'inflammation au niveau des zones intestinales ayant une perméabilité accrue, avec une augmentation de cette perméabilité qui précéderait le début de l'inflammation (Madsen et al., 1999). Le fait qu'une augmentation de la perméabilité intestinale soit retrouvée chez les époux de patients MC suggère également une implication de facteurs environnementaux sur ces altérations (Breslin et al., 2001 ; Söderholm et al., 1999). Cette augmentation de perméabilité semble majoritairement due à une altération des jonctions serrées ainsi qu'à une augmentation de l'apoptose épithéliale (**Figure 52**).

In vitro, le traitement avec des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF ou l'IFN γ est connu pour induire une rupture des jonctions serrées, par exemple via une endocytose des protéines occludine ou JAM-A (Bruewer et al., 2003 and 2005 ; Utech et al., 2005 ; Wang et al., 2005). L'induction chimique d'une colite représente le modèle animal le plus utilisé pour induire une inflammation intestinale. Ainsi la colite au DSS (Dextran Sodium Sulfate) endommage directement l'épithélium colique entraînant une perturbation de la continuité de la BEI et augmentant ainsi la translocation de bactéries ou d'antigènes luminaux qui seront reconnus par le système immunitaire de la muqueuse intestinale (Okayasu et al., 1990). Les souris exposées au DSS développent une augmentation de la perméabilité avant l'apparition de l'inflammation colique, et plusieurs changements dans l'assemblage des protéines des jonctions serrées se produisent pendant le stade pré-inflammatoire de ce modèle, comme la perte complète de l'expression de ZO-1 ou encore l'augmentation de l'expression de la claudine-1 (Poritz et al., 2007). De la même manière, une délétion du gène codant pour la protéine transmembranaire JAM-A entraîne une augmentation de la perméabilité épithéliale colique due à une augmentation des claudines 10 et 15 capables former des pores (Laukoetter et al., 2007). Chez les patients MC, une réduction de l'expression des protéines des

Etude bibliographique

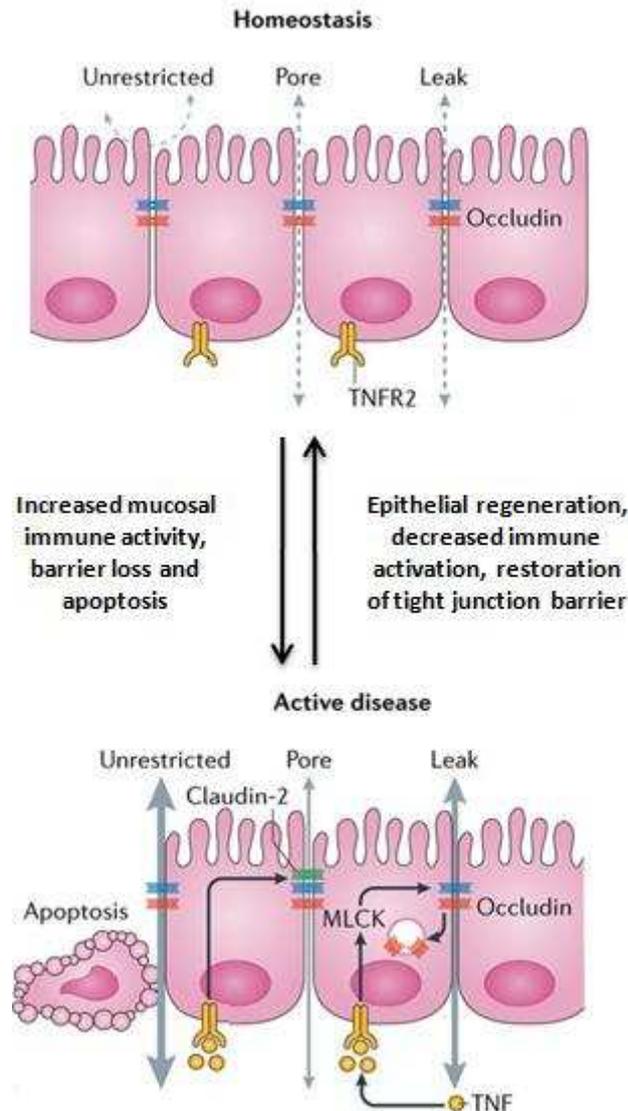
jonctions serrées occludine et claudines 5 et 8 a été détectée (Zeissig et al., 2007). De plus, la claudine-2 est capable de former des pores sélectifs, et son expression est retrouvée augmentée chez ces patients, conduisant à une augmentation de la perméabilité paracellulaire. Cette augmentation est d'ailleurs probablement impliquée dans les diarrhées chez ces patients, à cause d'une augmentation du passage de cations (Amasheh et al., 2002). Dans la RCH, la claudine-2 est également augmentée alors que l'occludine et les claudines 1 et 4 sont diminuées (Heller et al., 2005). Une diminution de l'expression de la protéine JAM-A est également retrouvée chez les patients MICI (Vetrano et al., 2008). De la même manière, l'IL-13 est retrouvée augmentée chez les patients RCH et semble jouer un rôle néfaste sur la BEI puisqu'elle diminue la résistance transépithéliale et augmente l'expression de claudine-2 (Heller et al., 2005). Enfin, la MLCK phosphoryle la MLC et est impliquée dans l'ouverture des jonctions serrées en induisant une contraction du cytosquelette d'actine et myosine. Il a été montré que le TNF α et l'IFN γ augmentaient l'expression de la MLCK, conduisant à une augmentation de la perméabilité paracellulaire *in vitro* (Wang et al., 2005). Une étude a également montré qu'une activation de la MLCK augmentait la perméabilité paracellulaire aux macromolécules non chargées, mais qu'elle pourrait aussi déclencher la synthèse d'IL-13 et l'augmentation de l'expression de claudine 2 associée (Weber et al., 2010). Or l'activité de la MLCK est retrouvée augmentée chez les patients MICI (Blair et al., 2006).

De la même manière, des souris génétiquement modifiées pour exprimer une N-cadhérine dominante négative spécifiquement dans les CEI de l'intestin grêle développent spontanément un phénotype ressemblant à une MC (Hermiston and Gordon, 1995). Les cadhérines, associées aux caténines, sont le principal constituant des jonctions adhérentes qui maintiennent les cellules entre elles et sont associées au cytosquelette d'actine (Pastorelli et al., 2013). Chez ces souris, l'expression modifiée de la N-cadhérine interfère avec l'E-cadhérine et conduit à des ruptures de la BEI et à la génération de lésions inflammatoires. Les souris mutantes pour la N-cadhérine démontrent également une prolifération et une migration épithéliale aberrante ainsi qu'une augmentation de la mort cellulaire programmée dans les cryptes intestinales qui peuvent conduire à la formation d'adénome. Des souris déficientes en p120-caténine épithéliale, un régulateur cytoplasmique direct de l'expression et de la fonction de la E-cadherine, montrent également un phénotype similaire aux souris N-cadhérine dominantes négatives (Smalley-Freed et al., 2010). Le gène codant pour la E-cadhérine (CDH1) a d'ailleurs été identifié comme un gène de susceptibilité à développer une RCH (UK IBD Genetics Consortium et al., 2009).

Une augmentation de l'apoptose épithéliale résulte également en une augmentation de la perméabilité intestinale (Arrieta, 2006). Notamment, il a été montré chez des rats que l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales intestinales se produisait de façon simultanée à l'augmentation de la perméabilité de la BEI (Sun et al., 1998). De la même manière, l'induction de la voie extrinsèque de l'apoptose sur une lignée cellulaire de CEI par un ligand du récepteur de mort Fas était associée à une diminution de la résistance transépithéliale et à l'augmentation de la perméabilité aux petites molécules (Abreu et al., 2000). Plusieurs études ont déjà montré une augmentation de l'apoptose des CEI chez les patients MICI, et suggèrent un rôle central de sa dérégulation dans les altérations de la muqueuse observées chez ces patients (Di Sabatino et al., 2003 ; Iwamoto et al., 1996 ; Ruemmele et al., 2002 ; Sipos et al., 2005). A l'aide d'une endomicroscopie laser confocale il a également été montré une augmentation du nombre de trous dans la muqueuse de patients atteints par la MC (Goetz and Kiesslich, 2010 ; Kiesslich et al., 2007). Une étude avait montré que l'inflammation colique

Etude bibliographique

chez les patients MICI ou chez des souris avec une colite induite au DSS semblait induire l'apoptose des CEI via la voie intrinsèque, puisque dans les deux cas on retrouvait une augmentation des protéines p53 et PUMA (Dirisina et al., 2011). Enfin, l'IL-13 augmentée chez les patients RCH augmente également l'apoptose des CEI (Heller et al., 2005).



Durant l'homéostasie, l'épithélium intact régule la perméabilité paracellulaire grâce aux jonctions serrées.

Au cours d'une MICI, l'activité immunitaire est augmentée et conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF. Elles entraînent une augmentation de la perméabilité notamment via une augmentation de l'expression de la MLCK et d'une endocytose des protéines jonctionnelles comme l'occludine. La perméabilité paracellulaire dépendante de la formation de pores est également accrue via une augmentation de l'expression de claudine-2. Au fur et à mesure que la pathologie inflammatoire s'installe, on observe une augmentation de l'apoptose épithéliale, aggravant encore plus les perturbations de perméabilité.

(D'après Odenwald and Turner, 2016)

Figure 52 : Dérégulation du contrôle de la perméabilité paracellulaire dans les MICI

c- Défaut de réparation

En condition physiologique, le renouvellement continu des CEI contribue au maintien des fonctions de la BEI en reconstituant la couche épithéliale avec de nouvelles cellules afin de permettre une réparation rapide. Chez les patients MICI, des dommages épithéliaux sont fréquemment observés dans les lésions de la muqueuse, et une rémission complète nécessite à la fois la disparition de l'inflammation et la réparation de l'épithélium endommagé (Fiorino et al., 2011 ; Okamoto and Watanabe, 2005). De plus, des dysfonctions locales de la BEI identifiées par endomicroscopie laser confocale sont prédictives de rechutes chez ces patients (Kiesslich et al., 2012).

Etude bibliographique

Ainsi l'inflammation semble jouer un rôle néfaste sur les processus de réparation, puisque le TNF α , retrouvé augmenté chez ces patients, provoque une desquamation de la BEI (Watson and Hughes, 2012). De même, des niveaux supérieurs d'IL-13 sont retrouvés chez les patients RCH, et il a été montré que cette cytokine diminuait la vitesse de restitution épithéliale (Heller et al., 2005). Les études GWAS ont également permis de mettre en évidence de nombreux gènes de susceptibilité impliqués dans le développement des MICI. Parmi eux, on retrouve des gènes codant pour des protéines STAT et il a notamment été montré une diminution de l'activité de STAT5 dans les CEI de colons enflammés de patients MC, connue pour diminuer l'activité inflammatoire de NF κ B et favoriser la réparation épithéliale (Gilbert et al., 2012).

Enfin, chez les patients MICI, il a été montré que la localisation de RhoA était déplacée vers le cytosol des CEI et que l'inflammation entraînait une altération de la signalisation de RhoA qui n'était alors plus activée. Une délétion épithéliale génétique de RhoA chez des souris provoquait des altérations cytosquelettiques et une altération de l'élimination des cellules entraînant une perte d'intégrité épithéliale conduisant à une inflammation intestinale (López-Posadas et al., 2016). Il est toutefois important de noter qu'une activation de RhoA est également rapportée dans de nombreux cancers, tel que le cancer colorectal où RhoA promeut l'invasion des ganglions et des vaisseaux sanguins, associée à une diminution de la survie des patients (Jeong et al., 2016). Ainsi, l'utilisation à long terme de statines, connues pour inhiber RhoA, permet de réduire le risque de développer un cancer colorectal chez les patients MICI (Sebastian et al., 2014). Cependant deux rapports de cas ont montré que l'utilisation de statines pouvait entraîner le développement d'une colite semblable à une RCH, et le même type de résultat a été observé dans des modèles expérimentaux (Jahovic et al., 2006 ; Mukhopadhyaya et al., 2008 ; Rea, 2002). L'implication de RhoA dans l'homéostasie intestinale ne semble donc pas aussi claire qu'on peut le penser, et suggère qu'un déséquilibre de sa régulation, soit via une augmentation de son activité, soit via une diminution, pourrait entraîner des effets néfastes conduisant à une inflammation.

Ainsi, une diminution des fonctions de protection assurées par les CEI en conditions physiologiques, associée à des perturbations de l'intégrité des jonctions intercellulaires et à une augmentation de l'apoptose épithéliale conduit à des altérations des mécanismes contrôlant la perméabilité et la réparation de la BEI. Chez les patients MICI, ces défauts contribuent au développement et à l'entretien de l'inflammation et des stratégies visant à renforcer la BEI représentent ainsi une piste thérapeutique majeure dans ces pathologies.

4) Altérations du système nerveux entérique

a- Altérations neuronales

Les patients MICI présentent des symptômes qui suggèrent une perturbation des fonctions intestinales, telles que des changements sensori-moteurs ou des altérations de sécrétion (**Figure 53**). Ces anomalies illustrent l'impact de l'inflammation sur la signalisation neuronale. Schématiquement, les modifications neuronales liées à l'inflammation peuvent être classées en deux groupes : celles qui altèrent la morphologie structurale et celles qui altèrent la neurotransmission entérique (Lakhan and Kirchgessner, 2010).

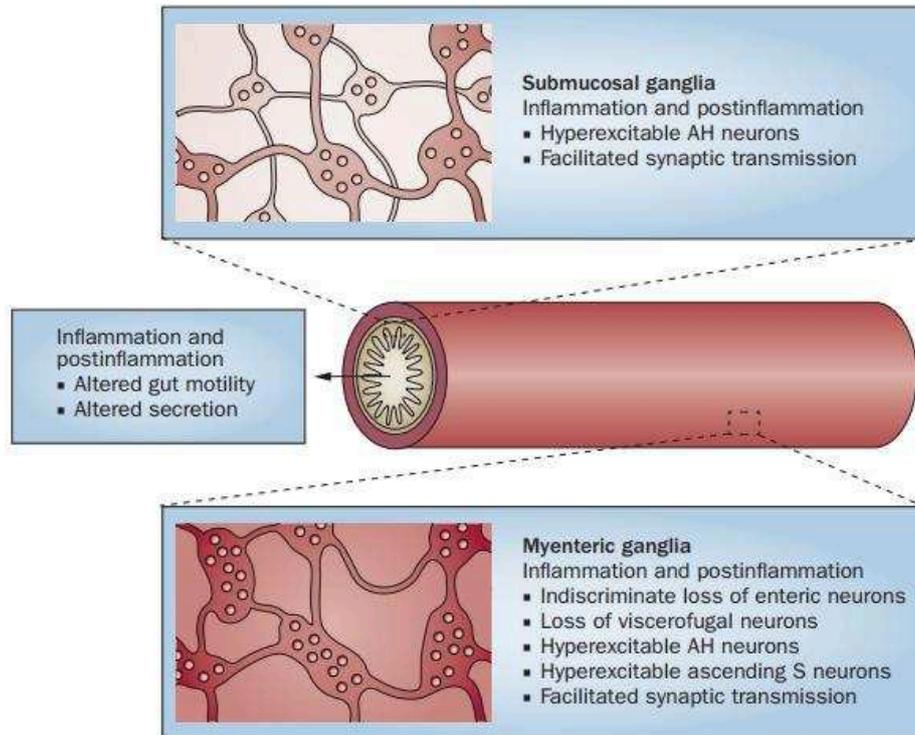


Figure 53 : Neuroplasticité des neurones entériques pendant et après une inflammation intestinale
L'inflammation entraîne des altérations de motilité et de sécrétion intestinale, associées à des modifications neuronales au niveau des plexus sous muqueux et myentérique. Au niveau du plexus myentérique l'inflammation provoque une perte rapide des neurones entériques et des neurones sensitifs viscéraux. Parmi les neurones restants, les neurones AH deviennent hyperexcitables et la communication synaptique entre eux est facilitée. Ces altérations persistent même après la résolution de l'inflammation. (Brierley and Linden, 2014)

➤ Altérations morphologiques et perte neuronale :

De nombreuses études ont décrit des changements structuraux neuronaux chez les patients MICI, avec une augmentation de la dégénérescence neuronale (De Giorgio et al., 2004 ; Geboes and Collins, 1998). En particulier, une augmentation de la taille (hypertrophie) des faisceaux nerveux ainsi qu'une augmentation de leur nombre (hyperplasie) est retrouvée chez ces patients (Villanacci et al., 2008). L'hypertrophie et l'hyperplasie du tronc nerveux ont été principalement rapportées dans la muqueuse, la sous-muqueuse et le plexus myentérique dans l'iléon ou le colon de patients MC, et ces anomalies structurales semblent associées à l'étendue de l'infiltration inflammatoire. Des anomalies de la muqueuse et de la sous-muqueuse sont retrouvées moins fréquemment chez les patients RCH. Cette augmentation de la densité neuronale au niveau des zones enflammées pourrait contribuer à l'intensité de l'inflammation, et il a été montré qu'une hyperplasie neuronale pouvait être un facteur de prédisposition au développement d'une inflammation de la muqueuse chez des nouveaux-nés (Margolis et al., 2011 ; Mya et al., 1994).

Une dégénérescence et une nécrose des prolongements nerveux accompagnent généralement ces changements structuraux. En effet, chez les patients MICI, on retrouve des axones enflés mais vides, remplis de grandes vacuoles liées à la membrane, avec des mitochondries enflées et une augmentation de la concentration en neurofibrilles (Vasina et al., 2006). Ces altérations sont

Etude bibliographique

retrouvées à la fois dans les zones lésées et non lésées chez les patients MC (Oehmichen and Reifferscheid, 1977 ; Villanacci et al., 2008). Des résultats similaires ont été observés dans des modèles animaux d'inflammation intestinale. Par exemple, une diminution du nombre de neurones myentériques par ganglion d'environ 20% est observée après l'induction d'une colite au TNBS chez le cochon d'inde (Linden et al., 2005). Cette perte neuronale persiste jusqu'à 56 jours après que l'inflammation soit résolue, mais aucun sous-type particulier de neurones ne semble majoritairement affecté, suggérant une perte neuronale indiscriminée qui se produit en début de colite. Cependant, une perte d'environ 80% des neurones sensitifs viscéraux (ayant leurs corps cellulaires dans les plexus myentériques mais avec des prolongements vers le système nerveux extrinsèque) est également observée dans les zones inflammatoires dans ce modèle (Linden, 2012). A l'inverse, une fois l'injure neurotoxique terminée, une rapide régénérescence des axones des neurones survivants est observée. Le même type de résultat a été observé chez le rat après l'induction d'une colite, avec une perte neuronale myentérique observée dès 48h et qui persiste jusqu'à 35 jours (Sanovic et al., 1999 ; Sarnelli et al., 2009).

Le mécanisme d'induction de la mort neuronale dans ces modèles reste inconnu, mais la perte neuronale est associée à l'apparition d'infiltrats d'éosinophiles et de neutrophiles dans les ganglions myentériques, suggérant un rôle du système immunitaire. Des plexites, correspondant à l'infiltrat de cellules inflammatoires, sont également retrouvées chez les patients MICI au niveau des plexus sous-muqueux et myentérique (Brierley and Linden, 2014). Ces plexites sont également retrouvées au niveau de segments intestinaux histologiquement sains, et sont prédictifs de rechutes dans le cas de la MC (Ferrante et al., 2006 ; Sokol et al., 2009). Chez les patients MICI, les effets bénéfiques des dérivés salicylés et des corticostéroïdes ont notamment été attribués à leur capacité à inhiber la formation d'espèces réactives de l'oxygène produites par les neutrophiles et à réduire leur infiltration, respectivement (Cronstein et al., 1992 ; Yamada et al., 1990).

➤ **Altérations fonctionnelles :**

Outre les modifications morphologiques, l'inflammation induit également des changements de l'expression de neurotransmetteurs et de leurs récepteurs au niveau des synapses. Les messagers chimiques impliqués dans les MICI incluent des neuropeptides et des petites molécules comme la sérotonine (5-HT) ou l'Ach (Margolis and Gershon, 2009). Au niveau de l'intestin des rongeurs, l'inflammation affecte de façon majeure les neurones cholinergiques, entraînant une diminution de la libération d'Ach (Collins et al., 1992). Cela pourrait être dû à des changements d'expression des protéines des vésicules synaptiques qui sont nécessaires à la libération de neurotransmetteurs. La 5-HT, un neurotransmetteur connu pour être impliqué dans l'activité péristaltique, a été reconnu comme un neurotransmetteur pro-inflammatoire et il a été montré que sa production par les cellules entérochromaffine de patients RCH était diminuée (Coates et al., 2004). Des concentrations élevées de SP, un neurotransmetteur pro-inflammatoire, ont été retrouvées dans le colon et le rectum de patients MICI, avec une augmentation massive dans le plexus myentérique de colon de patients RCH impliquant le passage d'une innervation majoritairement cholinergique à une innervation SP plus étendue (Bernstein et al., 1993 ; Neunlist et al., 2003). La densité des terminaisons nerveuses SP est corrélée à la sévérité de la maladie, et ces changements neurochimiques ont également été observés dans les zones non enflammées de l'intestin. On retrouve également une augmentation des sites de liaison de la SP dans la muqueuse enflammée des patients RCH ainsi qu'une augmentation de l'ARNm

Etude bibliographique

de son récepteur NK-1 (Goode et al., 2000 ; ter Beek et al., 2007). Le VIP semble également jouer un rôle dans la physiopathologie des MICI, et il a été montré qu'une supplémentation réduisait les signes cliniques et histologiques après l'induction d'une colite au TNBS (Arranz et al., 2008 ; Gross and Pothoulakis, 2007). De la même manière, le GLP-2 (Glucagon Like Peptide 2) réduit l'inflammation intestinale via une activation des neurones VIP du plexus sous-muqueux. Cependant, les études s'intéressant à la production de VIP chez les patients MICI sont contradictoires, puisque certaines trouvent une augmentation de la production de VIP en comparaison aux contrôles, alors que d'autres observent le contraire (Belai et al., 1997 ; Mazumdar and Das, 1992).

De nombreuses études électro-physiologiques ont également été réalisées dans des modèles animaux de MICI afin d'élucider les mécanismes à l'origine des changements de motilité induits par l'inflammation. Ainsi, quel que soit le modèle utilisé pour induire une colite, les neurones entériques les plus affectés par l'inflammation étaient les neurones AH. Dans l'intestin normal du cochon d'inde, les neurones AH fonctionnent comme des neurones afférents primaires intrinsèques dans le plexus myentérique et sont impliqués dans le péristaltisme, la sécrétion et la vasodilatation. Ces neurones reçoivent très rarement des entrées synaptiques rapides dans des conditions normales, mais dans le côlon distal du cochon d'inde plus de neurones AH reçoivent des entrées synaptiques rapides suite à l'induction de l'inflammation (Linden et al., 2003). Les neurones AH dans l'iléon enflammé présentent également une hyperexcitabilité prolongée après un bref stimulus qui dure jusqu'à trois heures (Nurgali et al., 2009). L'excitation neuronale maintenue, observée uniquement dans les neurones de l'intestin enflammé, pourrait contribuer à la dysmotilité, à la douleur et à l'inconfort associé à l'inflammation intestinale dans les MICI. Les mécanismes responsables des changements d'excitabilité ne sont pas encore compris, mais ils pourraient impliquer une altération persistante de l'expression de canaux et/ou une libération continue de médiateurs inflammatoires en raison de l'inflammation de bas grade (Lakhan and Kirchgessner, 2010). Les colites facilitent également la transmission synaptique dans le plexus myentérique des cochons d'inde (Krauter et al., 2007). L'hyperexcitabilité des neurones AH et la facilitation de la transmission synaptique, ici due à une augmentation de la transmission cholinergique, est également retrouvée au niveau du plexus sous-muqueux chez ces animaux (Lomax et al., 2005). Enfin, le fait que l'hyperexcitabilité des neurones AH, la facilitation de la transmission synaptique et les altérations de la motilité intestinale soient encore présents dans les plexus sous-muqueux et myentérique pendant l'état post-inflammatoire pourraient expliquer pourquoi les patients MICI en rémission continuent de présenter des troubles de motilité (Krauter et al., 2007 ; Lomax et al., 2007). Ces résultats démontrent ainsi les effets à long terme d'une seule insulte inflammatoire sur les neurones entériques.

b- Altérations gliales

En conditions pathologiques, l'inflammation induit également des altérations gliales. Ainsi, si des modifications phénotypiques ont été décrites dans de nombreuses études, leur rôle sur les fonctions gliales reste assez flou. Tout comme les astrocytes du SNC maintenant considérés comme susceptibles de contribuer à certaines maladies neurologiques, les CGE pourraient également jouer un rôle dans la physiopathologie des MICI, soit via la perte de fonctions normales, soit via le gain de fonctions anormales (Hamby and Sofroniew, 2010 ; Ochoa-Cortes et al., 2016). Grâce à l'utilisation de modèles *in vitro* ou de modèles animaux de délétion gliale et d'induction de colite, plusieurs

Etude bibliographique

potentiels rôles dysfonctionnels des CGE ont été postulés pour être impliqués dans la physiopathologie de ces maladies (Cabarrocas et al., 2003).

➤ Altérations phénotypiques :

Chez les patients MICI, on retrouve une hyperplasie et une hypertrophie des CGE (Geboes and Collins, 1998). Un double marquage BrdU-S100 β de ganglions myentériques a montré que l'inflammation semblait induire la mitose des CGE dans l'iléon du cochon d'Inde (Bradley et al., 1997). De même, si l'IL-1 β semblait diminuer la prolifération des CGE à faible dose, une dose élevée d'IL-10 (5-100 ng/mL) avait l'effet inverse (Rühl et al., 2001). De plus, dans les zones enflammées de patients MICI, une augmentation de l'expression des marqueurs gliaux S100 β et GFAP est observée en comparaison aux patients contrôles (Cornet et al., 2001 ; Villanacci et al., 2008). Cette augmentation était plus marquée chez les patients RCH que chez les patients MC, suggérant que les altérations gliales pourraient être différentes entre ces deux pathologies (Bongioanni et al., 1996 ; von Boyen et al., 2011). A l'inverse, une diminution de l'expression de ces marqueurs est observée dans la muqueuse et la sous-muqueuse des zones non enflammées chez ces patients, probablement en association avec une désorganisation du réseau glial moins réactif à l'inflammation. De même, une diminution de l'expression de S100 β est retrouvée dans la lamina propria de patients MICI en comparaison aux contrôles (Kubota et al., 1992). Il a également été montré que la diminution de l'expression de GFAP chez les patients MC était retrouvée à des niveaux comparables au niveau d'expression de GFAP après une ablation partielle des CGE chez des souris transgéniques, ce qui entraînait une inflammation intestinale fulminante (Cornet et al., 2001). Une étude a également montré une diminution de 38% du nombre de CGE S100 β + dans la RCH, ainsi qu'une augmentation du ratio CGE/neurones, suggérant qu'une altération ou une perte gliale pourrait être associée à une diminution majeure du nombre de neurones (Bernardini et al., 2012). L'ajout de cytokines pro-inflammatoires ou du composant bactérien LPS peut également changer le phénotype des CGE. Ainsi, les cytokines proinflammatoires TNF α et IL-1 β et le LPS bactérien augmentent significativement l'expression de GFAP et de S100 β (Cirillo et al., 2009 ; von Boyen et al., 2004). Un traitement au TNF α et IL1 β augmente également la production d'endothéline 1 par les CGE, qui agit de façon autocrine et augmente l'expression de GFAP (von Boyen et al., 2010). De même, dans un modèle d'inflammation intestinale *in vivo* après l'administration de LPS à des rats, une augmentation de l'expression de la GFAP était retrouvée au niveau du plexus myentérique (Rosenbaum et al., 2016).

Prises ensemble, ces données suggèrent une altération du nombre de CGE en conditions inflammatoires, avec une diminution en zones non inflammatoires et une augmentation en zones enflammées. Cependant, la diminution de la quantité de CGE dans les MICI est encore débattue aujourd'hui, car si des études montrent une diminution de l'expression des marqueurs gliaux dans les zones non enflammées, aucune étude ne montre une diminution réelle du nombre de CGE.

➤ Altérations fonctionnelles :

Une étude a montré que l'IL-1 β induisait l'expression de Fos par les CGE *ex vivo* sur des tissus isolés de l'iléon et du côlon provenant du cochon d'Inde, ce qui suggère une activation des CGE dans des conditions inflammatoires (Tjwa et al., 2003). L'activation des CGE dans les modèles animaux semble être identique à ce qui est observé *ex vivo*. En effet, il a été démontré dans les modèles de

Etude bibliographique

colite que l'IL-1 β induisait également l'expression de Fos par les CGE chez le rat et le cochon d'Inde (Miampamba and Sharkey, 1999 ; Sharkey et al., 1999).

Il a été démontré dans le SNC que la surexpression de la protéine S100 β était responsable de la production de médiateurs proinflammatoires qui pourraient avoir des effets néfastes sur les cellules voisines (Cirillo et al., 2009 ; Cirillo et al., 2011). Ainsi, en réponse à un stimulus inflammatoire, les CGE produisaient de l'IL-6 de manière similaire aux astrocytes, mais aussi de l'IL-1 β et du TNF α (Rühl et al., 2001 ; Van Wagoner and Benveniste, 1999). L'inflammation induit également une augmentation de la sécrétion de facteurs neurotrophiques par les CGE comme le GDNF et le NGF. Ces données suggèrent que les CGE acquièrent des propriétés fonctionnelles pour protéger les neurones entériques des lésions inflammatoires (von Boyen and Steinkamp, 2006 ; von Boyen et al., 2006). Le GDNF a également montré un rôle sur les cellules épithéliales coliques et un rôle autocrine sur les CGE en les protégeant de l'apoptose (Steinkamp et al., 2003 and 2012). Le GDNF joue aussi un rôle important dans le mécanisme de protection de la BEI par les CGE après une stimulation par ischémie/reperfusion (Xiao et al., 2014). De plus, il a été démontré dans un modèle de colite chez la souris que le GDNF diminuait la perméabilité intestinale et réduisait la réponse inflammatoire (Zhang et al., 2010). Enfin, en présence de cytokines proinflammatoires (TNF α , IL-1 β , IFN γ), les CGE acquièrent de nouvelles propriétés fonctionnelles pour empêcher l'augmentation de la perméabilité de la BEI (Cheadle et al., 2013). La bradykinine, un médiateur inflammatoire, induisait aussi une augmentation de la concentration en Ca²⁺ et augmentait la réponse neuronale observée par une dépolarisation des neurones myentériques, associée à la production accrue de PGE₂ par les CGE (Murakami et al., 2007). Ensemble, ces données suggèrent que l'inflammation induit des changements dans la production de cytokines et de facteurs neurotrophiques qui peuvent jouer un rôle bénéfique à la fois sur la BEI et sur les neurones entériques.

Chez les patients MICI on retrouve une augmentation de la production de GDNF en zones enflammées, mais une diminution en zones non enflammées (von Boyen et al., 2011). De même, les cytokines comme l'IL-1 β et le TNF α sont des cytokines pro-inflammatoires fortement augmentées dans les MICI (Noguchi et al., 1998 ; Reinecker et al., 1993 ; Schreiber et al., 1999). Une augmentation de la production de PGD₂ est également retrouvée dans les zones enflammées de patients MC, et il a été montré *in vitro* qu'un traitement au LPS augmentait la production gliale de ce médiateur (Le Loupp et al., 2015). Toutefois, un rôle dysfonctionnel des CGE dans le contrôle des fonctions de la BEI a été mis en évidence chez ces patients. En particulier, une étude lipidomique a montré une diminution de la production de quatre médiateurs gliaux par les CGE de patients MC : le 15-HETE, le 18-HEPE, la 15dPGJ₂ et le 11 β PGF₂ α (Coquenlorge et al., 2016). Cette étude a également mis en évidence la perte de fonction des CGE chez ces patients, qui étaient alors incapables de contrôler la réparation et l'étalement des CEI ou de diminuer la perméabilité comme des CGE contrôlés. La diminution de la production gliale de ces médiateurs par les CGE de patients MC semble concourir aux dysfonctions observées, puisque le 11 β PGF₂ α augmente la réparation et l'étalement des CEI, ainsi que la résistance épithéliale. De même, le 15dPGJ₂ a un rôle protecteur sur les neurones entériques en les protégeant du stress oxydatif et régule la prolifération et la différenciation des CEI (Abdo et al., 2012 ; Bach-Ngohou et al., 2010). Dans le contexte de la maladie cœliaque et de la RCH, la surexpression de S100 β dans l'intestin pourrait également jouer un rôle délétère sur l'inflammation, en particulier par la production de NO (Cirillo et al., 2009 ; Esposito et al., 2007). Ces données sont soutenues par une étude montrant que dans le cas d'une colite induite chez la souris,

Etude bibliographique

des facteurs tels que le NO glial pourraient avoir des effets néfastes sur l'intégrité de la BEI et donc sur la gravité de la colite (MacEachern et al., 2015).

Enfin, les CGE sont capables de répondre à des infections bactériennes par l'expression de TLR, et si Coquenlorge et al. ont montré que l'addition de LPS à des CGE *in vitro* ne modifiait pas l'expression de TLR4, il a été montré dans un modèle murin de colite que l'expression de TLR4 par les CGE était augmentée (Coquenlorge et al., 2014 ; Esposito et al., 2014). Chez les patients MICI, une augmentation de l'expression gliale de CMH II a également été retrouvée dans les plexus myentériques et sous-muqueux (Geboes et al., 1992). *In vitro*, l'IFN γ et le TNF α augmentent l'expression gliale de CMH II et d'ICAM-1 (Hollenbach et al., 2000). Ces changements induisent une augmentation de l'adhésion des lymphocytes T et les CGE deviennent des cellules présentatrices d'antigènes, suggérant leur implication dans les réponses inflammatoires.

Ainsi, ces données suggèrent que dans des conditions inflammatoires *in vitro* et *in vivo*, les CGE acquièrent de nouvelles propriétés phénotypiques et fonctionnelles, comme les astrocytes réactifs dans le SNC. Une inflammation à court terme semble induire des CGE réactives avec de nouvelles propriétés bénéfiques pour l'intégrité intestinale. Cependant, l'induction de telles propriétés pourrait également avoir des effets néfastes à long terme lorsque l'inflammation est maintenue et lorsque les lésions ne sont pas réparées, comme dans les MICI.

5) Altérations du niveau de production d'eicosanoïdes

Le rôle des eicosanoïdes dans les processus inflammatoires intestinaux n'est pas clair. En effet, si certaines études suggèrent un rôle actif de ces dérivés dans l'inflammation intestinale, certaines études montrent également qu'une altération de leur expression pourrait concourir aux mécanismes physiopathologiques des MICI, soulignant leur importance dans le maintien de l'intégrité intestinale. Ainsi, du fait de leurs rôles anti- ou pro-inflammatoires, l'étude de la production d'eicosanoïdes chez les patients MICI a fait l'objet de nombreuses études. Parce que les taux urinaires ou sériques des eicosanoïdes ne reflètent pas forcément leur production *in situ*, l'étude de la synthèse des eicosanoïdes intestinaux n'a pas été facile. La plupart des études sont basées sur l'incubation de biopsies de muqueuses intestinales, même si les résultats peuvent être biaisés par une stimulation mécanique pendant l'échantillonnage et que seuls les fragments accessibles par endoscopie peuvent être analysés (Stenson, 2014). Une perfusion intestinale permet la quantification de la libération intraluminaire d'eicosanoïdes *in vivo* dans l'intestin grêle et le colon. Une dialyse rectale peut également être réalisée.

a- Les eicosanoïdes comme médiateurs de l'inflammation

Les eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique sont impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions, telles que l'augmentation du débit sanguin, de la perméabilité vasculaire ou encore de la migration des neutrophiles (Eberhart and Dubois, 1995). Une augmentation de la production de nombreux de ces dérivés est retrouvée chez les patients MICI et dans des modèles animaux d'inflammation intestinale, suggérant une implication de ces molécules dans l'initiation et/ou l'entretien de l'inflammation.

Etude bibliographique

Ainsi, une incubation *in vitro* de muqueuses coliques de patients MICI a montré une augmentation de la production de PGE2, LTB4 et 5-HETE en comparaison aux muqueuses normales (Baumeister et al., 1996 ; Sharon and Stenson, 1984). De même, une augmentation de la production de PGE2, 6-ketoPGF2 α , TXB2, LTB4, 12-HETE et 15-HETE est retrouvée dans les muqueuses rectales de patients MICI (Hawkey et al., 1983 ; Ligumsky et al., 1981 ; Sharon et al., 1978 ; Sharon and Stenson, 1984). Plus récemment, une étude a également démontré un rôle pro-inflammatoire de la PGD2 retrouvée augmentée chez les patients RCH et corrélée avec l'activité de la maladie (Hokari et al., 2011). Une augmentation de PGE2, PGD2, TXB2, 5-HETE, 11-HETE, 12-HETE et 15-HETE était également retrouvée dans la muqueuse enflammée de patients RCH et corrélée avec la sévérité de l'inflammation (Masoodi et al., 2013). De même, une dialyse *in vivo* a également montré une augmentation de la concentration de plusieurs eicosanoïdes corrélée positivement à l'activité de la maladie chez des patients RCH et dans un modèle animal de colite (Lauritsen et al., 1986 ; Zipser et al., 1987). Ainsi, les concentrations luminales de PGE2 et LTB4 sont augmentées chez les patients présentant une maladie active, mais retrouvent des niveaux contrôles durant les périodes de rémission (Lauritsen et al., 1986). Durant l'inflammation active, des concentrations accrues de tous les dérivés des cyclooxygénases, excepté le 6-ketoPGF1 α , sont retrouvées chez les patients MICI (Lauritsen et al., 1988). L'expression de COX-2 est indétectable dans l'iléon ou le colon de patients normaux, mais son expression apicale par les cellules épithéliales des zones enflammées est induite chez les patients MICI (Singer et al., 1998). De plus, les concentrations de PGE2 et TXB2 sont plus hautes chez les patients RCH par rapport aux patients MC. La concentration de LTB4 est augmentée seulement chez les patients RCH en comparaison aux contrôles. Chez les patients malades, cette augmentation de la production d'eicosanoïdes semblait associée aux dommages épithéliaux observés par endoscopie.

Le même type d'observations est retrouvé dans des modèles expérimentaux d'inflammation intestinale. Ainsi une colite induite à l'acide acétique chez des rats entraîne une augmentation de la production de LTB4, LTC4, 12-HETE, 5-HETE et PGE2 par la muqueuse colique (Sharon and Stenson, 1985). Dans un modèle de colite au TNBS, une augmentation de la production de PGE2 et de LTB4, mais une diminution de LTC4 est observée (Allgayer et al., 1989). Il a également été montré dans ce modèle qu'une inhibition de la 5-LOX entraînait une diminution des dommages histologiques coliques et diminuait la synthèse de LTB4 (Wallace et al., 1989). Dans un modèle de colite au DSS, la PGE2 aggrave la sévérité et l'inflammation colique en se liant aux récepteurs EP2 et EP4 des cellules dendritiques et des lymphocytes T qui vont produire plus d'IL-23 et d'IL-17 (Boniface et al., 2009 ; Sheibanie et al., 2007).

b- Les eicosanoïdes comme agents protecteurs

Outre leur rôle pro-inflammatoire, de nombreux dérivés de l'acide arachidonique pourraient également jouer un rôle anti-inflammatoire. En effet, un traitement avec des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui inhibent les COX-1 et COX-2 et bloquent ainsi la synthèse de prostaglandines entraîne une exacerbation de l'activité de la maladie chez les patients MICI (Felder et al., 2000). Ils induisent également une rechute quelques jours après leur ingestion chez 17 à 28% des patients asymptomatiques atteints d'une MICI (Takeuchi et al., 2006). D'autres études ont également reporté un taux accru de rechutes ou de complications secondaires chez les patients MICI ayant pris des AINS (Evans et al., 1997 ; Meyer et al., 2006). La PGD2 et son dérivé le 15dPGJ2 ont un

Etude bibliographique

effet anti-inflammatoire et sont associés à une résolution de l'inflammation (Ajuebor et al., 2000 ; Rajakariar et al., 2007). Or la PGD2 est retrouvée augmentée chez les patients RCH en rémission (Vong et al., 2010). La PGE2 favorise également la tolérance immunitaire ce qui diminue la gravité de l'inflammation à des taux basaux (Chinen et al., 2011). De plus, dans un modèle de colite au DSS, la PGE2 produite par les cellules souches mésenchymateuses promeut la prolifération et la réparation épithéliale et inhibe l'apoptose des CEI (Fukata et al., 2006). Une diminution de l'expression de la 15-LOX-2 est également retrouvée dans la muqueuse colique de patients RCH (Mangino et al., 2006).

Il est important de noter que tous ces dérivés exercent leurs effets via des récepteurs spécifiques dont l'expression peut également varier en condition inflammatoire ou pathologique. La plupart de ces médiateurs ont une demi-vie assez courte et se lient donc aux récepteurs exprimés par les cellules voisines. La compréhension de leur rôle dans l'inflammation, en particulier dans les MICI, nécessite donc une connaissance des cellules productrices et des cellules exprimant leurs récepteurs (Stenson, 2014). La production accrue de ces nombreux eicosanoïdes dans les MICI est principalement attribuée aux cellules de la muqueuse et aux neutrophiles, mais leur production altérée par d'autres types cellulaires pourrait également concourir aux mécanismes physiopathologiques. Il est difficile de trancher sur un rôle pro- ou anti-inflammatoire de ces dérivés, mais il semble toutefois clair qu'une dérégulation de leur production puisse conduire à des situations pathologiques, soit via une activation de mécanismes pro-inflammatoires, soit via une diminution de leurs effets protecteurs.

Objectifs de l'étude

Les données de la littérature mettent en évidence le rôle majeur du SNE dans le contrôle des fonctions digestives, mais son implication dans la physiopathologie des MICI est encore peu connu. En effet le SNE, en association avec le microbiote et le système immunitaire, est un régulateur clé de l'homéostasie épithéliale intestinale. Ainsi, en conditions physiologiques, les neurones et les cellules gliales entériques sécrètent de nombreux médiateurs capables de moduler les fonctions de la BEI, tels que des neurotransmetteurs, des cytokines ou encore des médiateurs lipidiques. En particulier, les CGE sécrètent de nombreux médiateurs gliaux tels que le GSNO, le TGF β ou encore le 15dPGJ2 qui régulent les propriétés de la BEI. Cependant, dans les MICI, on retrouve une altération de l'intégrité de la BEI, notamment via une augmentation de la perméabilité intestinale et une diminution des mécanismes de réparation. Ces modifications sont connues pour participer au développement pathologique des MICI, et renforcer la BEI pourrait permettre de moduler l'inflammation et/ou les atteintes digestives chez ces patients. De nombreuses études ont également montré une altération gliale dans le contexte des MICI, mais le rôle fonctionnel des CGE et leur implication dans la physiopathologie des MICI reste tout de même vague. Etudier la production de médiateurs gliaux et leurs conséquences fonctionnelles dans le contexte des MICI pourrait ainsi permettre de mieux comprendre les mécanismes pathologiques impliqués dans l'inflammation intestinale chronique.

Ainsi, les objectifs de ce travail de thèse étaient :

1) D'analyser si les CGE de patients MICI régulent les fonctions de la BEI (et plus particulièrement la perméabilité) comme des CGE contrôles, ou si elles sont dysfonctionnelles

2) D'identifier des facteurs capables de renforcer la BEI ainsi que les mécanismes de signalisation impliqués, qui pourraient représenter une approche thérapeutique ou permettre d'identifier une cible thérapeutique d'intérêt afin d'améliorer les symptômes et la qualité de vie des patients MICI

Ce travail de thèse est présenté sous la forme de deux articles. Le premier a déjà été publié dans *Gastroenterology* en 2016 et le second est en préparation.

Dans le premier article, nous avons montré que les CGE de patients MC produisaient significativement moins de 15-HETE, un médiateur lipidique qui diminue la perméabilité intestinale. Il montre également que la perte de fonctions des CGE de patients MC pour la régulation de la perméabilité de la BEI peut être restaurée par l'ajout de 15-HETE, et l'étude des mécanismes impliqués suggère une modulation de l'expression des protéines des jonctions serrées.

Dans le second article, nous avons montré qu'un autre médiateur lipidique, la PGI2, était également retrouvé en quantité diminuée dans les biopsies de patients MICI. Cette étude met en évidence un rôle majeur de la PGI2 dans la régulation de la perméabilité intestinale, capable de protéger la BEI des conséquences délétères d'une inflammation intestinale *in vivo*. Nous avons également montré un rôle bénéfique de la PGI2 sur l'apoptose épithéliale qui est retrouvée

Objectifs de l'étude

augmentée chez les patients MICI et pourrait concourir à l'augmentation de perméabilité retrouvée chez ces patients.

Trois autres articles sont également présentés en annexe, deux en préparation et l'un qui vient d'être soumis à *Movement disorders*.

Le premier concerne l'étude de l'implication de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) épithéliale dans la régulation de la perméabilité intestinale. Il fait suite à notre première étude qui suggérait que l'effet bénéfique du 15-HETE sur la BEI pouvait être du à une inhibition de l'AMPK. Une collaboration avec Benoit Viollet (Institut Cochin, Paris) nous a ainsi permis d'analyser l'impact d'une délétion épithéliale des deux sous-unités catalytiques de l'AMPK sur la perméabilité de la BEI *in vivo* et *ex vivo*.

Le second élargit notre travail à l'étude de l'expression intestinale d'eicosanoïdes dans une autre pathologie qui atteint également le tube digestif et le SNE : la maladie de Parkinson. En effet, des troubles digestifs, en premier lieu la constipation, sont retrouvés chez ces patients et une atteinte du SNE semblable à celle du SNC est observée chez les parkinsoniens. Le but de cette étude était d'étudier si des mécanismes similaires à ceux que nous avons identifiés dans le contexte des MICI pouvaient être envisagés pour jouer un rôle dans cette pathologie centrale.

Le troisième est une revue se focalisant sur les preuves existantes d'une réactivité gliale au cours de l'inflammation et son potentiel dysfonctionnement et impact dans les MICI, et plus particulièrement dans la MC.

Résultats

Article 1 :

Défauts de production de 15-HETE et du contrôle de la perméabilité intestinale par les cellules gliales entériques de patients atteints par la maladie de Crohn

Présentation de l'article 1 :

L'implication des CGE dans le contrôle des propriétés et fonctions de la BEI en conditions physiologiques a été mise en évidence grâce à l'utilisation de modèles *in vivo* d'ablation gliale. En effet, une ablation des CGE, réalisée par différentes méthodes, résulte en une augmentation de la perméabilité intestinale précédant le développement de l'inflammation, et entraîne une jéjuno-iléite fulminante caractérisée par une rupture de la BEI (Aubé et al., 2006 ; Bush et al., 1998 ; Cornet et al., 2001). De nombreuses études réalisées *in vitro* ont complété ces travaux et analysé le rôle bénéfique des CGE sur la régulation de la BEI, notamment via une régulation de la perméabilité, de la résistance, de la réparation, de la prolifération ou encore de la différenciation des CEI (Bach-Ngohou et al., 2010 ; Cheadle et al., 2013 ; Coquenlorge et al., 2016 ; Neunlist et al., 2006 and 2013 ; Savidge et al., 2007 ; Van Landeghem et al., 2011). Ces travaux ont permis d'identifier les médiateurs gliaux qui modulent les fonctions de la BEI (Neunlist et al., 2013), parmi lesquels le 15dPGJ2 régule la prolifération et la différenciation des CEI et le 11 β PGF2 α augmente la réparation et la résistance de la BEI ainsi que l'étalement des CEI (Bach-Ngohou et al., 2010 ; Coquenlorge et al., 2016).

Dans le contexte des MICI, de nombreuses études rapportent une altération de la production d'eicosanoïdes ou une modulation de l'expression de leurs enzymes de synthèse (Stenson, 2014). Parallèlement, une altération de l'intégrité de la BEI est retrouvée chez les patients MICI, et il a été montré que l'augmentation de perméabilité intestinale retrouvée chez ces patients précédait les rechutes et le développement de l'inflammation (Hollander et al., 1986 ; Pearson et al., 1982). Cependant, l'implication des CGE dans la production de ces eicosanoïdes et leur contribution aux altérations de la BEI observées chez ces patients restent encore peu connues. Des études suggèrent tout de même un rôle clé des CGE dans les mécanismes physiopathologiques des MICI, puisqu'une altération gliale est retrouvée chez ces patients, notamment via une modification de l'expression des marqueurs gliaux (Cornet et al., 2001 ; Villanacci et al., 2008). De plus, une étude plus récente du laboratoire a mis en évidence une dysfonction des CGE de patients MC qui produisaient moins de 11 β PGF2 α et n'étaient alors plus capables de réguler la réparation de la BEI comme des CGE contrôles (Coquenlorge et al., 2016).

Ainsi, le but de ce travail était de définir le profil lipidique de CGE de rat afin d'identifier en partie le sécrétome de ces cellules. Il avait également pour but d'étudier la production de ces médiateurs lipidiques par des CGE de patients contrôles ou atteints par la MC et d'identifier leur impact fonctionnel sur la perméabilité de la BEI.

Dans ce but, nous avons dosé la production de médiateurs lipidiques dans les milieux conditionnés de cultures primaires de CGE issues d'intestin de rats ou de pièces opératoires en zones non enflammées de patients contrôles ou atteints par la MC. Le dosage de 29 médiateurs lipidiques a été réalisé par Nicolas Cenac (IRSD, Toulouse) grâce à une méthode de spectrométrie de masse décrite par *Le Faouder et al., 2013*. Nos résultats ont montré que les CGE de rats produisaient de nombreux médiateurs lipidiques, dont le 5- et le 15-HETE. L'étude de la production de ces dérivés par les CGE humaines indique une diminution de la production de 15-HETE par les CGE de patients MC. Grâce à un modèle de coculture indirecte de CEI avec des CGE humaines, cette étude a mis en évidence un rôle bénéfique du 15-HETE sur la perméabilité paracellulaire de la BEI *in vitro*. De même,

Résultats

l'inhibition de la production de 15-HETE *in vivo* résultait en une augmentation de cette perméabilité. Enfin, l'étude des mécanismes moléculaires impliqués analysée par Western Blot démontre que l'effet bénéfique du 15-HETE sur la perméabilité paracellulaire est du à une augmentation de l'expression de la protéine ZO-1 via une voie dépendante de l'AMPK.

Cette étude révèle également un rôle dysfonctionnel des CGE de patients MC, incapables de diminuer la perméabilité comme des CGE contrôles. Toutefois, une supplémentation en 15-HETE restaurait une perméabilité contrôle, suggérant que le défaut de production par les CGE de patients MC pourrait concourir aux mécanismes physiopathologiques chez ces patients. Les CGE de patients MC étant issues de zones non enflammées, nous montrons ainsi une altération fonctionnelle intrinsèque qui pourrait prédisposer et/ou participer directement au développement de la maladie.

Cet article a été publié dans *Gastroenterology* en Janvier 2016.

BASIC AND TRANSLATIONAL—ALIMENTARY TRACT

Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells From Patients With 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} Marie Freyssinet,^{1,3,4} Michel Neunlist,^{1,2,3,4} and Malvyne Rolli-Derkinderen^{1,2,3,4}

¹INSERM, UMR913, Nantes, France; ²Nantes University, Nantes, France; ³Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, IMAD, CHU Nantes, Hôpital Hôtel-Dieu, Nantes, France; ⁴Centre de Recherche en Nutrition Humaine, Nantes, France; and ⁵INSERM UMR1043, Toulouse, France

BACKGROUND & AIMS: Enteric glial cells (EGCs) produce soluble mediators that regulate homeostasis and permeability of the intestinal epithelial barrier (IEB). We investigated the profile of polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolites produced by EGCs from rats and from patients with Crohn's disease (CD), compared with controls, along with the ability of one of these metabolites, 15-hydroxyicosatetraenoic acid (15-HETE), to regulate the permeability of the IEB. **METHODS:** We isolated EGCs from male Sprague-Dawley rats, intestinal resections of 6 patients with CD, and uninfamed healthy areas of intestinal tissue from 6 patients who underwent surgery for colorectal cancer (controls). EGC-conditioned media was analyzed by high-sensitivity liquid-chromatography tandem mass spectrometry to determine PUFA signatures. We used immunostaining to identify 15-HETE-producing enzymes in EGCs and tissues. The effects of human EGCs and 15-HETE on permeability and trans-epithelial electrical resistance of the IEB were measured using Caco-2 cells; effects on signal transduction proteins were measured with immunoblots. Levels of proteins were reduced in Caco-2 cells using short-hairpin RNAs or proteins were inhibited pharmacologically. Rats were given intraperitoneal injections of 15-HETE or an inhibitor of 15-lipoxygenase (the enzyme that produces 15-HETE); colons were collected and permeability was measured. **RESULTS:** EGCs expressed 15-lipoxygenase-2 and produced high levels of 15-HETE, which increased IEB resistance and reduced IEB permeability. 15-HETE production was reduced in EGCs from patients with CD compared with controls. EGCs from patients with CD were unable to reduce the permeability of the IEB; the addition of 15-HETE restored permeability to levels of control tissues. Inhibiting 15-HETE production in rats increased the permeability of the IEB in colon tissues. We found that 15-HETE regulates IEB permeability by inhibiting an adenosine monophosphate-activated protein kinase and increasing expression of zonula occludens-1. **CONCLUSIONS:** Enteric glial cells from patients with CD have reduced production of 15-HETE, which controls IEB permeability by inhibiting adenosine monophosphate-activated protein kinase and increasing expression of zonula occludens-1.

Keywords: Enteric Nervous System; Inflammatory Bowel Disease; IBD; Arachidonic Acid.

Accumulating data demonstrate that under physiological conditions, enteric glial cells (EGCs) positively regulate the intestinal epithelial barrier (IEB). Prime evidence for EGC requirement in maintaining IEB homeostasis is the drastic phenotype of mouse models defective for EGCs. In vivo, severe ablation of EGCs induces a fulminant jejunoileitis, characterized by disruption of IEB integrity.^{1,2} Less severe ablation of EGCs increases paracellular permeability in the absence of gut inflammation³ or before development of intestinal inflammation.⁴ Additional arguments are the studies demonstrating that EGCs control the major IEB properties of proliferation, differentiation, healing, resistance, and permeability.⁵ EGCs inhibit intestinal epithelial cell (IEC) proliferation via the release of transforming growth factor- β ^{1,6} and regulate IEC proliferation and differentiation via the 15-deoxy- Δ -prostaglandin J₂.⁷ Both in vivo and in vitro experiments show that EGCs enhance IEB repair after mechanical or inflammatory injury through the production of derived pro-epidermal growth factor.⁸ EGCs also increase IEB resistance and reduce paracellular permeability, in part via S-nitrosoglutathione.⁹ EGCs have consistently been shown to increase IEB resistance evoked by stressors such as bacteria, inflammatory mediators, and skin burn injuries.^{10–12} Altogether these studies identify EGC as a source for soluble factors able to reinforce the IEB via paracrine signaling, but no broad glial secretome has been defined, and the production of gliomediators in pathologic contexts remains to be determined. This could be of particular interest to understanding

*Authors share co-first authorship.

Abbreviations used in this paper: AMPK, adenosine monophosphate-activated kinase; CD, Crohn's disease; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; EGC, enteric glial cell; ERK, extracellular signal-regulated kinase; 15-HETE, 15-hydroxyicosatetraenoic acid; IEB, intestinal epithelial barrier; IEC, intestinal epithelial cell; JUG, rat enteric glial cell line; LOX, lipoxygenase; PBS, phosphate-buffered saline; PGE₂, prostaglandin E₂; PUFA, polyunsaturated fatty acid; ROG, rat enteric glial cells; TEER, transepithelial electrical resistance; UC, ulcerative colitis; ZO-1, zonula occludens-1.

Most current article

© 2016 by the AGA Institute
0016-5085/\$36.00

<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.038>

pathologic mechanisms of inflammatory bowel disease. Indeed, EGCs present abnormalities in Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). First, glial-derived neurotrophic factor expression is significantly higher in the mucosae of patients with UC as compared with those of controls.¹³ In contrast to UC, a reduced number of glial fibrillary acidic protein-positive EGC are present in noninflamed gut specimens of patients with CD.^{2,13} However, none of the currently available data provide evidence of EGC dysfunction in inflammatory bowel disease that could be responsible for gut dysfunction and/or pathologic symptom generation.

Polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolites are bioactive compounds that play an important role in the induction and resolution of inflammation, and characterization of their role in inflammatory bowel disease is currently in progress. The major PUFA in the diet is linoleic acid, which is a precursor of arachidonic acid. Arachidonic acid is metabolized via 3 major biochemical pathways as follows: the cyclooxygenase pathway leading to prostaglandins, prostacyclin, and thromboxane; the lipoxygenase (LOX) pathway giving rise to various hydroperoxy and hydroxyl fatty acids and leukotrienes; the P450-dependent epoxygenase pathway generating epoxyeicosanoids. Previous studies have shown up-regulation of cyclooxygenase and LOX in active UC¹⁴ and elevation of thromboxane B₂,¹⁵ leukotriene B₄,¹⁶ and prostaglandin E₂ (PGE₂)¹⁷ in UC and CD. However, their production is attributed to the mucosa^{15–17} or, more specifically, to neutrophils.¹⁸ The contribution of EGCs is unknown, but these cells have been reported to produce PGE₂¹⁹ and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂.⁷

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

Materials and Methods

Human and Rat Enteric Glial Cell Cultures

Cultures of human and adult rat EGCs were obtained according to the procedure described by Soret et al.²⁰ Briefly, human EGC originated from noninflamed, macroscopically healthy areas of intestinal resections from control patients (having undergone surgery for colorectal cancer) and those with a diagnosis of CD established according to international criteria. Six control (aged 19–74 years; sex ratio 1:1; 3 colons and 3 ilea) and 6 CD (Table 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 Humans and registered under the no. DC-2008-402. Adult rat enteric glial cells (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

Table 1. Main Clinical Features of Patients With Crohn's Disease (n = 6)

Sex	Age at surgery, y	Explant use for EGC culture	Duration of the disease, y	Treatment at the time of surgery
Female	49	Colon	24	Anti-TNF α antibody
Female	63	Ileum	21	None
Male	24	Colon	7	None
Male	17	Ileum	1	Humira
Female	28	Ileum	11	Imurel + corticoid
Female	25	Ileum	13	Imurel

TNF, tumor necrosis factor.

medium (DMEM, 4.5 g/L Glc) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mmol/L glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin. The purity of the cellular population was verified regularly by immunocytochemistry (see Immunocytochemistry). EGC cultures presenting >80% glial fibrillary acidic protein-, Sox10-, and S100 β -positive cells were used for 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.

Polyunsaturated Fatty Acid Dosage

The PUFA dosage was performed as described by Le Faouder et al.²¹ and is detailed in the Supplementary Material.

The PUFA profile was established in EGC-conditioned media. Five thousand JUG, ROG, or human EGC were plated in 12-well plates and after 1 day placed in 2 mL defined DMEM supplemented with 100 IU/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin, without any serum. After 3 days, conditioned media were centrifuged at 14,000 rpm for 5 minutes at 4°C, 1 mL was used for analysis of permeability and transepithelial electrical resistance (TEER) on Caco-2 filters, and 500 μ L frozen at –80°C until analysis.

Intestinal Epithelial Cell Culture

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

Stable Caco-2 cell lines expressing short-hairpin RNA sequences targeting zonula occludens-1 (ZO-1) or degenerated sequences (control) were established to assess the role of ZO-1. Lentiviral particles (sc-29829-V) were purchased and used according to manufacturer's instructions (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Stable cell lines were selected in 1 mg/mL puromycin dihydrochloride 2 weeks before use, and maintained under selection during the experimental period. Antibiotic-resistant cell lines were screened by immunoblotting. TEER and permeability were measured as explained for the parental Caco-2 cell line.

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 μ m; Corning, Avon, France). The 5-HETE (100 μ g/mL) or

15-HETE (100 pg/mL) was added or not the following day for an additional 2 days. The IEC size was measured by anti-ZO-1 immunostaining. After the 2 days of the experiment, IEC Transwell filters were fixed, separated from the Transwell, and incubated for 30 minutes at room temperature with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.5% Triton X-100 and 10% horse serum. Filters were then incubated with a mouse monoclonal antibody, anti-ZO-1 (1:500; Invitrogen), diluted in PBS 0.5% Triton X-100 and 10% horse serum overnight at 4°C. After washing with PBS, filters were incubated with an anti-mouse CY-3 (1:500; Jackson Immuno-Research, West Grove, PA) for 45 minutes at room temperature. Filters were mounted on slides for fluorescence microscopy analysis. Images were acquired with a digital camera (Olympus DP 50; Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a fluorescence microscope (Olympus IX 50). Cell surface area was measured with ImageJ software. A mean of 45.3 ± 7.3 IECs were analyzed for each experimental condition. The proliferation rate was evaluated by counting 4',6-diamidino-2-phenylindole nuclear staining.

Measurement of Transepithelial Electrical Resistance 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 TEER was measured 1 day after treatment with an EVOM epithelial voltammeter (World Precision Instruments, Inc, Sarasota, FL). To determine the effect of EGC-conditioned media or 5- or 15-HETE on IEB permeability, 50 μ L apical medium were replaced with 50 μ L fluorescein-5.6 sulfonic acid (1 mg/mL; Invitrogen, Carlsbad, CA). The fluorescence level of basolateral aliquots (150 μ L) was measured every 30 minutes for a period of 180 minutes using a fluorimeter (Varioskan, Thermo SA, France). Paracellular permeability was determined by the mean 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 fixed in PBS/4% paraformaldehyde for 15 minutes. Immunostaining was performed as described in the [Supplementary Material](#).

Western Blotting

After different time periods of 15-HETE stimulation, the Caco-2 filters were washed with ice-cold PBS and placed into ice-cold radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer containing with protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN) and serine-threonine phosphatase inhibitor cocktail (Sigma, St Louis, MO). Nuclei and unlysed cells were removed and samples were processed for electrophoresis using the NuPAGE MES SDS buffer kit (Invitrogen) and separated on 4%–12% bis-Tris or 3%–8% Tris-acetate gels (NuPAGE, Life Technologies, Carlsbad, CA). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes with the iBlot System

(Life Technologies). After blocking, blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in Tris-buffered saline/5% nonfat dry milk for mouse anti-ZO-1 (Thermo Scientific, Logan, UT; 1:200), mouse anti-ZO-2 (Life Technologies; 1:200), rabbit anti-occludin (Abcam, Cambridge, MA; 1:250), rabbit anti-JAM-A (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX; 1:500), rabbit anti-claudin 1 (Invitrogen; 1:250), mouse anti-claudin 2 (Life Technologies; 1:200), rabbit anti-phospho-Thr172 adenosine monophosphate-activated kinase (P-AMPK), rabbit anti-AMPK, rabbit anti-phospho-p44/p42 (P-ERK), rabbit anti-p44/p42, rabbit anti-phosphoY416Src, rabbit anti-Src (Cell Signaling, Danvers, MA), anti-phosphotyrosine 4G10Platinum, mouse anti- β -actin (Sigma Aldrich, 1:10,000), and mouse anti- β -glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (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, Hercules, CA) using a Gel-Doc imager and the Image Lab Software (Bio-Rad). The value of phosphorylated or total protein immunoreactivity was normalized to the unphosphorylated form or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase immunoreactivity, respectively, and expressed as fold increase relative to the mean of control values taken as 1.

Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Analysis

Human controls or CD EGC were lysed in RA1 buffer (Macherey-Nagel, Düren, Germany) in order to study messenger RNA expression as described in the [Supplementary Material](#).

Animal Procedure

For in vivo assessment of 15-HETE in IEB permeability, 15-HETE (2 mL of 400 ng/mL in PBS) or 15-lipoxygenase inhibitor 1 (2 mL of 4 μ L/mL in PBS; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) were given to male Sprague-Dawley rats (250 g; Janvier, Saint Berthevin Cedex, France) by 2 intraperitoneal injections of 1 mL at a 2-hour interval. Four hours after the first intraperitoneal, animals were sacrificed and the entire colon was removed, opened, and washed 3 times in cold Krebs's solution (0.187 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6.84 g/L NaCl, 0.35 g/L KCl, 2.10 g/L NaHCO_3 , 1.98 g/L glucose, 0.368 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.244 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Four pieces of each colon were mounted in Ussing chambers (0.03 cm^2 exposed surface area) (Physiological Instruments, San Diego, CA) as described previously.²² Each chamber contained 2 mL Ham's Nutrient Mixture (HAM/F12; Invitrogen, Courtaboeuf, France). The medium was maintained at 37°C under an atmosphere of 95% O_2 and 5% CO_2 . After 30 minutes of equilibrium, 200 μ L apical medium was replaced with 200 μ L fluorescein-5.6 sulfonic acid (1 mg/mL; Invitrogen). The fluorescence level of basolateral aliquots (150 μ L) was measured every 30 minutes for a period of 180 minutes using a fluorimeter (Varioskan, Thermo SA, France). Paracellular permeability was determined by the mean of the gradient of change in fluorescence intensity over time, using a linear regression fit model measured in the specimens (GraphPad Software, La Jolla, CA). Four rats were included in

each group. Two rats of the control group were treated with the 15-HETE excipient, ethanol, and 2 other control rats were treated with the 15-LOX inhibitor excipient, chloroform, at the same dilution as the drugs.

Drugs

The 5- or 15-HETE were purchased from Cayman Chemical. U0126 (MEK1/2 inhibitor, 10 μM; Calbiochem, La Jolla, CA) or AICAR (AMPK activator, 10 μM; Calbiochem) were added, or not, 30 minutes before the addition of 15-HETE.

Statistical Analysis

All graphics were drawn and analyzed with GraphPad Prism Software (GraphPad Software) using a Kruskal–Wallis nonparametric analysis of variance test followed by Dunn’s post test. Values of $P \leq .05$ were considered statistically significant.

Results

Rat Enteric Glial Cells Produce 5- and 15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid

To uncover molecules potentially implicated in glial–epithelial communication, we characterized the profile of 29 n-6 (eicosanoids)/n-3 (docosanoids) PUFA-derived metabolites in conditioned media of primary cultures of ROG or JUG. The 5- and 15-HETE levels were significantly higher in conditioned media of ROG and JUG compared with defined DMEM culture media (Figure 1). The 8-HETE, 18-HEPE, 8isoPGA2, 14-HDoHE, leukotriene A4, PGE2, and thromboxane B2 levels were also significantly higher in ROG-conditioned media, but not in those conditioned with JUG (Figure 1). Among the 29 lipidic mediators analyzed, 5 were undetected, and 15 others did not show any significant differences compared to defined DMEM culture media (Supplementary Material). This analysis showed that rat

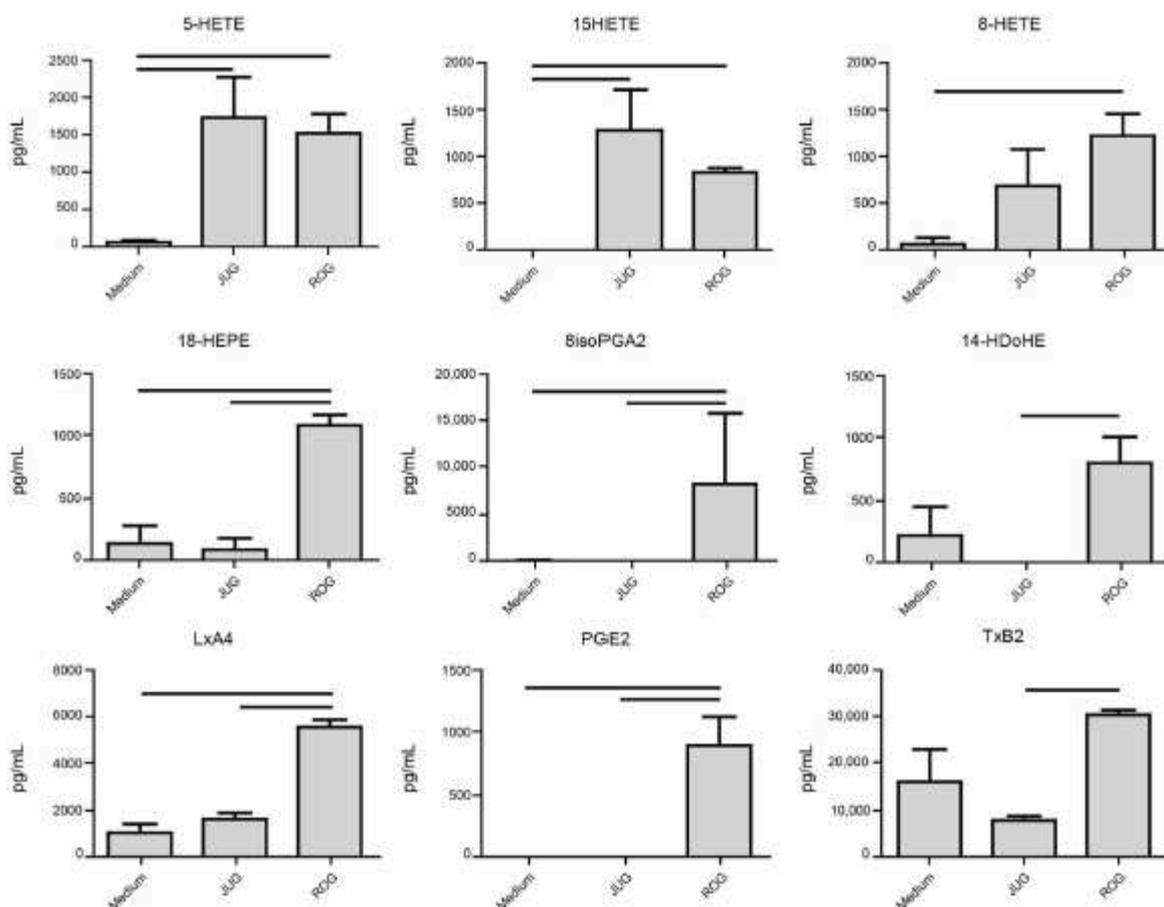


Figure 1. Rat EGCs mostly produce 5- and 15-HETE. Production of eicosanoids by EGCs was measured using high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry in the culture medium of JUG or primary cultures of ROG. Nine compounds were differentially present in culture medium alone (medium) or after 3 days of JUG or ROG culture. Fifteen compounds were present at the same level in these 3 media, and 5 compounds were undetected (Supplementary Material). Data represent means ± SEM of 4 independent cultures, $P < .05$.

EGC cell line or primary cultures can produce 5- and 15-HETE.

15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Increases Intestinal Epithelial Barrier Spreading and Resistance and Decreases Intestinal Epithelial Barrier Permeability

In a first set of experiments, we determined if these 2 mediators could regulate IEB properties by directly treating Caco-2 with 5- or 15-HETE. Compared with untreated cells, 15-HETE significantly increased the TEER (Figure 2A) and decreased the permeability (Figure 2B) of Caco-2 monolayers, whereas 5-HETE had no significant effect. Both mediators increased Caco-2 spreading (Figure 2C) compared with untreated cells. The 5- or 15-HETE did not modify Caco-2 cell numbers in these conditions (Figure 2D). These first functional data demonstrate that 5- or 15-HETE could

regulate IEB properties, and that 15-HETE had a broader effect than 5-HETE, regulating spreading and also resistance and permeability of an IEC monolayer. We focused our study on the effects of 15-HETE.

Human and Rat Enteric Glial Cells Express the 15-Lipoxygenase-2

To better understand 15-HETE production by EGC, we used immunostaining to analyze the expression of the 2 enzymes, 15-lipoxygenase-1 (15-LOX-1) and 15-lipoxygenase-2 (15-LOX-2), responsible for its production in ROG, and also in human EGC and human submucosal plexus. The immunoreactivity of 15-LOX-2 appeared as a cytoplasmic staining for 100% of ROG (Figure 3A) and human EGC (Figure 3B). The immunoreactivity of 15-LOX-1 was undetectable. Co-staining of human enteric submucosal plexus with 15-LOX-2 and S100 β glial marker showed that

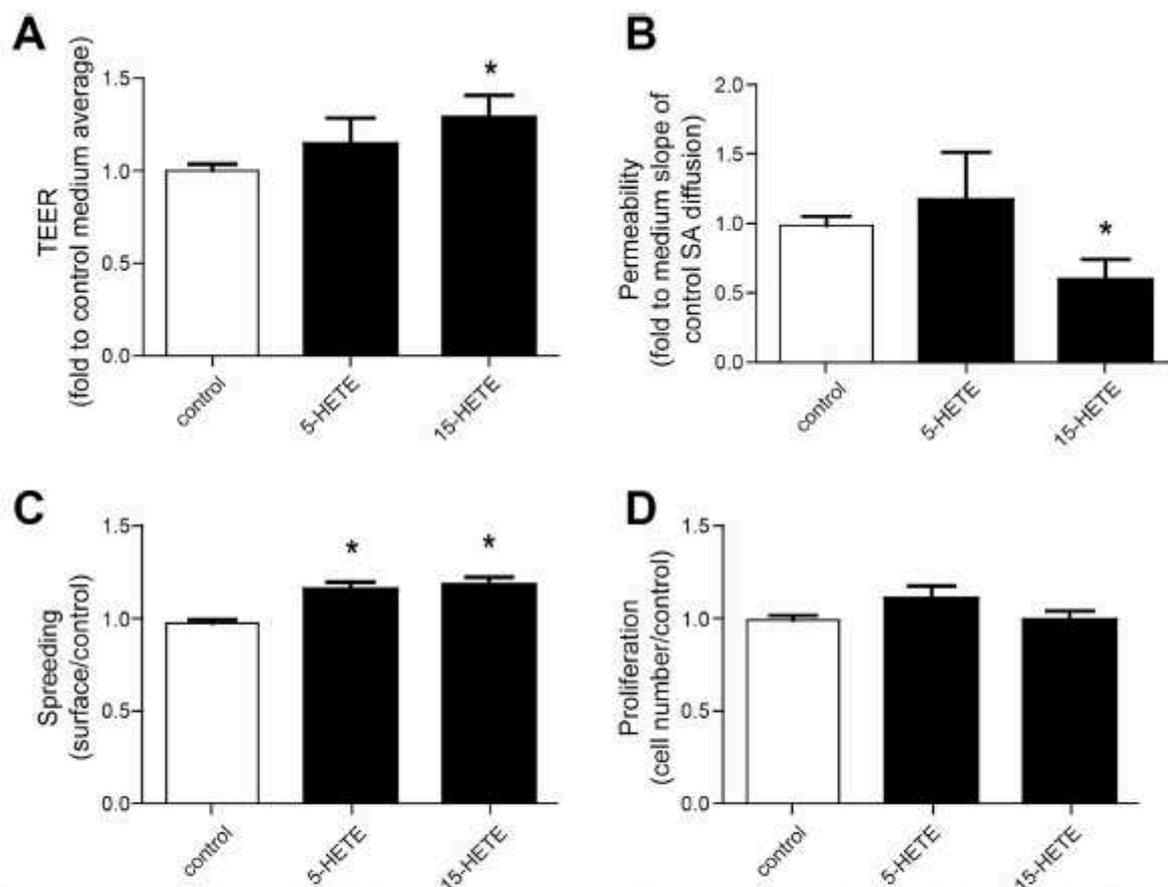


Figure 2. 15-HETE increases IEB spreading and resistance and decreases IEB permeability. 5- or 15-HETE functional impact on IEB was assessed by TEER, permeability, spreading, and proliferation measurements. (A) TEER was measured on a Caco-2 monolayer after 1 day of 5- or 15-HETE (100 pg/mL) in the basolateral 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 4',6-diamidino-2-phenylindole staining. These 4 parameters are represented as fold to the control mean. Data represent means \pm SEM of 4 to 6 independent experiments. $P < .05$. LxA4, leukotriene A2; TxB2, thromboxane B2.

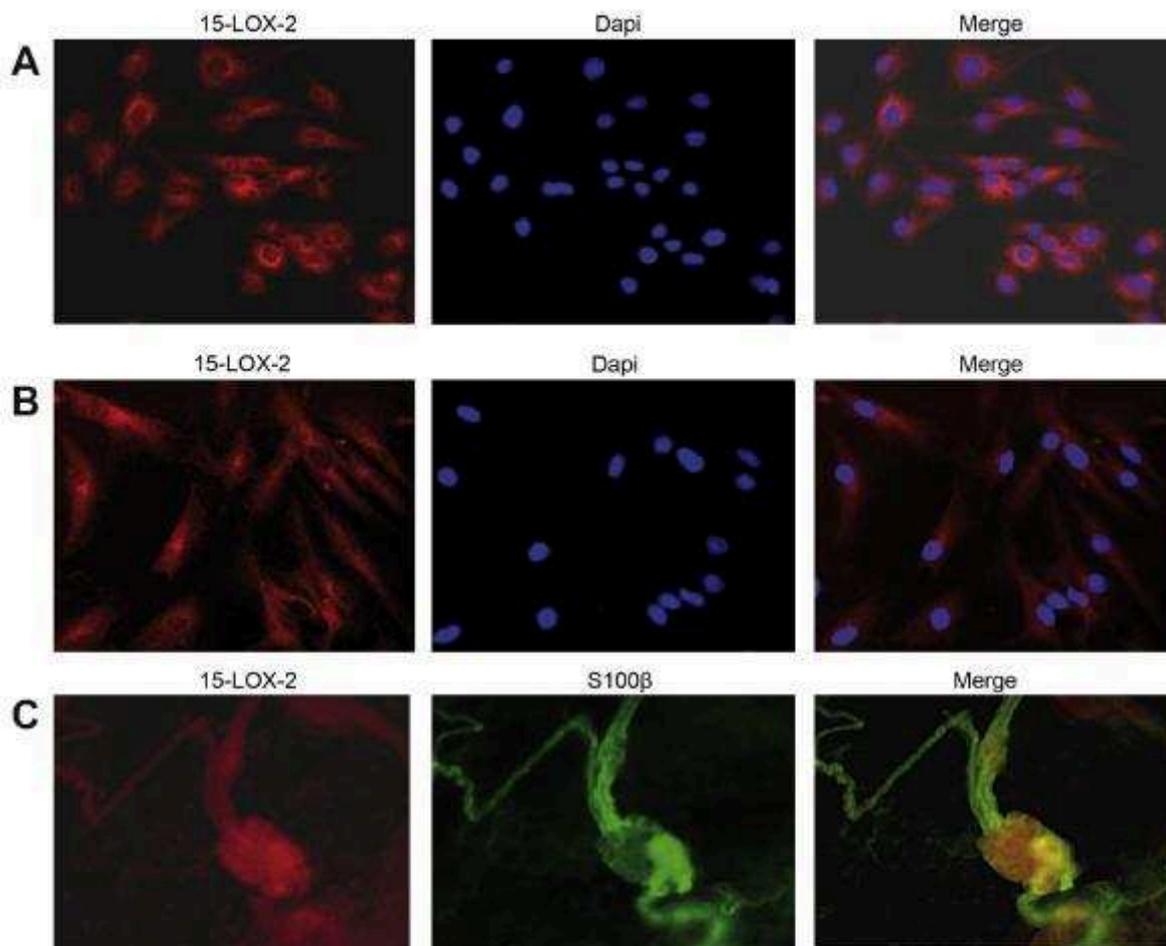


Figure 3. Human and rat EGC express the 15-lipoxygenase-2(15-LOX-2). (A) ROG and (B) human EGC immunostaining for 15-LOX-2. Scale bar = 50 μ m. (C) Submucosal immunohistochemistry was performed using anti-15LOX-2 and -S100 β (glial marker) antibodies. Representative pictures. dapi, 4',6-diamidino-2-phenylindole. Scale bar = 100 μ m.

15-LOX-2 is expressed in situ in EGC, and also in neurons (Figure 3C).

Defect of 15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Production by Crohn's Disease Enteric Glial Cells Is Responsible for Increased Intestinal Epithelial Barrier Permeability

To analyze the importance of glial 15-HETE production and its impact on IEB in a pathologic context, we studied EGC from CD patients compared with control patients. The 15-Lox-2 messenger RNA (ALox15B) expression was measured in control and CD EGCs and 15-HETE production was measured in control and CD EGC-conditioned media. Although ALox15B was expressed at comparable levels in control and CD EGC (Figure 4A), the 15-HETE level was significantly lower in CD compared with control EGC-conditioned media (Figure 4B). To study the functional impact of control and CD EGCs on IEB, we replaced Caco-2

basolateral culture media with EGC-conditioned media. Control EGC-conditioned media induced a significant decrease in IEB permeability, but CD EGC-conditioned media had no effect (Figure 4C). The 15-HETE supplementation in CD EGC-conditioned media significantly decreased IEB permeability, but had no additional effect when added to control EGC-conditioned media (Figure 4C). These data show that the functional defect presented by CD EGCs could be fixed by addition of 15-HETE.

In Vivo Inhibition of 15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Production Induces Intestinal Epithelial Barrier Permeability

To evaluate the range of impact of 15-HETE on IEB permeability in vivo, rats were injected intraperitoneally with 15-HETE or 15-LOX inhibitor 1, and the permeability of colon pieces was measured in Ussing chambers. The 15-HETE injection had no significant effect, and 15-LOX

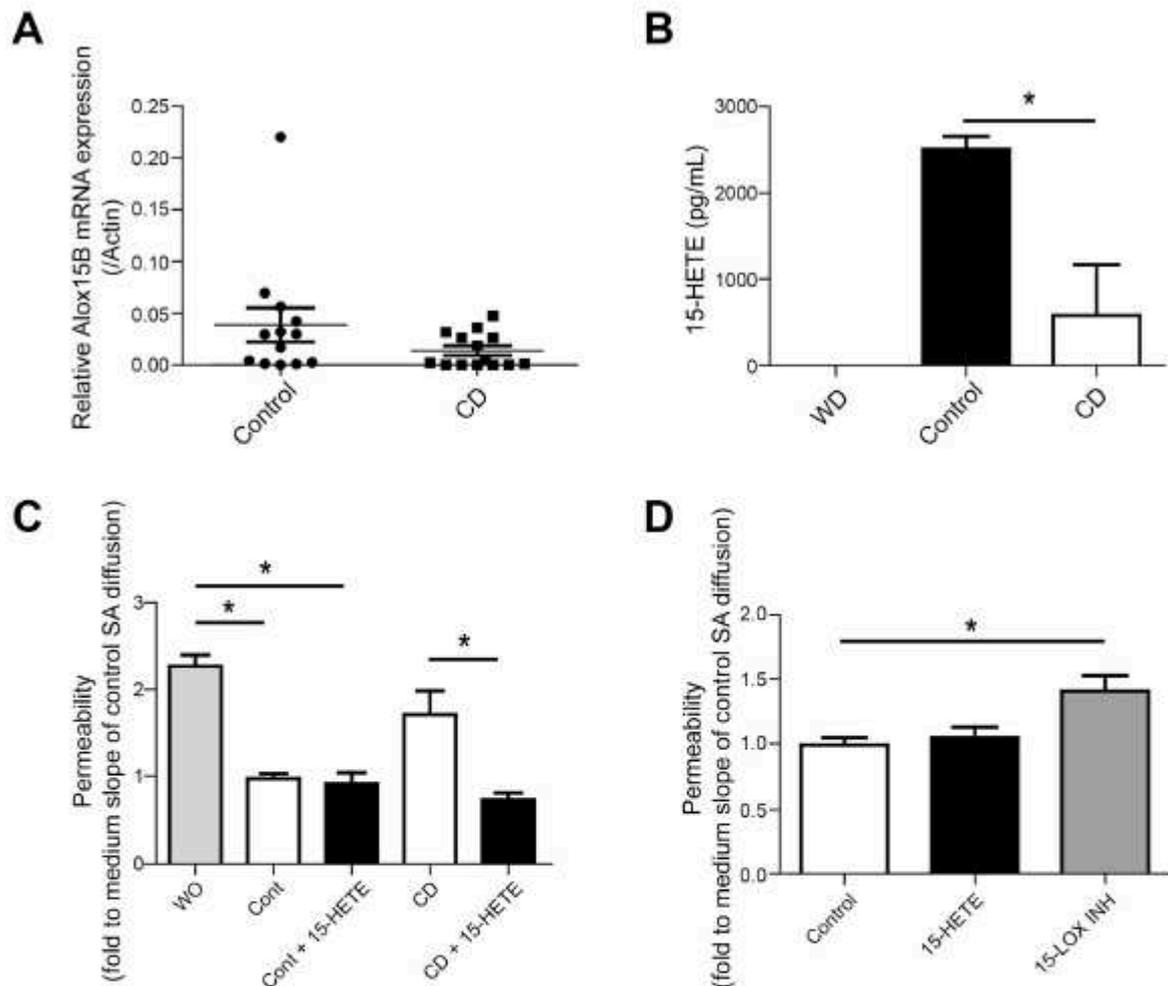


Figure 4. EGCs from CD patients are functionally abnormal: they misproduce 15-HETE and fail to reduce IEB permeability. (A) ALox15B messenger RNA (coding for 15-LOX-2) expression was measured in human EGC from control (control) or CD (CD) patients. (B) 15-HETE production was measured by liquid chromatography tandem mass spectrometry in the culture medium of human EGCs from control or CD patients, or in the culture medium alone (WO). Data represent means \pm SEM of 6 independent control and 5 CD EGC cultures. * $P < .05$. (C) Permeability was measured by sulfonic acid flux through the Caco-2 monolayer incubated without (WO) or with control (cont) or CD EGC-conditioned media, with supplementation of 15-HETE (+15-HETE) or not. Data represent means \pm SEM of fold to the control mean of 3 to 6 independent experiments. * $P < .05$. (D) 15-HETE functional impact in vivo was evaluated by the measurement of colon permeability of rats 4 hours after intraperitoneal injections with 15-HETE (15-HETE) or 15-lipoxygenase inhibitor 1 (15-lox INH). Data represent means \pm SEM of 2 independent experiments, 4 animals per group for each experiment; * $P < .05$.

inhibitor 1 injection induced an increase in IEB permeability (Figure 4D). This indicated that 15-HETE production constantly maintains IEB permeability in vivo.

15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Induces Zonula Occludens-1 Expression in Intestinal Epithelial Cells

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 for 5 minutes, 15 minutes, or 24 hours. Expression

of ZO-1 was increased after 15 minutes and 24 hours of 15-HETE treatment, and claudin 1, claudin 2, occludin, JAM-A, and ZO-2 expression were unchanged (Figure 5A and B). This indicated that 15-HETE could decrease IEB permeability through a rise in ZO-1 expression.

Zonula Occludens-1 Is Necessary to Regulate Epithelial Resistance and Permeability in Response to 15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid

To assess the role of ZO-1 in the effects of 15-HETE, we generated a Caco-2 cell line that down-regulates ZO-1

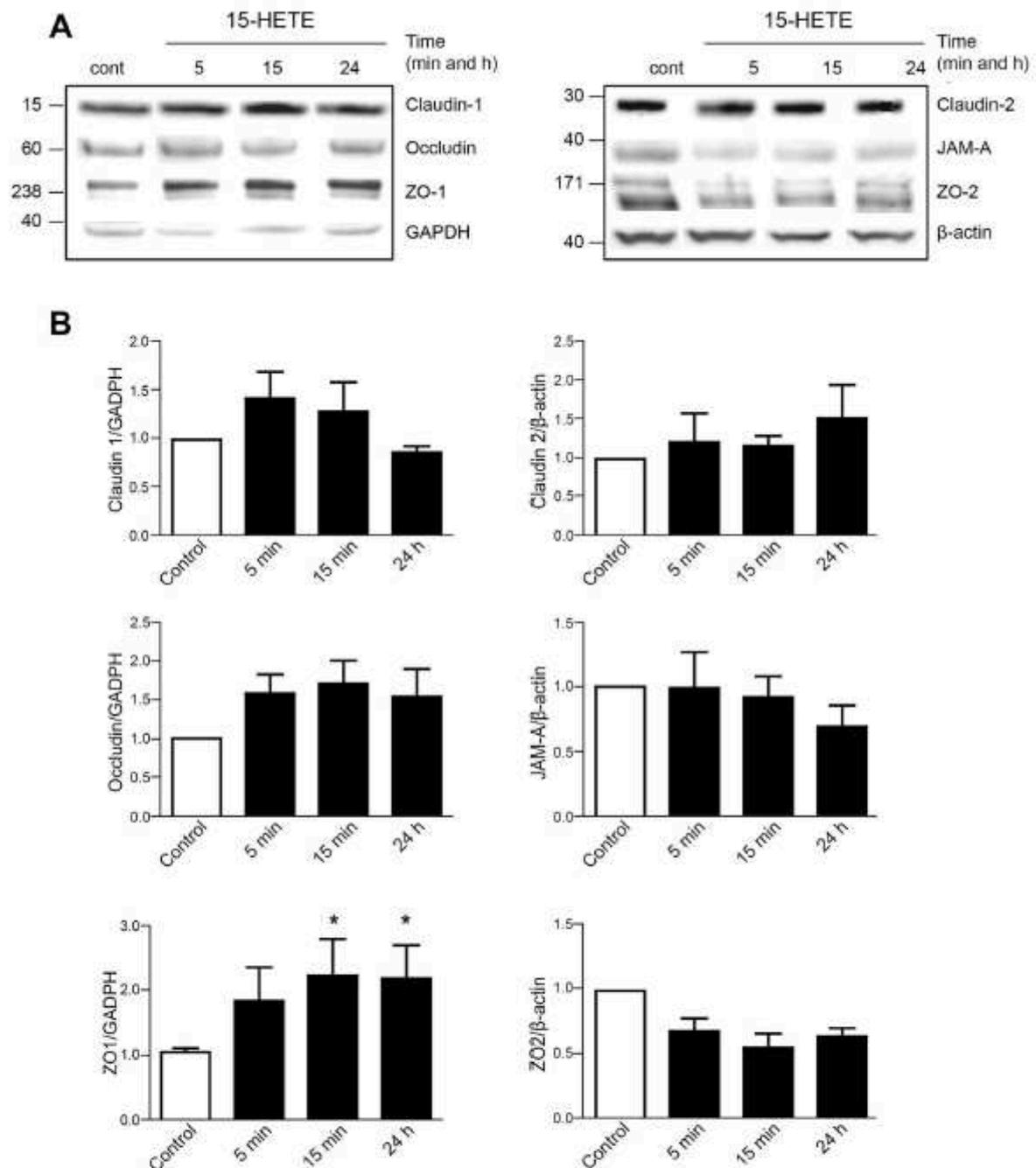


Figure 5. 15-HETE induces ZO-1 expression in IEC. (A) Claudin-1, claudin-2, occluding, JAM-A, ZO-1, and ZO-2 expression were measured by Western blotting from Caco-2 monolayers stimulated for 5 minutes, 15 minutes, or 24 hours with 15-HETE (100 pg/mL) at the basolateral side. (B) Quantification of Western blot analysis. Data represent means of fold to control mean ± SEM of 3 to 4 independent experiments. **P* < .05.

expression. We stably expressed ZO-1 short-hairpin RNA and isolated a stable cell line on the basis of puromycin resistance. This cell line showed a significant reduction of around 80% of ZO-1 protein levels when compared with

control, and no more induction of ZO-1 expression after treatment with 15-HETE (Figure 6A). The 15-HETE-induced increase in TEER and decrease in permeability observed in control Caco-2 were absent in the

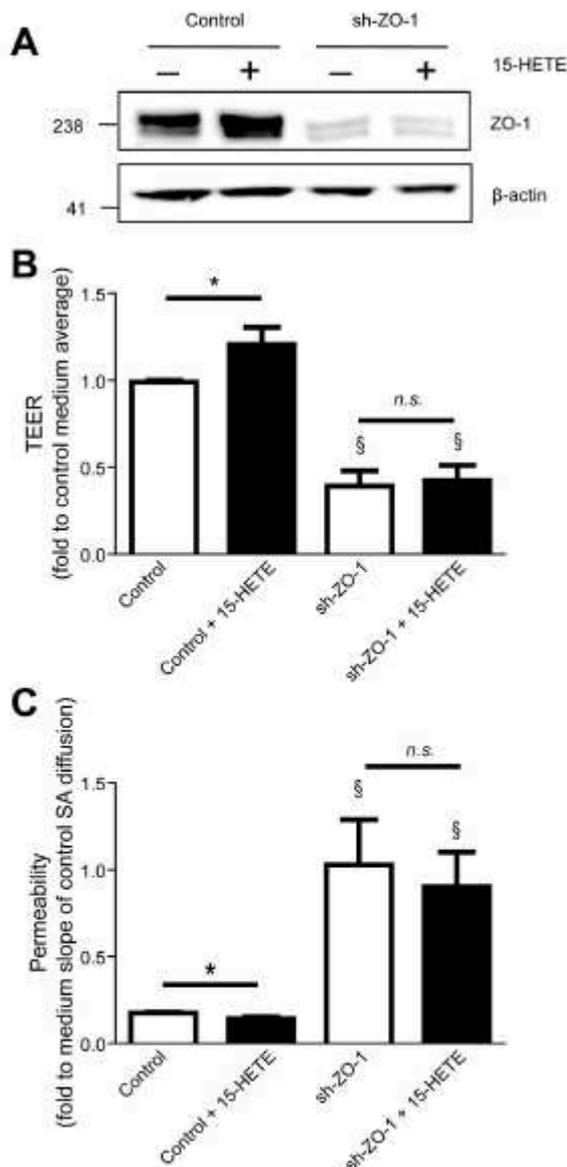


Figure 6. ZO-1 is necessary to regulate epithelial resistance and permeability in response to 15-HETE. Stable Caco-2 cell lines expressing short-hairpin RNA sequences targeting ZO-1 (sh-ZO-1) or degenerated sequences (control) were established to assess the role of ZO-1 in 15-HETE effects. (A) Representative Western blot analysis shows that sh-ZO-1 effectively knocks down ZO-1 expression. (B) TEER was measured on control or sh-ZO-1 Caco-2 monolayers with or without 1 day of 15-HETE (100 pg/mL) in the basolateral chamber. (C) Permeability was measured by sulfonic acid flux through the same Caco-2 monolayers. These 2 parameters are represented as fold to the medium control mean. Data represent means \pm SEM of 6 independent experiments. * $P < .05$ compared to without 15-HETE; [§] $P < .05$ compared to control.

sh-ZO-1 cell line (Figure 6B and C). Compared with control cells, sh-ZO-1 cells presented significantly decreased TEER (Figure 6B) and increased permeability (Figure 6C). These data demonstrate that the regulation of IEB properties by 15-HETE is mediated by ZO-1.

15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Inhibits Adenosine Monophosphate-Activated Kinase to Increase Intestinal Epithelial Barrier Resistance

To refine the signaling involved in the control of IEB permeability by 15-HETE, we analyzed the transduction pathways that could be activated by 15-HETE in IECs. The 15-HETE regulates several cellular functions through tyrosine phosphorylation, Src, extracellular signal-regulated kinase (ERK), or AMPK activation.²³⁻²⁵ Global tyrosine phosphorylation did not vary with the time period of 15-HETE stimulation (Figure 7A and B). Quantification of specific major signals of tyrosine phosphorylation at 22, 40, or 110 kDa did not show further variations (quantification not shown). ERK phosphorylation was significantly increased after 15 minutes and 24 hours of 15-HETE treatment, and Src phosphorylation remained stable (Figure 7A and B). On the contrary, AMPK phosphorylation was significantly reduced after 15 minutes of 15-HETE treatment (Figure 7A and B). To study the implication of ERK activation or AMPK inhibition on 15-HETE-induced reduction of permeability, we pretreated Caco-2 cells with the ERK pathway inhibitor, U0126, or the AMPK activator, AICAR. U0126 treatment alone decreased IEB permeability, and 15-HETE had no additional effect (Figure 7C). The AICAR compound entirely blocked the 15-HETE-induced decrease in IEB permeability and, despite a trend, had no significant effect alone (Figure 7D). These data demonstrated that ERK activation by 15-HETE was not responsible for the inhibition of IEB permeability by 15-HETE, and AMPK inhibition was.

Discussion

Whereas several studies have described phenotypic abnormalities of EGC from CD patients, no functional study is available to define whether these cells present dysfunctions. Our work demonstrates that CD EGCs are defective for IEB permeability control, a defect that could be due to their low 15-HETE production. At the same time, we describe how EGCs express 15-LOX-2, but not 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 indicates that a few metabolites are present in EGC-conditioned medium, and that LOX metabolites such as 5- and 15-HETE are highly produced, independently of the source of rat EGC, primary cultures or cell lines. Considering the low stability of these compounds, we cannot draw conclusions about the absence of production of the other PUFA by EGC, but we could ensure the production of 5-and

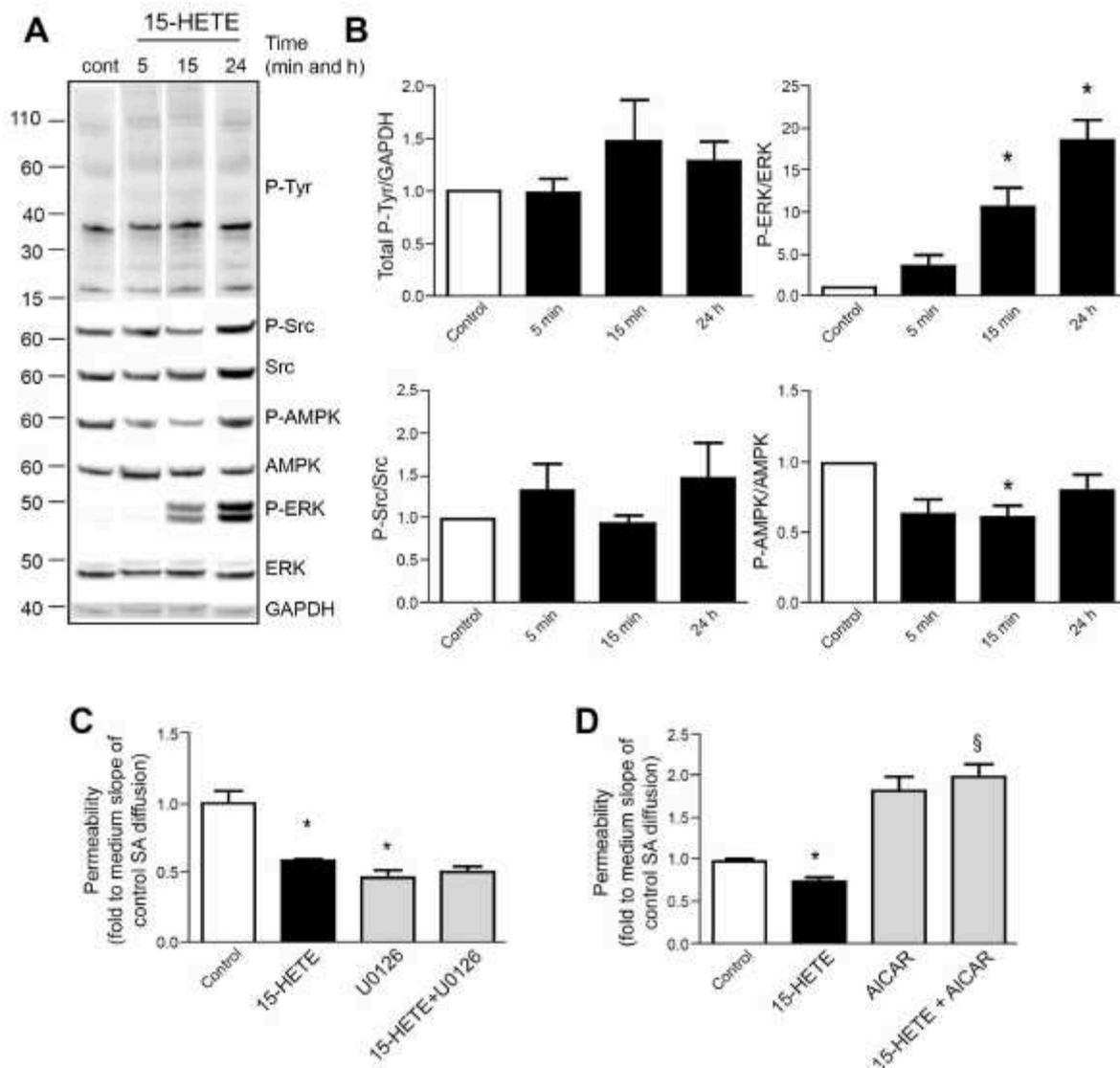


Figure 7. 15-HETE inhibits AMPK to decrease IEB permeability. (A) Total phospho-tyrosine (P-Tyr), ERK phosphorylation (P-ERK), Src phosphorylation (P-Src), and AMPK phosphorylation (P-AMPK) levels were measured by Western blotting from Caco-2 monolayers stimulated for 5 minutes, 15 minutes, or 24 hours with 15-HETE (100 pg/mL) at the basolateral side. (B) Quantification of Western blot analysis. Data represent means of fold to control mean \pm SEM of 4 independent experiments. * $P < .05$. (C) Impact of ERK inhibition on IEB permeability was assessed by pretreatment of Caco-2 monolayer with the MEK inhibitor (U0126, 10 μ M) 30 minutes before 15-HETE stimulation. Data represent means of fold to control mean \pm SEM of 3 independent experiments. * $P < .05$. (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 mean \pm SEM of 3 independent experiments. * $P < .05$ vs control; [§] $P < .05$ vs 15-HETE.

15-HETE. In addition, 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,²⁶ and later in lung, esophageal epithelial cells, and ovarian tissue.²⁷⁻²⁹ The biologic functions of 15-LOX-2 in different cell types are diverse.

Until now, it has mainly been studied in relation to cancer and atherosclerosis. The 15-LOX-2 negatively regulates the proliferation of prostate epithelial cells^{30,31} and has a tumor-suppressing role.^{32,33} Concerning atherosclerosis, the beneficial role of 15-LOX has been questioned for a long time regarding the anti-inflammatory effect of 15-LOX through lipid mediator production and the proinflammatory and atherogenic effects through oxLDL

formation.³⁴ Nevertheless, recent studies have focused on a proatherogenic role of 15-LOX-2,^{35–37} in particular by increasing inflammation. In fact, 15-LOX-2 exerts biologic activities via the formation of bioactive lipids, mainly 15-HETE, that could exhibit numerous pro- or anti-inflammatory properties. The 15-HETE increases platelet aggregation,³⁸ and induces endothelial cell barrier dysfunction,³⁹ angiogenesis,^{24,40–43} and vascular and pulmonary smooth muscle remodeling.^{23,25,44–49} Concerning effects on the epithelium, 15-HETE has been shown to induce cell growth of pre-confluent non-differentiated IECs.⁵⁰ We did not find an effect of 15-HETE on Caco-2 cell numbers, and could only explain this difference by the confluence and the IEC culture on filters. Only one other study has reported that 15(S)-HETE can increase Caco-2 TEER and decrease permeability.⁵¹ We confirmed these results and have additionally shown that 15-HETE induces Caco-2 spreading and controls the permeability in vivo. This enlarges the spectrum of the effects of 15-HETE on IEB, and because these are beneficial, we could consider them to reinforce the IEB, especially in a pathologic context presenting IEB defects.

Due to their anti- or proinflammatory properties, some PUFAs have already been measured in the mucosa of inflammatory bowel disease patients.^{15–18} More recently, it was shown that levels of PGE₂, PGD₂, thromboxane B₂, 5-HETE, 11-HETE, 12-HETE, and 15-HETE were significantly elevated in inflamed mucosa and correlated with the severity of inflammation in UC patients.⁵² The production of 15-HETE was also induced after ischemia in mouse jejunal tissue.⁵³ Our work provides evidence for a protective role of 15-HETE, prompting a reinforcing of the IEB by diminishing its permeability.

This study additionally shows that, in Caco-2 cells, 15-HETE did not activate Src or induce tyrosine phosphorylation as described previously,^{25,45} but activated the ERK and inhibited the AMPK pathways. Whereas ERK activation was not responsible for the reduction in permeability observed, the AMPK inhibition was. 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 with AMPK. Nevertheless, the nordihydroguaiaretic acid inhibitor of 15-LOX induced phosphorylation and activation of AMPK,⁵⁴ confirming the relation we are describing between 15-HETE and AMPK. In addition, if the expression of AMPK was necessary for an amelioration of the epithelial barrier,^{55,56} AMPK activation has been linked to intestinal barrier dysfunction.^{57,58} AMPK activation has also been shown to decrease ZO-1 expression.⁵⁷ Further work is necessary to define if, as described, inhibition of the AMPK α 2 isoform, but not inhibition of α 1, can reinforce the epithelial barrier.⁵⁹

Nevertheless, we have shown that the impact of 15-HETE on permeability requires ZO-1 expression, confirming that this tight junction protein is a key mediator of the EGC control of epithelial permeability and resistance.^{9,11,12,60} Taking into account the impact of nutrients and microbiota on the phenotype and function of the

enteric nervous system,⁶¹ we might wonder whether nutritional status can influence gut wall integrity through the ENS.⁶²

Our work defines the novel protective role of 15-HETE on the IEB, and shows that 15-HETE mediates its effect through AMPK inhibition and ZO-1 expression. In addition, this work brings the first evidence of human EGC dysfunction in CD. Overall, our ex vivo functional studies indicate that primary cultures of EGCs isolated from noninflamed intestine of CD patients exhibit loss of function as compared with EGCs isolated from control patients. These findings suggest that CD EGCs have an altered intrinsic functional phenotype. It is tempting to speculate that impaired intrinsic functions of EGCs from CD patients predispose to and/or directly participate in the disease onset, supporting the idea that CD could be a “gliopathy.”

Supplementary Material

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at www.gastrojournal.org, and at <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.038>.

References

- 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.
- Comet A, Savidge TC, Cabarrocas J, et al. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13306–13311.
- 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;55:630–637.
- Arrieta MC, Madsen K, Doyle J, et al. Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. *Gut* 2009;58:41–48.
- Neunlist M, Van Landeghem L, Mahe MM, et al. The digestive neuronal-glial-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10:90–100.
- 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–G241.
- Bach-Ngohou K, Mahe MM, Aubert P, et al. Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J Physiol* 2010;588:2533–2544.
- 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–G987.
- Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, et al. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 2007; 132:1344–1358.

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. *Am J Pathol* 2012;181:478–486.
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;60:473–484.
13. von Boyen GB, Schulte N, Pfluger C, et al. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol* 2011;11:3.
14. Jupp J, Hillier K, Elliott DH, et al. Colonic expression of leukotriene-pathway enzymes in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:537–546.
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;38:564–567.
16. Sharon P, Stenson WF. Enhanced synthesis of leukotriene B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1984;86:453–460.
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;21:591–596.
18. Nielsen OH, Ahnfelt-Ronne I, Elmgreen J. Abnormal metabolism of arachidonic acid in chronic inflammatory bowel disease: enhanced release of leukotriene B4 from activated neutrophils. *Gut* 1987;28:181–185.
19. Murakami M, Ohta T, Otsuguro KI, et al. Involvement of prostaglandin E2 derived from enteric glial cells in the action of bradykinin in cultured rat myenteric neurons. *Neuroscience* 2007;145:642–653.
20. Soret R, Coquenforge S, Cossais F, et al. Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells. *Neurogastroenterol Motil* 2013;25:e755–e764.
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. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013;932:123–133.
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. *J Physiol* 2011;589:4341–4352.
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. *J Recept Signal Transduct Res* 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;115:2105–2116.
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. *J Biol Chem* 2011;286:22478–22488.
26. Brash AR, Boeglin WE, Chang MS. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:6148–6152.
27. Chanez P, Bonnans C, Chavis C, et al. 15-lipoxygenase: a Janus enzyme? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:655–658.
28. 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* 2003;5:121–127.
29. Roffeis J, Hornung D, Kuhn H, et al. 15-Lipoxygenase-2 is differentially expressed in normal and neoplastic ovary. *Eur J Cancer Prev* 2007;16:568–575.
30. 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 Mediat* 2007;82:135–146.
31. 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. *J Biol Chem* 2002;277:16189–16201.
32. Bhatia B, Maldonado CJ, Tang S, et al. Subcellular localization and tumor-suppressive functions of 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) and its splice variants. *J Biol Chem* 2003;278:25091–25100.
33. 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 Leukot Essent Fatty Acids* 2006;74:235–245.
34. Wittwer J, Hersberger M. The two faces of the 15-lipoxygenase in atherosclerosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007;77:67–77.
35. 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.
36. Wuest SJ, Cruet M, Gemperle C, et al. Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages. *Atherosclerosis* 2012;225:121–127.
37. Rydberg EK, Krettek A, Ullstrom C, et al. Hypoxia increases LDL oxidation and expression of 15-lipoxygenase-2 in human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2040–2045.
38. Vijil C, Hermansson C, Jeppsson A, et al. Arachidonate 15-lipoxygenase enzyme products increase platelet aggregation and thrombin generation. *PLoS One* 2014;9:e88546.
39. 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.

40. 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; 58:679–688.
41. 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;61:707–718.
42. 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. *Biochem Cell Biol* 2014;91:498–505.
43. 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 preeclampsic pregnancy. *PLoS One* 2014;9:e96510.
44. 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 Mediat* 2010; 93:84–92.
45. Potula HS, Wang D, Quyen DV, et al. Src-dependent STAT-3-mediated expression of monocyte chemo-attractant protein-1 is required for 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vascular smooth muscle cell migration. *J Biol Chem* 2009;284:31142–31155.
46. 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 Mediat* 2010;91:51–60.
47. 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. *J Biochem* 2010; 147:751–764.
48. Zhang L, Ma J, Li Y, et al. 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) protects pulmonary artery smooth muscle cells against apoptosis via HSP90. *Life Sci* 2010; 87:223–231.
49. 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. *Cell Signal* 2012;24:1931–1939.
50. Cabral M, Martin-Venegas R, Moreno JJ. Role of arachidonic acid metabolites on the control of non-differentiated intestinal epithelial cell growth. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45:1620–1628.
51. Ohata A, Usami M, Miyoshi M. Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxygenase activation. *Nutrition* 2005; 21:838–847.
52. 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.
53. Gobetti 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.
54. 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. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;401:92–97.
55. 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. *J Nutr* 2013;143:1872–1881.
56. 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. *J Surg Res* 2014;187:252–261.
57. Scharl M, Paul G, Barrett KE, et al. AMP-activated protein kinase mediates the interferon-gamma-induced decrease in intestinal epithelial barrier function. *J Biol Chem* 2009;284:27952–27963.
58. 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; 137:2030–2040 e5.
59. Qin S, Rodrigues GA. Differential roles of AMPK α 1 and AMPK α 2 in regulating 4-HNE-induced RPE cell death and permeability. *Exp Eye Res* 2010;91:818–824.
60. 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–G1036.
61. Neunlist M, Schemann M. Nutrient-induced changes in the phenotype and function of the enteric nervous system. *J Physiol* 2014;592:2959–2965.
62. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 2009;58:1091–1103.

Author names in bold designate shared co-first authorship.

Received January 19, 2015. Accepted September 16, 2015.

Reprint requests

Address requests for reprints to: Malvynne Rolli-Dekinderen, PhD, or Michel Neunlist, PhD, INSERM UMR913, School of Medicine, University of Nantes, 1, rue Gaston Veil, NANTES, F-44035, France. e-mail: malvynne.rolli-dekinderen@univ-nantes.fr; Michel.Neunlist@univ-nantes.fr; fax: (+33) 02 40 08 75 06.

Acknowledgments

The authors are indebted to Tony Durand for quantitative polymerase chain reaction expertise and to Christina Van Itaille (National Heart, Lung and Blood Institute of the National Institutes of Health) for providing the MDCK cell lines. Experiments were carried within the small animal exploration facility Cardex, which is supported by the GIS-IBSA program.

Conflicts of interest

The authors disclose no conflicts.

Funding

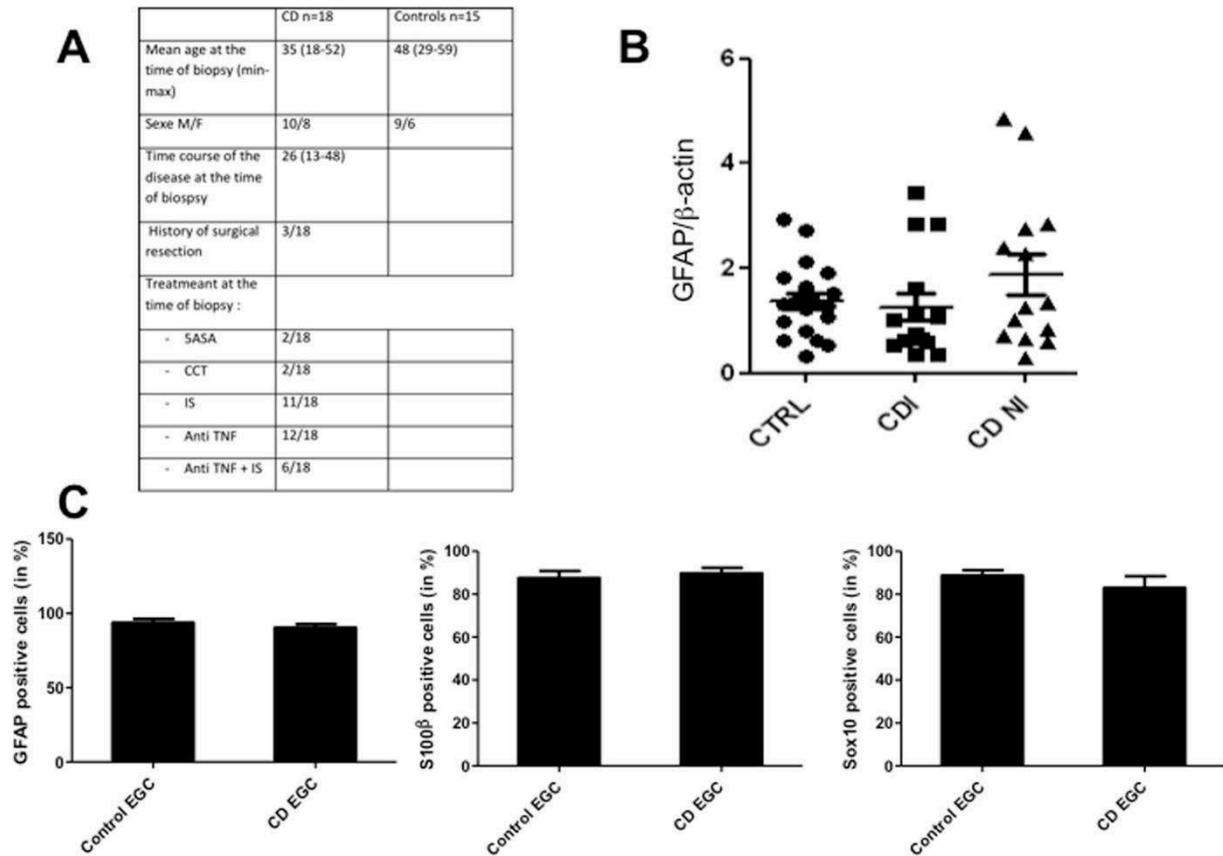
This work was funded by the INSERM, Nantes University, the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) of Nantes and SanTige foundation. Sabrina Coqueron and Camille Pochard are recipients of doctoral fellowships from Inserm-Pays de La Loire. Malvynne Rolli-Dekinderen is supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS). Michel Neunlist is supported by a Contrat d'interface Hospitalier du CHU of Nantes.

		6kPGF1 α	PGE3	LxB4	RvDx	LTB5	PGA1	LTB4	15dPGJ2
medium	(pg/ml)	115.82	1250.16	2092.93	1521.20	0.00	0.00	410.42	433.65
	SD	200.60	578.57	1246.22	566.70	0.00	0.00	246.50	195.76
JUG	(pg/ml)	0.00	592.59	1141.71	2099.77	0.00	0.00	389.04	457.11
	SD	0.00	105.39	1141.92	848.34	0.00	0.00	252.29	112.16
ROG	(pg/ml)	1569.05	561.04	356.51	1094.27	138.80	463.47	351.75	395.27
	SD	2813.47	727.60	797.18	265.23	310.38	1036.34	110.24	49.16
		17-HDoHE	12-HETE	14,15-EET	5-oxoETE	11,12-EET	8,9-EET	5,6-EET	ND
medium	(pg/ml)	0.00	292.21	244.21	38584.08	1058.09	0.00	82.54	PGF2 α
	SD	0.00	506.13	422.98	24982.21	1832.66	0.00	142.96	RvD1
JUG	(pg/ml)	0.00	1106.24	0.00	32835.13	1503.71	0.00	877.12	7MaR1
	SD	0.00	1424.77	0.00	34447.21	1507.94	0.00	1519.21	PD1
ROG	(pg/ml)	460.90	2434.02	873.64	38223.42	399.85	136.07	381.46	5,6-DiHETE
	SD	654.16	1368.65	906.52	30814.11	894.08	304.26	364.22	

SUPPL MAT 1. Rat EGC mostly produce 5- and 15-HETE.

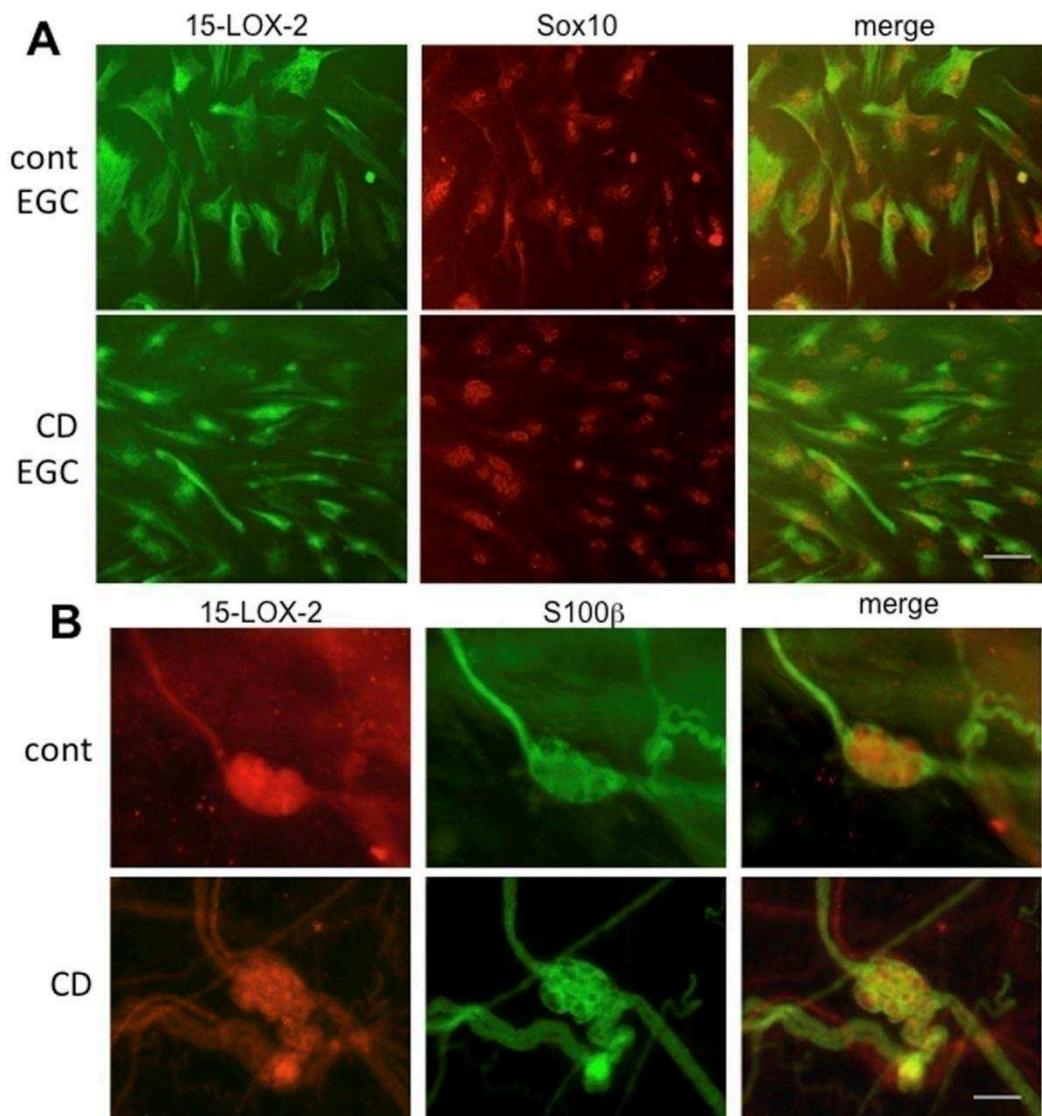
The PUFA dosage was performed as described by Le Faouder et al.²¹ This innovative method allows the simultaneous measurement of 29 lipids: 6-keto-prostaglandin F1 α (6kPGF $_{1\alpha}$); thromboxan B2 (TXB $_2$); prostaglandin E2 (PGE $_2$); prostaglandin E3 (PGE $_3$); prostaglandin A1 (PGA $_1$); 8-iso prostaglandin A2 (8-isoPGA $_2$); 15-Deoxy-Delta12,14-Prostaglandin J2 (15d-PGJ $_2$); lipoxin A4 (LxA $_4$); resolvin D1 (RvD $_1$); leukotrien B4 (LTB $_4$); leukotrien B5 (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 29 lipids of interest and 3 deuterated internal standards (LxA $_4$ -d5, LTB $_4$ -d4, 5-HETE-d8) were separated by LC-MS/MS analysis on an HPLC system (Agilent LC1290 Infinity) coupled to Agilent 6460 triple quadrupole MS (Agilent Technologies) equipped with electrospray ionization operating in negative mode. Reverse-phase HPLC was performed using a 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 analyses were performed using MassHunter Quantitative Analysis software (Agilent Technologies).

Production of eicosanoids by EGC was measured using high sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry in the culture medium of a rat EGC cell line (JUG) or primary cultures of rat EGC (ROG). Nine compounds were differentially present in culture medium alone (medium) or after 3 days of JUG or ROG culture (Figure 1). Fifteen compounds were present at the same level in these three media, and five compounds were undetected (ND) (Suppl Mat 1). Data represent means \pm SEM of 4 independent cultures, p<0.05.



SUPPL MAT 2. EGC from CD patients are comparable to EGC from control patients.

(A) Main clinical features of patients with Crohn's disease (CD) and control. 5-aminosalicylic acid (5-ASA); corticoids (CCT); immunosuppressive treatment (IS); anti-Tumor Necrosis Factor alpha antibodies (anti-TNF). (B) GFAP mRNA was quantified in biopsies from control (CTRL) or CD patients in inflamed (CDI) or non inflamed (CD NI) area. (C) Cells expressing the glial markers GFAP, S100 β or Sox10 are expressed as percentage of the total cells in each culture used.

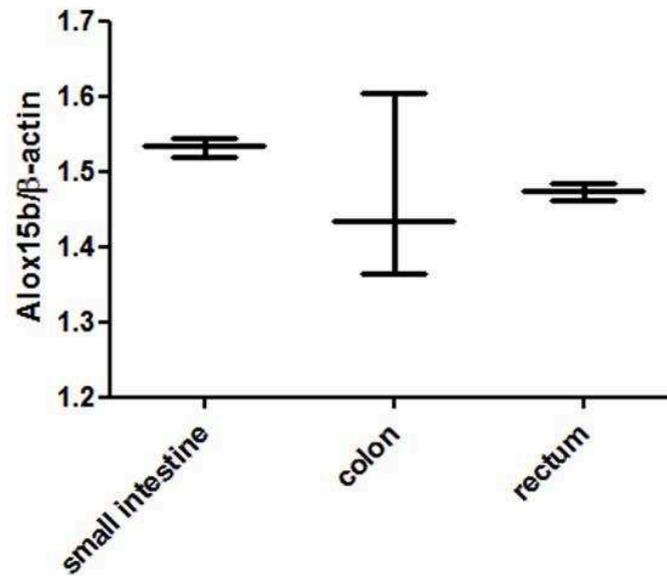


SUPPL MAT 3. Human EGC from control patients (cont EGC) or Crohn's disease patients (CD EGC) express the 15-lipoxygenase-2.

To compare 15-lipoxygenase-2 (15-LOX-2) expression in control (cont EGC) versus CD EGC, we have observed 15-lox2- immunostaining in culture or *in situ*.

Immunostaining was performed 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 anti-rabbit 488 (713-095-147; 1:1000; Jackson ImmunoResearch or FluoProbes®488; 1:1000; Interchim). Submucosal plexuses of control patients were also analyzed for lipoxygenase immunoreactivity with slight modification of time and buffer composition from the protocol described above. Tissues were fixed for 4 h in PAF and incubated in NH_4Cl (100 mM) for 15 min before incubation in PBS-0.5% Triton X-100-1% saponine for 1 h and a blocking procedure for 2 h in PBS-0.5% triton X-100-1% saponin and 10% horse serum. Primary antibodies were incubated for 2 days, and secondary antibodies overnight. S100b (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) and analyzed with Cell B software (Soft Imaging System, Olympus).

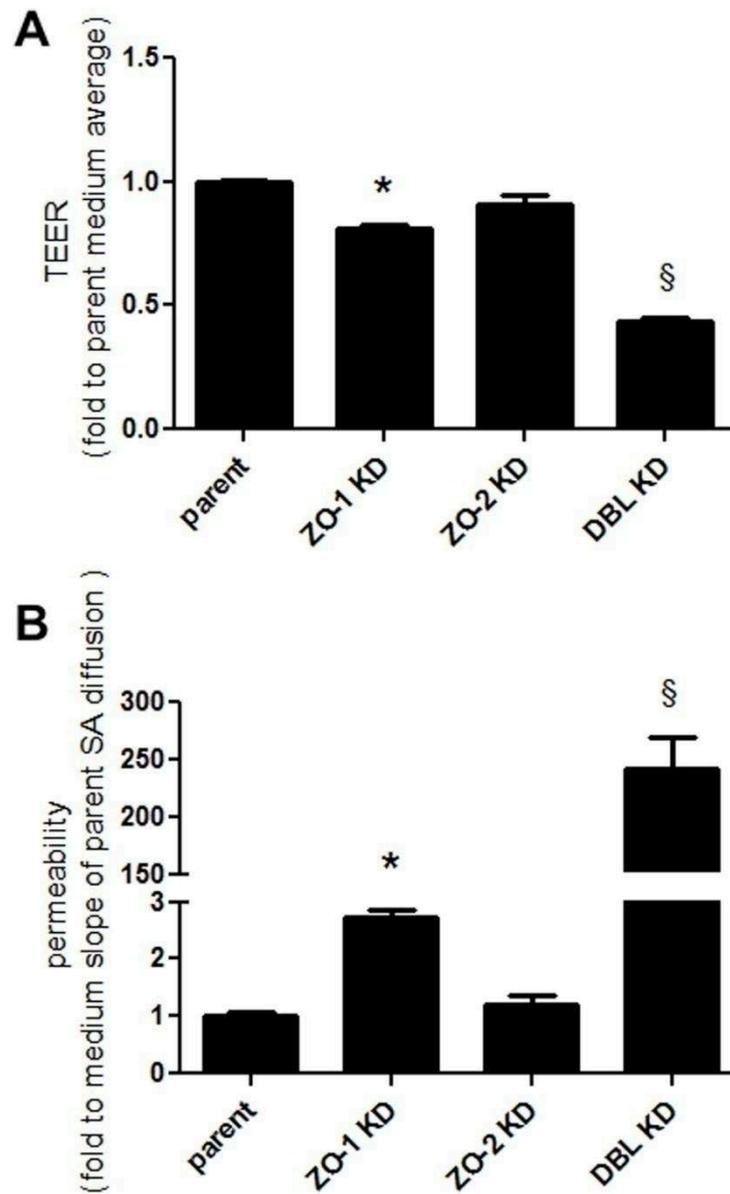
(A) human EGC immunostaining for 15-LOX-2 or Sox-10 glial marker. Scale bare 50 μm . (B) Immunohistochemistry of submucosal plexus from control (cont) or CD patients (CD) was performed using anti-15LOX-2 and -S100 β (glial marker) antibodies. Representative pictures. Scale bare 100 μm



SUPPL MAT 4. ALox15B is expressed all along the gut.

ALox15B mRNA (coding for 15-LOX-2) expression was measured in human small intestine (n=4), colon (n=4) or rectum (n=3).

Following the manufacturer's recommendations, total RNA extraction from cells or tissues was performed with the Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) and 1 µg purified RNA was denatured and processed for reverse transcription using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). PCR amplifications were performed using the Taqman Gene Expression Assay (Life Technologies) and run on a StepOnePlus system (Life Technologies). The following primers were used: b-actin Control kit Yakima (Eurogentec) and Alox15B (Hs00153988_m1, Life Technologies). Relative quantification of gene expression was determined using the standard curve method and endogenous control b-actin mRNA.



SUPPL MAT 5. ZO-1 is necessary to regulate epithelial resistance and permeability in MDCK
 As opposed to ZO-2, ZO-1 regulates TEER and limits solute permeability. To assess the role of ZO-1 and ZO-2 on TEER and permeability to sulfonic acid, we studied stable Madin-Darby canine kidney (MDCK) II cell lines expressing short hairpin RNA (shRNA) sequences targeting both ZO-1 (ZO-1 KD), ZO-2 (ZO-2 KD) or both ZO-1 and ZO-2 (DBL KD). (A) TEER was measured on parent or KD MDCK monolayer (B) Permeability was measured by sulfonic acid flux through the same MDCK monolayer. These two parameters are represented as fold to the medium parent average. Data represent means \pm SEM of 3 independent experiments in duplicates. * $p < 0.05$ compared to control; § $p < 0.05$ compared to control or compared to ZO-2 KD.

Article 2 :

La prostacycline prévient la colite et diminue la perméabilité intestinale via une régulation de l'occludine et de la Caspase-3

Présentation de l'article 2 :

Dans l'article précédent, nous avons montré qu'un nouveau médiateur lipidique produit par les CGE, le 15-HETE, contrôlait la perméabilité épithéliale intestinale. De plus, nous avons mis en évidence qu'il était sous-produit par les CGE de patients MC, suggérant que le défaut de perméabilité observé chez ces patients pourrait venir du défaut de production de ce glio-médiateur.

Pour poursuivre ce travail, nous avons replacé les CGE dans un environnement inflammatoire semblable à celui qu'elles ont lors des MICI. Ainsi nous avons dosé les médiateurs lipidiques de CGE humaines, non pas dans des conditions de culture contrôles comme lors de la première étude, mais après 4 jours de traitement avec un cocktail inflammatoire représenté par le TNF α et l'IL-1 β . Ces nouvelles expériences nous ont permis de montrer que la production de PGE2, PGI2 et de 8isoPGA2 par les CGE humaines est augmentée en réponse à l'inflammation, ce qui n'est pas le cas du 15-HETE. De plus les CGE de patients MC ont perdu cette réponse à l'inflammation, ce qui pose à nouveau la question de l'effet bénéfique ou non de la réponse inflammatoire gliale. Par ailleurs, si nous confrontons ces données au dosage lipidique réalisé sur des surnageants de biopsies de patients contrôles ou MICI, parmi les 3 nouveaux médiateurs lipidique d'intérêt identifiés, seule la production de PGI2 est significativement diminuée en zone saine de patients RCH et dans les biopsies en zones enflammées de patients MC. Ainsi, nous nous sommes demandé si la PGI2 retrouvée en quantité diminuée chez les patients MICI pouvait avoir un rôle physiologique protecteur sur les fonctions de la BEI qui pourrait expliquer les altérations retrouvées chez ces patients.

Ce deuxième travail est la caractérisation de l'impact fonctionnel de la PGI2 sur les propriétés de la BEI *in vivo* dans un modèle d'inflammation intestinale. Pour cela, des souris traitées ou non au DSS ont reçu des injections de PBS ou d'Epoprostenol, un analogue stable de la PGI2. L'impact de la PGI2 sur la colite induite au DSS a été analysé en mesurant différents paramètres morphologiques tels que la perte de poids des animaux ou la longueur des colons, et un score histologique plus détaillé du remodelage colique a également été mis en place. Un score d'activité de la maladie a été établi en se basant sur la consistance des fécès et sur la présence de sang ou non, et la perméabilité intestinale a été mesurée *in vivo*. L'inflammation de nos différents groupes d'animaux a également été estimée en quantifiant l'expression de différentes cytokines pro-inflammatoires. Nos résultats ont montré un rôle bénéfique de la PGI2 qui protégeait des dommages induits par une inflammation intestinale. En effet, le traitement au DSS entraînait un remodelage morphologique et une augmentation du score d'activité de la maladie et de la perméabilité *in vivo*, mais une supplémentation en PGI2 prévenait ces changements. De manière intéressante la PGI2 ne réduisait que très partiellement l'inflammation induite par la colite au DSS via une diminution de l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires, mais avait un effet majeur sur la BEI. En effet l'étude des mécanismes moléculaires impliqués nous a montré que la PGI2 avait un effet direct sur la BEI, augmentant l'expression de la protéine Occludine et diminuant l'apoptose et l'expression de la Caspase-3 clivée. Le rôle bénéfique de la PGI2 a été validé dans un modèle de culture d'explants murins et humains *ex vivo* traités ou non avec un inducteur d'apoptose, la staurosporine. Nous avons également retrouvé une augmentation de l'expression de la Caspase-3 clivée et de l'apoptose au niveau de la muqueuse des patients MICI en comparaison aux patients contrôles. Enfin, un

Résultats

prétraitement de biopsies de patients MICI avec de la PGI2 entraînait une diminution de la perméabilité *ex vivo*.

Cette étude nous a non seulement permis d'identifier la PGI2 comme un nouveau médiateur lipidique capable de renforcer les propriétés de la BEI, mais elle met aussi en évidence que le défaut fonctionnel de production de PGI2 par les muqueuses de patients MICI peut être amélioré par une supplémentation avec un analogue stable.

Cet article est actuellement en préparation.

Prostacyclin prevents colitis and decreases intestinal permeability through occludin and Caspase-3 regulation

Short title: PGI2 defect in inflammatory bowel disease

Camille Pochard,^{1,2,3} Arnaud Bourreille,^{1,2,3,5} Philippe Aubert,^{1,2,3} Charlène Gesret,^{1,2,3} Jérémy Brégeon,^{1,2,3} Anne Jarry,⁶ Nicolas Cenac,⁴ Emmanuel Coron,^{1,2,3} Guillaume Meurette,^{1,2,3} Juliette Podevin,^{1,2,3} Michel Neunlist^{1,2,3} and Malvyne Rolli-Derkinderen^{1,2,3}

¹INSERM, UMR1235 TENS, Nantes, F-44093, France.

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

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

⁴INSERM UMR1043, Toulouse, F-33 000, France.

⁵CIC, Nantes, F-44093, France.

⁶INSERM, UMR1232 TENS, Nantes, F-44093, France.

Correspondence Malvyne Rolli-Derkinderen or Michel Neunlist, The Enteric Nervous System in gut and brain disorders, TENS INSERM UMR1235. School of Medicine, University of Nantes; 1, rue Gaston Veil, NANTES; F-44035, France; Phone number: +33 (0)2 40 41 29 74; Fax number +33 (0)2 40 08 75 06; e-mail address: malvyne.derkinderen@univ-nantes.fr or michel.neunlist@univ-nantes.fr

Author Contributions MRD and MN designed the research and supervised the study. CP, PA, CG, JB, AJ and NC performed experiments. MRD and CP analyzed the data and wrote the paper. MN, AJ and NC participated in the critical reading of the manuscript. AB, EC, GM and JP managed and provided biopsies and human surgical samples.

Acknowledgement We are indebted to Tony Durand for quantitative PCR expertise. Experiments were carried within the small animal exploration facility Cardiex, which is supported by the GIS-IBiSA program. We would like to thank Guylène Hamery and Julie Pajot for their great help in animal facility organization, the CIC, the CCDE and the department of pathology of the Hôtel-Dieu - Nantes hospital for their involvement.

Résultats

Grant Support This work was supported by grants from the INSERM, Nantes University, and the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) of Nantes. CP 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).

Abbreviations CD, Crohn's disease; UC, Ulcerative colitis; IEB, intestinal epithelial barrier; IEC, intestinal epithelial cell; PUFA, polyunsaturated fatty acid; CASP3, Caspase 3

Disclosures The authors disclose no conflicts.

Transcript Profiling No

Writing AssistanceNo

ABSTRACT

BACKGROUND & AIMS: Whereas a decrease of the prostacyclin synthesis enzyme expression has been described in Crohn's disease patients, the prostacyclin PGI₂ effect on intestinal epithelial barrier (IEB) properties remains sparse. This work intended to study PGI₂ effect on colitis development and IEB permeability in vivo in mice and ex vivo on human samples.

METHODS: Iloprost or Epoprostenol PGI₂ analog supplementation was used to analyze PGI₂ effects on IEB but also to counter colitis development in the mice model of DSS-induced colitis. PGI₂ levels were measured on human biopsies from control and inflammatory bowel disease (IBD) patients using high sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry and PGI₂ effects on permeability of human samples was assessed. Molecular signaling were analyzed using pharmacological approaches, quantitative PCR and western blot analyzes.

RESULTS: PGI₂ analog prevented colitis development, reduced inflammation, increased the expression of the tight junction protein occludin, inhibited the expression of the cleaved Caspase-3 and abrogated DSS-induced increase in permeability in vivo. The permeability of human and mice explants induced by the apoptosis-inducer staurosporine was also entirely blocked by PGI₂ treatment. Finally we have shown that PGI₂ levels were decreased in the mucosa of IBD patients that presented higher apoptotic level. The permeability of biopsies from IBD patients was also significantly lowered by treatment with PGI₂ analog.

CONCLUSIONS: This study not only presents the first evidence for PGI₂ regulation of IEB properties, but also reveals that the functional defect of PGI₂ mucosal production by IBD patients could be fixed by addition of PGI₂ analog.

KEYWORDS: Intestinal Epithelial Cells; Inflammatory Bowel Disease; epoprostenol; iloprost; apoptosis

INTRODUCTION

The inflammatory bowel diseases (IBD) that encompass both ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), are complex chronic inflammatory disorders which incidence varies between different countries but overall has increased greatly in recent years ¹. IBD is characterized by chronic or relapsing immune activation and inflammation within the gastrointestinal (GI) tract that severely alters GI function. Common IBD symptoms are bleeding, severe diarrhea, cramping, abdominal pain, fever, and weight loss. In CD as well as UC, the inflammation of the gut goes along with breakdown of intestinal barrier function, abnormal secretion and changes of the patterns of motility. Several lines of evidence suggest that alterations of intestinal epithelial barrier (IEB) permeability play an important role in IBD ². An increase in intestinal permeability occurs in asymptomatic first-degree relatives of CD patients ³ and is often observed prior to relapse of CD ⁴.

The etiologies of IBD have not been fully elucidated. However, there are compelling evidence suggesting that IBD pathogenesis is sustained by aberrant immune response associated with changes in microbiota as well as environmental and genetic factors ⁵. Currently genome-wide association studies appear to explain only a minority of the risk associated with development of CD ⁶. A recent study of genome-wide analysis of DNA methylation identified that two eicosanoid synthesis pathway enzymes, the prostaglandin D₂ (PGD₂) synthase PTGDS and the prostacyclin (PGI₂) synthase PTGIS, were differentially expressed in CD fibrotic colons ⁷. The observed increase in PTGDS mRNA levels confirmed previous works describing that the level of L-PGDS mRNA expression was increased in CD inflamed area ⁸ or in UC patients in parallel with disease activity ⁹. But overall the role of its major product PGD₂ remains debated concerning its pro- or anti-inflammatory role in IBD ⁹⁻

12.

Résultats

Concerning PGI₂ a few is known about its role in gut or IBD and the down-regulation of PTGIS expression in IBD patients was described in Sadler at al. paper for the first time. In the 80's, a set of works analyzed some prostaglandin content in rectal mucosa from IBD patients¹³⁻¹⁸. The PGI₂ content of rectal mucosa presented no difference in CD patients¹³ or an increase in UC patients¹⁵ compared to control patients. In the same time a defect in PGI₂ content was observed in mucosa of patient suffering from duodenal ulcer disease¹⁹ and a capacity for PGI₂ to prevent the development of ASA-induced ulcers^{20, 21}. PGI₂ effect on mucosa is unknown excepted its inhibition of the transport of water and solute through human jejunum²² and its potential synergy with PGE₂ or PGE₁ to reinforce the IEB^{23, 24}. In addition to its well known anti-thrombotic and vasodilatory actions, the PGI₂ pathway has been also described as an important mediator of inflammation and pain^{25, 26} in other chronic disorders such as arthritis and is thereby very interesting to decipher in IBD.

This work aims to determine the level of PGI₂ in human biopsies from IBD or control patients, and using PGI₂ analog to assess the impact of PGI₂ on human IEB permeability and more broadly on colitis development in vivo.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Human tissues originated from control, Crohn's disease (CD) or ulcerative colitis (UC) patients were used for explants (Table 1) mucosa molecular analyzes (Table 2) biopsy supernatant analyzes (Table 3) and biopsy permeability analyzes (Table 4). Briefly surgical resections (used for explants and mucosa molecular analyzes) were collected from macroscopically and microscopically unaffected fragment from patients undergoing surgery. The control patients were patients undergoing surgery for colon cancer except two patients undergoing surgery for stenosis or Hartmann's procedure that were used for explants. The samples were always taken at least 10cm away from the tumor. Concerning biopsies they were taken in inflamed and/or healthy areas. The location of the samples and the main clinical features of the patients are represented in Tables 1-4 (**Suppl Table**). Patients gave their written 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 Humans and registered under the no. DC-2008-402.

Human Explants

Human explants were obtained from human colon samples (Table 1) washed with cold Krebs's solution and from which the muscle layer and the submucosa were removed. Explants were mucosal pieces of 30-40 mg maintained in culture in RPMI/HamF12 (v/v) supplemented with 0.01% BSA, 100IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and fungizone (1%) at 37°C with 95% O₂ and 5% CO₂ under gently agitation. They were incubated with PGI₂ analog (Iloprost 10µM) 4 hours prior the addition of staurosporine (1µM). After 18hours explants were placed in Ussing chambers for permeability measurement.

Mucosa molecular analyzes

Human surgical resections (Table 2) were washed with cold Krebs's solution and the mucosa removed and fixed 1 hour in paraformaldehyde solution (4% in PBS) or snap frozen for further analyzes.

Biopsy supernatants

Biopsy supernatants were prepared as previously described ²⁷.

Biopsy permeability

Upon removal biopsies were placed in Ussing chambers and incubated with PGI₂ analog (Iloprost 10μM) 1 hour prior for permeability measurement.

Ex vivo permeability assessment in Ussing chambers

Human biopsies and human or mice explants were mounted in Ussing chambers (0.011 or 0.03 cm² exposed surface area, respectively) (Physiological instruments) as previously described ²⁸ measuring the slope of fluorescein-5.6 sulfonic acid (1 mg/mL) diffusion for a period of 180 min to evaluate paracellular permeability.

Mice Explants

Colons from C57BL/6NRJ were removed and washed three times in cold Krebs's solution. 8 pieces of each colon were incubated with Biopsies media (DMEM 4.5g/L Glc, FBS 2.5%, 100IU/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin, 20 μg/mL Gentamycin, 1.1 μg/mL AmphoB) with PGI₂ analog (Iloprost 10μM) at 37°C with 95%O₂ and 5% CO₂. After 4 hours, staurosporine (1μM, Promocell) was added to colon segments and incubated overnight. 24hours after the beginning of incubation, pieces of colons were mounted in Ussing chambers and paracellular permeability was measured as detailed above.

DSS-induced colitis and in vivo permeability assessment

Résultats

Colitis was induced by 4% (w/v) of Dextran Sulfate Sodium (DSS, MP Biomedicals) in drinking water renewed every day for 4 days to male C57BL/6NRJ (8 weeks, Janvier). For in vivo assessment of PGI₂ Epoprostenol (1µg/ml in PBS) or vehicle (PBS) were given by three intraperitoneal injections of 100µL distanced of 4 hours per day. Four mice per cages were housed on a 12:12-hours light/dark cycle with free access to food (UAR) and water. Animals were weighted daily and the last day animals received by gavage 120µL of solution (300mg Red Carmin, 50 mg fluorescein–5.6 sulfonic acid, 50 mg Horse Radish Peroxydase – HRP Sigma Aldrich, 5mL 0.5% carboxymethylcellulose) and placed in individual cage. The Disease Activity Index (DAI) was calculated based on stool consistency observed during the 4 hours post gavage (0= hard stool ; 1= soft or liquid stool) and gross bleeding (0= no blood ; 1= blood) and was comprised from 0 to 2. After 4 hours, blood was collected from the tail vein and paracellular permeability was evaluated in plasma. Transepithelial permeability to HRP was measured by an enzymatic activity assay with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine reagent (BD Bioscience). Mice were euthanized and colon fragments withdrawn to be fixed 1hour in paraformaldehyde solution (4% in PBS) or snap frozen for further analyzes. All experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Pays de la Loire (study n° 01953.01).

Real-time quantitative PCR analysis

Mucosal fragments from control and IBD patients or colon samples from mice were lyzed in RA1 buffer and total RNA extraction was performed with Nucleospin RNAII kit according to the manufacturer's recommendations (Macherey-Nagel). Purified mRNA was processed for reverse transcription using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). PCR amplifications were performed using the Absolute Blue SYBR green fluorescein kit (Roche)

or the Taqman Gene Expression Assay (Life Technologies) and run on a StepOnePlus system (Life Technologies). The primers used are mentioned in **Suppl Material 1**.

Western blotting

Mucosal fragments from control and IBD patients or colon samples from mice were lyzed in RA1 buffer and total protein extraction was performed according to the manufacturer's recommendations (Macherey-Nagel). For Caco-2 filters, cell lyzates were prepared as previously described ²⁹. Samples were processed for WB analyzes as previously described ²⁹. The primary antibodies used are mentioned in **Suppl Material 2**.

6-ketoPGF_{1α} dosage

The 6-ketoPGF_{1α} dosage was performed as described Le Faouder et al. ³⁰ from biopsy supernatants.

Immunohistochemistry and histopathology

Fixed human and mice tissues were included in paraffin using a coating station (LEICA EG1150C) and sections (3μm) were performed using a microtome (LEICA RM2255).

Fluorescence

The slides were dewaxed and epitopes retrieval was performed before permeabilization and blocking 2 hours in 10 % horse serum in PBS-0.5% triton X-100 and. Primary antibody for cleaved Caspase-3 (rabbit polyclonal antibody, 9661 Cell Signaling Technology 1:100) or occludin (rabbit polyclonal antibody, Abcam, 1:100) was incubated overnight at 4°C, and secondary antibody 2 hours at room temperature. Images were acquired with an Axio Zoom.V16 stereomicroscope (Zeiss) and analyzed with Zen software (Zeiss). The

fluorescence was reported to mucosal area to estimate the cleaved Caspase-3 expression using ImageJ software (National Institute of Health).

Histological score

HPS coloration (Hematein Phloxin Safran) allowed the visualization of tissues morphology. Tissue damage was scored in a blinded manner by quantifying destruction of mucosal architecture, cellular infiltration, muscle thickening and loss of goblet cells (details in **Suppl Material 3**).

Caco-2 culture, Transepithelial Electrical Resistance and Permeability measurement in vitro

The human IEC line Caco-2 was cultured, TEER and permeability measured as previously described ²⁹. The 6-ketoPGF_{1α} (10 μM, Cayman Chemical Company) or PGI₂ analog (Iloprost 10 μM, Cayman Chemical Company) were added or not the following day in the basolateral compartment.

Statistics

All graphics were drawn and analyzed using GraphPad Prism 5.00 Software (GraphPad Software). Values are expressed as means ± standard error of the mean (SEM). The significance of differences was determined using either the two-way ANOVA followed by Bonferroni posttests or the non parametric Mann–Whitney test using GraphPad Prism 5.00. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

PGI₂ analog blocks DSS-induced colitis.

To study the role of PGI₂ supplementation in vivo we analyzed the damages observed in DSS-induced colitis model of mice co-treated or not with the PGI₂ analog Epoprostenol. Caecal remodeling observed after DSS treatment was decreased when DSS-treated mice simultaneously received Epoprostenol (**Figure 1A**). The reduction of colon length and the loss of weight observed in DSS-treated mice were both abrogated in Epoprostenol-co-treated mice (**Figure 1B** and **1C**). Epoprostenol injections alone did not modify the observed parameters (**Figure 1A, 1B** and **1C**). To get more into details we measured the Disease Activity Index (DAI) that take into account the stool consistency and the gross bleeding. DAI was significantly increased in DSS-treated mice compared to control animals, and significantly reduced in Epoprostenol-co-treated mice compared to DSS-treated mice (**Figure 1D**). The changes in distal colon morphology induced by DSS were also inhibited by Epoprostenol co-treatment (**Figure 1E**). Quantification of this remodeling showed that Epoprostenol co-treatment did not prevented muscle thickening (**Figure 1F**) or cellular infiltration (**Figure 1G**) but prevented mucosal architecture destruction (**Figure 1H**). Goblet cells depletion was significantly increased by DSS treatment compared to control mice whereas it was not significantly increased by DSS in presence of Epoprostenol (**Figure 1I**). All together these data showed a beneficial role of PGI₂ analog supplementation that lowered clinical and morphological damages observed in colitis induced by DSS.

PGI₂ analog prevents DSS-induced permeability in vivo.

To assess the impact of PGI₂ supplementation on IEB failure in vivo we measured permeability in DSS-treated mice with or without Epoprostenol co-treatment. Paracellular permeability was increased in DSS-treated mice compared to control animals. Epoprostenol

treatment had no basal effects and Epoprostenol co-treatment with DSS inhibited the DSS-induced permeability and normalized it to control level (**Figure 2A**). Additionally we measured transcellular permeability to HRP in these mice. Transcellular permeability was unchanged between all four animal groups (**Suppl Figure 1**). These data show that PGI₂ could prevent the increase of IEB paracellular permeability observed in vivo in mice under DSS treatment.

PGI₂ analog partially reduces inflammation observed in DSS-induced colitis.

To investigate the effect of PGI₂ on the inflammatory reaction of mice treated or not with DSS to develop colitis with or without Epoprostenol co-treatment, we measured the mRNA expression of key cytokines in the colon of these mice. The DSS-induced increase of TNF- α (**Figure 2B**), IL-6 (**Figure 2C**) and IL-17A (**Figure 2D**) mRNA expression was not affected by Epoprostenol co-treatment. In contrast the increase in IL-22 (**Figure 2E**) and IL-1 β (**Figure 2G**) mRNA induced by DSS was not anymore significant when animals were co-treated with Epoprostenol. Despite a trend the expression of IFN- γ (**Figure 2F**) and IL-4 (**Figure 2H**) mRNA was not significantly modified by DSS or Epoprostenol. These data suggested a partial regulation of inflammatory process by PGI₂ via a down regulation of some cytokines such as IL-22 and IL-1 β .

PGI₂ analog decreases Caco-2 monolayer permeability.

To begin the investigation of PGI₂ effect on IEB we assessed whether PGI₂ analog Iloprost can directly modulate the paracellular permeability of a Caco-2 intestinal epithelial cell (IEC) monolayer in vitro. In comparison to untreated cells, Iloprost significantly increased the TEER (**Figure 3A**) and decreased paracellular permeability of Caco-2 monolayers (**Figure 3B**). To ensure that the PGI₂ effects observed could not have been mediated by its inactive

degradation product 6-ketoPGF_{1α}, we have also measured TEER and permeability on Caco-2 cells treated with 6-ketoPGF_{1α}. It did neither modify the TEER (**Suppl Figure 2A**) nor the permeability (**Suppl Figure 2B**). These data demonstrated that PGI₂ could directly regulate the IEB resistance and permeability.

PGI₂ analog increases occludin and decreases claudin-2 expression in vitro.

To investigate the mechanisms of PGI₂ regulation of IEB permeability we made a screening of the expression of tight junction proteins or regulator of paracellular permeability in this Caco-2 model treated or not with Iloprost. ZO-1 and claudin-2 expression were significantly decreased in presence of Iloprost (**Figure 3C, 3D and 3F**). In contrast occludin expression was significantly increased by Iloprost treatment (**Figure 3C and 3E**). JAM-A, cingulin and P-MLC20 expression were not changed by Iloprost treatment (**Figure 3C, 3G, 3H and 3I**). These data showed that PGI₂ analog treatment could modify tight junction protein expression.

PGI₂ analog prevents the DSS-induced decrease of apical occludin expression in vivo.

We then went back to the DSS-induced colitis model to analyze IEB occludin and claudin-2 expression, the two tight junction proteins that could explain the prevention of DSS-induced permeability by Epoprostenol. Occludin immunostaining showed a clear apical border staining unchanged by Epoprostenol supplementation. DSS treatment decreased Occludin apical staining that was restored by Epoprostenol co-treatment (**Figure 3J**). We failed to obtain any clear claudin-2 immunostaining (not shown). These results showed that the decrease of apical expression of occludin observed in colon of DSS-treated mice was prevented by PGI₂ analog supplementation.

PGI₂ analog decreases apoptosis observed in the colon of DSS-treated mice.

Résultats

Because modifications of IEB permeability can be sustained by changes in tight junction protein expression but also modulation of IEC apoptosis or proliferation we measured cleaved Caspase-3 expression, PCNA expression and Akt phosphorylation in colon from DSS-treated mice injected or not with PGI₂ analog Epoprostenol. Immunofluorescence staining revealed a higher level of cleaved Caspase-3 expression in colon of DSS-treated mice compared to control mice, mice injected with Epoprostenol or to DSS-mice injected with Epoprostenol (**Figure 4A** and **4B**). Additionally we showed that Akt phosphorylation was increased in Epoprostenol+DSS treated mice in comparison to Epoprostenol-treated animals (**Figure 4E**). PCNA expression was not modified (**Figure 4D**). These data suggested an additional protective role for PGI₂ analog that could decrease apoptosis and promote IEC survival.

PGI₂ analog reverses mouse and human IEB breakdown ex vivo

To validate PGI₂ implication in regulating apoptosis and thereby IEB permeability we added an apoptosis inducer, the staurosporine, to colon samples from control mice or mucosal explants from control patients maintained in culture for 24h and supplemented or not with PGI₂ analog. The paracellular permeability was measured in Ussing chambers after these treatments. As expected the staurosporine treatment increased paracellular permeability of mice or human explants and Iloprost supplementation entirely inhibited it, leading to a normalization of permeability values (**Figure 5A** and **5B**). These data showed that PGI₂ analog was able to prevent the increase of permeability induced by the apoptosis inducer Staurosporine.

Cleaved Caspase-3 expression and apoptosis are increased in mucosa from CD or UC patients.

Résultats

Before continuing our investigation of PGI₂ on human samples, we wanted to analyze the apoptotic processes in mucosa of IBD vs control patients. Therefore we have measured cleaved Caspase-3 expression by western blotting and Bax and Bcl2 mRNA expression by quantitative PCR in mucosa of control, CD or UC patients. Whereas the expression of cleaved Caspase-3 was increased in CD as well as UC patients compared to control patients (**Figure 6A**), Bcl2 and Bax mRNA were unchanged (**Figure 6C and 6D**). We have completed these analyzes by immunohistochemistry of cleaved Caspase-3 and epithelial apoptosis measurement using the cytodeath M30 antibody. No cleaved Caspase-3 or M30 staining were the most frequent pattern observed in mucosa from control patients. In contrast strong cleaved Caspase-3 and M30 staining were the pattern mostly observed in CD or UC patients (**Figure 6B**). These data showed that epithelial apoptosis was increased in CD as well as UC patient mucosa compared to control patient mucosa.

PGI₂ production is decreased in biopsy supernatants of IBD patients.

To analyze the PGI₂ content in gut mucosa of IBD patients, we analyzed PGI₂ production by measuring its inactive by-product, the 6-ketoPGF_{1α}, in control or IBD biopsy supernatants. The 6-ketoPGF_{1α} level was significantly decreased in biopsy supernatant from healthy areas but not inflamed areas of UC patients. In contrast 6-ketoPGF_{1α} level was significantly decreased in biopsies from inflamed areas but not healthy areas of CD patients (**Figure 7A**). To complete the analysis of PGI₂ dependent pathway functionality, we then measured the expression of the PGI₂ receptor IP (PTGIR) in the mucosa of IBD patients. PTGIR mRNA level was not significantly different in CD or UC vs control mucosa (**Suppl Figure 3**) suggesting that the pathway could be functional. These data showed that IBD patients did not present a defect in PGI₂ signaling, but a lack of PGI₂ content in healthy or inflamed areas.

PGI₂ analog reduces permeability of biopsies from IBD patients.

To assess whether PGI₂ treatment could reduce the permeability observed in IBD patients, we pre-treated with Iloprost biopsies from CD or UC patients one hour before paracellular permeability measurement in Ussing-chambers. Iloprost treatment significantly decreased IBD biopsies permeability (**Figure 7B**). The differences observed in the amplitude of permeability responses to Iloprost were not explained by the type of IBD (UC or CD), the biopsy location (ileum or right colon) or the inflammation of the mucosa (inflamed and non inflamed area). This showed that Iloprost could reduce the permeability of IBD biopsy, suggesting that the functional defect of PGI₂ mucosal production by IBD patients could be fixed by addition of PGI₂ analog.

DISCUSSION

Our work describes a novel PGI₂-mediated protective mechanism of IEB. We have demonstrated that PGI₂ stable analog supplementation inhibits IEC apoptosis, the decreased Occludin expression, the increased IEB permeability and the colitis development observed *in vivo* in a mice model. We have additionally shown that apoptosis-induced permeability of mice or human mucosa explants was blocked by PGI₂ analog *ex vivo*. Eventually we have showed that PGI₂ production was lacking in biopsies from CD and UC patients which mucosa presented higher apoptotic epithelial cells. PGI₂ analog again reduced IBD biopsy permeability suggesting that the functional defect of PGI₂ mucosal production by IBD patients could be fixed by addition of PGI₂ analog.

Eicosanoids include prostaglandins (PGs among which the PGD₂, PGE₂ or PGI₂) and thromboxanes (Tx) that are termed prostanoids, as well as leukotrienes, lipoxins, hydroperoxyeicosatetraenoic acids, hydroxyeicosatetraenoic acids (among which the 15-HETE) and epoxyeicosatetraenoic acids. Their production or the expression of their synthesis enzymes is generally described to be are increased in IBD. 12-LOX expression is increased in mucosa from CD and UC patients³¹ and 5-LOX activity and LTB₄ production is elevated in mucosa from UC patients³². PGE₂, and LTB₄ synthesis are enhanced in the inflamed colonic mucosa in active UC and CD with rectal ulcerations³³ and PGE₂ in experimental ileitis³⁴. PTGDS expression is increased in CD fibrotic colons⁷, the level of L-PGDS mRNA expression is increased in UC patients in parallel with disease activity⁹ or in CD inflamed area⁸. 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 patients³⁵. But overall the role of their products such as PGD₂ in IBD remains unknown or debated concerning their pro-inflammatory or anti-inflammatory properties^{9-12, 36, 37}. A lot of works described PGE₂ effects in the gastrointestinal tract, driving the idea that PGE₂

specificity depends on its receptor and could provide mucosal protection to colitis through EP4/2 receptors^{38,39} but that PGE₂-dependent pathway could also lead to tumor formation⁴⁰.

The literature is ambivalent concerning PGI₂ potential effects on IEB permeability as well as on gut inflammation. In one hand PGI₂ could act as a mediator of pain, inflammation and consequent damages in IBD patients. Indeed PGI₂ pathway is enhanced in experimental ileitis³³ and it was also suggested that the mechanisms responsible for the therapeutic effects of steroids and sulphasalazine in IBD may be related to the inhibition of prostanoid synthesis^{15, 16}. But in another hand PGI₂ defect has been involved in duodenal ulcer¹⁹ and a PTGIS downregulation has been shown in fibrotic CD patients⁷. The decrease in PGI₂ content that we observed in biopsy supernatants from IBD patients could argue for an involvement of PGI₂ defect in pathological development, and thereby a protective role for PGI₂ upon IEB. This idea is also supported by the association and common mechanisms underlying IBD and chronic airway diseases⁴¹ and the currently widely use of stable PGI₂ analogs beraprost and iloprost as treatment of pulmonary hypertension. They showed potent anti-inflammatory and endothelium-dependent anti-edemagenic effects in several models of acute lung injury. In addition the use of PGI₂ analog beraprost has been shown to enhance the endothelial barrier⁴² that is consistent with the decreased permeability that we observed in IEB in response to Epoprostenol or iloprost treatments.

The mechanisms of the IEB reinforcement observed in our study involved regulation of the tight junction protein expression as well as apoptotic inhibition. In IBD the decrease of permeability has been explained by tight junction defect or IEC renewal defect. Indeed in CD as well as in UC claudin-2 upregulation, MLCK activation or occludin downregulation have already been observed⁴³. As PGI₂ can regulate tight junction protein expression and increase ZO-1, occludin and claudin-5 expression to reverse endothelial damage⁴⁴, we could have expected an up regulation of these tight junction proteins by iloprost treatment in vitro or

Epoprostenol supplementation in vivo. This was not the case for ZO-1 which expression was decreased in Caco-2 treated by Iloprost, but we indeed observed that occludin expression was increased in this cellular model. More interestingly the down regulation of the apical expression of occludin observed in colon of mice treated with DSS to develop colitis, was inhibited by Epoprostenol supplementation, that could explain the PGI₂ analog effect on IEB⁴⁵.

In addition to this regulation of tight junction, we have shown that can PGI₂ analog can also inhibit apoptosis to regulate IEB permeability. When the epithelium is intact, intestinal barrier function is largely defined by permeability characteristics of the epithelial tight junction. However, epithelial cell death also causes barrier loss, regardless of tight junction function⁴⁶. After 4 days of DSS we observed an increase in the expression of cleaved-Caspase-3 in the colon of our colitis-mice model. This cleavage is consistent with the increase in cleaved-Caspase-3 that we observed in tissues from IBD patients that also presented higher epithelial apoptosis. It has already been shown that LPS-induction of apoptosis induced increase in IEB paracellular permeability⁴⁷ and that cleaved-Caspase-3 was associated with increased permeability already observed in other colitis model⁴⁸. As we did not observed change in Bcl2 or Bax mRNA expression in mucosa from CD or UC patients, we could suppose that the transduction pathway leading to apoptosis is mainly the extrinsic one concerning IEC death receptor pathway activation. PGI₂ has been involved in apoptosis regulation of different cell type and in particular has anti-apoptotic effect to colonic epithelial cells⁴⁹ but no pathway was identified. As occludin mislocalization as been shown to trigger Caspase-3-dependent apoptosis⁵⁰, we could suppose that our observations of occludin and Caspase-3 regulation by PGI₂ analog are linked.

Whereas the data concerning PGI₂ regulation of the gastrointestinal tract were sparse, our work clearly shows that PGI₂ can directly target the IEB to decrease IEB permeability and

Résultats

apoptosis induces during colitis. As we observed in vivo in DSS-induced colitis model that PGI₂ analog supplementation decreased cellular infiltration and IL-22 and IL-1β expression in colon, we could suppose a more global effect of PGI₂ than the one on IEB studied in this paper. Finally the PGI₂ defect observed in IBD patient mucosa could not only explain the IEC apoptosis but also the increased IEB permeability observed in CD and UC patients. PGI₂ supplementation can reduce apoptosis and fix the permeability suggesting that strategic therapy using permeability pro-reducing agents could be added to the classical anti-inflammatory ones to improve clinical outcomes.

REFERENCES

1. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012;142:46-54 e42; quiz e30.
2. Arrieta MC, Bistriz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 2006;55:1512-20.
3. Buhner S, Buning C, Genschel J, et al. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 2006;55:342-7.
4. Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, et al. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 1993;341:1437-9.
5. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-34.
6. Ventham NT, Kennedy NA, Nimmo ER, et al. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology* 2013;145:293-308.
7. **Sadler T, Bhasin JM**, Xu Y, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression defines molecular characteristics of Crohn's disease-associated fibrosis. *Clin Epigenetics* 2016;8:30.
8. Le Loupp AG, Bach-Ngohou K, Bourreille A, et al. Activation of the prostaglandin D2 metabolic pathway in Crohn's disease: involvement of the enteric nervous system. *BMC Gastroenterol* 2015;15:112.
9. Hokari R, Kurihara C, Nagata N, et al. Increased expression of lipocalin-type-prostaglandin D synthase in ulcerative colitis and exacerbating role in murine colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G401-8.
10. Gilroy DW, Colville-Nash PR, McMaster S, et al. Inducible cyclooxygenase-derived 15-deoxy(Delta)12-14PGJ2 brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. *Faseb J* 2003;17:2269-71.
11. Rajakariar R, Hilliard M, Lawrence T, et al. 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* 2007;104:20979-84.
12. **Li J, Kong D, Wang Q, Wu W**, et al. Niacin ameliorates ulcerative colitis via prostaglandin D2-mediated D prostanoid receptor 1 activation. *EMBO Mol Med* 2017;9:571-588.
13. Hawkey CJ, Karmeli F, Rachmilewitz D. Imbalance of prostacyclin and thromboxane synthesis in Crohn's disease. *Gut* 1983;24:881-5.
14. Hawkey CJ, Truelove SC. Effect of prednisolone on prostaglandin synthesis by rectal mucosa in ulcerative colitis: investigation by laminar flow bioassay and radioimmunoassay. *Gut* 1981;22:190-3.
15. Ligumsky M, Karmeli F, Sharon P, et al. Enhanced thromboxane A2 and prostacyclin production by cultured rectal mucosa in ulcerative colitis and its inhibition by steroids and sulfasalazine. *Gastroenterology* 1981;81:444-9.
16. Sharon P, Ligumsky M, Rachmilewitz D, et al. Role of prostaglandins in ulcerative colitis. Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine. *Gastroenterology* 1978;75:638-40.
17. Sharon P, Stenson WF. Enhanced synthesis of leukotriene B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1984;86:453-60.
18. Zifroni A, Treves AJ, Sachar DB, et al. Prostanoid synthesis by cultured intestinal epithelial and mononuclear cells in inflammatory bowel disease. *Gut* 1983;24:659-64.
19. Hillier K, Smith CL, Jewell R, et al. Duodenal mucosa synthesis of prostaglandins in duodenal ulcer disease. *Gut* 1985;26:237-40.
20. Konturek SJ, Brzozowski T, Piastucki I, et al. Prevention of ethanol and aspirin-induced gastric mucosal lesions by paracetamol and salicylate in rats: role of endogenous prostaglandins. *Gut* 1982;23:536-40.

21. Konturek SJ, Obtulowicz W, Sito E, et al. Distribution of prostaglandins in gastric and duodenal mucosa of healthy subjects and duodenal ulcer patients: effects of aspirin and paracetamol. *Gut* 1981;22:283-9.
22. Moriarty KJ, O'Grady J, Rolston DD, et al. Effect of prostacyclin (PGI₂) on water and solute transport in the human jejunum. *Gut* 1986;27:158-63.
23. Blikslager AT, Roberts MC, Rhoads JM, et al. Prostaglandins I₂ and E₂ have a synergistic role in rescuing epithelial barrier function in porcine ileum. *J Clin Invest* 1997;100:1928-33.
24. Gao F, Horie T. Protective effect of prostaglandins on the methotrexate induced damage of small intestine in rats. *In Vivo* 2000;14:453-6.
25. Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, et al. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 1997;388:678-82.
26. Pulichino AM, Rowland S, Wu T, et al. Prostacyclin antagonism reduces pain and inflammation in rodent models of hyperalgesia and chronic arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319:1043-50.
27. 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(2):196–201.
28. De Quelen, F., Chevalier, J., Rolli-Derkinderen, M., Mourot, J., Neunlist, M., and Boudry, G. n-3 polyunsaturated fatty acids in the maternal diet modify the postnatal development of nervous regulation of intestinal permeability in piglets. *J Physiol*. 2011; 589:4341-4352.
29. **Pochard C, Coquenlorge S**, Jaulin J, et al. Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells From Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2016;150(1):168–80.
30. 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.
31. Shannon VR, Stenson WF, Holtzman MJ. Induction of epithelial arachidonate 12-lipoxygenase at active sites of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol* 1993;264:G104-11.
32. Ikehata A, Hiwatashi N, Kinouchi Y, et al. Altered leukotriene B₄ metabolism in colonic mucosa with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:44-9.
33. Lauritsen K, Staerk Laursen L, Bukhave K, et al. Longterm olsalazine treatment: pharmacokinetics, tolerance and effects on local eicosanoid formation in ulcerative colitis and Crohn's colitis. *Gut* 1988;29:974-82.
34. Rehal S, von der Weid PY. Experimental ileitis alters prostaglandin biosynthesis in mesenteric lymphatic and blood vessels. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2015;116-117:37-48.
35. **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.
36. Ajuebor MN, Singh A, Wallace JL. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G238-44.
37. Vong L, Ferraz JG, Panaccione R, et al. 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* 2010;107:12023-7.
38. **Peng X, Li J**, Tan S, et al. COX-1/PGE₂/EP₄ alleviates mucosal injury by upregulating beta-arr1-mediated Akt signaling in colitis. *Sci Rep* 2017;7:1055.
39. Stenson WF. Prostaglandins and epithelial response to injury. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:107-10.

40. **Kim HB, Kim M**, Park YS, et al. Prostaglandin E2 Activates YAP and a Positive-Signaling Loop to Promote Colon Regeneration After Colitis but Also Carcinogenesis in Mice. *Gastroenterology* 2017;152:616-630.
41. Rodriguez-Roisin R, Bartolome SD, Huchon G, et al. Inflammatory bowel diseases, chronic liver diseases and the lung. *Eur Respir J*. 2016; 47(2):638–50.
42. Birukova AA, Zagranchnaya T, Fu P, et al. Prostaglandins PGE(2) and PGI(2) promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation. *Exp Cell Res* 2007;313:2504-20.
43. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9:799-809.
44. Muramatsu R, Kuroda M, Matoba K, et al. Prostacyclin prevents pericyte loss and demyelination induced by lysophosphatidylcholine in the central nervous system. *J Biol Chem* 2015;290:11515-25.
45. Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, et al. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 2005;1669:34-42.
46. Gitter AH, Wullstein F, Fromm M, et al. Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: characterization and quantification by electrophysiological imaging. *Gastroenterology* 2001;121:1320-8.
47. Yu LC, Flynn AN, Turner JR, et al. SGLT-1-mediated glucose uptake protects intestinal epithelial cells against LPS-induced apoptosis and barrier defects: a novel cellular rescue mechanism? *Faseb J* 2005;19:1822-35.
48. **Su L, Nalle SC**, Shen L, et al. TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology* 2013;145:407-15.
49. Cutler NS, Graves-Deal R, LaFleur BJ, et al. Stromal production of prostacyclin confers an antiapoptotic effect to colonic epithelial cells. *Cancer Res* 2003;63:1748-51.
50. Beeman N, Webb PG, Baumgartner HK. Occludin is required for apoptosis when claudin-claudin interactions are disrupted. *Cell Death Dis* 2012;3:e273.

Author names in bold designate shared co-first authorship

FIGURE LEGENDS

Figure 1. PGI₂ analog prevents DSS-induced damages in vivo. PGI₂ impact on colon remodeling and animal weight loss induced by DSS in vivo was measured 3 days after the end of the 4 days of DSS treatment in control or DSS-treated mice that received PBS or Epoprostenol during the 4 first days. (A) Caecal remodeling; scale=1cm (B) Colon length (C) Animal weight. Data represent means \pm SEM of 4 to 6 mice per group. PGI₂ impact on damages induced by DSS in vivo was measured at the end of the 4 day treatment in control or DSS-treated mice that received PBS or Epoprostenol every day.(D) Disease Activity Index (DAI). (E) HPS coloration of distal colon sections of control (cont) DSS-treated (DSS) Epoprostenol-treated (EPO) or Epoprostenol and DSS (EPO+DSS)-treated mice (magnification*20). Histological score was evaluated from these HPS staining by quantifying (F) muscle thickening, (G) destruction of mucosal architecture, (H) cellular infiltration, and (I) loss of goblet cells. Data represent means \pm SEM of 12 to 20mice per group. *p< 0.05, ***p < 0.001 (for DSS factor effects) and #p < 0.05, ###p < 0.001 (for EPO factor effects), two way ANOVA followed by Bonferroni posttests.

Figure 2. PGI₂ analog prevents DSS-induced permeability in vivo and partially prevents inflammation induced by DSS. PGI₂ impact on permeability was measured in vivo at the end of the 4 days treatment in control or DSS-treated mice that received PBS or Epoprostenol every day. (A) Paracellular permeability was evaluated by the measurement of sulfonic acid in animal plasma 4 hours after mice gavage. Data represent means \pm SEM of 16 to 20 mice per group. Messenger RNA expression for (B) TNF- α , (C) IL-6, (D) IL-17A, (E) IL-22, (F) IFN- γ (G) IL-1 β and (H) IL-4 was measured at the end of the 4 days treatment in colon fragments of control or DSS-treated mice that received PBS or Epoprostenol every day. Data represent means \pm SEM of 12 mice per group. *p< 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001(for DSS factor effects) and #p < 0.05 (for EPO factor effects),two way ANOVA followed by Bonferroni posttests.

Figure 3. PGI₂ analog reduces permeability, increases occludin expression in vitro and prevents the DSS-induced decrease of apical occludin expression in vivo. PGI₂ impact on transelectrical resistance (TEER) and permeability was measured in vitro on a Caco-2 monolayer after one day of treatment with Iloprost (10 μ M) or not (Cont) in the basolateral compartment.(A) TEER (B) Paracellular permeability. Data represent means \pm SEM of 13 to

16 Caco-2 filters per condition. (C) Representative Western Blot from Caco-2 lysates. (D) ZO-1, (E) occludin, (F) claudin-2, (G) JAM-A, (H) cingulin and (I) P-MLC20 expression quantification related to β -actin expression from western blotting analyzes. Data represent means \pm SEM of 7 to 12 Caco-2 filters per condition. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ non parametric Mann–Whitney test. PGI₂ impact on occludin expression was measured in vivo at the end of the 4 day treatment in control or DSS-treated mice that received PBS or Epoprostenol every day. (J) Representative occludin staining of distal colon sections of control (Cont) DSS-treated (DSS) Epoprostenol-treated (EPO) or Epoprostenol and DSS (EPO+DSS)-treated mice (magnification*100). n=3 mice per group.

Figure 4. PGI₂ analog decreases DSS-induced apoptosis in vivo. PGI₂ impact on apoptosis was measured at the end of the 4 day treatment in colon of control or DSS-treated mice that received PBS or Epoprostenol every day. (A) Representative pictures of mice colon immunostaining for cleavedCaspase-3 (magnification*100). (B) Quantification of cleaved Caspase-3 staining relative to mucosal area. (C) Representative Western Blot analyzes of PCNA and P-Akt/Akt expression from colon fragments of the four groups of mice.(D) Quantification of PCNA expression (E) Quantification of P-Akt/Akt expression. Data represent means \pm SEM of 12 mice per group. * (for DSS factor effects) or # (for EPO factor effects) $p < 0.05$ two way ANOVA followed by Bonferroni posttests.

Figure 5. PGI₂ analog prevents mice or human IEB breakdown ex vivo. Potential of PGI₂ to block IEB breakdown induced by apoptosis was assessed by measuring paracellular permeability of colon explants treated or not one day with epithelial apoptosis inducer staurosporine (Stauro, 1 μ M) without (NT) or with a 4h pretreatment with Iloprost (10 μ M). Paracellular permeability was measured by sulfonic acid flux through tissues in Ussing chambers after the mentioned treatment. (A) Explants from proximal colon of Swiss mice. Data represent means \pm SEM of 16 explants per group.(B) Human mucosal colonic explants from control patients. Data represent means \pm SEM of 4 patients with 6 explants per condition and per patient. *** $p < 0.001$ (for DSS factor effects) or # $p < 0.05$ (for EPO factor effects) two way ANOVA followed by Bonferroni posttests.

Figure 6. Mucosa from IBD patients presents an increase in cleaved Caspase-3 expression and apoptosis. Expression of cleaved Caspase-3 and epithelial apoptosis were evaluated in mucosa from control, CD or UC patients by Western blot analyzes,

immunostaining or real time PCR. (A) Quantification of cleaved Caspase-3 normalized to β -actin expression observed by Western Blotting. Data represent means \pm SEM of signals from mucosa lysates from control (n=20), CD (n=20) and UC (n=16) patients. p indicated on the figure, non parametric Mann–Whitney test. (B) Representative immunostaining of cleaved Caspase-3 or M30 cytodeth epithelial apoptosis marker from control (n=10), CD (n=10) and UC (n=7) patients. (C) Measurement of Bax and (D) Bcl2 mRNA expression from control (n=20), CD (n=20) and UC (n=16) patients. $p > 0,05$ non parametric Mann–Whitney test.

Figure 7. PGI₂ production is decreased in biopsy supernatants from IBD patients, and PGI₂ analog treatment reduces permeability of biopsies from IBD patients. (A) PGI₂ production was measured in biopsy supernatants from IBD patients through quantification of 6-ketoPGF_{1 α} using high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry. Data represent means \pm SEM of control (cont), CD healthy area (CDha) and inflamed area (CDia) or UC healthy area (UCha) and inflamed area (UCia) (n=12 per group). p indicated on the figure, non parametric Mann–Whitney test. (B) Paracellular permeability of biopsies from IBD patients (n=9) was measured by sulfonic acid (SA) flux in Ussing chambers, after a 1 hour pretreatment with Iloprost (10 μ M) or not (Cont). Data represent the mean SA flux of 2 biopsies per condition per patient. * $p < 0.05$ paired t test.

Supplemental S1. PGI₂ analog does not affect transcellular permeability in control or DSS treated mice. PGI₂ impact on transcellular permeability was measured in vivo at the end of the 4 day treatment in control or DSS-treated mice that received PBS or Epoprostenol every day. Transcellular permeability was measured by calculating HRP activity in animal serum 4 hours after mice gavage. Data represent means \pm SEM of 16 to 20 mice per group. $p > 0,05$ two way ANOVA followed by Bonferroni posttests.

Supplemental S2. 6-ketoPGF_{1 α} inactive PGI₂ degradation product does not change Caco-2 TEER or permeability. (A) TEER was measured on a Caco-2 monolayer after one day of 6-ketoPGF_{1 α} (10 μ M) in basolateral compartment. (B) Paracellular permeability was measured by sulfonic acid (SA) flux through the same Caco-2 monolayer. Data represent means \pm SEM of 3 independent experiments. $p > 0,05$ non parametric Mann–Whitney test.

Supplemental S3. PGI₂ receptor mRNA expression is unchanged in CD or UC patient mucosa compared to control patient mucosa. PGI₂ receptor (PTGIR) mRNA expression was measured by real time PCR in mucosa from control (Cont, n=20), CD (n=20) and UC (n=16) patients. $p > 0,05$ non parametric Mann–Whitney test.

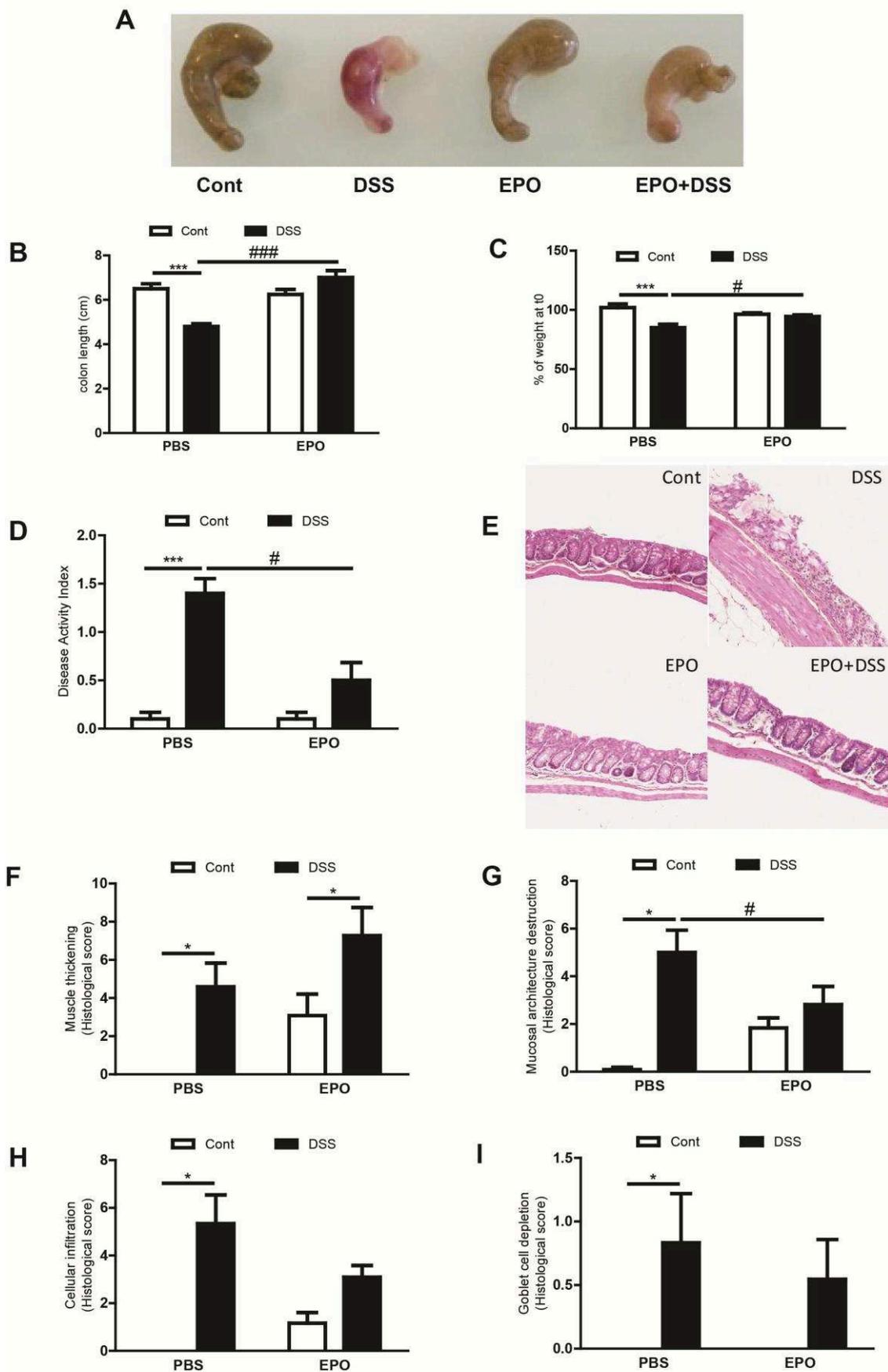


Figure 1

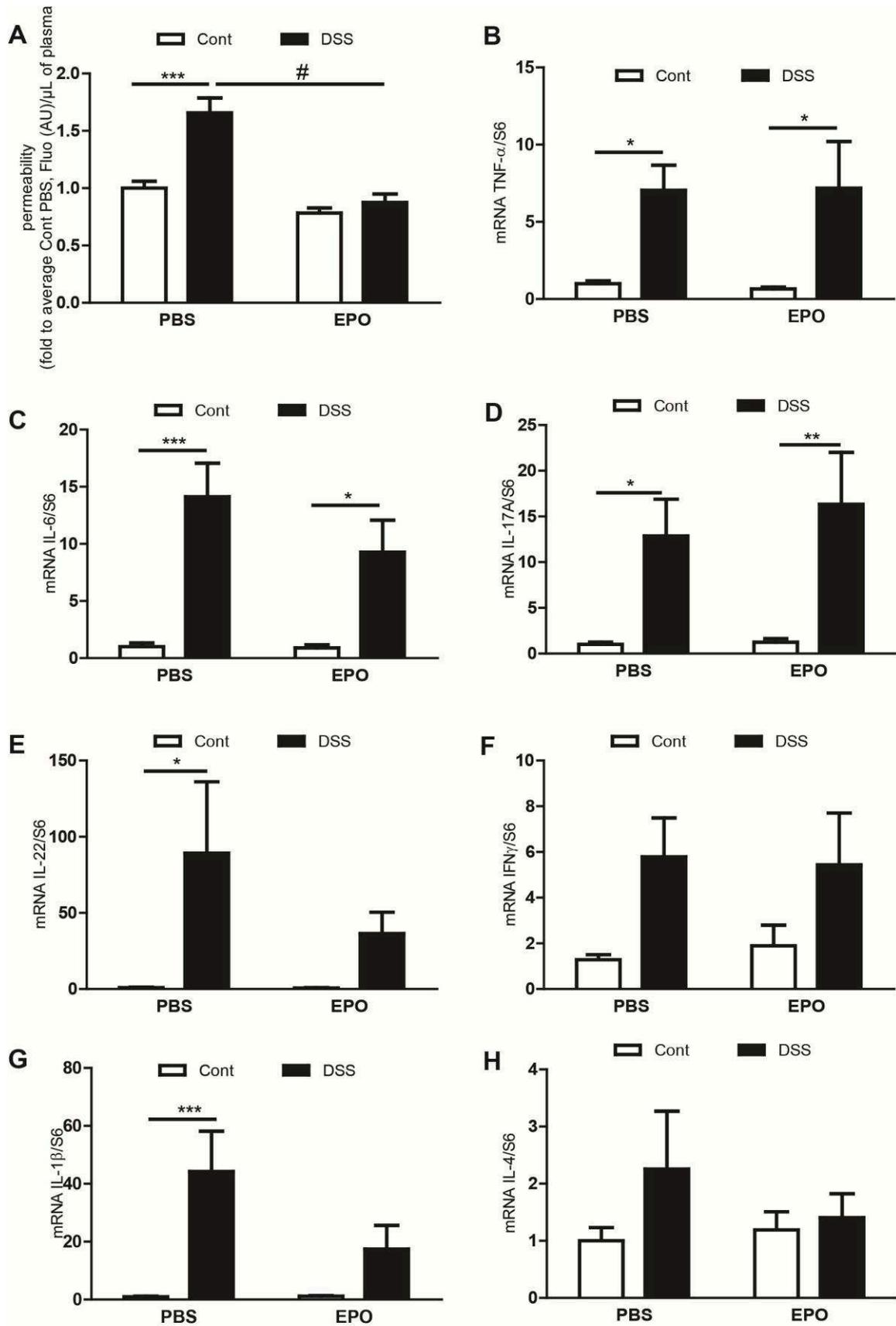


Figure 2

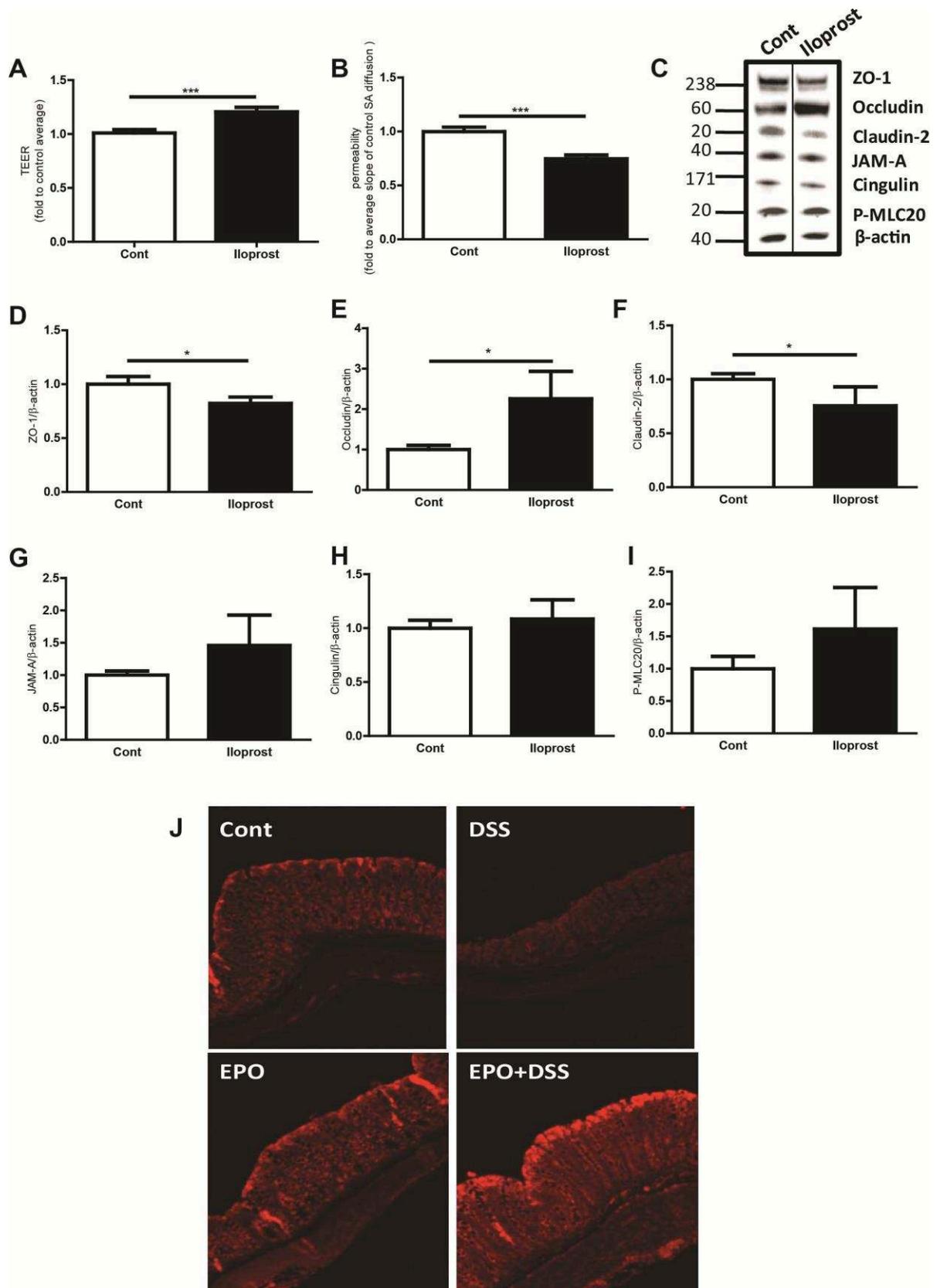


Figure 3

Résultats

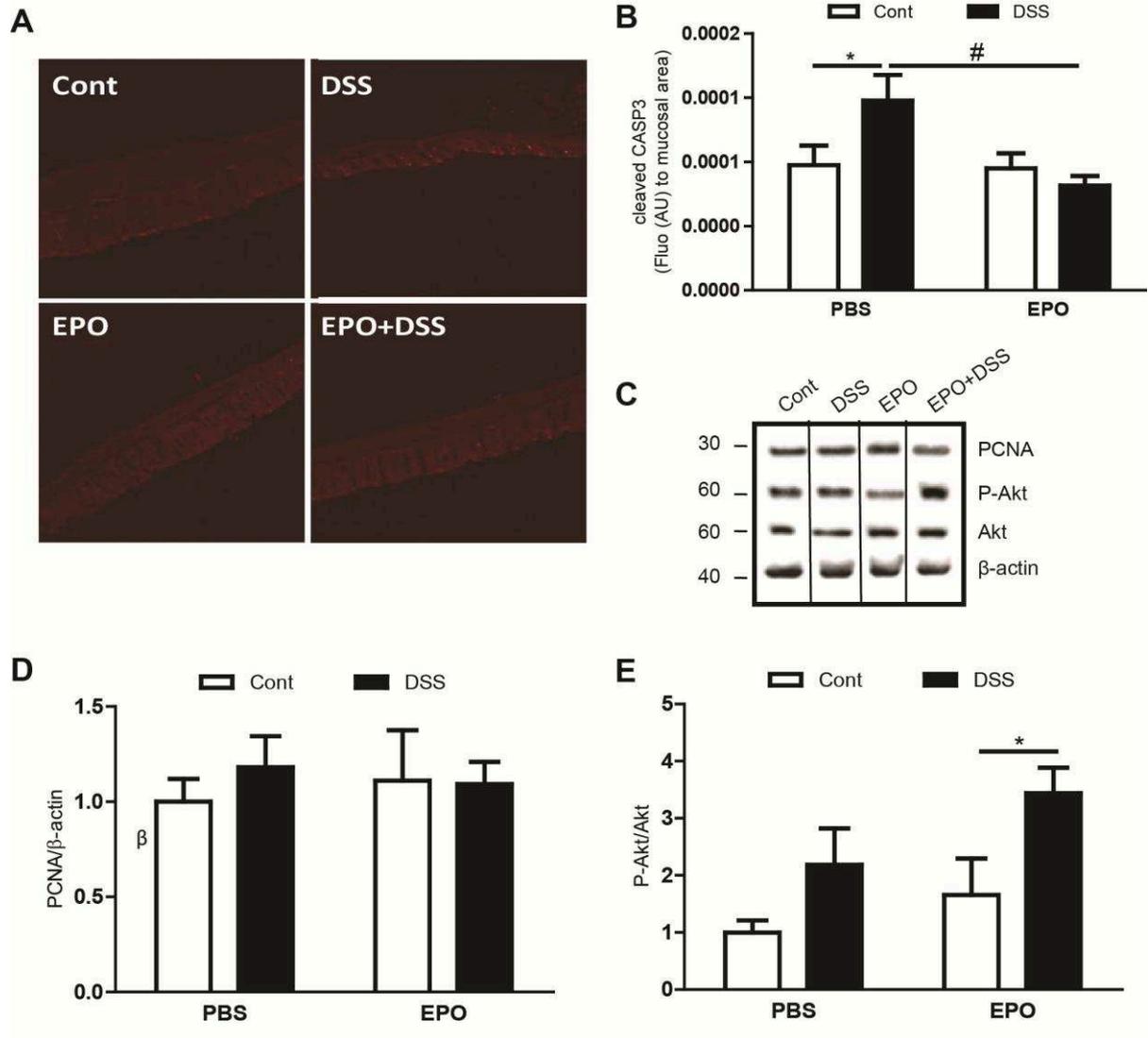


Figure 4

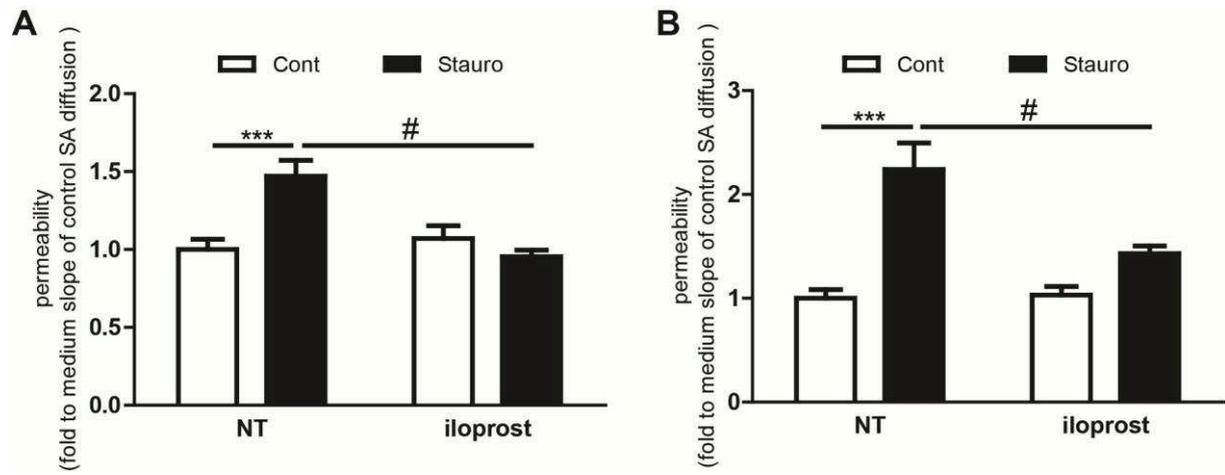


Figure 5

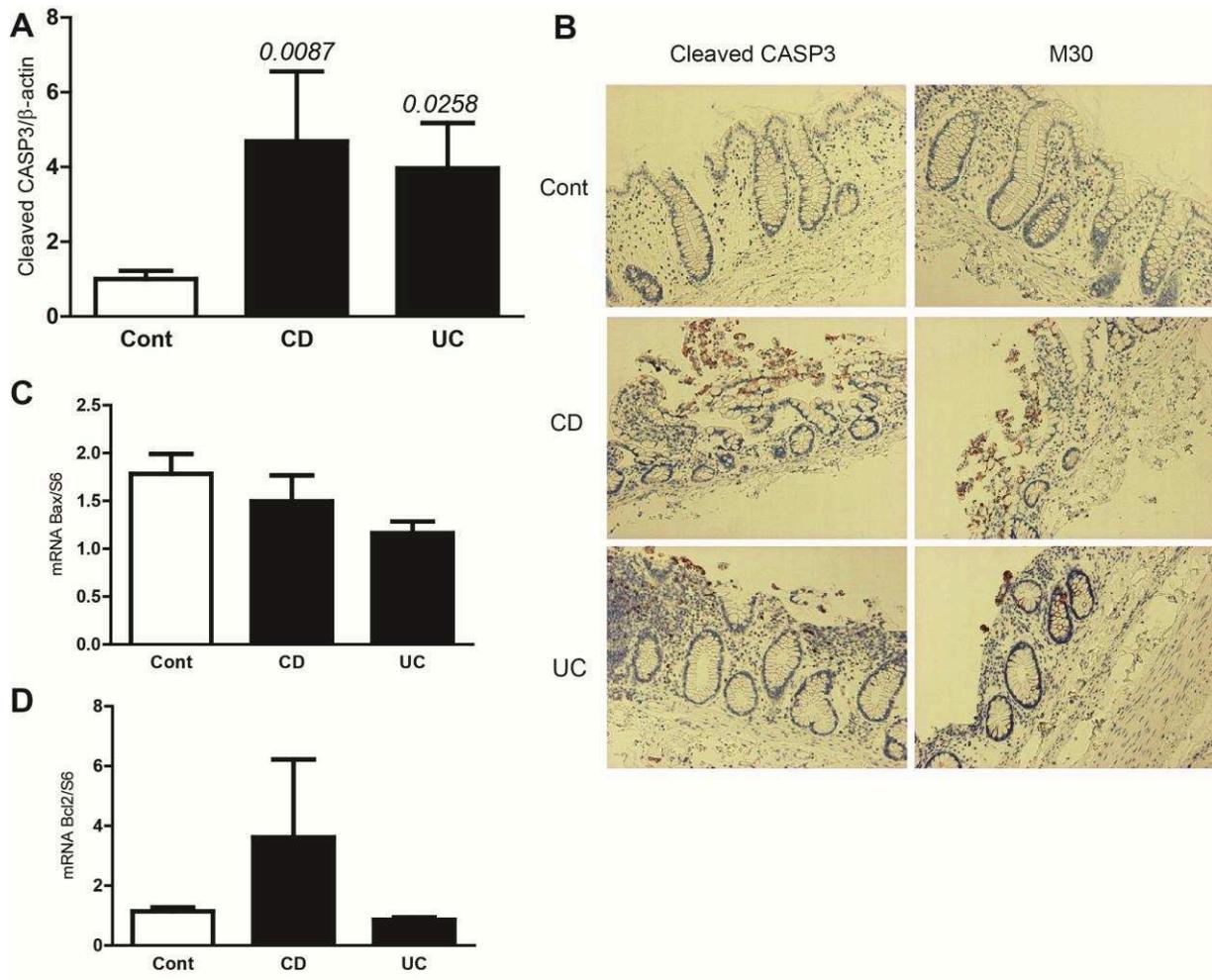


Figure 6

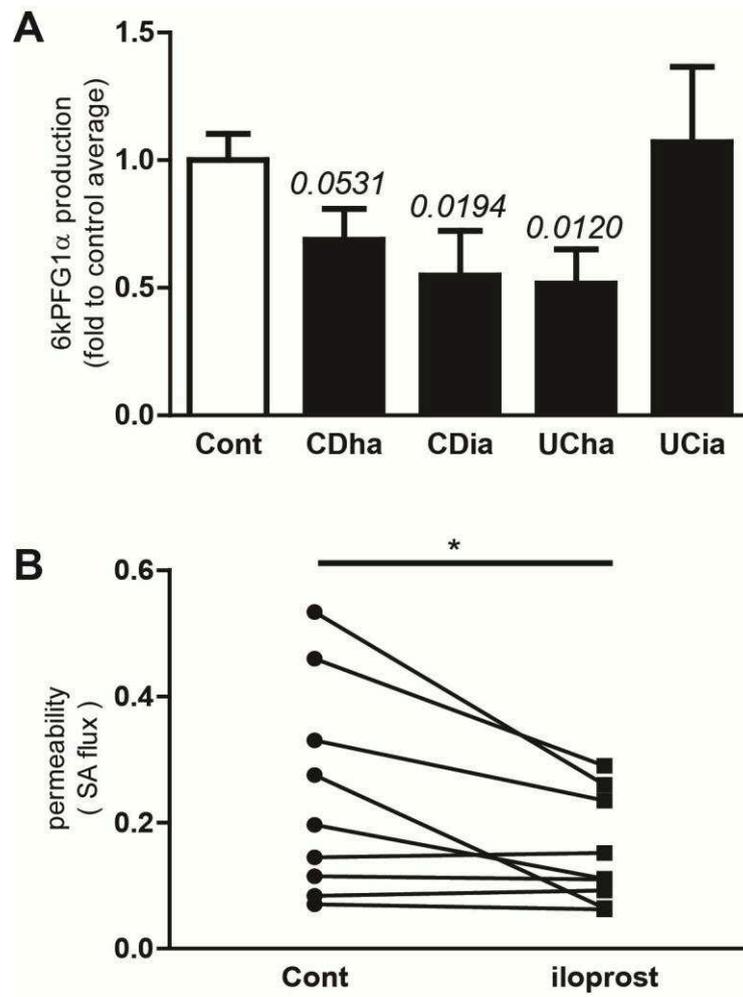
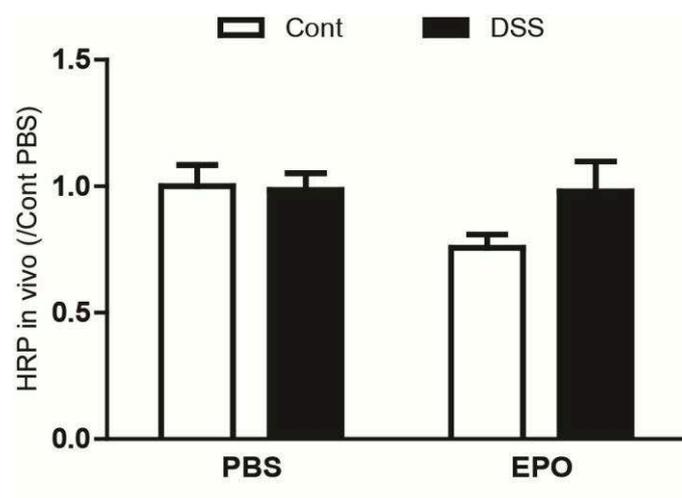
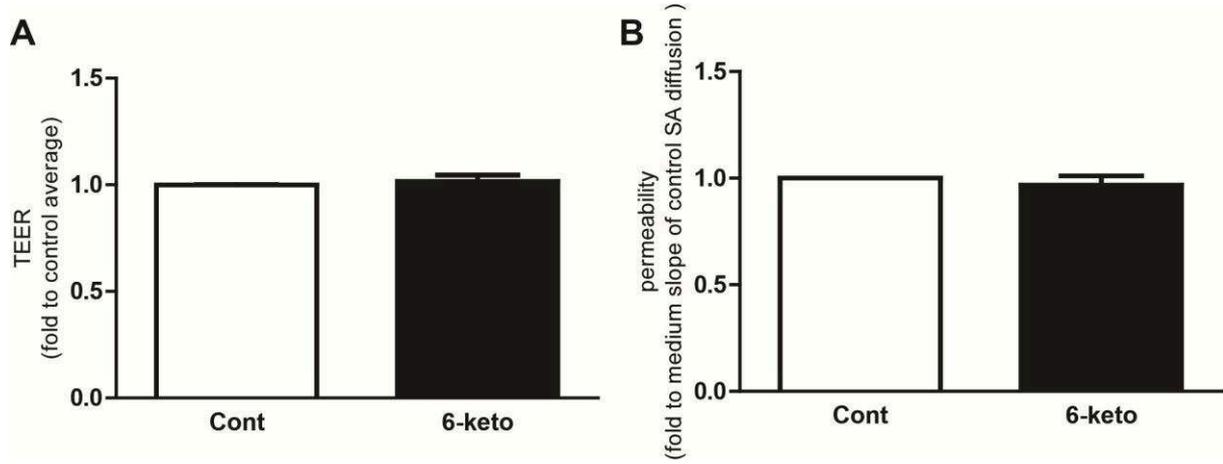


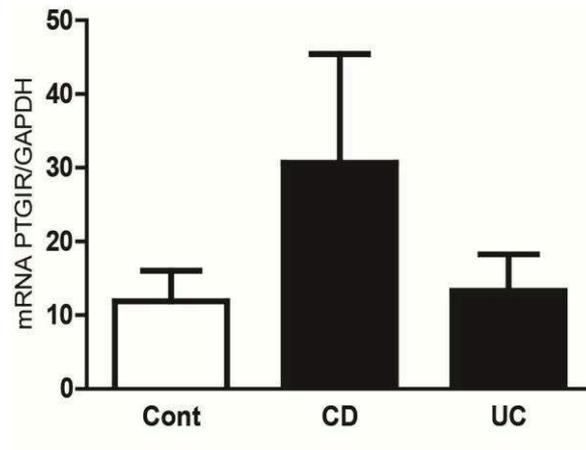
Figure 7



Supplemental S1



Supplemental S2



Supplemental S3

Discussion

Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence un nouveau rôle des eicosanoïdes dérivés de la voie des oméga 6 dans le contrôle des propriétés de la BEI. En effet, nous avons montré que le 15-HETE et la PGI2 diminuaient la perméabilité épithéliale et l'apoptose des CEI. Nos résultats suggèrent qu'une production altérée de ces composés lipidiques pourrait participer à la physiopathologie des MICI, puisqu'ils étaient tous deux retrouvés en quantité diminuée chez ces patients parallèlement à des altérations de la BEI. Une meilleure compréhension de leur métabolisme au niveau de la paroi digestive ainsi que de la régulation de l'expression et de l'activité de leurs enzymes de production permettrait ainsi de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués. De plus, une supplémentation ou l'identification des cibles épithéliales de ces composés lipidiques pourrait représenter une cible thérapeutique prometteuse pour la prise en charge des patients MICI, mais également pour toutes les autres pathologies qui présentent des défauts de BEI.

De plus, nous avons montré qu'en conditions physiologiques les CGE représentaient une source de ces médiateurs lipidiques, et pourraient ainsi permettre de renforcer la BEI. De même, en conditions inflammatoires aiguës, un rôle protecteur des CGE a déjà été suggéré via l'acquisition de nouvelles propriétés bénéfiques. A l'inverse, dans le cas des MICI caractérisées par une inflammation chronique, notre travail suggère une dysfonction gliale qui pourrait participer au développement et/ou à l'entretien de ces pathologies. En effet, si des altérations gliales phénotypiques avaient déjà été observées chez ces patients, nos résultats démontrent une altération fonctionnelle intrinsèque des CGE de patients MC qui ne sont plus capables de réguler la perméabilité épithéliale comme des CGE contrôles.

L'importance d'une balance oméga 3/oméga 6 efficace

Le rôle bénéfique des oméga 3 et 6 a été décrit pour la première fois en 1929 par Georges Burr et sa femme qui ont montré que des rats nourris avec un régime dépourvu en acides gras polyinsaturés présentaient une faible croissance et une inflammation de la peau (Burr and Burr, 1973 and 1981). Une supplémentation en acide alpha-linolénique (oméga 3) ou linoléique (oméga 6) permettait alors de corriger ces problèmes, ce qui leur a valu l'appellation d'acides gras essentiels. L'intérêt pour ces dérivés lipidiques a repris toute son importance en 1978 lorsqu'il a été découvert que les Esquimaux du Groenland, présentant des taux d'incidence très faibles d'infarctus de myocarde, avaient des taux plasmatiques élevés en oméga 3 mais faibles en oméga 6 (Dyerberg and Bang, 1978). De nombreuses études ont ensuite démontré le rôle bénéfique des oméga 3 et de leurs dérivés dans les mécanismes de cardioprotection, notamment via leur effet anti-arythmique, anti-thrombotique, vasodilatateur ou encore inhibiteur de la formation de plaque d'athérosclérose (De Caterina et al., 2000 ; Goodnight et al., 1981 ; Jain et al., 2015 ; Leaf et al., 1999 ; Simopoulos, 2003).

Plus récemment, le rôle des oméga 3 et 6 et de leurs dérivés dans les phénomènes inflammatoires a connu un essor majeur, en particulier dans les cas des MICI. Il est en effet connu que les régimes alimentaires affectent le tractus gastro-intestinal, et de nombreuses études se sont ainsi intéressées au rôle potentiel des oméga 3 et 6 dans le traitement des MICI. Les oméga 3 sont

connus pour leur rôle bénéfique via la production de molécules anti-inflammatoires, telles que les résolvines ou les protectines, régulant les réponses immunitaires et favorisant les mécanismes de cicatrisation de la muqueuse intestinale (Barbalho et al., 2016 ; Stulnig, 2003 ; Whiting et al., 2005). Cependant, si une supplémentation en oméga 3 entraîne une diminution des paramètres inflammatoires chez les patients MICI, aucun effet n'a été rapporté sur l'activité de la maladie ou sur les taux de rechutes (Dixon et al., 2015). A l'inverse, un régime alimentaire riche en oméga 6 est plutôt associé à des effets pro-inflammatoires et corrélé à un risque plus grand de développer une MICI (Hou et al., 2011 ; IBD in EPIC Study Investigators et al., 2009 ; Shoda et al., 1996). En effet, une augmentation de l'incidence des MICI est observée dans les pays avec un régime occidental caractérisé par un ratio déséquilibré entre oméga 3 et 6, du à une forte augmentation de la consommation d'acide linoléique (oméga 6) qui a quasiment triplé durant le 20^e siècle (Blasbalg et al., 2011). Ainsi, l'apport idéal recommandé actuellement en oméga 6 et 3 serait une balance comprise entre 1:1 et 1:4. Il est toutefois important de noter que différents autres paramètres pourraient bien sûr expliquer l'augmentation de cette incidence dans les pays développés. En particulier, une diminution de l'exercice et l'amélioration de l'hygiène dans ces pays et les changements de vie qui en découle (médicaments, eau chaude, réfrigérateur, brosse à dent, nourriture stérilisée...) pourraient également contribuer à des changements physiologiques ou à des infections particulières qui pourraient modifier le microbiote et participer à l'étiologie des MICI (Koloski, 2008 ; Korzenik, 2005).

Des études suggèrent tout de même que le schéma "oméga 3 = anti-inflammatoires vs oméga 6 = pro-inflammatoires" n'est pas aussi clair qu'on peut le penser. En effet, il a été montré que l'huile de poisson, très riche en oméga 3, pouvait avoir un rôle pro-inflammatoire puisqu'elle exacerbait l'inflammation dans des modèles murins génétiques de colite ou induits par *Helicobacter hepaticus* (Hegazi et al., 2006 ; Woodworth et al., 2010). De même, dans un modèle murin de colite induite au DSS, la consommation d'un régime riche en oméga 6 n'avait pas d'effet sur l'inflammation colique alors que les souris ayant reçu un régime riche en oméga 3 présentaient une colite exacerbée (Matsunaga et al., 2008). Un régime riche en oméga 6 (acide linoléique) était également plus efficace qu'un régime riche en acide oléique pour induire une rémission chez des patients MC (Gassull et al., 2002). De la même manière, un régime riche en acide arachidonique administré à des souris avec une colite n'a pas montré d'effets pro-inflammatoires, mais avait un rôle bénéfique en réduisant le stress du réticulum endoplasmique et en diminuant le stress oxydatif des colonocytes (Knoch et al., 2010). Plusieurs études ont également démontré le rôle bénéfique d'eicosanoïdes dérivés des oméga 6 sur les fonctions de la BEI (Bach-Ngohou et al., 2010 ; Coquenlorge et al., 2016 ; Moeser et al., 2006). Enfin, la lipoxine A4 dérivée des oméga 6 a démontré son rôle anti-inflammatoire *in vitro* via la diminution de l'expression de gènes pro-inflammatoires et *in vivo* en réduisant la sévérité d'une colite induite au DSS (Gewirtz et al., 2002). *In vivo*, son taux était également augmenté dans les tissus intestinaux de souris nourries avec un régime riche en oméga 6, et protégeait des dommages inflammatoires induits par une ischémie/reperfusion en diminuant l'atteinte de la muqueuse, le recrutement de granulocytes et l'expression de chimiokines (Gobbetti et al., 2015). Ainsi, l'existence de nombreux dérivés et leurs effets parfois opposés suggèrent qu'une balance efficace entre oméga 3 et oméga 6 serait la clé pour maintenir l'homéostasie intestinale.

Il semble de plus en plus clair que le rôle des oméga 6 et de leurs dérivés ne peut pas être simplement considéré comme pro-inflammatoire, puisque de nombreuses études ont également

démonstré leur rôle bénéfique durant l'inflammation. L'inflammation est un phénomène physiologique qui va permettre à l'organisme de lutter contre une agression en activant le système immunitaire et de réparer les lésions tissulaires qui en résultent. Mais lorsque celle-ci devient chronique, on observe généralement des complications dues à une difficulté des organes à réparer les lésions tissulaires et à assurer correctement leurs fonctions. Une stratégie thérapeutique pourrait ainsi reposer sur l'identification des médiateurs capables d'induire une résolution de l'inflammation. Ainsi, il a notamment été montré dans le cas d'une ischémie/reperfusion intestinale que les dérivés des oméga 6 pouvaient à la fois être des médiateurs pro-inflammatoires, mais aussi anti-inflammatoires et pro-résolutifs (**Figure 54**). Par exemple, parmi les eicosanoïdes dérivés des COX, la PGE₂ semble impliquée dans l'induction de la réponse inflammatoire durant l'ischémie, alors que le 15dPGJ₂ semble participer à la résolution de l'inflammation suivant la reperfusion (Gobbetti et al., 2013). Mieux comprendre la cinétique et les voies enzymatiques impliquées dans les phénomènes inflammatoires retrouvés chez les patients MICI, en particulier durant les poussées, pourrait alors permettre d'imaginer de nouvelles stratégies afin d'induire une résolution de l'inflammation, par exemple via une supplémentation en médiateurs pro-résolutifs.

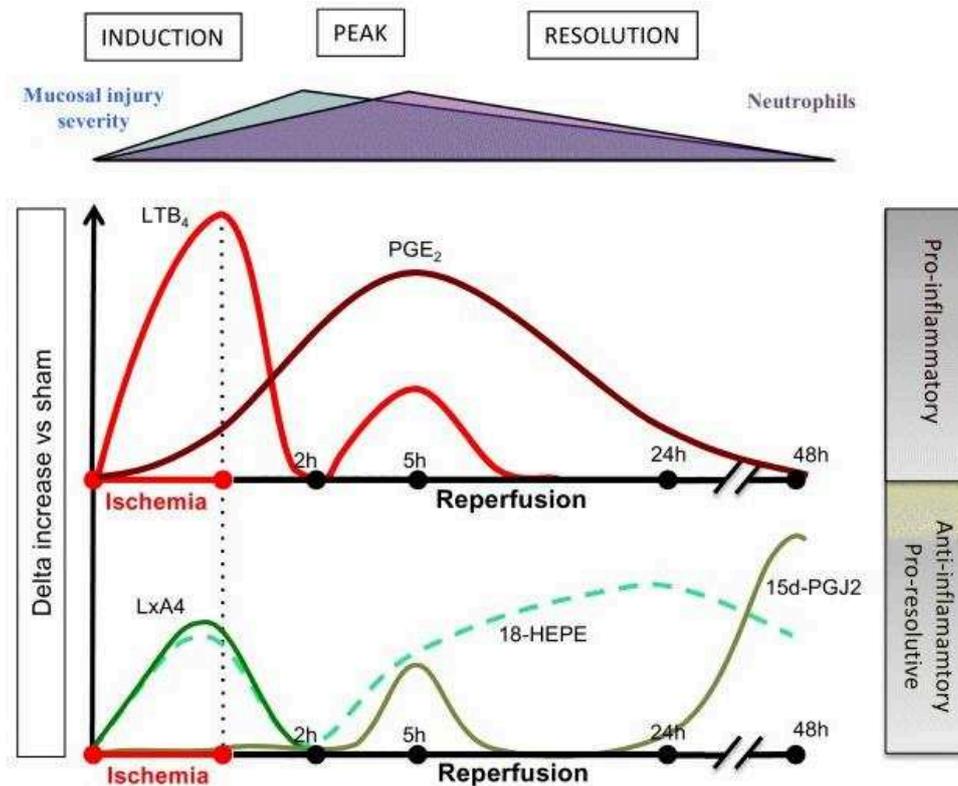


Figure 54 : Production temporelle des eicosanoïdes durant une ischémie/reperfusion intestinale
 Durant l'ischémie (induction de la réponse inflammatoire) on observe une augmentation de la production de LTB₄ attractif des neutrophiles et de LxA4 protectrice vasculaire. Entre 2h et 5h après la reperfusion, les dérivés des COX (PGE₂ ici) sont augmentés, avec des pics correspondant aux dégâts de la muqueuse (2h) et au recrutement des cellules immunitaires (5h). Le LTB₄ et la LxA4 sont de nouveau retrouvés augmentés à 5h, probablement à cause d'une production des dérivés des LOX par les cellules immunitaires nouvellement recrutées. 24h après la reperfusion, tous les eicosanoïdes sont diminués pour atteindre des niveaux basaux après 48h, à l'exception des médiateurs participant à la résolution de l'inflammation comme le 18-HEPE ou la 15dPGJ₂. D'après Gobbetti et al., 2013.

Outre l'influence environnementale que pourrait avoir une alimentation déséquilibrée en oméga 3 et 6 sur le développement et/ou l'évolution des MICI, une altération de l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides est également retrouvée chez ces patients. En particulier, une diminution de l'expression de la Fatty Acid Synthase a été observée dans l'iléon et le colon de patients RCH (Heimerl et al., 2006). De la même manière, une augmentation de l'activité de COX-2 est retrouvée au niveau des cellules épithéliales des patients MICI (Singer et al., 1998). Le même type de résultat a été observé chez des patients MC, ainsi qu'une augmentation de l'expression de la L-PGDS (Le Loupp et al., 2015). Au niveau des sites enflammés, une augmentation de l'expression de la 12-LOX chez les patients MICI et de l'activité de la 5-LOX chez les patients RCH a également été rapportée (Ikehata et al., 1995 ; Shannon et al., 1993). A l'inverse, une diminution de l'expression de la L-PGDS et de AKR1C3 a été retrouvée dans les CGE de patients MC, associée à une diminution de la production de 11 β PGF2 α (Coquenlorge et al., 2016). Une altération de l'expression des métabolites de ces enzymes est également retrouvée chez les patients MICI (**Figure 55**). On retrouve ainsi une augmentation de la concentration des dérivés des oméga 6 dans les membranes cellulaires chez ces patients au niveau de la muqueuse colique et dans les globules rouges (Nishida et al., 1987 ; Ueda et al., 2008). Une augmentation de plusieurs eicosanoïdes dérivés des oméga 6 tels que le LTB4, le TXB2, la PGE2 ou encore la PGD2 a aussi été rapportée dans les muqueuses de patients MICI (Masoodi et al., 2013 ; Sharon and Stenson, 1984). Nos résultats ont également démontré que les CGE de patients MC produisaient moins de 15-HETE, et que la PGI2 était retrouvée en quantité diminuée dans les biopsies de patients MICI. Toutefois, il reste encore à déterminer à quoi sont dues ces altérations du métabolisme des lipides chez ces patients. Il a été montré qu'une hyperméthylation du promoteur codant pour la PTGIS était retrouvée chez les patients MC, associée à une diminution de son expression (Sadler et al., 2016). Cependant, si on peut penser que l'inflammation chronique pourrait être responsable de ces modifications épigénétiques, il n'est pas exclu qu'une altération de l'expression de ces enzymes pourrait elle-même être responsable du développement de l'inflammation.

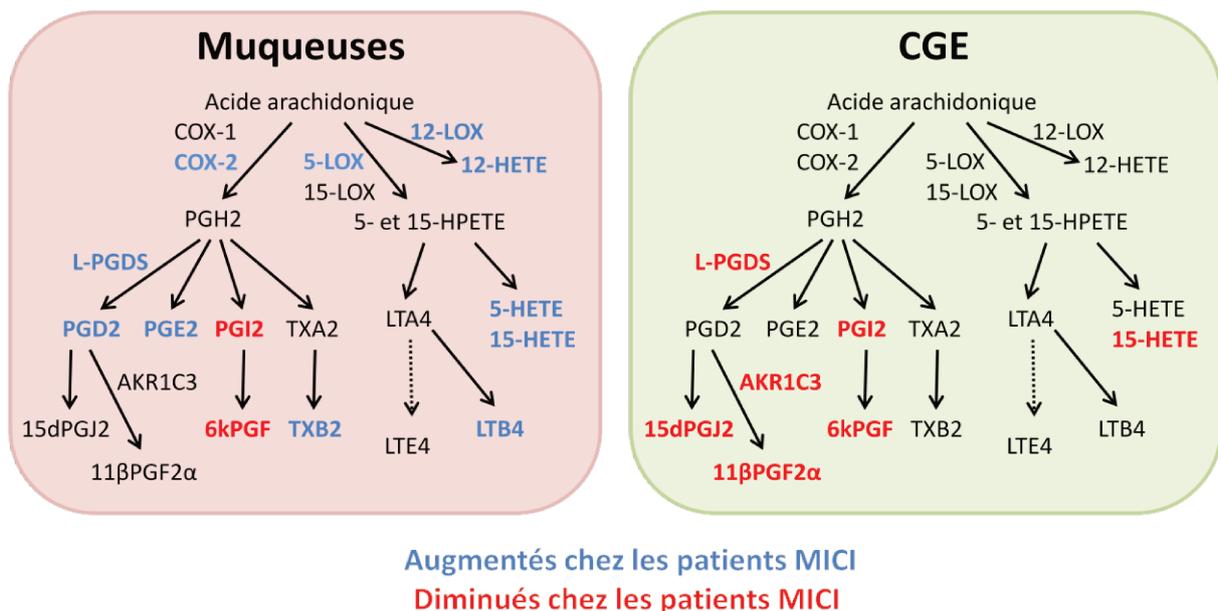


Figure 55 : Altération du métabolisme des dérivés des oméga 6 chez les patients MICI

Dans notre travail, nous avons également montré un nouveau rôle bénéfique de deux dérivés des oméga 6 sur la régulation des propriétés de la BEI à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, le 15-HETE et la PGI2 diminuent la perméabilité épithéliale en modulant l'expression des protéines des jonctions serrées, et la PGI2 régule également l'apoptose épithéliale en inhibant le clivage de la Caspase-3. A l'inverse, leur production est retrouvée diminuée chez les patients MICI, parallèlement à des altérations de la BEI. Actuellement il n'existe pas de modèles génétiques d'animaux invalidés pour la production de ces deux composés, mais leur étude aurait pu permettre d'analyser si leur délétion pourrait conduire au développement d'une pathologie semblable aux MICI.

Plusieurs données sont toutefois à prendre en compte avant d'envisager une quelconque stratégie thérapeutique. Tout d'abord, il est important de souligner que l'effet bénéfique de ces eicosanoïdes que nous décrivons ici est spécifique aux cellules épithéliales intestinales, mais leur rôle sur d'autres types cellulaires pourrait être bien différent. Le 15-HETE a par exemple été décrit pour augmenter la perméabilité endothéliale et la PGI2 pour jouer un rôle néfaste sur la progression de l'arthrite rhumatoïde (Lundqvist et al., 2016 ; Stitham et al., 2011). Une supplémentation avec ces composés pourrait ainsi avoir des effets délétères non voulus, notamment si ces composés sont absorbés et diffusent vers d'autres organes. De plus, il a par exemple été montré que la PGE2 pouvait avoir des effets inverses en fonction du récepteur (EP1 à EP4) auquel elle se fixait (Sugimoto and Narumiya, 2007). Il paraît ainsi primordial d'identifier les récepteurs spécifiques de ces composés lipidiques, et d'identifier les cellules cibles afin de pallier à d'éventuels effets secondaires. La PGI2 possède un récepteur spécifique (IP receptor) mais en ce qui concerne le 15-HETE, aucun récepteur spécifique n'a encore été mis en évidence même si des études suggèrent qu'il pourrait se lier à la membrane plasmique (Vonakis and Vanderhoek, 1993). De plus, nos résultats ont montré que l'effet bénéfique de ces eicosanoïdes sur la BEI n'était possible que lorsqu'ils étaient ajoutés en basolatéral, mais pas en apical. De ce fait, la localisation des récepteurs sur les cellules cibles en fonction de la localisation des cellules productrices (CGE par exemple) est également à prendre en compte pour de futures stratégies thérapeutiques. Enfin, ces composés sont des agonistes des récepteurs nucléaires PPAR et leurs différences d'action pourraient ainsi être expliquées en fonction du sous-type ciblé (PPAR α , PPAR β/δ ou PPAR γ). Il serait donc intéressant d'analyser l'expression de ces différents récepteurs par les cellules de la BEI et celles de son microenvironnement. De plus, des études ont montré que différents génotypes peuvent être associés à des réponses différentes aux acides gras. Par exemple, des polymorphismes génétiques pour TNF α et PPAR α sont associés à une réponse altérée aux interventions nutritionnelles avec des acides gras (Fontaine-Bisson et al., 2007 ; Paradis et al., 2005). Il a également été montré que différents types de consommation de graisse interagissent avec le polymorphisme de l'IL-6, le TNF α et PPAR γ pour moduler l'activité de la MC (Ferreira et al., 2010 ; Guerreiro et al., 2009). Ainsi, il serait intéressant de caractériser le génotype des patients avant d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques nutritionnelles.

Les CEI, une cible thérapeutique

Les MICI sont caractérisées par une rupture de l'intégrité de la BEI entraînant une augmentation de la perméabilité et de l'infiltration de pathogènes. Plusieurs études ont également montré une augmentation de l'apoptose des CEI chez les patients MICI, et suggèrent un rôle central de sa dérégulation dans les altérations de la muqueuse observées chez ces patients (Di Sabatino et

al., 2003 ; Iwamoto et al., 1996 ; Ruemmele et al., 2002). Renforcer la BEI représente ainsi un enjeu majeur dans ces pathologies.

Actuellement, les thérapies utilisées dans le contexte des MICI visent principalement à réduire l'inflammation, mais elles sont associées à de nombreux effets secondaires (nausées, fièvre, sensibilité accrue aux infections voir des conséquences plus graves comme une augmentation de la fréquence des lymphomes ou de troubles auto-immuns) et ne sont pas efficaces chez tous les patients. Plus qu'un effet bénéfique sur l'inflammation, il a été montré que ces traitements ciblaient également la BEI. En particulier, il a été montré *in vitro* sur des lignées cellulaires épithéliales qu'un traitement anti-TNF α prévenait l'augmentation de la phosphorylation de la MLC et empêchait la diminution de l'expression des claudines 1 et 4 induite par l'inflammation (Fischer et al., 2013). Dans un modèle expérimental de colite les anti-TNF α empêchaient la diminution d'expression de ZO-1 et de l'Occludine, ainsi que l'augmentation de l'expression de la claudine 2 (Fries et al., 2008). Il en est de même concernant les phénomènes d'apoptose : un traitement avec des anti-TNF α induisait là encore une diminution de l'apoptose épithéliale dans le cas d'une MC active (Zeissig et al., 2004). De même, il améliorerait la sévérité d'une iléite semblable à la maladie de Crohn en abrogeant l'apoptose épithéliale (Marini et al., 2003). Cibler directement la BEI représenterait ainsi une approche thérapeutique prometteuse pour la prise en charge des patients MICI, par exemple en modulant l'expression des protéines jonctionnelles qui régulent la perméabilité épithéliale ou les phénomènes de renouvellement et d'apoptose.

Cibler les jonctions serrées des CEI ?

Plusieurs études ont démontré le rôle de certains dérivés lipidiques sur la modulation des protéines jonctionnelles épithéliales. Il a été montré que les acides gras à chaînes courtes tels que le butyrate sont capables d'améliorer les fonctions de la BEI, notamment via une augmentation de l'expression de la claudine 1 (Wang et al., 2012). Mais malgré des effets prometteurs observés dans des études non contrôlées, plusieurs essais randomisés n'ont pas confirmé l'intérêt thérapeutique du butyrate au cours des MICI (Cook and Sellin, 1998). Dans un modèle expérimental de colite, les oméga 3 augmentaient l'expression de ZO-1 et des claudine 1, 5 et 8 (Li et al., 2008 bis). Sur des lignées cellulaires épithéliales, les oméga 3 prévenaient également la redistribution des protéines des jonctions serrées ZO-1 et Occludine induite par l'inflammation (Amasheh et al., 2009 ; Li et al., 2008). Mais là encore, les oméga 3 n'ont pas démontré leur efficacité sur l'activité et les taux de rechute des MICI (Dixon et al., 2015). Dans ce travail, nous démontrons un rôle bénéfique de dérivés des oméga 6 sur la régulation des protéines des jonctions serrées. Nous avons ainsi montré que le 15-HETE et la PGI2 diminuaient la perméabilité paracellulaire de la BEI via une augmentation de l'expression des protéines des jonctions serrées ZO-1 et Occludine, respectivement. Il paraît toutefois très probable qu'une supplémentation globale en oméga 6 ne serait en réalité pas bénéfique pour tout l'organisme. Ainsi, identifier les mécanismes d'action de ces composés lipidiques et leurs cibles épithéliales permettrait de moduler directement les propriétés de la BEI, en limitant leurs effets sur les cellules de son microenvironnement. En ce sens, il serait par exemple intéressant d'identifier les voies de signalisation impliquées dans ces modifications d'expression des protéines jonctionnelles afin d'envisager des approches pharmacologiques plus spécifiques des acteurs moléculaires des jonctions serrées des CEI.

Cibler le renouvellement/apoptose des CEI ?

Dans nos travaux, nous avons mis en évidence un rôle bénéfique de la PGI₂ sur la régulation de l'apoptose via une inhibition du clivage de la Caspase-3, qui pourrait expliquer son rôle sur la perméabilité épithéliale. Plusieurs études ont d'ailleurs montré le lien étroit qu'il existe entre apoptose et perméabilité intestinale. Notamment, il a été montré chez des rats que l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales intestinales se produisait de façon simultanée à l'augmentation de la perméabilité de la BEI (Sun et al., 1998). De la même manière, l'induction de l'apoptose sur une lignée cellulaire de CEI était associée à une diminution de la résistance transépithéliale et à l'augmentation de la perméabilité aux petites molécules (Abreu et al., 2000). Afin de valider le lien entre apoptose et perméabilité dans notre étude, nous avons donc utilisé un inducteur d'apoptose, la staurosporine, et nous avons pu montrer que son effet sur l'augmentation de la perméabilité *ex vivo* sur des explants de souris ou de muqueuses humaines pouvait également être contré par un prétraitement à la PGI₂. La capacité de la PGI₂ à réguler les phénomènes d'apoptose a déjà été démontrée sur différents types cellulaires tels que les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales vasculaires ainsi que les cellules pancréatiques et les cellules rénales (Chen et al., 2012 ; Chen et al., 2013 ; Goto et al., 2014 ; Ochiai et al., 1997). Au niveau de l'intestin, le rôle de la PGI₂ sur l'apoptose est peu décrit mais une étude a toutefois mis en évidence un rôle bénéfique de la PGI₂ sur l'inhibition de l'apoptose des cellules épithéliales du colon, observé notamment via la diminution du marqueur M30 (Cutler et al., 2003).

Cependant, le mécanisme selon lequel la PGI₂ est capable de réguler les phénomènes d'apoptose via la Caspase-3 reste encore inconnu. Nos résultats suggèrent que des modifications de prolifération des CEI ne semblent pas être impliquées puisque l'expression du marqueur PCNA restait inchangée entre nos différents groupes d'animaux. Toutefois, la PGI₂ pourrait entraîner une augmentation de la survie des CEI, comme nous avons pu l'observer avec l'augmentation de l'expression de P-Akt chez les animaux DSS traités avec l'analogue stable de la PGI₂. Ainsi, il faut rester prudent sur l'effet que pourrait avoir une supplémentation en PGI₂, car l'inhibition de l'apoptose et la promotion de la survie épithéliale pourrait en réalité conduire au développement de cancer *in vivo*. En effet, si la PGI₂ semble associée à un effet protecteur contre le cancer du poumon, il a été montré une augmentation de l'expression de la PTGIS dans les cellules tumorales de cancer du sein (Klein et al., 2015 ; Tennis et al., 2010). De plus, une étude a également montré que la PGI₂ activait les récepteurs PPAR δ dont l'expression est retrouvée augmentée dans les CEI des cancers colo-rectaux, et pourrait ainsi participer au développement tumoral (Gupta et al., 2000). Ainsi, une supplémentation à long terme pourrait avoir un effet néfaste et des études expérimentales sur le pouvoir tumorigène intestinal de la PGI₂ semblent nécessaires avant d'envisager toute approche thérapeutique chez les patients MICI.

Cibler l'AMPK épithéliale ?

Hormis les protéines des jonctions serrées et/ou l'apoptose, une cible moléculaire intéressante pour réguler l'homéostasie de la BEI serait l'AMPK. En effet, nos résultats ont montré que le 15-HETE inhibait l'AMPK épithéliale *in vitro*, concourant à la diminution de perméabilité observée via une régulation de l'expression de la protéine ZO-1. De manière cohérente, une activation de l'AMPK par l'AICAR résultait en une augmentation de la perméabilité paracellulaire *in vitro*. Mais les données actuelles concernant la régulation de la BEI par l'AMPK sont contradictoires. Il

a déjà été démontré qu'une inhibition de l'AMPK entraînait une diminution de la perméabilité (Scharl et al., 2009). A l'inverse, d'autres papiers suggèrent qu'une activation de l'AMPK aurait un rôle bénéfique sur les fonctions de la BEI, notamment en améliorant la localisation et l'expression des protéines des jonctions serrées (Elamin et al., 2013 ; Park et al., 2015). Il a d'ailleurs été montré que l'association des jonctions serrées aux microtubules du cytosquelette était médiée par une phosphorylation de la cinguline par l'AMPK, démontrant son rôle central dans la morphogénèse épithéliale (Yano et al., 2013). Durant l'inflammation, les niveaux d'énergie de la cellule diminuent ce qui augmente l'activité de l'AMPK, et il a été montré que l'IFN γ activait l'AMPK qui participait alors à la protection de l'épithélium intestinal (Scharl et al., 2009 bis). Enfin, la Metformine, un activateur de l'AMPK, supprime l'inflammation et augmente la différenciation épithéliale chez des souris développant des colites spontanées (Xue et al., 2016). Mais la limite de ces études repose sur la spécificité des agents pharmacologiques utilisés, capables d'activer d'autres protéines que l'AMPK, et qui ne sont pas spécifiques d'une sous-unité particulière de l'AMPK. En effet, l'AMPK possède deux isoformes de la sous-unité catalytique : $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Il a récemment été montré qu'une délétion épithéliale de l'AMPK $\alpha 1$ *in vivo* avait un rôle délétère sur les fonctions de la BEI, en augmentant la perméabilité et la prolifération épithéliale, aggravant les effets d'une colite induite au DSS (Sun et al., 2017). Mais des phénomènes de compensation pourraient exister entre les deux sous-unités, et il paraît donc primordial d'étudier l'implication d'une inhibition ou d'une activation des deux sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de l'AMPK sur les fonctions intestinales. Ainsi, nous avons étudié la perméabilité *in vivo* et *ex vivo* de souris invalidées pour les gènes des deux sous-unités catalytiques de l'AMPK épithéliale, en collaboration avec Benoit Viollet (Institut Cochin, Paris). Nos résultats ont montré que la perméabilité était augmentée chez les animaux KO par rapport aux animaux WT, à la fois *in vivo* et *ex vivo*. Ces résultats, présentés en **Annexe 1**, semblent contredire nos résultats obtenus *in vitro* mais valident l'implication de l'AMPK dans le contrôle de la perméabilité de la BEI.

En plus de la spécificité des sous-unités, il reste à définir comment les oméga 3 et 6 régulent l'activité de l'AMPK. Ainsi, il a été montré qu'un traitement avec des oméga 3 protégeait des lésions intestinales suite à une ischémie/reperfusion via une activation de l'AMPK (Jing et al., 2014). De manière similaire, une supplémentation en oméga 3 restaurait les mécanismes maintenant l'homéostasie cérébrale après une lésion traumatique, toujours en activant l'AMPK (Wu et al., 2007). Nos travaux suggèrent que les oméga 6 pourraient également moduler les fonctions de la BEI par une voie dépendante de l'AMPK. Ces travaux nous permettraient de déterminer si cibler directement l'AMPK épithéliale pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique dans le cas des MICI. Il est ainsi possible d'envisager qu'un traitement avec des activateurs pharmacologiques de l'AMPK tels que la Metformine ou l'AICAR pourrait renforcer la BEI en diminuant sa perméabilité, en conditions physiologiques mais aussi et surtout lors d'une inflammation intestinale.

Renforcer la BEI grâce aux CGE

Le rôle crucial des CGE dans le maintien de l'homéostasie épithéliale a été démontré dans de nombreux modèles d'ablation gliale entraînant une rupture de l'intégrité de la BEI et une augmentation de la perméabilité pouvant conduire au développement d'une inflammation intestinale (Aubé et al., 2006 ; Bush et al., 1998 ; Cornet et al., 2001 ; Savidge et al., 2007). En conditions physiologiques, les CGE sont capables de produire de nombreux médiateurs capables de

renforcer la BEI. Ainsi, elles produisent du GSNO, du pro-EGF ou encore du TGF β 1 qui vont réguler les propriétés de la BEI telles que sa résistance, sa perméabilité, sa réparation et la prolifération/différenciation des CEI (Neunlist et al., 2013). Les CGE sont également capables de produire des médiateurs lipidiques dérivés des oméga 6. Une étude précédente du laboratoire avait ainsi montré une production par les CGE humaines de patients contrôles de 21 médiateurs lipidiques, dont le 6-ketoPGF1 α , TXB2, 11 β PGF2 α , PGE2, PGD2, 15dPGJ2, LTB4, 5-HETE, 15-HETE, 8-HETE et 12-HETE. Le rôle de certains de ces dérivés sur les fonctions de la BEI a déjà été étudié, comme le 15dPGJ2 qui induisait la différenciation et inhibait la prolifération des CEI (Bach-Ngohou et al., 2010) et le 11 β PGF2 α qui augmentait la réparation de la BEI ainsi que l'étalement des CEI (Coquenlorge et al., 2016). Dans ce travail de thèse, nous avons mis en évidence que les CGE de rats produisaient également de nombreux eicosanoïdes dérivés des oméga 6, dont le 5-HETE, 15-HETE, 8-HETE, LTA4, PGE2 et TXB2 (Pochard et al., 2016). Nous avons également montré que le 15-HETE régulait la perméabilité de la BEI, tout comme la PGI2 qui régulait aussi l'apoptose des CEI.

Ainsi, les CGE représentent une source de facteurs capables de renforcer la BEI, et l'identification de ces médiateurs ainsi que leurs mécanismes d'action pourrait permettre l'émergence de nouveaux traitements pour toutes les pathologies caractérisées par une altération de la BEI. En effet, outre les MICI caractérisées par une augmentation de la perméabilité intestinale, d'autres pathologies présentent des altérations similaires (König et al., 2016). Ainsi, les patients atteints du syndrome de l'intestin irritable (IBS) présentent également une perméabilité intestinale accrue *in vivo*, corrélée à l'index d'activité de la maladie (Zhou et al., 2009). *Ex vivo*, les biopsies de patients IBS ont aussi une perméabilité augmentée, de manière concomitante à une diminution de l'expression des ARNm de ZO-1 (Piche et al., 2009). De même, une augmentation de la perméabilité intestinale et une structure anormale des jonctions serrées est retrouvée dans la maladie coeliaque (Bjarnason et al., 1983 ; Duerksen et al., 2005 ; Schulzke et al., 1998). Dans le cas de maladies métaboliques comme l'obésité et le diabète de type 2, on considère qu'une augmentation de la perméabilité intestinale entraînerait une augmentation du passage de LPS dans le sang qui participerait au développement de l'inflammation systémique, elle-même participant aux altérations du métabolisme énergétique (Teixeira et al., 2012). Enfin, une augmentation de la perméabilité corrélée avec la sévérité des symptômes est retrouvée dans l'allergie alimentaire, qui persiste même lorsque les patients suivent un régime sans allergène (Järvinen et al., 2013 ; Perrier and Corthésy, 2011).

Toutefois, le contrôle des fonctions de la BEI *in vivo* par les CGE en conditions physiologiques a très récemment été remis en cause. En effet les précédentes études d'ablation gliale avaient été réalisées en utilisant le marqueur glial GFAP comme cible et donc en délétant les CGE exprimant la GFAP. Certains modèles d'ablation gliale ont été réalisés chez des souris exprimant la Thymidine kinase du virus Herpes simplex sous le contrôle du promoteur GFAP : un traitement avec du gancyclovir entraînait alors la délétion des CGE GFAP+ (Bush et al., 1998 ; Savidge et al., 2007). D'autres étaient basés sur un ciblage auto-immun des cellules GFAP+ exprimant un antigène viral reconnu par les lymphocytes T CD8+ spécifiques de cet antigène (Aubé et al., 2006 ; Cornet et al., 2001). Or il est désormais admis que, physiologiquement, de nombreuses CGE n'expriment pas la GFAP (plus de la moitié des CGE de la muqueuse et sous-muqueuse), alors qu'elles expriment quasiment toutes PLP1 (Rao et al., 2015). Ainsi, une ablation gliale des CGE exprimant PLP1 dans le

but d'éliminer au maximum tous les types de CGE dans l'intestin a été réalisée (Rao et al., 2017). Dans cette étude, aucune inflammation intestinale et aucune modification de la perméabilité de la BEI n'étaient retrouvées. Afin d'expliquer les altérations épithéliales retrouvées dans les précédents modèles, Rao et al. suggèrent une toxicité du gancyclovir qui pourrait s'étendre aux cellules voisines et donc affecter les CEI. Ils ont d'ailleurs noté la présence d'un marqueur de rupture des doubles brins d'ADN (une étape précoce de la cascade apoptotique) au niveau des cryptes épithéliales. A l'inverse, Savidge et al. n'ont reporté aucune toxicité épithéliale du gancyclovir lorsqu'il était injecté seul à des souris non transgéniques (Savidge et al., 2007). De plus, les cellules de Schwann du système nerveux périphérique et les oligodendrocytes du SNC expriment aussi PLP1, et les auteurs ont d'ailleurs rapporté une faiblesse des membres postérieurs et un déficit de coordination 14 jours après l'induction de la délétion. Ainsi, même si l'étude se limite à l'analyse des altérations gastro-intestinales pendant les 10 premiers jours, on peut toutefois supposer qu'une altération des mécanismes de régulation centrale du SNE et des fonctions intestinales pourraient constituer un biais majeur dans cette étude. Enfin, dans le modèle ciblant les CGE PLP1+, toutes les CGE ne sont pas déplétées (66% des CGE S100 β + dans l'intestin grêle et 74% dans le colon) : on peut ainsi se demander si les CGE restantes pourraient être GFAP+, puisqu'on sait qu'il en existe en réalité assez peu physiologiquement. On pourrait donc imaginer que l'absence d'atteinte épithéliale retrouvée après une ablation gliale des CGE PLP1+ serait due à un contrôle efficace des propriétés de la BEI par les CGE GFAP+ par exemple. Actuellement, l'expression de PLP1 par les CGE a été décrite uniquement chez la souris, mais il reste encore à déterminer s'il en est de même pour les CGE humaines, et si son expression est modifiée en conditions pathologiques. Il serait bien sûr intéressant de voir si une altération de son expression est retrouvée en parallèle des modifications de l'expression de GFAP et S100 β chez les patients MICI, et si l'étude de cette population cellulaire représente ainsi un intérêt dans ce contexte pathologique. De plus, les expériences *in vitro* présentées dans nos travaux ont été réalisées sur des CGE GFAP+, ce qui suggère que c'est cette sous-population particulière qui présenterait des altérations phénotypiques et fonctionnelles dans le cas des MICI. Toutefois, il reste encore à déterminer si les autres sous-populations de CGE présentent le même type d'altérations, et on peut également se demander si ces différents sous-types ne pourraient pas être impliqués dans la régulation de fonctions biologiques autres que les propriétés épithéliales, telle que la motricité comme il a été montré pour les CGE PLP1+.

Par conséquent, si le rôle des CGE sur le contrôle des fonctions de la BEI peut être discuté en conditions physiologiques *in vivo*, il apparaît tout de même évident que les CGE produisent des médiateurs gliaux qui renforcent les propriétés épithéliales. L'impact bénéfique des CGE GFAP+ *in vitro* n'est pas remis en cause, mais il serait toutefois intéressant d'étudier l'impact des autres sous-populations de CGE sur les fonctions de la BEI. Cependant, en l'absence de glie *in vivo*, de nombreuses autres populations cellulaires pourraient également produire ces médiateurs qui renforcent la BEI, ce qui pourrait expliquer pourquoi dans certains modèles d'ablation gliale on ne retrouve pas d'altérations épithéliales. Le fait que les CGE puissent interagir avec le système immunitaire et le microbiote suggère également qu'elles pourraient influencer la BEI lorsqu'elles sont activées (on parle alors de glie réactive) par certaines conditions infectieuses ou immunologiques.

Les CGE réactives, un remodelage qui se veut bénéfique

En réponse à des lésions, un stress ou à l'inflammation, les astrocytes du SNC acquièrent de nouvelles propriétés et sont alors qualifiés de "glie réactive" (Pekny and Pekna, 2014). L'induction de ces astrocytes réactifs, caractérisés notamment par une augmentation de l'expression du marqueur glial GFAP et par une augmentation de la prolifération et de la sécrétion de cytokines, peut avoir des effets bénéfiques sur la cicatrisation des tissus cérébraux (Lomax et al., 2005 ; Sofroniew, 2015). En effet, il a été démontré que les astrocytes réactifs étaient impliqués dans la réparation de la barrière hémato-encéphalique et étaient bénéfiques pour les neurones notamment en augmentant la croissance des axones (Eddleston and Mucke, 1993). Ainsi, les similarités qui existent entre les CGE et les astrocytes servent de base pour étendre à l'intestin le concept de glie réactive.

Aussi bien dans le SNC que dans le SNE, le phénotype de glie réactive est notamment caractérisé par une augmentation de l'expression des marqueurs gliaux GFAP, S100 β et Sox10. La protéine S100 β est connue pour avoir une activité neurotrophique, en modulant la croissance et la différenciation neuronale à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Huttunen et al., 2000). De plus, l'inflammation entraîne la production gliale de facteurs neurotrophiques tels que le GDNF, le BDNF et le NGF (Coelho-Aguiar et al., 2015 ; von Boyen et al., 2006). Le GDNF a également démontré son effet bénéfique sur les CEI en les protégeant de l'apoptose, et sur les CGE elles-mêmes en fonctionnant comme une boucle rétroactive protectrice (Steinkamp et al., 2003 and 2012). Tout comme le GDNF, le BDNF peut protéger les CGE de l'apoptose induite par des cytokines pro-inflammatoires (Steinkamp et al., 2012 bis). *In vitro*, un traitement avec du LPS et de l'IFN γ augmente la prolifération des CGE (Cirillo et al., 2011). De même, une inflammation *in vivo* stimule la prolifération des CGE myentériques (Bradley et al., 1997). Enfin, un traitement de CGE par des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IFN γ) *in vitro* semblait induire un phénotype réactif entraînant une diminution de la perméabilité épithéliale. Cet effet bénéfique était dû à la production gliale de GSNO, qui modulait l'expression des protéines des jonctions serrées Occludine et ZO-1 (Cheadle et al., 2013). Ainsi, une inflammation à court terme induit un phénotype de glie réactive qui semble bénéfique pour la survie neuronale et épithéliale.

Mais si l'induction d'une glie réactive semble être bénéfique pour la récupération des fonctions cérébrales, il a été démontré que si elle n'était pas résolue dans le temps elle pourrait empêcher la récupération complète des fonctions du SNC (Faulkner et al., 2004 ; Hamby and Sofroniew, 2010). Il a ainsi été montré qu'en réponse à un traumatisme léger ou à distance de blessures plus sévères, les astrocytes réactifs présentaient une hypertrophie et des changements moléculaires et fonctionnels modérés qui leur conféraient un potentiel résolutif bénéfique (Sofroniew, 2009). A l'inverse, au niveau des zones enflammées et endommagées, on observe une astrogliose sévère avec la formation d'une glie cicatricielle pouvant avoir des effets néfastes. Celle-ci a pour but premier de protéger les tissus sains en empêchant le passage des cellules inflammatoires, mais elle va également empêcher la régénération des axones et peut persister pendant de longues périodes, contribuant ainsi aux mécanismes pathologiques de maladies neurologiques. Un tel paradigme pourrait exister pour les CGE dans l'intestin, et contribuer aux altérations observées dans de nombreuses pathologies faisant intervenir des mécanismes inflammatoires. Ainsi, une exposition

prolongée et/ou plus intense à des bactéries ou virus ou à des médiateurs inflammatoires induit un phénotype de glie réactive qui peut produire des facteurs protecteurs, mais aussi des facteurs destructeurs, altérer leur mécanosensitivité et altérer la signalisation calcique et purinergique (**Figures 56 et 57**). Les MICI étant caractérisées par une inflammation chronique il est légitime de penser que l'induction de CGE réactives, probablement bénéfiques au départ, pourrait finalement s'avérer délétère dans le temps et participer aux mécanismes physiopathologiques de ces maladies.

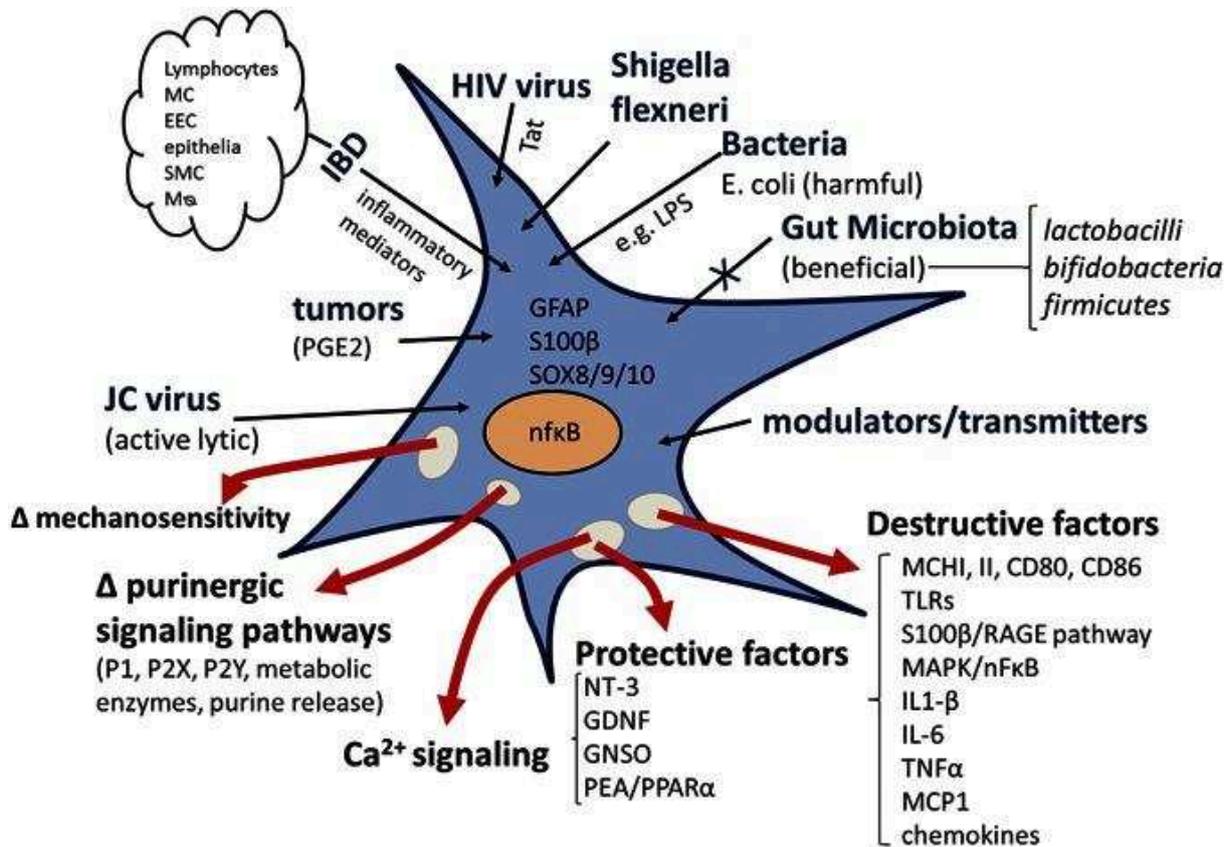


Figure 56 : Le phénotype de "glie réactive" en conditions pathologiques peut s'avérer délétère

De nombreux glio ou neurotransmetteurs peuvent activer les CGE tels que le 5-HT, l'Ach, le GABA, le glutamate, l'ATP ou encore certains lipides. De même, une infection intestinale par des bactéries ou virus et des médiateurs inflammatoires retrouvés notamment dans les MICI peuvent également induire un phénotype de glie réactive. Les CGE réactives relarguent des facteurs protecteurs tels que la neurotrophine-3 ou le GDNF, mais aussi des facteurs destructeurs comme des médiateurs pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α , MCP-1), activer la voie de transcription pro-inflammatoire NF κ B, augmenter l'expression de CMHII et activer les TLR. Certaines insultes peuvent altérer la mécanosensitivité des CGE ainsi que leur signalisation calcique et purinergique. (Ochoa-Cortes et al., 2016)

Considérer la Maladie de Crohn comme une gliopathie ?

Différentes études ont permis de mettre en évidence des changements phénotypiques et fonctionnels des CGE au cours des MICI. Chez ces patients on retrouve une hyperplasie et une hypertrophie des CGE, ainsi qu'une augmentation de l'expression des marqueurs gliaux GFAP et S100 β en zones inflammatoires (Cornet et al., 2001 ; Geboes and Collins, 1998 ; Villanacci et al., 2008). A l'inverse, une diminution de l'expression de ces marqueurs est retrouvée en zones non

inflammatoires chez les patients MC. Parallèlement, une augmentation de la production de GDNF est retrouvée en zones enflammées, mais on retrouve une diminution en zones non enflammées (von Boyen et al., 2011). Ces données suggèrent une activation des CGE dans le contexte des MICI vers un phénotype de glie réactive, mais il reste encore à déterminer si c'est une réactivité modérée avec un effet bénéfique ou plutôt un phénotype de glie cicatricielle néfaste. De plus, la diminution de l'expression des marqueurs/facteurs gliaux en zones saines a été interprétée comme une perte gliale, mais on ne sait pas s'il s'agit réellement de cela ou d'une dédifférenciation de la glie.

Les altérations de la BEI observées au cours des MICI, notamment l'augmentation de perméabilité, pourraient être expliquées par des altérations fonctionnelles et/ou une altération du nombre de CGE qui ne seraient alors plus capables de réguler les propriétés de la BEI comme en conditions physiologiques. En effet, bien que les cytokines pro-inflammatoires, en particulier le TNF α et l'IFN γ , activent les CGE, elles peuvent également entraîner leur apoptose lorsqu'elles sont présentes trop longtemps (Coelho-Aguiar et al., 2015). Une comparaison avec les défauts fonctionnels observés dans des modèles d'ablation gliale appuie cette notion. Selon la sévérité de l'ablation, on observe ainsi une inflammation intestinale avec des altérations épithéliales, une neurodégénérescence voire une modification du codage neurochimique (Aubé et al., 2006 ; Bush et al., 1998 ; Cornet et al., 2001 ; Nasser et al., 2006). Deux études de notre laboratoire suggèrent tout de même un rôle dysfonctionnel des CGE, dans le cas de la MC tout du moins (Coquenlorge et al., 2016 ; Pochard et al., 2016). En effet, si les médiateurs connus pour réguler les fonctions de la BEI n'ont pas été retrouvés en quantité différente chez les patients MICI, une analyse lipidomique a mis en évidence une sous-production gliale de plusieurs eicosanoïdes (15-HETE, 18-HEPE, 15dPGI 2 et 11 β PGF 2α) chez les patients MC. Cette étude a également mis en évidence la perte de fonction des CGE dans la MC, qui étaient alors incapables de contrôler la réparation et l'étalement des CEI ou d'augmenter la résistance transépithéliale comme des CGE contrôles (Coquenlorge et al., 2016). La diminution de la production gliale de ces médiateurs par les CGE de patients MC semble concourir aux dysfonctions observées, puisque le 11 β PGF 2α augmentait la réparation et l'étalement des CEI, ainsi que la résistance épithéliale.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence une dysfonction gliale dans le contexte des MICI, et plus particulièrement dans le cas de la MC. Les CGE semblent acquérir de nouvelles propriétés semblables aux CGE réactives, mais démontrent également des changements phénotypiques et fonctionnels qui pourraient être responsables d'une altération de l'homéostasie intestinale. Ainsi, nous avons montré que les CGE de patients MC auraient plutôt un phénotype de "glie réactive défectueuse" (**Figure 57**). Contrairement à des CGE de patients contrôles, les CGE de patients MC n'étaient plus capables de réguler la perméabilité épithéliale. De même, nous avons montré que les CGE de patients MC produisaient moins de 15-HETE en comparaison aux patients contrôles. Nous disposons également de résultats non publiés démontrant que si la production de PGI 2 est diminuée dans les biopsies de patients MICI, cela pourrait être du à un défaut de production gliale puisque les CGE pathologiques produisent moins de ce médiateur lipidique en comparaison aux patients contrôles (**Figure 58**). Une altération de la production gliale de ces deux eicosanoïdes capables de réguler les fonctions de la BEI pourrait ainsi participer aux altérations épithéliales retrouvées chez ces patients et concourir à l'initiation et/ou à l'évolution de ces pathologies inflammatoires chroniques.

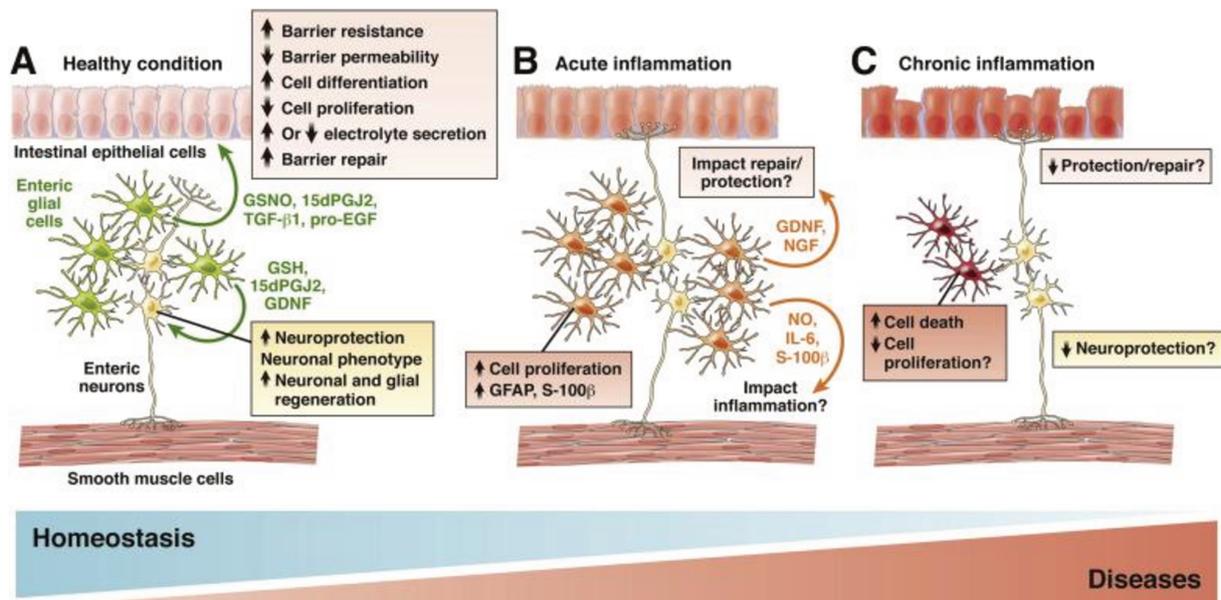


Figure 57 : Les CGE pourraient participer à la physiopathologie des MICI

(A) En conditions physiologiques, les CGE régulent l'homéostasie de la BEI via la libération de nombreux facteurs tels que le GSNO, le 15dPGJ2, le TGF- β ou encore le pro-EGF. En particulier, elles augmentent la résistance/réparation de la BEI et diminuent sa perméabilité, et régulent également la différenciation et la prolifération des CEI. Les CGE régulent aussi les fonctions neuronales comme la neuroprotection, l'expression de neuromédiateurs ou encore le renouvellement neuronal. (B) Sous l'influence de stressseurs environnementaux comme des médiateurs inflammatoires ou une stimulation bactérienne, les CGE acquièrent un phénotype de glie réactive caractérisé par une augmentation de la prolifération et de l'expression des marqueurs gliaux. Ces CGE réactives pourraient participer au développement de l'inflammation mais elles ont également un rôle dans la protection et la réparation des lésions neuronales et épithéliales. (C) Dans le cas d'une inflammation chronique, on retrouve plutôt un phénotype de "glie réactive défectueuse", avec une augmentation de la mort des CGE ou une altération de leurs fonctions qui pourraient contribuer à la dégénération neuronale et aux dysfonctions de la BEI observées par exemple dans le cas des MICI. (Neunlist et al., 2014)

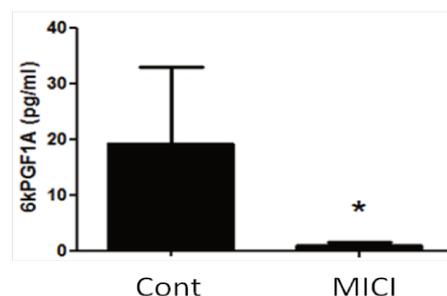


Figure 58 : Les CGE de patients MICI produisent moins de PGI2 que les patients contrôles

Discussion

Cependant, des résultats préliminaires de notre laboratoire suggèrent que les CGE de patients RCH ne présenteraient pas les mêmes altérations que les CGE de patients MC, puisqu'elles produiraient des quantités de 15-HETE similaires aux CGE contrôles. De plus, même si nous disposons de peu de patients, nos résultats laissent penser que les CGE de patients RCH seraient capables de réguler la perméabilité de la BEI comme des CGE contrôles. Ces données pourraient par exemple expliquer pourquoi dans la MC les atteintes du tube digestif sont transmurales, alors qu'elles ne touchent que la muqueuse dans la RCH. De plus, ces deux pathologies ont un profil inflammatoire différent, de type Th1 pour la MC et Th2 pour la RCH. On peut ainsi imaginer que seule une inflammation chronique de type Th1 serait capable d'induire une altération fonctionnelle des CGE.

Il est important de noter que notre travail a été réalisé sur des CGE isolées à partir du plexus myentérique, et même si aucune donnée ne nous permet d'affirmer que ces CGE seraient différentes de celles retrouvées dans le plexus sous-muqueux, nous pouvons tout de même nous poser la question d'une spécificité fonctionnelle. En particulier, comme nous nous intéressons au contrôle glial des fonctions de la BEI, il serait intéressant d'isoler les CGE du plexus sous-muqueux afin de les comparer d'un point de vue fonctionnel aux CGE du plexus myentérique. De plus, nous nous sommes concentrés sur l'impact dysfonctionnel des CGE de patients MICI sur les fonctions de la BEI, mais il serait intéressant d'étudier leur impact sur les autres composants cellulaires de leur microenvironnement tels que les neurones, les cellules endothéliales ou encore les cellules immunitaires. En particulier, il a été montré dans le cadre des MICI que les CGE pourraient participer aux réponses immunitaires et entretenir la réponse inflammatoire. Par exemple, l'expression gliale du CMHII est augmentée chez les patients MICI, faisant des CGE des cellules présentatrices d'antigènes (Geboes et al., 1992). De même, l'augmentation de l'expression de S100 β en zones enflammées chez les patients RCH conduit à l'augmentation de la production de NO qui pourrait contribuer à l'inflammation de la muqueuse (Cirillo et al., 2009). En conditions inflammatoires, les CGE sont également capables de produire des médiateurs inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 β ou la PGE2 (Murakami et al., 2009 ; Rühl et al., 2001). De façon intéressante, l'activation *in vivo* du récepteur de l'IL-1 exprimé par les CGE a été suggéré pour être responsable de la réponse inflammatoire dans un modèle murin d'iléus post-opératoire (Stoffels et al., 2014). Des souris déficientes pour les récepteurs TLR2 et 4 exprimés par les CGE présentaient également une sensibilité réduite à une colite induite au DSS (Brun et al., 2013 ; Esposito et al., 2014). Enfin, il a été montré que la production par les CGE de facteurs de la famille du GDNF contrôlait la production d'IL-22 par des cellules immunitaires particulières : les ILC3 (Innate Lymphoid Cells), des régulateurs majeurs de l'inflammation et des infections des barrières muqueuses (Ibiza et al., 2016).

On peut donc se demander si les altérations gliales observées au cours des MICI sont constitutives et sont donc le résultat d'une prédisposition (génétique par exemple), ou si c'est l'inflammation chronique qui a rendu ces CGE dysfonctionnelles. De nombreuses études suggèrent également que les CGE de patients MICI pourraient elles-mêmes participer aux réponses inflammatoires, mais il reste encore à déterminer si elles en sont à l'origine ou si c'est une réponse face à une inflammation déjà présente. Le fait que nos expériences aient été réalisées avec des CGE isolées à partir de zones non inflammatoires nous pousse tout de même à penser que les altérations gliales retrouvées chez ces patients sont constitutives et ne dépendent pas de l'environnement inflammatoire des cellules.

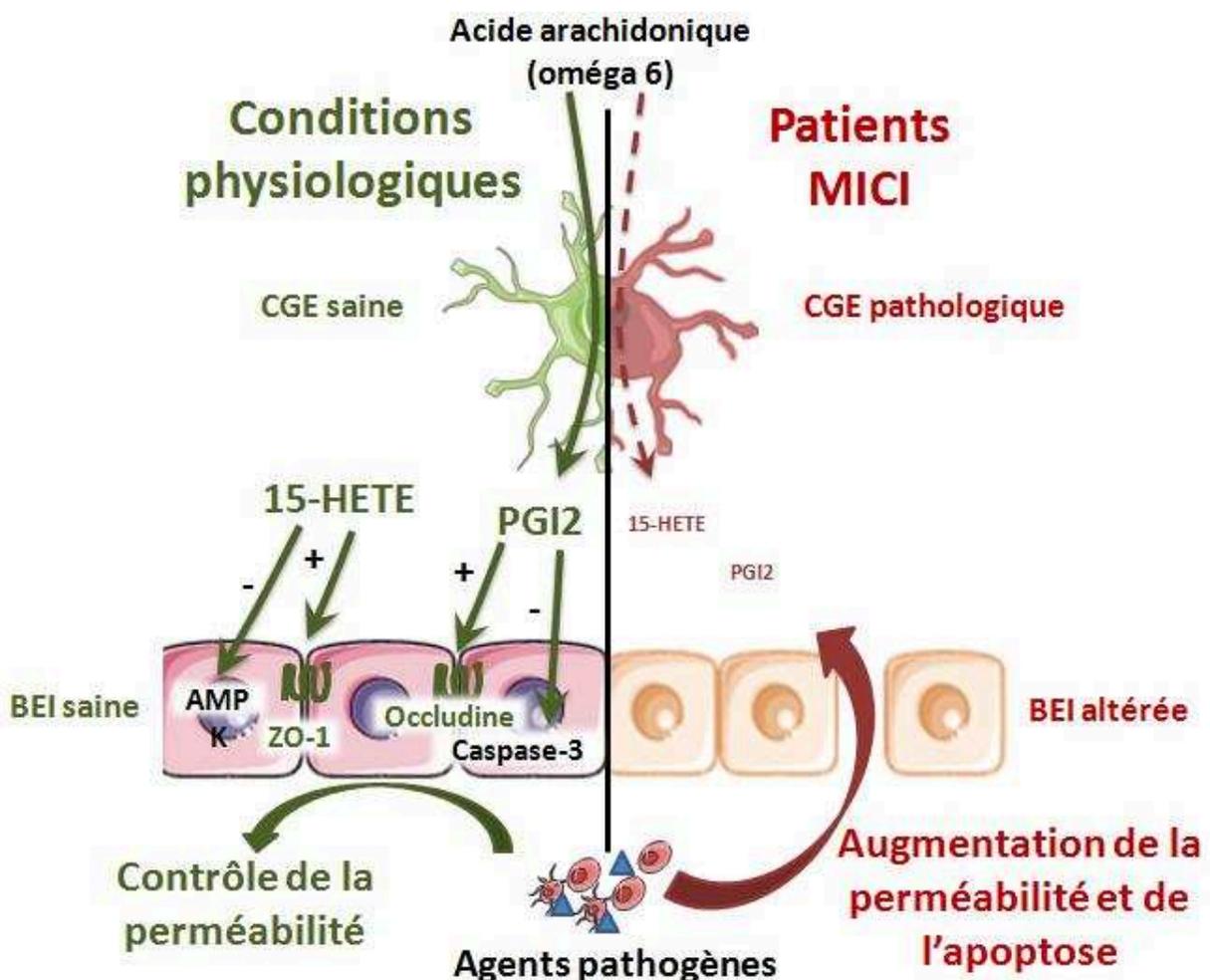
Conclusion

Nos travaux ont mis en évidence l'implication de nouveaux médiateurs dans le contrôle des propriétés de la BEI en conditions physiologiques. Ainsi, le 15-HETE diminue la perméabilité de la BEI via une augmentation de l'expression de ZO-1 et une inhibition de l'AMPK. De même, la PGI2 diminue la perméabilité via une augmentation de l'expression de l'Occludine et régule l'apoptose épithéliale en inhibant le clivage de la Caspase-3. De plus, ces médiateurs et les mécanismes qu'ils contrôlent font défaut dans les MICI. Ainsi, ces résultats nous permettent d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de renforcer la BEI dans le cas de MICI mais aussi dans les pathologies caractérisées notamment par une altération de la perméabilité épithéliale. Ces médiateurs sont des eicosanoïdes dérivés des oméga 6, et il semblerait donc logique d'imaginer qu'une supplémentation en oméga 6 pourrait permettre de moduler les propriétés de la BEI. Toutefois, l'importance d'une balance équilibrée entre oméga 3/oméga 6 pour la santé de l'organisme suggère qu'un traitement à long terme avec ces composés pourrait avoir des conséquences néfastes, sur le système cardiovasculaire par exemple. De plus, les dérivés des oméga 6 sont nombreux, leurs effets parfois opposés, et l'expression des enzymes permettant la synthèse de ces dérivés est parfois défaillante, ce qui rendrait la supplémentation en oméga 6 inopérante. Cela nous pousse plutôt à croire qu'un apport direct de ces composés serait plus efficace. Nous avons commencé à tester cette stratégie dans des modèles murins et il nous faut poursuivre cette approche dans d'autres modèles, avec une analyse plus poussée et peut-être ne pas tester qu'un seul médiateur, mais définir un cocktail de médiateurs (15-HETE + PGI2 + 11 β -PGF2 α) qui ciblerait plusieurs propriétés de la BEI. En effet l'impact de ces eicosanoïdes sur la BEI a été étudié séparément, mais in vivo la diminution de production de ces médiateurs lipidiques peut être retrouvée de façon concomitante. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet d'une supplémentation avec ces composés sur les fonctions de la BEI, en conditions physiologiques ou inflammatoires, car on peut imaginer un effet synergique comme cela a déjà été démontré pour la PGI2 et la PGE2 (Blikslager et al., 1997). L'administration d'analogues stables de ces composés par voie orale, par injections intrapéritonéales ou même coatés sur des endoprothèses pourrait ainsi constituer une approche prometteuse pour la prise en charge des patients souffrant d'altérations de la muqueuse intestinale. Il paraît par ailleurs primordial d'identifier les cibles moléculaires épithéliales impliquées dans l'effet de ces eicosanoïdes, ce qui nous permettrait d'envisager des approches thérapeutiques visant plus spécifiquement la BEI. Dans ce contexte, nous avons commencé l'étude de l'AMPK épithéliale et devons poursuivre nos recherches pour déterminer si des agents pharmacologiques modulant l'activité de l'AMPK pourraient être utilisés afin de renforcer la BEI.

Dans ce travail de thèse, nous avons également mis en évidence l'implication d'un composant majeur du SNE, les CGE, dans la physiopathologie des MICI. Le laboratoire avait déjà démontré que les CGE de patients MC produisaient moins de 11 β PGF2 α et qu'elles étaient alors incapables d'augmenter la réparation de la BEI comme des CGE contrôles (Coquenlorge et al., 2016). Mes travaux ont mis en évidence que les CGE de patients MC produisaient moins de 15-HETE et PGI2 et ne pouvaient alors plus réguler la perméabilité de la BEI, autre propriété majeure de l'homéostasie intestinale (Pochard et al., 2016 ; Pochard et al, en préparation). Ces travaux sont les premières

Conclusion

études fonctionnelles de CGE humaines et si elles ont le défaut d'être basées sur des expériences réalisées in vitro, elles ont la qualité de montrer une différence entre des CGE de patients contrôles, atteints de MC ou atteints de RCH en dehors de leur environnement pathologique. Ainsi, même si notre travail suggère que des altérations gliales pourraient concourir aux dysfonctions de la BEI observées chez ces patients et participer à l'initiation et/ou à l'évolution de ces pathologies, il reste beaucoup de questions en suspens : Est-ce l'inflammation chronique qui a modifié durablement les CGE de patients MC ? Comment réagissent les CGE in vivo à l'inflammation aigüe ou chronique ? Est-ce qu'un défaut glial en PTGIS et/ou 15-LOX-2 serait suffisant pour induire une colite ? Les CGE du plexus myentérique sont-elles comparables aux CGE de la muqueuse ou de la sous-muqueuse ? Et de manière plus large : Comment se comportent les CGE dans d'autres pathologies inflammatoires ? Comment les CGE régulent-elles les autres types cellulaires voisins ? Des progrès supplémentaires sont attendus dans un proche avenir avec le développement de techniques d'imagerie in vivo, l'optogénétique et des méthodes de traçage de lignées cellulaires pour mieux caractériser le rôle des CGE et, en particulier, déterminer si des sous-classes fonctionnellement distinctes existent. L'ère de la gliogastroentérologie ne fait que commencer !



Annexes

Annexe 1 : Maintien de la barrière intestinale : quelle contribution pour la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) dans l'épithélium intestinal ?

Dans notre étude sur le rôle du 15-HETE dans le contrôle de la perméabilité de la BEI, nous avons identifié une nouvelle cible épithéliale : l'AMPK. En effet, nous avons montré que le 15-HETE diminuait la perméabilité paracellulaire *in vitro* via une inhibition de l'AMPK. Afin de valider l'implication de cette protéine dans le maintien de l'homéostasie intestinale nous avons mis en place une collaboration avec Benoit Viollet (Institut Cochin, Paris). Ce spécialiste de l'AMPK a créé des animaux génétiquement modifiés pour pouvoir déléter les sous-unités catalytiques $\alpha 1$ ou/et $\alpha 2$ de l'AMPK dans différents tissus d'intérêt, dont l'épithélium. Cette collaboration a pour but d'étudier le rôle des deux sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de l'AMPK dans l'homéostasie de la BEI et plus particulièrement le contrôle de la perméabilité intestinale et de l'inflammation chez ces animaux, avec de plus une analyse de l'activité de l'AMPK dans des biopsies de patients MC.

Une publication de Sun et al., en mai 2017 décrivant une étude des knock-out épithéliaux d' $\alpha 1$ nous pousse à poursuivre notre analyse du double knock-out dans un contexte pathologique de MICI mais également d'obésité. Cette annexe est une ébauche de publication regroupant nos premiers résultats.

The epithelial AMP-activated protein kinase regulates intestinal permeability

Camille Pochard^{1,2}, Michel Neunlist^{1,2}, Jocelyne Leclerc^{3,4,5}, Marc Foretz^{3,4,5}, Benoit Viollet^{3,4,5} and Malvyne Rolli-Derkinderen^{1,2}

¹ UMR1235 TENS, Nantes, F-44093, France

² IMAD, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France

³ INSERM U1016, Institut Cochin, Paris, France

⁴ CNRS UMR8104, Paris, France

⁵ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris 75014, France

Abstract

The intestinal epithelial barrier (IEB) prevents passage of luminal substances and antigens through the paracellular space and rupture of its integrity is associated with a variety of gastrointestinal disorders and diseases. In particular IEB permeability is increased in inflammatory bowel disease or obesity and strengthening of the IEB has been associated with better clinical

outcomes. One of our last works has identified the AMP-activated protein kinase (AMPK) as an epithelial target of permeability regulator, but data concerning its role in the IEB regulation remain sparse. Using animal lacking the two $\alpha 1$ and $\alpha 2$ AMPK catalytic subunits in epithelial cells (AMPK $\alpha 1^{fl/fl}/\alpha 2^{fl/fl}$ -Villin-Cre) this work aims at determining the involvement of AMPK in IEB permeability control. AMPK $\alpha 1$ and $\alpha 2$ expressions were detected in the duodenum, jejunum, ileum as well as in the colon and their deletions were efficient in all intestinal segments. No differences were observed in animal weight, intestine length, total transit time or fecal weight between AMPK $\alpha 1^{fl/fl}/\alpha 2^{fl/fl}$ -Villin-Cre and wild type animals. In contrast the paracellular permeability measured *in vivo* by sulfonic acid flux was significantly increased in AMPK $\alpha 1^{fl/fl}/\alpha 2^{fl/fl}$ -Villin-Cre animals. *Ex vivo* permeability assays realized in Ussing chambers to distinguish the different intestinal segments revealed that the increased permeability only occurred at the jejunal and distal colonic levels. The transcellular permeability measured by horse-radish-peroxydase passage measurement in Ussing chambers was only increased in the distal colon of AMPK $\alpha 1^{fl/fl}/\alpha 2^{fl/fl}$ -Villin-Cre. Quantification of the junctional protein expression in these different segments revealed an increased Claudin 3 mRNA expression in the distal colon of AMPK $\alpha 1^{fl/fl}/\alpha 2^{fl/fl}$ -Villin-Cre mice, whereas ZO-1 and -2, Occludin, Claudin 1 and 2 were unchanged. The inflammatory status of the gut was also modified in these mice, as observed by an augmented tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA expression in the distal colon of AMPK $\alpha 1^{fl/fl}/\alpha 2^{fl/fl}$ -Villin-Cre mice. All together our data show that AMPK $\alpha 1$ and $\alpha 2$ are necessary to maintain the IEB homeostasis, and its defect could be involved in distal colon IEB rupture and inflammation.

Keywords : AMPK, intestinal permeability, Claudin 3, TNF- α

Introduction

The intestinal epithelial barrier (IEB) is a single-cell layer that constitutes the largest and most important barrier against the external environment. It acts as a selectively permeable barrier, permitting the absorption of nutrients, electrolytes, and water while maintaining an effective defense against intraluminal toxins, antigens, and enteric flora. Over the past decade, there has been increasing recognition of an association between disrupted IEB function and the development of autoimmune and inflammatory diseases. Increased intestinal permeability is even increasingly recognized to be an underlying pathogenic factor, not only in inflammatory bowel disease (IBD) but also in other gastrointestinal (irritable bowel syndrome) and non-gastrointestinal (allergy and type I diabetes) diseases [1]. An increase in intestinal permeability is often observed prior the relapse [2] and has been associated with ongoing symptoms (abdominal pain and altered bowel habit) in IBD patients [3]. Interestingly, if barrier disruption is not enough to induce the disease [4] reducing barrier permeability prevents the development of inflammation in a genetic model of IBD [5] and strategies of IEB restoration should be considered in the treatment of “leaky gut symptom” patients.

To develop strategies of IEB restoration, advances should be made in understanding the cellular mechanisms of intestinal barrier loss in disease. The IEB function of permeability control is primarily determined by the integrity of the epithelium and the tight junction that seals the paracellular space. The protein network composing tight junctions consists of transmembrane

proteins that interact extracellularly with adjacent cells and intracellularly with adaptor proteins that link to the cytoskeleton. Study of transgenic or knock-out models of some of them (Claudin 6, JAM-A, MLCK) have shown that they are necessary to maintain low permeability [6], and alteration of their expression (Claudin 2, Occludin) or activity (MLCK) has been observed in IBD patients [7]. We have recently shown that AMP-activated protein kinase (AMPK) inhibition is correlated with a decrease of IEB permeability [8], but the literature is controversial concerning its role in maintaining tight junctions [9].

The AMPK is an evolutionarily-conserved fuel-sensitive serine/threonine protein kinase and cellular nutrient sensor implicated in the regulation of energy homeostasis [10, 11]. Once activated, AMPK initiates metabolic changes to reprogram metabolism by inhibiting nonessential anabolic ATP-consuming process while stimulating ATP-delivering catabolic pathways. AMPK exists as a heterotrimeric complex comprising a catalytic α (2 isoforms $\alpha 1$ or $\alpha 2$ encoded by *Prkaa1* and *Prkaa2*) subunit, a scaffold β (2 isoforms $\beta 1$ or $\beta 2$ encoded by *Prkab1* and *Prkab2*) subunit and a regulatory γ (three isoforms $\gamma 1$, $\gamma 2$ or $\gamma 3$ encoded by *Prkag1*, *Prkag2* and *Prkag3*) subunit [12], which are uniquely distributed across different cell types. AMPK monitors energy balance at the cellular level by sensing intracellular AMP:ATP [13] and ADP:ATP ratios [14]. AMPK is normally only significantly active after phosphorylation of a conserved threonine residue (Thr172) within the activation loop of the kinase domain on α subunits. The upstream AMPK kinases are the tumor suppressor kinase LKB1 and the CaMKK β [15]. AMPK could be activated by pathological stimuli, such as oxidative damage, osmotic shock, hypoxia and glucose deprivation, as well as by physiological stimuli such as exercise and muscle contraction, and by hormones including leptin and adiponectin [13].

Given its key role in controlling energy homeostasis, AMPK has attracted widespread interest as a potential therapeutic target for metabolic diseases. However, recent data have expanded the paradigm of AMPK as a metabolic sensor and to the more global concept that AMPK has broad effects on cellular function. A surprising role of AMPK in the maintenance of epithelial cell barrier functions has been established and pharmacological activation of AMPK has been shown to reinforce epithelial tight junctions during adverse environmental changes. At the gut level, AMPK has already been involved in several processes, helping the enteroendocrine L-cells in their sensing role [16] and ameliorating the epithelial barrier [17, 18] through the modification of junctional protein expression [19] or phosphorylation [20, 21]. However, AMPK activation has been paradoxically linked to intestinal barrier dysfunction in chronic intestinal inflammatory conditions [9, 22] by decreasing ZO-1 expression [9]. Thus, there is evidence to suggest that, depending on context, engaging AMPK activation may exert either a positive or negative effect on IEB.

To precise the control exert by AMPK on IEB properties we will study IEB permeability, junctional protein expression and gut inflammation in animals lacking the two $\alpha 1$ and $\alpha 2$ AMPK catalytic subunits in epithelial cells (AMPK $\alpha 1^{fl/fl}/\alpha 2^{fl/fl}$ -Villin-Cre) and analyse AMPK activation in biopsies of Crohn's disease patients.

Material and Methods

Animals and measurement of in vivo parameters

The experiments were carried out on 19-22 weeks old male and female C57BL6 mice in agreement with the ethics committee for animal experimentation of Paris Descartes (referral 12-193). KO AMPK mice specifically deleted in the intestinal epithelial cells were obtained by crossing Villin-Cre mice with AMPK α 1^{fl/fl}/ α 2^{fl/fl} mice.

The total transit time corresponds to the appearance of the first red faeces after gavage of the animals with a solution containing red carmine. The number and weight of the faeces were evaluated by placing the mice in individual cages for one hour. The humidity of the faeces was estimated by comparing the faeces wet weight to the dry weight (overnight in an incubator at 37 °C). Once the animals were sacrificed, the intestines were measured and segments were frozen for molecular analysis or further use for Ussing chambers permeability measurement as describes below.

Measurement of intestinal permeability in vivo and ex vivo

The animals were gavaged with 120 μ L of gavage solution (300 mg red carmine, 50 mg sulfonic acid coupled with fluorescein - SA Thermo Fisher Scientific, 50 mg Horse Radish Peroxidase - HRP Sigma Aldrich, 5 mL solution 0.5% carboxymethylcellulose) and placed in individual cages. After one hour, blood was collected from the tail vein and plasma used for permeability measurement. The plasma fluorescence reflecting sulfonic acid passage and thereby paracellular permeability was measured with an automatic microplate reader (Varioskan, Thermo Fisher Scientific). The transepithelial permeability to HRP was also measured in plasma by an enzyme activity assay with the reagent 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, BD Bioscience).

Ex vivo paracellular permeability of intestinal segments (jejunum, ileum, proximal colon, and distal colon) was analyzed by mounting the tissues in Ussing chambers (Physiological Instruments) as described previously [23]. Each chamber contains 2 mL of Ham (HAM/F12; Invitrogen) nutrient mixture maintained at 37 °C and continuously gazed with 95% O₂ and 5% CO₂. After 30 minutes of equilibration, 200 μ L of apical medium are replaced by 200 μ L of 0.4 kD sulfonic acid coupled with fluorescein (1 mg/mL). The fluorescence level of the basolateral aliquots (150 μ L) was measured every 30 minutes over a period of 180 minutes using an automatic microplate reader (Varioskan, Thermo Fisher Scientific). Transcellular permeability was measured by calculating the activity of HRP in the basolateral medium after 3 h of Ussing.

Quantitative real-time PCR analysis

Fragments of the different intestinal segments were lysed in RA1 buffer (Machery-Nagel) and total RNA extraction was performed with the Nucleospin RNAII kit according to the manufacturer's recommendations (Machery-Nagel). One μ g of purified mRNA was denatured and retro-transcribed using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). PCR amplifications were performed using the Absolute Blue SYBR green fluorescein kit (Roche) and analyzed on the StepOnePlus system (Life Technologies). The following primers (Sigma Aldrich) were used:

- Tumor necrosis factor alpha (TNF α) # NM_013693.3

Forward Primer : 5'-GAACTTCGGGGTGATCGGTCC-3'

- Reverse Primer : 5'-GCCACTCCAGCTGCTCCTCC-3'
- Interleukin 1 beta (IL-1 β) # NM_008361.4
 - Forward Primer : 5'-GCCTCGTGCTGTGGACCCATA-3'
 - Reverse Primer : 5'-TTGAGGCCCAAGGCCACAGGT-3'
 - Interleukin 6 (IL-6) # NM_031168.2
 - Forward Primer : 5'-TCCAGTTGCCTTCTGGGAC-3'
 - Reverse Primer : 5'-AGTCTCCTCTCCGGACTTGT-3'
 - Tight junction protein 1 (ZO-1) # NM_009386.2
 - Forward Primer : 5'-AAGAATATGGTCTTCGATTGG-3'
 - Reverse Primer : 5'-ATTTTCTGTACAGTACCATTTATCTTC-3'
 - Tight junction protein 2 (ZO-2) # NM_001198985.1
 - Forward Primer : 5'-CTAGACCCCCAGAGCCCCAGAAA-3'
 - Reverse Primer : 5'-TCGCAGGAGTCCACGCATACAAG-3'
 - Occludin # NM_008756.2
 - Forward Primer : 5'-GGTTAAAAATGTGTCTGCAGGCAC-3'
 - Reverse Primer : 5'-GAGGCTGCCTGAAGTCATCCAC-3'
 - Claudin 1 # NM_016674.4
 - Forward Primer : 5'-AATTCAGGTCTGGCGACAT-3'
 - Reverse Primer : 5'-GGCCAAATTCATACCTGGCA-3'
 - Claudin 2 # NM_016675.4
 - Forward Primer : 5'-GAAAGGACGGCTCCGTTTTTC-3'
 - Reverse Primer : 5'-TCTTCGGAGCCTGTTTGCTT-3'
 - Claudin 3 # NM_009902.4
 - Forward Primer : 5'-GCCCCAGGAGAGGAGCCGTTAA-3'
 - Reverse Primer : 5'-GCCGATGAAGGCCGAAACGC-3'
 - Ribosomal protein S6 (RPS6) # NM_001010.2
 - Forward Primer : 5'-CCAAGCTTATTCAGCGTCTTGTTACTCC-3'
 - Reverse Primer : 5'-CCCTCGAGTCCTTCATTCTTGGC-3'

Western Blot

For the validation of the epithelial deletion of AMPK α 1 and α 2 in our murine model, enterocytes were extracted from the duodenum, jejunum, ileum and colon by placing the intestinal fragments under rotation on wheel in PBS containing 1.5 mM EDTA (+ anti-protease cocktail) for 30 minutes at 4 °C. The cells were then recovered by centrifugation after removal of the tissue fragment. For the expression of the tight junctions proteins, the entire fragments of intestinal segments were used. Finally, the activity of AMPK was analyzed by measuring its phosphorylation on Thr172 in biopsies of control or Crohn's disease patients in quiescent or active phase (healthy or inflamed areas).

The samples were lysed in RA1 buffer (Machery-Nagel) and the protein extraction was carried out with the Nucleospin RNAII kit according to the manufacturer's recommendations (Machery-Nagel). All samples were separated on 4-12% Bis-Tris or 3-8% Tris-Acetate gels (Life Technologies). The proteins were transferred to nitrocellulose membranes with the iBlot™ system (Life Technologies). After blocking with TBS/0.1% Tween20/5% nonfat dry milk for 30 minutes, the

blots were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies diluted in TBS/0.1% Tween20/5% nonfat dry milk : sheep anti-AMPK α 1 or α 2 (obtained from Grahame Hardie, University of Dundee, UK), mouse anti-Phospho-AMPK (Cell Signaling Technology 1: 500), mouse anti-ZO-1 (Thermo Fisher Scientific 1:), rabbit anti-Occludin (Abcam 1: 500), mouse anti-P-MLC or MLC (Cell Signaling Technology 1:200) and mouse anti- β -actin (Sigma Aldrich 1: 10000). The blots were then incubated with the appropriate secondary antibodies coupled to HRP (Life Technologies) and visualized by chemiluminescence (ECL, Bio-Rad) using the Gel-Doc imager and the Image Lab software (Bio-Rad).

Human biopsies of control and CD patients

	quiescent CD n=15	active CD n=18	control n=15
Mean age at the time of biopsy (min-max)	30 (16-55)	35 (18-52)	48 (29-59)
Sex M/F	9/6	10/8	9/6
Time course of the disease at the time of biopsy (min-max)	18 (13-28)	26 (13-48)	
History of surgical resection	1/15	3/18	
Treatment at the time of biopsy :			
5 ASA	2/15	2/18	
CT	2/15	2/18	
IS	9/15	11/18	
Anti-TNFalpha	5/15	12/18	
Anti-TNFalpha + IS	3/15	6/18	

Results

Expression of the AMPK α 1 and α 2 catalytic subunits along the gut and validation of their epithelial deletion in AMPK α 1^{fl/fl}/ α 2^{fl/fl}-Villin-Cre animals.

To analyse the expression of the α 1 and α 2 subunits in different segments of the epithelial gut we have studied their expression by Western blot after extraction of the enterocytes of the different segments. The AMPK α 1 and α 2 were detected in duodenal, jejunal, ileal and colonic fragments, with an increased AMPK α 2 expression in the colon when compared to the other fragments (**Figure 1**). In order to validate the specific deletion of the two catalytic subunits of AMPK at the epithelial level, we compared their expression in enterocytes from wild type (WT) and AMPK α 1^{fl/fl}/ α 2^{fl/fl}-Villin-Cre (KO) to expression in the liver and in skeletal muscle. Expression of the AMPK α 1 and α 2 were not anymore detected in enterocytes extracted from KO mice when compared to WT mice, except in the colon where α 1 and α 2 were still slightly present in KO, even if greatly less than in the WT animals. Their expression in liver and muscles were comparable between the two lineages allowing us to confirm a specific deletion of intestinal epithelial cells.

AMPK α 1^{fl/fl}/ α 2^{fl/fl}-Villin-Cre animals had an increased paracellular permeability.

In order to study the impact of an epithelial deletion of AMPK $\alpha 1$ and $\alpha 2$ on gut functions, different parameters were measured in WT and KO animals. The survival of the animals and their dietary intake were not impacted (**Results not shown**). No changes in animal weight, length of the intestines, total transit time, and number and weight of faeces were observed (**Figure 2A, B, C, D, E, F**). However, KO mice have shown a significant increase in paracellular permeability measured by sulfonic acid flux *in vivo* compared to WT animals (**Figure 2G**). No changes in transcellular permeability (HRP flux) were observed *in vivo* (**Figure 2H**).

Increased permeability of AMPK $\alpha 1^{fl/fl}$ / $\alpha 2^{fl/fl}$ -Villin-Cre animals mainly affected the distal colon.

To refine our analysis of gut permeability in WT and KO mice, we compared the permeability of different intestinal segments *ex vivo* using Ussing chamber. The paracellular permeability was increased in the jejunum and distal colon of KO mice when compared to WT mice, but not in the ileal or proximal colon fragments (**Figure 3A**). The transcellular permeability was comparable between WT and KO jejunum, ileum or proximal colon, but was increased in the distal colon of KO animals (**Figure 3B**).

Changes in expression of tight junction proteins did not explain the observed changes in permeability.

In order to identify the molecular mechanism behind the observed changes in permeability, we analyzed the expression of tight junction protein between our two groups of animals. Analysis of mRNA expression showed an increase in claudin 3 expression in the distal colon of KO mice (**Figure 4F**) but no other changes in the expression of ZO-1, ZO-2, Occludin, claudin 1 and claudin 2 were detected (**Figure 4A, B, C, D, E**). We also analyzed the protein expression of some of these proteins, and our results showed a decrease in the amount of ZO-1 in the ileum of KO mice (**Figure 5A**). No change in the amount of Occludin protein or MLC phosphorylation was found (**Figure 5B and C**).

The epithelial deletion of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ AMPK partially increased the inflammatory status of animals.

In order to investigate whether the increase in permeability observed in KO animals is accompanied by an increase in gut inflammation, the expressions of the messenger RNAs coding for several pro-inflammatory cytokines were analyzed. No changes in the expression of mRNAs encoding for IL-1 β or IL-6 were observed (**Figure 6A and B**). However, an increase in the amount of mRNA encoding TNF- α was found in the distal colon of KO mice when compared to WT animals (**Figure 6C**), showing that $\alpha 1$ and $\alpha 2$ AMPK deletion presented inflammation.

AMPK phosphorylation was decreased in biopsies from quiescent CD patients.

To analyze whether AMPK epithelial activity could be modulated in pathological and inflammatory condition, we have analyzed AMPK Thr172 phosphorylation in biopsies from CD patients by Western blot. AMPK phosphorylation levels were comparable between biopsies from control and active CD patients, in healthy or inflammaed area. However the AMPK phosphorylation were significantly decreased in quiescent CD patient biopsies when compared to control or active CD

patient biopsies (**Figure 7**) suggesting than more than inflammation, the CD pathological condition downregulated AMPK activity.

Discussion

This work has demonstrated that an epithelial deletion of the two catalytic subunits of AMPK directly affects intestinal homeostasis. An increase in paracellular permeability was observed in KO animals *in vivo*, without modification of the other measured parameters such as intestine length and total transit time. The increased permeability was mainly observed in the distal colon and got along with an increase in TNF- α expression. Observed changes in the expression of the tight junction proteins did not correlate with the changes in permeability showing that other mechanisms should be involved in this dysregulation. Eventually we have observed a decrease in AMPK phosphorylation in quiescent CD patient biopsies. Thus, our results suggest that AMPK participates in the control of the intestinal permeability and that its inhibition could lead to increase in permeability as well as intestinal inflammation observed in human pathological context.

If we have shown in a previous work that AMPK inhibition was correlated with a decrease of IEB permeability, and that AMPK activation by the AICA-riboside-5'-phosphate (AICAR) increased Caco-2 monolayer permeability [8], the present study suggests an opposite regulation. This demonstrate that the IEB regulation by AMPK is more complexe that what we thought, and that we have to reconsider the data produced using AMPK pharmacological activator and inhibitor, the involvement of $\alpha 1$ or 2 subunits and the regulation of IEB function by epithelial or non-epithelial AMPK. The antidiabetic drug metformin or AICAR, activators of AMPK, and the C compound (CC), inhibitor of AMPK are currently used to study AMPK, whereas they are not specific but partially selective for AMPK activity regulation. The same year, Scharl et al., published that INF- γ -activated AMPK induced Occludin and ZO-1 down regulation to increase T84 monolayer permeability using AMPK knockdown with siRNA [9] whereas they demonstrated that INF- γ -activated AMPK induced PTPN2 expression to decrease Claudin 2 expression and T84 monolayer permeability using CC [22]. Metformin has been shown to improve IEB function [24] and we have preliminary data showing that orally given merformin decrease intestinal permeability and more particularly jenual permeability (data not shown), but whether this effect involves the AMPK remains to be determined. In the same manner whether metformin effects depend on epithelial or non epithelial AMPK activation should be tested using tissue specific knock-out animals. For exemple Xue et al. used IL-10 knock-out mice to demonstrate the beneficial effect of metformin, but they do not show if this effect depends on the AMPK expressed on macrophages that invade the intestinal mucosa [24]. Using AMPK $\alpha 1$ epithelial specific knock-out mice combined with *in vitro* use of AICAR on intestinal epithelial cells, the recent study of Sun et al., has elegantly shown that epithelial AMPK could decrease IEB permeability by improving epithelial differentiation [25]. Our present study confirms this work showing that epithelial AMPK knock-out animals present an increase in epithelial permeability. It also raises the question of $\alpha 2$ involment in this regulation as double $\alpha 1$ and $\alpha 2$ knock-out as well as single $\alpha 1$ knock-out shown an increase in permeability of around 50%. Whereas in retinal pigmented epithelial it has been shown that the $\alpha 2$ but not he $\alpha 1$ AMPK catalytic subunit was responsible for

retinal epithelial permeability [26], we could wonder whether at the intestinal epithelial level, $\alpha 2$ poorly control permeability or inversely can increase it in some other pathological conditions.

Concerning the molecular mechanisms laying downstream of AMPK and responsible of epithelial cell control, scattered data is currently available. AMPK is involved in the establishment and maintenance of intestinal polarity and in the localization of glucose carriers [27] and in intestinal epithelial differentiation through Cdx2 expression regulation [25]. The permeability regulated by AMPK has mostly been described to depend on the assembly and localization of the tight junction protein ZO-1 in renal epithelial cells [28, 29] or on ZO-1, Occludin or Claudin 2 or 5 expression in epithelial or endothelial cells [8, 9, 22, 30]. We have shown an increase in the expression of the mRNA encoding Claudin 3 in the distal colon and a decrease in the ZO-1 protein expression in the ileum of the KO AMPK mice. But AMPK could also induce Claudin 4 phosphorylation and membrane location [31] and a substrate fishing work has identified ZO-2 and Cingulin as potential substrate for AMPK [20]. The precise molecular mechanisms responsible for AMPK dependent permeability control in mice or human intestinal epithelium, in healthy or pathological conditions remain to be studied.

Another interesting finding was that KO AMPK animals exhibited an increase in TNF α expression at the distal colon level, but we could wonder whether this is a direct effect of the deletion or a consequence of the increased permeability. Indeed it has been shown in a colitis model that the increase in intestinal permeability preceded the development of Inflammation [5]. This association of AMPK inhibition concomitant to inflammation could be compared to obesity where the AMPK inhibition and low-grade intestinal and systemic inflammation are observed [32]. It is also interesting to note that our first results concerning AMPK in IBD is a decreased AMPK phosphorylation in biopsies from quiescent CD patients compared to biopsies from control or active CD patients, and the absence of difference between healthy and inflamed area. As AMPK could also be activated by stressors and inflammation [9], we would have expected an increase in AMPK phosphorylation in active and/or inflamed area. But more interestingly, the decrease of AMPK phosphorylation observed in biopsies from quiescent CD patients questions about AMPK inhibition role in CD pathogenesis. AMPK pathway activity (more than only AMPK phosphorylation), the cell type presenting phosphorylated/dephosphorylated AMPK in human biopsies and the analysis of AMPK KO reaction to colitis induction must be studied before any further conclusion.

More broadly we could wonder whether intestinal AMPK is involved in gastrointestinal symptoms observed in low grade inflammatory diseases such as type 2 diabetes or obesity where an increased permeability is observed and AMPK deregulation involved. It has been shown, for example, that in obese or type 2 diabetic patients or rats fed with a high-fat diet, AMPK activity is decreased in skeletal muscle [33, 34]. Thus, inhibition of AMPK may contribute to the pathophysiological mechanisms of these diseases, and therapeutic strategies to activate AMPK thus seem promising. Indeed, it has been shown that the beneficial effects of physical exercise were partly due to the activation of AMPK, which increases the recapture of glucose and fatty acids by the muscles and decreases their production by the liver [35]. Metformin, another AMPK activator, has also demonstrated its clinically beneficial effect in the treatment of patients with type 2 diabetes [35, 36]. In this study, our experiments were carried out on animals fed with standard diet, but it would of course be interesting to study the effect of an intestinal epithelial deletion of AMPK in animals fed with a fat diet in order to analyze its impact on the development of obesity and the resulting metabolic disorders.

Our work shows that intestinal epithelial deletion of the two subunits of AMPK appears to be associated with an alteration of the IEB, observed by an increase in the intestinal permeability itself associated with an increase in intestinal inflammation. The activity of AMPK seems to be decreased in CD pathological conditions as it is in obesity or type 2 diabetes, diseases with alterations of the epithelial barrier functions. Thus, AMPK could represent a target of interest to improve intestinal health.

References

- 1 Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;**11**:1075-83.
- 2 Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, *et al.* Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 1993;**341**:1437-9.
- 3 Chang J, Leong RW, Wasinger V, *et al.* Impaired Intestinal Permeability Contributes to Ongoing Bowel Symptoms in Patients With Inflammatory Bowel Disease and Mucosal Healing. *Gastroenterology* 2017.
- 4 Su L, Shen L, Clayburgh DR, *et al.* Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology* 2009;**136**:551-63.
- 5 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.
- 6 Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2009;**124**:3-20; quiz 1-2.
- 7 Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews Immunology* 2009;**9**:799-809.
- 8 Pochard C, Coquenlorge S, Jaulin J, *et al.* Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells from Patients With Crohn's disease. *Gastroenterology* 2016.
- 9 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.
- 10 Kahn BB, Alquier T, Carling D, *et al.* AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell metabolism* 2005;**1**:15-25.
- 11 Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, *et al.* The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science (New York, NY)* 2005;**310**:1642-6.
- 12 Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, *et al.* AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochemical Society transactions* 2003;**31**:162-8.
- 13 Hardie DG, Scott JW, Pan DA, *et al.* Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS letters* 2003;**546**:113-20.
- 14 Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, *et al.* Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 2011;**472**:230-3.
- 15 Carling D, Sanders MJ, Woods A. The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *International journal of obesity (2005)* 2008;**32 Suppl 4**:S55-9.
- 16 Sayers SR, Reimann F, Gribble FM, *et al.* Proglucagon Promoter Cre-Mediated AMPK Deletion in Mice Increases Circulating GLP-1 Levels and Oral Glucose Tolerance. *PLoS one* 2016;**11**:e0149549.
- 17 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.

- 18 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.
- 19 Wang B, Wu Z, Ji Y, *et al.* L-Glutamine Enhances Tight Junction Integrity by Activating CaMK Kinase 2-AMP-Activated Protein Kinase Signaling in Intestinal Porcine Epithelial Cells. *The Journal of nutrition* 2016;**146**:501-8.
- 20 Ducommun S, Deak M, Sumpton D, *et al.* Motif affinity and mass spectrometry proteomic approach for the discovery of cellular AMPK targets: identification of mitochondrial fission factor as a new AMPK substrate. *Cellular signalling* 2015;**27**:978-88.
- 21 Yano T, Matsui T, Tamura A, *et al.* The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *The Journal of cell biology* 2013;**203**:605-14.
- 22 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.
- 23 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.
- 24 Xue Y, Zhang H, Sun X, *et al.* Metformin Improves Ileal Epithelial Barrier Function in Interleukin-10 Deficient Mice. *PloS one* 2016;**11**:e0168670.
- 25 Sun X, Yang Q, Rogers CJ, *et al.* AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression. *Cell death and differentiation* 2017.
- 26 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.
- 27 Walker J, Jijon HB, Diaz H, *et al.* 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) enhances GLUT2-dependent jejunal glucose transport: a possible role for AMPK. *The Biochemical journal* 2005;**385**:485-91.
- 28 Zhang L, Jouret F, Rinehart J, *et al.* AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) inhibition induce Ca²⁺-independent deposition of tight junction components at the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 2011;**286**:16879-90.
- 29 Zhang L, Li J, Young LH, *et al.* AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;**103**:17272-7.
- 30 Zhao Z, Hu J, Gao X, *et al.* Activation of AMPK attenuates lipopolysaccharide-impaired integrity and function of blood-brain barrier in human brain microvascular endothelial cells. *Experimental and molecular pathology* 2014;**97**:386-92.
- 31 Xiang RL, Mei M, Cong X, *et al.* Claudin-4 is required for AMPK-modulated paracellular permeability in submandibular gland cells. *Journal of molecular cell biology* 2014;**6**:486-97.
- 32 Verdam FJ, Fuentes S, de Jonge C, *et al.* Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity (Silver Spring, Md)* 2013;**21**:E607-15.
- 33 Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, *et al.* Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects. *Diabetes* 2006;**55**:2277-85.
- 34 Liu Y, Wan Q, Guan Q, *et al.* High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPKa in rats' skeletal muscle. *Biochemical and biophysical research communications* 2006;**339**:701-7.
- 35 Hardie DG. AMP-activated protein kinase: a master switch in glucose and lipid metabolism. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2004;**5**:119-25.
- 36 Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, *et al.* The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes* 2002;**51**:2420-5.

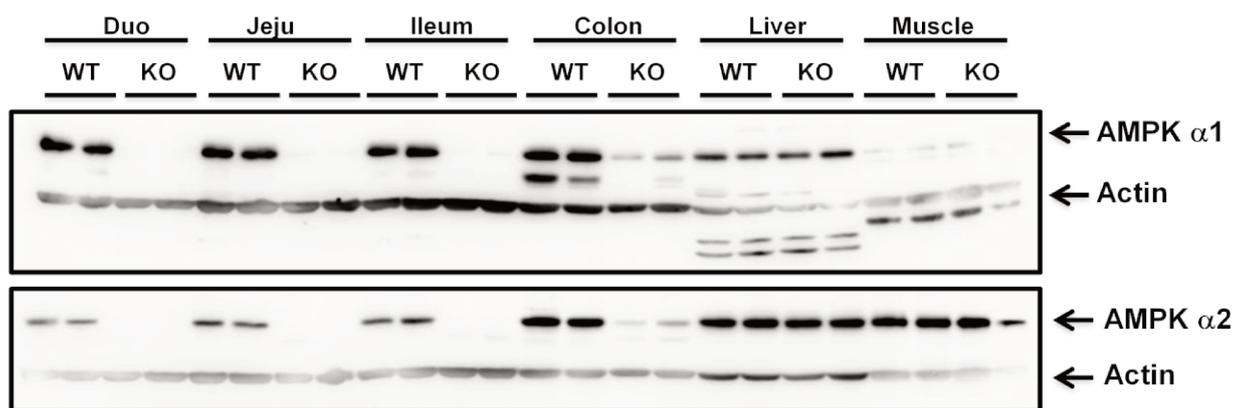


Figure 1: Characterization of epithelial deletion model of AMPK α1 and α2

Expression of the catalytic subunits of AMPK α1 and α2 in control mice (WT) or deleted for AMPK specifically at the epithelial level (KO). Representative Western blot of protein lysates from enterocytes (Duodenum, jejunum, ileum, colon), liver or muscle.

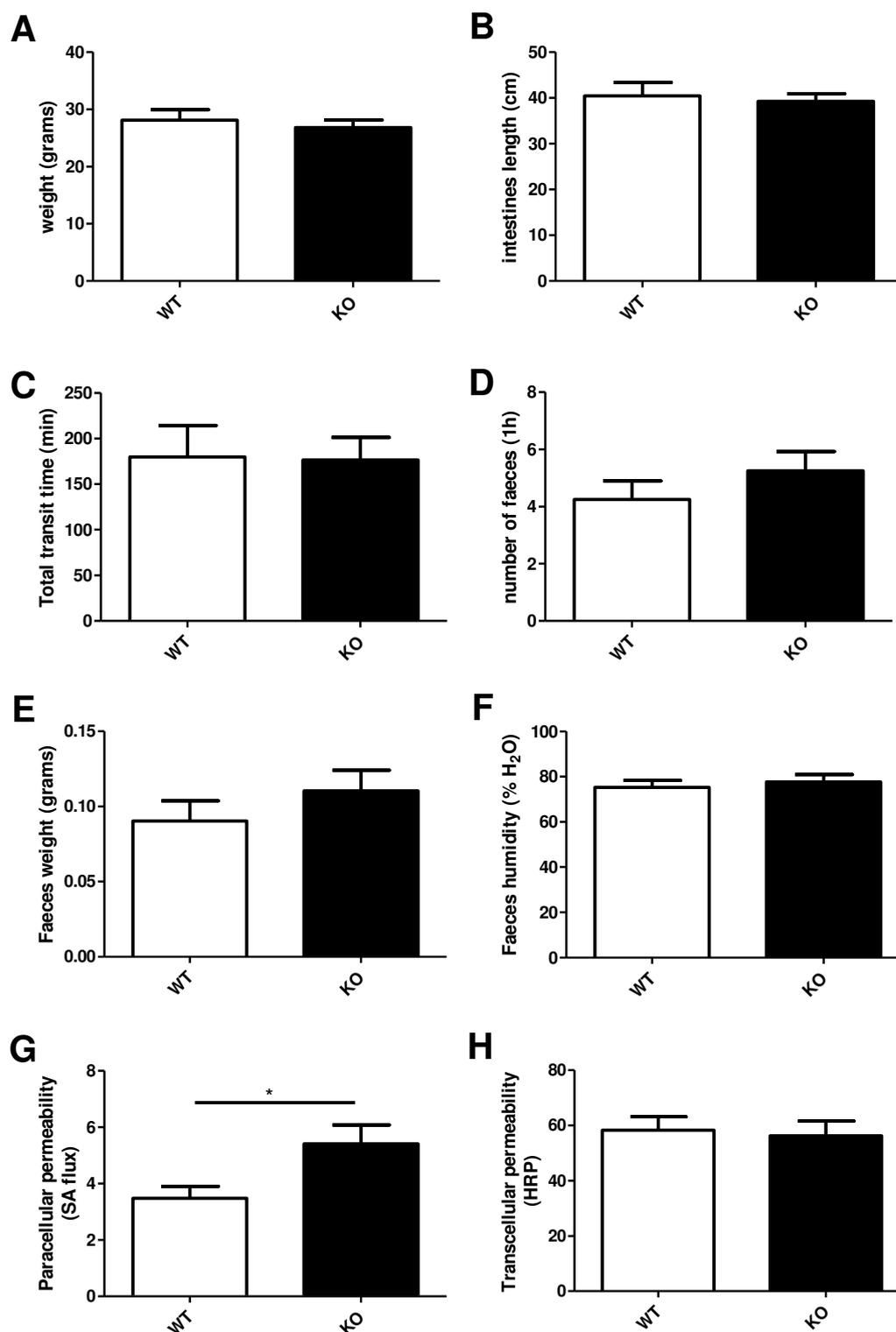


Figure 2: Epithelial deletion of AMPK increases paracellular permeability *in vivo*

The impact of epithelial deletion of the two AMPK subunits on different parameters was measured both *in vivo* and *ex vivo* in KO AMPK animals compared to WT. (A) Weight in grams, (B) intestines length in centimeters, (C) total transit time in minutes, (D) number of faeces in one hour, (E) faeces weight in grams, (F) faeces humidity in water percentage, (G) paracellular permeability evaluated by measuring the amount of sulfonic acid in the plasma one hour after gavage of the mice and (H) transcellular permeability evaluated by measuring the activity of HRP in this same plasma. Data represent means +/- SEM of 6 to 8 mice per group. * P < 0.05 non-parametric Mann-Whitney test.

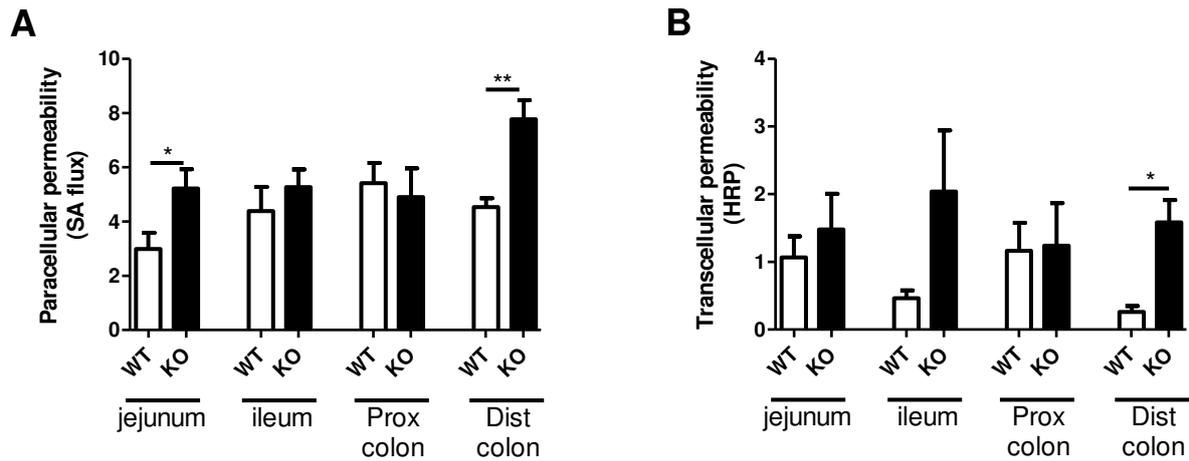


Figure 3: Epithelial deletion of AMPK increases paracellular permeability *ex vivo*

The para and transcellular permeability of intestinal segments (jejunum, ileum, proximal colon, and distal colon) was evaluated *ex vivo*. **(A)** Paracellular permeability measured by calculating sulfonic acid flux through pieces of intestinal segments in Ussing chamber. **(B)** Transcellular permeability measured by calculating the activity of HRP in the basolateral medium after 3 h of Ussing. Data represent means \pm SEM of 8 mice per group. * $P < 0.05$ non-parametric Mann-Whitney test.

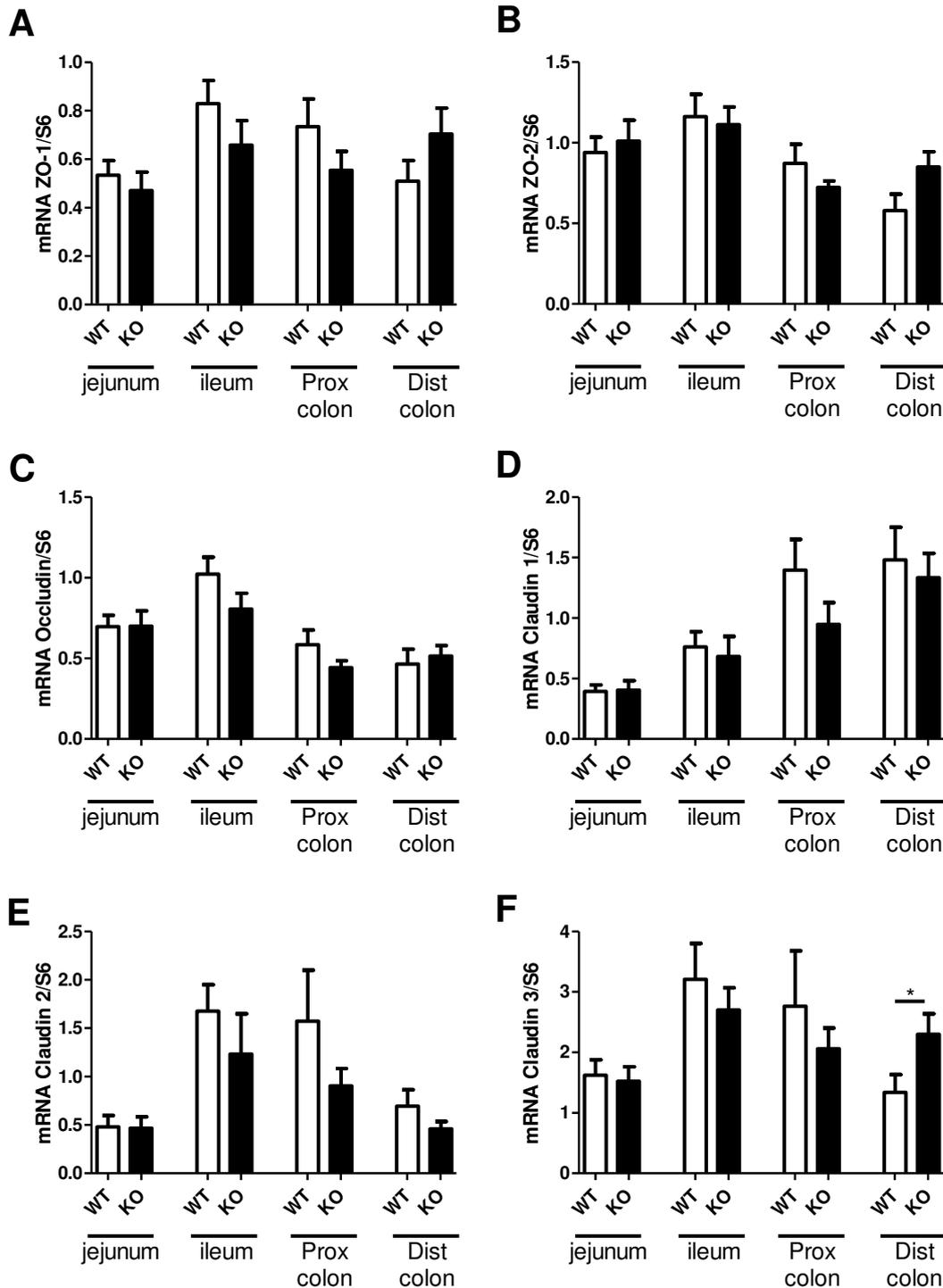


Figure 4: Epithelial deletion of AMPK modifies the mRNA expression of the tight junctions proteins

The expression of ZO-1 (A), ZO-2 (B), Occludin (C), Claudin 1 (D), Claudin 2 (E) and Claudin 3 (F) messenger RNAs was measured in different intestinal segments of WT mice compared to the KO AMPK mice by qPCR. Data represent means \pm SEM of 8 mice per group. * $P < 0.05$ non-parametric Mann-Whitney test.

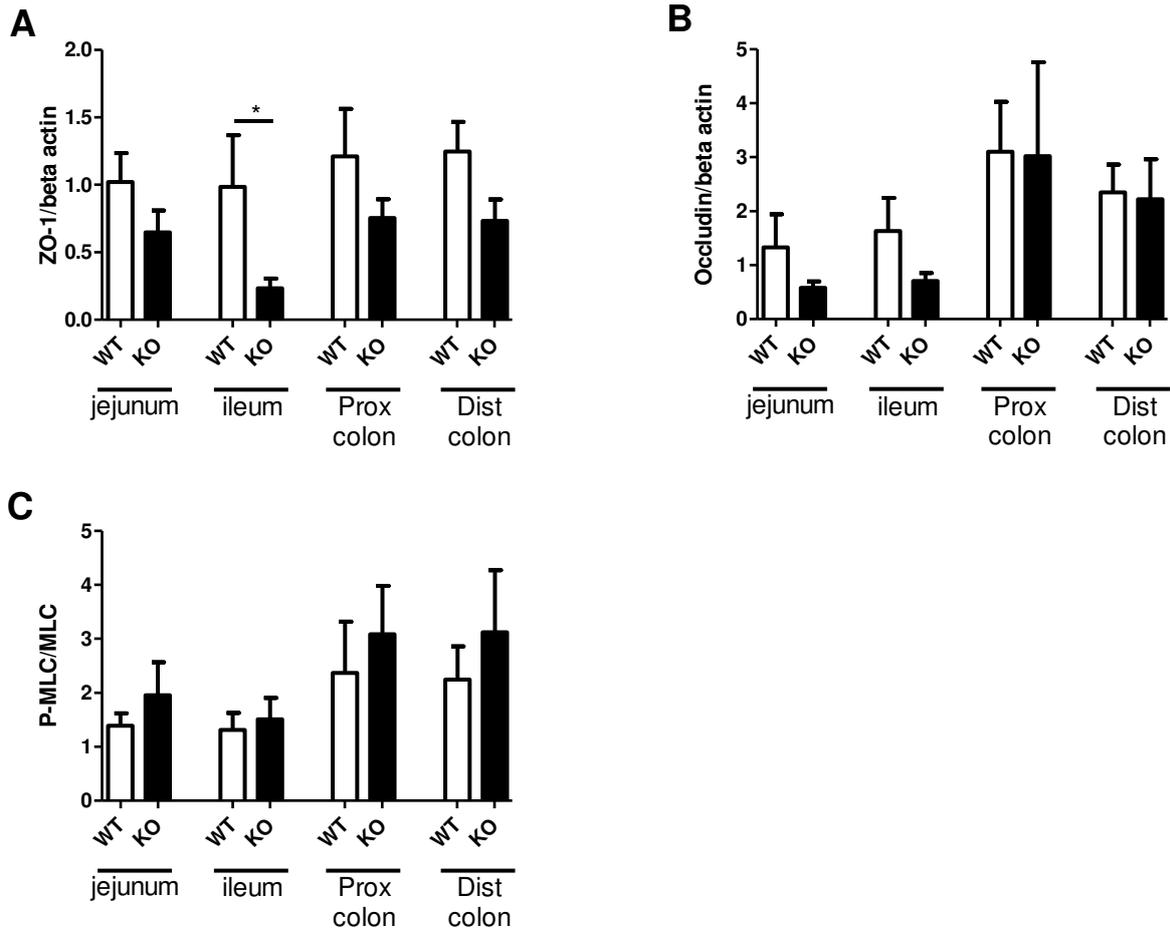


Figure 5: Epithelial deletion of AMPK modifies the protein expression of the tight junctions proteins

Protein expression of ZO-1 (A) and Occludin (B) as well as the phosphorylation levels of MLC (C) was measured in different intestinal segments of WT mice compared to AMPK KO mice by Western Blot. Data represent means +/- SEM of 8 mice per group. * P < 0.05 non-parametric Mann-Whitney test.

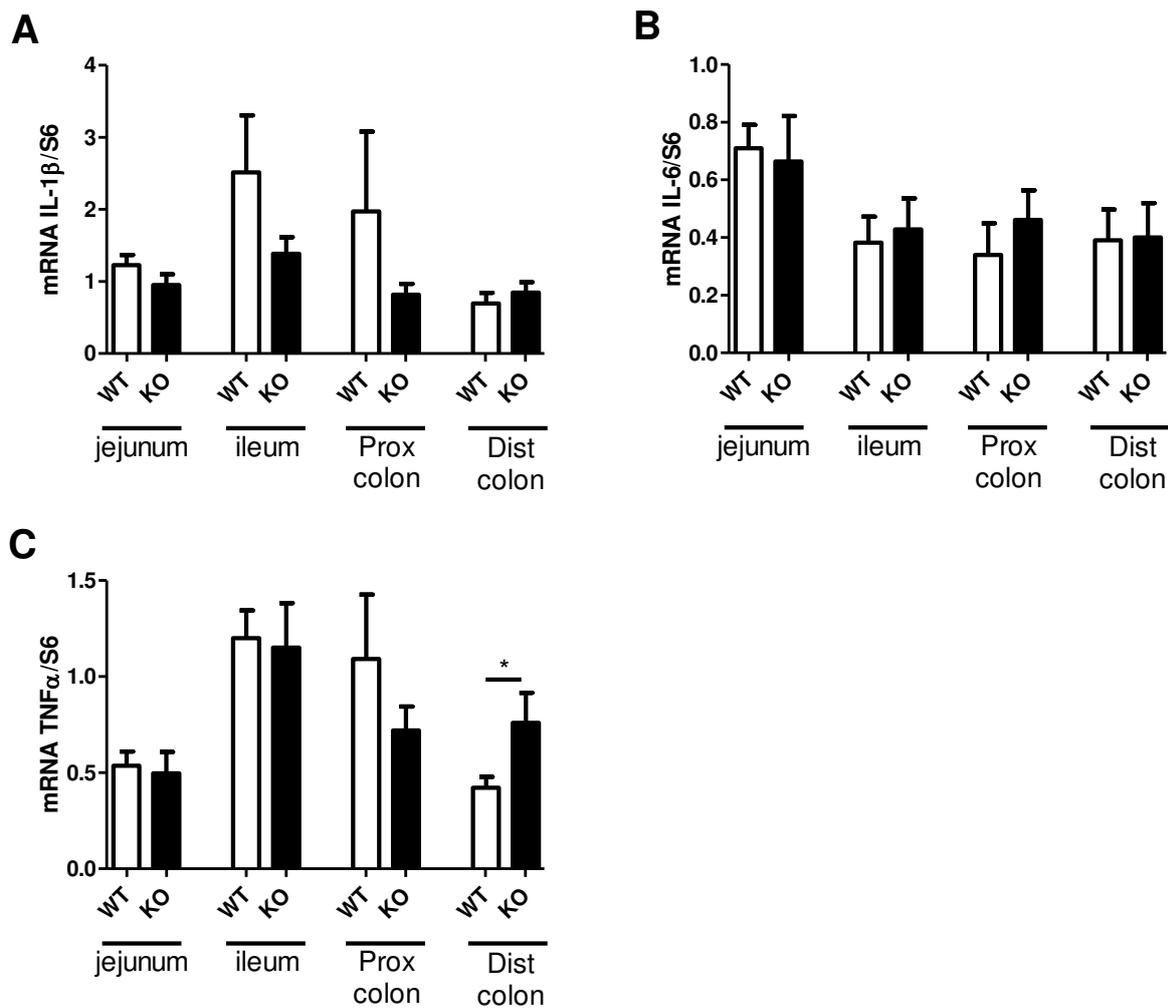


Figure 6: Epithelial deletion of AMPK increases the inflammatory status of animals

The expression of messenger RNAs encoding IL-1 β (A), IL-6 (B) and TNF α (C) was measured in different intestinal segments of WT mice compared to the KO AMPK mice by qPCR. Data represent means \pm SEM of 8 mice per group. * P < 0.05 non-parametric Mann-Whitney test.

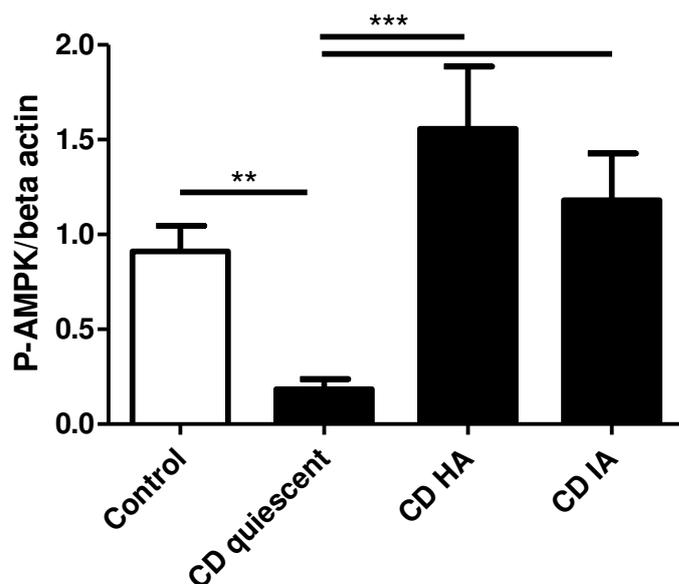


Figure 7: AMPK phosphorylation is decreased in biopsies from quiescent CD patients

AMPK phosphorylation level was measured in biopsies from control or CD patients with quiescent or active disease in healthy (HA) or inflamed (IA) area by Western Blot. Data represent means \pm SEM of 15 control, 15 quiescent CD, 18 active CD (HA and IA) patients. * $P < 0.05$ non-parametric Kruskal-Wallis test.

Annexe 2 : La cyclooxygénase 2 est augmentée dans le tractus gastrointestinal dans la maladie de Parkinson

Dans le but d'étudier l'expression intestinale d'eicosanoïdes dans la maladie de Parkinson, une autre pathologie qui atteint également le tube digestif, nous avons analysé l'expression de différentes enzymes de synthèse de la voie des eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique. Nos résultats, discutés dans la lettre qui suit, démontrent une modification de l'expression de COX-2 chez les parkinsoniens qui pourrait contribuer à la neuroinflammation retrouvée chez ces patients.

Ce papier a été soumis à *Movements Disorders* en Septembre 2017.

Cyclooxygenase 2 is upregulated in the gastrointestinal tract in Parkinson's disease

Journal:	<i>Movement Disorders</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Letters: New Observations
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Pochard, Camille Leclair-Visonneau, Laurène; CHU Nantes, Physiology Coron, Emmanuel; Inserm U1235 Neunlist, Michel; Inserm U1235 Rolli-Derkinderen, Malvyne; Inserm U1235 Derkinderen, Pascal; Inserm U1235
Keywords:	Parkinson's disease; Cyclooxygenase 2; colon; enteric nervous system; inflammation.

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review

Movement Disorders

Cyclooxygenase 2 is upregulated in the gastrointestinal tract in Parkinson's disease

Camille Pochard, MSc^{a,b,c}, Laurène Leclair-Visonneau, MD^{a,b,d}, Emmanuel Coron, MD, PhD^{a,b,c,d}, Michel Neunlist, PhD^{a,b,c}, Malvyne Rolli-Derkinderen, PhD^{a,b,c} and Pascal Derkinderen, MD, PhD^{a,b,d,e}

^aInserm, U1235, Nantes, F-44035, France

^bUniversity Nantes, Nantes, F-44035, France

^cCHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, F-44093, France

^dInserm, CIC-04, Nantes, F-44093, France

^eCHU Nantes, Department of Neurology, Nantes, F-44093, France

Corresponding author:

Pascal Derkinderen, Inserm U1235, 1 place Gaston Veil, 44035 Nantes, France. Tel: 0033(0)240165202; Fax: 0033(0)240165203; E-mail: derkinderenp@yahoo.fr; pascal.derkinderen@chu-nantes.fr

Keywords: Parkinson's disease; Cyclooxygenase 2; colon; enteric nervous system; inflammation.

Running head title: Enteric cyclooxygenase in PD

Manuscript: 483 words; **Title:** 84 characters; 1 figure; 6 references

Movement Disorders

Since its discovery in the early 1990s, cyclooxygenase-2 (COX-2) has emerged as a major player in inflammatory reactions in neurodegenerative disorders and especially in Parkinson's disease (PD). COX-2 is up-regulated in dopaminergic neurons of the *substantia nigra* in both PD patients and experimental parkinsonism.¹ Furthermore, non-steroidal anti-inflammatory drugs that inhibit COX-2 activity protect against dopamine degeneration in animal models of PD.² It is now well established that PD is not only a neurodegenerative condition of the central nervous system but also a disorder of the gastrointestinal (GI) tract. In line with these observations, we have recently shown that similarly to the brain, the main pro-inflammatory cytokines were up regulated in the colon of PD patients.³ In the current study, we propose to extend these results by determining if COX-2 is also upregulated in the GI tract in PD.

A total of 28 subjects participated in this study, 13 PD patients (mean age \pm standard deviation: 60 ± 7 years) and 15 healthy controls (56.4 ± 13 years). Controls were healthy subjects who had a normal colonoscopy for colorectal cancer screening. None of the patients or controls received any corticosteroid and/or nonsteroidal anti-inflammatory treatment six months prior to enrollment. The study protocol was approved by the local Committee on Ethics and Human Research (*Comité de Protection des Personnes Ouest VI*), and registered on ClinicalTrials.gov (identifier NCT01353183). Written informed consent was obtained from each patient and from each normal volunteer before the endoscopic procedure. Two GI biopsies per subjects were taken at the junction between the sigmoid and descending colon during the course of a rectosigmoidoscopy for PD patients and colonoscopy for controls. Total RNA and protein were isolated from the two-pooled biopsies using the NucleoSpin Triprep Kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). RT-PCR and Western Blot analyses were performed as previously described.^{3,4} For primers and antibodies details, see supplementary file 1.

A significant 3.4-fold increase in the expression levels of COX-2 mRNA was observed in biopsies from PD patients when compared to control subjects (Figure 1A). In contrast no significant change in the expression level of COX-1 was observed ($p=0.20$; Figure 1A). The results were confirmed at the protein level (Figure 1B).

The current findings extend our prior results³ and demonstrate that GI inflammation occurs in PD patients. They support a growing body of research that suggests the participation of a neuroinflammatory process in PD pathogenesis, involving

Movement Disorders

not only the central nervous system but also the peripheral autonomic networks along the so-called gut-brain axis.⁵ In large prospective studies, the use of ibuprofen, a potent COX-2 inhibitor was associated with a lower risk of future PD.⁶ The most common explanation for these effects is that ibuprofen-induced COX-2 inhibition may mitigate the progression of neurodegeneration through diminishing the production of toxic free radicals in the brain.² Our results may suggest that the possible protective effects of ibuprofen in PD are not limited to the central nervous system but also involve the GI tract.

References

1. Teismann P, Tieu K, Choi D-K, et al. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:5473–5478.
2. Hirsch EC, Vyas S, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 2012;**18** Suppl 1:S210–S212.
3. Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, et al. Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2013;**50**:42–48.
4. Clairembault T, Kamphuis W, Leclair-Visonneau L, et al. Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J Neurochem* 2014;**130**:805–815.
5. Houser MC, Tansey MG. The gut-brain axis: is intestinal inflammation a silent driver of Parkinson's disease pathogenesis? *npj Parkinson's Disease* 2017;**3**:3.
6. Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol* 2016;**15**:1257–1272.

Legend to figure

Figure 1: Expression of COX-2 in colonic biopsies from PD patients and controls. Total RNA and proteins were isolated from colonic biopsies (2 pooled-biopsies per subject) of 13 PD patients and 15 control subjects. **(A)** The mRNA expression levels of COX-2 and COX-1 were determined by real-time PCR. A significant increase in the expression levels of COX-2 but not of COX-1 was observed in colonic biopsies from PD patients when compared to controls **(B)** Protein extracts were subjected to immunoblot analysis using antibodies against COX-2 and β -actin. The optical densities of COX-2 immunoreactive band was measured, normalized to the optical densities of β -actin in

Movement Disorders

the same samples, and expressed as percentages of controls. Data correspond to mean±SEM. Patients versus control, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ non-parametric Mann-Whitney test.

Relevant conflict of interests/financial disclosures

Nothing to report

Author's contribution

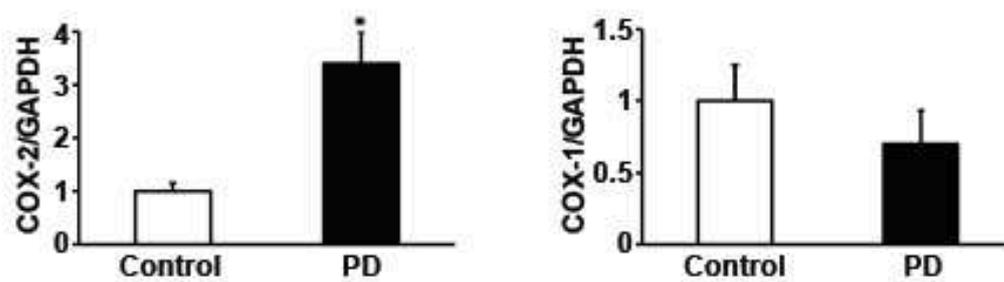
(1) Research Project: A. Conception, B. Organization, C. Execution; (2) Statistical Analysis: A. Design, B. Execution, C. Review and Critique; (3) Manuscript Preparation: A. Writing of the First Draft, B. Review and Critique. CP: 1B, 1C, 2B, 3B; LLV: 1B, 1C, 2C, 3B; EC: 1A, 2B, 3B; MN: 1A, 3B; MRD: 1A, 1B, 2C, 3B; PD: 1A, 1B, 2C, 3A

Acknowledgements

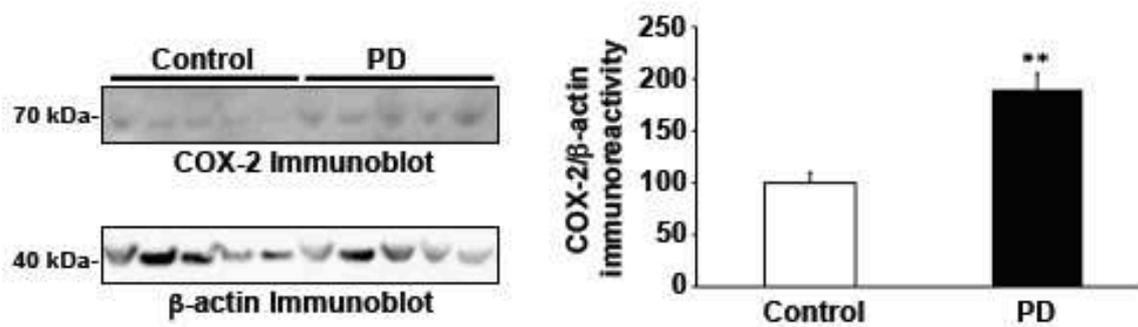
This work was supported by a grant from France Parkinson. Work in Michel Neunlist's lab is supported by CECAP (Comité d'Entente et de Coordination des Associations de Parkinsoniens), ADPLA (Association des Parkinsoniens de Loire Atlantique), FFPG (Fédération française des groupements parkinsoniens) and Parkinsoniens de Vendée.

Figure 1

A



B



Annexe 3 : Revue "Définir la Maladie de Crohn comme une gliopathie ?"

Defining Crohn's disease as a gliopathy ?

Camille Pochard,¹²³ Marie Freyssinet,¹²³ Arnaud Bourreille,¹²³ Michel Neunlist¹²³ and Malvyne Rolli-Derkinderen¹²³ .

1 INSERM, UMR1235 TENS, Nantes, F-44093, France.

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

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

Abstract

Far far away is the time where enteric glial cells (EGC) were only considered as satellites of enteric neurons. EGC undoubtedly contribute to neuroprotection and neuron regulation, but similar to their central counterpart astrocytes, compelling data indicate that enteric glia may in fact correspond to different cell sub-populations with several distinct functions upon their neighboring cells. To sense their environment such as nutrients or neuromediators, EGC express various receptors of a wide range of ligands. They produce different soluble factors and regulate nearby cells that are neurons, smooth muscle, immune and intestinal epithelial cells. Better understanding EGC response to an inflammatory environment is of particular interest in inflammatory bowel diseases (IBD) that are Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Indeed in IBD EGC exhibit abnormal phenotype and their neighboring cells are dysfunctional. In particular one of their favorite crosstalk partners, the intestinal epithelial cells have lost their abilities to constitute an efficient intestinal barrier. However whether EGC are naïve bystanders or active players of IBD etiology remains to be demonstrated. In the same manner whether CD EGC are comparable to UC EGC should be considered. Here we review existing evidence on EGC reactivity during inflammation and EGC putative dysfunction and difference in CD and UC.

Introduction

The inflammatory bowel diseases (IBD) that encompass both ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are complex chronic inflammatory disorders of largely unknown cause in a genetically predisposed host. The incidence of these diseases varies between different countries but overall has increased greatly in recent years and IBD is now a major public health problem that affects approximately 3.6 million people in the United States and Europe (1).

IBD is characterized by chronic or relapsing immune activation and inflammation within the gastrointestinal (GI) tract that severely alters GI function. In CD all layers of the gut can be involved, and normal healthy gut may be found between sections of diseased bowel. In contrast, UC causes inflammation and ulcers in the top layer lining the large intestine. Despite these differences, common

IBD symptoms are alterations in gut function that accompany the inflammation and give rise to bleeding, severe diarrhea, cramping (+/-abdominal pain), fever, and weight loss. In CD as well as UC, inflammation of the gut is incidental to breakdown of intestinal barrier function, abnormal secretion, changes in the patterns of motility, and visceral sensation that all together contribute to symptom generation. They are associated with an increased risk of developing colorectal cancer, with a cumulative probability of about 18% for UC patients and 8% in Crohn patients, after 30 years of disease (2).

The etiologies of IBD have not been fully elucidated. However, there are compelling evidences suggesting that (i) T cell and T cell trafficking to the gut and its associated lymphoid tissues are important components in disease pathogenesis (3) (ii) the intestinal bacteria are critical for the onset of IBD and (iii) genetic factors play an important role in susceptibility to the disease. Indeed several genetic factors (mutations in *Card15/Nod2*, *DLG5* or *OCTN1* genes) are identified and associated with a dysregulation of the immune response. This is the few we know, and constitute the base of the main actual (anti-TNF- α , - β 4 integrin antibodies) and in development (anti-IL12, -IL23, -IL17, -MADCAM, -CCR9) therapeutics (4). Despite an optimized use of immunosuppressive drugs and the new biologic agents, preventing disease outcome remains a challenge and the need for intestinal resection in CD and UC has remained stable. Primary and secondary failure to respond to approved therapies, and in some cases inability to provide a surgical solution to a particular patient due to extension and/or location of lesions, represents unmet needs in the treatment of IBD. Without further research in the pathogenesis of IBD, the discovery of lasting, effective forms of treatment is impossible.

In addition to study of the intestinal immune system and microbiota, interest has been focused on neighboring component that is the intestinal epithelial barrier (IEB) (5). The IEB is a single-cell layer that constitutes the largest and most important barrier against the external environment. It acts as a selectively permeable barrier, permitting the absorption of nutrients, electrolytes, and water while maintaining an effective defense against intraluminal toxins, antigens, and enteric flora (6). The epithelium maintains its selective barrier function through the formation of complex protein-protein networks that mechanically link adjacent cells and seal the intercellular space. The protein networks connecting epithelial cells form 3 adhesive complexes: desmosomes, adherent junctions, and tight junctions. These complexes consist of transmembrane proteins that interact extracellularly with adjacent cells and intracellularly with adaptor proteins that link to the cytoskeleton (7). The continual renewal of the surface epithelium, which requires cell shedding, represents a potential site of barrier loss. Although barrier function is maintained during physiologic cell shedding, the risk of gross barrier loss is present in inflammatory disease, where epithelial proliferation and turnover are accelerated. Consistent with this, increased tight junction permeability is associated with intestinal disease and electrical conductance is enhanced directly over sites of epithelial apoptosis. A failing regulation of the IEB properties could therefore contribute to the development of IBD and hyperpermeability and defective healing of the IEB has been observed in IBD, and more particularly in CD (8, 9). A good healing is associated with a better evolution of the pathology prognosis and it has been shown in a genetic model of IBD that a reduction in the IEB permeability protects against the development of inflammation (10). Moreover, it was shown that in subject with familial risk, the increased of the permeability precedes the onset of CD, suggesting that this increased of intestinal permeability could be a cause and not a consequence of inflammation (11).

The IEB is regulated by its microenvironment, which include the enteric nervous system (ENS). The ENS is an integrative autonomic nervous system which is extended from the lower 2/3 of the esophagus to the anus and is organized in two major ganglionic plexus composed of neurons and enteric glial cells (EGC) : the myenteric plexus (or Auerbach plexus) that controls the digestive motility, and the submucosal plexus (or Meissner plexus) that controls the functions of the IEB (12, 13). It has been shown that the activation of the ENS via the vagus nerve stimulation can modulate the integrity of the IEB by blocking the breakdown of tight junctions (14). A lot of studies have first focused on the involvement of neurons in the intestinal dysfunction because it has been shown that neurons undergo morphological changes in IBD and that the number of neurons was decreased in colitis models. More precisely, nerve fiber hypertrophy and hyperplasia and alteration of the neuronal cell bodies were observed in IBD (15) and colitis development was associated with a loss of 20% of the myenteric neurons in guinea pigs and 50% in rats, that was accompanied by the appearance of immune cells like neutrophils into myenteric ganglia (16-18). But evidence is now accumulating regarding the role of the other ENS component, EGC, in gut diseases. In addition to modified EGC properties under inflammation, EGC phenotype and functions are altered in IBD, and in a different way between CD and UC. Whether these abnormal EGC could participate in the pathogenesis of IBD or in particular CD should be considered.

EGC, regulators of the intestinal integrity?

Observed by Dogiel as nucleated satellite cells closed to enteric neurons in 1899, EGC were better characterized in 1971 by Gabella (19). They are often now described as gut counterpart of astrocytes of the central nervous system (CNS) expressing the same glial markers GFAP and S100 β , and having comparable functions, among which their neuroprotective role (20). GFAP (glial fibrillary acidic protein) is an intermediate filament protein mostly involved in the cytoskeletal structure. Nine splice variants of GFAP have been described in the CNS, but Clairembault et al. show that GFAP κ isoform, which is the more recently discovered, is the isoform mainly expressed by the EGC (21). S100 β is a neurotrophin enhancing neurite outgrowth and survival of neurons, and participating in the regulation of intracellular Ca²⁺ homeostasis (18, 22). The transcription factor Sox-10, which is a central factor required for peripheral glial fate acquisition and probably also for EGC differentiation is the third marker of mature EGC.

For a long time relegated to an “architectural support”, glial cells are undeniably recognized as active and major component of the physiology of nervous systems. At the gut level, emerging evidences suggest that EGC are key regulators of intestinal functions, modulating enteric neuronal activity but also directly regulating the IEB. Indeed if enteric glia-neuron cross talk significantly contributes to neuronal maintenance (23) survival and function (24), EGC are genuinely considered as strong regulators of intestinal barrier functions. From animal studies we know that EGC ablation leads to intestinal inflammation associated with an alteration of the mucosal integrity. No matter the experimental models, EGC ablation induces an increase in intestinal vascular permeability and an increase in IEB paracellular permeability prior to signs of inflammation (24-27). In addition *in vitro* studies using rat EGC have demonstrated that EGC can reinforce IEB barrier (28), enhance epithelial healing (29) inhibit epithelial cell proliferation (30, 31) and can even have a broader effect on epithelium by modifying its transcriptome (32). All these works show that EGC regulates IEB properties through the production and release of soluble factors. The recently identified glial factor,

GSNO (S-nitrosoglutathione) reinforces the IEB by decreasing its permeability (27) and increasing its resistance against *Shigella Flexneri* infection (28). EGC also speed up wound healing through the production of pro-EGF (pro-epithelial growth factor)(29) and are able to strongly inhibit intestinal epithelial cell proliferation through the release of transforming growth factor β 1 (31) or through the main PPAR γ ligand, 15-deoxy-(12,14)-prostaglandin J₂ (15dPGJ₂) that could also regulate intestinal epithelial cell differentiation (30). However a very interesting recent work of Rao et al., tempers if not discredits the physiological *in vivo* role of EGC on IEB control. Using the recently describe PLP1 glial marker (33), they analyzed mice depleted for PLP1 positive cells and have shown no requirement of these cells for the maintenance of gastrointestinal epithelium (34). Indeed in their mice model where around 80% of S100 β positive cells are depleted in the myenteric as well as in the submucosal plexus, they observed no change in epithelial renewal or permeability, and no sensitivity to DSS induced colitis development. They conclude that the IEB failure observed in the other models using GFAP positive EGC was mostly due to non-glial toxicity, but their arguments are not entirely convincing. Neither the ganciclovir toxicity on neighboring cells (25, 35) nor the GFAP expression in epithelium has been described while they were looked for. In addition Rao and al. did not analyze if the 20% remaining EGC cells were GFAP positive in the mucosa. Better than erasing all the previous findings, we should perhaps (i) propose a minor contribution of the majority of EGC in maintaining IEB homeostasis, that could also easily be explained by the soluble factors produced by glial that are not specific to EGC but can also be produced by other neighboring cells, and (ii) focus our research on different EGC sub-population, and in particular the GFAP positive cells. Indeed Boesmans et al., more than defining different EGC morphology according to their localization, described different EGC sub-population that differentially express GFAP, S100 β and Sox10 glial markers or none of them (36, 37). As GFAP is a marker of glial reactivity to inflammation, the study of EGC in IBD is again more interesting.

EGC and inflammation

It has been shown that in response to injury, stress or inflammation, astrocytes of the CNS acquire new properties and are then called "reactive glia" (38). Induction of these reactive astrocytes, characterized in particular by an increased expression of the glial marker GFAP and an increased proliferation and cytokine secretion, can have both beneficial and deleterious effects on the healing of brain tissue (39, 40). Indeed, it has been shown that reactive astrocytes were involved in repairing the blood-brain barrier, but it has also been shown that if these "reactive glia" are not resolved in time, it could prevent complete recovery of CNS functions (39, 41). Thus, it is possible that such a paradigm exists in conditions of intestinal inflammation, for the control of the IEB by the EGC (42). For now, we have very little data on the functional impact of reactive enteric glia on the integrity of the IEB. Similarly, it was shown that reactive astrocytes had beneficial effects on neurons particularly through the axon growth, but very little data link the EGC in inflammatory conditions with neurons, except a sensitization of myenteric neurons to bradykinin response (43).

Nevertheless changes in EGC phenotype and soluble mediator production have been observed when EGC were stimulated by proinflammatory cytokines or the bacterial component. A study shows that the IL-1 β induces c-Fos expression by EGC *ex vivo* on isolated tissues of ileum and colon from guinea pig, suggesting an activation of EGC in inflammatory conditions (44). Moreover, it has been shown that the proinflammatory cytokines TNF α and IL-1 β and the bacterial component

LPS increased significantly the expression of GFAP and S100 β by the EGC (45, 46). Similarly, a double-labeling BrdU-S100 β of myenteric ganglia showed that inflammation appeared to induce mitosis of EGC in the ileum of guinea pig (47). Ruhl et al. also showed that if the IL-1 β seemed to decrease the proliferation of EGC, high-dose of IL-10 (5-100 ng/mL) had the opposite effect (48). In addition, it was shown that in response to an inflammatory stimulus, EGC began to produce IL-6 similarly to the astrocytes, but also IL-1 β and TNF α (49). Thus, in response to inflammation EGC begin to produce proinflammatory cytokines, suggesting an involvement of these cells in the regulation of immune responses. The inflammation also induces an increase in secretion of neurotrophic factor by EGC, like GDNF and NGF (50, 51). GDNF not only regulate neurons but have also a role on barrier-protective mechanism of EGC after ischemia/reperfusion (52) and an autocrine role on EGC by protecting them from apoptosis (53, 54). Taken together, these data suggest that inflammation induces changes in the expression of glial markers and changes in cytokine production and neurotrophic factors that may play a beneficial role on the IEB. This is supported by a study in which in the presence of proinflammatory cytokines (TNF α , IL-1 β , IFN γ), EGC acquired new functional properties in preventing the increase of the permeability of the IEB (55). Examination of glial reactivity *in vivo* in different mice model shows that the activation of EGC in animal models appears to be identical to what is observed *in vitro*. Indeed, it was shown in colitis models that IL-1 β induces Fos expression by EGC in rats and guinea pigs (56, 57). Moreover, it was shown that in a colitis model in mice, GDNF decreased intestinal permeability and reduced the inflammatory response (58). Finally, EGC are able to respond to bacterial insults via expression of toll like receptor (TLR), and it has been shown in a model of DSS-induced colitis in mice that the expression of TLR4 by EGC was increased (59).

Taken together, these data suggest that in inflammatory conditions *in vitro* and *in vivo*, EGC could acquire new phenotypic and functional properties, as reactive astrocytes in the CNS. Thus, short-term inflammation appears to induce reactive EGC with new beneficial properties for intestinal integrity. However, induction of such properties could also have long term deleterious effects when the inflammation is maintained and when the lesions are not repaired, like in IBD.

EGC and IBD

Phenotypic characterization of EGC from patients with IBD shows that they differently express glial markers. Indeed, several studies show that in mucosal inflamed areas, there is an increase of the expression of GFAP and S100 β and an increased glial production of GDNF when compared to non inflamed area, in UC as well as in CD patients (26, 60) and S100 β has also been detected as overexpressed in UC (61). A decreased in GFAP expression and GDNF production was also observed in uninflamed area of CD compared to control patients, but not UC patients (26, 60). These results are often interpreted as a loss of glial cells, but no study shows a real decrease of EGC number. An analysis of Sox10 expression indicated that sox10 mRNA is overexpressed in patients with CD, in inflamed or non inflamed area (**Figure 1A**). The same profile has been obtained with s100 β mRNA expression measurement (**Figure 1B**). This confirms S100 β upregulation in CD (61) and shows a novel difference between CD and UC, the Sox10 expression.

To study EGC functions, we have developed a method to isolate and characterize human EGC (62). Using this method and a non contact co-culture model of intestinal epithelial cells (IEC), we have demonstrated that human EGC can also enhance IEC spreading, speed up IEB repair (63) and decrease IEB permeability (64). In addition we have identified that human EGC can produce some

others n-6 PUFA derivatives (n-6 PUFAd), the 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) and the 11 β -Prostaglandin F_{2 α} (11 β -PGF_{2 α}) to regulate IEB permeability (64) and healing (63) respectively. All these properties were lost by CD EGC (63,64). Analyzes of n-6 PUFAd production have further shown that they were not regulate in the same manner in CD and UC EGC. Whereas 15-HETE production is decreased in CD EGC compared to control EGC, it is increased in UC EGC compared to CD EGC (**Figure 2**). Functional analyzes of IEB regulation by these EGC have shown that UC EGC have lost the reinforcement of the resistance operated by control EGC, whereas CD EGC even induced a decrease in these resistance (**Figure 3**). Thus, these data suggest that in CD more than in UC, EGC are phenotypically altered but could also undergo functional changes that may contribute to the pathophysiology of these diseases.

Conclusion/Perspectives

IBD are diseases which symptoms are well known but which etiology remains poorly understood. In this context, EGC represent a new interesting actor since their role in maintaining intestinal integrity is increasingly studied. In this review, we focused on the impact of EGC on intestinal epithelial cells of the IEB, but the EGC may also act on other neighboring cells from enteroendocrine cells (65) to smooth muscle (66) immune cells (67, 68) and neurons (15, 69). EGC could also be a sensor of microbiota or nutrition and can thereby be a key regulator of gut properties. A better characterization of EGC in the context of IBD and other inflammatory pathologies should allow better understanding of the pathophysiological processes. Further progress is expected in the near future with the development of *in vivo* imaging techniques, optogenetic and cell lineage tracing methods to better characterize EGC role, and, in particular, whether functionally distinct subclasses of EGC exist.

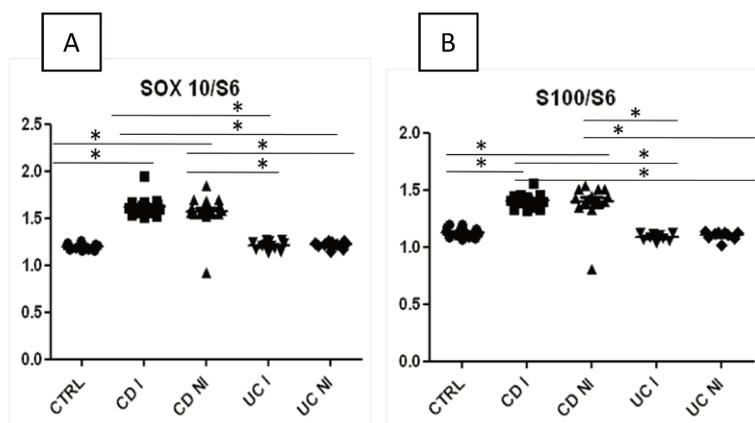


Figure 1 : The expression of Sox10 and S100b glial markers mRNA is increased in CD patients.

Quantification of S100 β and Sox10 mRNA on biopsies from controls patients (ctrl, n=15), inflamed area of CD patients (CD-I, n=15), non-inflamed area of CD patients (CD NI, n=15), inflamed area of UC patients (UC I, n=9), non-inflamed area of UC patients (UC NI, n=9). Statistical test used was a Kruskal Wallis and a Dunn's post-test, p value<0.0001.

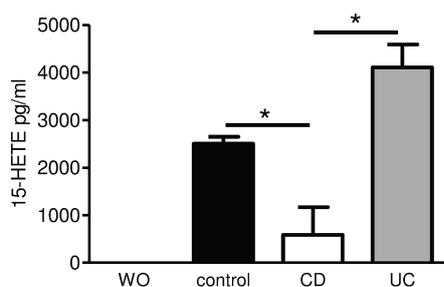


Figure 2 : 15-HETE production is decreased in CD but not UC EGC.

Production of eicosanoids by EGC was measured using high sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry in the culture medium of human EGC from control (control) CD or UC patients and compared to culture medium content (WO). Statistical test used was a Kruskal Wallis and a Dunn's post-test, p value<0.05

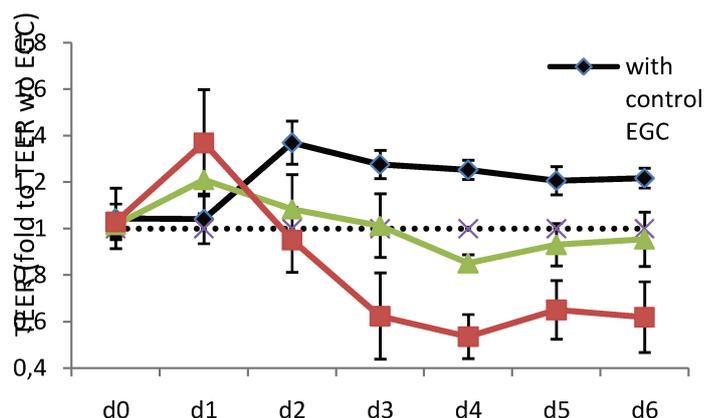


Figure 3 : Epithelial monolayer resistance is increased by control EGC, decreased by CD EGC but not changed by UC EGC.

Human EGC functional impact on IEB was assessed by transeletrical epithelial resistance (TEER) measurement on Caco-2 monolayer after 1 to 6 days of coculture. n=4 different cultures per group.

References

1. Ananthakrishnan, A.N. 2015. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12:205-217.
2. Rubin, D.C., Shaker, A., and Levin, M.S. 2012. Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Front Immunol* 3:107.
3. 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.
4. Rousseaux, C., El-Jamal, N., Fumery, M., Dubuquoy, C., Romano, O., Chatelain, D., Langlois, A., Bertin, B., Buob, D., Colombel, J.F., et al. 2013. The 5-aminosalicylic acid antineoplastic effect in the intestine is mediated by PPARgamma. *Carcinogenesis* 34:2580-2586.
5. Neunlist, M., Van Landeghem, L., Bourreille, A., and Savidge, T. 2008. Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 263:577-583.
6. Lee, S.H. 2015. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest Res* 13:11-18.
7. Shin, K., Fogg, V.C., and Margolis, B. 2006. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:207-235.
8. Arrieta, M.C., Bistriz, L., and Meddings, J.B. 2006. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 55:1512-1520.
9. Soderholm, J.D., Peterson, K.H., Olaison, G., Franzen, L.E., Westrom, B., Magnusson, K.E., and Sjodahl, R. 1999. Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* 117:65-72.
10. Arrieta, M.C., Madsen, K., Doyle, J., and Meddings, J. 2009. Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. *Gut* 58:41-48.
11. 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.
12. Grundy, D., and Schemann, M. 2006. Enteric nervous system. *Curr Opin Gastroenterol* 22:102-110.
13. Schemann, M., and Neunlist, M. 2004. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:55-59.
14. Krzyzaniak, M., Peterson, C., Loomis, W., Hageny, A.M., Wolf, P., Reys, L., Putnam, J., Eliceiri, B., Baird, A., Bansal, V., et al. 2011. Postinjury vagal nerve stimulation protects against intestinal epithelial barrier breakdown. *J Trauma* 70:1168-1175; discussion 1175-1166.
15. Geboes, K., and Collins, S. 1998. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol Motil* 10:189-202.
16. Linden, D.R., Couvrette, J.M., Ciolino, A., McQuoid, C., Blaszyk, H., Sharkey, K.A., and Mawe, G.M. 2005. Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterol Motil* 17:751-760.
17. Sanovic, S., Lamb, D.P., and Blennerhassett, M.G. 1999. Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am J Pathol* 155:1051-1057.
18. Sarnelli, G., De Giorgio, R., Gentile, F., Cali, G., Grandone, I., Rocco, A., Cosenza, V., Cuomo, R., and D'Argenio, G. 2009. Myenteric neuronal loss in rats with experimental colitis: role of tissue transglutaminase-induced apoptosis. *Dig Liver Dis* 41:185-193.
19. Gabella, G. 1971. Glial cells in the myenteric plexus. *Z Naturforsch B* 26:244-245.
20. Abdo, H., Derkinderen, P., Gomes, P., Chevalier, J., Aubert, P., Masson, D., Galmiche, J.P., Vanden Berghe, P., Neunlist, M., and Lardeux, B. 2010. Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *Faseb J* 24:1082-1094.
21. Clairembault, T., Kamphuis, W., Leclair-Visonneau, L., Rolli-Derkinderen, M., Coron, E., Neunlist, M., Hol, E.M., and Derkinderen, P. 2014. Enteric GFAP expression and

- phosphorylation in Parkinson's disease. *J Neurochem*.
22. Yang, Z., and Wang, K.K. 2015. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci* 38:364-374.
 23. De Giorgio, R., Arakawa, J., Wetmore, C.J., and Sternini, C. 2000. Neurotrophin-3 and neurotrophin receptor immunoreactivity in peptidergic enteric neurons. *Peptides* 21:1421-1426.
 24. Aube, A.C., Cabarrocas, J., Bauer, J., Philippe, D., Aubert, P., Doulay, F., Liblau, R., Galmiche, J.P., and Neunlist, M. 2006. Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 55:630-637.
 25. Bush, T.G., Savidge, T.C., Freeman, T.C., Cox, H.J., Campbell, E.A., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. 1998. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93:189-201.
 26. Cornet, A., Savidge, T.C., Cabarrocas, J., Deng, W.L., Colombel, J.F., Lassmann, H., Desreumaux, P., and Liblau, R.S. 2001. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13306-13311.
 27. Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., and Sofroniew, M.V. 2007. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 132:1344-1358.
 28. 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 S-nitrosoglutathione. *Gut* 60:473-484.
 29. Van Landeghem, L., Chevalier, J., Mahe, M.M., Wedel, T., Urvil, P., Derkinderen, P., Savidge, T., and Neunlist, M. 2011. Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300:G976-987.
 30. Bach-Ngohou, K., Mahe, M.M., Aubert, P., Abdo, H., Boni, S., Bourreille, A., Denis, M.G., Lardeux, B., Neunlist, M., and Masson, D. 2010. Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J Physiol* 588:2533-2544.
 31. 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:G231-241.
 32. Van Landeghem, L., Mahe, M.M., Teusan, R., Leger, 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* 10:507.
 33. Rao, M., Nelms, B.D., Dong, L., Salinas-Rios, V., Rutlin, M., Gershon, M.D., and Corfas, G. 2016. Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. *Glia*.
 34. Rao, M., Rastelli, D., Dong, L., Chiu, S., Setlik, W., Gershon, M.D., and Corfas, G. 2017. Enteric Glia Regulate Gastrointestinal Motility but Are Not Required for Maintenance of the Epithelium in Mice. *Gastroenterology*.
 35. Sofroniew, M.V., Bush, T.G., Blumauer, N., Lawrence, K., Mucke, L., and Johnson, M.H. 1999. Genetically-targeted and conditionally-regulated ablation of astroglial cells in the central, enteric and peripheral nervous systems in adult transgenic mice. *Brain Res* 835:91-95.
 36. 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*.
 37. Boesmans, W., Vanden Berghe, P., and Pachnis, V. 2012. Glial heterogeneity in the enteric nervous system. *Neurogastroenterology and Motility* 24:36.

38. Pekny, M., and Pekna, M. 2014. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev* 94:1077-1098.
39. Lomax, A.E., Fernandez, E., and Sharkey, K.A. 2005. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* 17:4-15.
40. Sofroniew, M.V. 2015. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci* 16:249-263.
41. Hamby, M.E., and Sofroniew, M.V. 2010. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics* 7:494-506.
42. Cabarrocas, J., Savidge, T.C., and Liblau, R.S. 2003. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41:81-93.
43. Murakami, M., Ohta, T., and Ito, S. 2009. Lipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin-1beta from enteric glial cells. *J Neurosci Res* 87:2095-2104.
44. Tjwa, E.T., Bradley, J.M., Keenan, C.M., Kroese, A.B., and Sharkey, K.A. 2003. Interleukin-1beta activates specific populations of enteric neurons and enteric glia in the guinea pig ileum and colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G1268-1276.
45. Cirillo, C., Sarnelli, G., Esposito, G., Grosso, M., Petruzzelli, R., Izzo, P., Cali, G., D'Armiento, F.P., Rocco, A., Nardone, G., et al. 2009. Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. *Neurogastroenterol Motil* 21:1209-e1112.
46. von Boyen, G.B., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schafer, K.H., Adler, G., and Kirsch, J. 2004. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* 53:222-228.
47. Bradley, J.S., Jr., Parr, E.J., and Sharkey, K.A. 1997. Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res* 289:455-461.
48. Ruhl, A., Franzke, S., and Stremmel, W. 2001. IL-1beta and IL-10 have dual effects on enteric glial cell proliferation. *Neurogastroenterol Motil* 13:89-94.
49. Ruhl, 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:G1163-1171.
50. von Boyen, G.B., Steinkamp, M., Geerling, I., Reinshagen, M., Schafer, 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.
51. von Boyen, G.B., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schafer, K.H., Adler, G., and Kirsch, J. 2006. Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines. *J Neuroendocrinol* 18:820-825.
52. 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* 50:274-289.
53. Steinkamp, M., Geerling, I., Seufferlein, T., von Boyen, G., Egger, B., Grossmann, J., Ludwig, L., Adler, G., and Reinshagen, M. 2003. Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 124:1748-1757.
54. Steinkamp, M., Gundel, H., Schulte, N., Spaniol, U., Pflueger, C., Zizer, E., and von Boyen, G.B. 2012. GDNF protects enteric glia from apoptosis: evidence for an autocrine loop. *BMC Gastroenterol* 12:6.
55. 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.
56. Miampamba, M., and Sharkey, K.A. 1999. c-Fos expression in the myenteric plexus, spinal cord and brainstem following injection of formalin in the rat colonic wall. *J Auton Nerv Syst* 77:140-151.

57. 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.
58. Zhang, D.K., He, F.Q., Li, T.K., Pang, X.H., Cui de, J., Xie, Q., Huang, X.L., and Gan, H.T. 2010. Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J Pathol* 222:213-222.
59. Esposito, G., Capoccia, E., Turco, F., Palumbo, I., Lu, J., Steardo, A., Cuomo, R., Sarnelli, G., and Steardo, L. 2013. Palmitoylethanolamide improves colon inflammation through an enteric glia/toll like receptor 4-dependent PPAR-alpha activation. *Gut*.
60. von Boyen, G.B., Schulte, N., Pfluger, C., Spaniol, U., Hartmann, C., and Steinkamp, M. 2011. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol* 11:3.
61. Cirillo, C., Sarnelli, G., Esposito, G., Turco, F., Steardo, L., and Cuomo, R. 2011. S100B protein in the gut: the evidence for enteroglia-sustained intestinal inflammation. *World J Gastroenterol* 17:1261-1266.
62. Soret, R., Coquenlorge, S., Cossais, F., Meurette, G., Rolli-Derkinderen, M., and Neunlist, M. 2013. Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells. *Neurogastroenterol Motil* 25:e755-764.
63. Coquenlorge, S., Van Landeghem, L., Jaulin, J., Cenac, N., Vergnolle, N., Duchalais, E., Neunlist, M., and Rolli-Derkinderen, M. 2016. The arachidonic acid metabolite 11beta-ProstaglandinF2alpha controls intestinal epithelial healing: deficiency in patients with Crohn's disease. *Sci Rep* 6:25203.
64. Pochard, C., Coquenlorge, S., Jaulin, J., Cenac, N., Vergnolle, N., Meurette, G., Freyssinet, M., Neunlist, M., and Rolli-Derkinderen, M. 2016. Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells from Patients With Crohn's disease. *Gastroenterology*.
65. Bohorquez, 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.
66. Komuro, T. 1988. Direct contacts between Auerbach's ganglia and smooth muscle cells in the small intestine of the rat. *Neurosci Lett* 92:27-29.
67. Ibiza, S., Garcia-Cassani, B., Ribeiro, H., Carvalho, T., Almeida, L., Marques, R., Misic, A.M., Bartow-McKenney, C., Larson, D.M., Pavan, W.J., et al. 2016. Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature* 535:440-443.
68. Sharkey, K.A. 2015. Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. *J Clin Invest* 125:918-925.
69. Brierley, S.M., and Linden, D.R. 2014. Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11:611-627.

Références

- Aasen, T., Mesnil, M., Naus, C.C., Lampe, P.D., and Laird, D.W. (2016). Gap junctions and cancer: communicating for 50 years. *Nature Reviews Cancer* 16, 775–788.
- Abbott, N.J., R?nnb?ck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte?endothelial interactions at the blood?brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 7, 41–53.
- Abdo, H., Derkinderen, P., Gomes, P., Chevalier, J., Aubert, P., Masson, D., Galmiche, J.-P., Vanden Berghe, P., Neunlist, M., and Lardeux, B. (2010). Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J.* 24, 1082–1094.
- Abdo, H., Mahé, M.M., Derkinderen, P., Bach-Ngohou, K., Neunlist, M., and Lardeux, B. (2012). The omega-6 fatty acid derivative 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress: 15d-PGJ2 and neuroprotection by enteric glial cells. *The Journal of Physiology* 590, 2739–2750.
- Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology* 10, 131–144.
- Abreu, M.T., Palladino, A.A., Arnold, E.T., Kwon, R.S., and McRoberts, J.A. (2000). Modulation of barrier function during Fas-mediated apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 119, 1524–1536.
- 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, G238-244.
- Allgayer, H., Deschryver, K., and Stenson, W.F. (1989). Treatment with 16,16'-dimethyl prostaglandin E2 before and after induction of colitis with trinitrobenzenesulfonic acid in rats decreases inflammation. *Gastroenterology* 96, 1290–1300.
- Al-Sadi, R.M., and Ma, T.Y. (2007). IL-1beta 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-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J. Immunol.* 180, 5653–5661.
- Alstead, E.M. (1999). The pill: safe sex and Crohn's disease? *Gut* 45, 165–166.
- Amasheh, M., Andres, S., Amasheh, S., Fromm, M., and Schulzke, J.-D. (2009). Barrier effects of nutritional factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165, 267–273.
- Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A.H., Schöneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2002). Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell. Sci.* 115, 4969–4976.
- Ananthakrishnan, A.N. (2013). Environmental Triggers for Inflammatory Bowel Disease. *Current Gastroenterology Reports* 15.
- Ananthakrishnan, A.N., Higuchi, L.M., Huang, E.S., Khalili, H., Richter, J.M., Fuchs, C.S., and Chan, A.T. (2012). Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann. Intern. Med.* 156, 350–359.
- Anderson, M.A., Ao, Y., and Sofroniew, M.V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci. Lett.* 565, 23–29.
- Andersson, R.E., Olaison, G., Tysk, C., and Ekblom, A. (2001). Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* 344, 808–814.

Références

- Anderton, B.H. (1981). Intermediate filaments: a family of homologous structures. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2, 141–166.
- 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. *Developmental Biology* 324, 288–296.
- Andriantsitohaina, R., and Surprenant, A. (1992). Acetylcholine released from guinea-pig submucosal neurones dilates arterioles by releasing nitric oxide from endothelium. *J. Physiol. (Lond.)* 453, 493–502.
- Anitha, M., Gondha, C., Sutliff, R., Parsadonian, A., Mwangi, S., Sitaraman, S.V., and Srinivasan, S. (2006). GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. *J. Clin. Invest.* 116, 344–356.
- 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.
- Ardesia, M., Ferlazzo, G., and Fries, W. (2015). Vitamin D and Inflammatory Bowel Disease. *BioMed Research International* 2015, 1–16.
- Arita, H., Nakano, T., and Hanasaki, K. (1989). Thromboxane A₂: its generation and role in platelet activation. *Prog. Lipid Res.* 28, 273–301.
- Arranz, A., Abad, C., Juarranz, Y., Leceta, J., Martinez, C., and Gomariz, R.P. (2008). Vasoactive intestinal peptide as a healing mediator in Crohn's disease. *Neuroimmunomodulation* 15, 46–53.
- Arrieta, M.C. (2006). Alterations in intestinal permeability. *Gut* 55, 1512–1520.
- Arslan, G., Atasever, T., Cindoruk, M., and Yildirim, I.S. (2001). (51)CrEDTA colonic permeability and therapy response in patients with ulcerative colitis. *Nucl Med Commun* 22, 997–1001.
- 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.
- Aubé, A.-C., Cabarrocas, J., Bauer, J., Philippe, D., Aubert, P., Doulay, F., Liblau, R., Galmiche, J.P., and Neunlist, M. (2006). Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 55, 630–637.
- Auerbach, L. (1864). Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. *Arch Pathol Anat Physiol* 457–460.
- Aytaç, E., Teksöz, S., Saygılı, S., Tortum, O.B., Yavuz, N., Sözer, V., Göksel, S., Uzun, H., Seymen, H.O., and Göksoy, E. (2013). Iloprost reduces colitis induced oxidative stress: An experimental study in rats. *Turk J Gastroenterol* 24, 224–229.
- Bach-Ngohou, K., Mahé, M.M., Aubert, P., Abdo, H., Boni, S., Bourreille, A., Denis, M.G., Lardeux, B., Neunlist, M., and Masson, D. (2010). Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J₂. *J. Physiol. (Lond.)* 588, 2533–2544.
- Balsinde, J., Winstead, M.V., and Dennis, E.A. (2002). Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* 531, 2–6.
- Banan, A., Fields, J.Z., Talmage, D.A., Zhang, Y., and Keshavarzian, A. (2001). PKC-beta1 mediates EGF protection of microtubules and barrier of intestinal monolayers against oxidants. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281, G833-847.
- Bannerman, P.G., Mirsky, R., Jessen, K.R., Timpl, R., and Duance, V.C. (1986). Light microscopic immunolocalization of laminin, type IV collagen, nidogen, heparan sulphate proteoglycan and fibronectin in the enteric nervous system of rat and guinea pig. *J. Neurocytol.* 15, 733–743.

Références

- Bar, K., Facer, P., Williams, N., Tam, P., and Anand, P. (1997). Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* *112*, 1381–1385.
- 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. *J. Histochem. Cytochem.* *57*, 1013–1023.
- Barbalho, S.M., Goulart, R. de A., Quesada, K., Bechara, M.D., and de Carvalho, A. de C.A. (2016). Inflammatory bowel disease: can omega-3 fatty acids really help? *Ann Gastroenterol* *29*, 37–43.
- Barker, N. (2013). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *15*, 19–33.
- Barker, N., van Oudenaarden, A., and Clevers, H. (2012). Identifying the Stem Cell of the Intestinal Crypt: Strategies and Pitfalls. *Cell Stem Cell* *11*, 452–460.
- Barnes, P.J., and Karin, M. (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* *336*, 1066–1071.
- 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.
- Barthel, W., and Markwardt, F. (1975). Aggregation of blood platelets by adrenaline and its uptake. *Biochem. Pharmacol.* *24*, 1903–1904.
- Basu, S. (2007). Novel cyclooxygenase-catalyzed bioactive prostaglandin F₂α from physiology to new principles in inflammation. *Medicinal Research Reviews* *27*, 435–468.
- Basuroy, S., Seth, A., Elias, B., Naren, A.P., and Rao, R. (2006). MAPK interacts with occludin and mediates EGF-induced prevention of tight junction disruption by hydrogen peroxide. *Biochemical Journal* *393*, 69–77.
- Baudry, C., Reichardt, F., Marchix, J., Bado, A., Schemann, M., des Varannes, S.B., Neunlist, M., and Moriez, R. (2012). Diet-induced obesity has neuroprotective effects in murine gastric enteric nervous system: involvement of leptin and glial cell line-derived neurotrophic factor: Enteric neuroplasticity and diet-induced obesity. *The Journal of Physiology* *590*, 533–544.
- Baumeister, B., Schmidt, C., Helisch, A., and Kipnowski, J. (1996). Increased prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ synthesis in isolated colonic mucosal cells in inflammatory bowel disease. a preliminary report. *J. Clin. Gastroenterol.* *22*, 117–120.
- Bayliss, W.M., and Starling, E.H. (1899). The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol. (Lond.)* *24*, 99–143.
- ter Beek, W.P., Biemond, I., Muller, E.S.M., van den Berg, M., and Lamers, C.B.H.W. (2007). Substance P receptor expression in patients with inflammatory bowel disease. Determination by three different techniques, i.e., storage phosphor autoradiography, RT-PCR and immunohistochemistry. *Neuropeptides* *41*, 301–306.
- 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.
- Benarroch, E.E. (2007). Enteric nervous system: Functional organization and neurologic implications. *Neurology* *69*, 1953–1957.
- Benjamin, J.L., Sumpter, R., Levine, B., and Hooper, L.V. (2013). Intestinal Epithelial Autophagy Is Essential for Host Defense against Invasive Bacteria. *Cell Host & Microbe* *13*, 723–734.

Références

- Berg, D.J., Zhang, J., Weinstock, J.V., Ismail, H.F., Earle, K.A., Alila, H., Pamukcu, R., Moore, S., and Lynch, R.G. (2002). Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10-deficient mice. *Gastroenterology* *123*, 1527–1542.
- Bergeron, V., Grondin, V., Rajca, S., Maubert, M.-A., Pigneur, B., Thomas, G., Trugnan, G., Beaugerie, L., Cosnes, J., Masliah, J., et al. (2012). Current smoking differentially affects blood mononuclear cells from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis: relevance to its adverse role in the disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *18*, 1101–1111.
- 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.
- Bernardini, N., Segnani, C., Ippolito, C., De Giorgio, R., Colucci, R., Fausone-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., and Shanahan, F. (2008). Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut* *57*, 1185–1191.
- 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.
- Bernstein, C.N., Rawsthorne, P., Cheang, M., and Blanchard, J.F. (2006). A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am. J. Gastroenterol.* *101*, 993–1002.
- Berson, F.G., Spatz, M., and Klatzo, I. (1975). Effects of oxygen saturation and pCO₂ on brain uptake of glucose analogues in rabbits. *Stroke* *6*, 691–696.
- Bertolotti, A., Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J.H., West, A.B., and Ron, D. (2001). Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice. *J. Clin. Invest.* *107*, 585–593.
- Bevins, C.L., and Salzman, N.H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* *9*, 356–368.
- Bezzi, P., and Volterra, A. (2001). A neuron–glia signalling network in the active brain. *Current Opinion in Neurobiology* *11*, 387–394.
- 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.
- Bishayee, K., and Khuda-Bukhsh, A.R. (2013). 5-Lipoxygenase Antagonist therapy: a new approach towards targeted cancer chemotherapy. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* *45*, 709–719.
- Bjarnason, I., Peters, T.J., and Veall, N. (1983). A persistent defect in intestinal permeability in coeliac disease demonstrated by a ⁵¹Cr-labelled EDTA absorption test. *Lancet* *1*, 323–325.
- 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.
- 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.
- Blasbalg, T.L., Hibbeln, J.R., Ramsden, C.E., Majchrzak, S.F., and Rawlings, R.R. (2011). Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am. J. Clin. Nutr.* *93*, 950–962.
- 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.

Références

- 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. *Journal of Clinical Investigation* *100*, 1928–1933.
- Blikslager, A.T., Roberts, M.C., and Argenzio, R.A. (1999). Prostaglandin-induced recovery of barrier function in porcine ileum is triggered by chloride secretion. *Am. J. Physiol.* *276*, G28-36.
- Boesmans, W., Martens, M.A., Weltens, N., Hao, M.M., Tack, J., Cirillo, C., and Vanden Berghe, P. (2013). Imaging neuron-glia interactions in the enteric nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience* *7*.
- Boesmans, W., Lasrado, R., Vanden Berghe, P., and Pachnis, V. (2015). Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia* *63*, 229–241.
- Bongioanni, P., Castagna, M., and Morigi, M. (1996). [Immunohistochemical study of the enteric glia in chronic intestinal inflammatory disease]. *Minerva Med.* *87*, 323–329.
- Boniface, K., Bak-Jensen, K.S., Li, Y., Blumenschein, W.M., McGeachy, M.J., McClanahan, T.K., McKenzie, B.S., Kastelein, R.A., Cua, D.J., and de Waal Malefyt, R. (2009). Prostaglandin E₂ regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J. Exp. Med.* *206*, 535–548.
- Bornstein, J.C., Gwynne, R.M., and Sjövall, H. (2012). Enteric Neural Regulation of Mucosal Secretion. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, (Elsevier), pp. 769–790.
- Boudry, G., Morise, A., Seve, B., and LE Huërou-Luron, I. (2011). Effect of milk formula protein content on intestinal barrier function in a porcine model of LBW neonates. *Pediatr. Res.* *69*, 4–9.
- von Boyen, G., and Steinkamp, M. (2006). [The enteric glia and neurotrophic factors]. *Z Gastroenterol* *44*, 985–990.
- von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schäfer, K.-H., Adler, G., and Kirsch, J. (2004). Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* *53*, 222–228.
- von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schäfer, K.-H., Adler, G., and Kirsch, J. (2006a). Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines. *J. Neuroendocrinol.* *18*, 820–825.
- von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Geerling, I., Reinshagen, M., Schäfer, K.H., Adler, G., and Kirsch, J. (2006b). Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *12*, 346–354.
- von Boyen, G.B.T., Degenkolb, N., Hartmann, C., Adler, G., and Steinkamp, M. (2010). The endothelin axis influences enteric glia cell functions. *Med. Sci. Monit.* *16*, BR161-167.
- von Boyen, G.B.T., Schulte, N., Pflüger, C., Spaniol, U., Hartmann, C., and Steinkamp, M. (2011). Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol* *11*, 3.
- Bradley, J.S., Parr, E.J., and Sharkey, K.A. (1997). Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res.* *289*, 455–461.
- 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, A., Treede, I., Gotthardt, D., Tietje, A., Zahn, A., Ruhwald, R., Schoenfeld, U., Welsch, T., Kienle, P., Erben, G., et al. (2009). Alterations of phospholipid concentration and species composition of the intestinal mucus barrier in ulcerative colitis: a clue to pathogenesis. *Inflamm. Bowel Dis.* *15*, 1705–1720.

Références

- 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: NTPDase2 in the Peripheral Nervous System. *Glia* 45, 124–132.
- Brégeon, J., Coron, E., Da Silva, A.C.C., Jaulin, J., Aubert, P., Chevalier, J., Vergnolle, N., Meurette, G., and Neunlist, M. (2016). Sacral nerve stimulation enhances early intestinal mucosal repair following mucosal injury in a pig model. *J. Physiol. (Lond.)* 594, 4309–4323.
- Brehmer, A., Schrödl, F., and Neuhuber, W. (2002). Morphological phenotyping of enteric neurons using neurofilament immunohistochemistry renders chemical phenotyping more precise in porcine ileum. *Histochem. Cell Biol.* 117, 257–263.
- Breslin, N.P., Nash, C., Hilsden, R.J., Hershfield, N.B., Price, L.M., Meddings, J.B., and Sutherland, L.R. (2001). Intestinal permeability is increased in a proportion of spouses of patients with Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 2934–2938.
- Brierley, S.M., and Linden, D.R. (2014). Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.
- Britsch, S. (2001). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes & Development* 15, 66–78.
- Brown, E.M., Sadarangani, M., and Finlay, B.B. (2013). The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat. Immunol.* 14, 660–667.
- Bruewer, M. (2005). Interferon- γ induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *The FASEB Journal* 19, 923–933.
- 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- γ 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.
- Burakoff, R., Nastos, E., and Won, S. (1990). Effects of PGF $_2$ alpha and of indomethacin on rabbit small and large intestinal motility in vivo. *Am. J. Physiol.* 258, G231-237.
- Burke, J.E., and Dennis, E.A. (2008). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *The Journal of Lipid Research* 50, S237–S242.
- Burns, A.J., and Douarin, N.M. (1998). The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development* 125, 4335–4347.
- Burns, A.J., Champeval, D., and Le Douarin, N.M. (2000). Sacral neural crest cells colonise aganglionic hindgut in vivo but fail to compensate for lack of enteric ganglia. *Dev. Biol.* 219, 30–43.
- Burr, G.O., and Burr, M.M. (1973). Nutrition classics from *The Journal of Biological Chemistry* 82:345-67, 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *Nutr. Rev.* 31, 248–249.
- Burr, G.O., and Burr, M.M. (1981). On the nature and rôle of the fatty acids essential in nutrition. *Progress in Lipid Research* 20, xxi.

Références

- Bush, T.G., Savidge, T.C., Freeman, T.C., Cox, H.J., Campbell, E.A., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1998). Fulminant Jejuno-Ileitis following Ablation of Enteric Glia in Adult Transgenic Mice. *Cell* 93, 189–201.
- Cabarrocas, J., Savidge, T.C., and Liblau, R.S. (2003). Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41, 81–93.
- Cajal, S.R. y (1893). Sur les ganglions et plexus nerveux d'intestin. *C R Soc Biol (Paris)* 5, 217–223.
- Calder, P.C. (2005). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochemical Society Transactions* 33, 423–427.
- Cameron, H.L., and Perdue, M.H. (2007). Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterol. Motil.* 19, 47–56.
- Camilleri, M. (2001). Enteric nervous system disorders: genetic and molecular insights for the neurogastroenterologist. *Neurogastroenterol. Motil.* 13, 277–295.
- Campbell, H.K., Maiers, J.L., and DeMali, K.A. (2017). Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Experimental Cell Research*.
- Campieri, M., and Gionchetti, P. (1999). Probiotics in inflammatory bowel disease: new insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative? *Gastroenterology* 116, 1246–1249.
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M.A., and Severi, C. (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol* 28, 203–209.
- Catassi, C., Bonucci, A., Coppa, G.V., Carlucci, A., and Giorgi, P.L. (1995). Intestinal permeability changes during the first month: effect of natural versus artificial feeding. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 21, 383–386.
- Cerf-Bensussan, N., and Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nature Reviews Immunology* 10, 735–744.
- Chalazonitis, A. (2004). Neurotrophin-3 in the development of the enteric nervous system. In *Progress in Brain Research*, (Elsevier), pp. 243–263.
- Chalazonitis, A., Rothman, T.P., Chen, J., Vinson, E.N., MacLennan, A.J., and Gershon, M.D. (1998). 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.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., et al. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* 4, 702–707.
- Chan, S.S.M., Luben, R., Bergmann, M.M., Boeing, H., Olsen, A., Tjønneland, A., Overvad, K., Kaaks, R., Kennedy, H., Khaw, K.-T., et al. (2011). Aspirin in the aetiology of Crohn's disease and ulcerative colitis: a European prospective cohort study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 34, 649–655.
- 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.
- Chen, L., Tuo, B., and Dong, H. (2016). Regulation of Intestinal Glucose Absorption by Ion Channels and Transporters. *Nutrients* 8, 43.

Références

- Chen, Y., Luo, H., Kang, N., Guan, C., Long, Y., Cao, J., Shen, Q., Li, J., Yang, M., Peng, H., et al. (2012). Beraprost sodium attenuates cigarette smoke extract-induced apoptosis in vascular endothelial cells. *Mol. Biol. Rep.* *39*, 10447–10457.
- Chen, Y.-C., Chu, L.-Y., Yang, S.-F., Chen, H.-L., Yet, S.-F., and Wu, K.K. (2013). Prostacyclin and PPAR α agonists control vascular smooth muscle cell apoptosis and phenotypic switch through distinct 14-3-3 isoforms. *PLoS ONE* *8*, e69702.
- Cheng, K., Samimi, R., Xie, G., Shant, J., Drachenberg, C., Wade, M., Davis, R.J., Nomikos, G., and Raufman, J.-P. (2008). Acetylcholine release by human colon cancer cells mediates autocrine stimulation of cell proliferation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *295*, G591-597.
- Chinen, T., Komai, K., Muto, G., Morita, R., Inoue, N., Yoshida, H., Sekiya, T., Yoshida, R., Nakamura, K., Takayanagi, R., et al. (2011). Prostaglandin E2 and SOCS1 have a role in intestinal immune tolerance. *Nat Commun* *2*, 190.
- Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Thayer, W.R., Merkal, R.S., and Coutu, J.A. (1984). Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* *29*, 1073–1079.
- Choi, C.-H.R., Bakir, I.A., Hart, A.L., and Graham, T.A. (2017). Clonal evolution of colorectal cancer in IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* *14*, 218–229.
- Chow, Y.W., Pietranico, R., and Mukerji, A. (1975). Studies of oxygen binding energy to hemoglobin molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *66*, 1424–1431.
- Cipolla, G., Crema, F., Sacco, S., Moro, E., de Ponti, F., and Frigo, G. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and inflammatory bowel disease: current perspectives. *Pharmacol. Res.* *46*, 1–6.
- Cirillo, C., Sarnelli, G., Esposito, G., Grosso, M., Petruzzelli, R., Izzo, P., Cali, G., D'Armiento, F.P., Rocco, A., Nardone, G., et al. (2009). Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. *Neurogastroenterol. Motil.* *21*, 1209-e112.
- Cirillo, C., Sarnelli, G., Turco, F., Mango, A., Grosso, M., Aprea, G., Masone, S., and Cuomo, R. (2011a). Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglia cells and induces autocrine nitric oxide production. *Neurogastroenterol. Motil.* *23*, e372-382.
- Cirillo, C., Sarnelli, G., Esposito, G., Turco, F., Steardo, L., and Cuomo, R. (2011b). S100B protein in the gut: the evidence for enteroglia-sustained intestinal inflammation. *World J. Gastroenterol.* *17*, 1261–1266.
- 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.
- Coelho-Aguiar, J. de M., Bon-Frauches, A.C., Gomes, A.L.T., Veríssimo, C.P., Aguiar, D.P., Matias, D., Thomasi, B.B. de M., Gomes, A.S., Brito, G.A. de C., and Moura-Neto, V. (2015). The enteric glia: identity and functions. *Glia* *63*, 921–935.
- Cohen, J.L., Strong, S.A., Hyman, N.H., Buie, W.D., Dunn, G.D., Ko, C.Y., Fleshner, P.R., Stahl, T.J., Kim, D.G., Bastawrous, A.L., et al. (2005). Practice parameters for the surgical treatment of ulcerative colitis. *Dis. Colon Rectum* *48*, 1997–2009.
- Collins, S.M., Blennerhassett, P., Vermillion, D.L., Davis, K., Langer, J., and Ernst, P.B. (1992). Impaired acetylcholine release in the inflamed rat intestine is T cell independent. *Am. J. Physiol.* *263*, G198-201.

Références

- Conlin, V.S., Wu, X., Nguyen, C., Dai, C., Vallance, B.A., Buchan, A.M.J., Boyer, L., and Jacobson, K. (2009). Vasoactive intestinal peptide ameliorates intestinal barrier disruption associated with *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297, G735-750.
- Cook, R.D., and Burnstock, G. (1976). The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. I. Neuronal elements. *Journal of Neurocytology* 5, 171–194.
- Cook, S.I., and Sellin, J.H. (1998). Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 12, 499–507.
- Coquenlorge, S., Duchalais, E., Chevalier, J., Cossais, F., Rolli-Derkinderen, M., and Neunlist, M. (2014). Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system. *J Neuroinflammation* 11, 202.
- Coquenlorge, S., Van Landeghem, L., Jaulin, J., Cenac, N., Vergnolle, N., Duchalais, E., Neunlist, M., and Rolli-Derkinderen, M. (2016). The arachidonic acid metabolite 11 β -ProstaglandinF2 α controls intestinal epithelial healing: deficiency in patients with Crohn's disease. *Sci Rep* 6, 25203.
- Cornet, A., Savidge, T.C., Cabarrocas, J., Deng, W.-L., Colombel, J.-F., Lassmann, H., Desreumaux, P., and Liblau, R.S. (2001). Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: A possible mechanism in Crohn's disease? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 13306–13311.
- Cornish, J.A., Tan, E., Simillis, C., Clark, S.K., Teare, J., and Tekkis, P.P. (2008). The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 2394–2400.
- Corrao, G., Tragnone, A., Caprilli, R., Trallori, G., Papi, C., Andreoli, A., Di Paolo, M., Riegler, G., Rigo, G.P., Ferraù, O., et al. (1998). Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC). *Int J Epidemiol* 27, 397–404.
- 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. (2008). What is the link between the use of tobacco and IBD? *Inflamm. Bowel Dis.* 14 Suppl 2, S14-15.
- 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., Nion-Larmurier, I., Afchain, P., Beaugerie, L., and Gendre, J.-P. (2004). Gender differences in the response of colitis to smoking. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2, 41–48.
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., and Cortot, A. (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 1785–1794.
- Cossais, F., Durand, T., Chevalier, J., Boudaud, M., Kermarrec, L., Aubert, P., Neveu, I., Naveilhan, P., and Neunlist, M. (2016). Postnatal development of the myenteric glial network and its modulation by butyrate. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 310, G941-951.
- Costa, M., Brookes, S.J., and Hennig, G.W. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47 Suppl 4, iv15–19; discussion iv26.
- Costantini, T.W., Bansal, V., Krzyzaniak, M., Putnam, J.G., Peterson, C.Y., Loomis, W.H., Wolf, P., Baird, A., Eliceiri, B.P., and Coimbra, R. (2010). Vagal nerve stimulation protects against burn-induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G1308-1318.

Références

- Costantini, T.W., Krzyzaniak, M., Cheadle, G.A., Putnam, J.G., Hageny, A.-M., Lopez, N., Eliceiri, B.P., Bansal, V., and Coimbra, R. (2012). Targeting α -7 nicotinic acetylcholine receptor in the enteric nervous system: a cholinergic agonist prevents gut barrier failure after severe burn injury. *Am. J. Pathol.* *181*, 478–486.
- Crone, S.A., Negro, A., Trumpp, A., Giovannini, M., and Lee, K.-F. (2003). Colonic epithelial expression of ErbB2 is required for postnatal maintenance of the enteric nervous system. *Neuron* *37*, 29–40.
- Cronstein, B.N., Kimmel, S.C., Levin, R.I., Martiniuk, F., and Weissmann, G. (1992). A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *89*, 9991–9995.
- Cui, S., and Chang, P.-Y. (2016). Current understanding concerning intestinal stem cells. *World Journal of Gastroenterology* *22*, 7099.
- Cummings, D.E., and Overduin, J. (2007). Gastrointestinal regulation of food intake. *J. Clin. Invest.* *117*, 13–23.
- da Cunha Franceschi, R., Nardin, P., Machado, C.V., Tortorelli, L.S., Martinez-Pereira, M.A., Zanotto, C., Gonçalves, C.-A., and Zancan, D.M. (2017). Enteric glial reactivity to systemic LPS administration: Changes in GFAP and S100B protein. *Neuroscience Research*.
- Cutler, N.S., Graves-Deal, R., LaFleur, B.J., Gao, Z., Boman, B.M., Whitehead, R.H., Terry, E., Morrow, J.D., and Coffey, R.J. (2003). Stromal production of prostacyclin confers an antiapoptotic effect to colonic epithelial cells. *Cancer Res.* *63*, 1748–1751.
- Cutolo, M., Capellino, S., Sulli, A., Serioli, B., Secchi, M.E., Villaggio, B., and Straub, R.H. (2006). Estrogens and autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1089*, 538–547.
- Dajani, E.Z., Shahwan, T.G., and Dajani, N.E. (2003). Prostaglandins and brain-gut axis. *J. Physiol. Pharmacol.* *54 Suppl 4*, 155–164.
- Damaskos, D., and Kolios, G. (2008). Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora ?on the scope? *British Journal of Clinical Pharmacology* *65*, 453–467.
- Danese, S., Sans, M., and Fiocchi, C. (2004). Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmunity Reviews* *3*, 394–400.
- 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.
- De Caterina, R., Liao, J.K., and Libby, P. (2000). Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am. J. Clin. Nutr.* *71*, 213S–23S.
- De Giorgio, R., Guerrini, S., Barbara, G., Stanghellini, V., De Ponti, F., Corinaldesi, R., Moses, P.L., Sharkey, K.A., and Mawe, G.M. (2004). Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system. *Gastroenterology* *126*, 1872–1883.
- D’Haens, G., Lemmens, L., Geboes, K., Vandeputte, L., Van Acker, F., Mortelmans, L., Peeters, M., Vermeire, S., Penninckx, F., Nevens, F., et al. (2001). Intravenous cyclosporine versus intravenous corticosteroids as single therapy for severe attacks of ulcerative colitis. *Gastroenterology* *120*, 1323–1329.
- 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.

- Dicker, K.A., Löwenberg, B., Schaefer, U.W., and van Bekkum, D.W. (1975). [Allogenic bone marrow transplantation in men]. *Hamatol. Bluttransfus.* *16*, 306–329.
- Didier, N., Romero, I.A., Créminon, C., Wijkhuisen, A., Grassi, J., and Mabondzo, A. (2003). Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J. Neurochem.* *86*, 246–254.
- Diniz, L.P., Almeida, J.C., Tortelli, V., Vargas Lopes, C., Setti-Perdigão, P., Stipursky, J., Kahn, S.A., Romão, L.F., de Miranda, J., Alves-Leon, S.V., et al. (2012). Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor β signaling through modulation of D-serine levels in cerebral cortex neurons. *J. Biol. Chem.* *287*, 41432–41445.
- Dirisina, R., Katzman, R.B., Goretsky, T., Managlia, E., Mittal, N., Williams, D.B., Qiu, W., Yu, J., Chandel, N.S., Zhang, L., et al. (2011). p53 and PUMA independently regulate apoptosis of intestinal epithelial cells in patients and mice with colitis. *Gastroenterology* *141*, 1036–1045.
- Dixon, L.J., Kabi, A., Nickerson, K.P., and McDonald, C. (2015). Combinatorial effects of diet and genetics on inflammatory bowel disease pathogenesis. *Inflamm. Bowel Dis.* *21*, 912–922.
- Dogiel, A. (1899). Ueber den Bau der Ganglien in den Geflechtendes Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säuge-thiere. *Arch Anat Physiol Leip Anat Abt* 130–158.
- Domoto, T., Bishop, A.E., Oki, M., and Polak, J.M. (1990). An in vitro study of the projections of enteric vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in the human colon. *Gastroenterology* *98*, 819–827.
- 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.
- van Dop, W.A., Uhmman, A., Wijgerde, M., Sleddens–Linkels, E., Heijmans, J., Offerhaus, G.J., van den Bergh Weerman, M.A., Boeckstaens, G.E., Hommes, D.W., Hardwick, J.C., et al. (2009). Depletion of the Colonic Epithelial Precursor Cell Compartment Upon Conditional Activation of the Hedgehog Pathway. *Gastroenterology* *136*, 2195–2203.e7.
- 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.
- Druckenbrod, N.R., and Epstein, M.L. (2005). The pattern of neural crest advance in the cecum and colon. *Dev. Biol.* *287*, 125–133.
- Druckenbrod, N.R., and Epstein, M.L. (2007). Behavior of enteric neural crest-derived cells varies with respect to the migratory wavefront. *Dev. Dyn.* *236*, 84–92.
- 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.
- Duerksen, D.R., Wilhelm-Boyles, C., and Parry, D.M. (2005). Intestinal permeability in long-term follow-up of patients with celiac disease on a gluten-free diet. *Dig. Dis. Sci.* *50*, 785–790.
- Dupaul-Chicoine, J., Dagenais, M., and Saleh, M. (2013). Crosstalk between the intestinal microbiota and the innate immune system in intestinal homeostasis and inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *19*, 2227–2237.
- Dvash, E., Har-Tal, M., Barak, S., Meir, O., and Rubinstein, M. (2015). Leukotriene C4 is the major trigger of stress-induced oxidative DNA damage. *Nature Communications* *6*, 10112.
- Dyerberg, J., and Bang, H.O. (1978). Dietary fat and thrombosis. *Lancet* *1*, 152.

Références

- Eberhart, C.E., and Dubois, R.N. (1995). Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 109, 285–301.
- 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.
- Eddleston, M., and Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54, 15–36.
- 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.
- Ekbohm, 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.E., Masclee, A.A., Dekker, J., Pieters, H.-J., and Jonkers, D.M. (2013). Short-chain fatty acids activate AMP-activated protein kinase and ameliorate ethanol-induced intestinal barrier dysfunction in Caco-2 cell monolayers. *J. Nutr.* 143, 1872–1881.
- Eliakim, R., Karmeli, F., Cohen, P., Heyman, S.N., and Rachmilewitz, D. (2001). Dual effect of chronic nicotine administration: augmentation of jejunitis and amelioration of colitis induced by iodoacetamide in rats. *Int J Colorectal Dis* 16, 14–21.
- Esposito, G., Cirillo, C., Sarnelli, G., De Filippis, D., D'Armiento, F.P., Rocco, A., Nardone, G., Petruzzelli, R., Grosso, M., Izzo, P., et al. (2007). Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease. *Gastroenterology* 133, 918–925.
- Esposito, G., Capoccia, E., Turco, F., Palumbo, I., Lu, J., Steardo, A., Cuomo, R., Sarnelli, G., and Steardo, L. (2014). Palmitoylethanolamide improves colon inflammation through an enteric glia/toll like receptor 4-dependent PPAR- α activation. *Gut* 63, 1300–1312.
- 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.
- Evans, J.M., McMahan, A.D., Murray, F.E., McDevitt, D.G., and MacDonald, T.M. (1997). Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut* 40, 619–622.
- Fahlgren, A., Hammarstrom, S., Danielsson, A., and Hammarstrom, M.-L. (2004). beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 137, 379–385.
- Fakhoury, M., Al-Salami, H., Negrulj, R., and Mooranian, A. (2014). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *Journal of Inflammation Research* 113.
- Faulkner, J.R., Herrmann, J.E., Woo, M.J., Tansey, K.E., Doan, N.B., and Sofroniew, M.V. (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 24, 2143–2155.
- Feeney, M.A., Murphy, F., Clegg, A.J., Trebble, T.M., Sharer, N.M., and Snook, J.A. (2002). A case-control study of childhood environmental risk factors for the development of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 14, 529–534.
- Feinstein, D.L., Weinmaster, G.A., and Milner, R.J. (1992). Isolation of cDNA clones encoding rat glial fibrillary acidic protein: Expression in astrocytes and in Schwann cells. *Journal of Neuroscience Research* 32, 1–14.

Références

- Felder, J.B., Korelitz, B.I., Rajapakse, R., Schwarz, S., Horatagis, A.P., and Gleim, G. (2000). Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am. J. Gastroenterol.* *95*, 1949–1954.
- Ferrante, M., de Hertogh, G., Hlavaty, T., D’Haens, G., Penninckx, F., D’Hoore, A., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Geboes, K., and van Assche, G. (2006). The value of myenteric plexitis to predict early postoperative Crohn’s disease recurrence. *Gastroenterology* *130*, 1595–1606.
- Ferrari, L., Krane, M.K., and Fichera, A. (2016). Inflammatory bowel disease surgery in the biologic era. *World Journal of Gastrointestinal Surgery* *8*, 363.
- Ferreira, P., Cravo, M., Guerreiro, C.S., Tavares, L., Santos, P.M., and Brito, M. (2010). Fat intake interacts with polymorphisms of Caspase9, FasLigand and PPARgamma apoptotic genes in modulating Crohn’s disease activity. *Clin Nutr* *29*, 819–823.
- 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.
- Fetalvero, K.M., Shyu, M., Nomikos, A.P., Chiu, Y.-F., Wagner, R.J., Powell, R.J., Hwa, J., and Martin, K.A. (2006). The prostacyclin receptor induces human vascular smooth muscle cell differentiation via the protein kinase A pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *290*, H1337-1346.
- Filion, F., Bouchard, N., Goff, A.K., Lussier, J.G., and Sirois, J. (2001). Molecular Cloning and Induction of Bovine Prostaglandin E Synthase by Gonadotropins in Ovarian Follicles Prior to Ovulation in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 34323–34330.
- Findley, M.K., and Koval, M. (2009). Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life* *61*, 431–437.
- 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*, G970-979.
- Flamant, M., Aubert, P., Rolli-Derkinderen, M., Bourreille, A., Neunlist, M.R., Mahé, 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 S-nitrosoglutathione. *Gut* *60*, 473–484.
- Fletcher, E., Clark, M., and Furness, J. (2002). Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus. *Cell and Tissue Research* *308*, 339–346.
- van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology* *71*, 241–260.
- Flynn, B., Bergner, A.J., Turner, K.N., Young, H.M., and Anderson, R.B. (2007). Effect of Gdnf haploinsufficiency on rate of migration and number of enteric neural crest-derived cells. *Dev. Dyn.* *236*, 134–141.
- Fontaine-Bisson, B., Wolever, T.M.S., Chiasson, J.-L., Rabasa-Lhoret, R., Maheux, P., Josse, R.G., Leiter, L.A., Rodger, N.W., Ryan, E.A., Connelly, P.W., et al. (2007). Genetic polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha modify the association between dietary polyunsaturated fatty acids and fasting HDL-cholesterol and apo A-I concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* *86*, 768–774.
- Franchimont, D., Vermeire, S., El Housni, H., Pierik, M., Van Steen, K., Gustot, T., Quertinmont, E., Abramowicz, M., Van Gossum, A., Devière, J., et al. (2004). Deficient host-bacteria interactions in

Références

- inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 53, 987–992.
- Fries, W., Muja, C., Crisafulli, C., Cuzzocrea, S., and Mazzon, E. (2008). Dynamics of enterocyte tight junctions: effect of experimental colitis and two different anti-TNF strategies. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G938-947.
- Froicu, M., and Cantorna, M.T. (2007). Vitamin D and the vitamin D receptor are critical for control of the innate immune response to colonic injury. *BMC Immunol.* 8, 5.
- Froicu, M., Weaver, V., Wynn, T.A., McDowell, M.A., Welsh, J.E., and Cantorna, M.T. (2003). A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. *Mol. Endocrinol.* 17, 2386–2392.
- Frolkis, A., Dieleman, L.A., Barkema, H.W., Panaccione, R., Ghosh, S., Fedorak, R.N., Madsen, K., Kaplan, G.G., and Alberta IBD Consortium (2013). Environment and the inflammatory bowel diseases. *Can. J. Gastroenterol.* 27, e18-24.
- Fu, M., Lui, V.C.H., Sham, M.H., Cheung, A.N.Y., and Tam, P.K.H. (2003). HOXB5 expression is spatially and temporarily regulated in human embryonic gut during neural crest cell colonization and differentiation of enteric neuroblasts. *Dev. Dyn.* 228, 1–10.
- Fuchs, E., and Raghavan, S. (2002). GETTING UNDER THE SKIN OF EPIDERMAL MORPHOGENESIS. *Nature Reviews Genetics* 3, 199–209.
- Fukata, M., and Arditj, M. (2013). The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal Immunology* 6, 451–463.
- Fukata, M., Chen, A., Klepper, A., Krishnareddy, S., Vamadevan, A.S., Thomas, L.S., Xu, R., Inoue, H., Arditj, M., Dannenberg, A.J., et al. (2006). Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* 131, 862–877.
- Furness, J.B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 87–96.
- Furness, J.B. (2006). *The enteric nervous system* (Malden, Mass.: Blackwell Publishing).
- Furness, J.B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9, 286–294.
- Furness, J.B., Kunze, W.A., Bertrand, P.P., Clerc, N., and Bornstein, J.C. (1998). Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog. Neurobiol.* 54, 1–18.
- Furness, J.B., Jones, C., Nurgali, K., and Clerc, N. (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.* 72, 143–164.
- Gabella, G. (1972). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J. Anat.* 111, 69–97.
- Gabella, G. (1981). Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: The enteric glial cells. *Neuroscience* 6, 425–436.
- Gabella, G. (1990). On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. *Journal of the Autonomic Nervous System* 30, S59–S66.
- 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.
- Galligan, J.J., LePard, K.J., Schneider, D.A., and Zhou, X. (2000). Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System* 81, 97–103.

- Gardiner, K.R., and Dasari, B.V.M. (2007). Operative management of small bowel Crohn's disease. *Surg. Clin. North Am.* *87*, 587–610.
- Gareau, M.G., Jury, J., and Perdue, M.H. (2007). Neonatal maternal separation of rat pups results in abnormal cholinergic regulation of epithelial permeability. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *293*, G198-203.
- Gassull, M.A., Fernández-Bañares, F., Cabré, E., Papo, M., Gjaffer, M.H., Sánchez-Lombraña, J.L., Richart, C., Malchow, H., González-Huix, F., Esteve, M., et al. (2002). Fat composition may be a clue to explain the primary therapeutic effect of enteral nutrition in Crohn's disease: results of a double blind randomised multicentre European trial. *Gut* *51*, 164–168.
- Geboes, K., and Collins, S. (1998). Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol. Motil.* *10*, 189–202.
- Geboes, K., Rutgeerts, P., Ectors, N., Mebis, J., Penninckx, F., Vantrappen, G., and Desmet, V.J. (1992). Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. *Gastroenterology* *103*, 439–447.
- Gegg, M.E., Beltran, B., Salas-Pino, S., Bolanos, J.P., Clark, J.B., Moncada, S., and Heales, S.J.R. (2003). Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/neurodegeneration? *J. Neurochem.* *86*, 228–237.
- Gent, A.E., Hellier, M.D., Grace, R.H., Swarbrick, E.T., and Coggon, D. (1994). Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* *343*, 766–767.
- Gerbe, F., Legraverend, C., and Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* *69*, 2907–2917.
- Gershon, M.D. (1997). Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* *7*, 101–109.
- Gershon, M.D. (1999). Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *13 Suppl 2*, 15–30.
- Gershon, M.D. (2013). 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract: Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity *20*, 14–21.
- Gershon, M.D., and Bursztajn, S. (1978). Properties of the enteric nervous system: Limitation of access of intravascular macromolecules to the myenteric plexus and muscularis externa. *The Journal of Comparative Neurology* *180*, 467–487.
- Gershon, M.D., and Rothman, T.P. (1991). Enteric glia. *Glia* *4*, 195–204.
- Gewirtz, A.T., Collier-Hyams, L.S., Young, A.N., Kucharzik, T., Guilford, W.J., Parkinson, J.F., Williams, I.R., Neish, A.S., and Madara, J.L. (2002). Lipoxin a4 analogs attenuate induction of intestinal epithelial proinflammatory gene expression and reduce the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis. *J. Immunol.* *168*, 5260–5267.
- Ghosh, S., Armitage, E., Wilson, D., Minor, P.D., and Afzal, M.A. (2001). Detection of persistent measles virus infection in Crohn's disease: current status of experimental work. *Gut* *48*, 748–752.
- 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.
- Girardin, S.E., Hugot, J.P., and Sansonetti, P.J. (2003). Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol.* *24*, 652–658.
- Gisolfi, C.V. (2000). Is the GI System Built For Exercise? *News Physiol. Sci.* *15*, 114–119.

- Gobbetti, T., Le Faouder, P., Bertrand, J., Dubourdeau, M., Barocelli, E., Cenac, N., and Vergnolle, N. (2013). Polyunsaturated fatty acid metabolism signature in ischemia differs from reperfusion in mouse intestine. *PLoS ONE* 8, e75581.
- Gobbetti, T., Ducheix, S., le Faouder, P., Perez, T., Riols, F., Boue, J., Bertrand-Michel, J., Dubourdeau, M., Guillou, H., Perretti, M., et al. (2015). Protective effects of n-6 fatty acids-enriched diet on intestinal ischaemia/reperfusion injury involve lipoxin A₄ and its receptor: Effects of n-6 diet on ischaemia/reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology* 172, 910–923.
- Godet, P.G., May, G.R., and Sutherland, L.R. (1995). Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut* 37, 668–673.
- Goetz, M., and Kiesslich, R. (2010). Advances of endomicroscopy for gastrointestinal physiology and diseases. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G797-806.
- Goldblum, S.E., Rai, U., Tripathi, A., Thakar, M., De Leo, L., Di Toro, N., Not, T., Ramachandran, R., Puche, A.C., Hollenberg, M.D., et al. (2011). The active Zot domain (aa 288-293) increases ZO-1 and myosin 1C serine/threonine phosphorylation, alters interaction between ZO-1 and its binding partners, and induces tight junction disassembly through proteinase activated receptor 2 activation. *The FASEB Journal* 25, 144–158.
- Goldstein, A.M., Brewer, K.C., Doyle, A.M., Nagy, N., and Roberts, D.J. (2005). BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mech. Dev.* 122, 821–833.
- Gonzalez-Martinez, T., Perez-Piñera, P., Díaz-Esnal, B., and Vega, J.A. (2003). S-100 proteins in the human peripheral nervous system. *Microsc. Res. Tech.* 60, 633–638.
- Goode, T., O’Connell, J., Anton, P., Wong, H., Reeve, J., O’Sullivan, G.C., Collins, J.K., and Shanahan, F. (2000). Neurokinin-1 receptor expression in inflammatory bowel disease: molecular quantitation and localisation. *Gut* 47, 387–396.
- Goodnight, S.H., Harris, W.S., and Connor, W.E. (1981). The effects of dietary omega 3 fatty acids on platelet composition and function in man: a prospective, controlled study. *Blood* 58, 880–885.
- Goto, Y., Yamaguchi, S., Tamura, M., Mochizuki, H., Kurumatani, H., Okano, K., and Miyamoto, M. (2014). A prostacyclin analog prevents the regression of renal microvascular network by inhibiting mitochondria-dependent apoptosis in the kidney of rat progressive glomerulonephritis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 112, 16–26.
- Goyal, R.K., and Hirano, I. (1996). The enteric nervous system. *N. Engl. J. Med.* 334, 1106–1115.
- Gradel, K.O., Nielsen, H.L., Schønheyder, H.C., Ejlersen, T., Kristensen, B., and Nielsen, H. (2009). Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. *Gastroenterology* 137, 495–501.
- Gribble, F.M., and Reimann, F. (2017). Signalling in the gut endocrine axis. *Physiol. Behav.*
- Gross, K.J., and Pothoulakis, C. (2007). Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 918–932.
- Gross, E.R., Gershon, M.D., Margolis, K.G., Gertsberg, Z.V., Li, Z., and Cowles, R.A. (2012). Neuronal serotonin regulates growth of the intestinal mucosa in mice. *Gastroenterology* 143, 408–417.e2.
- Grubišić, V., and Gulbransen, B.D. (2017). Enteric glia: the most alimentary of all glia. *J. Physiol. (Lond.)* 595, 557–570.
- Grundy, D., and Schemann, M. (2007). Enteric nervous system: Current Opinion in Gastroenterology 23, 121–126.

Références

- Grundy, D., Al-Chaer, E.D., Aziz, Q., Collins, S.M., Ke, M., Taché, Y., and Wood, J.D. (2006). Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology* 130, 1391–1411.
- Guarner, F., and Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet* 361, 512–519.
- Guerreiro, C.S., Ferreira, P., Tavares, L., Santos, P.M., Neves, M., Brito, M., and Cravo, M. (2009). Fatty acids, IL6, and TNFalpha polymorphisms: an example of nutrigenetics in Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 2241–2249.
- Gulbransen, B.D., and Sharkey, K.A. (2009). Purinergic neuron-to-glia signaling in the enteric nervous system. *Gastroenterology* 136, 1349–1358.
- 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.
- Guo, Y., Zhang, W., Giroux, C., Cai, Y., Ekambaram, P., Dilly, A. -k., Hsu, A., Zhou, S., Maddipati, K.R., Liu, J., et al. (2011). Identification of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR31 as a Receptor for 12-(S)-Hydroxyeicosatetraenoic Acid. *Journal of Biological Chemistry* 286, 33832–33840.
- Gupta, R.A., Tan, J., Krause, W.F., Geraci, M.W., Willson, T.M., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2000). Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 13275–13280.
- Haché, M., Denault, A., Bélisle, S., Robitaille, D., Couture, P., Sheridan, P., Pellerin, M., Babin, D., Noël, N., Guertin, M.-C., et al. (2003). Inhaled epoprostenol (prostacyclin) and pulmonary hypertension before cardiac surgery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 125, 642–649.
- 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.
- 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.
- 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.
- Halme, L. (2006). Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* 12, 3668.
- Hamby, M.E., and Sofroniew, M.V. (2010). Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics* 7, 494–506.
- 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. *The Lancet* 357, 1925–1928.
- Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., et al. (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat. Genet.* 39, 207–211.
- Hanani, M., and reichenbach, A. (1994). Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Cell and Tissue Research* 278, 153–160.
- Hanani, M., Maudlej, N., and Härtig, W. (1999). Morphology and intercellular communication in glial cells of intramural ganglia from the guinea-pig urinary bladder. *J. Auton. Nerv. Syst.* 76, 62–67.
- 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, G644-651.

- Hanauer, S.B. (2006). Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm. Bowel Dis.* 12 Suppl 1, S3-9.
- Hancock, L., and Mortensen, N.J. (2008). How often do IBD patients require resection of their intestine? *Inflamm. Bowel Dis.* 14 Suppl 2, S68-69.
- Hansen, M.B. (2003). The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol. Toxicol.* 92, 105–113.
- Hansen, M.B., and Skadhauge, E. (1995). New aspects of the pathophysiology and treatment of secretory diarrhoea. *Physiol Res* 44, 61–78.
- 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, M.B., Dresner, L.S., and Wait, R.B. (1998). Profile of neurohumoral agents on mesenteric and intestinal blood flow in health and disease. *Physiol Res* 47, 307–327.
- Hart, A., and Kamm, M.A. (2002). Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16, 2017–2028.
- 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.
- van haver, e. r., de vooght, l., oste, m., sangild, p. t., thymann, t., weyns, a. l. m., and van ginneken, c. j. (2008). Postnatal and diet-dependent increases in enteric glial cells and VIP-containing neurones in preterm pigs. *Neurogastroenterology & Motility* 20, 1070–1079.
- Hawkes, C.H., Del Tredici, K., and Braak, H. (2007). Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33, 599–614.
- Hawkey, C.J., Karmeli, F., and Rachmilewitz, D. (1983). Imbalance of prostacyclin and thromboxane synthesis in Crohn's disease. *Gut* 24, 881–885.
- Haynes, R.L., and van Leyen, K. (2013). 12/15-Lipoxygenase Expression Is Increased in Oligodendrocytes and Microglia of Periventricular Leukomalacia. *Developmental Neuroscience*.
- 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.
- Hegazi, R.A.F., Saad, R.S., Mady, H., Matarese, L.E., O'Keefe, S., and Kandil, H.M. (2006). Dietary fatty acids modulate chronic colitis, colitis-associated colon neoplasia and COX-2 expression in IL-10 knockout mice. *Nutrition* 22, 275–282.
- Heimerl, S., Moehle, C., Zahn, A., Boettcher, A., Stremmel, W., Langmann, T., and Schmitz, G. (2006). Alterations in intestinal fatty acid metabolism in inflammatory bowel disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 341–350.
- 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.
- Hendrickson, B.A., Gokhale, R., and Cho, J.H. (2002). Clinical Aspects and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 79–94.
- Hens, J., Vanderwinden, J.-M., De Laet, M.-H., Scheuermann, D.W., and Timmermans, J.-P. (2001). Morphological and neurochemical identification of enteric neurones with mucosal projections in the human small intestine. *Journal of Neurochemistry* 76, 464–471.

Références

- Hering, N.A., Andres, S., Fromm, A., van Tol, E.A., Amasheh, M., Mankertz, J., Fromm, M., and Schulzke, J.D. (2011). Transforming Growth Factor- β , a Whey Protein Component, Strengthens the Intestinal Barrier by Upregulating Claudin-4 in HT-29/B6 Cells. *Journal of Nutrition* *141*, 783–789.
- Hermiston, M.L., and Gordon, J.I. (1995). Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* *270*, 1203–1207.
- Hertz, L. (1965). Possible role of neuroglia: a potassium-mediated neuronal–neuroglial–neuronal impulse transmission system. *Nature* *206*, 1091–1094.
- Higuchi, L.M., Khalili, H., Chan, A.T., Richter, J.M., Bousvaros, A., and Fuchs, C.S. (2012). A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *Am. J. Gastroenterol.* *107*, 1399–1406.
- Hoehner, J., Wester, T., Pahlman, S., and Olsen, L. (1996). Localization of neurotrophins and their high-affinity receptors during human enteric nervous system development. *Gastroenterology* *110*, 756–767.
- Hoff, S., Zeller, F., von Weyhern, C.W.H., Wegner, M., Schemann, M., Michel, K., and Rühl, A. (2008). Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J. Comp. Neurol.* *509*, 356–371.
- 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*, G401-408.
- Hollander, D., Vadheim, C.M., Brettholz, E., Petersen, G.M., Delahunty, T., and Rotter, J.I. (1986). Increased intestinal permeability in patients with Crohn’s disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann. Intern. Med.* *105*, 883–885.
- Hollenbach, E., Ruhl, A., Zoller, M., and Stremmel, W. (2000). T cell activation by enteric glia ? A novel pathway for the amplification of inflammatory responses in the enteric nervous system (ENS). *Gastroenterology* *118*, A184–A185.
- Holzer, P. (2002). Sensory neurone responses to mucosal noxae in the upper gut: relevance to mucosal integrity and gastrointestinal pain. *Neurogastroenterology and Motility* *14*, 459–475.
- Hou, J.K., Abraham, B., and El-Serag, H. (2011). Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am. J. Gastroenterol.* *106*, 563–573.
- Houades, V., Rouach, N., Ezan, P., Kirchhoff, F., Koulakoff, A., and Giaume, C. (2006). Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain. *Neuron Glia Biol.* *2*, 3–14.
- Howe, K.L., Reardon, C., Wang, A., Nazli, A., and McKay, D.M. (2005). Transforming growth factor- β 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.
- Huang, Z.-L., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2007). Prostaglandins and adenosine in the regulation of sleep and wakefulness. *Curr Opin Pharmacol* *7*, 33–38.
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O’Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* *411*, 599–603.

Références

- Huizinga, J.D., Robinson, T.L., and Thomsen, L. (2000). The search for the origin of rhythmicity in intestinal contraction; from tissue to single cells. *Neurogastroenterol. Motil.* 12, 3–9.
- Husebye, E. (1997). Communication between CNS and ENS: do regulatory peptides play a role in control of sleep modulation of gastrointestinal motility? *Neurogastroenterol. Motil.* 9, 1–3.
- Hussain, M.M. (2014). Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr. Opin. Lipidol.* 25, 200–206.
- Huttunen, H.J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A.L., Donato, R., and Rauvala, H. (2000). Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J. Biol. Chem.* 275, 40096–40105.
- Hwang, J.-M. (2008). Surgery for inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* 14, 2678.
- IBD in EPIC Study Investigators, Tjonneland, A., Overvad, K., Bergmann, M.M., Nagel, G., Linseisen, J., Hallmans, G., Palmqvist, R., Sjodin, H., Hagglund, G., et al. (2009). Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: a nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut* 58, 1606–1611.
- Ibiza, S., García-Cassani, B., Ribeiro, H., Carvalho, T., Almeida, L., Marques, R., Misic, A.M., Bartow-McKenney, C., Larson, D.M., Pavan, W.J., et al. (2016). Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature* 535, 440–443.
- Ikehata, A., Hiwatashi, N., Kinouchi, Y., Yamazaki, H., Ito, K., and Toyota, T. (1995). Altered leukotriene B4 metabolism in colonic mucosa with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 30, 44–49.
- Ito, K., Chung, K.F., and Adcock, I.M. (2006). Update on glucocorticoid action and resistance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 522–543.
- Iwamoto, M., Koji, T., Makiyama, K., Kobayashi, N., and Nakane, P.K. (1996). Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J. Pathol.* 180, 152–159.
- Iwanaga, K., Nakamura, T., Maeda, S., Aritake, K., Hori, M., Urade, Y., Ozaki, H., and Murata, T. (2014). Mast cell-derived prostaglandin D2 inhibits colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Cancer Res.* 74, 3011–3019.
- Jacob, C., Yang, P.-C., Darmoul, D., Amadesi, S., Saito, T., Cottrell, G.S., Coelho, A.-M., Singh, P., Grady, E.F., Perdue, M., et al. (2005). Mast Cell Tryptase Controls Paracellular Permeability of the Intestine: ROLE OF PROTEASE-ACTIVATED RECEPTOR 2 AND -ARRESTINS. *Journal of Biological Chemistry* 280, 31936–31948.
- Jahovic, N., Gedik, N., Ercan, F., şirvanci, S., Yüksel, M., şener, G., and Alican, İ. (2006). Effects of statins on experimental colitis in normocholesterolemic rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 41, 954–962.
- Jain, A.P., Aggarwal, K.K., and Zhang, P.-Y. (2015). Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19, 441–445.
- 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.
- Järvinen, K.M., Konstantinou, G.N., Pilapil, M., Arrieta, M.-C., Noone, S., Sampson, H.A., Meddings, J., and Nowak-Węgrzyn, A. (2013). Intestinal permeability in children with food allergy on specific elimination diets. *Pediatr Allergy Immunol* 24, 589–595.

- Jeong, D., Park, S., Kim, H., Kim, C.-J., Ahn, T.S., Bae, S.B., Kim, H.J., Kim, T.H., Im, J., Lee, M.S., et al. (2016). RhoA is associated with invasion and poor prognosis in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* *48*, 714–722.
- Jess, T., Frisch, M., Jørgensen, K.T., Pedersen, B.V., and Nielsen, N.M. (2012). Increased risk of inflammatory bowel disease in women with endometriosis: a nationwide Danish cohort study. *Gut* *61*, 1279–1283.
- Jessen, K.R. (2004). Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* *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. *Journal of Neuroimmunology* *8*, 377–393.
- Jez, J.M., Flynn, T.G., and Penning, T.M. (1997). A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. Pharmacol.* *54*, 639–647.
- Jing, H., Yao, J., Liu, X., Fan, H., Zhang, F., Li, Z., Tian, X., and Zhou, Y. (2014). 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. *J. Surg. Res.* *187*, 252–261.
- Johansen, F.-E., and Kaetzel, C.S. (2011). Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunology* *4*, 598–602.
- Johansson, M.E.V., and Hansson, G.C. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature Reviews Immunology* *16*, 639–649.
- Johnston, A., Gudjonsson, J.E., Sigmundsdottir, H., Runar Ludviksson, B., and Valdimarsson, H. (2005). The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clinical Immunology* *114*, 154–163.
- Jørgensen, S.P., Agnholt, J., Glerup, H., Lyhne, S., Villadsen, G.E., Hvas, C.L., Bartels, L.E., Kelsen, J., Christensen, L.A., and Dahlerup, J.F. (2010). Clinical trial: vitamin D3 treatment in Crohn's disease - a randomized double-blind placebo-controlled study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *32*, 377–383.
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Philip Schumm, L., Sharma, Y., Anderson, C.A., et al. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* *491*, 119–124.
- Kabouridis, P.S., Lasrado, R., McCallum, S., Chng, S.H., Snippert, H.J., Clevers, H., Pettersson, S., and Pachnis, V. (2015a). The gut microbiota keeps enteric glial cells on the move; prospective roles of the gut epithelium and immune system. *Gut Microbes* *6*, 398–403.
- Kabouridis, P.S., Lasrado, R., McCallum, S., Chng, S.H., Snippert, H.J., Clevers, H., Pettersson, S., and Pachnis, V. (2015b). Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. *Neuron* *85*, 289–295.
- 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.

Références

- Kaeffer, B. (2011). Survival of Exfoliated Epithelial Cells: A Delicate Balance between Anoikis and Apoptosis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 1–9.
- Kamei, D., Murakami, M., Nakatani, Y., Ishikawa, Y., Ishii, T., and Kudo, I. (2003). Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 19396–19405.
- Kaplan, G.G., Jackson, T., Sands, B.E., Frisch, M., Andersson, R.E., and Korzenik, J. (2008). The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 2925–2931.
- 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. *The American Journal of Gastroenterology* 105, 2412–2419.
- Kapur, R.P. (2000). Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: experimental support for an evolutionarily conserved model. *Dev. Biol.* 227, 146–155.
- Kaser, A., Lee, A.-H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E.S., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., et al. (2008). XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134, 743–756.
- Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R.S. (2010). Inflammatory Bowel Disease. *Annual Review of Immunology* 28, 573–621.
- 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. *Journal of Pediatric Surgery* 25, 514–519.
- Katsuyama, M., Sugimoto, Y., Namba, T., Irie, A., Negishi, M., Narumiya, S., and Ichikawa, A. (1994). Cloning and expression of a cDNA for the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett.* 344, 74–78.
- Kelles, A., Janssens, J., and Tack, J. (2000). IL-1beta and IL-6 excite neurones and suppress cholinergic neurotransmission in the myenteric plexus of the guinea pig. *Neurogastroenterology and Motility* 12, 531–538.
- Kelsh, R.N. (2006). Sorting out Sox10 functions in neural crest development. *Bioessays* 28, 788–798.
- Khalili, H., Higuchi, L.M., Ananthakrishnan, A.N., Manson, J.E., Feskanich, D., Richter, J.M., Fuchs, C.S., and Chan, A.T. (2012). Hormone therapy increases risk of ulcerative colitis but not Crohn's disease. *Gastroenterology* 143, 1199–1206.
- Khalili, H., Higuchi, L.M., Ananthakrishnan, A.N., Richter, J.M., Feskanich, D., Fuchs, C.S., and Chan, A.T. (2013). Oral contraceptives, reproductive factors and risk of inflammatory bowel disease. *Gut* 62, 1153–1159.
- Khen, N., Jaubert, F., Sauvat, F., Fourcade, L., Jan, D., Martinovic, J., Vekemans, M., Landais, P., Brousse, N., Leborgne, M., et al. (2004). Fetal intestinal obstruction induces alteration of enteric nervous system development in human intestinal atresia. *Pediatr. Res.* 56, 975–980.
- Khor, B., Gardet, A., and Xavier, R.J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 307–317.
- Kiesslich, R., Goetz, M., Angus, E.M., Hu, Q., Guan, Y., Potten, C., Allen, T., Neurath, M.F., Shroyer, N.F., Montrose, M.H., et al. (2007). Identification of epithelial gaps in human small and large intestine by confocal endomicroscopy. *Gastroenterology* 133, 1769–1778.
- Kiesslich, R., Duckworth, C.A., Moussata, D., Gloeckner, A., Lim, L.G., Goetz, M., Pritchard, D.M., Galle, P.R., Neurath, M.F., and Watson, A.J.M. (2012). Local barrier dysfunction identified by confocal laser endomicroscopy predicts relapse in inflammatory bowel disease. *Gut* 61, 1146–1153.

Références

- Kikuchi, A., Kishida, S., and Yamamoto, H. (2006). Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Experimental & Molecular Medicine* 38, 1–10.
- Kim, W.J., Kim, J.H., and Jang, S.K. (2007). Anti-inflammatory lipid mediator 15d-PGJ2 inhibits translation through inactivation of eIF4A. *EMBO J.* 26, 5020–5032.
- Kim, Y.I., Chung, K.-Y., So, B.J., and Park, J.J. (2012). Mucosal protective effect of PGI2 on canine small bowel auto-transplantation. *Transplant. Proc.* 44, 1169–1170.
- Kimball, B.C., and Mulholland, M.W. (2002). Enteric Glia Exhibit P2U Receptors that Increase Cytosolic Calcium by a Phospholipase C-Dependent Mechanism. *Journal of Neurochemistry* 66, 604–612.
- Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X., and Reinecker, H.C. (2000). Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 118, 1001–1011.
- Kirchgessner, A.L. (2001). Glutamate in the enteric nervous system. *Curr Opin Pharmacol* 1, 591–596.
- Kleessen, B., Kroesen, A.J., Buhr, H.J., and Blaut, M. (2002). Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand. J. Gastroenterol.* 37, 1034–1041.
- Klein, T., Benders, J., Roth, F., Baudler, M., Siegle, I., and Kömhoff, M. (2015). Expression of Prostacyclin-Synthase in Human Breast Cancer: Negative Prognostic Factor and Protection against Cell Death *In Vitro*. *Mediators of Inflammation* 2015, 1–9.
- Kleiveland, C.R., Kassem, M., and Lea, T. (2008). Human mesenchymal stem cell proliferation is regulated by PGE2 through differential activation of cAMP-dependent protein kinase isoforms. *Exp. Cell Res.* 314, 1831–1838.
- 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.
- Knoch, B., Barnett, M.P.G., McNabb, W.C., Zhu, S., Park, Z.A., Khan, A., and Roy, N.C. (2010). Dietary arachidonic acid-mediated effects on colon inflammation using transcriptome analysis. *Mol Nutr Food Res* 54 Suppl 1, S62-74.
- Kobayashi, K.S., Chamillard, 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.
- Koloski, N.A. (2008). Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: A critical review of the literature. *World Journal of Gastroenterology* 14, 165.
- Komuro, T., Bałuk, P., and Burnstock, G. (1982). An ultrastructural study of neurons and non-neuronal cells in the myenteric plexus of the rabbit colon. *Neuroscience* 7, 1797–1806.
- König, J., Wells, J., Cani, P.D., García-Ródenas, C.L., MacDonald, T., Mercenier, A., Whyte, J., Troost, F., and Brummer, R.-J. (2016). Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clinical and Translational Gastroenterology* 7, e196.
- Kopp, Z.A., Jain, U., Van Limbergen, J., and Stadnyk, A.W. (2015). Do Antimicrobial Peptides and Complement Collaborate in the Intestinal Mucosa? *Frontiers in Immunology* 6.
- Korzenik, J.R. (2005). Past and current theories of etiology of IBD: toothpaste, worms, and refrigerators. *J. Clin. Gastroenterol.* 39, S59-65.
- 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.

Références

- 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.
- Krauter, E.M., Strong, D.S., Brooks, E.M., Linden, D.R., Sharkey, K.A., and Mawe, G.M. (2007a). Changes in colonic motility and the electrophysiological properties of myenteric neurons persist following recovery from trinitrobenzene sulfonic acid colitis in the guinea pig. *Neurogastroenterol. Motil.* 19, 990–1000.
- Krauter, E.M., Linden, D.R., Sharkey, K.A., and Mawe, G.M. (2007b). Synaptic plasticity in myenteric neurons of the guinea-pig distal colon: presynaptic mechanisms of inflammation-induced synaptic facilitation. *J. Physiol. (Lond.)* 581, 787–800.
- Krug, S.M., Amasheh, S., Richter, J.F., Milatz, S., Gunzel, 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. *Molecular Biology of the Cell* 20, 3713–3724.
- Krzyzaniak, M., Peterson, C., Loomis, W., Hageny, A.-M., Wolf, P., Reys, L., Putnam, J., Eliceiri, B., Baird, A., Bansal, V., et al. (2011). Postinjury vagal nerve stimulation protects against intestinal epithelial barrier breakdown. *J Trauma* 70, 1168-1175; discussion 1175-1176.
- 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.
- Kundumani-Sridharan, V., Niu, J., Wang, D., Van Quyen, D., Zhang, Q., Singh, N.K., Subramani, J., Karri, S., and Rao, G.N. (2010). 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced angiogenesis requires Src-mediated Egr-1-dependent rapid induction of FGF-2 expression. *Blood* 115, 2105–2116.
- Kunze, W.A., and Furness, J.B. (1999). The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 117–142.
- Lacy, E.R. (1988). Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. *J. Clin. Gastroenterol.* 10 Suppl 1, S72-77.
- Lakatos, P.L., Szamosi, T., and Lakatos, L. (2007). Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J. Gastroenterol.* 13, 6134–6139.
- Lake, J.I., and Heuckeroth, R.O. (2013). Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 305, G1-24.
- Lakhan, S.E., and Kirchgessner, A. (2010). Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. *Journal of Neuroinflammation* 7, 37.
- Lallès, J.-P. (2016). Microbiota-host interplay at the gut epithelial level, health and nutrition. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 7.
- Lambeau, G., and Gelb, M.H. (2008). Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 495–520.
- 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. (Lond.)* 33, 34–51.
- Lashner, B.A., and Loftus, E.V. (2006). True or false? The hygiene hypothesis for Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 1003–1004.
- Laukoetter, M.G., Nava, P., Lee, W.Y., Severson, E.A., Capaldo, C.T., Babbin, B.A., Williams, I.R., Koval, M., Peatman, E., Campbell, J.A., et al. (2007). JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J. Exp. Med.* 204, 3067–3076.

Références

- Lauritsen, K., Laursen, L.S., Bukhave, K., and Rask-Madsen, J. (1986). Effects of topical 5-aminosalicylic acid and prednisolone on prostaglandin E2 and leukotriene B4 levels determined by equilibrium in vivo dialysis of rectum in relapsing ulcerative colitis. *Gastroenterology* 91, 837–844.
- Lauritsen, K., Laursen, L.S., Bukhave, K., and Rask-Madsen, J. (1988). In vivo profiles of eicosanoids in ulcerative colitis, Crohn's colitis, and Clostridium difficile colitis. *Gastroenterology* 95, 11–17.
- Le Berre-Scoul, C., Chevalier, J., Oleynikova, E., Cossais, F., Talon, S., Neunlist, M., and Boudin, H. (2017). A novel enteric neuron-glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development: Enteric glia control in neuronal development. *The Journal of Physiology* 595, 583–598.
- Le Faouder, P., Baillif, V., Spreadbury, I., Motta, J.-P., Rousset, P., Chêne, G., Guigné, C., Tercé, F., Vanner, S., Vergnolle, N., et al. (2013). 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.* 932, 123–133.
- Le Loupp, A.-G., Bach-Ngohou, K., Bourreille, A., Boudin, H., Rolli-Derkinderen, M., Denis, M.G., Neunlist, M., and Masson, D. (2015). Activation of the prostaglandin D2 metabolic pathway in Crohn's disease: involvement of the enteric nervous system. *BMC Gastroenterol* 15, 112.
- Leaf, A., Kang, J.X., Xiao, Y.F., and Billman, G.E. (1999). n-3 fatty acids in the prevention of cardiac arrhythmias. *Lipids* 34 Suppl, S187-189.
- Lee, J.C., Thuneberg, L., Berezin, I., and Huizinga, J.D. (1999). Generation of slow waves in membrane potential is an intrinsic property of interstitial cells of Cajal. *Am. J. Physiol.* 277, G409-423.
- Lehmann, C., König, J.P., Dettmann, J., Birnbaum, J., and Kox, W.J. (2001). Effects of iloprost, a stable prostacyclin analog, on intestinal leukocyte adherence and microvascular blood flow in rat experimental endotoxemia. *Crit. Care Med.* 29, 1412–1416.
- 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. *Colorectal Dis* 11, 572–583.
- Levenstein, S., Prantera, C., Varvo, V., Scribano, M.L., Andreoli, A., Luzi, C., Arcà, M., Berto, E., Milite, G., and Marcheggiano, A. (2000). Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 1213–1220.
- Li, N. (2004). Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 287, G726–G733.
- Li, N., and Neu, J. (2009). Glutamine Deprivation Alters Intestinal Tight Junctions via a PI3-K/Akt Mediated Pathway in Caco-2 Cells. *Journal of Nutrition* 139, 710–714.
- Li, Q., Zhang, Q., Wang, M., Zhao, S., Xu, G., and Li, J. (2008a). n-3 polyunsaturated fatty acids prevent disruption of epithelial barrier function induced by proinflammatory cytokines. *Mol. Immunol.* 45, 1356–1365.
- Li, Q., Zhang, Q., Zhang, M., Wang, C., Zhu, Z., Li, N., and Li, J. (2008b). Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on membrane microdomain localization of tight junction proteins in experimental colitis. *FEBS J.* 275, 411–420.
- Ligumsky, M., Karmeli, F., Sharon, P., Zor, U., Cohen, F., and Rachmilewitz, D. (1981). Enhanced thromboxane A2 and prostacyclin production by cultured rectal mucosa in ulcerative colitis and its inhibition by steroids and sulfasalazine. *Gastroenterology* 81, 444–449.
- Lim, H., and Dey, S.K. (2002). A novel pathway of prostacyclin signaling-hanging out with nuclear receptors. *Endocrinology* 143, 3207–3210.

Références

- Linden, D.R. (2012). Colitis is associated with a loss of intestinofugal neurons. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *303*, G1096-1104.
- Linden, D.R., Sharkey, K.A., and Mawe, G.M. (2003). Enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea-pig distal colon. *J. Physiol. (Lond.)* *547*, 589–601.
- Linden, D.R., Couvrette, J.M., Ciolino, A., McQuoid, C., Blaszyk, H., Sharkey, K.A., and Mawe, G.M. (2005). Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterol. Motil.* *17*, 751–760.
- 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*, e324-338.
- Loftus, E.V., and Sandborn, W.J. (2002). Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* *31*, 1–20.
- Lomax, A.E., Bertrand, P.P., and Furness, J.B. (2001). Electrophysiological characteristics distinguish three classes of neuron in submucosal ganglia of the guinea-pig distal colon. *Neuroscience* *103*, 245–255.
- Lomax, A.E., Fernández, E., and Sharkey, K.A. (2005a). Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol. Motil.* *17*, 4–15.
- Lomax, A.E., Mawe, G.M., and Sharkey, K.A. (2005b). Synaptic facilitation and enhanced neuronal excitability in the submucosal plexus during experimental colitis in guinea-pig. *J. Physiol. (Lond.)* *564*, 863–875.
- Lomax, A.E., O’Hara, J.R., Hyland, N.P., Mawe, G.M., and Sharkey, K.A. (2007). Persistent alterations to enteric neural signaling in the guinea pig colon following the resolution of colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *292*, G482-491.
- López-Posadas, R., Becker, C., Günther, C., Tenzer, S., Amann, K., Billmeier, U., Atreya, R., Fiorino, G., Vetrano, S., Danese, S., et al. (2016). Rho-A prenylation and signaling link epithelial homeostasis to intestinal inflammation. *J. Clin. Invest.* *126*, 611–626.
- López-Vales, R., Navarro, X., Shimizu, T., Baskakis, C., Kokotos, G., Constantinou-Kokotou, V., Stephens, D., Dennis, E.A., and David, S. (2008). Intracellular phospholipase A(2) group IVA and group VIA play important roles in Wallerian degeneration and axon regeneration after peripheral nerve injury. *Brain* *131*, 2620–2631.
- Lu, W., Zhao, X., Zou, S., and Huang, J. (2012). A fluorimetric assay for human reticulocyte 15-lipoxygenase-1 activity. *Analytical Biochemistry* *426*, 66–68.
- Lundqvist, A., Sandstedt, M., Sandstedt, J., Wickelgren, R., Hansson, G.I., Jeppsson, A., and Hultén, L.M. (2016). The Arachidonate 15-Lipoxygenase Enzyme Product 15-HETE Is Present in Heart Tissue from Patients with Ischemic Heart Disease and Enhances Clot Formation. *PLOS ONE* *11*, e0161629.
- Luther, J., Dave, M., Higgins, P.D.R., and Kao, J.Y. (2010). Association between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature. *Inflamm. Bowel Dis.* *16*, 1077–1084.
- Ma, T.Y. (2004a). TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* *286*, 367G–376.
- Ma, T.Y. (2004b). Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* *288*, G422–G430.

Références

- Ma, J., Zhang, L., Zhang, J., Liu, M., Wei, L., Shen, T., Ma, C., Wang, Y., Chen, Y., and Zhu, D. (2013). 15-Lipoxygenase-1/15-hydroxyeicosatetraenoic acid promotes hepatocellular cancer cells growth through protein kinase B and heat shock protein 90 complex activation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45, 1031–1041.
- Ma, K., Nunemaker, C.S., Wu, R., Chakrabarti, S.K., Taylor-Fishwick, D.A., and Nadler, J.L. (2010). 12-Lipoxygenase Products Reduce Insulin Secretion and β -Cell Viability in Human Islets. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95, 887–893.
- Ma, T.Y., Nguyen, D., Bui, V., Nguyen, H., and Hoa, N. (1999). Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am. J. Physiol.* 276, G965-974.
- 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. (Lond.)* 589, 3333–3348.
- MacEachern, S.J., Patel, B.A., Keenan, C.M., Dicay, M., Chapman, K., McCafferty, D.-M., Savidge, T.C., Beck, P.L., MacNaughton, W.K., and Sharkey, K.A. (2015). Inhibiting Inducible Nitric Oxide Synthase in Enteric Glia Restores Electrogenic Ion Transport in Mice With Colitis. *Gastroenterology* 149, 445–455.e3.
- Macpherson, A., Khoo, U.Y., Forgacs, I., Philpott-Howard, J., and Bjarnason, I. (1996). Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 38, 365–375.
- Maddox, J.F., and Serhan, C.N. (1996). Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. *J. Exp. Med.* 183, 137–146.
- 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.
- Madsen, K.L., Malfair, D., Gray, D., Doyle, J.S., Jewell, L.D., and Fedorak, R.N. (1999). Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm. Bowel Dis.* 5, 262–270.
- Maeda, S., Hsu, L.-C., Liu, H., Bankston, L.A., Iimura, M., Kagnoff, M.F., Eckmann, L., and Karin, M. (2005). Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* 307, 734–738.
- 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.
- Mais, D.E., Saussy, D.L., Magee, D.E., and Bowling, N.L. (1990). Interaction of 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE and 5,12-diHETE at the human platelet thromboxane A2/prostaglandin H2 receptor. *Eicosanoids* 3, 121–124.
- Maka, M., Claus Stolt, C., and Wegner, M. (2005). Identification of Sox8 as a modifier gene in a mouse model of Hirschsprung disease reveals underlying molecular defect. *Developmental Biology* 277, 155–169.
- Mammen, J.M.V., and Matthews, J.B. (2003). Mucosal repair in the gastrointestinal tract: *Critical Care Medicine* 31, S532–S537.
- Man, A.L., Bertelli, E., Rentini, S., Regoli, M., Briars, G., Marini, M., Watson, A.J.M., and Nicoletti, C. (2015). Age-associated modifications of intestinal permeability and innate immunity in human small intestine. *Clinical Science* 129, 515–527.

Références

- 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.
- Manev, H., and Manev, R. (2006). 5-Lipoxygenase (ALOX5) and FLAP (ALOX5AP) gene polymorphisms as factors in vascular pathology and Alzheimer's disease. *Med. Hypotheses* *66*, 501–503.
- Mangino, M.J., Brounts, L., Harms, B., and Heise, C. (2006). Lipoxin biosynthesis in inflammatory bowel disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *79*, 84–92.
- Marchionni, M.A., Goodearl, A.D.J., Su Chen, M., Bermingham-McDonogh, O., Kirk, C., Hendricks, M., Danehy, F., Misumi, D., Sudhalter, J., Kobayashi, K., et al. (1993). Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* *362*, 312–318.
- Margolis, K.G., and Gershon, M.D. (2009). Neuropeptides and inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* *25*, 503–511.
- Margolis, K.G., Stevanovic, K., Karamooz, N., Li, Z.S., Ahuja, A., D'Autréaux, F., Saurman, V., Chalazonitis, A., and Gershon, M.D. (2011). Enteric neuronal density contributes to the severity of intestinal inflammation. *Gastroenterology* *141*, 588–598, 598.e1-2.
- Marini, M., Bamias, G., Rivera-Nieves, J., Moskaluk, C.A., Hoang, S.B., Ross, W.G., Pizarro, T.T., and Cominelli, F. (2003). TNF-alpha neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 8366–8371.
- 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.
- Masoodi, M., Pearl, D.S., Eiden, M., Shute, J.K., Brown, J.F., Calder, P.C., and Trebble, T.M. (2013). Altered Colonic Mucosal Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) Derived Lipid Mediators in Ulcerative Colitis: New Insight into Relationship with Disease Activity and Pathophysiology. *PLoS ONE* *8*, e76532.
- Matsuda, S., and Koyasu, S. (2000). Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* *47*, 119–125.
- Matsunaga, H., Hokari, R., Kurihara, C., Okada, Y., Takebayashi, K., Okudaira, K., Watanabe, C., Komoto, S., Nakamura, M., Tsuzuki, Y., et al. (2008). Omega-3 fatty acids exacerbate DSS-induced colitis through decreased adiponectin in colonic subepithelial myofibroblasts. *Inflamm. Bowel Dis.* *14*, 1348–1357.
- Matsuoka, T., Hirata, M., Tanaka, H., Takahashi, Y., Murata, T., Kabashima, K., Sugimoto, Y., Kobayashi, T., Ushikubi, F., Aze, Y., et al. (2000). Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science* *287*, 2013–2017.
- May, G.R., Sutherland, L.R., and Meddings, J.B. (1993). Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* *104*, 1627–1632.
- Mazumdar, S., and Das, K.M. (1992). Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in the colon from normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* *87*, 176–181.
- 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.
- Mazzucchelli, L., Hauser, C., Zraggen, K., Wagner, H.E., Hess, M.W., Laissue, J.A., and Mueller, C. (1996). Differential in situ expression of the genes encoding the chemokines MCP-1 and RANTES in human inflammatory bowel disease. *The Journal of Pathology* *178*, 201–206.

Références

- 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.
- McClain, J.L., Fried, D.E., and Gulbransen, B.D. (2015). Agonist-evoked Ca(2+) signaling in enteric glia drives neural programs that regulate intestinal motility in mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 1, 631–645.
- McGovern, D.P.B., Hysi, P., Ahmad, T., van Heel, D.A., Moffatt, M.F., Carey, A., Cookson, W.O.C., and Jewell, D.P. (2005). Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1245–1250.
- McHugh, N.J., Csuka, M., Watson, H., Belcher, G., Amadi, A., Ring, E.F., Black, C.M., and Maddison, P.J. (1988). Infusion of iloprost, a prostacyclin analogue, for treatment of Raynaud's phenomenon in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 47, 43–47.
- McNees, A.L., Markesich, D., Zayyani, N.R., and Graham, D.Y. (2015). Mycobacterium paratuberculosis as a cause of Crohn's disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 9, 1523–1534.
- Meddings, J.B., Sutherland, L.R., and May, G.R. (1994). Intestinal permeability in patients with Crohn's disease. *Gut* 35, 1675–1676.
- Medema, J.P., and Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* 474, 318–326.
- Meissner, G. (1857). Über die Nerven der Darmwand. *Z Ration Med N F* 8, 364–366.
- 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, 267–273, e110.
- Meyer, A.M., Ramzan, N.N., Heigh, R.I., and Leighton, J.A. (2006). Relapse of inflammatory bowel disease associated with use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Dig. Dis. Sci.* 51, 168–172.
- Miampamba, M., and Sharkey, K.A. (1999). c-Fos expression in the myenteric plexus, spinal cord and brainstem following injection of formalin in the rat colonic wall. *Journal of the Autonomic Nervous System* 77, 140–151.
- 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, G979-991.
- Mitchell, M.D., Chang, M.C., Chaiworapongsa, T., Lan, H.-Y., Helliwell, R.J.A., Romero, R., and Sato, T.A. (2005). Identification of 9alpha,11beta-prostaglandin F2 in human amniotic fluid and characterization of its production by human gestational tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 4244–4248.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 56–68.
- Mittal, R., and Coopersmith, C.M. (2014). Redefining the gut as the motor of critical illness. *Trends in Molecular Medicine* 20, 214–223.
- Moeser, A.J., Nighot, P.K., Ryan, K.A., Wooten, J.G., and Blikslager, A.T. (2006). Prostaglandin-mediated inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 2 stimulates recovery of barrier function in ischemia-injured intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291, G885-894.
- Molodecky, N.A., and Kaplan, G.G. (2010). Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 6, 339–346.

Références

- Moriez, R., Abdo, H., Chaumette, T., Faure, M., Lardeux, B., and Neunlist, M. (2009). Neuroplasticity and neuroprotection in enteric neurons: Role of epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 382, 577–582.
- Mukhopadhyaya, A., Gilmour, H., and Plevris, J. (2008). Pravastatin-induced colitis: *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 20, 810–812.
- Mullin, J.M., Valenzano, M.C., Verrecchio, J.J., and Kothari, R. (2002). Age- and diet-related increase in transepithelial colon permeability of Fischer 344 rats. *Dig. Dis. Sci.* 47, 2262–2270.
- 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.
- Murakami, M., Ohta, T., Otsuguro, K.-I., and Ito, S. (2007). Involvement of prostaglandin E(2) derived from enteric glial cells in the action of bradykinin in cultured rat myenteric neurons. *Neuroscience* 145, 642–653.
- Murakami, M., Ohta, T., and Ito, S. (2009). Lipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin-1beta from enteric glial cells. *J. Neurosci. Res.* 87, 2095–2104.
- Musquer, N., Coquenlorge, S., Bourreille, A., Aubert, P., Matysiak-Budnik, T., des Varannes, S.B., Lauwers, G., Neunlist, M., and Coron, E. (2013). Probe-based confocal laser endomicroscopy: a new method for quantitative analysis of pit structure in healthy and Crohn's disease patients. *Dig Liver Dis* 45, 487–492.
- Muza-Moons, M.M., Schneeberger, E.E., and Hecht, G.A. (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells: EPEC induces tight junction protein redistribution. *Cellular Microbiology* 6, 783–793.
- Mya, G.H., Ng, W.F., Cheng, W., and Saing, H. (1994). Colonic hyperganglionosis presenting as neonatal enterocolitis and multiple strictures. *J. Pediatr. Surg.* 29, 1628–1630.
- Nagahama, M., Semba, R., Tsuzuki, M., and Aoki, E. (2001). *L*-Arginine Immunoreactive Enteric Glial Cells in the Enteric Nervous System of Rat Ileum. *Neurosignals* 10, 336–340.
- 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.
- Nair, M.G., Guild, K.J., Du, Y., Zaph, C., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A., Stevens, S., Karow, M., and Artis, D. (2008). Goblet cell-derived resistin-like molecule beta augments CD4+ T cell production of IFN-gamma and infection-induced intestinal inflammation. *J. Immunol.* 181, 4709–4715.
- Nakamura, K., Sakuragi, N., Takakuwa, A., and Ayabe, T. (2016). Paneth cell α -defensins and enteric microbiota in health and disease. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 35, 57–67.
- Nakanishi, M., and Rosenberg, D.W. (2013). Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Seminars in Immunopathology* 35, 123–137.
- Nakanishi, M., Montrose, D.C., Clark, P., Nambiar, P.R., Belinsky, G.S., Claffey, K.P., Xu, D., and Rosenberg, D.W. (2008). Genetic deletion of mPGES-1 suppresses intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* 68, 3251–3259.
- Nakanishi, M., Menoret, A., Tanaka, T., Miyamoto, S., Montrose, D.C., Vella, A.T., and Rosenberg, D.W. (2011). Selective PGE(2) suppression inhibits colon carcinogenesis and modifies local mucosal immunity. *Cancer Prev Res (Phila)* 4, 1198–1208.

- Naruhn, S., Meissner, W., Adhikary, T., Kaddatz, K., Klein, T., Watzer, B., Muller-Brusselbach, S., and Muller, R. (2010). 15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Is a Preferential Peroxisome Proliferator-Activated Receptor / Agonist. *Molecular Pharmacology* 77, 171–184.
- Nasser, Y., Fernandez, E., Keenan, C.M., Ho, W., Oland, L.D., Tibbles, L.A., Schemann, M., MacNaughton, W.K., Rühl, A., and Sharkey, K.A. (2006a). Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291, G912-927.
- Nasser, Y., Ho, W., and Sharkey, K.A. (2006b). Distribution of adrenergic receptors in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse, and rat. *J. Comp. Neurol.* 495, 529–553.
- 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.
- Neunlist, M., Aubert, P., Toquet, C., Oreshkova, T., Barouk, J., Lehur, P.A., Schemann, M., and Galmiche, J.P. (2003a). Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 52, 84–90.
- Neunlist, M., Toumi, F., Oreshkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Laboissee, C.L., Galmiche, J.-P., and Jarry, A. (2003b). 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, G1028-1036.
- Neunlist, M., Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Ruhl, A., Lardeux, B., Savidge, T., et al. (2006). Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 292, G231–G241.
- Neunlist, M., Coquenlorge, S., Aubert, P., Duchalais-Dassonneville, E., des Varannes, S.B., Meurette, G., and Coron, E. (2011). Colonic endoscopic full-thickness biopsies: from the neuropathological analysis of the myenteric plexus to the functional study of neuromuscular transmission. *Gastrointest. Endosc.* 73, 1029–1034.
- 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.
- Neunlist, M., Rolli-Derkinderen, M., Latorre, R., Van Landeghem, L., Coron, E., Derkinderen, P., and De Giorgio, R. (2014). Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology* 147, 1230–1237.
- Neurath, M.F. (2012). Animal Models of Inflammatory Bowel Diseases: Illuminating the Pathogenesis of Colitis, Ileitis and Cancer. *Digestive Diseases* 30, 91–94.
- Ng, S.C., Bernstein, C.N., Vatn, M.H., Lakatos, P.L., Loftus, E.V., Tysk, C., O’Morain, C., Moum, B., Colombel, J.-F., and Epidemiology and Natural History Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel Disease (IOIBD) (2013). Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 62, 630–649.
- 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.
- Nishida, T., Miwa, H., Shigematsu, A., Yamamoto, M., Iida, M., and Fujishima, M. (1987). Increased arachidonic acid composition of phospholipids in colonic mucosa from patients with active ulcerative colitis. *Gut* 28, 1002–1007.

Références

- Nishino, J., Saunders, T.L., Sagane, K., and Morrison, S.J. (2010). Lgi4 Promotes the Proliferation and Differentiation of Glial Lineage Cells throughout the Developing Peripheral Nervous System. *Journal of Neuroscience* 30, 15228–15240.
- Noda, T., and Yoshimori, T. (2009). Molecular basis of canonical and bactericidal autophagy. *Int. Immunol.* 21, 1199–1204.
- Noguchi, M., Hiwatashi, N., Liu, Z., and Toyota, T. (1998). Secretion imbalance between tumour necrosis factor and its inhibitor in inflammatory bowel disease. *Gut* 43, 203–209.
- Nozaki, M. (1975). [Combined use of bucolome and pyrazolone derivatives (1). Pharmacological activities and blood concentration]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 71, 609–629.
- Nurgali, K., Nguyen, T.V., Thacker, M., Pontell, L., and Furness, J.B. (2009). Slow synaptic transmission in myenteric AH neurons from the inflamed guinea pig ileum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297, G582-593.
- O’Byrne, P.M. (1997). Leukotrienes in the pathogenesis of asthma. *Chest* 111, 275–345.
- Ochiai, H., Nakamura, S., Suzuki, S., and Baba, S. (1997). Pancreatic damage resulting from temporary portal triad interruption during partial hepatectomy: protective effect of a prostaglandin I2 analogue. *J. Surg. Res.* 73, 129–136.
- Ochoa-Cortes, F., Turco, F., Linan-Rico, A., Soghomonyan, S., Whitaker, E., Wehner, S., Cuomo, R., and Christofi, F.L. (2016). Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* 22, 433–449.
- Odenwald, M.A., and Turner, J.R. (2016). The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 14, 9–21.
- Oehmichen, M., and Reifferscheid, P. (1977). Intramural ganglion cell degeneration in inflammatory bowel disease. *Digestion* 15, 482–496.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., et al. (2001a). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* 411, 603–606.
- Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., and Nunez, G. (2001b). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 276, 4812–4818.
- 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. *Gut* 52, 1591–1597.
- Okamoto, R., and Watanabe, M. (2005). Cellular and molecular mechanisms of the epithelial repair in IBD. *Dig. Dis. Sci.* 50 Suppl 1, S34-38.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98, 694–702.
- Okuno, T., Iizuka, Y., Okazaki, H., Yokomizo, T., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2008). 12(S)-hydroxyheptadeca-5Z, 8E, 10E-trienoic acid is a natural ligand for leukotriene B₄ receptor 2. *The Journal of Experimental Medicine* 205, 759–766.
- Pacheco, S., Hillier, K., and Smith, C.L. (1987). Inflammatory bowel disease: the in vitro effect of sulphasalazine and other agents on prostaglandin synthesis by human rectal mucosa. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20, 221–230.

Références

- Paradis, A.-M., Fontaine-Bisson, B., Bossé, Y., Robitaille, J., Lemieux, S., Jacques, H., Lamarche, B., Tchernof, A., Couture, P., and Vohl, M.-C. (2005). The peroxisome proliferator-activated receptor alpha Leu162Val polymorphism influences the metabolic response to a dietary intervention altering fatty acid proportions in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* *81*, 523–530.
- Paratore, C., Goerich, D.E., Suter, U., Wegner, M., and Sommer, L. (2001). Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development* *128*, 3949–3961.
- Park, H.-Y., Kunitake, Y., Hirasaki, N., Tanaka, M., and Matsui, T. (2015). Theaflavins enhance intestinal barrier of Caco-2 Cell monolayers through the expression of AMP-activated protein kinase-mediated Occludin, Claudin-1, and ZO-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *79*, 130–137.
- Parkes, M., Barrett, J.C., Prescott, N.J., Tremelling, M., Anderson, C.A., Fisher, S.A., Roberts, R.G., Nimmo, E.R., Cummings, F.R., Soars, D., et al. (2007). Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* *39*, 830–832.
- Pastorelli, L., De Salvo, C., Mercado, J.R., Vecchi, M., and Pizarro, T.T. (2013). Central Role of the Gut Epithelial Barrier in the Pathogenesis of Chronic Intestinal Inflammation: Lessons Learned from Animal Models and Human Genetics. *Frontiers in Immunology* *4*.
- Pearson, A.D., Eastham, E.J., Laker, M.F., Craft, A.W., and Nelson, R. (1982). Intestinal permeability in children with Crohn's disease and coeliac disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* *285*, 20–21.
- Pekny, M., and Pekna, M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol. Rev.* *94*, 1077–1098.
- Peloquin, J.M., and Nguyen, D.D. (2013). The microbiota and inflammatory bowel disease: Insights from animal models. *Anaerobe* *24*, 102–106.
- Pereira, M.P., Hurtado, O., Cárdenas, A., Boscá, L., Castillo, J., Dávalos, A., Vivancos, J., Serena, J., Lorenzo, P., Lizasoain, I., et al. (2006). Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 cause potent neuroprotection after experimental stroke through noncompletely overlapping mechanisms. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *26*, 218–229.
- Perrier, C., and Corthésy, B. (2011). Gut permeability and food allergies. *Clin. Exp. Allergy* *41*, 20–28.
- Peters-Golden, M., and Brock, T.G. (2003). 5-Lipoxygenase and FLAP. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids *69*, 99–109.
- Peterson, L.W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology* *14*, 141–153.
- Petrof, E.O., Ciancio, M.J., and Chang, E.B. (2004). Role and regulation of intestinal epithelial heat shock proteins in health and disease. *Chin J Dig Dis* *5*, 45–50.
- Pham, T.D., Gershon, M.D., and Rothman, T.P. (1991). Time of origin of neurons in the murine enteric nervous system: sequence in relation to phenotype. *J. Comp. Neurol.* *314*, 789–798.
- Piche, T., Barbara, G., Aubert, P., Bruley des Varannes, S., Dainese, R., Nano, J.L., Cremon, C., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Galimiche, J.P., et al. (2009). Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* *58*, 196–201.
- Pidgeon, G.P., Tang, K., Cai, Y.L., Piasentin, E., and Honn, K.V. (2003). Overexpression of platelet-type 12-lipoxygenase promotes tumor cell survival by enhancing alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) integrin expression. *Cancer Res.* *63*, 4258–4267.

Références

- Pires, W., Veneroso, C.E., Wanner, S.P., Pacheco, D.A.S., Vaz, G.C., Amorim, F.T., Tonoli, C., Soares, D.D., and Coimbra, C.C. (2016). Association Between Exercise-Induced Hyperthermia and Intestinal Permeability: A Systematic Review. *Sports Medicine*.
- Pithadia, A.B., and Jain, S. (2011). Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Rep* 63, 629–642.
- Pochard, C., Coquenlorge, S., Jaulin, J., Cenac, N., Vergnolle, N., Meurette, G., Freyssinet, M., Neunlist, M., and Rolli-Derkinderen, M. (2016). Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells From Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology* 150, 168–180.
- 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, G495-499.
- Podolsky, D.K., and Isselbacher, K.J. (1984). Glycoprotein composition of colonic mucosa. Specific alterations in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 87, 991–998.
- Poritz, L.S., Garver, K.I., Green, C., Fitzpatrick, L., Ruggiero, F., and Koltun, W.A. (2007). Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J. Surg. Res.* 140, 12–19.
- Porro, B., Songia, P., Squellerio, I., Tremoli, E., and Cavalca, V. (2014). Analysis, physiological and clinical significance of 12-HETE: A neglected platelet-derived 12-lipoxygenase product. *Journal of Chromatography B* 964, 26–40.
- Potten, C.S. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 353, 821–830.
- Puleston, J., Cooper, M., Murch, S., Bid, K., Makh, S., Ashwood, P., Bingham, A.H., Green, H., Moss, P., Dhillon, A., et al. (2005). A distinct subset of chemokines dominates the mucosal chemokine response in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 21, 109–120.
- 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* 35, 353–359.
- Rådmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., and Samuelsson, B. (2015). 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851, 331–339.
- 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.
- Rajendran, N. (2010). Role of diet in the management of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* 16, 1442.
- Ramstedt, U., Serhan, C.N., Nicolaou, K.C., Webber, S.E., Wigzell, H., and Samuelsson, B. (1987). Lipoxin A-induced inhibition of human natural killer cell cytotoxicity: studies on stereospecificity of inhibition and mode of action. *J. Immunol.* 138, 266–270.
- Rao, M., Nelms, B.D., Dong, L., Salinas-Rios, V., Rutlin, M., Gershon, M.D., and Corfas, G. (2015). Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system: Transcriptional Profiling PLP1⁺ Enteric Glia. *Glia* 63, 2040–2057.
- Rao, M., Rastelli, D., Dong, L., Chiu, S., Setlik, W., Gershon, M.D., and Corfas, G. (2017). Enteric Glia Regulate Gastrointestinal Motility but are not Required for Maintenance of the Epithelium in Mice. *Gastroenterology*.

Références

- Raouf, A.H., Tsai, H.H., Parker, N., Hoffman, J., Walker, R.J., and Rhodes, J.M. (1992). Sulphation of colonic and rectal mucin in inflammatory bowel disease: reduced sulphation of rectal mucus in ulcerative colitis. *Clin. Sci.* 83, 623–626.
- Rea, W.E. (2002). Ulcerative colitis after statin treatment. *Postgraduate Medical Journal* 78, 286–287.
- Reddy, G.P., Prasad, M., Sailesh, S., Kumar, Y.V., and Reddanna, P. (1993). Arachidonic acid metabolites as intratesticular factors controlling androgen production. *Int. J. Androl.* 16, 227–233.
- Reif, S., Klein, I., Lubin, F., Farbstein, M., Hallak, A., and Gilat, T. (1997). Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 40, 754–760.
- Reinecker, H.C., Steffen, M., Witthoef, T., Pflueger, I., Schreiber, S., MacDermott, R.P., and Raedler, A. (1993). Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 94, 174–181.
- Reinecker, H.C., Loh, E.Y., Ringler, D.J., Mehta, A., Rombeau, J.L., and MacDermott, R.P. (1995). Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology* 108, 40–50.
- Rickmann, M., and Wolff, J.R. (1995). S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain. *Neuroscience* 67, 977–991.
- 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.
- Riento, K., and Ridley, A.J. (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 446–456.
- Roberts, R.R., Murphy, J.F., Young, H.M., and Bornstein, J.C. (2006). Development of colonic motility in the neonatal mouse—studies using spatiotemporal maps. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 292, G930–G938.
- Rogers, B.H., Clark, L.M., and Kirsner, J.B. (1971). The epidemiologic and demographic characteristics of inflammatory bowel disease: an analysis of a computerized file of 1400 patients. *J Chronic Dis* 24, 743–773.
- Rolhion, N., Barnich, N., Bringer, M.-A., Glasser, A.-L., Ranc, J., Hébuterne, X., Hofman, P., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion. *Gut* 59, 1355–1362.
- Rosenbaum, C., Schick, M.A., Wollborn, J., Heider, A., Scholz, C.-J., Cecil, A., Niesler, B., Hirrlinger, J., Walles, H., and Metzger, M. (2016). Activation of Myenteric Glia during Acute Inflammation In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE* 11, e0151335.
- Rossi, P., Lindgren, J.A., Kullman, C., and Jondal, M. (1985). Products of the lipoxygenase pathway in human natural killer cell cytotoxicity. *Cell. Immunol.* 93, 1–8.
- Rothman, T.P., Tennyson, V.M., and Gershon, M.D. (1986). Colonization of the bowel by the precursors of enteric glia: studies of normal and congenitally aganglionic mutant mice. *J. Comp. Neurol.* 252, 493–506.
- Ruan, K.H., Li, P., Kulmacz, R.J., and Wu, K.K. (1994). Characterization of the structure and membrane interaction of NH₂-terminal domain of thromboxane A₂ synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 20938–20942.
- Ruemmele, F.M., Seidman, E.G., and Lentze, M.J. (2002). Regulation of intestinal epithelial cell apoptosis and the pathogenesis of inflammatory bowel disorders. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 34, 254–260.
- ruhl, a. (2005). Glial cells in the gut. *Neurogastroenterology and Motility* 17, 777–790.

Références

- Rühl, A., Franzke, S., Collins, S.M., and Stremmel, W. (2001a). Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, G1163-1171.
- Rühl, A., Franzke, S., and Stremmel, W. (2001b). IL-1beta and IL-10 have dual effects on enteric glial cell proliferation. *Neurogastroenterol. Motil.* **13**, 89–94.
- Rühl, A., Trotter, J., and Stremmel, W. (2001). Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglia cell lines from the myenteric plexus of adult rat. *Neurogastroenterology and Motility* **13**, 95–106.
- Rühl, A., Nasser, Y., and Sharkey, K.A. (2004). Enteric glia. *Neurogastroenterol. Motil.* **16 Suppl 1**, 44–49.
- Rühl, A., Hoppe, S., Frey, I., Daniel, H., and Schemann, M. (2005). Functional expression of the peptide transporter PEPT2 in the mammalian enteric nervous system. *J. Comp. Neurol.* **490**, 1–11.
- Sadler, T., Bhasin, J.M., Xu, Y., Barnholz-Sloan, J., Chen, Y., Ting, A.H., and Stylianou, E. (2016). Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression defines molecular characteristics of Crohn's disease-associated fibrosis. *Clin Epigenetics* **8**, 30.
- Sanders, K.M., Ordög, T., Koh, S.D., Torihashi, S., and Ward, S.M. (1999). Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol. Motil.* **11**, 311–338.
- Sanders, K.M., Ward, S.M., and Koh, S.D. (2014). Interstitial Cells: Regulators of Smooth Muscle Function. *Physiological Reviews* **94**, 859–907.
- Sanovic, S., Lamb, D.P., and Blennerhassett, M.G. (1999). Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am. J. Pathol.* **155**, 1051–1057.
- Sansom, O.J. (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes & Development* **18**, 1385–1390.
- Sarnelli, G., De Giorgio, R., Gentile, F., Calì, G., Grandone, I., Rocco, A., Cosenza, V., Cuomo, R., and D'Argenio, G. (2009). Myenteric neuronal loss in rats with experimental colitis: role of tissue transglutaminase-induced apoptosis. *Dig Liver Dis* **41**, 185–193.
- Sasaki, Y., Kamei, D., Ishikawa, Y., Ishii, T., Uematsu, S., Akira, S., Murakami, M., and Hara, S. (2012). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is involved in multiple steps of colon carcinogenesis. *Oncogene* **31**, 2943–2952.
- Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**, 415–418.
- Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Rühl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., and Sofroniew, M.V. (2007a). Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* **132**, 1344–1358.
- Savidge, T.C., Sofroniew, M.V., and Neunlist, M. (2007b). Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. *Laboratory Investigation* **87**, 731–736.
- Schäfer, K.H., Hänsgen, A., and Mestres, P. (1999). Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *Anat. Rec.* **256**, 20–28.
- Scharl, M., Paul, G., Barrett, K.E., and McCole, D.F. (2009a). AMP-activated protein kinase mediates the interferon-gamma-induced decrease in intestinal epithelial barrier function. *J. Biol. Chem.* **284**, 27952–27963.
- Scharl, M., Paul, G., Weber, A., Jung, B.C., Docherty, M.J., Hausmann, M., Rogler, G., Barrett, K.E., and McCole, D.F. (2009b). Protection of epithelial barrier function by the Crohn's disease associated gene protein tyrosine phosphatase n2. *Gastroenterology* **137**, 2030–2040.e5.

Références

- Schauber, J., Rieger, D., Weiler, F., Wehkamp, J., Eck, M., Fellermann, K., Scheppach, W., Gallo, R.L., and Stange, E.F. (2006). Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 18, 615–621.
- Schepers, A.G., Vries, R., van den Born, M., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Lgr5 intestinal stem cells have high telomerase activity and randomly segregate their chromosomes: Lgr5 adult intestinal stem cell characteristics. *The EMBO Journal* 30, 1104–1109.
- Scher, J.U., and Pillinger, M.H. (2005). 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin. Immunol.* 114, 100–109.
- 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.
- Schuligoi, R., Grill, M., Heinemann, A., Peskar, B.A., and Amann, R. (2005). Sequential induction of prostaglandin E and D synthases in inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 684–689.
- Schulzke, J.D., Bentzel, C.J., Schulzke, I., Riecken, E.O., and Fromm, M. (1998). Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. *Pediatr. Res.* 43, 435–441.
- Sebastian, S., Hernández, V., Myrelid, P., Kariv, R., Tsianos, E., Toruner, M., Marti-Gallostra, M., Spinelli, A., van der Meulen-de Jong, A.E., Yuksel, E.S., et al. (2014). Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: results of the 3rd ECCO pathogenesis scientific workshop (I). *J Crohns Colitis* 8, 5–18.
- Shah, N. (1994). Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. *Cell* 77, 349–360.
- Shanahan, F., and Bernstein, C.N. (2009). The evolving epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 25, 301–305.
- Shannon, V.R., Stenson, W.F., and Holtzman, M.J. (1993). Induction of epithelial arachidonate 12-lipoxygenase at active sites of inflammatory bowel disease. *Am. J. Physiol.* 264, G104-111.
- 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.
- Share, J.B. (1976). Review of drug treatment for Down's syndrome persons. *Am J Ment Defic* 80, 388–393.
- 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.
- Sharma, I., Dhaliwal, L.K., Saha, S.C., Sangwan, S., and Dhawan, V. (2010). Role of 8-iso-prostaglandin F2alpha and 25-hydroxycholesterol in the pathophysiology of endometriosis. *Fertil. Steril.* 94, 63–70.
- Sharon, P., and Stenson, W.F. (1984). Enhanced synthesis of leukotriene B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 86, 453–460.
- Sharon, P., and Stenson, W.F. (1985). Metabolism of arachidonic acid in acetic acid colitis in rats. Similarity to human inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 88, 55–63.
- 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. (2010). Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2687–2692.

Références

- 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.
- Shoda, R., Matsueda, K., Yamato, S., and Umeda, N. (1996). Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan. *Am. J. Clin. Nutr.* *63*, 741–745.
- Shorter, R.G., Huizenga, K.A., and Spencer, R.J. (1972). A working hypothesis for the etiology and pathogenesis of nonspecific inflammatory bowel disease. *Am J Dig Dis* *17*, 1024–1032.
- Shureiqi, I. (2005). The Critical Role of 15-Lipoxygenase-1 in Colorectal Epithelial Cell Terminal Differentiation and Tumorigenesis. *Cancer Research* *65*, 11486–11492.
- Sibartie, S., O’Hara, A.M., Ryan, J., Fanning, Á., O’Mahony, J., O’Neill, S., Sheil, B., O’Mahony, L., and Shanahan, F. (2009). Modulation of pathogen-induced CCL20 secretion from HT-29 human intestinal epithelial cells by commensal bacteria. *BMC Immunology* *10*, 54.
- Silk, D.B., Grimble, G.K., and Rees, R.G. (1985). Protein digestion and amino acid and peptide absorption. *Proc Nutr Soc* *44*, 63–72.
- Simopoulos, A.P. (2003). Essential fatty acids in health and chronic diseases. *Forum Nutr* *56*, 67–70.
- Singer, I.I., Kawka, D.W., Schloemann, S., Tessner, T., Riehl, T., and Stenson, W.F. (1998). Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *115*, 297–306.
- Sipos, F., Molnár, B., Zágoni, T., Berczi, L., and Tulassay, Z. (2005). Growth in epithelial cell proliferation and apoptosis correlates specifically to the inflammation activity of inflammatory bowel diseases: ulcerative colitis shows specific p53- and EGFR expression alterations. *Dis. Colon Rectum* *48*, 775–786.
- Smalley-Freed, W.G., Efimov, A., Burnett, P.E., Short, S.P., Davis, M.A., Gumucio, D.L., Washington, M.K., Coffey, R.J., and Reynolds, A.B. (2010). p120-catenin is essential for maintenance of barrier function and intestinal homeostasis in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 1824–1835.
- Smyth, E.M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y., and FitzGerald, G.A. (2009). Prostanoids in health and disease. *J. Lipid Res.* *50 Suppl*, S423-428.
- Snoeck, V., Goddeeris, B., and Cox, E. (2005). The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes and Infection* *7*, 997–1004.
- Söderholm, J.D., Olaison, G., Lindberg, E., Hannestad, U., Vindels, A., Tysk, C., Järnerot, G., and Sjö Dahl, R. (1999). Different intestinal permeability patterns in relatives and spouses of patients with Crohn’s disease: an inherited defect in mucosal defence? *Gut* *44*, 96–100.
- Söderlund, S., Tribukait, B., Öst, Å., Broström, O., Karlén, P., Löfberg, R., Askling, J., and Sjöqvist, U. (2011). Colitis-associated DNA aneuploidy and dysplasia in Crohn’s disease and risk of colorectal cancer. *Inflamm. Bowel Dis.* *17*, 1101–1107.
- Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* *32*, 638–647.
- Sofroniew, M.V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature Reviews Neuroscience* *16*, 249–263.
- Sokol, H., Polin, V., Lavergne-Slove, A., Panis, Y., Treton, X., Dray, X., Bouhnik, Y., Valleur, P., and Marteau, P. (2009). Plexitis as a predictive factor of early postoperative clinical recurrence in Crohn’s disease. *Gut* *58*, 1218–1225.

Références

- Song, Z.M., Brookes, S.J., Llewellyn-Smith, I.J., and Costa, M. (1995). Ultrastructural studies of the myenteric plexus and smooth muscle in organotypic cultures of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* *280*, 627–637.
- Sonnenberg, A. (1988). Geographic and temporal variations of sugar and margarine consumption in relation to Crohn's disease. *Digestion* *41*, 161–171.
- Sonoda, N., Furuse, M., Sasaki, H., Yonemura, S., Katahira, J., Horiguchi, Y., and Tsukita, S. (1999). Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J. Cell Biol.* *147*, 195–204.
- 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.
- Soret, R., Coquenlorge, S., Cossais, F., Meurette, G., Rolli-Derkinderen, M., and Neunlist, M. (2013). Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells. *Neurogastroenterol. Motil.* *25*, e755-764.
- Spisni, E., Griffoni, C., Santi, S., Riccio, M., Marulli, R., Bartolini, G., Toni, M., Ullrich, V., and Tomasi, V. (2001). Colocalization prostacyclin (PGI₂) synthase--caveolin-1 in endothelial cells and new roles for PGI₂ in angiogenesis. *Exp. Cell Res.* *266*, 31–43.
- Sreeramkumar, V., Fresno, M., and Cuesta, N. (2012). Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes? *Immunol. Cell Biol.* *90*, 579–586.
- Steinkamp, M., Geerling, I., Seufferlein, T., von Boyen, G., Egger, B., Grossmann, J., Ludwig, L., Adler, G., and Reinshagen, M. (2003). Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* *124*, 1748–1757.
- Steinkamp, M., Gundel, H., Schulte, N., Spaniol, U., Pflueger, C., Zizer, E., and von Boyen, G.B.T. (2012a). GDNF protects enteric glia from apoptosis: evidence for an autocrine loop. *BMC Gastroenterol* *12*, 6.
- Steinkamp, M., Schulte, N., Spaniol, U., Pflüger, C., Hartmann, C., Kirsch, J., and von Boyen, G.B. (2012b). Brain derived neurotrophic factor inhibits apoptosis in enteric glia during gut inflammation. *Med. Sci. Monit.* *18*, BR117-122.
- Stenson, W.F. (2014). The universe of arachidonic acid metabolites in inflammatory bowel disease: can we tell the good from the bad? *Curr. Opin. Gastroenterol.* *30*, 347–351.
- Stichtenoth, D.O., Thorén, S., Bian, H., Peters-Golden, M., Jakobsson, P.J., and Crofford, L.J. (2001). Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J. Immunol.* *167*, 469–474.
- Stitham, J., Midgett, C., Martin, K.A., and Hwa, J. (2011). Prostacyclin: an inflammatory paradox. *Front Pharmacol* *2*, 24.
- Stoffels, B., Hupa, K.J., Snoek, S.A., van Bree, S., Stein, K., Schwandt, T., Vilz, T.O., Lysson, M., Veer, C.V., Kummer, M.P., et al. (2014). Postoperative ileus involves interleukin-1 receptor signaling in enteric glia. *Gastroenterology* *146*, 176–187.e1.
- Stulnig, T.M. (2003). Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *132*, 310–321.
- Sugimoto, Y., and Narumiya, S. (2007). Prostaglandin E Receptors. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 11613–11617.
- Sun, X., Yang, Q., Rogers, C.J., Du, M., and Zhu, M.-J. (2017). AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression. *Cell Death Differ.* *24*, 819–831.

Références

- Sun, Z., Wang, X., Wallen, R., Deng, X., Du, X., Hallberg, E., and Andersson, R. (1998). The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* *33*, 415–422.
- Suzuki, T. (2013). Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cellular and Molecular Life Sciences* *70*, 631–659.
- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., et al. (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *122*, 44–54.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., and Herber, A. (2009). Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. *J. Physiol. Pharmacol.* *60 Suppl 6*, 61–71.
- Szebeni, B., Veres, G., Dezsőfi, A., Rusai, K., Vannay, A., Mraz, M., Majorova, E., and Arató, A. (2008). Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* *151*, 34–41.
- Tager, A.M., and Luster, A.D. (2003). BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *69*, 123–134.
- Takahashi, Y., Tokuoka, S., Masuda, T., Hirano, Y., Nagao, M., Tanaka, H., Inagaki, N., Narumiya, S., and Nagai, H. (2002). Augmentation of allergic inflammation in prostanoïd IP receptor deficient mice. *Br. J. Pharmacol.* *137*, 315–322.
- Takeuchi, K., Smale, S., Premchand, P., Maiden, L., Sherwood, R., Thjodleifsson, B., Bjornsson, E., and Bjarnason, I. (2006). Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *4*, 196–202.
- 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.
- 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., Kobayashi, T., Tsujimoto, M., Oh-ishi, S., Murakami, M., and Kudo, I. (2003). Regulation of cytosolic prostaglandin E2 synthase by 90-kDa heat shock protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *303*, 1018–1023.
- Taupin, D., and Podolsky, D.K. (2003). Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *4*, 721–732.
- Taugog, J.D., Richardson, J.A., Croft, J.T., Simmons, W.A., Zhou, M., Fernández-Sueiro, J.L., Balish, E., and Hammer, R.E. (1994). The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J. Exp. Med.* *180*, 2359–2364.
- Teixeira, T.F.S., Collado, M.C., Ferreira, C.L.L.F., Bressan, J., and Peluzio, M. do C.G. (2012). Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. *Nutrition Research* *32*, 637–647.
- Tennis, M.A., Vanscoyk, M., Keith, R.L., and Winn, R.A. (2010). The role of prostacyclin in lung cancer. *Transl Res* *155*, 57–61.

Références

- Thomas, G.A., Swift, G.L., Green, J.T., Newcombe, R.G., Braniff-Mathews, C., Rhodes, J., Wilkinson, S., Strohmeyer, G., and Kreuzpainter, G. (1998). Controlled trial of antituberculous chemotherapy in Crohn's disease: a five year follow up study. *Gut* 42, 497–500.
- Thomsen, L., Robinson, T.L., Lee, J.C., Faraway, L.A., Hughes, M.J., Andrews, D.W., and Huizinga, J.D. (1998). Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. *Nat. Med.* 4, 848–851.
- 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.
- Tixier, E., Galmiche, J.-P., and Neunlist, M. (2006). Intestinal neuro-epithelial interactions modulate neuronal chemokines production. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344, 554–561.
- Tjwa, E.T.T.L., Bradley, J.M., Keenan, C.M., Kroese, A.B.A., and Sharkey, K.A. (2003). Interleukin-1beta activates specific populations of enteric neurons and enteric glia in the guinea pig ileum and colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G1268-1276.
- Tornøe, K., Hannibal, J., Georg, B., Schmidt, P.T., Hilsted, L., Fahrenkrug, J., and Holst, J.J. (2001). PACAP 1-38 as neurotransmitter in the porcine antrum. *Regul. Pept.* 101, 109–121.
- Toumi, F., Neunlist, M., Cassagnau, E., Parois, S., Laboisse, C.L., Galmiche, J.-P., and Jarry, A. (2003). Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol. Motil.* 15, 239–242.
- Toyomoto, M., Inoue, S., Ohta, K., Kuno, S., Ohta, M., Hayashi, K., and Ikeda, K. (2005). Production of NGF, BDNF and GDNF in mouse astrocyte cultures is strongly enhanced by a cerebral vasodilator, ifenprodil. *Neurosci. Lett.* 379, 185–189.
- Tran, L., and Greenwood-Van Meerveld, B. (2013). Age-Associated Remodeling of the Intestinal Epithelial Barrier. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 68, 1045–1056.
- Travassos, L.H., Carneiro, L.A.M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhães, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., et al. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* 11, 55–62.
- Triantafyllidis, J. (2011). Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. *Drug Design, Development and Therapy* 185.
- 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. *Experimental Cell Research* 303, 494–503.
- Tysk, C., Riedesel, H., Lindberg, E., Panzini, B., Podolsky, D., and Järnerot, G. (1991). Colonic glycoproteins in monozygotic twins with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 100, 419–423.
- Ueda, Y., Kawakami, Y., Kunii, D., Okada, H., Azuma, M., Le, D.S.N.T., and Yamamoto, S. (2008). Elevated concentrations of linoleic acid in erythrocyte membrane phospholipids in patients with inflammatory bowel disease. *Nutr Res* 28, 239–244.
- UK IBD Genetics Consortium, Barrett, J.C., Lee, J.C., Lees, C.W., Prescott, N.J., Anderson, C.A., Phillips, A., Wesley, E., Parnell, K., Zhang, H., et al. (2009). Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat. Genet.* 41, 1330–1334.

Références

- 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. *Clinical Nutrition* 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.
- Utech, M., Ivanov, A.I., Samarin, S.N., Bruewer, M., Turner, J.R., Mrsny, R.J., Parkos, C.A., and Nusrat, A. (2005). Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* 16, 5040–5052.
- Vachon, P.H. (2006). *Survie cellulaire : différences et différenciation*. *Médecine/Sciences* 22, 423–429.
- Van Den Bogaerde, J., Cahill, J., Emmanuel, A.V., Vaizey, C.J., Talbot, I.C., Knight, S.C., and Kamm, M.A. (2002). Gut mucosal response to food antigens in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16, 1903–1915.
- Van der Sluis, M., De Koning, B.A.E., De Bruijn, A.C.J.M., Velcich, A., Meijerink, J.P.P., Van Goudoever, J.B., Büller, H.A., Dekker, J., Van Seuning, I., Renes, I.B., et al. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131, 117–129.
- Van Landeghem, L., 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* 10, 507.
- Van Landeghem, L., Chevalier, J., Mahé, M.M., Wedel, T., Urvil, P., Derkinderen, P., Savidge, T., and Neunlist, M. (2011). Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G976–987.
- Van Landeghem, L., Santoro, M.A., Krebs, A.E., Mah, A.T., Dehmer, J.J., Gracz, A.D., Scull, B.P., McNaughton, K., Magness, S.T., and Lund, P.K. (2012). Activation of two distinct Sox9-EGFP-expressing intestinal stem cell populations during crypt regeneration after irradiation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302, G1111–1132.
- Van Spaendonk, H., Ceuleers, H., Witters, L., Patteet, E., Joossens, J., Augustyns, K., Lambeir, A.-M., De Meester, I., De Man, J.G., and De Winter, B.Y. (2017). Regulation of intestinal permeability: The role of proteases. *World Journal of Gastroenterology* 23, 2106.
- Van Wagoner, N.J., and Benveniste, E.N. (1999). Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 100, 124–139.
- Van Wagoner, N.J., Oh, J.W., Repovic, P., and Benveniste, E.N. (1999). Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor. *J. Neurosci.* 19, 5236–5244.
- Vanderwinden, J.-M., Timmermans, J.-P., and Schiffmann, S.N. (2003). Glial cells, but not interstitial cells, express P2x7, a ionotropic purinergic receptor, in the rat GI musculature. *Gastroenterology* 124, A347–A348.
- Vanner, S. (1994). Corelease of neuropeptides from capsaicin-sensitive afferents dilates submucosal arterioles in guinea pig ileum. *Am. J. Physiol.* 267, G650–655.
- Vanner, S., and Surprenant, A. (1991). Cholinergic and noncholinergic submucosal neurons dilate arterioles in guinea pig colon. *Am. J. Physiol.* 261, G136–144.
- Vanner, S., and Surprenant, A. (1996). Neural reflexes controlling intestinal microcirculation. *Am. J. Physiol.* 271, G223–230.

Références

- Vargas, N., and Marino, F. (2016). Heat stress, gastrointestinal permeability and interleukin-6 signaling — Implications for exercise performance and fatigue. *Temperature* 3, 240–251.
- Vasiliadis, K., Kanellos, I., Tsachalis, T., Blouhos, K., Zaraboukas, T., Koliakos, G., and Betsis, D. (2007). Influence of the stable prostacyclin analog iloprost on the healing of colonic anastomosis in rats. *Minerva Chir* 62, 241–248.
- Vasina, V., Barbara, G., Talamonti, L., Stanghellini, V., Corinaldesi, R., Tonini, M., De Ponti, F., and De Giorgio, R. (2006). Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Auton Neurosci* 126–127, 264–272.
- Vecchi Brumatti, L., Marcuzzi, A., Tricarico, P.M., Zanin, V., Girardelli, M., and Bianco, A.M. (2014). Curcumin and inflammatory bowel disease: potential and limits of innovative treatments. *Molecules* 19, 21127–21153.
- Vercammen, C., and Ceuppens, J.L. (1987). Prostaglandin E2 inhibits human T-cell proliferation after crosslinking of the CD3-Ti complex by directly affecting T cells at an early step of the activation process. *Cell. Immunol.* 104, 24–36.
- Vetrano, S., Rescigno, M., Cera, M.R., Correale, C., Rumio, C., Doni, A., Fantini, M., Sturm, A., Borroni, E., Repici, A., et al. (2008). Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 135, 173–184.
- Vijil, C., Hermansson, C., Jeppsson, A., Bergström, G., and Hultén, L.M. (2014). Arachidonate 15-Lipoxygenase Enzyme Products Increase Platelet Aggregation and Thrombin Generation. *PLoS ONE* 9, e88546.
- 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.
- 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.
- 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, G539-547.
- Vukavić, T. (1984). Timing of the gut closure. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 3, 700–703.
- Wakefield, A.J., Pittilo, R.M., Sim, R., Cosby, S.L., Stephenson, J.R., Dhillon, A.P., and Pounder, R.E. (1993). Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J. Med. Virol.* 39, 345–353.
- 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.
- Wallace, J.L., MacNaughton, W.K., Morris, G.P., and Beck, P.L. (1989). Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 96, 29–36.

Références

- 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, H.-B., Wang, P.-Y., Wang, X., Wan, Y.-L., and Liu, Y.-C. (2012a). Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. *Dig. Dis. Sci.* 57, 3126–3135.
- Wang, J., Yuen, B.H., and Leung, P.C. (1989). Stimulation of progesterone and prostaglandin E2 production by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *FEBS Lett.* 244, 154–158.
- Wang, M., Gao, Z., Zhang, Z., Pan, L., and Zhang, Y. (2014). Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 10, 3544–3551.
- Wang, S.-L., Wang, Z.-R., and Yang, C.-Q. (2012b). Meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active inflammatory bowel disease. *Exp Ther Med* 4, 1051–1056.
- 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. (Lond.)* 573, 147–159.
- Watanabe, K. (2002). Prostaglandin F synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68–69, 401–407.
- 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.
- Weaver, L.T., Laker, M.F., and Nelson, R. (1984). Enhanced intestinal permeability in preterm babies with bloody stools. *Arch. Dis. Child.* 59, 280–281.
- Weber, C.R., Raleigh, D.R., Su, L., Shen, L., Sullivan, E.A., Wang, Y., and Turner, J.R. (2010). Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity. *J. Biol. Chem.* 285, 12037–12046.
- Weber, L.P., Seto, M., Sasaki, Y., Swärd, K., and Walsh, M.P. (2000). The involvement of protein kinase C in myosin phosphorylation and force development in rat tail arterial smooth muscle. *Biochem. J.* 352 Pt 2, 573–582.
- Weersma, R.K., Van Dullemen, H.M., Van Der Steege, G., Nolte, I.M., Kleibeuker, J.H., and Dijkstra, G. (2007). Review article: inflammatory bowel disease and genetics: REVIEW: IBD AND GENETICS. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 26, 57–65.
- 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., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., et al. (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53, 1658–1664.
- Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R.E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., et al. (2005). Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 18129–18134.
- Wehkamp, J., Schmid, M., and Stange, E.F. (2007). Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23, 370–378.
- Welcker, K., Martin, A., Kölle, P., Siebeck, M., and Gross, M. (2004). Increased intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease. *Eur. J. Med. Res.* 9, 456–460.

Références

- Wells, J.M., Brummer, R.J., Derrien, M., MacDonald, T.T., Troost, F., Cani, P.D., Theodorou, V., Dekker, J., Méheust, A., de Vos, W.M., et al. (2017). Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 312, G171–G193.
- 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.
- Williams, C.N. (2008). Does the incidence of IBD increase when persons move from a low- to a high-risk area? *Inflamm. Bowel Dis.* 14 Suppl 2, S41-42.
- Wilson, D.P., Susnjar, M., Kiss, E., Sutherland, C., and Walsh, M.P. (2005). Thromboxane A₂-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca²⁺ entry and Ca²⁺ sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. *Biochem. J.* 389, 763–774.
- Wong, C.T., Ussyshkin, N., Ahmad, E., Rai-Bhogal, R., Li, H., and Crawford, D.A. (2016). Prostaglandin E₂ promotes neural proliferation and differentiation and regulates Wnt target gene expression. *J. Neurosci. Res.* 94, 759–775.
- Wood, J.D., Alpers, D.H., and Andrews, P.L. (1999). Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 45 Suppl 2, II6-II16.
- Woodward, D.F., Jones, R.L., and Narumiya, S. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: Classification of Prostanoid Receptors, Updating 15 Years of Progress. *Pharmacological Reviews* 63, 471–538.
- Woodworth, H.L., McCaskey, S.J., Duriancik, D.M., Clinthorne, J.F., Langohr, I.M., Gardner, E.M., and Fenton, J.I. (2010). Dietary fish oil alters T lymphocyte cell populations and exacerbates disease in a mouse model of inflammatory colitis. *Cancer Res.* 70, 7960–7969.
- 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.
- Xia, Y., Hu, H.-Z., Liu, S., Ren, J., Zafirov, D.H., and Wood, J.D. (1999). IL-1 β and IL-6 excite neurons and suppress nicotinic and noradrenergic neurotransmission in guinea pig enteric nervous system. *Journal of Clinical Investigation* 103, 1309–1316.
- Xiao, C.-Y., Yuhki, K., Hara, A., Fujino, T., Kuriyama, S., Yamada, T., Takayama, K., Takahata, O., Karibe, H., Taniguchi, T., et al. (2004). Prostaglandin E₂ protects the heart from ischemia-reperfusion injury via its receptor subtype EP4. *Circulation* 109, 2462–2468.
- 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.* 50, 274–289.
- Xiao, W.-D., Chen, W., Sun, L.-H., Wang, W.-S., Zhou, S.-W., and Yang, H. (2011). The protective effect of enteric glial cells on intestinal epithelial barrier function is enhanced by inhibiting inducible nitric oxide synthase activity under lipopolysaccharide stimulation. *Mol. Cell. Neurosci.* 46, 527–534.
- Xue, Y., Zhang, H., Sun, X., and Zhu, M.-J. (2016). Metformin Improves Ileal Epithelial Barrier Function in Interleukin-10 Deficient Mice. *PLoS ONE* 11, e0168670.
- Yamada, T., Volkmer, C., and Grisham, M. (1990). Antioxidant Properties of 5-ASA: Potential Mechanism for Its Anti-Inflammatory Activity. *Canadian Journal of Gastroenterology* 4, 295–302.
- Yang, Q. (2001). Requirement of Math1 for Secretory Cell Lineage Commitment in the Mouse Intestine. *Science* 294, 2155–2158.

Références

- Yang, P., Cartwright, C., Chan, D., Vijjeswarapu, M., Ding, J., and Newman, R.A. (2007). Zylamend-mediated inhibition of human prostate cancer PC3 cell proliferation: effects on 12-LOX and Rb protein phosphorylation. *Cancer Biol. Ther.* 6, 228–236.
- Yano, T., Matsui, T., Tamura, A., Uji, M., and Tsukita, S. (2013). The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *J. Cell Biol.* 203, 605–614.
- Yap, L.M., Ahmad, T., and Jewell, D.P. (2004). The contribution of HLA genes to IBD susceptibility and phenotype. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18, 577–596.
- Yeaman, T.J. (2004). A renaissance for SRC. *Nature Reviews Cancer* 4, 470–480.
- Yokomizo, T., Kato, K., Hagiya, H., Izumi, T., and Shimizu, T. (2001). Hydroxyeicosanoids Bind to and Activate the Low Affinity Leukotriene B4 Receptor, BLT2. *Journal of Biological Chemistry* 276, 12454–12459.
- Young, H.M., Jones, B.R., and McKeown, S.J. (2002). The projections of early enteric neurons are influenced by the direction of neural crest cell migration. *J. Neurosci.* 22, 6005–6018.
- 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, H.M., Turner, K.N., and Bergner, A.J. (2005). The location and phenotype of proliferating neural-crest-derived cells in the developing mouse gut. *Cell Tissue Res.* 320, 1–9.
- Zeissig, S., Bojarski, C., Bürgel, N., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.D. (2004). Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. *Gut* 53, 1295–1302.
- 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.
- Zhang, D.K., He, F.Q., Li, T.K., Pang, X.H., Cui, D.J., Xie, Q., Huang, X.L., and Gan, H.T. (2010). Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J. Pathol.* 222, 213–222.
- Zhang, W., Sarosi, G., Barnhart, D., Yule, D.I., and Mulholland, M.W. (1997). Endothelin-activated calcium signaling in enteric glia derived from neonatal guinea pig. *Am. J. Physiol.* 272, G1175–1185.
- 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.
- 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.
- Zhou, Q., Zhang, B., and Verne, G.N. (2009). Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *Pain* 146, 41–46.
- Zhu, Y., Huang, Y.-F., Kek, C., and Bulavin, D.V. (2013). Apoptosis Differently Affects Lineage Tracing of *Lgr5* and *Bmi1* Intestinal Stem Cell Populations. *Cell Stem Cell* 12, 298–303.
- Zipser, R.D., Nast, C.C., Lee, M., Kao, H.W., and Duke, R. (1987). In vivo production of leukotriene B4 and leukotriene C4 in rabbit colitis. Relationship to inflammation. *Gastroenterology* 92, 33–39.

Références

Zouiten-Mekki, L., Serghini, M., Fekih, M., Kallel, L., Matri, S., Ben Mustapha, N., Boubaker, J., and Filali, A. (2013). Rôle de la cellule épithéliale dans l'homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Médecine/Sciences* 29, 1145–1150.

Thèse de Doctorat

Camille POCHARD

Identification et étude fonctionnelle de médiateurs gliaux impliqués dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques intestinales

Identification and functional study of glial mediators involved in the pathophysiology of chronic inflammatory bowel disease

Résumé

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) telles que la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique sont des maladies chroniques dans lesquelles interviennent des facteurs environnementaux, immunologiques et génétiques. Récemment, il a été montré que la barrière épithéliale intestinale (BEI) était impliquée dans la physiopathologie des MICI, et des approches visant à améliorer la résistance et la réparation de cette BEI représentent de nouvelles pistes thérapeutiques prometteuses. Notre laboratoire a largement contribué ces dernières années à identifier les cellules gliales entériques (CGE), comme un nouveau composant clé du microenvironnement de la BEI, renforçant la protection de la BEI et sa cicatrisation. A l'inverse, chez les patients MICI, les CGE sont altérées à la fois d'un point de vue phénotypique et fonctionnel. Dans ce contexte, outre une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques, le but de ce projet visait à identifier les CGE comme une nouvelle cible d'intérêt thérapeutique dans les MICI. Grâce à une analyse lipidomique, nous avons mis en évidence une sous-production de différents médiateurs lipidiques par les CGE de patients MICI. Parmi eux, le 15-HETE et la PGI2 étaient capables de réguler la perméabilité de la BEI, à la fois in vitro et in vivo. De plus, ils semblaient capables de restaurer les fonctions perdues chez les patients MICI. Ainsi, nos travaux suggèrent qu'une sous-production de ces médiateurs lipidiques par les CGE de patients MICI pourraient concourir aux mécanismes physiopathologiques, et représentent une nouvelle piste thérapeutique majeure.

Mots clés

Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ; Cellules gliales entériques ; Barrière épithéliale intestinale ; Perméabilité ; Apoptose ; Inflammation ; 15-HETE ; Prostacycline PGI2

Abstract

Chronic inflammatory bowel disease (IBD) such as Crohn's disease and ulcerative colitis are chronic diseases involving environmental, immunological and genetic factors. Recently, the intestinal epithelial barrier (IEB) has been shown to be involved in the pathophysiology of IBD, and approaches to improve the resistance and repair of this IEB represent promising new therapeutic pathways. Our laboratory has made a significant contribution in recent years to identifying enteric glial cells (EGC) as a key new component of the IEB microenvironment, enhancing IEB protection and healing. Conversely, in IBD patients, EGC are altered both phenotypically and functionally. In this context, in addition to a better understanding of physiopathological mechanisms, the aim of this project was to identify EGC as a new therapeutic target in IBD. Using a lipidomic analysis, we have demonstrated the underproduction of various lipid mediators by the EGC from IBD patients. Among them, 15-HETE and PGI2 were able to regulate the permeability of the IEB, both in vitro and in vivo. In addition, they appeared to be able to restore functions lost in IBD patients. Thus, our work suggests that underproduction of these lipid mediators by EGC from IBD patients could contribute to pathophysiological mechanisms and represent a new major therapeutic target.

Key Words

Chronic inflammatory bowel disease ; Enteric glial cells ; Intestinal epithelial barrier ; Permeability ; Apoptosis ; Inflammation ; 15-HETE ; Prostacyclin PGI2