

THESE DE DOCTORAT DE BIOLOGIE SANTE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Neurosciences et immunologie

Par

Julie PABOIS

« Rôle du système nerveux entérique et de l'inflammation dans la formation des plexites entériques »

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 9/12/2020

Unité de recherche : UMR Inserm-1235-TENS

Rapporteurs avant soutenance :

Nathalie Vergnolle PhD, DR – Inserm U-1220, Institut en recherche digestive, Toulouse
Stéphane Hunot PhD, DR – CNRS - ICM, Paris

Composition du Jury :

Président : Xavier Treton PhD, PU-PH – CHU Beaujon – Inserm UMR 1149, Paris

Examinateurs : Laetitia Gautreau-Rolland PhD, MCU – Université de Nantes – CRCINA, Nantes
Xavier Treton PhD, PU-PH – CHU Beaujon – Inserm UMR 1149, Paris

Dir. de thèse : Philippe Naveilhan PhD, CRHC – Inserm UMR-1235, TENS, Nantes
Co-dir. de thèse : Isabelle Neveu PhD, CRCN – Inserm UMR-1235, TENS, Nantes

Invité

Michel Neunlist PhD, DR – Inserm UMR-1235, TENS, Nantes

Remerciements

Je remercie avant tout Philippe Naveilhan, Isabelle Neveu et Tony Durand pour tellement de choses qui se sont passés au cours de ces (quasi) quatre années de recherches à leurs côtés qu'il en faudrait presque un deuxième manuscrit ! Je pense sincèrement avoir rejoint la parfaite équipe pour mon épanouissement professionnel en recherche mais aussi personnelle.

Je ne saurais que trop remercier Philippe et Isabelle pour leur encadrement scientifique, leur pédagogie, et leur écoute. Au-delà des aspects professionnels, je vous remercie tous les deux pour votre bonne humeur, votre humanité, ces restaurants, ces verres et ces discussions partagées. Merci d'avoir cru en mes capacités, de m'avoir encouragée et donnée la liberté à mes ambitions de recherches. Philippe merci pour votre confiance, votre disponibilité et vos idées qui ont été des moteurs dans ces travaux et merci encore pour votre générosité. Isabelle merci pour votre patience, votre investissement dans la correction de ces nombreux travaux de rédactions et présentations mais aussi pour votre gentillesse et nos discussions diverses et variées. Vous êtes tous les deux des personnes exceptionnelles et vous formez un duo aussi efficace qu'inoubliable. Je suis heureuse et je mesure ma chance d'avoir pu travailler avec vous.

Tony, je pense qu'il n'existe que très peu de personne comme toi capable d'assurer un si grand nombre d'expériences en parallèle, de le faire avec dynamisme, précision, efficacité, rigueur et bonne humeur. Merci de m'avoir transmis tes connaissances avec patience, pédagogie et humour. Outre tes aptitudes professionnelles incontestables qui ont indéniablement contribué à l'avancée de ce projet (et de tant d'autres), merci pour ta confiance, tes encouragements, tes blagues du vendredi (et celle de tous les autres jours), et pour nos discussions en salle de culture. Ça va me manquer.

Bien évidemment, merci au directeur de l'unité Michel Neunlist, d'avoir créé et développé cette structure de recherche. Merci de m'avoir accueilli et permis de participer à de nombreux congrès nationaux et internationaux ainsi que de m'avoir donné la chance de réaliser une mobilité internationale dans un pays exceptionnel.

Je remercie Kulmira Nurgali et Rhiannon Filippone qui m'ont ouvert les portes de leur laboratoire à Melbourne, qui se sont adapté à mon anglais et qui m'ont fait découvrir la recherche à l'autre bout du monde.

J'adresse des remerciements particuliers à Jacques Gonzales, un collègue sans filtre qui s'est révélé devenir un ami. L'expérience de la thèse demande souvent de la détermination, et tu as su renforcer la tienne comme la mienne. Merci pour tes nombreux conseils et pour ton aide précieuse jusqu'à la rédaction de ce manuscrit. Bien sûr, merci de m'avoir si bien intégré dès mon arrivée au laboratoire, d'avoir partagé de nombreuses bières, cosmopolitains, pâtisseries de chez Guerlais et autres sucreries. Un merci spécifique à Alice Prigent de m'avoir si bien accueillie et toujours encouragée au laboratoire comme autour d'un « petit galopin ». Nos aventures à tous les trois durant la FNM-2019 à Amsterdam resteront des moments inoubliables !!

Je remercie également les étudiants qui ont partagé une partie de mes années au laboratoire notamment Simon C, Charlène G, Farouk D, Marie A, Camille P, Johanna Z, Amélie L, Chloé L et Elise L pour leur gentillesse et les bons moments partagés. Merci à Emeline G et Elsa B de s'être investi dans ce projet et merci à Rodrigue B et Catherine LB de s'y être investi également et de continuer à le faire progresser.

Merci à tous les membres de l'unité qui la font fonctionner au quotidien. Merci pour leur investissement, leur disponibilité, la transmission de leur savoir, la bonne ambiance et l'esprit d'équipe qu'ils assurent. Un remerciement particulier à Malvyne pour sa joie de vivre et ses invitations à diners ainsi qu'à Sophie pour m'avoir donné l'occasion d'enseigner.

Enfin, et non des moindres, je remercie mes proches. Avant tout je remercie mes parents Véronique et Pascal ainsi que mon frère Thomas, sans qui je n'en serai probablement pas là aujourd'hui. Vous êtes une famille géniale, au soutien et à l'amour inconditionnels, qui sont des moteurs pour moi, merci pour tout. Un remerciement particulier à ma mère pour son altruisme et son implication dans la correction orthographique du manuscrit, à mon père pour sa gentillesse et pour m'avoir accordé des moments de détente grâce à sa sélection exceptionnelle de vin ainsi qu'à mon frère pour son humour à toute épreuve et son excellente cuisine. Merci à ceux qui se sont intéressé à ce projet et qui m'ont encouragé depuis de nombreuses années, notamment ma grand-mère Christianne, Florian et Isabelle. Merci aussi à ceux qui ne sont plus là mais qui m'ont toujours encouragé, notamment mon grand-père Jean-Claude. Merci aussi à Jordan, mon amour, d'être unique. Merci pour ton écoute, tes encouragements et ta capacité à mes changer les idées. Merci également à mes amis de toujours Simon et Sarah pour votre soutien et tous ce que l'on partage.

Table des matières

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN CONGRES	1
LISTE DES ACTIVITES COMPLEMENTAIRES.....	3
LISTE DES PRIX ET BOURSES.....	4
LISTES DES ABREVIATIONS :.....	5
INTRODUCTION GENERALE	6
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. Le Système Nerveux Entérique.....	7
1. Historique	7
2. Embryogénèse et maturation post-natale	7
a. Développement in utero.....	7
b. Maturation extra-utérine	9
3. Architecture du réseau nerveux entérique	9
a. Innervation intrinsèque	9
b. Innervation extrinsèque	11
❖ Voie sympathique	11
❖ Voie parasympathique	11
4. Les cellules du SNE	12
a. Les neurones entériques.....	12
b. Les cellules gliales entériques	13
❖ Marqueurs	14
❖ Classification & plasticité	16
❖ Modèle de délétion et d'altération des CGE	17
▪ Les modèles de délétion gliale	18
▪ Les modèles d'altération gliale	19
❖ La coopération glio-neuronale	20
❖ La coopération glio-épithéliale	21
❖ La coopération glio-musculaire.....	21
II. Le Système Immunitaire	22
1. Embryogenèse et maturation post-natale	22
a. Développement in utero.....	22
b. Maturation extra-utérine	23
2. Les organes lymphoïdes	23
a. Les organes lymphoïdes primaires	24
b. Les organes lymphoïdes secondaires.....	24

3. Les cellules immunitaires	26
a. Les cellules de l'immunité innée	26
b. Les cellules de l'immunité adaptative	28
4. La réponse inflammatoire.....	29
a. Généralités	30
b. Médiateurs moléculaires.....	31
c. Migration des lymphocytes	31
III. Interactions neuro-immunes dans la paroi intestinale	33
1. Proximité anatomique	33
a. Proximité et interactions neuro-immunes dans la paroi intestinale	33
b. Innervation des organes lymphoïdes	35
2. Partage de certains modes de fonctionnement	35
a. Synapse nerveuse et synapse immunologique	35
b. Mémoire neuronale et mémoire immunitaire	38
3. Participation des cellules nerveuses à la réponse inflammatoire	38
a. Réponse des cellules nerveuses aux signaux inducteurs exogènes	38
b. Réponse des cellules nerveuses aux médiateurs cytokiniques	39
c. La douleur lors de la réponse inflammatoire	40
d. Réflexe cholinergique anti-inflammatoire	41
4. Communication neuro-immune fonctionnelle	42
a. Neurones et cellules immunes	42
b. CGE et cellules immunes	44
5. Les médiateurs des communications neuro-immunes	45
a. Les neurotransmetteurs	45
b. Les neuropeptides	46
c. Les cytokines	47
IV. La maladie de Crohn	48
1. Epidémiologie & diagnostic	48
a. Epidémiologie	48
b. Diagnostic	48
2. Manifestations & conséquences de la maladie	49
a. Symptômes digestifs & les différents phénotypes de la MC	49
b. Comorbidité & impact sociétal	50
3. Etiologie	51
a. Facteurs de risque environnementaux	51
b. Susceptibilités génétiques	52
4. Mécanismes pathologiques	52
a. Microbiote et dysbiose	53
b. Altération de la BEI	53
c. Hyperactivité du système immunitaire digestif	54
❖ Immunité innée	54
❖ Immunité adaptative	55
d. Altération des réseaux nerveux	56

5. Thérapies & innovations thérapeutiques	58
a. Suivi clinique.....	58
b. Stratégies thérapeutiques actuelles et innovations.....	58
c. Prévention de la récidive post-opératoire : intérêt des plexites entériques.....	60
CONTEXTE & OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	64
RÉSULTATS	65
Article 1:.....	65
T cells show preferential adhesion to enteric neural cells in culture and are close to neural cells in the myenteric ganglia of Crohn's patients.	65
Manuscrit 2 :.....	68
Implication of ICAM-1 in the adhesion of T cells to enteric glial cells : perspectives in the formation of enteric plexitis in Crohn's disease.....	68
Résultats complémentaires	99
1. Etude de l'adhésion des LT en fonction de l'origine des CGE (contrôle vs Crohn).....	99
2. Etude de l'adhésion des sous-populations de LT CD4+ et CD8+ d'origine murine....	101
3. Implication d'ICAM-1/LFA-1 dans l'adhésion des LT CD4+ et CD8+ d'origine murine.....	102
4. Etude de l'adhésion des LT CD4+ et CD8+ aux CGE d'origine humaine	103
5. Etude des LT CD4+ et CD8+ dans les plexus myentériques de patients Crohn.....	104
DISCUSSION & PERSPECTIVES	107
Plexites, une étroite proximité entre les CGE et les LT	107
Caractérisation des LT adhérant aux CGE.....	110
La dynamique d'adhésion des LT.....	111
Implication d'ICAM-1/LFA-1 dans l'adhésion des LT aux CGE.....	112
Conséquences fonctionnelles des interactions LT-CGE	114
Le lifitegrast diminue l'infiltration des LT dans les ganglions myentériques des souris Winnie	121
CONCLUSION.....	124
REFERENCES	126

Liste des publications et communications en congrès

Publications :

Articles présentés dans la thèse :

- ❖ **Pabois J.**, Durand T., Le Berre C., Gonzales J.A., Neunlist M., Bourreille A., Naveilhan P., Neveu I. **T cells show preferential adhesion to enteric neural cells in culture and are close to neural cells in the myenteric ganglia of Crohn's patients.** Journal of neuroimmunology - Volume 349, December 2020, 577422.

- ❖ **Pabois J.**, Le Berre C., Durand T., Filippone R. T., Brossard C., Nurgali K., Neunlist M., Bourreille A., Neveu I., Naveilhan P. **Implication of ICAM-1 in the adhesion of T cells to enteric glial cells: perspectives in the formation of enteric plexitis in Crohn's disease.** En rédaction.

Article non présenté dans la thèse :

- ❖ Kermarrec L., Durand T., Gonzales J., **Pabois J.**, Hulin P., Neunlist M., Neveu I., Naveilhan P. **Rat enteric glial cells express novel isoforms of IL7 regulated during inflammation.** Neurogastroenterology and Motility. 2019;31:e13 4 67.

Communications orales en séminaire interne :

- ❖ **Pabois J.**, Le Berre C., Durand T., Neunlist M., Bourreille A., Neveu I., Naveilhan P. Role of enteric nervous system and inflammation in plexitis formation. Invitée par le **groupe des maladies digestives relatives aux entéro-neuropathies** associés aux universités de Melbourne et de Victoria – Novembre 2019 - Melbourne, Australie.

- ❖ **Pabois J.**, Le Berre C., Durand T., Neunlist M., Bourreille A., Neveu I., Naveilhan P. Rôle du système nerveux entérique et de l'inflammation dans la formation des plexites entériques. **Journées de l'IMAD** (Institut des Maladies de l'Appareil Digestif) – Mai 2019 – Nantes, France

Communications sélectionnées pour une présentation orale dans des congrès :

- ❖ **Pabois J.**, Le Berre C., Durand T., Neunlist M., Bourreille A., Neveu I., Naveilhan P. Les plexites myentériques dans la maladie de Crohn : implication d'ICAM-1 dans les interactions entre cellules gliales entériques et lymphocytes T. **GFNG** (Groupe Français de neurogastroenterologie) - Juin **2019** - **Toulouse, France**.
- ❖ Le Berre C., **Pabois J.**, Durand T., Durieu E., Rolli-Derkinderen M., Bossard C., Podevin J., Neunlist M., Neveu I., Naveilhan P., Bourreille A. Myenteric plexitis and post-operative recurrence in Crohn's disease: the role of enteric glial cells and ICAM-1. 14th congress of **ECCO** - Mars **2019** - **Copenhagen, Danemark**.
- ❖ **Pabois J.**, Durand T., Gonzales J.A., Neunlist M., Neveu I., Naveilhan P. Impact de stimulus pro-inflammatoire sur les interactions cellules gliales entériques-lymphocytes T. **GFNG** – Juin **2017** - **Nantes, France**.

Présentation de poster dans des congrès :

- ❖ **Pabois J.**, Le Berre C., Durand T., Neunlist M., Bourreille A., Neveu I., Naveilhan P. Etude *in vitro* des interactions entre cellules gliales entériques et lymphocytes T dans un contexte pro-inflammatoire, mars **2019**, **JFHOD, Paris, France**.
- ❖ **Pabois J.**, Le Berre C., Durand T., Durieu E., Rolli-Derkinderen M., Bossard C., Neunlist M., Neveu I., Bourreille A., Naveilhan P. Analyses of the interactions between enteric glial cells and T cells in the myenteric plexus of patients with Crohn's disease, octobre **2018**, **DHU2020, Nantes, France**.
- ❖ **Pabois J.**, Durand T., Le Berre C., Neunlist M., Bourreille A., Neveu I., Naveilhan P. « Pro-inflammatory stimuli increase ICAM-1 expression in enteric glial cells and favor T cell adhesion », août **2018**, **FNM, Amsterdam, Pays-bas**.
- ❖ **Pabois J.**, Neveu I., Durand T., Gonzales J. A., Neunlist M., Naveilhan P., Effect of T cell activation and inflammation on the interaction between T cells and Enteric Glial Cells, novembre **2017**, **UEGW, Barcelone, Espagne**
- ❖ **Pabois J.**, Durand T., Gonzales J.A, Neunlist M., Neveu I., Naveilhan P. Effect of pro-inflammatory cytokines on T cell interactions with enteric glial cells, août **2017**, **ENSM, Cork, Irlande**

Liste des activités complémentaires

Enseignement en licence sciences de la vie (L2 & L3) :

- ❖ **Monitorat à la faculté des Science et Techniques de Nantes – 2019/2020** : 60h d’enseignement réparties en TP de « Neurophysiologie : Comment les neurones créent du sens ? » et TD « d’analyses expérimentales et outils bio-informatiques ».

- ❖ **Monitorat à la faculté des Science et Techniques de Nantes – 2018/2019** : 60h d’enseignement réparties en TP de « Bonnes Pratiques de Laboratoire », TP de « Neurophysiologie : Comment les neurones créent du sens ? » et TD « d’analyses expérimentales et outils bio-informatiques ».

Diffusion de la culture scientifique (vulgarisation) :

Tous publics :

- ❖ Ma thèse en 180 secondes – Sélection nantaises – Mars 2020
- ❖ La nuit des chercheurs – Science dating – Février 2020
- ❖ Utopiales nantaises – co-animation du stand de l’unité – Novembre 2018
- ❖ Fête de la science – co-animation du stand de l’unité – 2017 & 2018

Etudiants :

- ❖ Journée Porte Ouvertes des laboratoires – 2019 & 2020
- ❖ Congrès des Licences de la Facultés des Sciences et Techniques de Nantes - 2019
- ❖ Passeport Recherche au lycée Notre Dame des Landes en Vendée – 2017/2018

Formation d’étudiants en stage :

- ❖ **Encadrement de stagiaires de master 2** : Rodrigue Brossaud (2020/2021) et Catherine Le Berre (2017/2018)

- ❖ **Encadrement de stagiaires de licence 3** : Emeline Guillet (2019/2020) et Elsa Bouillard (2018/2019)

Liste des prix et bourses

Prix :

❖ Prix de communication orale - 2019 :

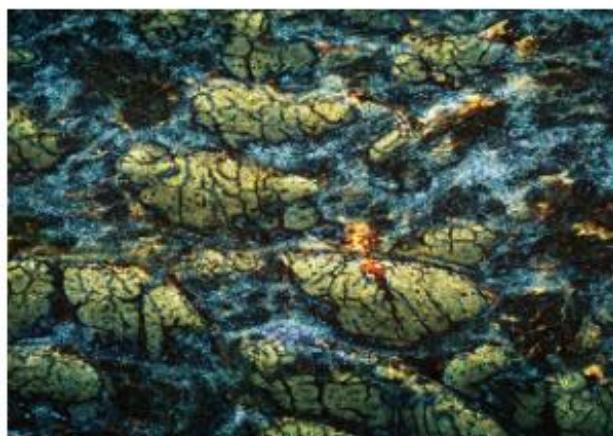
- Congrès national du Groupe Français de Neurogastroentérologie (GFNG) - Juin 2019, Toulouse, France.
- Journées de l’Institut des Maladies de l’Appareil Digestives (IMAD) - Mai 2019, Nantes, France.

❖ 1^{er} prix du concours de l’Imagerie Nantaise aux « Folle Journée de l’Imagerie » organisée par la Fondation Université de Nantes – 2019.

Thématique : Mêler "Art et Science"

Illustration : « Vibration de l’archipel intestinal » - Visualisation d’un épithélium de souris par tomographie plein champ.

Auteurs : Julie Pabois & Tony Durand



Bourses :

❖ Bourse pour une mobilité à l’étranger – 2019.

Bourse de 6000 euros délivrée par la fondation SantéDige pour une mobilité de 3 mois dans le laboratoire du Dr Kulmira Nurgali à Melbourne, Australie.

Projet : évaluer une stratégie pré-clinique par blocage de LFA-1 dans un modèle murin de maladie inflammatoire chronique de l’intestin.

❖ Bourse de Thèse – 2017/2020.

Bourse du Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) obtenue sur concours de l’école doctorale Biologie-Santé de Nantes en 2017. Contrat de thèse de trois ans (09/2017 – 09/2020) + avenant de contrat du au COVID-19 (09/2020 – 12/2020)

Listes des abréviations :

BCR : B cell receptor	LPS : Lipopolysaccharide
BEI : Barriere épithéliale intestinale	LT : Lymphocyte T
BMP2 : Bone morphogenetic protein 2	LTI : Lymphoid tissue-inducer
CGE : Cellule gliale entérique	MC : Maladie de Crohn
CGRP : Calcitonin gene-related peptide	M-CSF : Macrophage colony stimulator factor
ChAT : Choline acétyltransférase	MICI : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	NCC : Neural crest cell
CSH : Cellule souche hématopoïétique	NK : Natural killer
DAMP : Damaged-associated molecular patterns	NLR : Nod-like receptor
DSS : Dextran sodium sulfate	NO : Nitric oxide
ECCO : European crohn's and colitis organisation	PAMP : Pathogen-associated molecular patterns
EGF : Epithelial growth factor	PP : Plaque de Peyer
ENCC : Enteric neural crest derived cell	PRR : Pattern-recognition receptor
GCV : Ganciclovir	RLR : Rig like receptor
GDNF : Glial cell line-derived neurotrophic factor	SI : Système immunitaire
GFAP : Glial fibrillary acidic protein	SMAC : Supra molecular activation cluster
GSNO : S-Nitrosoglutathione	SNE : Système nerveux entérique
ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule-1	SP : Substance P
IFN : Interféron	TCR : T cell receptor
ILC : Innate lymphoid cell	TGF β : Transofrming growth factor β
LB : Lymphocyte B	TLR : Toll-like receptor
LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen-1	TNBS : Trinitrobenzenesulfonic acid
LPL : Lamina propria lymphocyte	TNF : Tumor necrosis factor
	Treg : Lymphocyte T régulateur
	VIP : Vasoactive intestinal peptide

Introduction générale

Le maintien de l'homéostasie nécessite des interactions coordonnées et efficaces entre de multiples types cellulaires. A cet égard, la paroi intestinale a une double particularité. C'est la partie de l'organisme où se côtoie la plus grande diversité cellulaire, et c'est en particulier l'environnement le plus favorable aux interactions neuro-immunes. Dans ce micro-environnement, les cellules du système nerveux entérique (SNE) et du système immunitaire ont des rôles essentiels. Alors que le SNE est le régulateur des fonctions digestives, le système immunitaire assure la surveillance antigénique en ajustant sa balance tolérogénique et ses capacités de défense. Des études de plus en plus nombreuses rapportent la communication bidirectionnelle et l'influence mutuelle de ces deux systèmes dans le maintien et la rupture de l'homéostasie digestive. De plus, l'infiltration aberrante de cellules immunes dans les ganglions myentériques de patients atteints par la maladie de Crohn nous ont conduits à étudier les interactions entre les cellules du SNE et des cellules du système immunitaire.

En effet, une meilleure connaissance des interactions neuro-immunes au sein de la paroi intestinale est importante pour comprendre certains des mécanismes mis en jeu dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales comme la maladie de Crohn (MC). Cette pathologie aujourd'hui encore incurable, se caractérise par des poussées inflammatoires chroniques qui aboutissent à la destruction progressive de la paroi intestinale et qui par conséquent nécessite une ou plusieurs interventions chirurgicales. Les causes de ces dérèglements immunitaires ne sont toujours pas entièrement connues mais des altérations dans les communications intercellulaires ont été suggérées. La présence excessive de cellules immunitaires au sein ou en périphérie des ganglions myentériques, appelé plexites entériques, est une illustration de ces altérations. En outre, depuis 2017, les plexites myentériques sont considérées comme des indicateurs prédictifs de récurrence post-opératoire précoce de la maladie de Crohn, quand elles sont localisées en marge proximale des résections intestinales.

Dans ce contexte, ce projet de thèse s'est focalisé sur les interactions entre les cellules immunes et les cellules neurales entériques. En particulier, j'ai étudié l'adhésion des lymphocytes T aux cellules entériques gliales grâce à des co-cultures préparées à partir de cellules humaines ou murines. Ces travaux descriptifs ont conduit à une collaboration internationale avec le Dr Nurgali afin d'évaluer une stratégie pré-clinique sur le développement de plexites myentériques et de colites dans un modèle murin d'inflammation colique chronique spontanée.

Etude bibliographique

I. Le Système Nerveux Entérique

Le système nerveux entérique (SNE), surnommé le « second cerveau », est une branche intégrée et individualisée du système nerveux autonome spécialisée dans l’innervation du tractus gastro-intestinal.

1. Historique

Au cours de la seconde moitié du 19^{ième} siècle, ont été rapportées les premières descriptions des cellules neurales entériques organisées en plexus au sein de la paroi digestive (Mesisner-1857, Billroth-1858 et Auerbach-1864). En 1899, le professeur russe Dogiel a proposé une première classification tripartite des neurones entériques sur des critères morphologiques et évoquait une éventuelle relation entre leurs morphologies et leurs fonctions (Brehmer et al., 1999; Furness, 2012). C'est aussi en 1899, que les britanniques Bayliss et Starling ont observé la contraction spontanée *ex vivo* d'un segment d'intestin grêle canin preuve qu'il existe un système nerveux intrinsèque capable de contrôler la contractilité des muscles lisses intestinaux (Bayliss and Starling, 1899). Les cellules gliales entériques (CGE), initialement évoquées par le Pr Dogiel, ont véritablement été décrites par le professeur d'histologie Gabella en 1972, puis précisées en 1981 (Gabella, 1972, 1981). Il les a notamment comparées aux cellules gliales du système nerveux central observant une similarité particulière avec les astrocytes. Au cours du 20^{ième} siècle, le codage neurochimique et la connectivité neuronale ont été largement recherchées (Brehmer et al., 1999). Finalement, c'est en 1921 que le Dr Langley a proposé la dénomination spécifique de « système nerveux entérique » pour désigner ce système nerveux autonome unique (Gershon, 1999; Spencer and Hu, 2020).

2. Embryogénèse et maturation post-natale

A la naissance, neurones et cellules gliales sont déjà organisés selon le réseau architectural adulte mais ils subissent une maturation fonctionnelle indispensable aux activités optimales du tractus intestinal lors de la période post-natale (Roberts et al., 2007).

a. Développement *in utero*

Les recherches sur le développement embryonnaire ont principalement été réalisées sur des embryons de poulet et de souris, complétées par des études sur le poisson-zèbre et l'Homme (Goldstein et al., 2013).

Les neurones entériques et les CGE dérivent de progéniteurs multipotents communs, les cellules de la crête neurale (NCC), majoritairement d'origine vagale (Yntema and Hammond, 1954; Goldstein et al., 2013). Leur migration précoce se fait selon un gradient rostro-caudal avec un développement initial du plexus myentérique (Nagy and Goldstein, 2017). Dès leur entrée au sein du mésenchyme intestinal, les NCC acquièrent un phénotype entérique (ENCC) avant de se différencier en neurones ou CGE (*Figure 1*) (Wallace and Burns, 2005; Heanue and Pachnis, 2007; Goldstein et al., 2013).

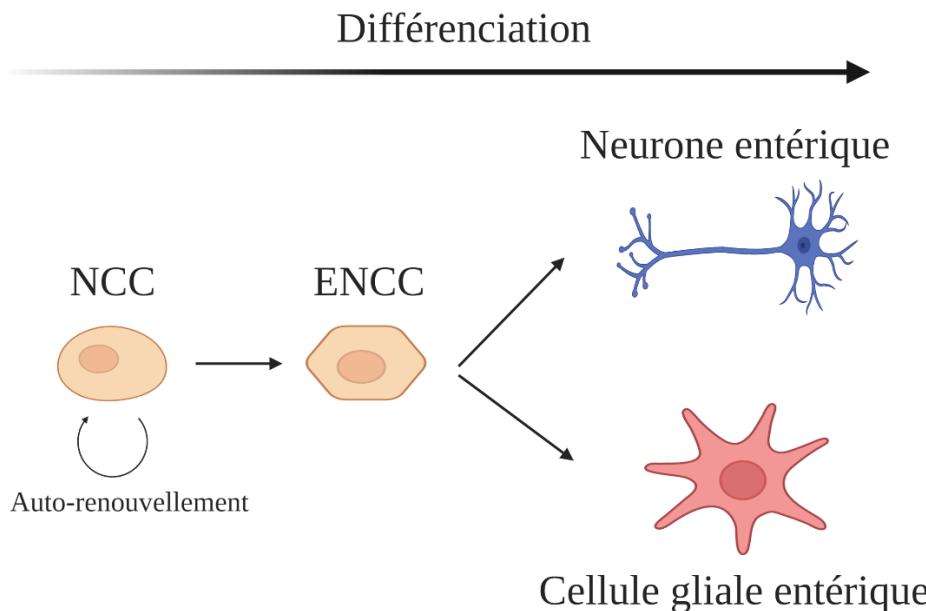


Figure 1 : Différenciation progressive des NCC en ENCC puis en neurones entériques ou cellules gliales entériques au cours de l'embryogenèse. Crée sur biorender.com à partir d'Heanue et Pachnis (Heanue and Pachnis, 2007).

Plusieurs voies de signalisation sont indispensables à la mise en place du réseau nerveux entérique, notamment la voie du GDNF-GFR α 1-Ret. Le GDNF est un facteur neurotrophique aux fonctions pléiotropiques primordiales au développement et fonctionnement du SNE. Son récepteur GFR α 1 s'hétérodimerise avec la chaîne Ret qui transduit le signal via des activités tyrosine kinase. Les modèles murins présentant une délétion des gènes codants pour le GDNF, le GFR α 1 ou le Ret, naissent avec un tronc gastro-intestinal aganglionique et meurent très rapidement (Schuchardt et al., 1994; Moore et al., 1996; Enomoto et al., 1998). Des études complémentaires ont démontré qu'au cours des différentes étapes du développement le GDNF limitait l'apoptose des ENCC, favorisait leur auto-renouvellement (Taraviras et al., 1999; Mwizerwa et al., 2011), contribuait à leur migration au sein de la paroi intestinale (Young et al., 2001; Natarajan et al., 2002) et stimulait leur différenciation en neurones (Mwizerwa et al., 2011).

b. Maturation extra-utérine

A la naissance, les neurones entériques des sourceaux sont déjà connectés par des synapses fonctionnelles et produisent différents neurotransmetteurs. Toutefois, il faudra encore environ onze jours pour aboutir à un réseau nerveux entérique fonctionnellement mature. Durant cette période de maturation, l’arborisation axonale se complexifie et les propriétés électrophysiologiques se développent (Jp et al., 2012; Hao et al., 2013). De récentes études suggèrent un rôle important de la communauté microbiotique lors de cette étape de maturation (Kabouridis and Pachnis, 2015; Obata and Pachnis, 2016). Les modèles murins dépourvus de microbiote, les souris axéniques, ainsi que les souris conventionnelles traitées aux antibiotiques, ont une réduction de l’excitabilité des neurones myentériques de l’iléum, (McVey Neufeld et al., 2013) et une diminution de la densité gliale (Kabouridis et al., 2015) et nerveuse au niveau des segments jéjunum et iléum associé à une réduction de la fréquence et de l’amplitude des contractions jéjunales (Collins et al., 2014). L’impact des bactéries sur les cellules nerveuses entériques serait en partie médié par les TLR. Par exemple, la liaison de lipopolysaccharides (LPS) présents dans la paroi des bactéries Gram négatives, au TLR4 neuronal favorise leur survie (Anitha et al., 2012). Par ailleurs, la délétion génétique du TLR2 réduit le nombre de neurones et de CGE de façon similaire aux observations dans les souris traitées aux antibiotiques (Brun et al., 2013). L’action du microbiote sur le développement nerveux entérique pourrait également se faire à travers des dérivés de la fermentation des fibres alimentaires, comme le butyrate qui favorise la proportion de neurones myentériques producteurs d’acetylcholine (Soret et al., 2010).

3. Architecture du réseau nerveux entérique

La paroi du tractus gastro-intestinal est innervée par le SNE dont les corps neuronaux sont localisés au sein même de la paroi digestive (innervation intrinsèque), mais également par le réseau nerveux autonome extrinsèque dont les corps neuronaux sont localisés dans le tronc cérébral, la moelle épinière ou les relais ganglionnaires (*Figure 2*) (Schemann and Neunlist, 2004; Spencer and Hu, 2020).

a. Innervation intrinsèque

Le SNE est présent dans la paroi du tube digestif à partir du tiers inférieur de l’œsophage jusqu’à l’anus. Son organisation fonctionnelle est remarquable. Les corps cellulaires des neurones et des CGE sont agrégés en amas de différentes densités pour former les ganglions nerveux.

La connexion entre les ganglions d'un même plan est assurée par les fibres inter-ganglionnaires constituées de prolongements neuronaux et gliaux ainsi que des CGE.

L'ensemble des ganglions et des fibres inter-ganglionnaires d'un même plan est appelé plexus. Chaque ganglion est de taille relativement modeste mais l'ensemble des plexus constitue un vaste réseau parfaitement structuré (Wattchow et al., 1995; Furness, 2012; Spencer and Hu, 2020). Une étude rapporte jusqu'à huit plexus dans le colon humain (Wedel et al., 1999) mais l'on admet le plexus sous-muqueux ,ou de Meisner, et le plexus myentérique, ou d'Auerbach, comme les deux principaux plexus.

Le plexus sous-muqueux est localisé sous la muqueuse. Il est subdivisé en une partie interne, proche de la lumière digestive correspondant au plexus initialement décrit par Meisner, et en une partie externe décrite comme le plexus de Schabdasch ou de Henle (Brehmer et al., 2010). Pour d'autres auteurs, il existe un plexus intermédiaire décrit chez le cochon et chez l'homme (Hoyle and Burnstock, 1989). Le plexus sous-muqueux est le plus développé dans l'intestin grêle où les fonctions d'absorption et sécrétion sont les plus actives. Les cellules nerveuses de ce plexus sous-muqueux sont principalement impliquées dans le contrôle de la barrière épithéliale (Brehmer, 2006; Brehmer et al., 2010).

Le plexus myentérique est localisé dans la muscleuse entre les deux couches de cellules musculaires lisses. Ses ganglions sont de taille plus imposante et ses neurones innervent principalement les cellules musculaires lisses qui l'encerclent mais des projections dans la muqueuse ont également été observées (Goyal and Hirano, 1996; Hens et al., 2001). Dans l'intestin grêle et le colon, le plexus myentérique est le principal régulateur de l'activité motrice qui assure la segmentation pour un mélange efficace du bolus, le péristaltisme pour la propulsion, ainsi que la propulsion lente associée au réflexe moteur. C'est à son niveau que se font les principales connexions avec le réseau nerveux extrinsèque (Furness, 2012; Gulbransen and Sharkey, 2012). Enfin, grâce à la coopération entre les deux plexus, le SNE peut induire une réponse réflexe rapide d'éviction aux toxiques en induisant la diarrhée et/ou le vomissement (Furness et al., 2013).

b. Innervation extrinsèque

Les fonctions digestives sont également sous l'influence des voies autonomes extrinsèques sympathiques et parasympathiques. Cette innervation assure également un rôle dans l'axe intestin-cerveau (Schemann, 2005; van de Wouw et al., 2017).

❖ Voie sympathique

La voie sympathique est principalement activée en cas de stress, de fuite et/ou de défense. Son activation entraîne une réduction des activités digestives. Les fibres nerveuses impliquées sont principalement des projections efférentes transportant les informations du cerveau vers le tractus gastro-intestinal (Capurso et al., 1968). Le principal neuromédiateur post-ganglionnaire est la noradrénaline, aussi appellée norépinephrine (Costes et al., 2013).

❖ Voie parasympathique

La voie parasympathique est principalement active lors du repos et de la digestion. Le nerf vague innerve le tractus gastro-intestinal selon un gradient proximo-distal avec une forte densité de fibres dans le duodénum et l'intestin grêle proximal. Les fibres, en majorité afférentes, relaient les informations en provenance de la paroi intestinale vers le système nerveux central (Forsythe et al., 2014; Willemze et al., 2015). Le principal neuromédiateur post-ganglionnaire est l'acétylcholine. Cette voie parasympathique a également été identifiée comme un acteur immunosuppresseur et désigné sous le terme de réflexe cholinergique anti-inflammatoire (Ordovas-Montanes et al., 2015; Willemze et al., 2015).

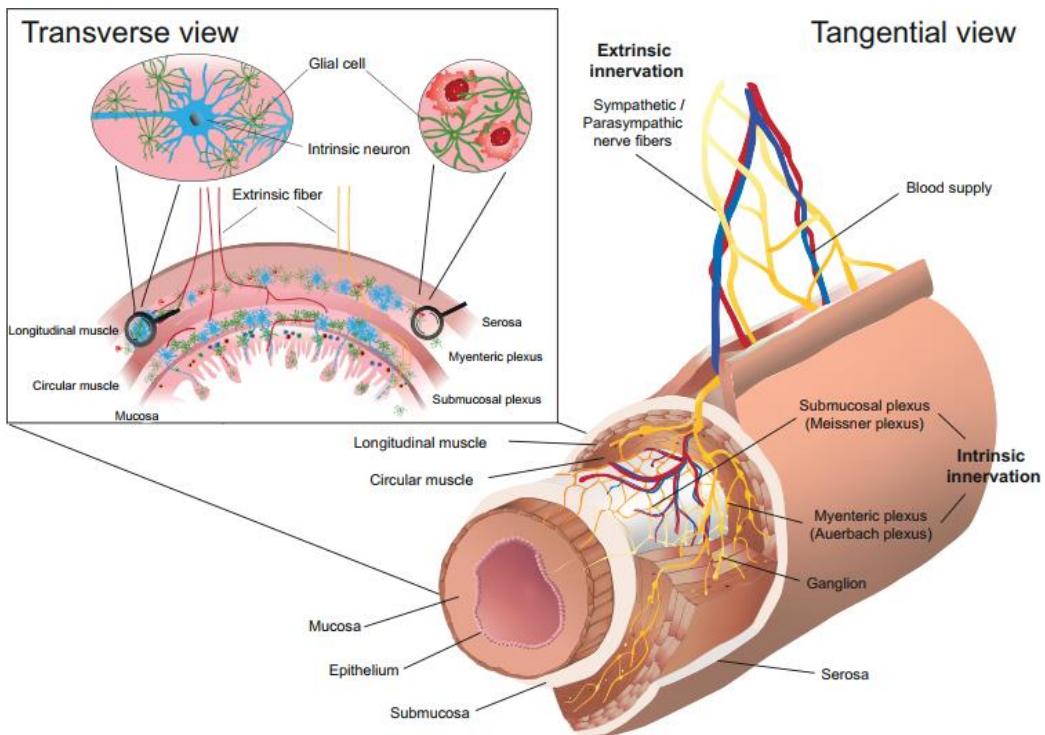


Figure 2 : Représentation circulaire et transverse de l'innervation intrinsèque et extrinsèque de la paroi intestinale. La paroi intestinale est stratifiée de la lumière vers les couches profondes par la barrière épithéliale, la muqueuse, la sous-muqueuse où se situe le plexus nerveux sous-muqueux, la couche musculaire circulaire, le plexus myentérique, les fibres musculaires longitudinales et la séreuse ou adventice (Jakob et al., 2020).

4. Les cellules du SNE

Le SNE est exclusivement composé de neurones et de cellules gliales entériques. Les neurones entériques représentent une réelle hétérogénéité associée à des fonctions bien caractérisées et individualisées. La diversité des cellules gliales entériques semble plutôt être l'expression d'une plasticité cellulaire liées aux diverses stimulations environnementales.

a. Les neurones entériques

Le corps cellulaire des neurones entériques est localisé dans les plexus d'où ils projettent leurs prolongements, les axones et les dendrites, dans l'ensemble des couches de la paroi digestive. Ils expriment des marqueurs pan-neuronaux comme PGP9.5 et HuC/D. Certains produisent des neurotransmetteurs communs aux neurones centraux, comme l'acétylcholine, ou spécifique du tractus gastro-intestinal, comme le neuropeptide vasointestinale (VIP). Si l'acétylcholine est considéré un neurotransmetteur excitateur au sein de la paroi intestinale, le VIP a une activité secrétomotrice inhibitrice (Spencer and Hu, 2020).

La classification tripartite historique des neurones entériques s'est complexifiée, et l'hypothèse d'un lien structure/fonction s'est confirmée. Aujourd'hui, on estime le nombre de neurones entériques entre 400 et 600 millions classés en 16 sous-types fonctionnels selon les critères morphologiques, l'expression de neuromédiateurs et les propriétés électrophysiologiques. Trois principaux groupes sont distingués selon leurs fonctions (Furness, 2000, 2012) :

- Les neurones sensitifs sont des neurones intrinsèques afférents primaires. Caractérisés par de larges corps cellulaires et de nombreux prolongements innervant la muqueuse et les couches musculaires, ils détectent les changements environnementaux (chimio et mécano-senseur) et initient la réponse nerveuse (Bertrand et al., 1997; Furness, 2006; Furness et al., 2004).
- Les neurones moteurs, sont subdivisés en cinq sous-types : les neurones excitateurs, les neurones inhibiteurs, les neurones secrétomoteurs/vasodilatateurs, les neurones secrétomoteurs non vasodilateurs et les neurones reliés aux cellules entero-endocrines. Ils innervent l'ensemble des cellules musculaires lisses intestinales, l'épithélium, les glandes sécrétrices, ainsi que les vaisseaux sanguins et lymphatiques pour adapter leurs activités contractiles.
- Les interneurones sont des cellules qui assurent la connexion entre les neurones sensitifs et moteurs.

Des études sont actuellement menées pour comprendre les mécanismes d'intégration des signaux entre ces différents types de neurones et leur relation avec les cellules de leur microenvironnement (Spencer and Hu, 2020).

b. Les cellules gliales entériques

Les cellules gliales entériques, également appelée glie entérique, ont été étudiées plus tardivement que les neurones entériques mais se sont révélées indispensable à l'homéostasie digestive. C'est une population cellulaire unique, plastique, présentant des caractéristiques phénotypiques hétérogènes. Les CGE sont impliquées dans des échanges bidirectionnels avec de nombreuses cellules du micro-environnement. Pour reprendre le terme d'Ibiza, les CGE constituent une « plaque tournante » du tractus gastro-intestinal, intégrant rapidement les stimuli luminaux et endogènes, adaptant leur réponses et modulant l'activité des cellules avoisinantes (Ibiza et al., 2016).

❖ Marqueurs

Les CGE expriment des protéines communes aux autres populations gliales identifiées à ce jour (*Figure 3 & 4*). L'expression de ces protéines varie en fonction de l'environnement et de leur localisation (Jessen and Mirsky, 1980; Ferri et al., 1982; Hoff et al., 2008; Laranjeira and Pachnis, 2009; Grubišić and Gulbransen, 2017).

La protéine GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) est le composant principal des gliofilaments. Parmi ses neuf variants d'épissages, GFAP κ est le variant majoritairement exprimé par la glie entérique (Clairembault et al., 2014). Son expression varie au cours du temps et en fonction du microenvironnement (Boesmans et al., 2015). Ce marqueur du cytosquelette glial est généralement utilisé comme indicateur de réactivité gliale (von Boyen, 2004; Rosenbaum et al., 2016; da Cunha Franceschi et al., 2017).

La protéine S100 β est un isoforme de la famille des protéines de liaison au calcium S100. Elle appartient à la superfamille EF-hand. Dans les cellules gliales, la protéine S100 β est impliquée dans le métabolisme protéique, l'agencement du cytosquelette, la régulation des récepteurs, la prolifération cellulaire, la différenciation et l'homéostasie calcique (Heizmann, 2002; Donato et al., 2009).

Le facteur de transcription SOX10 est exclusivement exprimé dans le noyau. Il est principalement utilisé comme marqueur pour dénombrer les cellules gliales (Hoff et al., 2008).

Plus récemment identifiée comme marqueur glio-entérique, la protéine protéolipide-1 (PLP-1) est un isoforme de la famille des protéolipides qui composent la gaine de myéline. Cette protéine cytoplasmique est majoritairement co-exprimée par les CGE S100 β^+ (Rao et al., 2015).

Marqueur	Avantages	Inconvénients	Références
S100 β	Marqueur de surface	Expression variable, marquage plus ou moins diffus	Ferri et al., 1982 ; Liu et al., 2013 ; Stenkamp-Strahm et al., 2013
GFAP	Marqueur de réactivité gliale	Expression variable, marquage fibrillaire	Jessen and Mirsky, 1980; Stenkamp-Strahm et al., 2013
SOX10	Marqueur du noyau (dénombrément)	Aucune indication morphologique	Hoff et al., 2008; Stenkamp-Strahm et al., 2013

Figure 3 : Avantages et inconvénients des trois principaux marqueurs gliaux utilisés pour les analyses immunohistochimiques.

Les CGE ont principalement été associées aux astrocytes, de par l'expression de la GFAP, cependant de récentes analyses transcriptomiques ont révélé une proximité génétique majeure des CGE avec les cellules de Schwann, puis avec les oligodendrocytes et enfin, avec les astrocytes. L'étude a également rapporté l'expression de gène commun avec les neurones. Au-delà de ces similarités, la glie entérique est véritablement reconnue comme une population unique au profil transcriptomique spécifique (Rao et al., 2017).

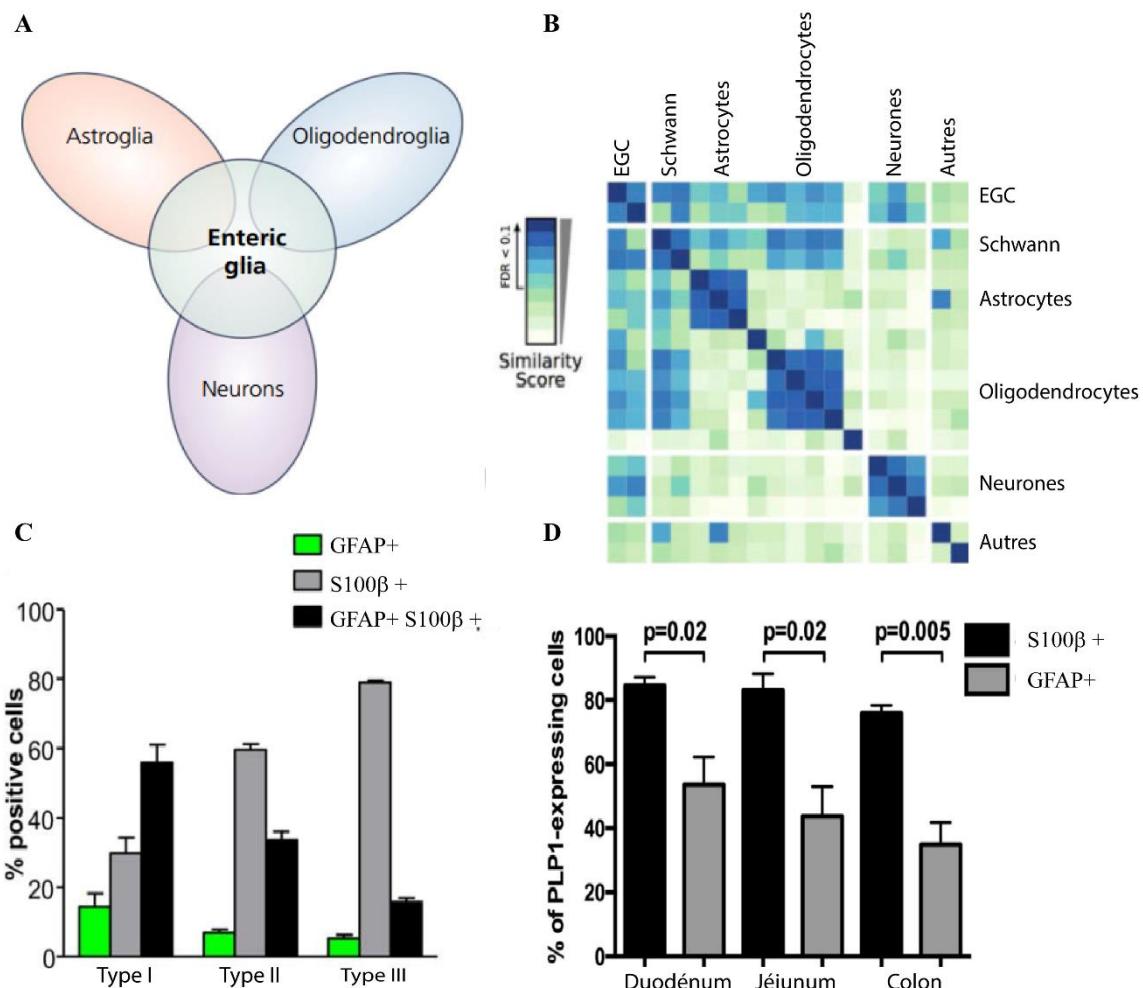


Figure 4 : Les CGE constituent une population gliale unique co-exprimant des marqueurs gliaux centraux (astrocytes, oligodendrocytes) et périphériques (cellules de Schwann) ainsi que des marqueurs neuronaux (A-B). Les marqueurs gliaux GFAP, S100 β et PLP1 sont plus ou moins co-exprimés sélectivement par les CGE. Leur expression varie en fonction des types gliaux selon leur localisation (C) ainsi que selon les segments intestinaux (D) (Boesmans et al., 2015; Grubišić and Gulbransen, 2017; Rao et al., 2017).

❖ Classification & plasticité

Les CGE constituent la population majoritaire du SNE. Selon le plexus et l'espèce, elles peuvent être jusqu'à sept fois plus nombreuses que les neurones (Hoff et al., 2008). Elles sont présentes dans l'ensemble des strates de la paroi digestive, notamment dans les plexus mais également dans la lamina propria et les couches musculaires (Gabella, 1981, 1972; Gershon and Rothman, 1991; Gulbransen and Sharkey, 2012). De morphologie hétérogène, les CGE possèdent plusieurs prolongements qui, chez l'homme, peuvent atteindre cent micromètres (Liu et al., 2013).

Dans les années 80, une classification des différentes CGE a été élaborée en fonction de leur localisation et de leurs caractéristiques morphologiques (Komuro et al., 1982; Hanani and Reichenbach, 1994). Cette classification a été complétée et validée en 2012 puis en 2015 (*Figure 5*) (Gulbransen and Sharkey, 2012; Boesmans et al., 2015).

- Le Type I correspond aux cellules gliales intra-ganglionnaires. Ces CGE sont les plus proches morphologiquement des astrocytes.
- Le Type II est observé aux jonctions ganglionnaires et dans les fibres interganglionnaires. Ce sont les CGE inter-ganglionnaires.
- Le Type III est subdivisé entre les types IIISM quand les CGE sont localisées dans les plexus sous-muqueux et les types IIIm lorsque les CGE sont observées dans la muqueuse. Le réseau glial sous-muqueux est particulièrement dense. Il s'organise verticalement et horizontalement le long des villosités intestinales où il est en étroite proximité avec l'épithélium ainsi qu'avec les vaisseaux sanguins (CD34+) et lymphatiques (D2-40+) (Liu et al., 2013).
- Le Type IV est localisé au niveau des fibres musculaires circulaires et longitudinales généralement le long des prolongements neuronaux. Ce sont les CGE intra-musculaires.

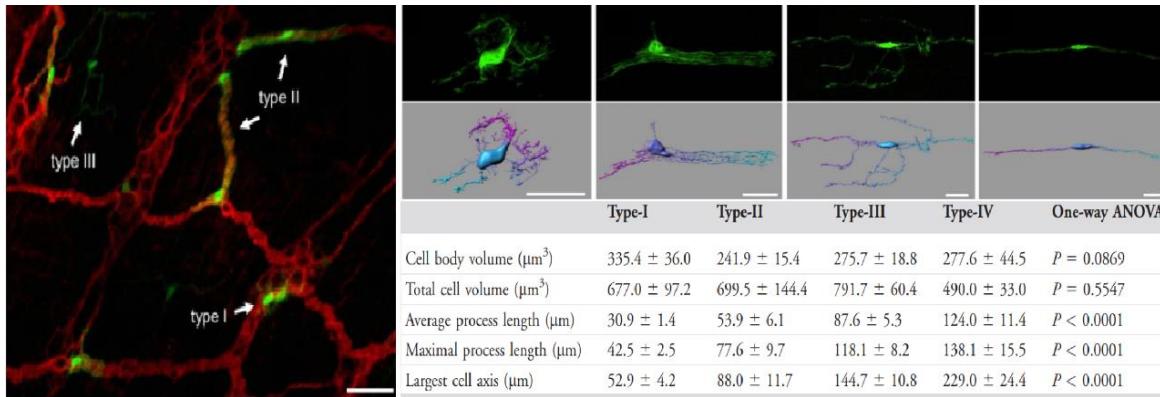


Figure 5 : Les quatre types de CGE identifiés selon leur localisation et des critères morphologiques associés (Boesmans et al., 2015).

A ce jour, aucune corrélation n'a été mis en évidence entre ces quatre sous-types et des fonctions spécifiques, mais des différences dans l'expression des canaux potassiques voltage-dépendant (Costagliola et al., 2009) et dans la réponse à l'ATP (Boesmans et al., 2015) ont été rapportées. Cette classification est en pratique peu utilisée car aucun lien structure-fonction n'a été démontré. De plus, les CGE sont incroyablement plastiques avec une expression dynamique des différents marqueurs en fonction de leur localisation et selon les stimulations environnantes (Valès et al., 2018).

❖ Modèle de délétion et d'altération des CGE

Les CGE forment un syncytium fonctionnel qui assure une communication rapide à travers les gap jonctions, notamment la transmission des flux calciques (Hanani et al., 1989; Maudlej and Hanani, 1992; Hanani et al., 2000; Zhang et al., 2003; Boesmans et al., 2013; Ochoa-Cortes et al., 2016). Par ailleurs, les CGE ont la propriété de détecter une grande variabilité de stimuli d'origine luminal, comme des dérivés du microbiote (Turco et al., 2014), ou les composés nutritionnels (Neunlist and Schemann, 2014). Elles expriment également des récepteurs aux neurotransmetteurs (Georg B. T. von Boyen et al., 2006; Boesmans et al., 2013) et aux cytokines (Rühl et al., 2001b, 2001a; G. B. T. von Boyen et al., 2006; von Boyen et al., 2004). En réponse à ces stimuli, les CGE modifient notamment leur production de facteurs neurotrophiques, de cytokines, de dérivés lipidiques et des protéines intervenant dans la régulation calcique (Cabarrocas et al., 2003; Neunlist et al., 2013; Pochard et al., 2018).

Pour étudier *in vivo* les fonctions gliales entériques, différents modèles de délétion ou d'altération ont été développés chez la souris en ciblant principalement les populations GFAP+ (*Figure 6*).

- Les modèles de délétion gliale

Un premier modèle développé par Bush et ses collaborateurs était basé sur la destruction des CGE par injection de ganciclovir (GCV) à des souris exprimant la protéine HSV sous le promoteur GFAP. Dans ce modèle, la délétion des cellules gliales ganglionnaires et muqueuses avait majoritairement lieu dans les segments de l'intestin grêle terminal. Chez ces souris ont été observées une nécrose fulgurante de la paroi intestinale, une prolifération sanguine de bactérie à Gram negative, une perte et une atrophie neuronale, des désordres épithéliaux et une hyperactivité immunitaire (Bush et al., 1998). En 2007, Savidge et al. ont reproduit ce modèle de délétion GFAP-HSV-GCV et ont confirmé une destruction massive des CGE GFAP+ au niveau des parties terminales de l'intestin grêle. La première altération observée est une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale (BEI), suivi 7 jours plus tard, de manifestations inflammatoires digestives et de signes cliniques. Cette observation suggérait un rôle majeur des CGE dans le contrôle de la perméabilité de la barrière épithéliale. Ils ont ensuite démontré la sécrétion gliale de GSNO comme inducteur de l'expression de protéines de jonctions serrées au niveau des cellules de la BEI (Savidge et al., 2007).

Dans un second modèle, les CGE ont été éliminées grâce à l'activité cytolytique des LTCD8+ selon un mécanisme d'autoantigène basé sur l'expression de la protéine HA sous le promoteur GFAP et sur la production de LTCD8+ avec un TCR spécifique de la protéine HA. Ce modèle n'est pas viable et les souriceaux survivaient à peine une semaine. De ce fait, les analyses ont été réalisées sur des fragments intestinaux présentant un SNE immature. Associés à une suppression gliale majoritairement sous-muqueuse, les analyses ont révélé des lésions inflammatoires iléales et coliques sans impact des populations neuronales PGP9.5+ (Cornet et al., 2001). Pour pallier aux problèmes de létalité précoce, Aube et al. ont effectué un transfert adoptif de LT CD8+ aux TCR anti-HA chez des souris adultes. Les analyses ont révélé une altération du codage neurochimique variable selon le plexus, une réduction de la motricité intestinale et une augmentation de la perméabilité paracellulaire sans manifestation inflammatoire (Aube, 2006).

Un troisième modèle récemment développé par Rao et al. est basé sur l'ablation des cellules gliales PLP1+ présentes dans les plexus, les couches musculaires et la muqueuse. Les analyses de ce modèle n'ont pas rapporté de signe d'inflammation, ni d'altérations neuronales ni de dysfonctions de la BEI. Seule, une augmentation du réflexe moteur colique a été observée chez les souris femelles. Pour évaluer l'impact de cette délétion gliale dans un contexte pathologique, du Dextran Sodium Sulfate (DSS) a été ajoutée à l'eau de boisson des souris pour induire une

colite. Suite à ce traitement, les souris contrôles et les souris sans CGE développaient une colite similaire. Dès lors, Rao et al. ont conclu que les CGE PLP1+ n'ont pas de rôle dans le contrôle des fonctions de la BEI. Ils suggèrent que l'inflammation précédemment observée dans le modèle GFAP-HSV-GCV serait probablement due à l'action毒ique parasite associée à la réaction de lyse GCV-HSV sur les cellules avoisinantes, notamment les cellules épithéliales (Rao et al., 2017).

- Les modèles d'altération gliale

Des modèles affectant les fonctions gliales sans provoquer leur mort ont également été utilisés. Nasser et al. ont généré un de ces modèle en administrant du fluorocitrate, un poison métabolique qui inhibe une enzyme gliale. Dans ce modèle, des altérations motrices intestinales ont été observées sans modification du réseau neuronal, des fonctions de la BEI, ni de la réponse inflammatoire (Nasser et al., 2006). Gulbransen et Grubisic ont quant à eux, généré des souris transgéniques connexine-43 chez lesquelles la formation de gap-jonction peut être bloquée, empêchant la communication gliale. Dans ce modèle inductible, aucun changement de la perméabilité de la BEI n'a été observé, mais les analyses ont révélé une diminution du transport ionique par les neurones et une réduction de la motricité intestinale (Grubišić and Parpura, 2017).

Pour conclure, les modèles de suppression et d'altération gliales entériques ont rapporté des données contradictoires qui suggèrent toutefois l'implication des interactions entre les CGE et les cellules du microenvironnement. Ces observations vont également dans le sens d'une hétérogénéité et d'une plasticité gliale pour adapter des réponses.

Population gliale	Principe	Altération BEI	Altération neurones	Altération motrice	Inflammation
GFAP+	Transgène - HSV + GCV	Oui	Oui	NA	Oui
GFAP+	Transgène – HA + LT anti-HA (letal)	NA	Non	NA	Oui
GFAP+	Transgène – HA + injection LT anti-HA	Oui	Oui	Oui	Non
PLP-1+	Transgène - Tamoxifen	Non	NA	Oui (femelle)	Non
Toutes	Gliotoxine: Fluorocitrate	Non	Non	Oui	Non
Toutes	Transgène- Connexine43	Non	Oui	Oui	NA

Figure 6 : Tableau récapitulatif des effets observés dans les modèles de délétion ou d'altération gliale chez la souris. NA = Non Analysé.

❖ La coopération glio-neuronale

La proximité anatomique entre les CGE et les neurones entériques a été rapportée dès les premières descriptions du réseau nerveux entérique (Gabella, 1981, 1972; Komuro et al., 1982) et la coopération entre ces deux types cellulaires a été largement décrite (De Giorgio et al., 2012). Les CGE assurent un soutien structurel aux neurones et participent également à leur survie en secrétant des facteurs neurotrophiques (Anitha et al., 2006; G. B. T. von Boyen et al., 2006), en éliminant des cations K+ présent en excès dans l'espace extracellulaire (Hanani et al., 2000), en dégradant les radicaux libres oxygénés (Abdo et al., 2010, 2012) ou en détoxifiant des produits du catabolisme du glutamate (Fletcher et al., 2002). Elles sont également impliquées dans la neurotransmission en contribuant à la synthèse de neurotransmetteurs comme le glutamate, le GABA (Galligan et al., 2000) et le NO (Nagahama et al., 2001), en facilitant l'arborisation axonale et la densité synaptique physiologique (Le Berre-Scoul et al., 2017) et en favorisant la transmission d'informations sensitives des cellules entéroendocrines de la BEI vers les neurones entériques (Bohórquez et al., 2014). Une implication des CGE dans l'activité des synapses neuronales a également été rapportée (Gulbransen and Sharkey, 2009; Fung et al., 2017). Enfin, de récentes expériences réalisées *in vitro* ont mis en évidence une communication paracrine entre les neurones et les CGE à travers l'ATP, les purines (Gulbransen and Sharkey, 2009) et la voie de signalisation calcique (Boesmans et al., 2019).

❖ La coopération glio-épithéliale

Le rôle indispensable des CGE sur la perméabilité de la BEI a été remis en question par Rao et al. (Rao et al., 2017), cependant le modèle de délétion gliale au ganciclovir avait rapporté une augmentation de la perméabilité de la barrière comme cause première des manifestations inflammatoires digestives et de signes cliniques (Savidge et al., 2007). De plus, de nombreuses études ont démontré une implication des cellules gliales dans la différentiation, l'adhésion, la migration et la prolifération des cellules de la BEI (Neunlist et al., 2013). Ces actions paracrines sont renforcées par la proximité anatomique entre les cellules de la BEI et les CGE de la muqueuse ou les prolongements gliaux en provenance des plexus (Mestres et al., 1992). En effet, le réseau glial muqueux est dense, s'étendant de la base des cryptes jusqu'aux villosités (Liu et al., 2013). Des études réalisées *in vitro* ont également rapporté une action protectrice de GSNO gliale sur des portions de colon humain préstimulées par la souche pathogène *Shigella flexneri* (Flamant et al., 2011) ainsi que son rôle inducteur dans l'expression de protéines de jonctions serrées sur la lignée épithéliale humaine Caco-2 préalablement stimulée par un cocktail de cytokines pro-inflammatoires (Cheadle et al., 2013). Enfin, grâce à la sécrétion de pro-EGF et la stimulation de kinases d'adhésion focale, la glie entérique facilite la réparation de la BEI en favorisant la mobilité des cellules épithéliales (Van Landeghem et al., 2011).

❖ La coopération glio-musculaire

Les CGE et leurs prolongements sont présents dans les couches musculaires profondes de la paroi intestinale (Komuro, 1988; Hanani and Reichenbach, 1994; Boesmans et al., 2015). De plus, les modèles d'altération ou de délétion gliale suggèrent un rôle prépondérant de la glie dans la motricité intestinale. Grâce aux jonctions gap, le syncytium glial serait impliqué dans le contrôle de la motricité (McClain et al., 2014). Le mode d'action exact reste à être déterminé. Un effet indirect via les neurones serait également possible (Nasser et al., 2006; Rao et al., 2017).

II. Le Système Immunitaire

Le système immunitaire (SI) assure la défense de l'organisme face aux agressions extérieures (virus, bactéries, champignons, lésions) et intérieures (cancers). Alors que le système immunitaire inné intervient immédiatement et de manière non spécifique, la réponse immunitaire adaptative intervient dans un second temps grâce à des mécanismes de reconnaissance spécifique. Chez les individus sains, en absence de stress pathogénique, le système immunitaire est dans un état tolérogénique ; alors que chez des individus souffrant de maladies auto-immunes et/ou de maladies inflammatoires chroniques, les réponses immunitaires sont aberrantes et/ou incontrôlées aboutissant à la destruction des tissus (Parkin and Cohen, 2001).

1. Embryogenèse et maturation post-natale

Les cellules immunes dérivent d'un précurseur commun appelé cellule souche hématopoïétique (CSH) et se différencient au cours de l'hématopoïèse.

*a. Développement *in utero**

In utero, l'hématopoïèse a lieu principalement dans le foie primitif (Cumano et al., 2019). Certaines cellules souches hématopoïétiques se différencient en progéniteurs hématopoïétiques circulants, les cellules initiatrices des tissus lymphoïdes (LTI), au phénotype CD45+IL7R α +CD4+CD3-. Les LTI sont à l'origine du développement des ganglions lymphatiques ainsi que des plaques de Peyer (PP) (Drayton et al., 2006).

Comme pour le développement du réseau nerveux entérique, la voie de signalisation Ret est également impliquée dans l'hématopoïèse en favorisant notamment la survie et la prolifération des CSH (Fonseca-Pereira et al., 2014) ainsi que la mise en place des PP. En effet, chez la souris, la suppression du gène Ret, ou de son co-récepteur GFR α 3, diminue le nombre de PP dans l'intestin adulte. Une première étude a démontré le rôle précoce et spécifique de la signalisation Ret/GFR α 3/artémine dans l'attraction et l'agrégation des LTI (Veiga-Fernandes et al., 2007). Ces observations ont été confirmées par Patel et al. qui ont montré par vidéo-microscopie le ralentissement et l'aggrégation des LTI à proximité de billes chargées en artémine. Ils ont également démontré que ces agrégats se formaient plus efficacement lors de l'addition des co-récepteurs GFR α 3 suggérant une activité optimale à travers une signalisation trans (Patel et al., 2012).

b. Maturation extra-utérine

Le microbiote intestinal influence la maturation des cellules neurales entériques mais également celle des cellules immunitaires entériques (Pronovost and Hsiao, 2019). En effet, les souris axéniques, ou traitées par antibiotique, présentent des altérations de l'immunité digestive. Par exemple, il a été rapporté une diminution des neutrophiles associée à un défaut de réponse face à des agressions bactériennes pathogènes (Deshmukh et al., 2014) ainsi qu'une réduction du nombre des cellules T régulatrices coliques CD4+CD25+FOXP3+ (Russell et al., 2012). A ce propos, il est à noter que les souches bactériennes Clostridium et Bacteroides fragilis stimulent les fonctions immunosuppressives et le nombre de LT régulateurs FoxP3+ (Round and Mazmanian, 2010; Atarashi et al., 2011, 2013). De plus, après avoir mis en évidence une augmentation du nombre de cellules i-NKT, une hausse de la concentration sanguine et colique en chémokine CXCL16 ainsi qu'une sensibilité accrue à la colite chez les souris axéniques, Olszak et al. ont montré que ces effets sont abrogés par le transfert de microbiote conventionnel chez les souriceaux (Olszak et al., 2012). Enfin, Gomez de Agüero et al. ont mis en évidence que le transfert de microbiote dans des souris axéniques gestantes modifiait les populations colique de cellules immunitaires innées de type 3 et de macrophages F4/80+CD11c+ des nouveaux-nés. L'effet pourrait être médié par les anticorps maternels produits en réponse aux antigènes du microbiote intestinal et transmis lors de l'allaitement (Gomez de Agüero et al., 2016).

2. Les organes lymphoïdes

Les cellules immunes sont produites, stockées et activées dans des formations tissulaires spécialisées appelées organes lymphoïdes caractérisés par le regroupement de cellules hématopoïétiques spécifiques et de composants stromals (Boehm et al., 2012). La néogénèse des cellules immunitaires s'effectue dans les organes lymphoïdes primaires alors que les organes lymphoïdes secondaires assurent le stockage et l'activation des lymphocytes. En cas d'inflammation chronique, des organes lymphoïdes tertiaires peuvent se former n'importe où dans l'organisme de façon éphémère (Drayton et al., 2006).

a. Les organes lymphoïdes primaires

Chez les mammifères adultes, la moelle osseuse est l'organe lymphoïde primaire où se développe la majorité des cellules immunitaires incluant les lymphocytes B et le thymus est l'organe lymphoïde primaire où se développent les lymphocytes T (LT). C'est dans ces organes lymphoïdes primaires que les précurseurs lymphocytaires subissent des processus de réarrangement génétique complexe, ou recombinaison somatique, afin de générer le récepteur spécifique d'un unique antigène, appelé BCR pour les lymphocytes B, et le TCR pour les lymphocytes T. Dans le thymus, les LT traversent également une étape de sélection positive au cours duquel les LT qui expriment les co-récepteurs CD4 et CD8, n'exprimeront plus que le CD4 ou le CD8 en fonction de leur interaction avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I ou de type II. Ces LT subissent ensuite une sélection négative durant laquelle les LT auto-réactifs aux antigènes du soi sont éliminés par apoptose (Kumar et al., 2018; Luckheeram et al., 2012).

b. Les organes lymphoïdes secondaires

Nombreux et disséminés dans l'ensemble de l'organisme, les organes lymphoïdes secondaires ont un rôle essentiel dans la réponse adaptative en assurant la survie, la prolifération, l'activation, et la maturation des lymphocytes. Les organes lymphoïdes secondaires sont la rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses qui incluent le tissu lymphoïde associé à l'intestin. Ils ont une architecture générale similaire avec une partie externe encapsulée et des zones internes divisées en zone B, zone T et parfois en zone mixte. Ils ont également chacun leurs spécificités, notamment dans l'origine des antigènes qui y sont drainés et présentés aux lymphocytes.

La rate est le plus ancien organe lymphoïde secondaire. C'est un filtre sanguin qui permet l'élimination des globules rouges endommagés. Elle est également dédiée à la surveillance de l'ensemble des antigènes du réseau vasculaire. Localisée dans la partie haute des viscères digestifs, elle ne fait pas à proprement parler partie du tissu lymphoïde associé à l'intestin. Toutefois les lymphocytes qui y circulent peuvent rejoindre le tractus gastro-intestinal. Des macrophages et des cellules dendritiques y sont également présents en nombre (Brendolan et al., 2007; Boehm et al., 2012).

Les ganglions lymphatiques disséminés en chaînes ou en relais ganglionnaires dans l'ensemble de l'organisme, drainent les antigènes circulants dans le réseau lymphatique. En particulier, les ganglions mésentériques sont des relais ganglionnaires lymphatiques localisés dans le mésentère intestinal. Ils sont dédiés à la surveillance locale des antigènes luminaux intestinaux.

Le tissu lymphoïde associé à l'intestin est considéré comme le principal organe lymphoïde secondaire de par son étendue. Toutes les cellules immunitaires y sont représentées au sein de multiples structures immunitaires caractéristiques disséminées dans la lamina propria (*Figure 7*). Dans l'intestin grêle des mammifères, on observe en particulier les plaques de Peyer qui correspondent à des amas de lymphocytes organisés en follicules de lymphocytes B et de lymphocytes T entremêlés de cellules dendritiques. Dans l'intestin grêle et le colon sont présents des follicules isolés définis comme des amas lymphocytaires de taille modeste, et des cryptopatches où se regroupent les cellules dendritiques et les cellules lymphoïdes innées (ILC). On y distingue également les lymphocytes résidant dans la lamina propria (LPL), des macrophages, des éosinophiles, et des cellules dendritiques. De plus, dans la barrière épithéliale intestinale sont localisés des lymphocytes T intra-épithéliaux ainsi que des cellules Microfold situées au-dessus des PP, qui favorisent le transfert d'antigènes luminaux (Ishikawa et al., 2007; Olivares-Villagómez and Van Kaer, 2017).

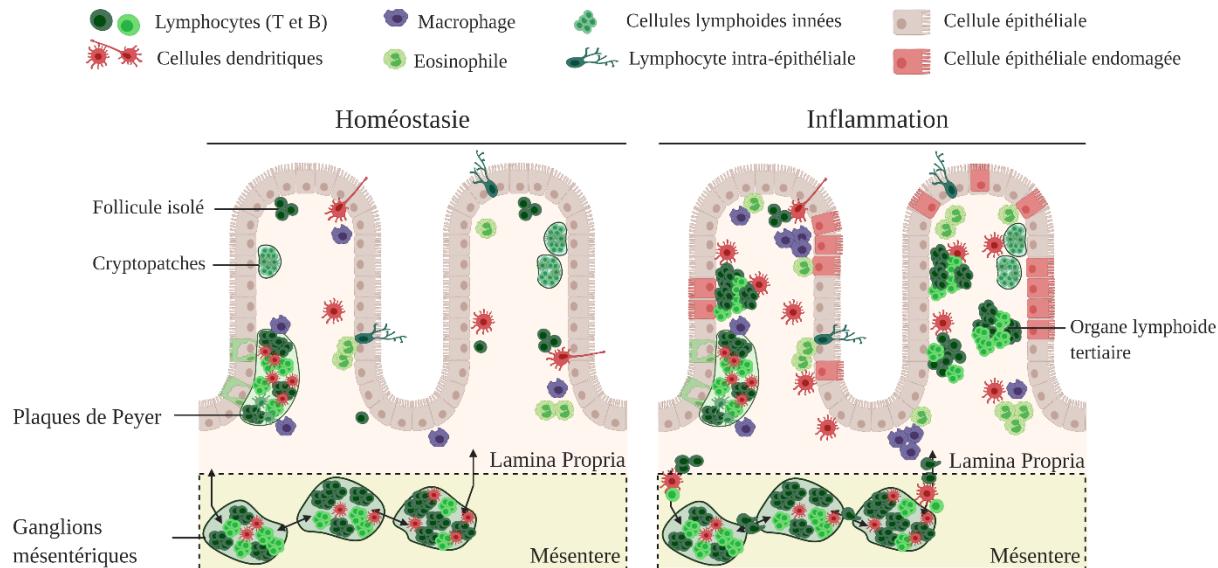


Figure 7 : Représentation des structures lymphoïdes dédiées à la surveillance immunitaire du tractus gastro-intestinal en condition d'homéostasie et lors d'une réponse inflammatoire. Dans la lamina propria sont représentés les cryptopatches, les follicules isolés, les PP ainsi que les différentes cellules isolées comme les macrophages, les cellules dendritiques ou les LPL. La chaîne ganglionnaire lymphatique mésentérique est située dans le mésentère externe et assure un recrutement rapide de lymphocyte dans la lamina propria en cas d'inflammation. Crée sur biorender.com à partir de Pearson et al., 2012).

3. Les cellules immunitaires

Les cellules immunitaires sont particulièrement nombreuses et diversifiées. Elles sont classées selon leur mode d'action en cellules de l'immunité innée, pour la plupart issue de la lignée myéloïde, ou en cellules de l'immunité adaptative exclusivement dérivé de la lignée lymphoïde.

a. Les cellules de l'immunité innée

L'immunité innée assure la première défense de l'organisme grâce à diverses cellules immunitaires aux activités principalement phagocytaires ou cytotoxiques. Elles assurent une immuno-surveillance constante des tissus afin d'initier rapidement une réponse inflammatoire et coordonner le recrutement des cellules de l'immunité adaptative. Les cellules de l'immunité innée sont activées grâce aux récepteurs PRR capables de reconnaître des antigènes non spécifiques d'origine exogène qualifiés de PAMP et/ou endogène qualifiés de DAMP. On distingue plusieurs types de cellules de l'immunité innée.

Principalement présentes dans la circulation sanguine, les neutrophiles et les éosinophiles ont des activités cytotoxiques vis-à-vis des agents infectieux. Premières cellules à être recrutées sur le site inflammatoire, les neutrophiles sont impliqués dans le contrôle des infections bactériennes en secrétant des granules cytotoxiques, et des cytokines/chémokines qui assurent le recrutement lymphocytaire (Ley et al., 2018). Les éosinophiles secrètent également des granules avec des médiateurs cytotoxiques, comme l'éosinophile peroxydase, ainsi que des cytokines impliquées dans les fonctions lymphocytaires (Parkin and Cohen, 2001; Rothenberg et al., 2001).

Représentant 2 à 3% des cellules de la lamina propria, les mastocytes intestinaux participent à la contraction musculaire et au contrôle des fonctions immunitaires innées et adaptatives (Parkin and Cohen, 2001; Bischoff, 2016). Ils sont particulièrement impliqués dans les réponses allergiques.

Dérivées de cellules myéloïdes ou lymphoïdes, les cellules dendritiques ont un rôle indispensable dans la coordination des réponses immunitaires innées et adaptatives. Ce sont les principales cellules professionnelles présentatrices d'antigène. Grâce à leur activité de phagocytose, elles dégradent puis présentent un vaste panel antigénique aux LT. Selon leur localisation et l'environnement, leur phénotype est variable. Généralement immature en conditions physiologiques, elles acquièrent un phénotype mature en réaction aux signaux de danger. Elles expriment alors des cytokines pro-inflammatoires, surexpriment des molécules de

co-stimulation et migrant vers l'organe lymphoïde secondaire le plus proche (Rossi and Young, 2005; Caér and Wick, 2020).

Dérivés des monocytes circulants, les macrophages sont particulièrement importants dans les réponses immunitaires digestives. Ils acquièrent sur site de façon réversible, un phénotype pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire en fonction du microenvironnement local (Muller et al., 2020). Une population de macrophages intestinaux « auto-entretenus », non-dérivés des monocytes circulant, a été décrit comme protecteur des neurones entériques (De Schepper et al., 2018). Les macrophages assurent différentes fonctions, principalement la phagocytose qui assure un microenvironnement sain aux cellules avoisinantes. Dans un contexte pro-inflammatoire, ils secrètent de multiples cytokines et sont capables de présenter des antigènes aux LT (Bain and Mowat, 2014; De Schepper et al., 2018).

Les cellules lymphocytaires innées (ILC) sont également importantes dans l'immunité digestive. Après la découverte des cellules Natural Killer (NK) en 1975, trois sous-populations ont été identifiées entre 2008 et 2011 et rapidement qualifiées d'ILC non cytotoxiques (*Figure 8*) (Artis and Spits, 2015; Bernink et al., 2015; Bogunovic, 2016; van der Gracht et al., 2016). Les NK, ILC1, ILC2 et ILC3 partagent certaines caractéristiques des lymphocytes mais ils sont dépourvus des récepteurs spécifiques d'un unique antigène. Les ILC2 sont principalement impliquées dans les allergies respiratoires et dans la surveillance des infections aux vers. Quant aux ILC3, principalement présentes dans les cryptopatches intestinaux, elles sont impliquées dans la surveillance bactérienne et le maintien de l'intégrité de la BEI (Diefenbach et al., 2014).

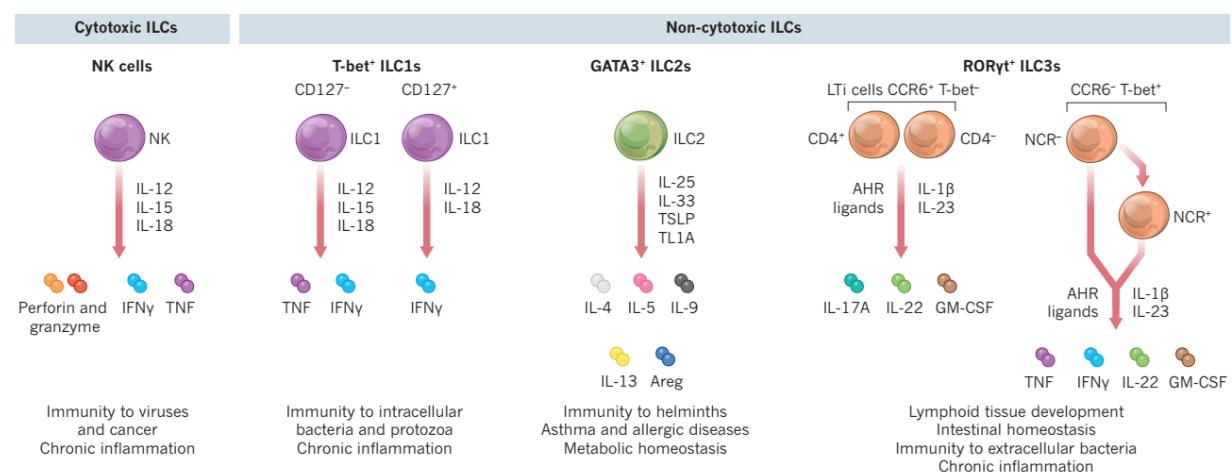


Figure 8 : Différenciation et fonctions des cellules lymphocytaires innées (ILC). Chaque type d'ILC est activé par un cocktail particulier de cytokines (flèche rose) pour générer une cellule présentant un profil de sécrétion moléculaire et des fonctions bien spécifiques (Artis and Spits, 2015).

b. Les cellules de l'immunité adaptative

L'immunité adaptative est assurée par les lymphocytes B (LB) et T (LT) après la reconnaissance spécifique d'un antigène par leur récepteur unique (Kumar et al., 2018). Les LB activés, plasmocytes, sont responsables de la réponse à médiation humorale tandis que les LT CD4+ auxiliaires et CD8+ cytotoxiques médient la réponse à médiation cellulaire.

La réponse à médiation humorale se caractérise par les fonctions des plasmocytes dont la principale est la production d'anticorps capables de neutraliser les toxines, d'assurer l'opsonisation et/ou l'activation des protéines de compléments. Ils existent divers isotypes d'anticorps (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD) aux structures et modes d'action différents (Cyster and Allen, 2019).

La réponse à médiation cellulaire est assurée par les LT effecteurs activés lors de la présentation antigénique. A la sortie du thymus, les LT sont naïfs, autrement dit fonctionnels mais inactifs. Ils ne秘ètent pas de cytokines spécifiques et ne peuvent accéder uniquement qu'aux réseaux vasculaires et lymphatiques qui les transportent jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires. Lors de la présentation antigénique les LT évoluent vers un phénotype effecteur selon l'association du co-récepteur et du CMH. Une présentation antigénique par les molécules du CMH-I, exprimé de façon ubiquitaire, engage les LTCD8+ vers un profil cytotoxique. Ces LTCD8+ cytotoxique agissent par lyse cellulaire grâce à l'exocytose de granules cytotoxiques composés de perforine, de granzyme B et/ou par induction d'apoptose à travers des mécanismes de contact cellulaire dépendant des voies FAS/FASL. Ils sont majoritairement impliqués dans la surveillance tumorale et des infections virales (Russell and Ley, 2002; Zhang and Bevan, 2011). Une présentation antigénique par les molécules du CMH-II, inductibles ou constitutivement exprimées par les cellules professionnelles présentatrice d'antigène, entraîne l'activation des LT CD4+ et initie leur polarisation en profil auxiliaire. La polarisation vers un phénotype particulier se fait selon les signaux environnementaux, notamment cytokiniques. Différents phénotypes ont été répertoriés selon les cytokines et les facteurs de transcription exprimés par les LT auxiliaires. Les principales sous-populations sont les Th1, Th2, Th9, Th22, et les Th17. Les LT auxiliaires exercent différentes fonctions, notamment dans l'activation et la commutation isotopique des LB ou l'élimination des bactéries, des virus, des champignons et des vers (de Souza and Fiocchi, 2016). Les LT régulateurs (Treg) sont des populations à part particulièrement importante pour limiter l'auto-immunité et assurer le retour à l'état basal après un épisode inflammatoire (Harrison and Powrie, 2013).

On distingue les nTreg produits au cours du processus de sélection négative thymique, et les iTreg générés lors de l'orientation périphérique des LTCD4+ (Murphy and Stockinger, 2010; Luckheeram et al., 2012). Ils sont responsables de la tolérance aux antigènes du soi, au microbiote commensal et aux nutriments.

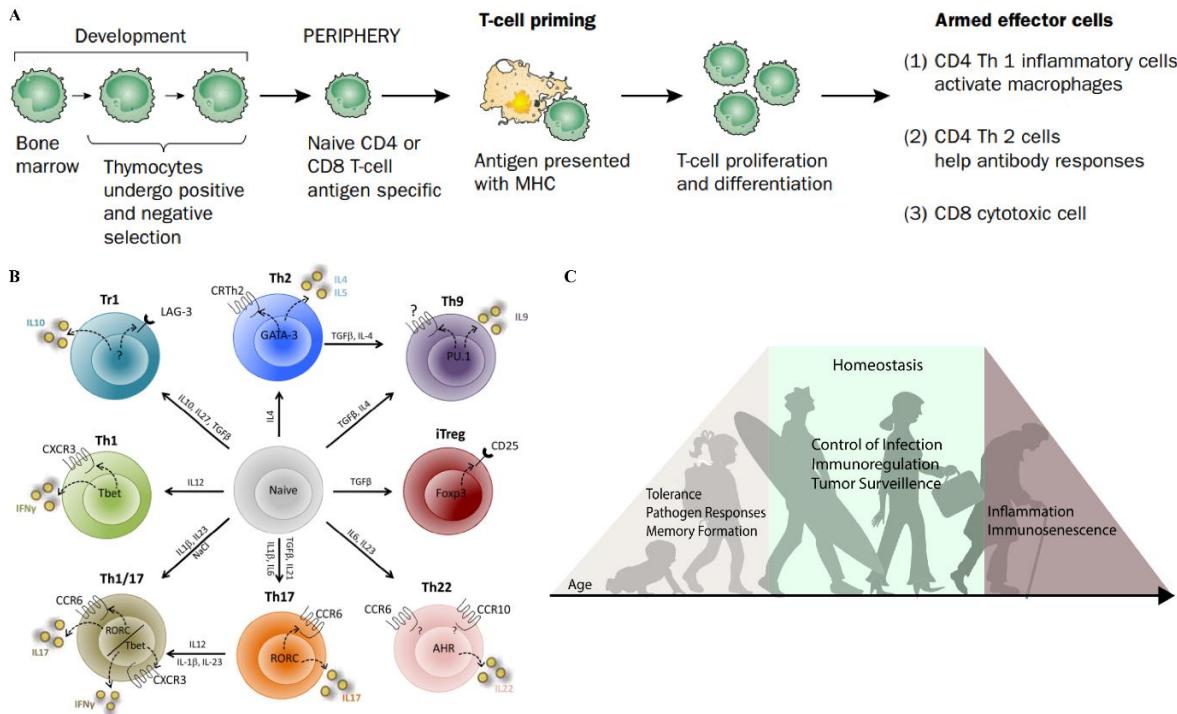


Figure 9 : (A) Génération, différenciation et activation des LT. Les thymocytes générés à partir des CSH subissent des sélections positives et négatives dans le thymus avant de migrer en périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires où s'effectue la présentation antigénique. Une fois activés, les LT effecteurs prolifèrent et se différencient en fonction des co-récepteurs exprimés et des signaux environnementaux. (B) Exemple des profils présentés par les LTCD4+ auxiliaires. Les cytokines inductrices du profil sont indiquées le long des flèches. Le facteur de transcription principal est inscrit au centre de la cellule. Les principales cytokines secrétées sont indiquées en périphérie des cellules. (C) Evolution des fonctions principales des LT au cours de la vie de l'homme (Geginat et al., 2013; Kumar et al., 2018).

4. La réponse inflammatoire

La réaction inflammatoire est un processus essentiel à la défense de l'organisme. Elle se déclenche dès l'apparition de signaux de dangers exogènes et/ou endogènes. Ses manifestations sont à la fois locales et systémiques. Les différentes étapes du processus inflammatoire sont étroitement régulées de l'initiation jusqu'à sa résolution, mais dans plusieurs cas pathologiques, l'inflammation devient chronique altérant parfois de façon irréversible les tissus (Medzhitov, 2010).

a. Généralités

La réponse inflammatoire se déclenche en réaction à un danger à travers des signaux inducteurs. Ces signaux peuvent être d'origine exogène, les PAMPs, généralement conservés entre les microorganismes, ou d'origine endogène, les DAMPs, relargués dans le micro-environnement par les cellules hôtes endommagées ou mortes. Ces signaux inducteurs sont détectés par des cellules senseurs grâce aux récepteurs PRR, classés selon leur mode de réponse en PRR d'endocytose, PRR de signalisation (incluant les TLR, les NLR, et les RLR) et PRR secrétés (associés à la réponse du complément). Par exemple, l'activation des PRR de signalisation induit la formation de l'inflammasome et/ou des voies de signalisation pro-inflammatoire comme la voie NF-κ-B, stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1- β , le TNF α ou l'IL-6 qui agissent localement sur les cellules du micro-environnement, mais également à distance sur des organes cibles comme le foie ou les organes lymphoïdes secondaires. Ces médiateurs stimulent le recrutement des cellules et des composés nécessaires à l'élimination des sources du danger. Une fois le danger éliminé, la réaction inflammatoire s'arrête et la réparation tissulaire se met en place (Takeuchi and Akira, 2010).

La réponse inflammatoire aigüe, en réponse à un pathogène ou à une lésion, est indispensable à la défense et la survie de l'organisme. En revanche, la réponse inflammatoire chronique peut devenir néfaste en maintenant un taux élevé des molécules pro-inflammatoires. C'est le cas de nombreuses pathologies comme le cancer, les maladies neurodégénératives ou les maladies inflammatoires de l'intestin. L'inflammation s'inscrit alors comme un cercle vicieux en contribuant activement aux dommages cellulaires (Medzhitov, 2010).

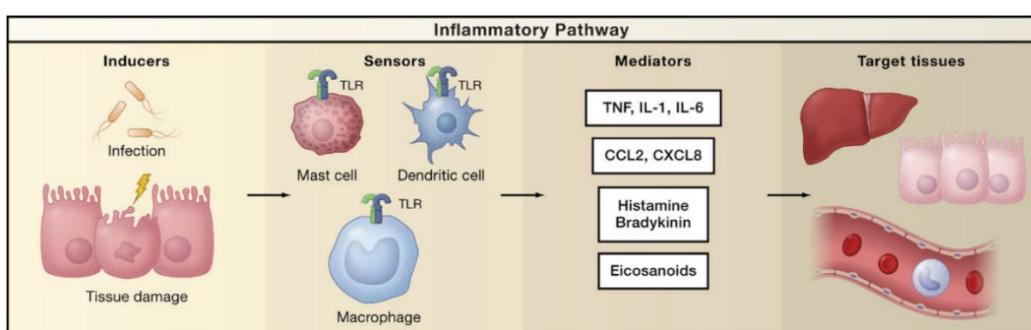


Figure 10 : Exemple des étapes de la réponse inflammatoire. En présence des signaux inducteurs (invasion bactérienne, lésion, etc), les cellules senseurs (cellules dendritiques, macrophages, mastocytes, etc) sont activées. Elles vont secréter des médiateurs de l'inflammation qui vont agir sur les tissus cibles (organes lymphoïdes secondaires, vaisseaux sanguins, etc) pour recruter tous les effecteurs nécessaires à la suppression du danger (Medzhitov, 2010).

b. Médiateurs moléculaires

Les médiateurs de la réponse inflammatoire favorisent le recrutement et l'activité de cellules effectrices, notamment les cellules immunitaires adaptatives, sur le site inflammatoire. Les médiateurs peuvent être d'origine plasmatique comme les molécules du complément, des protéines de coagulation, mais également des protéines kinines aux propriétés vaso-actives et parfois algésiques telle que la bradykinine. Les médiateurs peuvent également être secrétés par les cellules senseurs comme les prostaglandines, les leucotriènes ou les cytokines.

Les cytokines sont des protéines majoritairement solubles aux actions pléiotropiques parfois redondantes. Elles ont essentiellement une action paracrine (sur les cellules avoisinantes) ou autocrine (sur elle-même) et plus rarement endocrine (à distance grâce au réseau sanguin). On distingue les interleukines produites par les lymphocytes, les chémokines aux fonctions chemo-attractives, et les molécules particulières comme les interférons (IFN) ou les facteurs de nécrose tumorale (TNF). Les effets sont variables en fonction de leurs combinaisons, des doses, et des cellules cibles. Elles peuvent par exemple, participer à la régulation de l'activation, de la division, de l'apoptose ou des mouvements cellulaires (Parkin and Cohen, 2001). Au début d'une réponse inflammatoire, diverses cytokines pro-inflammatoires peuvent être produites selon la pathologie, mais il existe des signatures communes comme l'IL-6, le TNF α et l'IFN γ (Atreya et al., 2000; Yamamoto et al., 2000; Gabay, 2006). Parmi les cytokines produites au cours de la réponse inflammatoire, les chémokines sont indispensables au recrutement des cellules immunitaires. Selon la position de l'acide aminé cystéine par rapport aux autres acides aminés, on distingue les CXC ou α -chémokines et les CC ou β -chémokines (Parkin and Cohen, 2001; Charo and Ransohoff, 2006). Enfin, lors de la résolution de l'inflammation, ce sont des cytokines anti-inflammatoires qui sont produites comme l'IL-10 ou le TGF β , ainsi que des résolvines, dérivés des oméga-3.

c. Migration des lymphocytes

Les lymphocytes sont des cellules particulièrement mobiles grâce aux réseaux vasculaires et lymphatiques. Leur recrutement sur le site inflammatoire nécessite leur sortie des réseaux au cours d'un processus d'extravasion durant lequel les lymphocytes traversent la paroi vasculaire constituée de cellules endothéliales et de péricytes. Ce processus fait intervenir de façon coordonnée des chémokines et des molécules d'adhésion inter-cellulaires (*Figure 11*).

Après sa capture, le lymphocyte roule le long des cellules endothéliales en interagissant avec les sélectines endothéliales assurant une première adhésion relativement faible. Il s'ensuit un arrêt grâce à une adhésion forte permise par l'interaction entre l'intégrine LFA-1, exprimée au niveau de la membrane des lymphocytes, et ICAM-1 produit par les cellules endothéliales. L'intégrine LFA-1 est un hétérodimère transmembranaire composé des chaines α L (CD11a) et β 2 (CD18), dont la conformation change sous l'influence cytokinique, favorisant son affinité de liaison à ICAM-1 (Smith et al., 2007; Park et al., 2010). Cette étape précède le processus de diapédèse finale (von Andrian and Mempel, 2003).

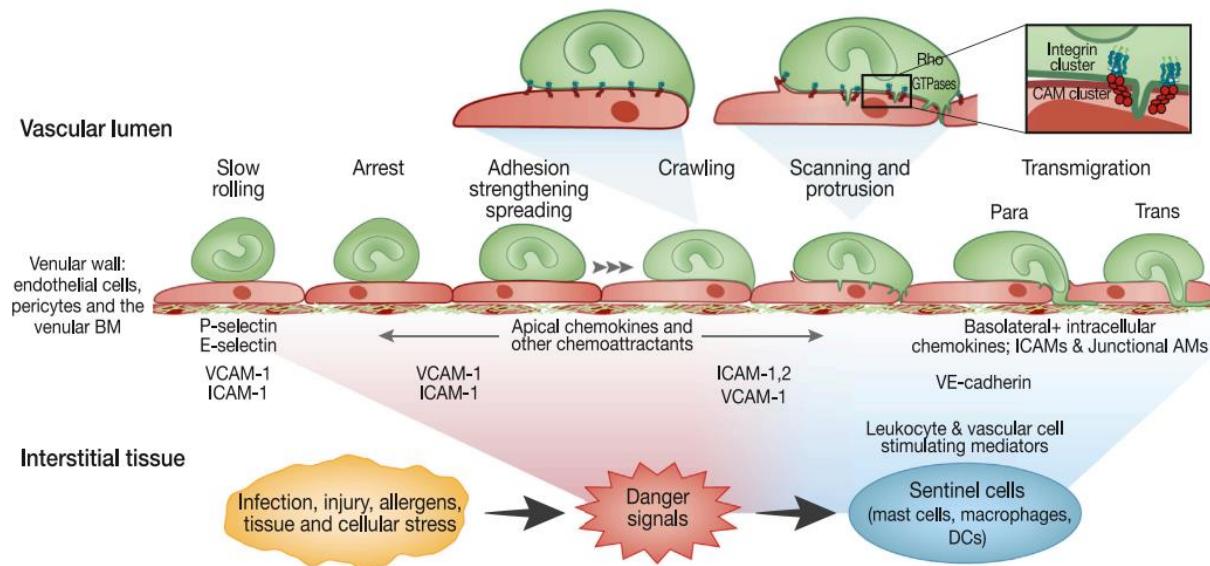


Figure 11 : Diapedese des leucocytes en réaction à la réponse inflammatoire (Nourshargh and Alon, 2014).

D'autre part, certaines molécules d'adhésion sont associées à l'organotropisme des LT. L'expression de ces molécules est induite lors de l'activation antigénique par les cellules dendritiques et les cytokines environnantes. Le couple de molécules d'adhésion le plus largement décrit dans la migration des LT au sein de la paroi intestinale est l'intégrine α 4- β 7 et son récepteur MaDCAM-1. L'intégrine α E- β 7 et son récepteur E-cadhéline, ainsi que la chémokine CCL25 produite par les cellules épithéliales et son récepteur CCR9 interviennent également (Agace, 2008). A priori, seules les cellules dendritiques CD103+ des ganglions mésentériques et des PP seraient capable d'induire l'expression de l'intégrine α 4 β 7 et du récepteur CCR9 par les LT au cours de la présentation antigénique. Les cellules dendritiques locales sont donc essentielles au recrutement spécifique des LT vers l'intestin (Stagg et al., 2002; Mora et al., 2003; Knight, 2016).

III. Interactions neuro-immunes dans la paroi intestinale

La paroi intestinale est un lieu de rencontre neuro-immune privilégié (*Figure 12*). Ces dernières années, plusieurs études y ont mis en lumière des interactions neuro-immunes primordiales pour l’homéostasie digestive (Godinho-Silva et al., 2019).

1. Proximité anatomique

a. Proximité et interactions neuro-immunes dans la paroi intestinale

La paroi intestinale est organisée en strates avec la barrière épithéliale intestinale comme frontière physique entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. Sous la monocouche épithéliale de la BEI se trouve la lamina propria où se côtoient de nombreuses cellules notamment des cellules immunitaires. La BEI et la lamina propria représente la couche muqueuse, sous laquelle se situe la couche sous-muqueuse qui contient le plexus nerveux sous-muqueux. Puis l’on observe la couche musculeuse qui regroupe les faisceaux musculaires circulaires et longitudinax entre lesquels se déploie le plexus myentérique.

En condition physiologique, la lamina propria est la strate où les CGE de la muqueuse ainsi que les prolongements gliaux et neuronaux sont le plus à proximité des cellules immunitaires résidentes. Chez les personnes souffrant des pathologies intestinales inflammatoires chroniques, ou du syndrome de l’intestin irritable, la densité des cellules immunitaires augmente dans la paroi intestinale et par conséquent, la proximité avec les structures nerveuses augmente également. Des contacts cellulaires entre la membrane des axones entériques et de mastocytes (Dvorak and Silen, 1985; Barbara et al., 2004) ou de lymphocytes (Dvorak and Silen, 1985; Geboes and Collins, 1998) ont d’ailleurs été rapportés grâce à des observations par microscope électronique. De façon intéressante, il a été montré que le nombre de mastocytes à proximité (moins de 5 μ m) d’un nerf entérique était corrélé à la fréquence et l’intensité des douleurs ressenties par les patients atteints par le syndrome de l’intestin irritable (Barbara et al., 2004). De plus, soumis à un environnement pro-inflammatoire, les cellules du SNE expriment des molécules membranaires indispensables à l’activation lymphocytaire comme des molécules du CMH-II (Geboes et al., 1992; Turco et al., 2014), des molécules de co-stimulation (Geboes et al., 1992; da Silveira et al., 2011) ou encore la molécule d’adhésion ICAM-1 (Smyth et al., 2013).

Cependant, à ce jour, le rôle de ces adhésions neuro-immunes a été très peu étudié, excepté une étude de notre groupe qui rapporte un contrôle partiel de la prolifération de LT humains par des mécanismes de contact avec les CGE (Kermarrec et al., 2016).

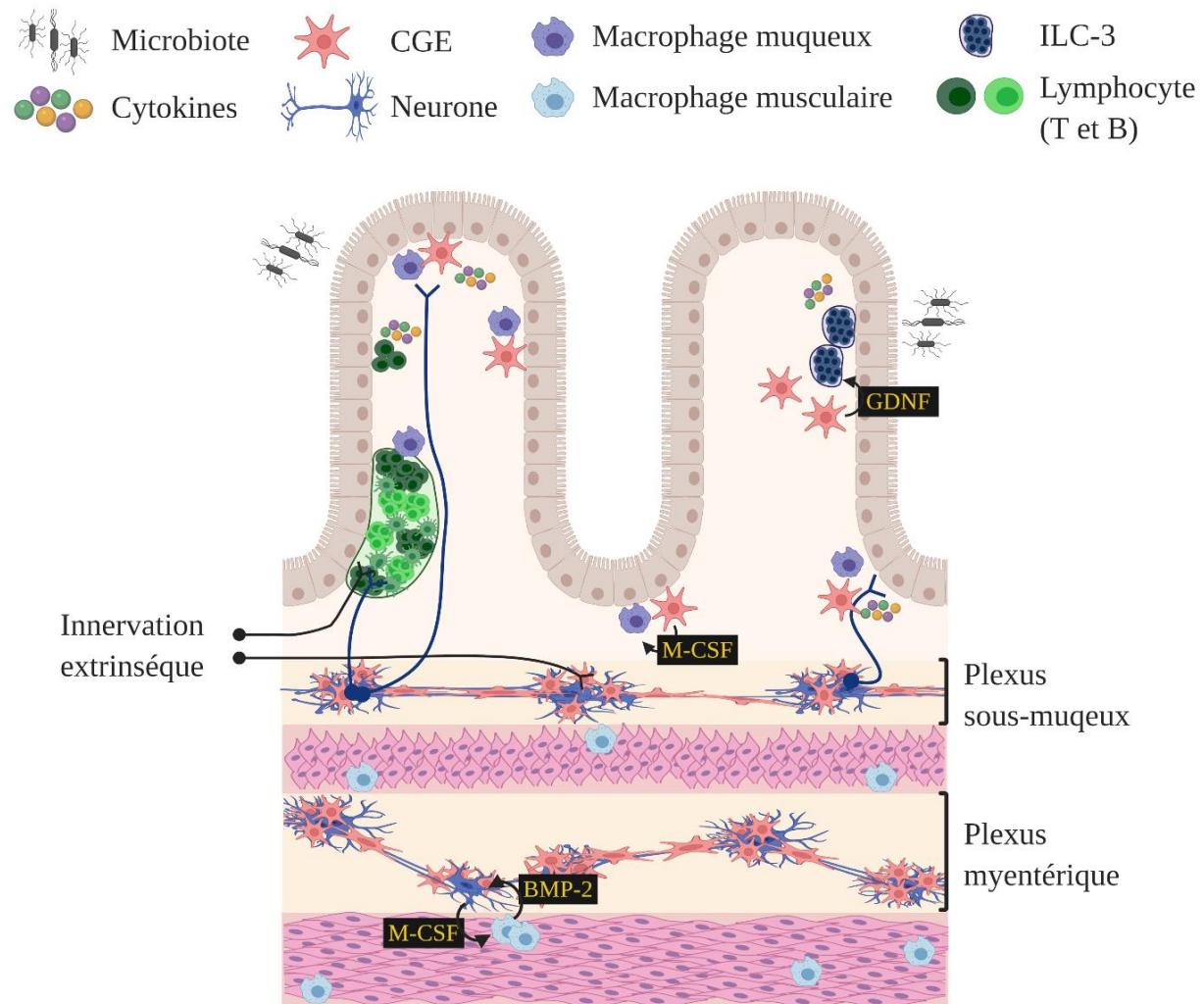


Figure 12 : Organisation cellulaire au sein de la paroi intestinale mettant en avant les interactions neuro-immunes entériques. Au sein de la lamina propria, se côtoient diverses cellules immunitaires, comme des macrophages, des lymphocytes et des ILC3, avec des cellules neurales. La proximité neuro-immune est également présente au niveau de la musculeuse. Crée sur biorender.com à partir de Margolis (Margolis et al., 2016).

b. Innervation des organes lymphoïdes

Les organes lymphoïdes sont richement vascularisés par les réseaux sanguins et lymphatiques mais ils sont également innervés. Les analyses immunohistochimiques réalisées par Felten et al. sur des tissus murins et humains ont montré une innervation sympathique noradrénergique et peptidergique, souvent à proximité des réseaux vasculaires, dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires (Felten et al., 1985). Par ailleurs, une innervation des PP par des fibres en provenance du plexus sous-muqueux a été mise en évidence dans la paroi d'iléon de mouton (Chiocchetti et al., 2008) ainsi que la présence de fibres nerveuses peptidergiques diverses (SP+, VIP+ et CGRP+) localisées à la base et entre les follicules des PP porcins et humains (Vulchanova et al., 2007). Enfin, dans les PP et la rate de souris, une étroite proximité entre des fibres neuronales PGP9.5+ et des LB, des LT et des cellules dendritiques a été rapporté. Ces observations suggèrent un rôle de l'innervation dans le contrôle des fonctions immunes. Il est à noter que certains chercheurs ont recherché dans quelle mesure cette innervation serait une voie de neuro-invasion des protéines à prions (Ma et al., 2007; Chiocchetti et al., 2008).

2. Partage de certains modes de fonctionnement

Dans une courte revue, Kioussis et Pachnis interrogent sur les similarités quant au mode de fonctionnements partagés des cellules neurales et des cellules immunitaires. Ils évoquent d'ailleurs la possibilité d'un ancêtre cellulaire commun au cours du processus évolutif (Kioussis and Pachnis, 2009).

a. Synapse nerveuse et synapse immunologique

Le système nerveux et le système immunitaire partagent la possibilité de communiquer grâce à des zones de contact privilégiées, appelées synapse, permettant d'assurer une transmission orientée d'informations entre deux entités cellulaires distinctes (Dustin and Colman, 2002).

La synapse nerveuse est une zone spécialisée dans la transmission d'informations entre un neurone présynaptique et un neurone post-synaptique. Il existe deux principaux types de synapse nerveuse (*Figure 13*). Pour transmettre l'information, la synapse chimique utilise des neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique suite à l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de la terminaison présynaptique. Quant à la synapse électrique, elle transmet l'influx nerveux à travers des canaux de type gap jonctions (Pereda, 2014). Dans les deux cas, les synapses nerveuses sont des zones membranaires d'organisation remarquable dotées de vésicules intracellulaires et/ou de récepteurs membranaires.

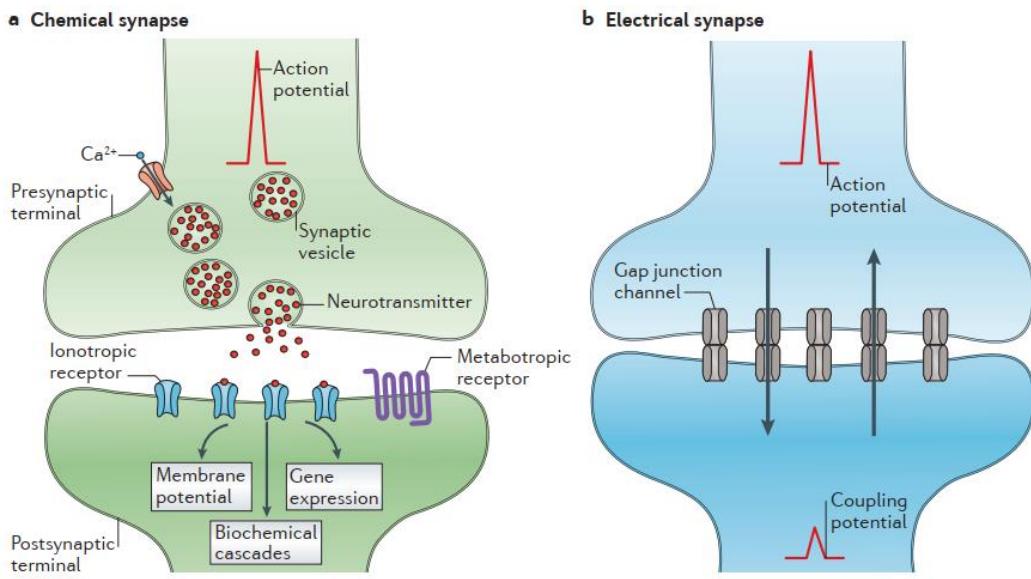


Figure 13 : Organisation des deux principaux types de synapse nerveuse (Pereda, 2014).

La synapse immunologique a été caractérisée au début des années 1980 (Norcross, 1984; Monks et al., 1998; Dustin and Baldari, 2017). Cette unité de communication se crée entre un lymphocyte T et une cellule dendritique assurant l'activation des lymphocytes T naïfs (Grakoui et al., 1999). Comme la synapse nerveuse, la synapse immunologique est une structure fonctionnelle dynamique et orientée dont la stabilité dépend de molécules d'adhésion et qui fait intervenir des réarrangements du cytosquelette et des récepteurs membranaires. De forme circulaire, elle est organisée en trois régions concentriques qualifiées de « Supra Molecular Activation Cluster » (SMAC) où se réorganisent et se regroupent des molécules membranaires (*Figure 14*). La partie centrale, le c-SMAC, correspond à la zone d'interaction entre le TCR exprimé par les LT et le complexe CMH-antigène exprimé à la surface de la membrane des cellules dendritiques. Dans la partie externe du c-SMAC, les co-récepteurs CD4 et CD8, les molécules de co-stimulation (CD28 pour les LT et CD80-86 pour les cellules dendritiques) et les molécules d'adhésion (CD2-LFA-3) ont un rôle critique. Dans le p-SMAC, le couple de molécules d'adhésion LFA-1-ICAM-1 est indispensable à la stabilité de la synapse immunologique mature. Enfin, dans la partie la plus externe, le d-SMAC, réside des molécules comme le CD45, une tyrosine phosphatase qui régule l'activation de différentes kinases transductrices du signal d'activation du TCR (Dustin, 2005).

La formation de la synapse immunologique est un processus dynamique qui peut être décomposé en trois phases. La phase d'expansion où les micro-clusters (agrégat des molécules précédemment citées) commencent à se former est suivie d'une phase de contraction pour aboutir à la formation d'une synapse mature (Dustin, 2005; Yokosuka and Saito, 2009). La synapse immunologique se forme en quelques minutes et peut se maintenir durant plusieurs heures notamment grâce aux molécules d'adhésion (Monks et al., 1998; Grakoui et al., 1999; Stoll et al., 2002).

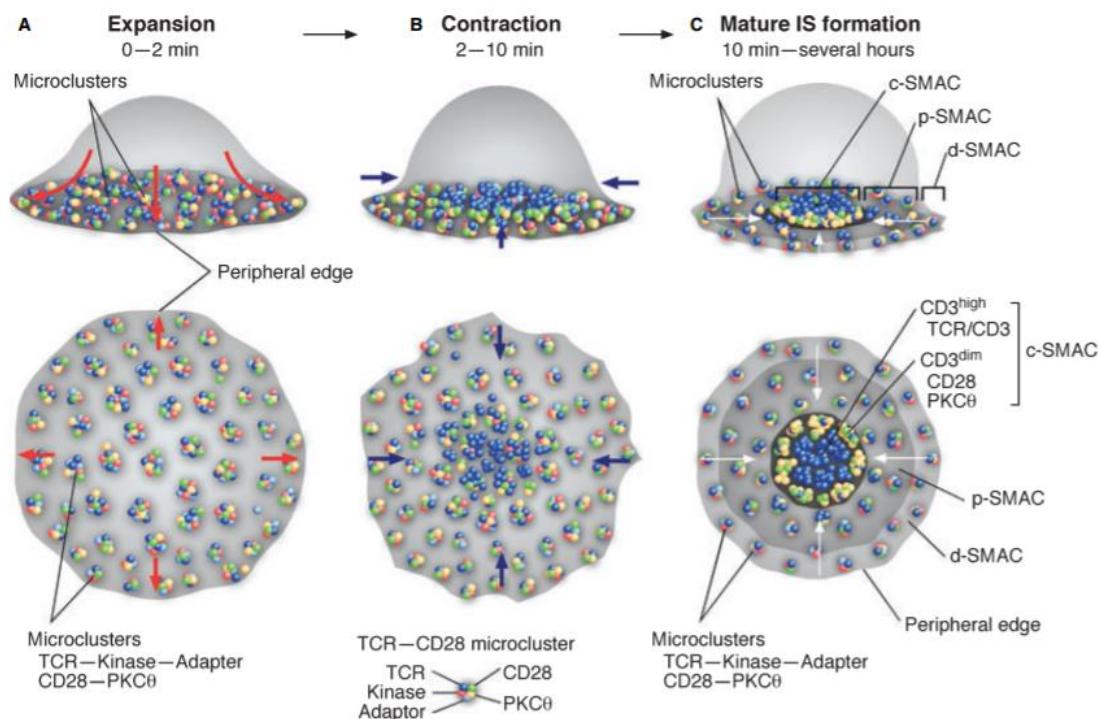


Figure 14 : Représentation de la formation d'une synapse immunologique (Yokosuka and Saito, 2009).

Quelques études mentionnent l'existence de synapses neuro-immunes dans la rate entre des projections du nerf splénique et des LT sécrétateurs d'acétylcholine. Ces synapses auraient un rôle dans le réflexe anti-inflammatoire (Felten et al., 1987; Tournier and Hellmann, 2003; Rosas-Ballina et al., 2011).

b. Mémoire neuronale et mémoire immunitaire

La mémoire est un mécanisme biologique par lequel les informations issues d'expériences ou d'évènements, sont intégrées, stockées et restituées afin d'optimiser les réponses lors d'une seconde stimulation au même stimulus.

La mémoire neuronale est basée sur des modifications structurales et chimiques des réseaux nerveux. Ces changements favorisent les connections synaptiques afin que la seconde réponse à un même stimulus soit plus rapide et plus précise que lors de la stimulation primaire (Tonegawa et al., 2015; Klinzing et al., 2019).

La mémoire immune est spécifique de la réponse adaptative et déterminante lors d'une seconde exposition au même pathogène. Après une première stimulation à un antigène, la majorité des lymphocytes effecteurs meure par apoptose mais certains évoluent en lymphocytes mémoires afin d'assurer une réponse plus rapide et plus efficace (Farber et al., 2016; Pradeu and Du Pasquier, 2018; Natoli and Ostuni, 2019).

3. Participation des cellules nerveuses à la réponse inflammatoire

Les CGE, les neurones entériques et le nerf vague sont des senseurs des signaux de danger. De plus, ils produisent et sont sensibles aux médiateurs de l'inflammation, exerçant une surveillance active de leur micro-environnement.

a. Réponse des cellules nerveuses aux signaux inducteurs exogènes

Les signaux inducteurs de l'inflammation sont détectés par les PRR dont le sous-groupe des TLR. Les neurones entériques et les CGE des plexus sous-muqueux et myentérique expriment différents sous-types de TLR fonctionnels (TRL2,3,4,7) et participent ainsi à la surveillance de la composition microbiotique intestinale et à la détection de pathogènes (Barajon et al., 2009; Anitha et al., 2012; Brun et al., 2013; Turco et al., 2014). Turco et al. ont rapporté la capacité des cellules gliales myentériques humaines en culture à distinguer les composés bactériens pathogènes de souches inoffensives. Par exemple, l'exposition de CGE à la souche pathogène E. Coli (EIEC) induisait l'expression d'un phénotype réactif caractérisé par l'augmentation de la protéine GFAP+, du facteur de transcription c-FOS et des protéines du CMH-II alors que ces paramètres n'étaient pas modifiés au contact de la souche inoffensive probiotique Lactobacillus (F19). De plus, l'étude a rapporté la distinction par les CGE entre des pathogènes vivants et des pathogènes inactivés par la chaleur dans la régulation de l'expression de TLR (Turco et al., 2014).

D'autre part, l'injection systémique de LPS à des souris favorise l'expression de la GFAP par les CGE myentériques dans tous les segments intestinaux sans altération des fonctions neuronales. La réactivité gliale apparaissait rapidement, seulement quatre heures après l'injection, et restait stable jusqu'à 24h avant de revenir à l'état basal sous sept jours. Il reste à déterminer si l'effet observé est lié à une augmentation de l'expression de la GFAP par des CGE qui la pré-exprimaient ou à un nombre plus élevé de cellules productrices (da Cunha Franceschi et al., 2017; Rosenbaum et al., 2016). Par ailleurs, des études *in vitro* ont révélé que les LPS favorisaient la production d'IFN γ par les CGE (Rosenbaum et al., 2016), l'expression d'IL-6 et de TNF α par les neurones entériques (Coquenlorge et al., 2014), ainsi que le relargage de TNF α , d'IL6 et de la chémokine MCP1 dans le surnageant de culture de système nerveux entérique murin (Burgueño et al., 2016).

b. Réponse des cellules nerveuses aux médiateurs cytokiniques

Les CGE sont sensibles aux différents médiateurs de l'inflammation. Par exemple, l'IL-1 β ou le TNF α stimule l'expression d'IL-7 (Kermarrec et al., 2019), d'IFN γ , d'IL-2, d'IL-6 et l'IL-10 (Rosenbaum et al., 2016) et augmente transitoirement l'expression de la GFAP (von Boyen, 2004). D'autre part, Rühl et al. ont rapporté un effet différentiel des cytokines sur la prolifération de cellules gliales immortalisées. L'IL-1 β diminuait la prolifération alors que l'IL-10 induisait une réponse bi-phasique dose dépendante. De plus, certaines réponses gliales nécessiteraient la stimulation simultanée de deux cytokines. Pour exemple, il a été montré *in vitro* l'association indispensable de LPS et d'IFN γ pour stimuler l'expression des protéines des CMH-II, des marqueurs GFAP et S100 β et la prolifération des CGE humaines (Cirillo et al., 2011). Des auteurs se sont intéressés à la caractérisation de ce phénotype glial réactif. Pour ce faire, ils ont analysé le profil transcriptomique de CGE humaines après un traitement par du LPS/IFN γ . Les résultats ont rapporté une augmentation de l'expression de nombreux gènes du processus inflammatoire, des gènes associés au métabolisme des purines ou bien encore des gènes codant pour des canaux ioniques, des facteurs de croissance ou des antioxydants. Ainsi, le phénotype des CGE en réaction à l'inflammation est complexe et susceptible de contribuer activement à la réponse inflammatoire (Liñán-Rico et al., 2016).

Les neurones entériques sont, eux aussi, sensibles aux cytokines, notamment l'IL-1 β qui favorise la production de la substance P tout en diminuant la production d'acétylcholine et de noradrénaline (Collins et al., 1992). Un traitement *in vitro* par l'IL-1 β ou l'IL-6 favorise l'activité des neurones sécrétomoteurs ainsi que celle des fibres sympathiques extrinsèques (Xia et al., 1999).

D'autre part, il a été montré dans un modèle de co-culture sur filtre que sous l'influence de cellules endothéliales activées par un cocktail d'IL-1 β /TNF α , les neurones entériques produisaient de l'IL-8 favorisant l'attraction des cellules mononucléées du sang (Tixier et al., 2006). Il est également important de noter que les ganglions myentériques de patients souffrant de maladie inflammatoire chronique intestinale expriment l'éotaxine qui favorise l'attraction des éosinophiles à proximité des prolongements nerveux (Smyth et al., 2013). De plus, la délétion spécifique du gène de l'IL-18 dans les neurones génère une susceptibilité à l'infection par la souche bactérienne Salmonelle en réduisant la production de peptide anti-microbiens, suggérant que les neurones entériques sont une source indispensable d'IL-18 dans l'intestin (Jarret et al., 2020).

D'autre part, les CGE et les neurones myentériques réagissent également à des médiateurs plasmatiques pro-inflammatoires comme la bradykinine, en augmentant leur concentration intracellulaire en calcium. La stimulation de CGE myentériques par la bradykinine favorise la production de PGE2, un médiateur lipidique pro-inflammatoire (Murakami et al., 2007). Enfin, l'association de bradykinine et d'IL1- β potentialise la production de PGE2 par les CGE, tout comme l'association de LPS et de bradykinine potentialise la réponse calcique des CGE et des neurones myentériques à travers des voies IL-1 β (Murakami et al., 2009).

c. La douleur lors de la réponse inflammatoire

La perception de la douleur, ou nociception, est indispensable pour assurer des réflexes d'évitements et de protection de l'organisme. D'autre part, elle est souvent associée aux réponses pro-inflammatoires et fait partie des symptômes de certains patients souffrant d'inflammation chronique. Les médiateurs de la douleur peuvent être d'origine chimique (cytokine, lipide, molécule irritante, changement osmotique), mécanique (lésion), ou thermique. Ils induisent une signalisation à travers des nocicepteurs membranaires des neurones nociceptifs qui intègrent les informations puis les transmettent jusqu'au système nerveux central.

La communication entre les neurones nociceptifs et les cellules immunitaires est bidirectionnelle et complexe. Au début de la réponse inflammatoire, certains médiateurs comme l'IL1- β ou la bradykinine, induisent la sensibilisation des nocicepteurs, c'est-à-dire abaissent le seuil de réponse des récepteurs tout en augmentant l'amplitude de la réponse (*Figure 15*) (Gold and Gebhart, 2010; Pinho-Ribeiro et al., 2017).

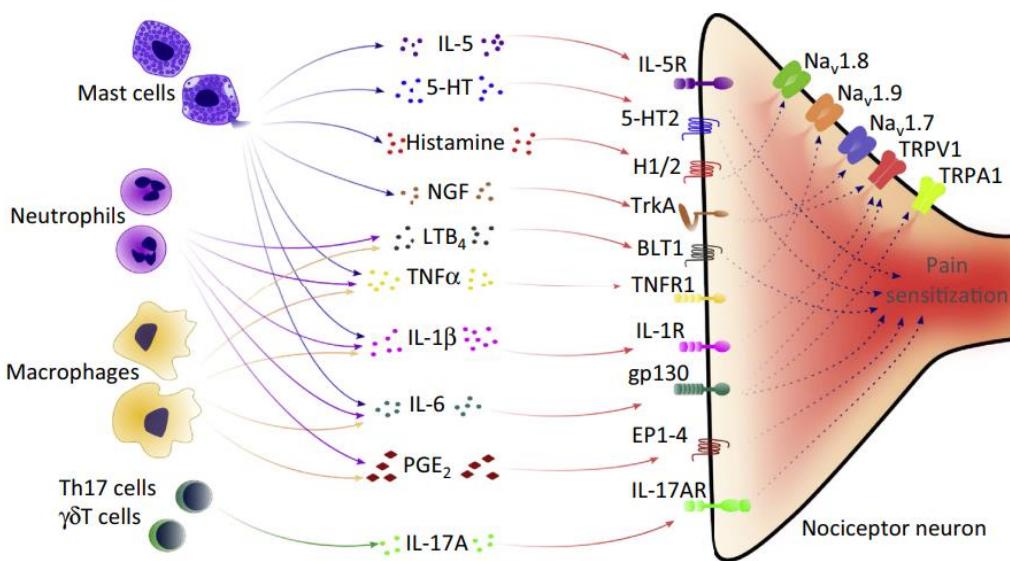


Figure 15 : Les cellules immunitaires秘ètent plusieurs médiateurs pro-inflammatoires capable de moduler l'activité des nocicepteurs dans les neurones et d'induire leur sensibilisation (Pinho-Ribeiro et al., 2017).

En parallèle, les cellules immunitaires, notamment les LT CD4+, sont capables d'induire une action analgésique en libérant des opioïdes endogènes comme l'enkephaline. Dans des modèles expérimentaux de colites induites, la perception de la douleur est inversement proportionnelle au nombre de LT CD4+ auxiliaires Th1 et Th17 présents dans la muqueuse intestinale. Selon cette étude, ces LT effecteurs seraient la principale source d'opioïdes endogènes au cours de l'inflammation intestinale et par conséquent participeraient à la fois à l'inflammation locale et l'activité analgésique (Boué et al., 2014).

Quant aux neurones nociceptifs, ils秘ètent des neuromédiateurs capables de moduler la perméabilité vasculaire, le flux dans les vaisseaux lymphatiques et l'activité des cellules immunitaires, tous essentiels à la réponse inflammatoire (Pinho-Ribeiro et al., 2017).

d. Réflexe cholinergique anti-inflammatoire

La stimulation *in vivo* du nerf vague réduit l'inflammation dans différents modèles de maladie inflammatoire digestive et de septicémie (Borovikova et al., 2000; Ordovas-Montanes et al., 2015). Cet effet immunosuppressif relayé par le nerf vague et la production d'acétylcholine est appelé « réflexe cholinergique anti-inflammatoire ». Il représente un exemple de communication fonctionnelle entre les neurones et les lymphocytes. En effet, l'activité anti-inflammatoire du nerf vague est relayée par le nerf splénique puis par les lymphocytes T CD4+ pour réguler *in fine* la production de TNF_α des macrophages.

Sous stimulation vagal, le nerf splénique produit de la norépinephrine qui stimule la production d'acétylcholine par des LTCD4+ spléniques mémoires. L'acétylcholine produite va agir sur les récepteurs $\alpha 7$ nicotinique des macrophages et diminuer leur production de TNF α . Les LT mémoires, généralement plutôt effecteurs de l'inflammation, font ici partie intégrante d'une activité immunorégulatrice sous contrôle nerveux (Wang et al., 2003; Rosas-Ballina et al., 2008, 2011). L'effet immunosuppressif pourrait également être médié par les récepteurs muscariniques de type 3, car leur déletion chez des souris infectées par la bactérie pathogène *C. rodentium* a favorisé une infiltration colique massive de lymphocytes CD3+ associé à des niveaux anormalement élevés de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α , IL-17A) (McLean et al., 2015).

Les LT CD4+ mémoires producteurs d'acétylcholine sont également présents dans les ganglions mésentériques et les PP (Rosas-Ballina et al., 2011) où leur rôle n'est pas encore clairement défini. Dans le modèle de colite induite par le DSS, les LT CD4+ producteur d'acétylcholine semblent favoriser la réponse inflammatoire au début de la réaction, puis intervenir dans la résolution inflammatoire, alors qu'ils n'ont apparemment pas d'effet sur l'apparition ou la sévérité des symptômes dans le modèle de colite par transfert adoptif de LT CD4+ dans les souris immunodéficientes (Willemze et al., 2019).

4. Communication neuro-immune fonctionnelle

Outre la participation du SNE à la réponse inflammatoire, les neurones et les CGE peuvent directement réguler l'activité de population immunitaire, principalement les cellules de l'immunité innée. Ces interactions neuro-immunes contribuent à adapter les réponses de chaque type cellulaire, notamment lors des situations de danger.

a. Neurones et cellules immunes

Des études récentes ont démontré une interdépendance entre des neurones entériques et une population de macrophages résidents dans les couches musculaires de la paroi intestinale. En effet, les neurones entériques produisent un des facteurs de croissance des macrophages, le M-CSF, qui régule le nombre et le développement des macrophages. Quant aux macrophages musculaires, ils秘rètent le facteur de croissance BMP2, qui agit directement sur les neurones entériques. Cette communication paracrine contribue à la motricité digestive physiologique. De plus, il est à noter que les macrophages musculaires adaptent leur sécrétion de BMP2 selon la composition microbiotique (Muller et al., 2014).

Au cours de leur étude, Muller et al., ont constaté que les macrophages résidents dans la lamina propria avaient un profil pro-inflammatoire alors que les macrophages musculaires avaient un profil anti-inflammatoire favorisant la réparation tissulaire. Les auteurs proposent un contrôle du profil des macrophages musculaires dépendant d'une signalisation nerveuse extrinsèque à travers la voie les récepteurs β 2 adrénergique. Ce contrôle nerveux sur le profil des macrophages musculaires serait particulièrement important lors d'une invasion bactérienne, car les métabolites bactériens agissent sur les fibres sympathiques en favorisant la sécrétion de norépinephrine, ce qui *in fine* renforcent leur profil réparateur des tissus (Gabanyi et al., 2016). Un second groupe a récemment démontré que ces macrophages musculaires utilisaient également la signalisation β 2 adrénergique pour préserver les neurones de la mort lors d'une invasion bactérienne. Dans leur étude, les auteurs comparent la mort des neurones myentériques en condition physiologique ou après gavage par des bactéries pathogènes chez des souris sauvages et des souris chez lesquelles l'activité des macrophages a été inhibée. Chez ces dernières, c'est-à-dire en l'absence de macrophages fonctionnels, une diminution du nombre de neurones myentériques a été observée uniquement après gavage bactérien. Ces résultats suggèrent une action protectrice des macrophages sur les neurones entériques lors de situation de danger comme une invasion bactérienne (Matheis et al., 2020).

D'autres recherches rapportent des communications fonctionnelles entre les neurones et les ILC. Deux équipes indépendantes rapportent le rôle de la signalisation NMUR1-NMU pour l'activation, la prolifération et la sécrétion des cytokines IL5-9-13 des ILC-2. Par ailleurs, la délétion du récepteur NMUR1 dans les ILC2 diminue l'efficacité de l'élimination des vers digestifs. Cardoso souligne que les neurones eux-mêmes détectent le danger et augmentent en conséquence leur production de NMU (Cardoso et al., 2017; Klose et al., 2017). L'année suivante, Moriyama et al. ont rapporté une expression des récepteurs β 2 adrénergiques par les ILC2 et observé leur étroite proximité avec les neurones adrénergiques intestinaux. La délétion des récepteurs β 2 adrénergiques induisait une activation excessive de la réponse ILC2. A l'inverse, l'injection d'agonistes des récepteurs β 2 adrénergiques diminuait leur activité et leur prolifération. La signalisation β 2 adrénergique apparaît donc comme un régulateur négatif de la réponse ILC2 (Moriyama et al., 2018). Les ILC3 sont, quant à eux, sensibles au peptide vasoactif intestinal (VIP). Les ILC3 de la lamina propria expriment le récepteur VIP couplé à des protéines G (VIPR2) et sont à proximité de prolongements neuronaux. La liaison de VIP aux ILC3 favorise spécifiquement leur production d'IL-22 et l'absence du récepteur VIPR2 diminue la production d'IL-22 et rend les souris plus sensibles à la colite au DSS (Seillet et al.,

2020). Une seconde étude confirme l'expression de VIPR2 par les ILC3 et la proximité avec les fibres nerveuses entériques productrices de VIP mais des résultats opposés ont été obtenus. Dans leur modèle, la stimulation du VIPR2 a provoqué la diminution de la production d'IL-22 et une réduction de la production des peptides anti-microbiens (Talbot et al., 2020). Ces deux modèles s'accordent toutefois pour suggérer un lien entre la régulation des ILC au sein de la muqueuse et la production de VIP.

b. CGE et cellules immunes

Trois études rapportent une contribution des CGE dans le contrôle des cellules immunitaires. Une première étude réalisée *in vitro* a mis en évidence que les CGE issues de plexus myentérique d'origine humaine avaient une action inhibitrice sur la prolifération des LT (Kermarrec et al., 2016). L'effet anti-prolifératif n'était que partiellement retrouvé lorsque les LT étaient incubés avec le surnageant de culture gliale. Cette observation sous-entend la nécessité de contacts entre les deux types cellulaires dans le contrôle complet de la prolifération des LT (Kermarrec et al., 2016). Ibiza et al. ont, quant à eux, démontré une boucle de détection-réaction des CGE au micro-environnement microbiotique. Grâce à l'utilisation de souris génétiquement modifiées, ils ont mis en évidence une régulation directe des ILC3 par les CGE. Selon leur hypothèse, la glie entérique produit du GDNF, en réponse à des signaux microbiotiques à travers la signalisation TLR/Myd-88. Le GDNF ainsi produit se lie au récepteur GFR α 1-Ret exprimé par les ILC3. En réponse, les ILC3 augmentent leur production d'IL-22, une cytokine qui régule la production de peptides anti-microbiens par les cellules de la BEI. Si un défaut apparaît dans cette boucle de communication, les souris développent des colites plus sévères. Les auteurs décrivent ici une unité fonctionnelle de coopération entre le microbiote, les CGE, les ILC et les cellules de la BEI, qui serait indispensable au contrôle de l'immunité locale (Ibiza et al., 2016). Grubisic et al. ont récemment décrit les CGE comme principal producteur de M-CSF, en comparaison des neurones entériques, mais aussi leur rôle connexin-43 dépendant dans l'activation des macrophages (Grubišić et al., 2020).

Il est à noter qu'en protégeant la survie neuronale et l'intégrité de la BEI, les CGE assurent un microenvironnement globale favorable à l'homéostasie digestive et à la tolérance immunitaire (Abdo et al., 2012; Cheadle et al., 2013; Xiao et al., 2014; Meir et al., 2015).

5. Les médiateurs des communications neuro-immunes

La communication bi-directionnelle neuro-immune implique différentes molécules communément exprimées par les cellules neurales et les cellules immunitaires (Yoo and Mazmanian, 2017).

a. *Les neurotransmetteurs*

Les neurotransmetteurs sont des molécules de la communication neurone-neurone dans les synapses chimiques mais ils participent également à la communication neuro-immune et peuvent être produits par les cellules immunitaires et entéro-endocrines.

Les catécholamines sont des neuro-hormones incluant l'adrénaline (épinéphrine), la noradrénaline (norépinephrine) et la dopamine. Leurs effets sont variables en fonction du récepteur et du type cellulaire cible. Dans un modèle *in vitro* d'explants de PP porcin, la stimulation basolatérale dopaminergique, mais pas la stimulation basolatérale adrénergique, réduit l'infiltration d'une souche bactérienne pathogène salmonelle (Brown and Price, 2008). Dans les macrophages, la signalisation $\beta 2$ adrénergique favorise l'expression d'un profil transcriptomique anti-inflammatoire protecteur (Gabanyi et al., 2016), inhibe la sécrétion de TNF α et leur activité phagocytaire (Chou et al., 1996; Straub et al., 2005). Une étude *in vitro* a également montré qu'une stimulation $\beta 2$ adrénergique favorisait la différenciation des LT activés vers un profil Th17 producteur d'IL-17A (Carvajal Gonczi et al., 2017). De plus, les voies adrénergiques $\beta 2$ diminuent la circulation lymphocytaire à partir des organes lymphoïdes secondaires. L'effet est rapide, réversible, dose-dépendant et médié par l'augmentation de l'expression de chémokines spléniques. Il a d'ailleurs été montré que l'injection d'agonistes $\beta 2$ dans un modèle murin de sclérose en plaque (EAE) ou d'hypersensibilité de la peau, diminuait la sévérité de ces pathologies. Quant aux souris dépourvues de récepteurs $\beta 2$, elles étaient plus sensibles à l'inflammation (Nakai et al., 2014). D'autre part, les lymphocytes peuvent produire des catécholamines sous la régulation des voies dopaminergiques (Ferrari et al., 2004).

L'acétylcholine est le neuromédiateur post-ganglionnaire du système parasympathique principalement représenté par le nerf vague. Ce neuromédiateur est également produit par les neurones entériques et certaines populations de LT. Sa production est régulée par l'expression de l'enzyme ChAT et son action est médiée par les récepteurs nicotiniques et muscariniques. Ces récepteurs ont été détectés dans les cellules immunitaires (Kawashima et al., 2007; Fujii et al., 2017). Comme précédemment évoqué, l'acétylcholine est indispensable au réflexe anti-inflammatoire (Rosas-Ballina and Tracey, 2009). *In vitro*, l'acétylcholine inhibe la production

de TNF α , IL-6, IL-1 β et IL-18 de manière concentration dépendante par des macrophages préalablement stimulés par des LPS (Borovikova et al., 2000). L’acétylcholine est produite par certaines populations de LT de la rate, des ganglions mésentériques et des PP. Sa production est augmentée par une stimulation adrénnergique et lors de l’activation lymphocytaire (Rosas-Ballina et al., 2011). Dans l’intestin, les cellules CD4+ productrices d’acétylcholine sont en majorité des profils Th17 préférentiellement localisées dans la lamina propria colique. L’absence de production d’acétylcholine par les cellules CD4+ a pour effet une diminution de la sécrétion de peptides antimicrobiens et une augmentation de la richesse et de la diversité microbiotique (Dhawan et al., 2016; Willemze et al., 2019).

La sérotonine est une neuro-hormone principalement produite par les cellules entérochromaffines dans le tractus gastro-intestinal (Erspamer and Asero, 1952) mais également sécrétée par les neurones entériques et les cellules dendritiques. Les récepteurs à la sérotonine sont exprimés par de nombreuses cellules myéloïdes et lymphoïdes (Stefulj et al., 2000). De plus, des altérations de la voie sérotoninergique ont été mises en évidence dans les maladies inflammatoires notamment digestives. La sérotonine agit sur les cellules de l’immunité innée grâce à nombreux mécanismes (Shajib and Khan, 2015). Par exemple, il a été rapporté que la sérotonine favorisait l’activation des LT (León-Ponte et al., 2007) et l’induction vers un profil réparateur des macrophages humains pré-stimulés par des LPS (de las Casas-Engel et al., 2013).

b. Les neuropeptides

La substance P et le VIP sont des neuropeptides spécifiques du tractus gastro-intestinal. La substance P favorise la production de cytokines pro-inflammatoires comme l’IL-1 β le TNF α , et l’IL-6 par des monocytes humains (Lotz et al., 1988). Elle inhibe la prolifération des lymphocytes et favorise la production d’anticorps d’isotype IgA, les anticorps digestifs, principalement par les plasmocytes des PP (Stanisz et al., 1986). Quant au VIP, il favorise l’induction des cellules dendritiques vers un profil tolérogénique capable d’orienter la différenciation en LT régulateur (Delgado et al., 2005). Le VIP a pour effet de diminuer la production de TBF β par une lignée de macrophages préalablement stimulés par des LPS (Sun et al., 2000). A ce propos, il est à noter que la signalisation des TLR2 et TLR4 favorise l’expression du récepteur VIP de type 2 dans les macrophages (Herrera et al., 2009). Le récepteur VIP est également exprimé par les ILC3 et sa délétion induit un défaut de production d’IL-22 qui s’accompagne d’une sensibilité accrue à une colite induite par le DSS (Talbot et al., 2020).

c. Les cytokines

Ces médiateurs indispensables des réponses inflammatoires et immunitaires sont principalement sécrétés par les cellules du SI. Toutefois les cellules nerveuses en produisent également et y sont sensibles (cf. chapitre III-3-b, p39 à 40).

IV. La maladie de Crohn

La maladie de Crohn (MC) est une des deux formes principales des maladies inflammatoires chronique de l'intestin (MICI). C'est une pathologie complexe aboutissant à une hyperactivité immunitaire incontrôlable associée à une destruction progressive et irréversible de la paroi intestinale.

1. Epidémiologie & diagnostic

La MC est une affection historiquement répandue dans les pays occidentalisés. Elle affecte aujourd'hui presque tous les continents, et se déclare généralement chez les jeunes adultes.

a. Epidémiologie

Les régions où l'on recense le plus de patients atteints par la MC sont les territoires historiques de prévalence à savoir l'Amérique du nord avec un record pour le Canada (319 cas pour 100 000 individus), l'Europe de l'ouest, l'Australie et la Nouvelle Zélande. En 2015, 1,3% de la population des Etats-Unis souffraient d'une MICI, ce qui représente trois millions d'individus (Dahlhamer et al., 2016). Sur le continent européen, l'incidence de la MC varie de 0,3 à 12,7 pour 100 000 individus en fonction des pays. Le record mondial est européen, attribué à nos voisins germaniques avec une prévalence de 327 cas pour 100 000 individus (Ananthakrishnan, 2015; Ng et al., 2018). En 2017 en France, l'association François Aupetit a recensé 80 000 personnes diagnostiquées pour la maladie de Crohn. Dans ces pays occidentalisés, l'incidence et la prévalence se sont stabilisées durant ces dernières décennies, mais elles sont en augmentation dans des pays jusqu'ici relativement épargnés (ou mal recensés) comme le Brésil, la Chine, Hong Kong ou Taiwan (Ng et al., 2018). Même si la prévalence et l'incidence de la MC sont relativement faibles, en comparaison de maladie comme le cancer, il n'en demeure pas moins que la MC est une pathologie mondiale grave. De plus, cette pathologie chronique a un coût économique conséquent pour les patients et les systèmes de santé.

b. Diagnostic

Le comité d'Organisation Européenne de la Maladie de Crohn et de la Colite (ECCO) regroupe un ensemble d'experts pour proposer des pratiques médicales communes afin d'assurer une prise en charge optimale des patients. Un des points importants est le diagnostic de la pathologie.

Selon le dernier consensus de l'ECCO, le diagnostic doit être établi sur la base d'une combinaison de signes cliniques, biochimiques et endoscopiques (Maaser et al., 2019). Le diagnostic est réalisé par un gastro-entérologue au cours d'un examen clinique combiné à une exploration endoscopique et/ou radiologique (Baumgart and Sandborn, 2012). Si les marqueurs biochimiques renseignent sur l'état inflammatoire et contribuent au diagnostic, il n'en existe aucun spécifique à la MC (Vermeire et al., 2006). La MC se déclare généralement chez les jeunes adultes avec un pic de diagnostic entre 20 et 39 ans. Les cas pédiatriques (<18ans) représentent $\frac{1}{4}$ des patients et sont fréquemment associés à manifestations cliniques plus sévères (Corica and Romano, 2017).

2. Manifestations & conséquences de la maladie

La MC est une affection chronique qui se manifeste par l'alternance de périodes de rémission entrecoupées d'épisodes inflammatoires imprévisibles plus ou moins longs durant lesquels les symptômes se manifestent. L'expression clinique de la MC est variable selon la localisation des lésions ainsi que le phénotype et la sévérité de la maladie, ainsi chaque patient est unique (Roda et al., 2020).

a. Symptômes digestifs & les différents phénotypes de la MC

La MC se distingue de la colite ulcéreuse, la seconde forme principale de MICI, par une inflammation transmurale pouvant affecter tous les segments de l'intestin avec un tiers des formes affectant l'intestin grêle, un tiers la jonction iléo-colique et un tiers localisé dans le colon. Plus rare, des lésions gastro-duodénales peuvent également survenir chez certains patients (Kuriyama et al., 2008). Un ou plusieurs segments peuvent être atteints chez le même patient (Peyrin-Biroulet et al., 2010; Baumgart and Sandborn, 2012; Roda et al., 2020). Les symptômes de la MC varient en fonction du phénotype de la pathologie, mais les patients présentent en général des douleurs abdominales, des diarrhées et/ou une constipation, des pertes de poids et d'appétit parfois associées à de l'anorexie, des nausées, des vomissements, de la fatigue chronique et de la fièvre (Gomollón et al., 2017; Torres et al., 2017). Selon les patients, l'imprévisibilité des récidives, la médication continue et les symptômes digestifs comme les douleurs et l'impériosité des selles sont les facteurs qui impactent le plus leur qualité de vie (Cohen, 2002; Roda et al., 2020).

Les gastro-entérologues classent la MC selon trois phénotypes relatifs aux lésions. Les patients peuvent présenter un ou plusieurs de ces phénotypes qui peuvent évoluer. Le phénotype inflammatoire se caractérise par une inflammation du tissu qui n'est détectable que par analyse microscopique. Aucune intervention chirurgicale n'est alors nécessaire mais ce phénotype peut évoluer vers un profil avec des complications sténosantes pouvant aller jusqu'à l'obstruction ou le développement de perforation du tube digestif (Feuerstein and Cheifetz, 2017; Gomollón et al., 2017; Roda et al., 2020).

b. Comorbidité & impact sociétal

Les patients atteints de MC ne développent pas que des symptômes digestifs. Parmi les manifestations extra-digestives, l'arthrite rhumatoïde est l'affection la plus répandue avec un quart des patients atteints. Le foie, les yeux, le réseau vasculaire, la peau et les reins peuvent également être affectés (Ott and Schölmerich, 2013; Harbord et al., 2016; Jang et al., 2019). Par ailleurs, d'anciennes études rapportent chez ces patients, une incidence de cancers colorectaux et de l'intestin grêle supérieure à celle de la population générale. Des revues récentes rappellent toutefois que les données commencent à dater et qu'il serait intéressant de revoir le risque de cancers digestifs au regard des récentes avancées dans les biothérapies (Jess et al., 2005; Annese et al., 2015) .

Des désordres psychologiques graves et fréquents sont également observés chez les patients, notamment une augmentation de la prévalence de l'anxiété et de la dépression (Bhamre et al., 2018). Récemment, il a été mis en évidence l'impact d'une inflammation intestinale chronique sur les cellules microgliales hippocampiques impliquées dans le contrôle des humeurs (Gampierakis et al., 2020).

Ces manifestations digestives et extra-digestives altèrent la vie professionnelle des patients. Dans une étude française, les patients atteints par une MICI, dont 62% de la cohorte ont une MC, se disent satisfaits de leur travail mais expriment clairement des difficultés dans les opportunités de poste et sont pour la plupart, moins diplômés (Le Berre et al., 2019).

Enfin, la qualité de vie est altérée par de nombreux facteurs liés à des manifestations physiques digestives et extra-digestives mais également par des facteurs psychologiques et socio-professionnels (*Figure 16*). De plus, la mortalité est 1,4 fois plus importante chez les patients atteints de MC en comparaison de la population générale (Peyrin-Biroulet et al., 2011).

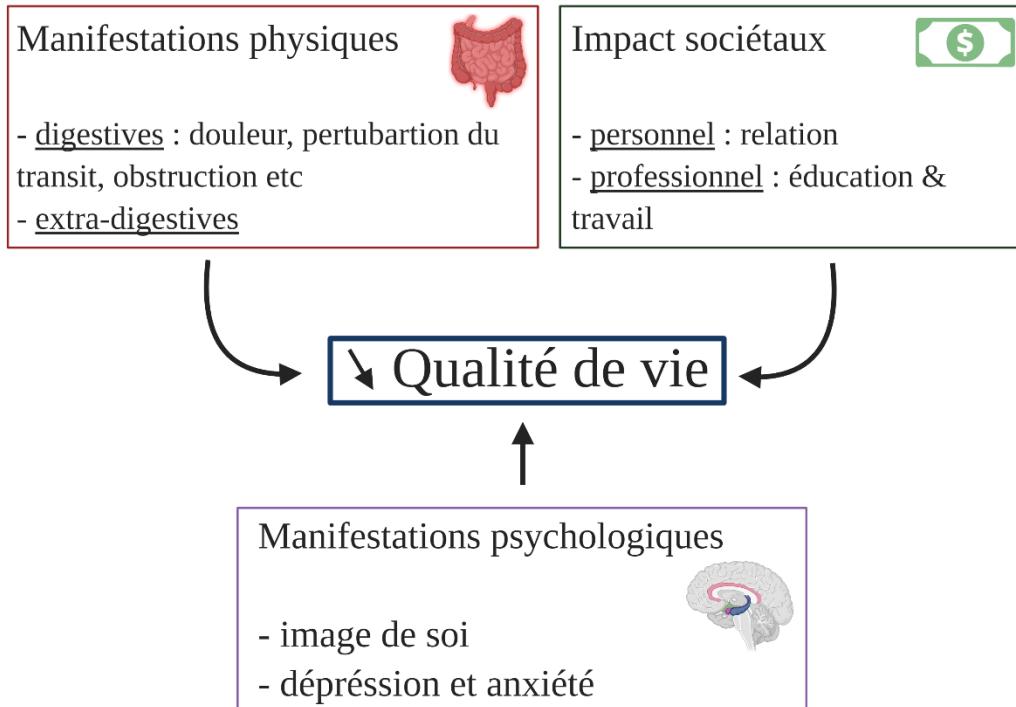


Figure 16 : La qualité de vie des patients atteints par la maladie de Crohn est affectée par des manifestations physiques digestives et extra-digestives, des problèmes sociaux ainsi que par des manifestations psychologiques. Crée sur biorender.com à partir de Roda (Roda et al., 2020).

3. Etiologie

L'étiologie de la MC n'est pas complètement élucidée. C'est une pathologie complexe qui fait intervenir des facteurs environnementaux, des susceptibilités génétiques, et des dysbioses intestinales qui contribuent à des réponses pro-inflammatoires aberrantes et chroniques (Strober et al., 2007; Kaser et al., 2010; Ananthakrishnan, 2015; Uniken Venema et al., 2017).

a. Facteurs de risque environnementaux

La prévalence historique de la MC dans les pays aux styles de vie urbains et occidentalisés, son augmentation récente dans les pays comme le Brésil et les études épidémiologiques montrant l'alignement de la prévalence des populations immigrées sur celle du pays d'accueil, suggèrent un impact important des facteurs environnementaux (Ng et al., 2018). Une méta-analyse de 2017 a confirmé le tabagisme, le style de vie urbain, l'appendicectomie, l'ablation des amygdales, l'exposition récurrente aux antibiotiques, la contraception orale, et des carences en vitamine D comme principaux facteurs de risque. Le tabagisme actif est également associé à la sévérité des symptômes, des lésions de la paroi et par conséquent, à l'augmentation des interventions chirurgicales précoces et récurrentes (Torres et al., 2017).

A l'inverse, des facteurs ont été identifiés comme protecteurs tels que l'activité physique régulière, l'allaitement maternel, un haut niveau de folate et de vitamine D (Piovani et al., 2019). A ce jour, il n'existe pas de recommandations nutritionnelles officielles mais des études suggèrent le régime méditerranéen comme protecteur car riche en alimentation végétale et en omega-3 associés à des effets anti-inflammatoires (Khalili et al., 2020). Une publication de Sandefur et al. , a rapporté qu'un régime vegan aurait permis une rémission sans médication chez un patient atteint de MC (Sandefur et al., 2019).

Même si les mécanismes d'actions des facteurs environnementaux sur le développement de la MC reste à être identifier clairement, l'éducation des populations est un levier important pour limiter l'incidence de la MC.

b. Susceptibilités génétiques

Des recherches génétiques généralisé ont mis en avant plusieurs polymorphismes d'un seul nucléotide associés aux MCI, notamment à la MC. La recherche de susceptibilités génétiques sur une cohorte de plus de 70 000 individus, a dévoilé plus de 200 loci associés à des risques relatifs souvent modérés. De plus, ces polymorphismes d'un seul nucléotide ne sont pas toujours associés à des variants protéiques fonctionnels (Hugot et al., 2001; Huang et al., 2017; Al Nabhani et al., 2017; Uniken Venema et al., 2017; Imam et al., 2018). Cependant, ces études ont révélé que les altérations génétiques détectées affectaient principalement les cellules de l'immunité innée et adaptative (Imam et al., 2018), le processus d'autophagie (Hugot et al., 2001) et les fonctions de barrière (Bonen and Cho, 2003; Jostins et al., 2012; de Lange and Barrett, 2015) nous renseignant ainsi sur les mécanismes pathologiques.

4. Mécanismes pathologiques

L'inflammation transmurale chronique du tractus gastro-intestinal observée dans la MC est le résultat d'un dérèglement des cellules immunitaires, non-immunitaires et du microbiote ainsi qu'un défaut de communication entre eux (*Figure 17*) (Fiocchi, 1997; Veiga-Fernandes and Mucida, 2016; Danese and Fiocchi, 2016). Ces dérèglements cellulaires favorisent un environnement toxique avec notamment la persistance de médiateurs pro-inflammatoires (ROS, NO, leucotriènes, histamine, protéase, prostaglandines, cytokines) contribuant à l'apoptose et la nécrose des cellules dans la paroi intestinale (Keshavarzian et al., 2003).

a. Microbiote et dysbiose

Il a été observé chez les patients atteints par la MC une moindre diversité du microbiote, avec un enrichissement des phylas Bacteroidetes et Proteobacteria et une diminution des Firmicutes (Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011). Pour déterminer si cette dysbiose était la cause ou la conséquence de désordre intestinaux, De Palma et al., ont effectué des transferts fécaux à partir de donneur humain présentant un syndrome de l'intestin irritable. Les souris axéniques chez lesquelles les transferts ont été réalisés, développaient les symptômes du donneur, suggérant qu'une dysbiose pourrait être un évènement déclencheur de trouble digestif (De Palma et al., 2017). Par ailleurs, certaines mutations génétiques (variants NOD2 et ATH16L1) identifiées comme inductrices de la MC et associées à des défauts d'autophagie, pourraient contribuer au développement d'une réponse immunitaire aberrante contre les antigènes du microbiote intestinal (Fritz et al., 2011). Enfin, le microbiote ayant un impact sur le développement des cellules immunitaires digestives, notamment des LT régulateurs, une dysbiose pourrait altérer les fonctions et le contrôle de l'activité des populations immunitaires au sein de la paroi intestinale.

b. Altération de la BEI

Les différents types cellulaires qui composent la BEI sont indispensables à l'équilibre entre l'absorption et le contrôle du passage des molécules (Baumgart and Dignass, 2002; Peterson and Artis, 2014; Soderholm and Pedicord, 2019). Les cellules les plus nombreuses sont les cellules épithéliales qui, grâce aux transporteurs et canaux spécialisés, permettent l'absorption des nutriments. Le passage de molécules (nutriments ou toxiques) peut se faire à travers les cellules épithéliales via des pompes et des canaux précédemment évoqués (voie transcellulaire) ou entre les cellules épithéliales (voie paracellulaire). La voie paracellulaire est hautement régulée grâce aux protéines de jonctions serrées. Chez les patients atteints de MC, il a été observé une augmentation de la perméabilité de la BEI (Bjarnason et al., 1983) en partie due à une altération des cellules épithéliales, des défauts de leur renouvellement et des anomalies dans la synthèse des protéines de jonctions serrées (Zeissig et al., 2007a; Jostins et al., 2012). Une diminution de l'expression des TLR3 et une augmentation de l'expression des TLR4 ont également été observées dans les cellules épithéliales de patients Crohn (Cario and Podolsky, 2000). Enfin, en réaction à l'inflammation locale, les cellules épithéliales秘rètent des cytokines pro-inflammatoires (Onyiah and Colgan, 2016) et expriment les protéines du CMH-II, ce qui les rend capables d'activer les LT CD4+ auxiliaires et ainsi favoriser leurs activités délétères (Wosen et al., 2018).

Indispensable à la fonction de barrière, les cellules de gobelet秘rètent des glycoprotéines, les mucines, qui composent le mucus et limitent le contact entre les microorganismes et les cellules épithéliales (Birchenough et al., 2015). Chez les patients atteints de MC, la sécrétion de mucine est diminuée, réduisant la couche protectrice de mucus (Buisine et al., 1999, 2001). La délétion d'un gène codant pour une mucine, Muc2, a d'ailleurs été utilisée pour générer un modèle expérimental murin de MICI, le modèle Winnie (Heazlewood et al., 2008; Eri et al., 2011).

c. Hyperactivité du système immunitaire digestif

Une réaction inflammatoire excessive est reconnue comme responsable des lésions observées dans la MC et des complications associées. Les cytokines pro-inflammatoires et les molécules d'adhésion lymphocytaires sont d'ailleurs les cibles principales des stratégies thérapeutiques actuelles. Si les LT CD4+ sont depuis longtemps reconnus comme contributeur de l'inflammation chronique dans la MC, les dernières recherches soulignent un rôle important des populations immunitaires lymphoïdes innées.

❖ Immunité innée

Chez les patients atteints de la MC, il a été observé un nombre plus élevé de macrophages particulier CD14+ produisant massivement des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-23 et le TNF- α (Kamada et al., 2008). D'autre part, les cellules dendritiques des patients présentent un profil mature associé à une hyperexpression des TLR2, des protéines CD40, des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et IL-6 (Hart et al., 2005), et des chémokines (Middel et al., 2006). L'infiltration d'éosinophiles est également augmentée chez ces patients (Jeziorska et al., 2001) et l'administration d'antagoniste de l'éotaxine, dans un modèle murin de colite induite par du TNBS, a réduit les symptômes et restauré une activité motricité colique normale (Filippone et al., 2018). Enfin, les populations d'ILC-1, d'ILC-2, et d'ILC-3, initialement identifiées dans des modèles murins de colite induite (Buonocore et al., 2010), sont en plus grand nombre dans les segments inflammés des patients Crohn (Geremia et al., 2011; Bernink et al., 2013; Geremia and Arancibia-Cárcamo, 2017). Ces ILC peuvent être à la fois, délétères en perpétuant l'inflammation par la sécrétion de cytokines comme l'IL-17 et l'IFN γ , et protecteurs, par exemple grâce à la production d'IL-22 par les ILC-3 (Tait Wojno and Artis, 2012).

❖ Immunité adaptative

Les patients atteints par la MC présentent des modifications du profil de sécrétion des immunoglobulines par les plasmocytes intestinaux (Scott et al., 1986 ; MacDermott et al., 1989). D'autre part, une augmentation des anticorps sériques dirigés contre certains antigènes du microbiote commensal, comme la flageline, a été rapportée (Lodes et al., 2004) et la concentration en anticorps anti-glycans serait corrélée positivement à la sévérité des symptômes (Mow et al., 2004).

Le rôle des LT dans la progression de la MC est mieux caractérisé, notamment en raison de l'infiltration aberrante de LTCD4+ auxiliaires dans la paroi digestive des patients (Emmrich et al., 1991; Stronkhorst et al., 1997; Imam et al., 2018). A ce propos, la maladie de Crohn a longtemps été opposée à la colite ulcéreuse selon le profil de LTCD4+ auxiliaires dominants. Chez les patients atteints de MC, ce sont les LTCD4+ auxiliaires associés à un profil TH1, secrétant principalement de l'IL-12 et de l'IFN γ qui sont décrits, alors que la colite ulcéreuse se définit majoritairement par un profil Th2 associé aux cytokines IL-5 et IL-13 (Berg et al., 1996; Fuss et al., 1996). Cependant, les réponses immunitaires sont rarement dichotomiques, et l'on reconnaît désormais l'implication d'autres populations comme les LT Th17 (Annunziato et al., 2007; Brand, 2009). La contribution des LT régulateurs reste mal connue mais ils pourraient participer à la physiopathologie de la MC (Mayne and Williams, 2013). En effet, chez ces patients, le nombre de LT régulateurs circulants est augmenté durant les phases de rémission et diminué lors des périodes de récidive. A noter que c'est dans les zones inflammatoires de la muqueuse que l'on observe le plus ces populations régulatrices (Maul et al., 2005). Les activités immunosuppressives des Treg semblent intactes dans les modèles expérimentaux de MCI. Ce serait les LT colitogéniques qui seraient résistant aux activités immunosuppressives (Fantini et al., 2009). Toutefois, l'administration de LT régulateurs CD4+CD25+FOXP3+ en phase active du processus inflammatoire a pu réduire les symptômes et restaurer une architecture intestinale physiologique (Mottet et al., 2003).

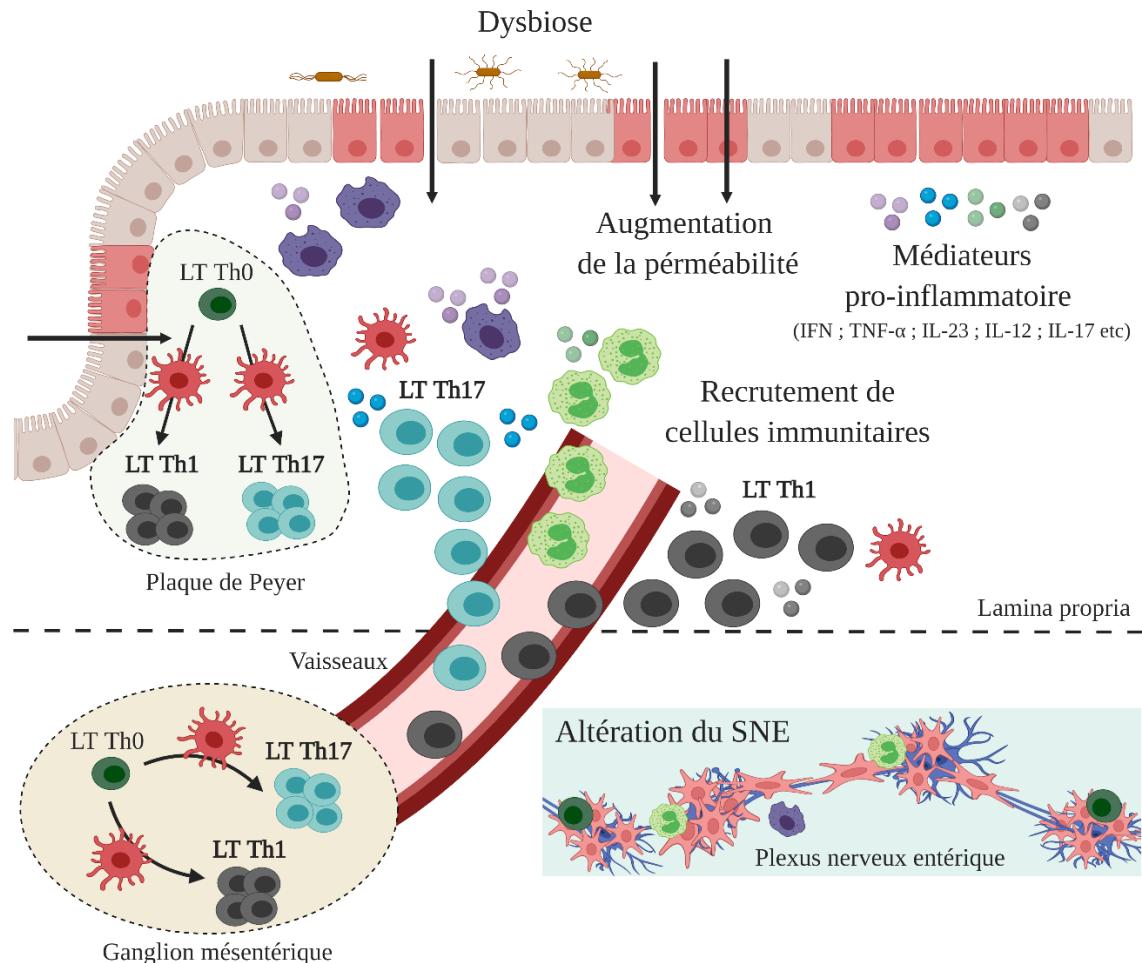
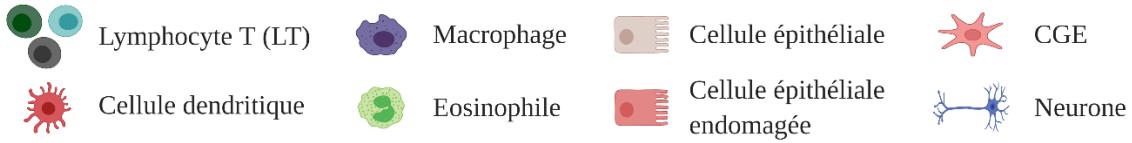


Figure 17 : Représentation simplifiée des altérations dans les segments digestifs atteint de patient Crohn. Crée sur biorender.com à partir de Baumgart et Sandborn (Baumgart and Sandborn, 2012).

d. Altération des réseaux nerveux

Au cours des années 1990, l'étude du SNE de patients atteints par la MC a révélé des altérations parfois contradictoires. Cependant, les analyses s'accordent pour rapporter des altérations morphologiques, le plus fréquemment une hypertrophie et une hyperplasie des cellules neurales entériques, une altération dans l'architecture des plexus, et une modification de l'expression des marqueurs gliaux et neuronaux. Ces altérations ont été observées dans des populations neurales des zones inflammées prélevées au cours des phases actives de la maladie. Des données plus récentes rapportent la persistance de ces altérations et de leurs conséquences fonctionnelles, notamment motrices, au cours des périodes asymptomatiques de rémission (Mawe et al., 2009; Brierley and Linden, 2014; Mawe, 2015).

Concernant les neurones entériques, les études ont rapporté des altérations du codage neurochimique notamment dans l'expression du neurotransmetteur VIP (Belai et al., 1997; Geboes and Collins, 1998; Sjölund et al., 1983; Schneider et al., 2001), ainsi que des processus de neurodégénération (Dvorak et al., 1980; Stead, 1992; Boyer et al., 2005) et de neurogénèse (Steinhoff et al., 1988; Brewer et al., 1990).

D'autres études ont suggéré une sensibilité à l'inflammation digestive en fonction de la densité nerveuse initiale. Les auteurs ont réalisé une étude comparative sur des souris transgéniques NSE-noggin qui génèrent en surabondance les neurones entériques (à hauteur de 150%) aux souris Hand2^{+/−} qui possèdent moins de neurones (environ 60%). Après avoir induit une colite chimique au TNBS, la survie, les symptômes, le score histologique, l'expression de gène pro-inflammatoires et les niveaux d'activité des neutrophiles ont été comparés. Les souris présentant un surabondance de neurones entériques développent une colite plus sévère comparativement aux souris sauvages. Inversement, les souris qui ont déficit en neurones développent une colite moins sévère (D'Atréaux et al., 2011; Margolis et al., 2011).

Concernant les CGE, le changement le plus fréquemment rapporté est l'augmentation de l'expression de la protéine GFAP dans les zones inflammatoires des segments inflammés (von Boyen et al., 2011). L'expression de la protéine S100 β dans les plexus sous-muqueux et myentérique est également plus importante dans les régions inflammées en comparaison des zones non lésées (Villanacci et al., 2008). De plus, l'analyse des surnageants de biopsies coliques a rapporté une surproduction de GDNF dans les zones lésées et un niveau non détectable dans les zones saines (von Boyen et al., 2011). Par ailleurs, le profil lipidomique des CGE de patients atteints de MC est altéré et leurs CGE sont moins efficaces pour réguler la perméabilité intestinale (Coquenlorge et al., 2014; Pochard et al., 2016, 2018). Enfin, d'autres études ont mis en évidence une expression des molécules du CMH-II par les CGE de patients atteints de MC (Koretz et al., 1987; Geboes et al., 1992), suggérant un rôle de la glie entérique comme cellules présentatrices d'antigènes sans pour autant identifier un mécanisme de présentation antigénique actif.

5. Thérapies & innovations thérapeutiques

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif de la MC. Les thérapies proposées sont des prises en charges symptomatiques limitant l'activité inflammatoire afin de réduire la destruction de la paroi intestinale et le recours à la chirurgie.

a. Suivi clinique

Le suivi des patients se fait à l'aide d'un indice d'activité de la maladie, le CDAI ou Crohn Disease Activity Index. Ce score est établi par le gastoentérologue en fonction du ressenti général des patients, de la présence/absence de masse à la palpation de l'abdomen, des variations de poids et de la fréquence/consistance des selles. L'activité de la maladie est alors classée en « faible/inactive » « modérée » ou « sévère » permettant d'ajuster la stratégie thérapeutique mais également de mesurer objectivement la réponse au traitement (Roda et al., 2020). Cette évaluation clinique est complétée par une évaluation des lésions de la muqueuse par endoscopie qui sont classifiées selon le score de Léman. C'est un indicateur objectif fiable qui permet d'affiner la prise en charge et le suivi thérapeutique (Pariente et al., 2011; Fiorino et al., 2016).

Il me semble important de noter que les symptômes ressentis par le patient ainsi que l'évaluation de la qualité de vie peuvent parfois être différents des conclusions cliniques objectifs du médecin (Torres et al., 2017).

b. Stratégies thérapeutiques actuelles et innovations

Actuellement, l'objectif thérapeutique pour la MC est de maintenir une rémission clinique et endoscopique sans stéroïde tout en limitant le risque de complications associées aux interventions chirurgicales. Concrètement, l'objectif est d'améliorer la qualité de vie des patients en limitant les chirurgies. Si le processus inflammatoire chronique est le résultat d'altérations multiples et complexes de nombreuses cellules, les stratégies thérapeutiques se sont développées autour du contrôle des fonctions immunitaires. En parallèle, certains auteurs ont récemment remis en avant l'intérêt de développer des stratégies protectrices du SNE afin d'enrichir l'arsenal thérapeutique insuffisant au regard de la persistance des nombreux recours chirurgicaux (Stavely et al., 2020).

Selon le consensus européen ECCO de 2017, la prise en charge thérapeutique doit prendre en compte la localisation des lésions, le phénotype de la maladie et la sévérité des symptômes. En première ligne, ce sont des immunosuppresseurs de type thiopurines ou méthotrexate qui sont proposés, puis en second recours, des anticorps anti-TNF α .

Les anti-TNF α représentent l'avancée la plus significative dans la prise en charge des patients durant ces dernières années. Sur le marché européen, il existe trois anticorps distincts, l'infliximab, l'adalimumab et le certolizumab pegol. Ils sont communément utilisés seul ou en combinaison avec un immunosuppresseur (Colombel et al., 2010; Dulai et al., 2014; Gomollón et al., 2017). En parallèle, les patients utilisent de plus en plus des alternatives non médicamenteuses complémentaires, principalement sur la base de régime alimentaire végétalisé ou sans gluten, de méditation et/ou de yoga (Torres et al., 2019). Ces thérapies alternatives ont notamment des effets bénéfiques pour la gestion du stress, de l'anxiété (Oligschlaeger et al., 2019) et pourraient faciliter la communication neuro-immunitaire de l'axe « intestin-cerveau » (Bonaz and Bernstein, 2013).

L'inhibition du recrutement général des lymphocytes par blocage LFA-1/ICAM-1 a également été testée comme piste thérapeutique. Les résultats issus de modèles animaux ont été contradictoires (Hamamoto et al., 1999; Soriano et al., 2000; Burns et al., 2001), mais un essai clinique basé sur l'administration d'un oligonucléotide anti-sens inhibant la production d'ICAM-1 a été autorisé. Malgré une première évaluation de phase II encourageant (Yacyshyn et al., 1998), les évaluations ultérieures sur un plus grand nombre de patients n'ont pas rapporté d'efficacité de l'oligonucléotide en comparaison du placebo (Schreiber et al., 2001; Yacyshyn et al., 2002, 2007).

Deux innovations thérapeutiques récemment mises sur le marché européen se sont ajoutées à l'arsenal médicamenteux. Les anticorps dirigés contre l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ (vedolizumab) bloquent le recrutement lymphocytaire dans la paroi digestive sans interférer avec le recrutement des LT circulants, ce qui permet de limiter les effets secondaires (Sandborn et al., 2013). Plus récemment approuvés, les anticorps anti-IL-12 et anti-IL-23 inhibent l'action de ces cytokines impliquées dans la différenciation de cellules aux profils impliqués dans la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires néfastes (Sandborn et al., 2012; Sands et al., 2017; Feagan et al., 2017).

Encore au stade d'essais cliniques, les injections d'anticorps anti NKG2D, qui bloquent la liaison aux récepteurs NKG2D exprimés par les ILC et les LT, semblent prometteur car ils induisent une rémission à long terme chez les patients (après douze semaines, mais sans effet à quatre semaines) (Allez et al., 2017). Encore au stade de développement préclinique, certains auteurs cherchent à prévenir l'apparition des MICI en explorant la piste vaccinale (Basso et al., 2018).

c. Prévention de la récidive post-opératoire : intérêt des plexites entériques

Grace à ces avancées thérapeutiques, le risque de chirurgie a légèrement diminué durant ces dernières décennies. Cependant, le recours chirurgical reste inéluctable pour la majorité des patients. Selon les études les chiffres varient et on estime à 30% les interventions chirurgicales dans les cinq ans post-diagnostic, jusqu'à 50% dans les dix ans, et entre 60-80% dans les vingt ans (Peyrin-Biroulet et al., 2010; Thia et al., 2010; Frolkis et al., 2013). Ces chiffres ne sont guère encourageants surtout que les récidives post-opératoires sont fréquentes (Feuerstein and Cheifetz, 2017). En effet, selon une étude publiée en 1990, 20% des patients présentent une récidive clinique dès la première année post-chirurgie (Rutgeerts et al., 1990). Un chiffre similaire (18%) a été rapporté lors d'une étude effectuée entre 1998 et 2013 (de Buck van Overstraeten et al., 2017). Des études publiées en 2012 et 2017 ont rapporté une récidive clinique dans les cinq ans pour 50% des patients opérés (Baumgart and Sandborn, 2012; Gionchetti et al., 2017) et une récidive chirurgicale dans les dix ans pour 20 % des patients après une première intervention (de Buck van Overstraeten et al., 2017). Enfin, si l'on prend en compte tous les types de récidives (clinique, endoscopique, chirurgicale), on estime entre 28% et 45% le risque de récidive à cinq ans, et entre 36% et 61% à dix ans (Ryan et al., 2019). A ce jour, l'ECCO recommande un suivi endoscopique des patients à 6 et 12 mois post-chirurgie afin que le gastroentérologue puisse conseiller ou non une reprise thérapeutique adaptée (Feuerstein and Cheifetz, 2017). Pour améliorer ce suivi et prévenir la récidive, l'identification et l'utilisation de marqueurs prédictifs objectifs et précis sont essentielles. Certains paramètres comme l'âge du patient, la durée de la maladie, le type de chirurgie pratiquée ou les niveaux d'IL-6 dans la muqueuse iléale, ont été mentionnés dans la littérature mais les résultats sont contradictoires (Yamamoto et al., 2004; Gklavas et al., 2017; Gionchetti et al., 2017). Selon le dernier consensus, sont actuellement considérées comme prédictif de la récidive post-opératoire, la consommation active de tabac, la présence d'un phénotype perforant, des lésions périanales, la nécessité du recours à une résection supérieure à 50 cm, la présence de granulomes mais également la détection de plexites myentériques en marge proximale de la résection (Gionchetti et al., 2017).

Les plexites, ou ganglionites, correspondent à une inflammation du ou des plexus. D'un point de vue histologique, la plexite se caractérise par la présence d'au moins une cellule immunitaire à proximité ou au sein d'un ganglion nerveux et/ou sur les fibres inter-ganglionnaires (*Figure 18*). Dans la paroi intestinale, l'infiltration peut se produire dans le plexus sous-muqueux et/ou dans le plexus myentérique. Ces infiltrats immunitaires, appelés plexites sous-muqueux ou myentériques, sont hétérogènes et principalement composés d'éosinophiles, de mastocytes, de plasmocytes et de lymphocytes T (Ferrante et al., 2006; Sokol et al., 2009; Bressenot and Peyrin-Biroulet, 2015; Decousus et al., 2016; Lemmens et al., 2017; Milassin et al., 2017). Par ailleurs, il est à noter que les plexites entériques, notamment myentériques, sont fréquents chez les patients Crohn. Selon les études, des plexites ont été détectés chez 26% (Sokol et al., 2009), 70-75 % (Ferrante et al., 2006; Misteli et al., 2015) et jusqu'à 88-91% (Decousus et al., 2016; Villanacci et al., 2008) à partir de résections proximales de patients atteints par la MC.

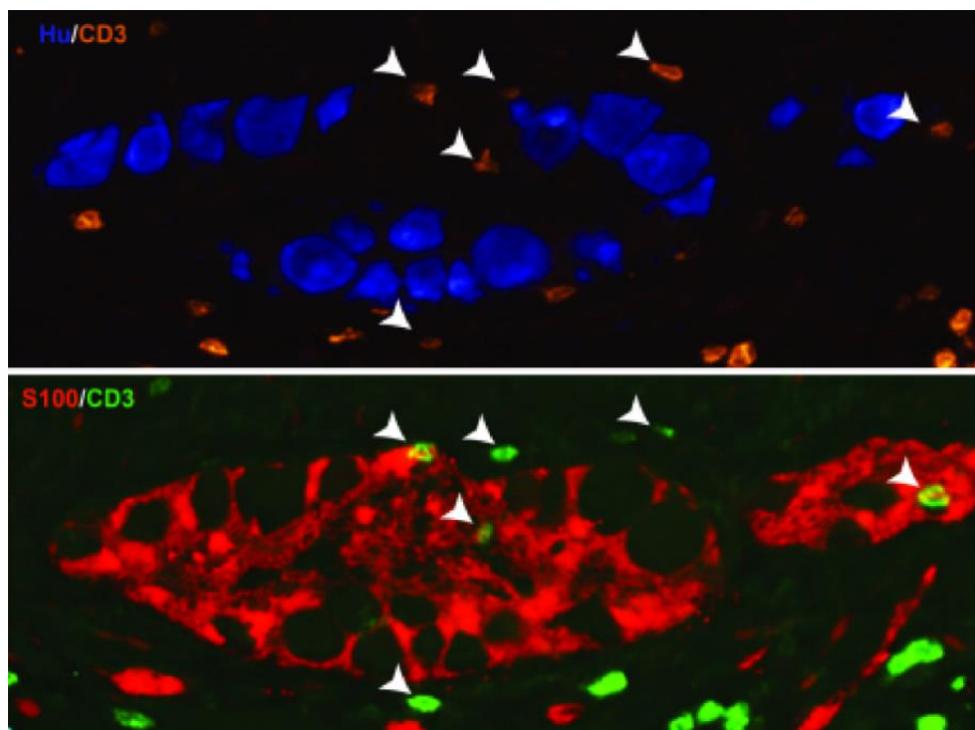


Figure 18 : Mis en évidence de plexites myentériques (tête de flèche) chez un patient atteint de la MC à l'aide de marquages immunohistochimiques dirigés contre les LT (CD3), les corps cellulaires neuronaux (Hu) et les CGE (S100 β).

La présence de ces infiltrats immuns à proximité de cellules neurales a notamment été rapporté dans la maladie de Crohn par Dvorak et al., dès 1980 (Dvorak et al., 1980). Leur intérêt comme marqueur prédictif a été révélé en 2006 par une étude de Ferrante démontrant une corrélation entre la récidive endoscopique et la présence de plexites myentériques au niveau de la marge proximale des résections intestinales. En effet, dans leur étude, 75% des patients présentant des plexites myentériques subissent une récidive endoscopique douze mois après l'intervention chirurgicale, alors que seul 41% des patients sans plexites détecté récidive (Ferrante et al., 2006). Une corrélation entre la sévérité des lésions endoscopique, le nombre de ganglions infiltrés et le nombre de cellules immunes détectées, a été observée et selon Ferrante et al., les ganglions nerveux entériques pourraient être une voie de dissémination des cellules immunes des zones inflammatoires vers les zones saines. A noter que le type de traitement thérapeutique (corticostéroïde ou mesalamine) avant la chirurgie ne semble pas influencer l'apparition de plexites entériques (Ferrante et al., 2006) mais il serait intéressant d'évaluer l'impact des nouvelles biothérapies, notamment des anticorps anti- $\alpha 4\beta 7$, sur leur formation.

Certaines études qui n'ont pas trouvé de corrélation entre la présence de plexites myentériques et la récidive post-opératoire, ont établi une corrélation entre la présence de plexites sous-muqueux et une récidive post-opératoire (Sokol et al., 2009; Bressenot and Peyrin-Biroulet, 2015; Lemmens et al., 2017). C'est le cas de l'étude de Sokol et al., dans laquelle le risque de récidive clinique est associé à la présence de plus de trois mastocytes dans le plexus sous-muqueux. Dans cette étude, ce sont principalement des mastocytes, cellules de l'immunité innée, qui infiltrent des ganglions sous-muqueux (80%), alors que dans les ganglions myentériques, les cellules immunes infiltrantes sont en majorité des lymphocytes (70%). Ces proportions sont celles retrouvées dans l'étude française de Decousus et al., dans l'étude princeps de Ferrante et al., et dans les travaux de Lemmens et al., (Ferrante et al., 2006; Sokol et al., 2009; Decousus et al., 2016; Lemmens et al., 2017). Ces résultats suggèrent des mécanismes de recrutement des cellules immunes spécifiques du type de plexus entériques.

	Ferrante	Sokol	Ng	Bressenot	Mistei	Lemmens	Decousus	Nakao	Milassin
Nb patients (Nb Ctrl)	56 (21)	171 (10)	99 (0)	67 (0)	86 (0)	74 (38)	75 (0)	51 (0)	104 (0)
Conclusion	Plexites M & récidive endoscopique	>= 3 mastocytes dans le plexus SM & récidive clinique	>= 1 dans le plexus SM & récidive chirurgicale	>= 10 éosinophile et/ou >= 6 lymphocytes dans le plexus SM & récidive chirurgicale	cellules immunes dans le plexus M & chirurgicale	ganglions et/ou >= 1 lymphocyte dans le plexus & chirurgicale	>= 1 lymphocite dans le neutrophile & endoscop	>= 8 cellules immunes dans le plexus M & chirurgicale	>= 2 lymphocytes dans le plexus SM & récidive clinique et/ou chirurgicale
Infiltrat lymphocyt-aire M	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Oui	Oui

Figure 19 : Résumé des études sur la valeur prédictive des plexites entériques en marge proximale dans la maladie de Croh. SM : Sous-Muqueux ; M : Myentérique.

Ainsi, la présence de plexites entériques en marge proximale des résections intestinales est un indicateur de récidive post-opératoire précoce. Leur détection pourrait aider au suivi et à la prise en charge thérapeutique adaptée pour les patients à risque, mais à ce jour, ce critère est en pratique encore peu utilisé (Roda et al., 2020). Afin d'optimiser l'utilisation des plexites entériques dans la prévention des récidives post-opératoire, et plus largement de mieux comprendre ces plexites, il est nécessaire d'en déchiffrer les mécanismes de formations. Quelles cellules nerveuses sont impliquées ? Quelles conditions favorisent l'infiltration immunitaire ? Quelles molécules sont impliquées ? Quels sont les rôles de ces communications, a priori anormales, dans la physiopathologie de la maladie de Crohn ? Quels impacts sur les cellules nerveuses ? Et sur les cellules immunitaires ? Peut-on inhiber ces interactions et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ?

Contexte & Objectifs du projet de thèse

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin qui impact la qualité de vie des patients et qui nécessite des interventions chirurgicales (Torres et al., 2017; Roda et al., 2020). Actuellement incurable, cette pathologie est associée à un recrutement et une activité aberrante des cellules immunitaires dans la paroi du tractus gastro-intestinal. A ce propos, de récentes publications ont mis en évidence l'importance des interactions entre certaines cellules immunitaires et les cellules neurales entériques dans le maintien et la rupture de l'homéostasie digestive (Muller et al., 2014; Ibiza et al., 2016; Grubišić et al., 2020; Talbot et al., 2020). Par ailleurs, l'infiltration de cellules immunitaires à la périphérie et/ou au sein des ganglions nerveux et/ou des fibres inter-ganglionnaires (plexites entériques) est, à présent, reconnue comme un facteur prédictif de récidive post-opératoire (Ferrante et al., 2006; Sokol et al., 2009; Vaughn and Moss, 2014; Decousus et al., 2016; Gionchetti et al., 2017; Lemmens et al., 2017; Ryan et al., 2019). Cette observation est d'autant plus importante que les taux de récidives post-opératoires sont fréquents estimés entre 28 et 45% seulement 5 ans après la première intervention (Thia et al., 2010; Feuerstein and Cheifetz, 2017). Les causes et les conséquences du développement des plexites entériques ne sont à ce jour pas connues mais leur observation en plus grand nombre chez les patients Crohn, suggère un rôle de ces infiltrats immunitaires dans la physiopathologie de cette maladie. C'est pourquoi une meilleure connaissance des plexites entériques, notamment de leur formation, pourrait permettre de comprendre certains des mécanismes à l'origine des récidives post-opératoires. Aussi avons-nous entrepris d'étudier les interactions entre les lymphocytes T et les cellules neurales entériques à partir de résections intestinales de patients Crohn mais également en co-cultures ainsi que dans un modèle murin de colite chronique spontanée. L'étude avait pour ambition :

- ❖ De caractériser les cellules neurales en étroite proximité avec les lymphocytes T dans les plexites myentériques de patients Crohn.
- ❖ D'étudier l'adhésion des cellules T dans des cultures primaires mixtes de SNE.
- ❖ De déterminer les facteurs favorisant l'adhésion des lymphocytes T aux cellules neurales entériques, et en particulier, les cellules gliales entériques.
- ❖ D'identifier le/les acteurs moléculaires impliqués dans les interactions glio-lymphocytaires.
- ❖ De tester l'impact de ce/ces acteurs moléculaires sur le développement de colite et la formation de plexites entériques dans un modèle murin de colite chronique spontanée.

Résultats

Article 1:

T cells show preferential adhesion to enteric neural cells in culture and are close to neural cells in the myenteric ganglia of Crohn's patients.

<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577422>

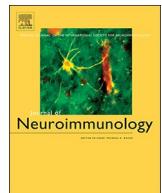
Résumé de l'article 1 :

La maladie de Crohn est une pathologie idiopathique incurable associée à une inflammation chronique transmurale d'un ou plusieurs segments du tractus gastro-intestinal. Malgré les récentes innovations thérapeutiques, le dérèglement des réponses immunitaires conduit à une destruction progressive de la paroi digestive. Ces complications nécessitent une résection chirurgicale des segments intestinaux affectés et les récidives post-opératoires sont fréquentes (Thia et al., 2010; Peyrin-Biroulet et al., 2010; Frolkis et al., 2013; Feuerstein and Cheifetz, 2017; Gionchetti et al., 2017). Face à ce constat alarmant, il était nécessaire d'identifier des marqueurs prédictifs de la récidive post-opératoire afin d'optimiser la prise en charge personnalisée des patients. Décrit depuis des décennies (Dvorak and Silen, 1985; Geboes and Collins, 1998), la présence de plexites entériques en marge proximale de résections intestinales a récemment été reconnue comme un marqueur prédictif de récidive endoscopique, clinique et chirurgicale post-opératoire pour les patients atteints de la maladie de Crohn (Ferrante et al., 2006; Sokol et al., 2009; Decousus et al., 2016; Gionchetti et al., 2017; Lemmens et al., 2017; Ryan et al., 2019).

Les précédentes études sur les plexites entériques étaient essentiellement basées sur des marquages histologiques montrant un infiltrat hétérogène de cellules immunitaires, à dominante lymphocytaire dans les plexus myentériques (Ferrante et al., 2006; Sokol et al., 2009; Bressenot and Peyrin-Biroulet, 2015; Decousus et al., 2016). Face au manque d'informations concernant les cellules neurales à proximité de l'infiltrat immunitaire, nous avons entrepris d'étudier l'adhésion des lymphocytes T dans des cultures primaires mixtes de système nerveux entériques de rat, et de caractériser par immunohistochimie, les cellules neurales à proximité des lymphocytes T dans les plexus entériques de patients Crohn.

Les observations par vidéomicroscopie ont montré qu'en co-culture, une partie des LT adhèrent activement aux cellules neurales dans des cultures primaires mixtes de SNE. En effet, certains émettent de façon dynamique des extensions cytoplasmiques quand d'autres pénètrent littéralement sous la culture. Les marquages immunohistochimiques ont rapporté l'adhésion préférentielle des LT non activés aux neurones PGP9.5+ et aux cellules gliales S100 β + dans les cultures primaires où sont présents des neurones entériques, des CGE et un vaste tapis de cellules musculaires lisses. De plus, l'activation des lymphocytes T avait pour effet de stimuler leur adhésion à l'ensemble de cellules présentes dans la culture primaire mixte de SNE.

Enfin, des analyses par immunohistochimie de résections intestinales proximales ont révélé une proximité entre des LT CD3+ avec des neurones entériques Hu+ et des CGE S100 β + dans les plexus myentériques de patients Crohn. Une étude quantitative a par ailleurs, révélé que seules les cellules LT CD3+ en étroite proximité avec les CGE S100 β + étaient en nombre supérieur dans les ganglions myentériques des patients Crohn en comparaison des patients contrôles.



Short Communication

T cells show preferential adhesion to enteric neural cells in culture and are close to neural cells in the myenteric ganglia of Crohn's patients



Julie Pabois, Tony Durand, Catherine Le Berre, Jacques Gonzales, Michel Neunlist,
Arnaud Bourreille, Philippe Naveilhan*, Isabelle Neveu

Université de Nantes, Inserm, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, Nantes, France

A B S T R A C T

Plexitis in the proximal margin of intestinal resections are associated with post-operative recurrence of Crohn's disease. To understand their formation, *in vitro* analyzes were performed. T cells adhered preferentially to neuron and glial cells in mixed primary cultures of enteric nervous system and T cell activation increased their adhesion capacity. Higher number of T lymphocytes in close proximity to enteric glial cells was also observed in the myenteric ganglia of Crohn's patients as compared to control. These data show that close proximity between lymphocytes and enteric neural cells exists and may contribute to the formation of plexitis.

1. Introduction

The enteric nervous system (ENS) is the intrinsic nervous system contained within the gastrointestinal tract. Composed of enteric neurons and glial cells (EGC), the ENS is organized into two major ganglionated plexi, the submucosal and the myenteric plexus. It is well established that enteric neurons and EGC are major regulators of motor and barrier functions (Bush et al., 1998; Furness, 2012; Neunlist et al., 2013; Rao et al., 2017). Much less is known about their active implication in the regulation of the gastrointestinal immune functions.

Close proximity of immune cells like plasma cells, macrophages, mast cells, eosinophils or T lymphocytes to nerve structures has been reported in patients with Crohn's disease since decades (Dvorak et al., 1980; Dvorak and Silen, 1985; Geboes et al., 1992). Mast cells and macrophages were also observed in apposition to nerve in the enteric plexus of non-lesioned animals (Newson et al., 1983; De Schepper et al., 2018) and early accumulation of T cells was observed in enteric ganglia in animal models of colitis (Pontell et al., 2009). Whether the enteric neural cells have an active role in the invasion of intestinal nerve structures by the immune cells remains to decipher but it has been shown that enteric neurons and glial cells can secrete neurotrophic factors, neuropeptides and neurotransmitters to which immune cells are sensitive (Margolis and Gershon, 2016; Yoo and Mazmanian, 2017).

Importantly, the secretion of GDNF by EGC was shown to regulate a subpopulation of innate lymphoid cells (ILC3) that reduces the susceptibility of mice to develop colitis (Ibiza et al., 2016). Other studies suggest that the ENS can also be a major source of cytokines or chemokines that could contribute to intestinal inflammation either directly or by modulating immune cell functions and phenotypes (Rühl et al., 2001; Tixier et al., 2005; Coquenlonge et al., 2014). Altogether, these observations emphasize the need of better characterizing and studying the neuro-immune interactions during intestinal inflammation, and in particular in inflammatory bowel diseases (IBD).

IBD are chronic inflammatory bowel diseases encompassing ulcerative colitis and Crohn's disease (Wallace et al., 2014). They are characterized by phases of relapse-remission, and due to severe complications such as fistulae, ulcer and obstruction, most patients undergo one or several surgeries through their life (Thia et al., 2010; Frolkis et al., 2013). To optimize their medical treatment and limit recurrence, predictive markers of post-operative recurrence are currently under investigation. As several studies have identified the presence of plexitis in the proximal margin of intestinal resections as a powerful tool to predict recurrence (Ryan et al., 2019), the accumulation of immune cells in and around the nerve enteric ganglia or bundle, has been recognized as a marker of post-operative recurrence in case of Crohn's disease (Gionchetti et al., 2017). Attempts to characterize the plexitis

Abbreviations: ActT, Activated T Lymphocytes; BD, Becton & Dickinson Biosciences; CD, Cluster of Differentiation; CFSE, CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester; Cp, Close proximity; Ctrl, control; ENS, Enteric Nervous System; EGC, Enteric Glial Cells; FCS, Fetal Calf Serum; GDNF, Glial cell line-Derived Neutrophic Factor; IBD, inflammatory bowel disease; IL, Interleukin; ILC3, Innate Lymphoid Cells type 3; MHC, Major Histocompatibility Complex; NCp, Not in close proximity clo; SA, Sigma-Aldrich; T, Non-activated T lymphocytes; TF, ThermoFisher

* Corresponding author at: INSERM UMR 1235, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex, France.

E-mail address: Philippe.naveilhan@univ-nantes.fr (P. Naveilhan).

<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577422>

Received 12 May 2020; Received in revised form 19 September 2020; Accepted 1 October 2020

Available online 07 October 2020

0165-5728/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

describe the presence of mast cells, eosinophils and T lymphocytes infiltrating the submucosal and/or myenteric plexus (Bressenot et al., 2013; Decousus et al., 2016; Ferrante et al., 2006; Lemmens et al., 2017; Milassin et al., 2017; Misteli et al., 2015; Sokol et al., 2009). However, little is known about the enteric neural cells involved in plexitis. Therefore, we explored the capacity of T lymphocytes to interact with enteric glial cells and neurons *in vitro* and *in vivo*.

2. Methods

2.1. Animals

Three-month-old and E15 pregnant female Sprague-Dawley rats (Janvier Laboratories, Le Genest-St-Isle, Fr) were housed in a 12-h light/dark cycle with *ad libitum* access to food and water. The experiments were carried out in strict accordance with the recommendations of the Animal Care and Use Committee of Nantes (France). Animals were anesthetized with isoflurane and sacrificed by cervical dislocation.

2.2. Preparation and staining of T lymphocytes

For each independent experiment, the T lymphocytes were purified from the spleen of one rat as previously described (Bonnamain et al., 2012). Briefly, the splenocytes were collected from the spleen by filtration through 100 µm nylon mesh filter, followed by the depletion of red blood cells. Then, splenocytes were counted and T cells were purified by negative sorting using anti-NKR-P1A (0.7 µg/mL, Thermo Fisher (TF), Waltham, US), anti-CD45RC (1 µg/mL, BD Biosciences (BD), San Jose, CA, US) and anti-CD11b/c (0.5 µg/mL, BD) antibodies associated with anti-mouse IgG coated Dynabeads (TF). T lymphocytes were cultivated in complete RPMI medium composed of RPMI 1640 (TF) supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (FCS ; Eurobio, Paris, Fr), 2 mM L-glutamine (TF), 1% non-essential amino acids (TF), 1 mM HEPES buffer (TF), 1 mM sodium pyruvate (TF), 100 U/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin (TF). Activation of T lymphocytes was performed by incubating the cells for three days in wells pre-coated with anti-CD3 antibodies (1 µg/mL, BD) in complete RPMI medium supplemented with anti-CD28 antibodies (2.5 µg/mL, BD) and 1 µM of 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich (SA), St-Louis, US).

Before the co-cultures, T lymphocytes were counted and labeled with carboxyfluorescein-succinimidyl-ester (CFSE, TF) according to the manufacturer's protocol. After 5 min of incubation with 5 µM of CFSE at RT, the reaction was stopped by adding FCS, and the cells were washed two times with RMPI. For the time-lapse experiments, T cells were labeled with Hoechst-33342 (TF) prior their addition to the cultures of ENS cells. The staining was performed by incubating the T cells with 1 µg/mL of Hoechst-33342 during 30 min at 37 °C, followed by two washes with RMPI.

2.3. Mixed primary cultures of enteric nervous system

Primary ENS cultures were prepared from E15 rat embryos as reported previously (Chevalier et al., 2008). Briefly, the intestines were isolated, minced with scissors and digested for 15 min at 37 °C with 0.1% (w/vol) trypsin (SA) in -DMEM-F12 (1:1) (TF). FCS (10%) and 0.01% (w/vol) of DNase (SA) was added. After 10 min of incubation at 37 °C, the cells were isolated by mechanical dissociation and seeded at 2.4×10^5 cells per cm² on gelatin pre-coated plates in DMEM-F12 (1:1) supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin. The FCS-supplemented medium was then replaced by a serum-free medium composed of DMEM-F12 (1:1) supplemented with 1% of N2 (TF), 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin. Half of the supernatant was replaced twice per week. Cells were used for the co-culture experiments after twelve days of culture.

2.4. Co-cultures

Activated or non-activated CFSE-labeled T lymphocytes (30,000 per well in 48-well plate) were added to the primary ENS cultures and incubated for two hours at 37 °C. The supernatant was gently removed. The plates were then carefully washed five times with warmed medium to eliminate the floating cells, fixed by 4% paraformaldehyde in PBS (vol/vol, ROTH Sochiel E.U.R.L, Lauterbourg, Fr) for 10 min and stored in PBS-azide at 4 °C until use.

2.5. Immunocytochemistry

Fixed co-cultures were incubated for 2 h at room temperature (RT) in PBS supplemented with 5% (vol/vol) horse serum (TF) and 0.1% (vol/vol) triton X-100 (SA). Cells were then stained with mouse IgG2a anti-SMA (1/500, Abcam, Paris, Fr), mouse IgG2b anti-HuC/D (1/500, TF), mouse anti-PGP9.5 (1/1000, TF) or rabbit anti-S100β (1/1000, Dako Agilent, Santa Clara, US) antibodies in PBS supplemented with 5% horse serum. After 12 h at 4 °C, the cells were washed and incubated for 2 h at RT with conjugated goat anti-mouse IgG (1/500, Jackson ImmunoResearch, JIR, Baltimore, US), goat anti-mouse IgG2a (1/500, JIR), goat anti-mouse IgG2b (1/500, JIR) and goat anti-Rabbit IgG (1/500, JIR). Nuclei were stained with DAPI (1 µg/mL, SA).

Micrographs were taken using confocal microscope Nikon A1 RSi (Nikon SAS, Champigny sur Marne, Fr) or IN Cell Analyzer 2200® (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, Fr).

The surface covered by the enteric neurons and glial cells was estimated automatically by the Developper Toolbox software (GE Healthcare Lifesciences) based on the intensity of PGP9.5 and S100β staining, respectively. As neuronal and glial staining often overlap, the total neural cell surface was calculated as followed: (surface covered by PGP9.5⁺ staining + surface covered by S100β⁺ staining) – (surface covered by both PGP9.5⁺ and S100β⁺ staining).

2.6. Immunohistochemistry

Transmural paraffin sections (5 µm) were prepared from the proximal margin of ileocolonic resections of patients with Crohn's disease ($n = 10$) or control ($n = 5$) (Anatomical pathology department, CHU of Nantes, France). For control patients, sections were performed away from the tumor tissue. Sections were deparaffined by incubating the slides in two successive baths of xylene (2 × 7 min), then in three successive baths of ethanol (100% - 5 min, 95% - 4 min, 70% - 3 min). After two baths of distilled water (2 × 2 min), sections were incubated in antigen retrieval solution (10 mM Trizma base, 1 mM EDTA, pH 9) during 90 s at 110 °C in a deckloaking chamber (DC2012-220 V, Biocare Medical). The sections were washed three times for one hour in the antigen blocking solution (Dako) before their incubation during 12 h at 4 °C with mouse anti-CD3 (1/100, Dako Agilent) associated with rabbit anti-HuD (1/500, Santa Cruz Biotechnology, Texas, US) or rabbit anti-S100β (1/1000, Dako Agilent) diluted in the Dako diluent (Dako Agilent). After several washes, the sections were incubated for one hour with Cy5-conjugated anti-mouse IgG (1/500, Invitrogen) and Cy3-conjugated anti-rabbit IgG (1/500, JIR) at RT and washed. The sections were then counterstained with DAPI, mounted in Prolong (TF) and viewed under a Zeiss AxioZoom.V16 fluorescent microscope with Apotome structured illumination module for optical sectioning (Zeiss, Oberkochen, D).

2.7. Cell counting

2.7.1. Co-cultures of rat T cells and enteric neural cells

T cells in close proximity (no black pixel between the different staining and/or on the top of PGP-9.5⁺ or S100β⁺ cells) were counted on the micrographs (pixel size: 0.324 µm) taken by the In Cell Analyzer. Each experiment was performed on independent cultures of ENS and T

cells. For each independent experiment, each condition was replicated in three wells and a minimum of 200 T cells was analyzed per well. The median values of the triplicate of independent experiments (n) were used to perform the statistical analyses.

2.7.2. Human transmural sections

The CD3 $^{+}$ T cells observed in close proximity or on the top of Hu $^{+}$ or S100 β $^{+}$ cells were counted on micrographs (pixel size: 0.413 μm) taken by the Axio Zoom.V16® (Zeiss, Oberkochen, D). The whole interface between circular and longitudinal muscle cell layers was visualized, and images were taken when stained ENS cells were observed. The number of T cells in close proximity with enteric neurons or EGC was then expressed in mean number of T cells per ganglia or per cells, respectively.

2.8. Time-lapse

To analyze the dynamic interactions between T lymphocytes and neural cells, activated T cells were labeled with CFSE or Hoechst-33342 and added (30,000 T cells/well) to ENS primary cultures. Then, the co-cultures were (1) immediately analyzed by time-lapse for two hours ($n = 3$), or (2) incubated for forty minutes, carefully washed four times to remove the non-adherent cells and then analyzed by time-lapse for eighty minutes (giving a total of two hours of co-cultures) ($n = 3$). Time-lapse recording (one image/min) was performed at 37 °C under 4% CO₂ using the In Cell 2200® Analyzer. Three fields per well were recorded in three wells for each independent experiment and analyzed.

2.9. Statistics

Results were presented as mean $+/-$ standard error of the mean (SEM) and analyzed with the non-parametric Mann-Whitney 2-sided U test using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, US). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3. Results

3.1. T cells are in close proximity to enteric neurons and EGC in mixed primary cultures of ENS

To analyze the interactions between enteric neural cells and T lymphocytes, mixed primary cultures of ENS were cultured for 12 days and activated T cells were added to the ENS cultures. Dynamic of the cell interactions was analyzed by time-lapse. After the addition of activated T cells to the ENS cultures, bright-field images were immediately captured every minute for two hours. In the movies, we observed that after sedimentation, T cells did not move far from their original position during the two hours of co-cultures, but part of them extend cytoplasmic processes on the underlying cell layer (Movie 1). Interestingly, active “scanning-like” behavior was observed with sometimes apparent attempt to penetrate into the ENS cell layer (movie 2). To show that T cells adhere to ENS cultures, a second set of experiments was performed in which activated T cells stained with Hoechst were co-cultivated for 40 min with ENS cultures before four careful washes. Then, the co-cultures were analyzed by time-lapse for 80 min. A lower amount of T cells was observed in these co-cultures, but their behavior was similar presenting a “scanning-like” movement rather than an “on/off” adhesion (movie 3).

To characterize these cultures, triple immunocytochemistry was performed using antibodies against S100 β (EGC), HuC/D (neurons) and SMA (smooth muscle cells). As illustrated in the Figs. 1A-D, the entire surface of the wells was covered by a layer of SMA-positive cells. On the top of this layer, ganglia of Hu-positive cells surrounded by S100-positive cells were clearly observed. Analyzes by confocal microscopy showed that the neurons were positioned on the top of EGC and muscle cell layers (Fig. 1E). These cultures were used to determine whether T

lymphocytes were able to interact with enteric neural cells. For this purpose, rat T lymphocytes were stained with CFSE and added to the mixed primary cultures of ENS. After two hours of co-culture, CFSE-positive cells were found to be adherent to the ENS cell layers. To analyze these interactions, the supernatants were removed and the cultures were carefully washed five times with warmed medium to eliminate the floating cells. The cultures were then fixed and double immunocytochemistry was performed with antibodies against PGP9.5 (neurons) and S100 β (EGC). Microscopy analyzes revealed that numerous adherent CFSE-positive cells are located in close proximity to PGP9.5- and/or S100 β -positive staining (Fig. 1F). Z-reconstruction of confocal images confirmed the close proximity of T lymphocytes to PGP9.5-positive neurites, S100 β -positive cells or both in primary ENS cultures (Fig. 1G-I).

3.2. Activation of T lymphocytes increases their capacity to adhere to the ENS cultures

Activation of immune cells leads to rapid behavioral changes which may modify their capacity to interact with the three types of cells present in the mixed primary ENS culture. To evaluate this point, T lymphocytes were activated or not with anti-CD3/anti-CD28 antibodies for three days, next stained with CFSE and co-cultivated for two hours with mixed primary ENS cultures. After the elimination of floating T lymphocytes, the number of total adherent CFSE-positive cells was counted. As shown in the Fig. 2A, the number of total adherent activated T lymphocytes per mm² of culture was significantly increased by 2.28 fold compared to non-activated T lymphocytes indicating that T cell activation increased their general capacity to adhere to mixed primary ENS cultures. Since 30,000 non-activated or activated T cells were added to the ENS cultures, the percentages of adherent T cells after two hours of co-culture were 5.2% $+/-$ 1.01 and 11.88% \pm 1.9, respectively (Fig. 2B). To further explore the interactions of T lymphocytes with enteric neural cells, the co-cultures were immunostained with antibodies against neural markers and the number of T lymphocytes in close proximity to PGP9.5- or S100 β -positive cells was quantified as described in the methods sections. The number of activated T lymphocytes in close proximity to enteric neurons and glial cells was 2.4-fold higher than the number of non-activated T lymphocytes (Fig. 2C).

No obvious sign of ENS degeneration was observed in the presence of non-activated or activated T lymphocytes during time-lapse analyze or in the immunostained co-cultures.

3.3. T lymphocytes preferentially adhere to enteric neural cells in mixed primary cultures of ENS

In the mixed primary ENS cultures, adherent T lymphocytes were often observed close to neural ganglia or interganglionic fibers. Therefore, quantitative analyzes were performed to determine whether T lymphocytes preferentially adhere to neurons and glial cells in cultures composed of enteric neural cells and smooth muscle cells. They revealed that 72.9% $+/-$ 2.1 of non-activated T lymphocytes (Fig. 2D) and 76.3% $+/-$ 3.9 of activated T lymphocytes (Fig. 2E) were observed in close proximity to PGP9.5- and/or S100 β -positive cells (mean $+/-$ SEM). These percentages were all the more remarkable that the area occupied by both neural cell types were less than 50% of the total well surface. Indeed, PGP9.5- and S100 β -positive cells occupied 26.8% $+/-$ 2.1 and 32.6% $+/-$ 2.2 of the surface area, respectively, but the total area covered by both neural cell types was estimated at only 46.5% $+/-$ 2.9 due to neuron and EGC overlapping (Fig. 2F). These data suggest privileged proximity of T lymphocytes with neural cells and according to the statistical analyzes, T cell activation had no effect on this preferential adhesion in mixed primary ENS cultures ($p = 0.67$). To determine whether T lymphocytes preferentially interact with one type of neural cells, we quantified the number of T cells in close

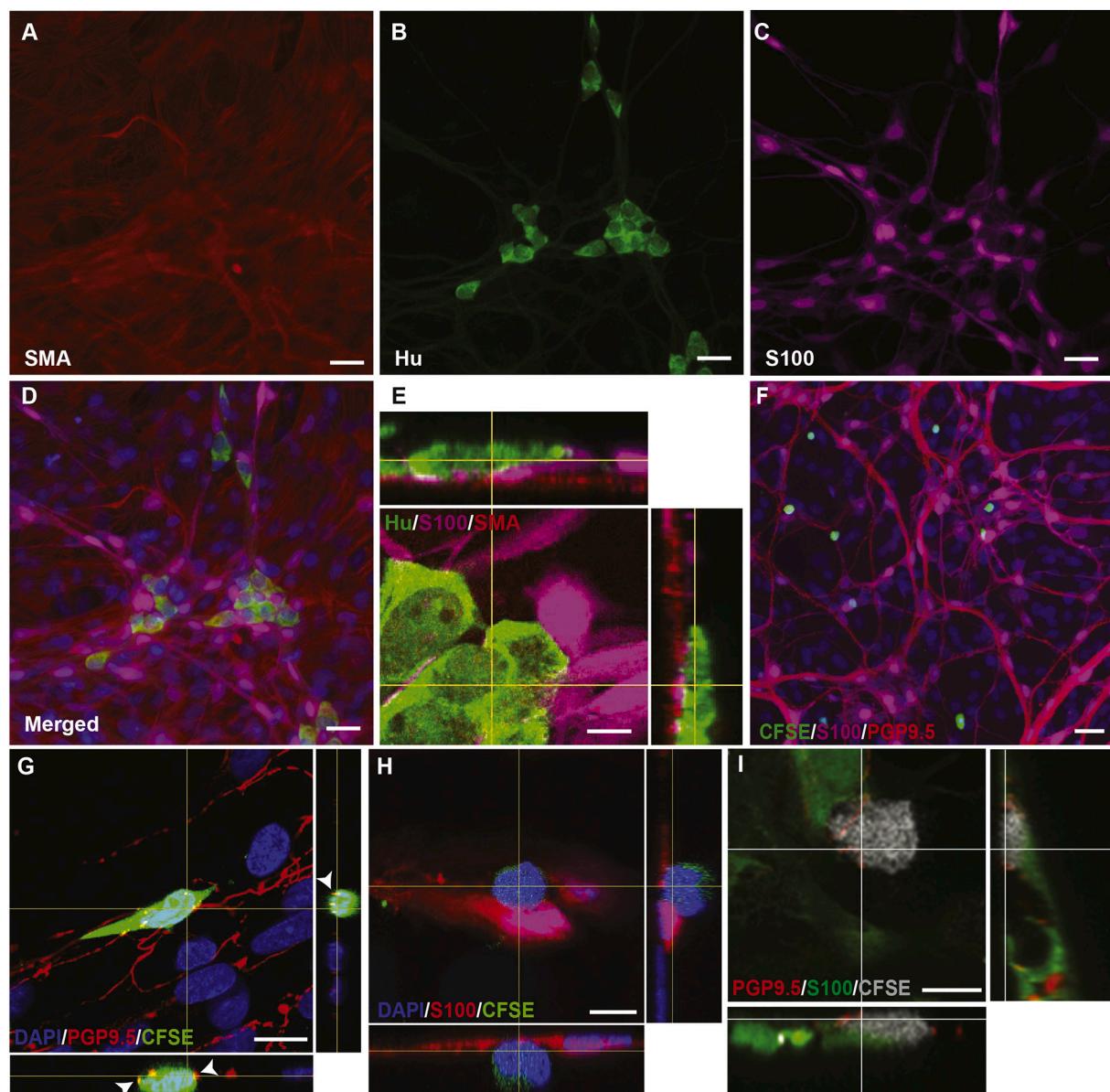


Fig. 1. Characterization of mixed primary ENS cultures and visualization of T lymphocyte adhesion after two hours of co-culture. **A-D:** Primary cultures of rat ENS stained by antibodies against SMA (red), Hu (green) and S100 β (purple). **E:** Z-reconstruction of confocal micrographs of primary cultures of rat ENS after triple immunostaining with Hu, S100 β and SMA antibodies showing the cell organization in ganglia. **F:** Representative view of T lymphocyte adhesion after two hours with mixed primary ENS cultures. Neural cells were stained with PGP9.5 (red) and S100 β (purple) while T lymphocytes were labeled with CFSE (green). **G, H:** Z-reconstruction of confocal micrographs showing a close proximity of CFSE-labeled T cells (green) to PGP9.5+ neurons (G) or S100 β + EGC (H) (red). **I:** Z-reconstruction of confocal micrographs showing a CFSE+ T cell (white) in close proximity to both PGP9.5+ neurons (red) and S100 β + EGC (green). Nuclei were counterstained with DAPI (Blue). Confocal Z sectioning: 0.5 μ m; size pixel: 0.14 μ m. Scales bars A-D, F: 30 μ m; E, H: 10 μ m and G, I: 15 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

proximity only to PGP9.5, only with S100 β cells or with both cell types. The results indicate that over 90% of the non-activated T lymphocytes (91.3% +/- 1.03; Fig. 2G) and activated T lymphocytes (93.9% +/- 1.9; Fig. 2H) were in close proximity to both neurons and EGC.

3.4. T cells are in close proximity to both neurons and glial cells in the myenteric ganglia of patients with Crohn's disease

Finally, investigations were carried out to determine whether T lymphocytes can interact with EGC and enteric neurons in patients during Crohn's disease. For this purpose, transmural paraffin sections were prepared from the proximal margin of ileocolonic resections of patients with Crohn's disease. Anti-CD3 immunohistochemistry

combined with hematoxylin-eosin staining showed that T cells were present in and around the myenteric ganglia (Fig. 3A) as previously reported. Serial sections were then stained with anti-CD3 combined with anti-HuD or anti-S100 β antibodies. Apoptome imaging revealed the presence of T cells in close proximity to EGC (Fig. 3B) and enteric neurons (Fig. 3C) within the myenteric ganglia. In the submucosal plexus, T cells were clearly present around the submucosal ganglia (less than 20 μ m) in all the patients, but close proximity of CD3 cells to S100 β - or Hu-positive cells was rarely observed (Fig. 3D-E).

To quantify the T cells in close proximity to neurons and/or EGC in the myenteric ganglia, the number of CD3 cells was determined in the intestinal resections from ten patients with Crohn's disease and five patients with colorectal cancer. The mean number of T cells in close

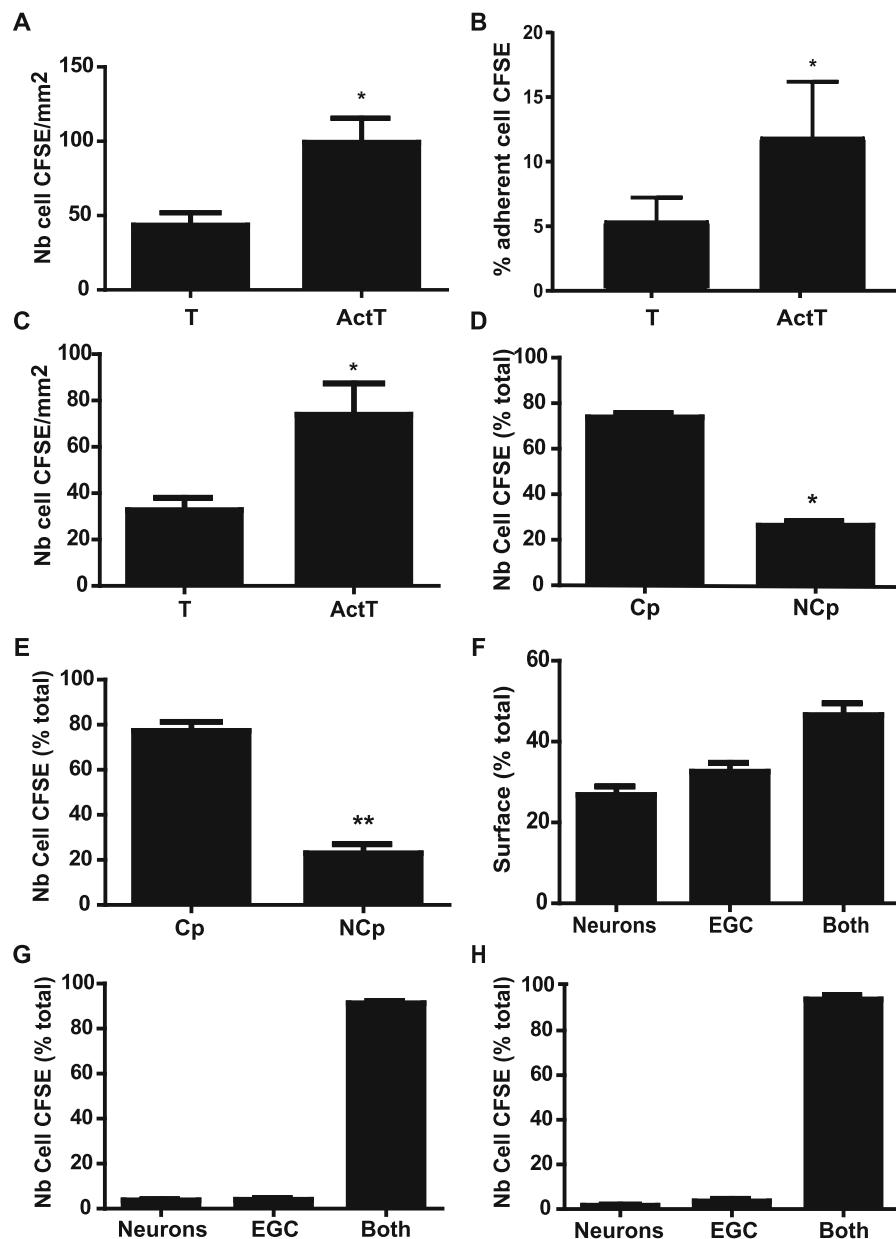


Fig. 2. Quantitative analyze of non-activated (T) and activated T lymphocyte (ActT) adhesion on primary ENS cultures after two hours of co-culture. **A:** Number of total adherent non-activated (T) or activated T lymphocytes (ActT) per mm² of cell culture. **B:** Percentage of non-activated T lymphocytes (T) or activated T lymphocytes (ActT) adherent to all cell types in the ENS cultures after two hours of co-culture. The percentage is expressed relative to the number of T cells added to the ENS cultures. **C:** Number of non-activated (T) or activated T lymphocytes (ActT) in close proximity with S100 β ⁺ (EGC) or PGP9.5⁺ (Neurons) cells per mm² of culture. **D-E:** Percentage of non-activated (D, n = 4) or activated T lymphocytes (E, n = 5) in close proximity (Cp) or not (NCp) to EGC and/or neurons. Percentage is expressed relative to the total number of adherent T lymphocytes. **F:** Percentage of the surface covered by PGP9.5⁺ cells, S100 β ⁺ cells or both (PGP9.5 + S100 β - 100% overlay) in primary ENS cultures (n = 8). **G-H:** Percentage of non-activated (F, n = 4) and activated T lymphocytes (G, n = 5) in close proximity only with neurons (PGP9.5⁺), only with EGC (S100 β ⁺) or with both cell types (Both). Data were expressed as mean +/− SEM. Statistics: Mann-Whitney U test; *, p < 0.05; **, p < 0.01.

proximity to neurons was not significantly different in the myenteric ganglia of patients with Crohn's disease or cancer (Fig. 3-G). However, the mean number of T cells in close proximity with EGC per ganglion was significantly higher in patients with Crohn's disease (3.9 ± 0.89) as compared to patients with cancer (1.35 ± 0.12 , $p = 0.026$) (Fig. 3-F).

4. Discussion

Accumulation of immune cells within and around the enteric nervous plexus is observed in Crohn's disease and the presence of enteric plexitis in the proximal margin of intestinal resection is a marker of post-operative recurrence (Ferrante et al., 2006; Gionchetti et al., 2017). The localization (submucosal or myenteric) and the type of immune cells described in the enteric plexitis vary but T lymphocytes are regularly observed (Bressenot et al., 2013; Decousus et al., 2016; Ferrante et al., 2006; Lemmens et al., 2017; Milassin et al., 2017; Misteli et al., 2015; Sokol et al., 2009). In contrast, nothing is known about the enteric neural cells involved in plexitis and whether plexitis play a role in Crohn's disease or are a mere epiphenomenon of T cell infiltration within the gut during inflammation. In order to address

these issues, a first major step is to better characterize the nature of plexitis and in particular, whether close proximity exists between enteric neural cells and T cells. In this general context, our study brings novel insights by demonstrating that T lymphocytes are in close proximity to S100 β -positive EGC and Hu-positive enteric neurons in the myenteric ganglia of patients with Crohn's disease. Such cell arrangements could be also detected in tumor-free transmural sections of patients with cancer, but the number of T cells in close proximity to EGC in the myenteric ganglia was significantly higher in patients with Crohn's disease. In the present work, the number of T cells in close proximity to enteric neurons was not significantly different in patients with cancer or Crohn's disease, but such an observation should be verified with a larger cohort of patients. T cells were also present around the submucosal ganglia of patients with Crohn's disease but close vicinity of T cells with neural cells in these ganglia was rare in the analyzed sections.

In the present paper, we also demonstrate that T lymphocytes adhere to ENS culture and are preferentially in close proximity to neural cells in mixed primary cultures containing EGC, enteric neurons and smooth muscle cells. The mechanism of these neuro-immune

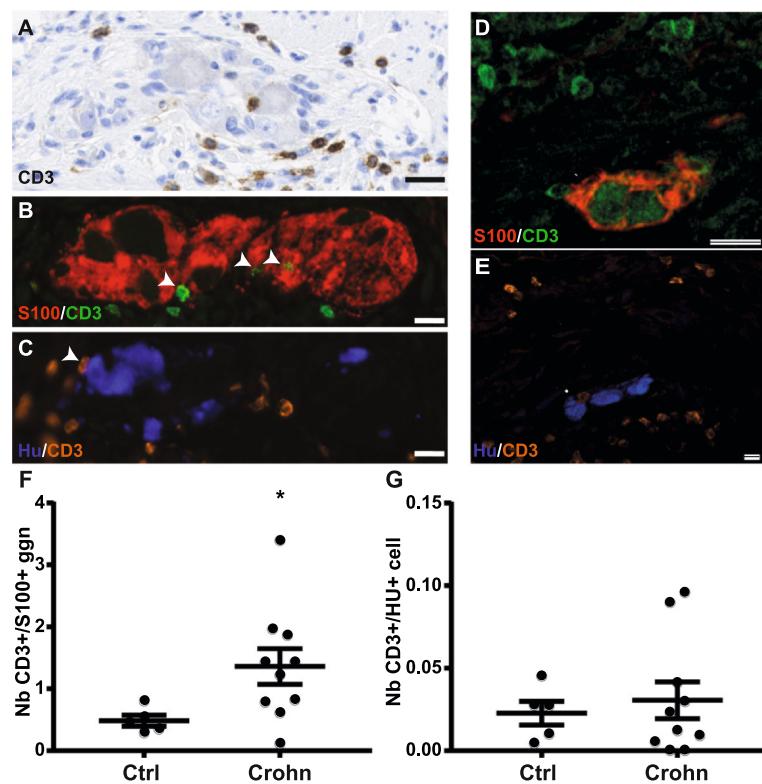


Fig. 3. T cell plexitis in enteric ganglia of patients with Crohn's disease. **A:** Visualization of T cells in myenteric ganglia after staining with anti-CD3 antibodies (brown) and hematoxylin-eosin. **B-C:** Serial sections of the myenteric ganglia double stained with anti-CD3 (green) / anti-S100 β (red) antibodies (**B**) or anti-CD3 (orange) / anti-HuD (blue) antibodies (**C**). **D-E:** Serial sections of the submucosal ganglia double stained with anti-CD3 (green) / anti-S100 β (red, **D**) or anti-CD3 (orange) / anti-HuD (blue, **E**) antibodies. **F:** Number of CD3 $^{+}$ T cells per myenteric ganglia (ggn) in close proximity to EGC (S100 β +). **G:** Number of CD3 $^{+}$ T cells per neuron (Hu $^{+}$) in close proximity with the cell body of enteric neurons. The quantitative analyzes were performed on intestinal tumor-free resections from five patients with colorectal cancer (ctrl) and ten patients with Crohn's disease (Crohn). Data were expressed as mean +/- SEM. Statistics: Mann-Whitney U test; *, p < 0.05. Scale bar: A, 25 μ m; B-D, 20 μ m; E, 15 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

interactions remains to be deciphered but according to different studies, enteric neurons and EGC are capable of producing adhesion molecules and chemoattractant factors. Thus, increased levels of ICAM-1 and eotaxin-3 transcripts were observed in the enteric neural ganglia of patients with inflammatory bowel disease (Smyth et al., 2013). On the other hand, Burgueño et al. showed that rat enteric neurons produced and released the monocyte chemoattractant protein MCP-1 in the rat ENS cultures (Burgueño et al., 2016). An expression of MCP1 mRNA was also reported in primary mouse EGC after IL-1 β exposure (Stoffels et al., 2014). In organotypic cultures derived from human intestinal biopsies, a production of IL-8 was observed in enteric neurons when ENS cells were co-cultivated with toxin-B pretreated epithelium (Tixier et al., 2005). This is of great interest as IL-8 derived from the neuron-like cells NT2-N induces the chemoattraction of peripheral blood mononuclear cells (Tixier et al., 2006). As IL-1 β is implicated in the production of these chemoattractant mediators, future analyzes should take into account the inflammatory environment when studying the interactions between T lymphocytes and enteric neural cells. In this regards, inflammatory conditions are all the more important to consider as they favor the production of metalloproteinases by macrophages or EGC (Pender et al., 2006; Lin et al., 2007) which in turn, may participate to extracellular remodeling and favor the penetration of T cells into the myenteric ganglia through the ganglionic sheet.

Studies on glial cells from the central nervous system are also of great interest as they show that interactions between astrocytes and T lymphocytes have an important role in the presentation of antigens (Fontana et al., 1984; Barcia et al., 2008) and in the regulation of T cell activation/proliferation (Wekerle et al., 1987; Gimsa et al., 2004). Interestingly, using a mice model of experimental autoimmune encephalomyelitis, Filipello et al. have recently described a contact-dependent bidirectional mechanism between astrocytes and T lymphocytes that favor the differentiation of T cells toward an immunosuppressive phenotype (Filipello et al., 2016). These observations strengthen the importance of close interactions between glial cells and T lymphocytes in the development and regulation of immune and/or inflammatory responses. Finally, it would be interesting to determine

whether these close interactions between T lymphocytes and EGC induce changes and lead to functional modifications in both immune and neural cells as reported for the interactions between muscularis macrophages and enteric neurons (Muller et al., 2014) as well as for EGC and ILC3 (Ibiza et al., 2016).

5. Conclusion

The demonstration that T lymphocytes preferentially adhere to neural cells in mixed primary ENS cultures raises new perspectives for understanding the development and establishment of plexitis in patients with Crohn's disease. Identifying the molecular actors and pathways involved in these mechanisms may also serve to determine the functional consequences of T cell - ENS cell interactions, and in particular whether adhesion of T lymphocytes to enteric neural cells could participate to the evolution of inflammatory bowel diseases.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577422>.

Acknowledgements

J. Pabois was supported by a fellowship from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. This work was supported by the region "Pays de la Loire" (2012-13456). The authors thank the MicroPicell platform of SFR Bonamy (Nantes, Fr), in particular Philippe Hulin, for their help in confocal microscopy.

The authors declare no financial nor personal interest.

References

- Barcia, C., Sanderson, N.S.R., Barrett, R.J., Wawrowsky, K., Kroeger, K.M., Puntel, M., Liu, C., Castro, M.G., Lowenstein, P.R., 2008. T cells' immunological synapses induce polarization of brain astrocytes in vivo and in vitro: a novel astrocyte response mechanism to cellular injury. *PLoS One* 3, e2977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002977>.
- Bonnamain, V., Mathieu, E., Thinard, R., Thebault, P., Nerriere-Daguin, V., Leveque, X., Anegon, I., Vanhove, B., Neveu, I., Naveilhan, P., 2012. Expression of Heme Oxygenase-1 in neural stem/progenitor cells as a potential mechanism to evade host

- immune response. *Stem Cells* 30, 2342–2353. <https://doi.org/10.1002/stem.1199>.
- Bressenot, A., Chevaux, J.-B., Williet, N., Oussalah, A., Germain, A., Gauchotte, G., Wissler, M.-P., Vignaud, J.-M., Bresler, L., Bigard, M.-A., Plénat, F., Guéant, J.-L., Peyrin-Biroulet, L., 2013. Submucosal plexitis as a predictor of postoperative surgical recurrence in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 1654–1661. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e318281f336>.
- Burgueño, J.F., Barba, A., Eyre, E., Romero, C., Neunlist, M., Fernández, E., 2016. TLR2 and TLR9 modulate enteric nervous system inflammatory responses to lipopolysaccharide. *J. Neuroinflammation* 13, 187. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0653-0>.
- Bush, T.G., Savidge, T.C., Freeman, T.C., Cox, H.J., Campbell, E.A., Mucke, L., Johnson, M.H., Sofroniew, M.V., 1998. Fulminant jeuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93, 189–201.
- Chevalier, J., Derkinderen, P., Gomes, P., Thinhard, R., Naveilhan, P., Vanden Berghe, P., Neunlist, M., 2008. Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J. Physiol. London* 586, 1963–1975. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.149815>.
- Coquenlorge, S., Duchalais, E., Chevalier, J., Cossais, F., Rolli-Derkinderen, M., Neunlist, M., 2014. Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system. *J. Neuroinflammation* 11, 202. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0202-7>.
- De Schepper, S., Verheyden, S., Aguilera-Lizarraga, J., Viola, M.F., Boesmans, W., Stakenborg, N., Voytyuk, I., Schmidt, I., Boeckx, B., Dierckx de Casterlé, I., Baekelandt, V., Gonzalez Dominguez, E., Mack, M., Depoortere, I., De Strooper, B., Sprangers, B., Himmelreich, U., Soenen, S., Guilliams, M., Vanden Berghe, P., Jones, E., Lambrechts, D., Boeckxstaens, G., 2018. Self-maintaining gut macrophages are essential for intestinal homeostasis. *Cell* 175 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.048>. 400–415.e13.
- Decousus, S., Boucher, A.-L., Joubert, J., Pereira, B., Dubois, A., Goutorbe, F., Déchelotte, P.J., Bommelaer, G., Buisson, A., 2016. Myenteric plexitis is a risk factor for endoscopic and clinical postoperative recurrence after ileocolonic resection in Crohn's disease. *Dig. Liver Dis.* 48, 753–758. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2016.02.023>.
- Dvorak, A.M., Silen, W., 1985. Differentiation between Crohn's disease and other inflammatory conditions by electron microscopy. *Ann. Surg.* 201, 53–63.
- Dvorak, A.M., Osage, J.E., Monahan, R.A., Dickersin, G.R., 1980. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies III. Target tissues. Proliferation of and injury to smooth muscle and the autonomic nervous system. *Hum. Pathol.* 11, 620–634. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(80\)80073-6](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(80)80073-6).
- Ferrante, M., de Hertogh, G., Hlavaty, T., D'Haens, G., Penninckx, F., D'Hoore, A., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Geboes, K., van Assche, G., 2006. The value of myenteric plexitis to predict early postoperative Crohn's disease recurrence. *Gastroenterology* 130, 1595–1606. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.02.025>.
- Filipello, F., Pozzi, D., Projetti, M., Romagnani, A., Mazzitelli, S., Matteoli, M., Verderio, C., Grassi, F., 2016. Ectonucleotidase activity and immunosuppression in astrocyte-CD4 T cell bidirectional signaling. *Oncotarget* 7, 5143–5156. <https://doi.org/10.18633/oncotarget.6914>.
- Fontana, A., Fierz, W., Wekerle, H., 1984. Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature* 307, 273–276. <https://doi.org/10.1038/307273a0>.
- Frolkis, A.D., Dykeman, J., Negrón, M.E., DeBruyn, J., Jette, N., Fiest, K.M., Frolkis, T., Barkema, H.W., Rioux, K.P., Panaccione, R., Ghosh, S., Wiebe, S., Kaplan, G.G., 2013. Risk of surgery for inflammatory bowel diseases has decreased over time: a systematic review and meta-analysis of population-based studies. *Gastroenterology* 145, 996–1006. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.07.041>.
- Furness, J.B., 2012. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 286–294. <https://doi.org/10.1038/ngastro.2012.32>.
- Geboes, K., Rutgeerts, P., Ectors, N., Mebis, J., Penninckx, F., Vantrappen, G., Desmet, V.J., 1992. Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. *Gastroenterology* 103, 439–447.
- Gimsa, U., Ören, A., Pandiyar, P., Teichmann, D., Bechmann, I., Nitsch, R., Brunner-Weinzierl, M.C., 2004. Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T helper cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152). *J. Mol. Med.* 82, 364–372. <https://doi.org/10.1007/s00109-004-0531-6>.
- Gionchetti, P., Dignass, A., Danese, S., Magro Dias, F.J., Rogler, G., Lakatos, P.L., Adamina, M., Ardizzone, S., Buskens, C.J., Sebastian, S., Laureti, S., Sampietro, G.M., Vucelic, B., van der Woude, C.J., Barreiro-de Acosta, M., Maaser, C., Portela, F., Vavricka, S.R., Gomollón, F., ECCO, 2017. 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and Management of Crohn's disease 2016: part 2: surgical management and special situations. *J Crohns Colitis* 11, 135–149. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jiw169>.
- 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., Eberl, G., Grice, E.A., Veiga-Fernandes, H., 2016. Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature* 535, 440–443. <https://doi.org/10.1038/nature18644>.
- Lemmens, B., de Buck van Overstraeten, A., Arijs, I., Sagaert, X., Van Assche, G., Vermeire, S., Tertychnyy, A., Geboes, K., Wolthuis, A., D'Hoore, A., De Hertogh, G., Ferrante, M., 2017. Submucosal Plexitis as a Predictive Factor for Postoperative Endoscopic Recurrence in Patients with Crohn's Disease Undergoing a Resection with ileocolonic. Results from a Prospective Single-centre Study. *J Crohns Colitis, Anastomosis*. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw135>.
- Lin, T., Zhang, W., Fan, Y., Mulholland, M., 2007. Interleukin-1beta and interleukin-6 stimulate matrix metalloproteinase-9 secretion in cultured myenteric glia. *J. Surg. Res.* 137, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.05.043>.
- Margolis, K.G., Gershon, M.D., 2016. Enteric neuronal regulation of intestinal inflammation. *Trends Neurosci.* 39, 614–624. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.06.007>.
- Milassin, Á., Sejben, A., Tiszlavicz, L., Reisz, Z., Lázár, G., Szűcs, M., Bor, R., Bálint, A., Rutka, M., Szepes, Z., Nagy, F., Farkas, K., Molnár, T., 2017. Analysis of risk factors - especially different types of plexitis - for postoperative relapse in Crohn's disease. *World J. Gastrointest. Surg.* 9, 167–173. <https://doi.org/10.4240/wjgs.v9.i7.167>.
- Misteli, H., Koh, C.E., Wang, L.M., Mortensen, N.J., George, B., Guy, R., 2015. Myenteric plexitis at the proximal resection margin is a predictive marker for surgical recurrence of ileocecal Crohn's disease. *Color. Dis.* 17, 304–310. <https://doi.org/10.1111/codi.12896>.
- Muller, P.A., Koscsó, B., Rajani, G.M., Stevanovic, K., Berres, M.-L., Hashimoto, D., Mortha, A., Leboeuf, M., Li, X.-M., Mucida, D., Stanley, E.R., Dahan, S., Margolis, K.G., Gershon, M.D., Merad, M., Bogunovic, M., 2014. Crosstalk between Muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell* 158, 300–313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.050>.
- Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahé, M.M., Derkinderen, P., Des Varannes, S.B., 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. <https://doi.org/10.1038/ngastro.2012.221>.
- Newson, B., Dahlström, A., Enerbäck, L., Ahlman, H., 1983. Suggestive evidence for a direct innervation of mucosal mast cells. *Neuroscience* 10, 565–570. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90153-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90153-7).
- Pender, S.L.F., Li, C.K.F., Di Sabatino, A., Sabatino, A.D.I., MacDonald, T.T., Buckley, M.G., 2006. Role of macrophage metalloelastase in gut inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1072, 386–388. <https://doi.org/10.1196/annals.1326.019>.
- Pontell, L., Castelucci, P., Bagyánszki, M., Jovic, T., Thacker, M., Nurgali, K., Bron, R., Furness, J.B., 2009. Structural changes in the epithelium of the small intestine and immune cell infiltration of enteric ganglia following acute mucosal damage and local inflammation. *Virchows Arch.* 455, 55–65. <https://doi.org/10.1007/s00428-009-0795-x>.
- Rao, M., Rastelli, D., Dong, L., Chiu, S., Setlik, W., Gershon, M.D., Corfas, G., 2017. Enteric glia regulate gastrointestinal motility but are not required for maintenance of the epithelium in mice. *Gastroenterology* 153 <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.07.002>. 1068–1081.e7.
- Rühl, A., Franzke, S., Collins, S.M., Stremmel, W., 2001. Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointestinal Liver Physiol.* 280, G1163–G1171.
- Ryan, J.M., Rogers, A.C., O'Toole, A., Burke, J.P., 2019. Meta-analysis of histological margin positivity in the prediction of recurrence after Crohn's resection. *Dis. Colon Rectum* 62, 882–892. <https://doi.org/10.1097/DCR.00000000000001407>.
- Smyth, C.M., Akasheh, N., Woods, S., Kay, E., Morgan, R.K., Thornton, M.A., O'Grady, A., Cummings, R., Sheils, O., Smyth, P., Gleich, G.J., Murray, F.M., Costello, R.W., 2013. Activated eosinophils in association with enteric nerves in inflammatory bowel disease. *PLoS One* 8, e64216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064216>.
- Sokol, H., Polin, V., Lavergne-Slove, A., Panis, Y., Treton, X., Dray, X., Bouhnik, Y., Valleur, P., Marteau, P., 2009. Plexitis as a predictive factor of early postoperative clinical recurrence in Crohn's disease. *Gut* 58, 1218–1225. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.177782>.
- 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., Hornung, V., Kalf, J.C., de Jonge, W.J., Wehner, S., 2014. Postoperative ileus involves interleukin-1 receptor signaling in enteric glia. *Gastroenterology* 146 <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.09.030>. 176–187.e1.
- Thia, K.T., Sandborn, W.J., Harmsen, W.S., Zinsmeister, A.R., Loftus, E.V., 2010. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology* 139, 1147–1155. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.070>.
- Tixier, E., Lalanne, F., Just, I., Galmiche, J.-P., Neunlist, M., 2005. Human mucosa/submucosa interactions during intestinal inflammation: involvement of the enteric nervous system in interleukin-8 secretion. *Cell. Microbiol.* 7, 1798–1810. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00596.x>.
- Tixier, E., Galmiche, J.-P., Neunlist, M., 2006. Intestinal neuro-epithelial interactions modulate neuronal chemokines production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 554–561. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.159>.
- Wallace, K.L., Zheng, L.-B., Kanazawa, Y., Shih, D.Q., 2014. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 20, 6–21. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.6>.
- Wekerle, H., Sun, D., Oropeza-Wekerle, R.L., Meyermann, R., 1987. Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. *J. Exp. Biol.* 132, 43–57.
- Yoo, B.B., Mazmanian, S.K., 2017. The enteric network: interactions between the immune and nervous systems of the gut. *Immunity* 46, 910–926. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.05.011>.

Manuscrit 2 :

Implication of ICAM-1 in the adhesion of T cells to enteric glial cells : perspectives in the formation of enteric plexitis in Crohn's disease.

En cours de rédaction.

Résumé de l'article 2 :

La mise en évidence d'une adhésion préférentielle des LT avec les CGE S100 β + dans les plexites myentériques de patients Crohn, nous a incités à approfondir nos recherches sur les interactions entre les CGE et les LT. En particulier, nous avons étudié :

- ❖ L'infiltration de lymphocytes T dans les plexus myentériques de patients Crohn en rémission et en récidive.
- ❖ L'influence de l'activation lymphocytaire ou d'une pré-stimulation pro-inflammatoire des CGE sur l'adhésion des LT grâce à des co-cultures murines et humaines.
- ❖ Les molécules d'adhésion impliquées dans l'interaction entre des LT aux CGE.
- ❖ L'impact de la neutralisation de/des acteurs moléculaires identifiés sur l'évolution de la colite et la formation de plexites myentériques dans un modèle murin de colite chronique spontanée (Heazlewood et al., 2008; Eri et al., 2011).

Les analyses quantitatives à partir des résections intestinales ont démontré un plus grand nombre de LT CD3+ en étroite proximité avec les CGE S100 β + ainsi qu'une proportion plus forte de ganglions myentériques infiltrés par des LT CD3+ chez les patients Crohn en récidive clinique comparativement aux patients contrôles. Cette observation est à rapprocher de nos résultats *in vitro* qui ont rapporté l'effet inducteur d'un pré-conditionnement des CGE par un environnement pro-inflammatoire (LPS ou IL1 β /TNF α) dans l'adhésion des LT aux CGE d'origine murine ou humaine.

Dans la perspective de comprendre les mécanismes intervenant dans l'adhésion de LT aux CGE, nous avons étudié l'expression de molécules d'adhésion et mis en évidence une surexpression d'ICAM-1 dans les CGE en réponse à des stimulations pro-inflammatoires. Les études *in vitro* de blocage par des anticorps anti-ICAM1 ou par le lifitegrast, un antagoniste chimique de LFA-1, ont confirmé l'implication de la liaison ICAM-1/LFA-1 dans l'adhésion des LT aux CGE. Pour déterminer dans quelle mesure ces molécules d'adhésion étaient importantes dans la formation des plexites *in vivo*, des souris Winnie qui développent spontanément des colites avec plexites myentériques, ont été traitées de manière curative par du lifitegrast. Les résultats ont rapporté un effet bénéfique des injections de lifitegrast associé à une réduction de l'inflammation du colon distal, une restauration partielle de la motricité colique ainsi qu'une diminution du nombre de LT CD3+ à proximité des CGE S100 β + dans les ganglions myentériques des souris Winnie.

Implication of ICAM-1 in the adhesion of T cells to enteric glial cells: perspectives in the formation of enteric plexitis in Crohn's disease.

Authors: J.Pabois¹, C.Le Berre¹, T.Durand¹, R. T. Filippone^{3,4}, C. Brossard², K.Nurgali^{3,4}, M. Neunlist¹, A. Bourreille¹, I. Neveu¹, P. Naveilhan¹.

Institutions

1. University of Nantes, Inserm, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, Nantes, France
2. Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, INSERM, CRCINA, Université de Nantes, CHU Nantes, F44000 Nantes, France
3. College of Health and Biomedicine, Victoria University, Melbourne, VIC, Australia
4. Institute for Health and Sport, Victoria University, Melbourne, VIC, Australia

Grant support: The study was supported by the “Région Pays de la Loire” (2012-13456), the association François Aupetit and the Foundation “SantéDige”. J. Pabois was supported by a fellowship from the French Ministry for Superior Education, Research and Innovation.

Corresponding author : Philippe Naveilhan, INSERM UMR 1235, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex. / E-mail: Philippe.naveilhan@univ-nantes.fr

Authors contribution: Conceptualization : JP, IN, PN, AB, MN, KN; Funding acquisition : IN, PN, MN; Investigation and Formal analysis : JP, TD, CL; Supervision : IN, PN ; Visualization : JP, PN; Writing : JP, IN, PN.

Abstract:

Background & Aims: The infiltration of immune cells in the enteric nervous plexus, called enteric plexitis, is considered as predictive factor for early postoperative recurrence in Crohn's disease. In a first approach to decipher the mechanisms leading to the formation of enteric plexitis, the interactions of T cells with enteric neural cells were studied in intestinal resections from Crohn patients, in co-cultures and in a mice model of spontaneous colitis.

Methods: T cells in close proximity to neural cells in myenteric plexitis were retrospectively quantified in intestinal resections collected from 21 Crohn and 9 cancer patients. Then, the mechanisms involved in the T cell adhesion to neural cells were investigated in co-cultures of rat and human EGC. Finally, the implication of adhesion molecules in the formation of plexitis and the development of colitis was studied by administrating the lifitegrast to Winnie mice.

Results: The mean number of T cells in close proximity to EGC was significantly higher in the myenteric ganglia of relapsing Crohn's patients ($1.85+/-0.3$) as compared to cancer's patients ($0.36+/-0.08$). *In vitro* experiments show that T cell activation and/or pro-inflammatory conditions induce an increase in the number of T cells adhering to EGC, whereas the blocking of ICAM-1/LFA-1 binding inhibits the T cell adhesion to EGC. Interestingly, the treatment of Winnie mice with the lifitegrast, which neutralizes a ICAM-1/ LFA-1 ligation, reduces signs of colitis and decreases the number of T cells in close proximity with EGC in myenteric plexus.

Conclusions: The increased number of T cells infiltrating the myenteric ganglia in the relapsing Crohn patients argues for further investigations on the development and the role of enteric plexitis in Crohn's disease. Here, we provide evidence that LFA-1/ICAM-1 are involved in the T cell adhesion to EGC. Moreover, the decrease in the number of T cells infiltrating the myenteric ganglia after treatment of the Winnie mice with lifitegrast suggest an implication of these adhesion molecules in the formation of plexitis.

Keywords: Plexitis, Crohn disease, Colitis mice model, Lifitegrast, Glial cells, ICAM-1

Abbreviations:

ActT : Activated T Lymphocytes

BD : Becton & Dickinson Biosciences

CD : Cluster of Differentiation

CFSE : CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester

CMMC : Colonic Migrating Motor Complexes

Ctrl : Control

EFS : French National Blood Service

EGC : Enteric Glial Cells

ENS : Enteric Nervous System

GI : GastroIntestinal

IBD : Inflammatory Bowel Disease

IL: Interleukin

ILC3: Innate Lymphoid Cells type 3

IP : Intraperitoneally

Lcn-2 : Lipocalin-2

LG : Lifitegrast

LMMP : Longitudinal Muscle Myenteric Plexus

SA : Sigma-Aldrich

SC : Short Contraction

Solv : Solvent

T : Non-activated T lymphocytes

TF : ThermoFisher

Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD) such as Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis are characterized by excessive and inappropriate reactions of the immune system leading to progressive and irreversible gut wall damages. Hypotheses that alterations of the crosstalk between the immune system, the enteric nervous system and the microbiota contribute to these dysfunctions are supported by different studies. Indeed, Ibiza et al., showed that the production of GDNF by enteric glial cells (EGC) in response to Toll-like receptor activation decreases the susceptibility of mice to colitis through the induction of IL-22 by the innate lymphoid cells 3 (ILC3) (Ibiza et al., 2016). In 2014, Muller et al., demonstrated that bidirectional communication between muscularis macrophages and enteric neurons contribute to proper motility and scavenger functions in response to microbiota signaling (Muller et al., 2014). In 2020, Matheis et al., revealed that adrenergic signaling in muscularis macrophages protects enteric neurons from cell death in case of bacterial invasion (Matheis et al., 2020). These observations emphasize the need of studying the neuro-immune interactions in IBD.

Recently, a great focus has been placed on the development and consequences of entericplexitis, a structure defined by an abnormal accumulation of immune cells in and around the enteric nervous ganglia. Indeed, the presence of enteric plexitis in the proximal margin of intestinal resections was found as predictive factor for early postoperative recurrence in Crohn's disease (Bressenot et al., 2013; Decousus et al., 2016; Ferrante et al., 2006; Lemmens et al., 2017; Milassin et al., 2017; Misteli et al., 2015; Sokol et al., 2009). Due to this observation, the detection of myenteric plexitis has been included in the guidelines of the European Crohn and Colitis Organization in 2017 (Gionchetti et al., 2017). A large variety of immune cells has been detected in Crohn's plexitis, including lymphocytes, plasmocytes, neutrophils and eosinophils (Bressenot et al., 2013). Whether some of them are more important than the others in postoperative recurrence of CD remains to be determined. Moreover, nothing is known about the cellular mechanisms leading to the formation of plexitis in the myenteric plexus.

We previously reported that T cells preferentially adhere to neural cells in primary cultures of ENS (Pabois et al., 2020). In the present paper, we show that T cells interact with both enteric neurons and EGC into the human gastrointestinal wall. *In vitro* studies reveal that inflammatory environment and/or T cell activation favor T cell - ECG adhesions. Blocking experiments indicate that the binding of ICAM-1 to LFA-1 is important for T cell - ECG adhesions and interestingly, its neutralization reduces the signs of colitis and the formation of enteric plexitis in a murine model of spontaneous colitis.

Materials and Methods

Detailed materials and methods could be found in supplementary data.

Materials

Human EGC were isolated from the intestinal resections of patients who gave their informed consent to take part to this study. All the procedures were performed according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Humans and registered under the number DC-2008-402. Three-month-old female Sprague-Dawley rats were obtained from Janvier Laboratories (Le Genest-St-Isle, Fr) and experiments were carried out in strict accordance with the recommendations of the Animal Care and Use Committee of Nantes (France). Twelve weeks-old female and male *Winnie* mice (Win/Win) (Eri et al., 2011; Heazlewood et al., 2008) and age-matched C57/BL6 were obtained from the Monash Animal Services (Melbourne, Australia). Mice experiments were conducted according to guidelines of the Australian National Health and Medical Research Council and the experimental protocol was approved by the Victoria University Animal Experimentations Ethics Committee.

Treatment and analyses of the *Winnie* mice

At day 0 (D0), 12 weeks-old *Winnie* (Win/Win) with active colitis were randomized into two groups and injected intraperitoneally (IP) twice a day with vehicle (Sham, n=9) or with 15 mg/kg of LifiteGrast (LG, n=14). At D14, mice were euthanized by cervical dislocation or intracardiac blood puncture after anesthetic injection, and tissues were immediately collected. Disease progression was evaluated using the Disease Activity Index (DAI) which combines scores for weight loss, stool consistency, rectal symptoms and the colon weight/length ratio as previously described (Stavely et al., 2018). The concentration of Lipocalin-2 (Lcn-2) in D14 fecal supernatants was quantified using the non-invasive Lcn-2 ELISA according to the manufacturer's protocol kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) (Chassaing et al., 2012). The morphology of the distal colon was investigated for each animal, on 20 µm cryostat sections stained with hematoxylin and eosin (Rahman et al., 2015). Colonic crypt architecture, epithelium damage and ulceration, mucosa and muscle thickness, smooth muscle dysplasia, and leukocyte infiltration were measured using images from Zeiss Axio Imager Microscope. Motility of distal colon was evaluated *ex vivo* in organ bath experiments as previously reported (Gwynne et al., 2004).

Human tissues

Paraffin block of ileocolonic resections (proximal margin) from 24 patients operated in 2016 were collected and 5 µm sections were performed using microtome. The socio-demographic, clinical, histologic and endoscopic data of patients with Crohn's disease are summarized in Table I. Four patients were excluded due to the absence (n=3) or to the low number of myenteric ganglia (<10, n=1). Post-operative recurrence was defined as endoscopic (Rutgeerts score ≥ i, 1 at the colonoscopy performed within one year after surgery) and/or clinical evaluation (physical examination performed 18 months after surgery). Three patients were lost for follow-up at 18 months (one patient died 10 days after surgery, two patients did not have any colonoscopy). Nine patients who underwent ileocolonic resections for colorectal cancer in 2016 were included as controls. Sections were performed at the proximal margin away from the tumor tissue.

Cell Culture

Enteric Glial Cells

Primary enriched cultures of myenteric glial cells were prepared as previously reported by Soret et al.(Soret et al., 2013). The cultures of human myenteric glial cells were prepared from macroscopically healthy area of intestinal resections obtained from 11 adult patients (Table II). The cultures of rat EGC were prepared from the colonic myenteric plexus of adult rat. Treatment of EGC with pro-inflammatory cytokines or LPS were performed by incubating the rat or the human EGC for 6h, 8h or 24h with 10 ng/mL IL1 β (PromoCell GmbH, Heidelberg, Ger) and 10 ng/mL TNF α (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, Fr; PromoCell GmbH,) or 100 ng/mL of LPS (Sigma-Aldrich). The supernatants were removed before the addition of T cells.

T lymphocytes

Rat T lymphocytes were purified from fresh rat spleen or mesenteric ganglia by negative cell sorting using anti-mouse IgG coated Dynabeads (TF) (Bonnamain et al., 2012). Human T lymphocytes were collected from the blood of healthy donors (EFS, Nantes, Fr) as previously described (Finney et al., 2004). Briefly, after the separation of peripheral blood mononuclear cells on Ficoll, T lymphocytes were sorted using Pan T cell isolation kit (Miltenyi Biotech, Paris, Fr). T cell activation was performed using coated anti-CD3 (1 µg/mL, BD) and anti-CD28 (2.5 (rat) or 5 (human) µg/ml, BD) antibodies. T lymphocytes were stained with 5 µM of carboxyfluorescein-succinimidyl-ester (CFSE, TF) according to the manufacturer's protocol before their addition to EGC cultures.

EGC-T cell co-cultures

Activated or non-activated T lymphocytes labeled with CFSE were added to the cultures of EGC (ratio 1:1) and incubated for two hours before analyses. Next the plates were carefully washed five times with PBS after to remove low adherent T cells and fixed

ICAM-1/LFA1 neutralization

To block the binding of *ICAM-1/LFA1*, activated T cells were added to the cultures of ECG, either after 1 hr of pre-incubation of EGC at 37°C with 10 µg/ml anti-ICAM-1 (BD Pharmingen) or isotype antibody (IgG1κ, Biolegend), or after 30 min of pre-incubation of T cells as well EGC at 37°C with 0.1 mM lifitegrast (SAR-1180; Sigma).

Immunochemistry

Tissue and cell preparation

Human 5µm full-thickness sections were deparaffined using standard procedures and incubated in antigen blocking solution (Dako Agilent, Santa Clara, US) for 1 hr at RT. Longitudinal muscle-myenteric plexus (LMMP) whole mount preparations were isolated from mouse distal colon (1cm²) and saturation was performed by incubating the LMMP for 1 hr at RT in 10% donkey serum (Merck, Millipore, Bayswater, VIC, Australia) diluted in PBS -Triton 0.1%. Rats fixed cells were incubated for 2 hrs at room temperature (RT) in PBS supplemented with 5% (vol/vol) horse serum (TF) and 0.25% (vol/vol) triton X-100 (SA).

Immunochemistry

Primary antibodies (Tab S3) were diluted in Dako diluent in case of paraffin sections (Dako Agilent, Santa Clara, US) or in PBS with 5% horse serum in other case. Tissues or cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies, washed and incubated for 2 hrs at RT with the secondary antibodies (Tab S3). After counterstaining with Dapi (1/1000, Sigma-Aldrich, Saint Louis, US), the slices were mounted in the ProLong™ Gold Antifade Mountant (TF) or in the Dako mounting media (North Sydney, NSW, Australia).

Cell counting and micrographs analyzes

T cells in close proximity with EGC (no black pixel between the different staining and/or on the top of S100β⁺ cells) were automatically counted by the INCell analyzer or manually counted on confocal or Axio Zoom micrographs. The surface covered by the EGC was estimated automatically based on S100β staining.

Western blotting

Cells were lysed with RA1 and the proteins were extracted using NucleoSpin® RNA/Protein (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) according to the manufacturer's instructions. Fifty µg of proteins were separated using NuPage Novex 4-12% Bis-Tris MiniGels™. Electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes were realized with the iBLot 2™ Dry Blotting System (Thermofisher, Courtaboeuf, Fr). Membranes were immunoblotted, revealed by Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, Fr) and visualized with laser-scanning densitometry ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad). Normalization with actin was performed using the software Image Lab® (Biorad, Marnes-la-coquette, Fr).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Prism 7.0, GraphPad software Inc, San Diego, CA, US) *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.0001.

Results

T cells interact with neurons and EGC in the myenteric ganglia of Crohn's patients

A preliminary set of experiments with a limited number of tissue sections revealed that proximal resections from the gut of Crohn's patients contain a higher number of T cells in close proximity to EGC in the myenteric ganglia as compared to control patients (Pabois et al., 2020). To confirm this observation and evaluate whether recurrence of the disease could affect such an observation, the number of T lymphocytes in close proximity to neural cells were quantified in the myenteric ganglia of proximal margin resections from 9 control and 21 patients with Crohn's disease. The serial sections were double stained with anti-CD3 antibody combined with anti-HuD or anti-S100 β antibodies. CD3+ cells were found in close proximity to EGC in all the analyzed patients except one control patient. Quantification studies confirmed a higher number of T cells in close proximity to EGC in the myenteric ganglia of Crohn's patients as compared to control patients (Fig. 1A). We next split the group of Crohn's patients according to the clinical recurrence of the disease at 18 months post-surgical resection. The number of CD3+ cells in close proximity with EGC per ganglia was statistically higher in the relapsing patients when compared to control patients (Fig. 1B). Interestingly, this number was not significantly different in the group of patients in remission as compared to control patients (Fig. 1B). We next determined the percentage of S100 β + ganglia infiltrating by CD3+ cells. The mean percentage of S100 β + ganglia with CD3+ cells was significantly higher in the group of Crohn's patients (58%, Fig. 1C) and especially in patients with relapse (64%, Fig. 1D) as compared to controls patients (Fig. 1C-D). Higher mean percentage of S100 β + ganglia with CD3+ cells was observed in the group of non-relapsing patients but the difference with the control group was not significant (Fig. 1D). The number of CD3+ cells in close proximity with Hu+ staining was then determined. One control patient was excluded due to the limited number of Hu+ cells observed in the myenteric plexus. No significant difference was observed between the different groups (Fig. 1E-F).

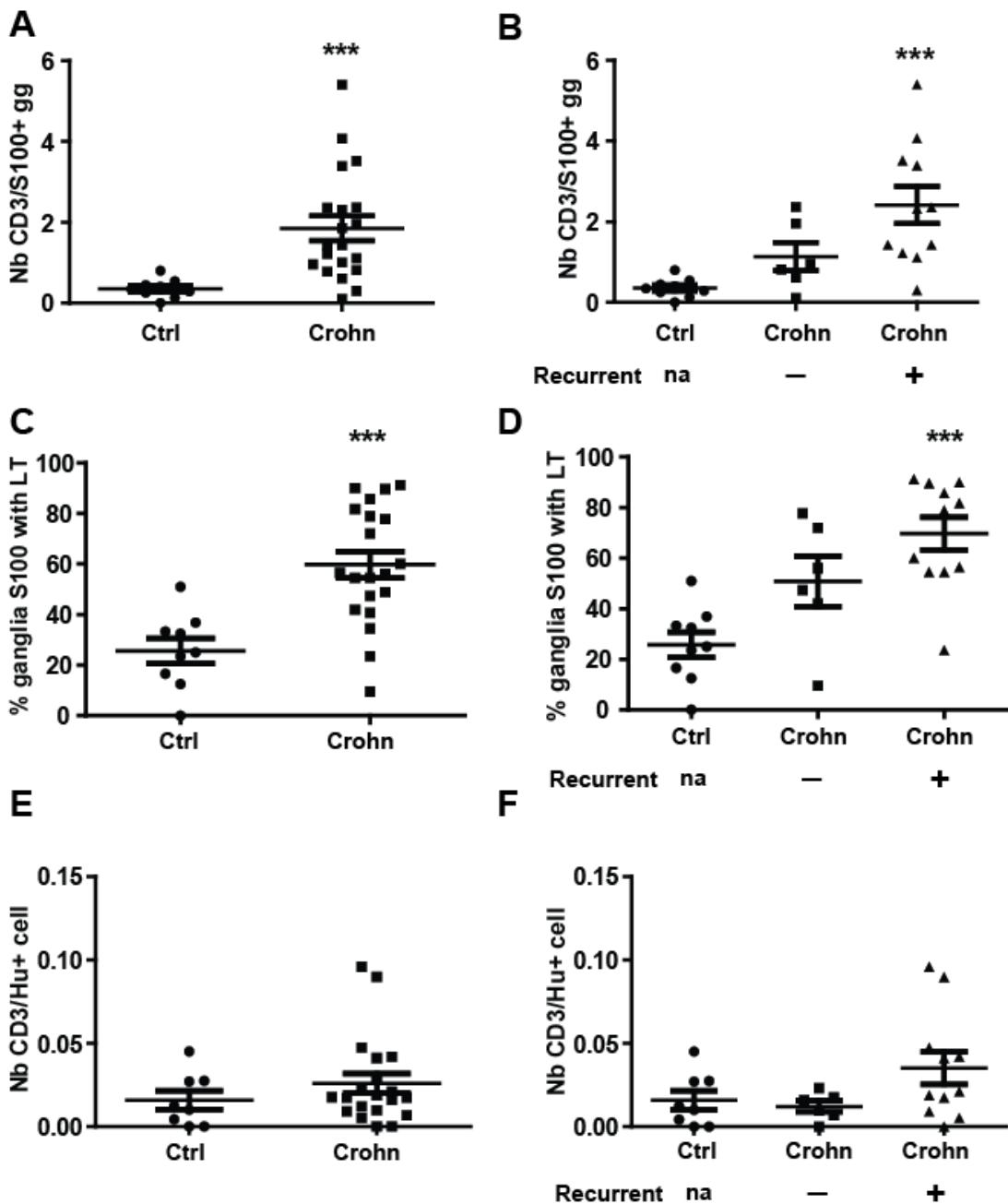


Figure 1: T cells in the myenteric ganglia of intestinal resections from control or Crohn patients. **A-B:** Mean number of CD3+ T cells in close proximity to S100 β staining per myenteric ganglia in the group of control (Ctrl) or Crohn patients (**A**) or in the group of control (Ctrl), remitting (-) or relapsing (+) Crohn patients (**B**). **C-D:** Percentage of myenteric ganglia with CD3+ T cells close to S100 β in the group of control (Ctrl) or Crohn patients (**C**) or in the group of control (Ctrl), remitting (-) or relapsing (+) Crohn patients (**D**). **E-F:** Mean numbers of T cells in close proximity with HuD staining per HuD-positive cells in the group of control (Ctrl) or Crohn patients (**E**) or in the group of control (Ctrl), remitting (-) or relapsing (+) Crohn patients (**F**). Control patients (n = 9), Crohn patients (n = 20), non-recurrent patients (n = 6); recurrent patients (n = 11). Data are the mean +- S.E.M. Statistical analyses: Kruskall-Wallis followed by Dunn's post-hoc tests (**E, G, I**) or Mann-Whitney test (**D, F, H**). ***, p < 0.0001

T cell activation or inflammatory stimuli increase the adhesion of T cells to EGC

To determine the parameters that favor the interactions between ECG and T cells, purified rat EGC were co-cultured with non-activated (T) or activated (ActT) T cells for two hours. The number of T cells adhering to EGC were then counted and expressed relative to S100 β surface. The results showed that activation of T cells favor their adhesion to EGC (Fig. 2A). To evaluate the impact of pro-inflammatory conditions on EGC-T cell interactions, EGC were pre-treated for 24h with LPS or IL1 β /TNF α . The supernatants were then removed and non-activated or activated T cells were added to the cultures of EGC. After 2 hrs of co-cultures, we observed a higher number of T cells adhering to EGC if glial cells were pretreated with LPS or IL1 β /TNF α (Fig. 2B-C). Interestingly, size-frequency analyzes revealed a higher number of small size T cells adhering to control EGC and a higher number of large size T cells adhering to LPS and IL1 β /TNF α pre-treated EGC (Fig. 2-D-E). The increase in the frequency of spreading splenic T lymphocytes is observed in the co-cultures with EGC pretreated with LPS and IL1 β /TNF α .

To investigate a possible difference in T cell adhesion according to immune cell origin, the adhesion of splenic and mesenteric T cells was compared in co-cultures with EGC. Interestingly, we observed a higher number of T cells adhering to control EGC when lymphocytes were isolated from the mesenteric lymph node (Fig 2F). This difference was also observed when EGC were pretreated with LPS and IL1 β /TNF α .

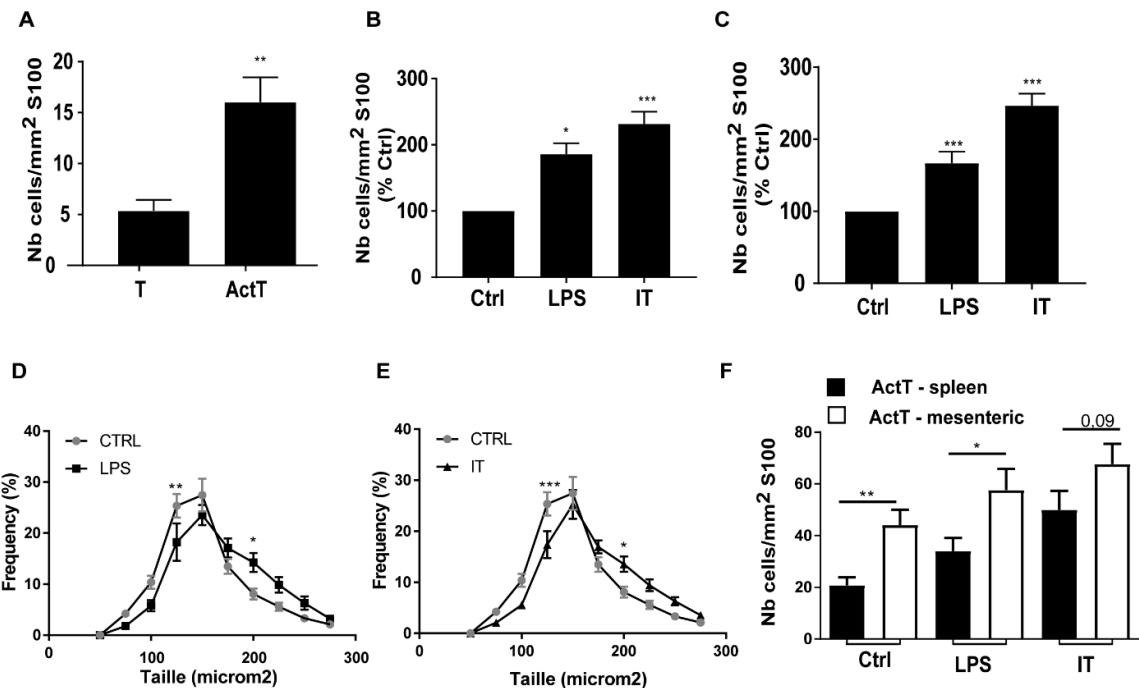


Figure 2 : Splenic and mesenteric T cells interact with myenteric EGC in 2hrs co-cultures. **A:** Number of T cells adhering to EGC after 2 hours of co-culture with non-activated (T, n=7) or activated T cells (ActT, n=8). **B-C:** Number of non-activated (B, n=7) or activated (C, n=18) CFSE+T cells adhering to EGC after 2 hrs of co-cultures with EGC pretreated for 24 hrs with LPS, IL1 β /TNF α (IT) or vehicle (Ctrl). The number of adherent T cells is expressed relative to S100 β surface and in percentage of control condition (% Ctrl). **D-E:** Size frequency of activated T cells adhering to EGC pretreated by LPS (D, n=5) or IT (E, n=5) **F:** Number of splenic or mesenteric activated T cells adhering to EGC after 2 hrs of co-cultures with EGC pretreated for 24 hrs with LPS, IL1 β /TNF α (IT) or vehicle (Ctrl). Data are the mean +- S.E.M. Statistical analyses: Mann-Whitney test (A, C, D, H) or Kruskall-Wallis followed by Dunns post-hoc tests (B-G-) or 2-way ANOVA (E, F) *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.0001.

Implication of ICAM-1/LFA-1 in the adhesion of T cells to rat EGC

With the perspective of identifying molecular actors implicated in the adhesion of T cells to EGC, the expression of adhesion molecules expressed by EGC like NCAM, and/or implicated in T cell interactions such as ICAM-1, was investigated. For this purpose, rat EGC were treated with IL1 β /TNF α for 6 or 24 hrs and then, Q-PCR and western blot were performed. An upregulation of ICAM-1 mRNA and protein was clearly observed after the treatment of EGC with IL1 β /TNF α whereas no difference in NCAM expression was reported (Fig. 3A-C). To confirm this result, double immunohistochemistry was performed on EGC treated or not with IL1 β /TNF α for 24 hrs. Whereas ICAM-1 was weakly detected in control condition, the adhesion molecule was clearly observed in EGC after the treatment with IL1 β /TNF α (Fig. 3D). Confocal imaging of EGC pretreated with IL1 β /TNF α showed a punctiform non-homogenous expression of ICAM-1 in the cell membrane of S100 β positive cells (Fig. 3E).

To evaluate the potential implication of ICAM-1 in the adhesion of T cell to EGC *in vitro*, the ligation between ICAM-1 and LFA-1 was blocked either, with a neutralizing antibody directed against ICAM-1, or with the lifitegrast (LG), a chemical inhibitor of LFA-1.

As presented in the figure 3F, treatment of EGC with anti-ICAM-1 antibodies decreased the number of splenic activated T cells adhering to EGC pretreated with IL1 β /TNF α . A decrease was also observed after the treatment of EGC and activated T cells with the lifitegrast (Fig 3G). The adhesion of activated T cells derived from the mesenteric lymph nodes was also strongly inhibited by the treatment with the lifitegrast (Fig 3-H).

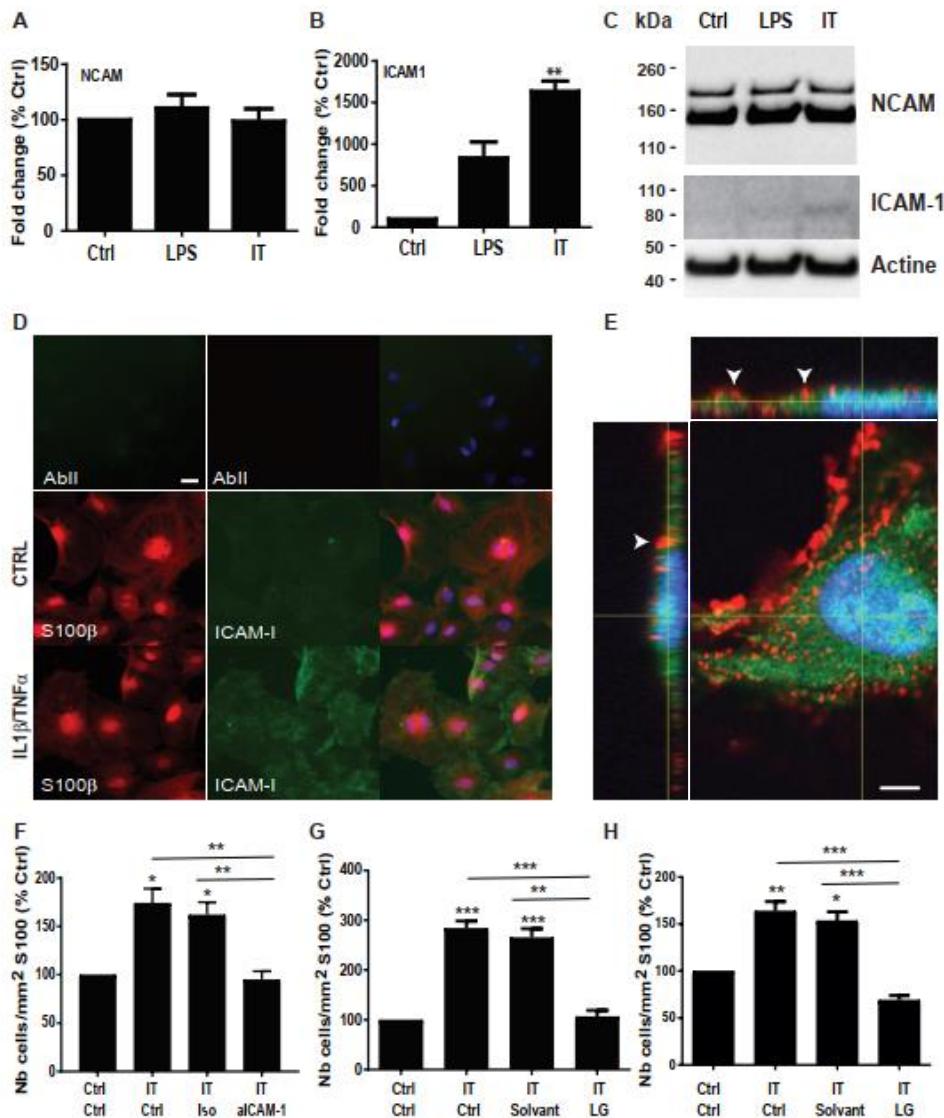


Figure 3 : Expression of ICAM-1 in rat myenteric EGC and its involvement in EGC-T cell adhesion.

A-B: Q-PCR analysis of NCAM (A, n=5) or ICAM-1 (B, n=5) mRNA in EGC treated or not (Ctrl) for 6 hrs with LPS or IL1 β /TNF α (IT). **C:** Western blot analysis of NCAM (n=4), ICAM-1 (n=5) and actin in EGC treated or not (Ctrl) for 24 hrs with LPS or IL1 β /TNF α (IT). **D:** Micrograph of EGC treated or not (Ctrl) with IL1 β /TNF α for 24 hrs and immunostained or not (AbII) with anti-S100 β (red) and anti-ICAM-1 (green) antibodies. Nuclei were counterstained with Dapi (Blue). Scale bar: 20 μ m. **E:** Confocal micrograph with Z reconstruction of EGC treated for 24 hrs with IL1 β /TNF α and immunostained with S100 β (green) and ICAM-1 (red). Nuclei were counterstained with Dapi (Blue). Scale bar: 5 μ m. **F-H:** Effect of LFA-1/ICAM-1 neutralization on the adhesion of T cells to EGC. Prior co-culture EGC were pre-treated with IL1 β /TNF α (IT). Next, EGC were preincubated for 60 min with anti-ICAM-1 neutralizing antibody or isotype control, and co-cultivated for 2 hrs with splenic activated T cells (**F**, n=8). In other hand, both EGC and activated T cells were pre-incubated for 30 min with LifiteGrast (LG) or solvent. Then, the LG-treated T cells prepared from spleen (**G**, n=10) or mesenteric lymph nodes (**H**, n=11) were co-cultivated for 2 hrs with LG-treated CGE. The number of CFSE+T cells adhering to EGC was expressed relative to S100 β surface and as percentage of control condition. Data are the mean + S.E.M. Statistical analyzes: Kruskall-Wallis followed by Dunns post-hoc tests. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.0001.

Implication of ICAM-1/LFA-1 in the adhesion of T cells to human EGC

As experimental results may differ between human and rodents, part of the experiments performed with rat cells were carried out with human EGC prepared from intestinal resections and T cells isolated from healthy donor's PBMC. The data presented in the figure 4A showed that pretreatment of EGC with LPS or IL1 β /TNF α significantly increased the number of activated T cells interacting with EGC as compared to untreated EGC. Analyze of ICAM-1 and NCAM regulation in human EGC revealed that treatment of human EGC with LPS or IL1 β /TNF α had no impact on NCAM expression (data not shown), but increase the levels of ICAM-1 mRNAs and proteins (Fig. 4B-C). Immunocytochemistry analyzes confirm the expression of ICAM-1 in human S100 β + EGC (Fig. 4D) with moderate levels in control condition and a strong increase of ICAM-1 expression after 24 hrs treatment with IL1 β /TNF α . Finally, as shown with rat EGC, treatment of human EGC and T cells with lifitegrast decreased the number of T cells adhering to EGC in co-cultures with EGC treated with IL1 β /TNF α (Fig. 4E).

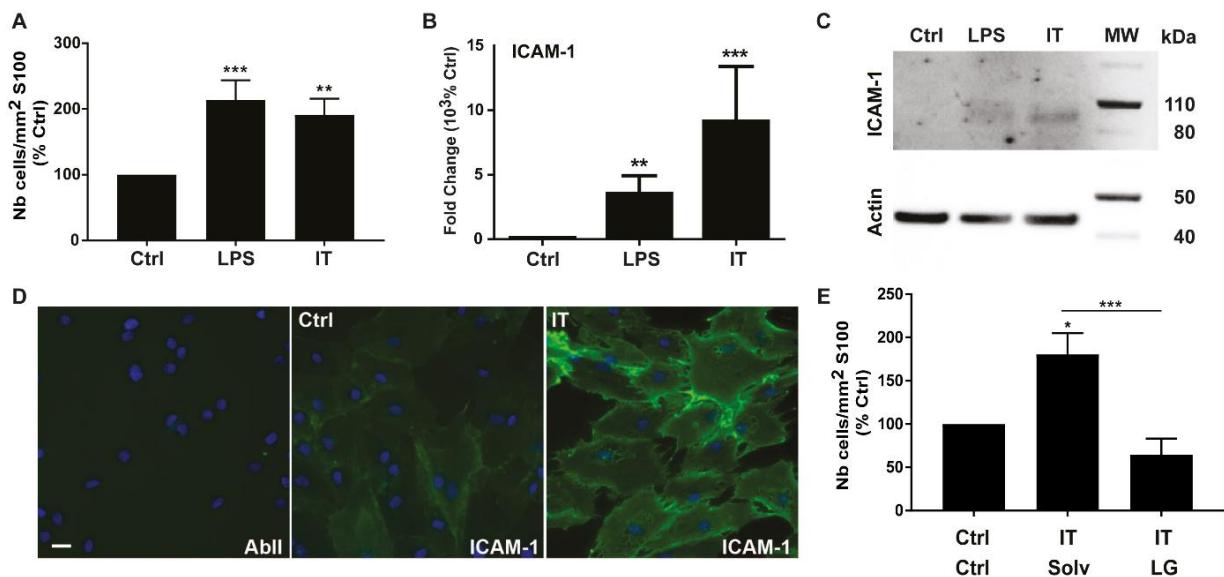


Figure 4 : Adhesion of human activated T cells to human EGC in vitro. **A:** Number of activated T cells adhering to EGC after 2 hrs of co-culture with human EGC pretreated for 24 hrs with LPS, IL-1 β /TNF α (IT) or solvent (Ctrl) ($n=11$). The results are expressed relative to S100 β surface and as percentage of control condition. **B-C:** Q-PCR analyzes of ICAM-1 expression in human EGC treated or not (Ctrl) for 6 hrs with LPS or IL1 β /TNF α (IT) (**B**, $n=13$). Western blot analysis of ICAM-1 expression in human EGC treated or not (Ctrl) for 24 hrs with LPS or IL1 β /TNF α (IT) (**C**, $n=7$). **D:** Immunocytochemistry of ICAM-1 (green) in EGC treated or not (Ctrl) with IL1 β /TNF α (IT) for 24 hrs. Nuclei were counterstained with Dapi (Blue). Scale bar: 10 μ m. **E:** Effect of LFA-1/ICAM-1 neutralization on EGC - T cell interactions. Activated T cells were pre-incubated for 30 min with lifitegrast (LG) or solvent (solv) ($n=9$) before their addition to cultures of ECG pretreated or not (Ctrl) for 24 hrs with IL1 β /TNF α (IT). The number of T cells interacting with EGC after 2 hrs of co-culture was counted and expressed relative to S100 β surface and as percentage of control condition. Data are the mean + S.E.M. Statistical analyzes: Kruskall-Wallis followed by Dunns post-hoc tests. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.0001$.

Effect of the lifitegrast on colitis development and colonic motility in Winnie mice

In order to evaluate the impact of LFA-1/ICAM-1 neutralization on active colitis and the formation of myenteric plexitis *in vivo*, lifitegrast was administrated to Winnie mice which spontaneously develop plexitis and colitis from the age of 2 months. For this purpose, 12 weeks-old Winnie mice were treated with IP injection of 15 mg/kg of lifitegrast twice a day for 14 days. Such a treatment with lifitegrast lead to a 51% decrease in the disease activity index (DAI) as compared to vehicle-treated group (Fig. 5A). We also observed a significant diminution of the fecal wet content (Fig. 5B), the concentration of fecal lipocalin-2 (Fig. 5C), the distal colon weight (Fig. 5D), the weight/length ratio (Fig. 5E), the histological score (Fig. 5F) as well as the thickness of the mucosa and muscle layers (Fig. 5G-H).

The impact of lifitegrast on the colonic motility was investigated *ex vivo* on the whole distal colon using 10 min spatiotemporal maps video. The frequency and speed of propagating contractions of more than 50 % of colon length were analyzed as these Colonic Migrating Motor Complexes (CMMCs) and correspond to the main physiological contractions of the gut wall. The frequency and speed of propagating contractions of less than 50% of the colon length were also studied as these short contractions (SC) are signs of colonic dysmotility. As shown in the figure 5I, mean of CMMC frequency was lower in sham Winnie mice as compared to wild-type mice. Interestingly, mean of CMMC frequency was not statistically different in lifitegrast-treated Winnie mice and wild-type mice (Fig. 5I). No statistical difference was observed for CMMC speed (Fig. 5J). Higher frequency and lower speed was observed for the short contractions in sham and lifitegrast-treated Winnie mice as compared to wild-type mice (Fig. 5K-L).

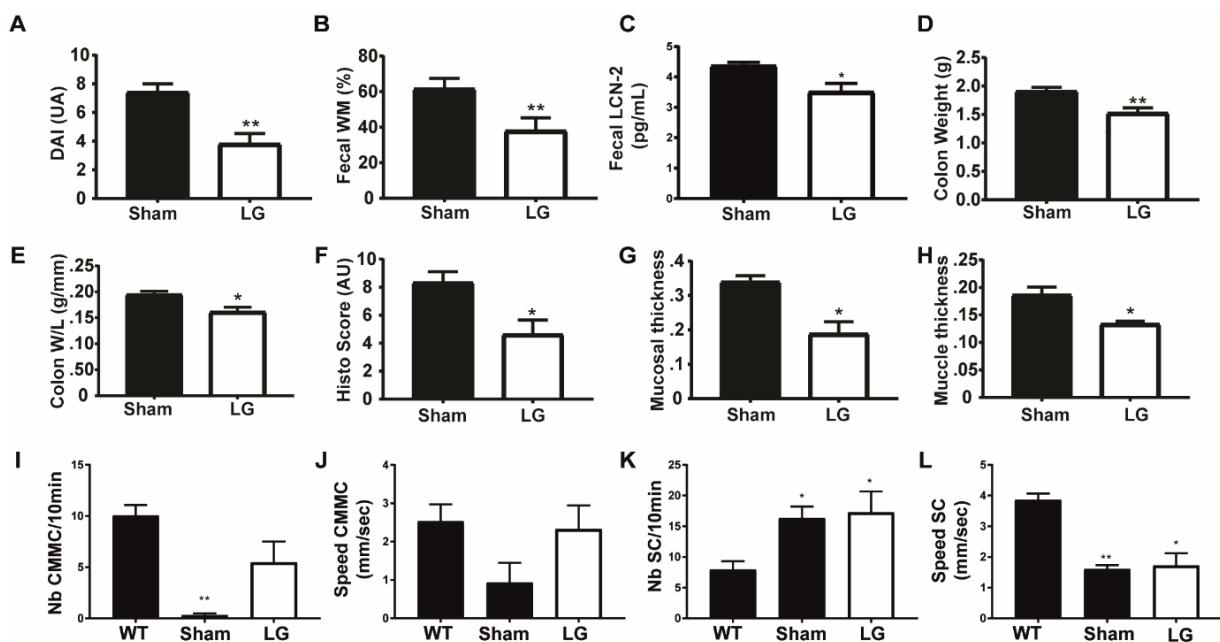


Figure 5 : Effect of the LifiteGrast (LG) on colitis and distal colonic motility in Winnie mice. 12 weeks-old Winnie mice with active colitis received i.p. injection of vehicle (Sham) or 15 mg/kg of LifiteGrast (LG) twice a day for 14 days. **A**- Disease Activity Index (Sham n=7; LG n=8); **B**- D14 Fecal wet mass (%) (Sham n=13 ; LG n=10) ; **C**- D14 Fecal lipocalin (Lcn-2) concentration (pg/mL) (Sham n=6 ; LG n=5) **D**- Colon weight (Sham n=12 ; LG n=12) **E**- Colon weight/length ratio (g/mm) (Sham n=12 ; LG n=12) **F -H** : Histological analyzes of the distal colon : global scoring (**F**), mucosal thickness (**G**) and muscle thickness (**H**) (Sham n=5; LG n=4). **I-L**: Ex vivo motility of distal colon from C57/BL6 mice (WT, n=6), non-treated Winnie mice (Sham, n=6) and lifitegrast-treated Winnie mice (LG, n=5). **I-J**: Frequency per 10 min (**I**) and speed (**J**) of Colonic Migrating Motor Complexes (CMMCs). **K-L**: Frequency per 10 min (**K**) and speed (**L**) of Short Contractions (SC). Data are the mean +- S.E.M. Statistical analyzes: non-parametric t-test Mann-Whitney or Kruskal-Wallis followed by post-test Dunn's (*p<0,05; **p<0,01).

Effect of lifitegrast on the development of plexitis in Winnie mice

To investigate the impact of the lifitegrast on plexitis, the infiltration of T lymphocytes in the myenteric plexus of distal colon was quantified (Fig. 6). For this purpose, S100 β and CD3 immunohistochemistry were performed on LMMP preparation of distal colon to determine the number of intraganglionic T lymphocytes in close proximity with S100 β^+ cells. In order to check the age of apparition of the myenteric plexitis in Winnie mice, the myenteric plexus were analyzed in 5 (no symptoms), 6 (start of colitis) and 14 (active colitis) weeks-old Winnie mice and in C57BL6 mice. The result presented in the figure 6A revealed a higher number of T cells in close proximity to S100 β^+ cells in 14 weeks-old Winnie mice as compared to wild-type mice and asymptomatic 5 weeks old Winnie (Fig. 6A). Interestingly, administration of lifitegrast for 14 days to 12 weeks-old winnie mice led to a significant decrease in the number of T cells infiltrating the myenteric plexitis (Fig. 6B). A punctiform expression of ICAM-1 by EGC in the myenteric plexus of Winnie mice was confirmed by double immunohistochemistry (Fig. 6C).

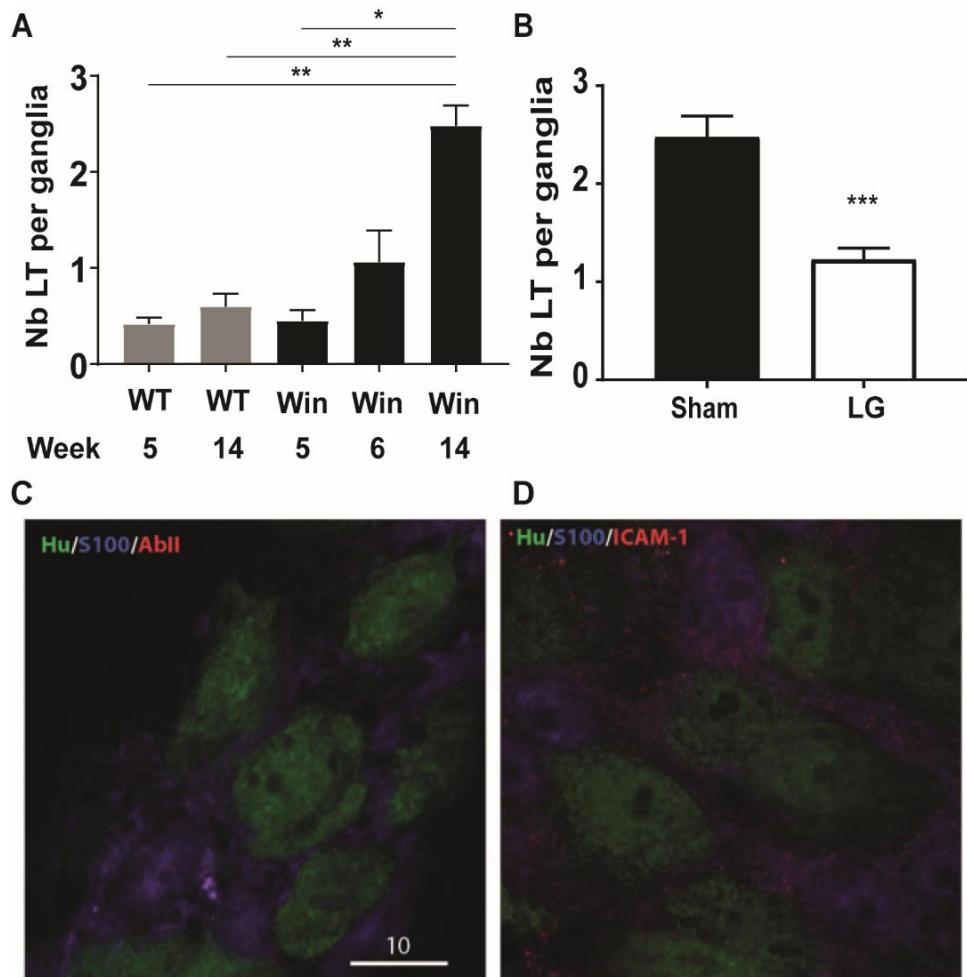


Figure 6 : Effect of lifitegrast on T cell infiltration in the myenteric plexus of Winnie mice. **A:** Number of T lymphocytes in the myenteric ganglia of the distal colon of Wild-Type (WT, C56bl6) mice at 5 ($n=4$) and 14 ($n=8$) weeks-old, and of Winnie mice at 5 (no symptoms, $n=5$), 6 (first colitis, $n=4$) and 14 (active colitis, $n=7$) weeks-old Winnie mice. **B:** Effect of the lifitegrast in Winnie mice. Twelve weeks-old Winnie mice with active colitis received vehicle (Sham) or 15 mg/kg of lifitegrast (LG) by intraperitoneal injections twice a day for 14 consecutive days and the number of CD3+ DAPI+ T lymphocytes per ganglia in contact with S100+ fibers or cells in LMMP preparation (Sham $n=7$; LG $n=9$) was counted. **C-D:** Expression of ICAM-1 in the myenteric ganglia of Winnie mice. Immunohistochemistry was performed on the myenteric ganglia of Winnie mice using secondary antibodies only (C, AbII) or anti-ICAM-1 antibodies (D). EGC were stained with anti-S100 β antibodies (purple) whereas neurons were immunolabelled with antibodies against anti-HuC/D (green). The representative micrograph shows a punctiform expression of ICAM-1 (red) that co-localized with anti-S100 β (purple) and anti-Hu (green) immunostaining in the myenteric ganglia. Scale bar: 10 μ m. Data are the mean +- S.E.M., Statistical analyzes were performed using non-parametric t-test Mann-Whitney (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$)

Discussion

In the present paper, we show that relapsing Crohn patients present a higher number of T cells in close proximity to EGC in the myenteric plexus of ilea-proximal margin resection, as compared to control or remitting Crohn patients. *In vitro* analyzes reveal that T cell activation and/or inflammatory stimuli favor the adhesion of T cells to human or rat ECG. Increased expression of ICAM-1 in EGC in response to pro-inflammatory stimuli suggest a role of adhesion molecules and blockage experiments confirm an implication of LFA-1/ICAM-1 in the interactions of T cells with EGC. Interestingly, systemic inhibition of LFA-1 using lifitegrast improved colitis, distal colonic motility and reduced myenteric plexitis in a mouse model of spontaneous colitis.

Increased number of plexitis in the proximal marge of intestinal resections is recognized as a predictive marker of early post-operative recurrence but literature about plexitis in Crohn's disease is confusing due to the various parameters taken in account to define plexites, to the diversity and localization of implicated immune cells, and to the basic hematoxylin eosin histological technique to identify plexitis. So, in the present study, we restricted our investigation to the T cell infiltrates and used double immunohistochemistry to only count T cells clearly in close proximity to neural cells. We found infiltrating T cells in the myenteric ganglia of cancer (Lemmens et al., 2017; Sokol et al., 2009) and CD (Bressenot and Peyrin-Biroulet, 2015; Decousus et al., 2016; Sokol et al., 2009) patients as previously reported, and we showed that these infiltrating T cells were in close proximity with Hu-positive neurons and S100 β -positive EGC. Quantification analyzes indicated a higher number of T cells in close proximity of ECG in the myenteric ganglia of patients affected by CD (global and relapsing) as compared to cancer patients. These results confirm our preliminary observations (Pabois et al., 2020) and suggest that neuro-immune interactions between T cells and neural cells exist in steady-state in the myenteric plexus and then, increase in case of chronic inflammatory digestive diseases. Studies with a larger number of patients are required to define the cut-off value beyond which patients will have a high risk of relapse, and then, should follow a preventive treatment. In this aim, double immunohistochemistry against markers of immune and neural cells should of a great help to quantify plexitis and standardize their evaluation.

T cell adhesion to EGC is increased if EGC were previously exposed to LPS or IL1 β /TNF α . Change of EGC in reaction to pro-inflammatory stimuli was already emphasized (von Boyen, 2004; Liñán-Rico et al., 2016; Valès et al., 2018), and our present data suggest that this plasticity may favor the formation of plexitis in case of CD. Indeed, tight-junction and epithelial alterations in the BEI in case of mild active CD (Zeissig et al., 2007) has been suggested to favor the entrance of bacterial fragments in addition to other ways of bacterial invasion in case of CD (Merga et al., 2014). EGC may then be exposed to bacterial fragments and LPS which in turn, may favor the adhesion of T cells to EGC. Moreover, as EGC can produce IL1 β and TNF α in response LPS treatment (Murakami et al., 2009; Rosenbaum et al., 2016; Guedia et al., 2016), an amplification loop may occur, increasing EGC-T cell interactions in the myenteric plexus. Interestingly, *in situ* hybridization analyzes on intestinal mucosal biopsies of IBD patients revealed an increased expression by epithelial cells and lamina propria cell of IL1 β and TNF α in active zone but also in non-active zone/ uninvolved region (Woywodt et al., 1994). This local production may favor T cell accumulation in close proximity to EGC in inflamed zone but also away from the inflamed zone.

One possibility concerning the changes in EGC which favor their interactions with T cells is an increased expression of adhesion molecules. Indeed, we provide the first evidence that exposure of rat and human EGC to IL1 β and TNF α stimulates *in vitro* the production of ICAM-1. Similar upregulation was previously observed in cultures of human astrocytes (Aloisi et al., 1992; Ballestas and Benveniste, 1995; Frohman et al., 1989) but also in Schwann cells (Lisak and Bealmeir, 1997), oligodendrocytes (Satoh et al., 1991) and microglia cells (Shrikant et al., 1995). Induction of ICAM-1 in ECG in response to inflammatory stimuli remains to be determined *in vivo* but increased production of ICAM-1 was reported in CD patients (Vainer and Nielsen, 2000) and an up-regulation of ICAM-1 mRNA was observed in the whole enteric nervous ganglia of CD patients refractory to treatment (Smyth et al., 2013). To examine a potential implication of ICAM-1 in the adhesion of T cells to EGC, we have carried out blocking experiments. The decrease in the number of T cells adhering to EGC after the exposure of rat EGC to anti-ICAM1 antibodies support an implication of these adhesion molecule in the adhesion of T cells to EGC. Similar results were observed in culture of astrocyte, except that a combination of anti-ICAM-1 and anti-VCAM-1 antibody was necessary to significantly reduce the percentage of T cells adhering to astrocytes (Filipello et al., 2016).

ICAM-1 link to LFA-1, a cell membrane protein naturally expressed by T cells in its inactive form. Upon TCR engagement or chemokine receptor as well selectin signals, LFA-1 acquires high affinity for ICAM-1 (Hogg et al., 2011). Here, we show that treatment of T cells with the LFA-1 antagonist, lifitegrast, inhibits the adhesion of activated T cells to EGC in culture. This result substantiates the implication of ICAM-1/LFA-1 in the interactions between T cells and EGC. An involvement of these adhesion molecules in the infiltration of T cells in the myenteric plexus raises the possibility that the blockage of ICAM-1 binding to LFA-1 *in vivo* reduces the formation of plexitis and the development of colitis. Previous attempts of ICAM-1/LFA-1 neutralization in animal models of colitis showed beneficial effects (Hamamoto et al., 1999; Taniguchi et al., 1998) or no effect (Burns et al., 2001; Soriano et al., 2000). So, clinical trials were carried out based on the administration of 20-base antisense oligonucleotides (Alicaforsen) targeting ICAM-1. After promising phase-II clinical trials (Yacyshyn et al., 1998), larger clinical trials did not demonstrate a significant efficacy of Alicaforsen as compared to placebo.(Schreiber et al., 2001; Yacyshyn et al., 2007, 2002). Lack of efficacy was suggested to be due to reduce availability of the antisense to target cells but also to the redundancy of adhesion molecules involved in the recruitment of leukocytes into the gut (Jairath et al., 2017; Soriano et al., 2000). Instead of targeting ICAM-1, our strategy was to target LFA-1 using the lifitegrast, already approved in dry eye disease therapy (Keating, 2017; Sun et al., 2013). Systemic administration of the lifitegrast in the Winnie mice which spontaneously develop colitis(Heazlewood et al., 2008; Eri et al., 2011) show beneficial effects, including the reduction of colitis symptoms, inflammation and dysmobility. Interestingly, a lower amount of T cells in close proximity to EGC in myenteric plexus was observed. As Winnie mice already present plexitis at 14-weeks post-natal, the reduction of T cell infiltration after lifitegrast treatment suggests that T cell recruitment in the myenteric ganglia is continuous during in disease's progression.

In complement to the demonstration that T cells are present in larger number in close proximity with EGC in case of CD, it remains to determine the functional consequences of such adhesion. Studies on glia of the central nervous system showed that interactions between T cells and astrocytes contribute to increase ectonucleotidase in CD4+ T cellassociated with an immunosuppressive-like phenotype (Filipello et al., 2016) and exert a cytotoxic action on astrocytes without induction of T cell proliferation (Aloisi et al., 1998). So, deciphering the consequences of EGC-T cell interactions on their respective phenotype may help in understanding some of the mechanisms implicated in the recurrence of CD.

Références

- Aloisi, F., Borsellino, G., Samoggia, P., Testa, U., Chelucci, C., Russo, G., Peschle, C., Levi, G., 1992. Astrocyte cultures from human embryonic brain: characterization and modulation of surface molecules by inflammatory cytokines. *J. Neurosci. Res.* 32, 494–506. <https://doi.org/10.1002/jnr.490320405>
- Aloisi, F., Ria, F., Penna, G., Adorini, L., 1998. Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J. Immunol.* 160, 4671–4680.
- Ballestas, M.E., Benveniste, E.N., 1995. Interleukin 1-beta- and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of ICAM-1 gene expression in astrocytes requires protein kinase C activity. *Glia* 14, 267–278. <https://doi.org/10.1002/glia.440140404>
- Bonnamain, V., Mathieu, E., Thinard, R., Thebault, P., Nerriere-Daguin, V., Leveque, X., Anegon, I., Vanhove, B., Neveu, I., Naveilhan, P., 2012. Expression of Heme Oxygenase-1 in Neural Stem/Progenitor Cells as a Potential Mechanism to Evade Host Immune Response. *Stem Cells* 30, 2342–2353. <https://doi.org/10.1002/stem.1199>
- Bressenot, A., Chevaux, J.-B., Williet, N., Oussalah, A., Germain, A., Gauchotte, G., Wissler, M.-P., Vignaud, J.-M., Bresler, L., Bigard, M.-A., Plénat, F., Guéant, J.-L., Peyrin-Biroulet, L., 2013. Submucosal plexitis as a predictor of postoperative surgical recurrence in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 1654–1661. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e318281f336>
- Bressenot, A., Peyrin-Biroulet, L., 2015. Histologic features predicting postoperative Crohn's disease recurrence. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 468–475. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000224>
- Burns, R.C., Rivera-Nieves, J., Moskaluk, C.A., Matsumoto, S., Cominelli, F., Ley, K., 2001. Antibody blockade of ICAM-1 and VCAM-1 ameliorates inflammation in the SAMP-1/Yit adoptive transfer model of Crohn's disease in mice. *Gastroenterology* 121, 1428–1436. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.29568>
- Chassaing, B., Srinivasan, G., Delgado, M.A., Young, A.N., Gewirtz, A.T., Vijay-Kumar, M., 2012. Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS ONE* 7, e44328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044328>
- Decousus, S., Boucher, A.-L., Joubert, J., Pereira, B., Dubois, A., Goutorbe, F., Déchelotte, P.J., Bommelaer, G., Buisson, A., 2016. Myenteric plexitis is a risk factor for endoscopic and clinical postoperative recurrence after ileocolonic resection in Crohn's disease. *Dig Liver Dis* 48, 753–758. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2016.02.023>
- Eri, R.D., Adams, R.J., Tran, T.V., Tong, H., Das, I., Roche, D.K., Oancea, I., Png, C.W., Jeffery, P.L., Radford-Smith, G.L., Cook, M.C., Florin, T.H., McGuckin, M.A., 2011. An intestinal epithelial defect conferring ER stress results in inflammation involving both innate and adaptive immunity. *Mucosal Immunol* 4, 354–364. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.74>
- Ferrante, M., de Hertogh, G., Hlavaty, T., D'Haens, G., Penninckx, F., D'Hoore, A., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Geboes, K., van Assche, G., 2006. The value of myenteric plexitis to predict early postoperative Crohn's disease recurrence. *Gastroenterology* 130, 1595–1606. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.02.025>
- Filipello, F., Pozzi, D., Proietti, M., Romagnani, A., Mazzitelli, S., Matteoli, M., Verderio, C., Grassi, F., 2016. Ectonucleotidase activity and immunosuppression in astrocyte-CD4 T cell bidirectional signaling. *Oncotarget* 7, 5143–5156. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6914>
- Finney, H.M., Akbar, A.N., Lawson, A.D.G., 2004. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol* 172, 104–113. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.104>
- Frohman, E.M., Frohman, T.C., Dustin, M.L., Vayuvegula, B., Choi, B., Gupta, A., van den Noort, S., Gupta, S., 1989. The induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression on human fetal astrocytes by interferon-gamma, tumor necrosis factor alpha, lymphotoxin, and

- interleukin-1: relevance to intracerebral antigen presentation. *J. Neuroimmunol.* 23, 117–124. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(89\)90030-1](https://doi.org/10.1016/0165-5728(89)90030-1)
- Gionchetti, P., Dignass, A., Danese, S., Magro Dias, F.J., Rogler, G., Lakatos, P.L., Adamina, M., Ardizzone, S., Buskens, C.J., Sebastian, S., Laureti, S., Sampietro, G.M., Vucelic, B., van der Woude, C.J., Barreiro-de Acosta, M., Maaser, C., Portela, F., Vavricka, S.R., Gomollón, F., ECCO, 2017. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 2: Surgical Management and Special Situations. *J Crohns Colitis* 11, 135–149. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw169>
- Guedia, J., Brun, P., Bhave, S., Fitting, S., Kang, M., Dewey, W.L., Hauser, K.F., Akbarali, H.I., 2016. HIV-1 Tat exacerbates lipopolysaccharide-induced cytokine release via TLR4 signaling in the enteric nervous system. *Sci Rep* 6, 31203. <https://doi.org/10.1038/srep31203>
- Gwynne, R.M., Thomas, E.A., Goh, S.M., Sjövall, H., Bornstein, J.C., 2004. Segmentation induced by intraluminal fatty acid in isolated guinea-pig duodenum and jejunum. *J. Physiol. (Lond.)* 556, 557–569. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.057182>
- Hamamoto, N., Maemura, K., Hirata, I., Murano, M., Sasaki, S., Katsu, K., 1999. Inhibition of dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice by intracolonically administered antibodies against adhesion molecules (endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) or intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)). *Clin. Exp. Immunol.* 117, 462–468. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00985.x>
- Heazlewood, C.K., Cook, M.C., Eri, R., Price, G.R., Tauro, S.B., Taupin, D., Thornton, D.J., Png, C.W., Crockford, T.L., Cornall, R.J., Adams, R., Kato, M., Nelms, K.A., Hong, N.A., Florin, T.H.J., Goodnow, C.C., McGuckin, M.A., 2008. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med.* 5, e54. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050054>
- Hogg, N., Patzak, I., Willenbrock, F., 2011. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 416–426. <https://doi.org/10.1038/nri2986>
- 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., Eberl, G., Grice, E.A., Veiga-Fernandes, H., 2016. Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature* 535, 440–443. <https://doi.org/10.1038/nature18644>
- Jairath, V., Khanna, R., Feagan, B.G., 2017. Alicaforsen for the treatment of inflammatory bowel disease. *Expert Opin Investig Drugs* 26, 991–997. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1349753>
- Keating, G.M., 2017. Lifitegrast Ophthalmic Solution 5%: A Review in Dry Eye Disease. *Drugs* 77, 201–208. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0681-1>
- Lemmens, B., de Buck van Overstraeten, A., Arijs, I., Sagaert, X., Van Assche, G., Vermeire, S., Tertychnyy, A., Geboes, K., Wolthuis, A., D'Hoore, A., De Hertogh, G., Ferrante, M., 2017. Submucosal Plexitis as a Predictive Factor for Postoperative Endoscopic Recurrence in Patients with Crohn's Disease Undergoing a Resection with Ileocolonic Anastomosis: Results from a Prospective Single-centre Study. *J Crohns Colitis*. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw135>
- Liñán-Rico, A., Turco, F., Ochoa-Cortes, F., Harzman, A., Needleman, B.J., Arsenescu, R., Abdel-Rasoul, M., Fadda, P., Grants, I., Whitaker, E., Cuomo, R., Christofi, F.L., 2016. Molecular Signaling and Dysfunction of the Human Reactive Enteric Glial Cell Phenotype: Implications for GI Infection, IBD, POI, Neurological, Motility, and GI Disorders. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 1812–1834. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000854>
- Lisak, R.P., Bealmear, B., 1997. Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on rat Schwann cells in vitro: comparison of interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 2, 233–243.
- Matheis, F., Muller, P.A., Graves, C.L., Gabanyi, I., Kerner, Z.J., Costa-Borges, D., Ahrends, T., Rosenstiel, P., Mucida, D., 2020. Adrenergic Signaling in Muscularis Macrophages Limits

- Infection-Induced Neuronal Loss. *Cell* 180, 64-78.e16.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.002>
- Merga, Y., Campbell, B.J., Rhodes, J.M., 2014. Mucosal Barrier, Bacteria and Inflammatory Bowel Disease: Possibilities for Therapy. *DDI* 32, 475–483. <https://doi.org/10.1159/000358156>
- Milassin, Á., Sejben, A., Tiszlavicz, L., Reisz, Z., Lázár, G., Szűcs, M., Bor, R., Bálint, A., Rutka, M., Szepes, Z., Nagy, F., Farkas, K., Molnár, T., 2017. Analysis of risk factors - especially different types of plexitis - for postoperative relapse in Crohn's disease. *World J Gastrointest Surg* 9, 167–173. <https://doi.org/10.4240/wjgs.v9.i7.167>
- Misteli, H., Koh, C.E., Wang, L.M., Mortensen, N.J., George, B., Guy, R., 2015. Myenteric plexitis at the proximal resection margin is a predictive marker for surgical recurrence of ileocaecal Crohn's disease. *Colorectal Dis* 17, 304–310. <https://doi.org/10.1111/codi.12896>
- Muller, P.A., Koscsó, B., Rajani, G.M., Stevanovic, K., Berres, M.-L., Hashimoto, D., Mortha, A., Leboeuf, M., Li, X.-M., Mucida, D., Stanley, E.R., Dahan, S., Margolis, K.G., Gershon, M.D., Merad, M., Bogunovic, M., 2014. Crosstalk between Muscularis Macrophages and Enteric Neurons Regulates Gastrointestinal Motility. *Cell* 158, 300–313.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.050>
- Murakami, M., Ohta, T., 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. <https://doi.org/10.1002/jnr.22036>
- Pabois, J., Durand, T., Le Berre, C., Gonzales, J., Neunlist, M., Bourreille, A., Naveilhan, P., Neveu, I., 2020. T cells show preferential adhesion to enteric neural cells in culture and are close to neural cells in the myenteric ganglia of Crohn's patients. *Journal of Neuroimmunology* 349, 577422. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577422>
- Rahman, A.A., Robinson, A.M., Jovanovska, V., Eri, R., Nurgali, K., 2015. Alterations in the distal colon innervation in Winnie mouse model of spontaneous chronic colitis. *Cell Tissue Res.* 362, 497–512. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2251-3>
- Rosenbaum, C., Schick, M.A., Wollborn, J., Heider, A., Scholz, C.-J., Cecil, A., Niesler, B., Hirrlinger, J., Walles, H., Metzger, M., 2016. Activation of Myenteric Glia during Acute Inflammation In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE* 11, e0151335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151335>
- Satoh, J., Kastrukoff, L.F., Kim, S.U., 1991. Cytokine-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cultured human oligodendrocytes and astrocytes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 50, 215–226. <https://doi.org/10.1097/00005072-199105000-00004>
- Schreiber, S., Nikolaus, S., Malchow, H., Kruis, W., Lochs, H., Raedler, A., Hahn, E.G., Krummenerl, T., Steinmann, G., German ICAM-1 Study Group, 2001. Absence of efficacy of subcutaneous antisense ICAM-1 treatment of chronic active Crohn's disease. *Gastroenterology* 120, 1339–1346. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.24015>
- Shrikant, P., Weber, E., Jilling, T., Benveniste, E.N., 1995. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression by glial cells. Differential mechanisms of inhibition by IL-10 and IL-6. *J. Immunol.* 155, 1489–1501.
- Smyth, C.M., Akasheh, N., Woods, S., Kay, E., Morgan, R.K., Thornton, M.A., O'Grady, A., Cummins, R., Sheils, O., Smyth, P., Gleich, G.J., Murray, F.M., Costello, R.W., 2013. Activated eosinophils in association with enteric nerves in inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* 8, e64216.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064216>
- Sokol, H., Polin, V., Lavergne-Slove, A., Panis, Y., Treton, X., Dray, X., Bouhnik, Y., Valleur, P., Marteau, P., 2009. Plexitis as a predictive factor of early postoperative clinical recurrence in Crohn's disease. *Gut* 58, 1218–1225. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.177782>
- Soret, R., Coquenlonge, S., Cossais, F., Meurette, G., Rolli-Derkinderen, M., 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.
<https://doi.org/10.1111/nmo.12200>

- Soriano, A., Salas, A., Salas, A., Sans, M., Gironella, M., Elena, M., Anderson, D.C., Piqué, J.M., Panés, J., 2000. VCAM-1, but not ICAM-1 or MAdCAM-1, immunoblockade ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Lab. Invest.* 80, 1541–1551.
- Stavely, R., Fraser, S., Sharma, S., Rahman, A.A., Stojanovska, V., Sakkal, S., Apostolopoulos, V., Bertrand, P., Nurgali, K., 2018. The Onset and Progression of Chronic Colitis Parallels Increased Mucosal Serotonin Release via Enterochromaffin Cell Hyperplasia and Downregulation of the Serotonin Reuptake Transporter. *Inflamm. Bowel Dis.* 24, 1021–1034. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy016>
- Sun, Y., Zhang, R., Gadek, T.R., O'Neill, C.A., Pearlman, E., 2013. Corneal inflammation is inhibited by the LFA-1 antagonist, lifitegrast (SAR 1118). *J Ocul Pharmacol Ther* 29, 395–402. <https://doi.org/10.1089/jop.2012.0102>
- Taniguchi, T., Tsukada, H., Nakamura, H., Kodama, M., Fukuda, K., Saito, T., Miyasaka, M., Seino, Y., 1998. Effects of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody on dextran sodium sulphate-induced colitis in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 945–949. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.1998.tb00766.x>
- Vainer, B., Nielsen, O.H., 2000. Changed colonic profile of P-selectin, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-2, and ICAM-3 in inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* 121, 242–247. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01296.x>
- Valès, S., Touvron, M., Van Landeghem, L., 2018. Enteric glia: Diversity or plasticity? *Brain Res.* 1693, 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.02.001>
- von Boyen, G.B.T., 2004. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* 53, 222–228. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.012625>
- Woywodt, A., Neustock, P., Kruse, A., Schwarting, K., Ludwig, D., Stange, E.F., Kirchner, H., 1994. Cytokine expression in intestinal mucosal biopsies. In situ hybridisation of the mRNA for interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in inflammatory bowel disease. *Eur. Cytokine Netw.* 5, 387–395.
- Yacyshyn, B., Chey, W.Y., Wedel, M.K., Yu, R.Z., Paul, D., Chuang, E., 2007. A randomized, double-masked, placebo-controlled study of alicaforsen, an antisense inhibitor of intercellular adhesion molecule 1, for the treatment of subjects with active Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.11.001>
- Yacyshyn, B.R., Bowen-Yacyshyn, M.B., Jewell, L., Tami, J.A., Bennett, C.F., Kisner, D.L., Shanahan, W.R., 1998. A placebo-controlled trial of ICAM-1 antisense oligonucleotide in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* 114, 1133–1142.
- Yacyshyn, B.R., Chey, W.Y., Goff, J., Salzberg, B., Baerg, R., Buchman, A.L., Tami, J., Yu, R., Gibiansky, E., Shanahan, W.R., ISIS 2302-CS9 Investigators, 2002. Double blind, placebo controlled trial of the remission inducing and steroid sparing properties of an ICAM-1 antisense oligodeoxynucleotide, alicaforsen (ISIS 2302), in active steroid dependent Crohn's disease. *Gut* 51, 30–36. <https://doi.org/10.1136/gut.51.1.30>
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., 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. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.094375>

Supplemental data

Demographics, clinical, histological and endoscopic data	Total (n=24)
Sex, n (%)	
Male	11 (45.8)
Age at diagnosis (years), median [IQR] ^a	24.0 [20.0-41.8]
Disease duration before first ileo-colonic resection (years), median [IQR] ^a	2.0 [0.8-8.5]
Age at index resection (years), median [IQR]	42.0 [27.5-49.5]
Previous surgery, n (%)	6 (25.0)
Disease location, n (%) ^b	
Small Bowel (L1)	10 (41.7)
Colonic (L2)	2 (8.3)
Ileocolonic (L3)	11 (45.8)
Upper digestive tract (L4)	0 (0.0)
Perianal disease (p), n (%) ^b	
Inactive lesions	2 (8.3)
Active lesions (Cardiff classification)	
Ulcerations	0 (0.0)
Fistula/Abscess	1 (4.2)
Stricture	1 (4.2)
Disease behavior, n (%) ^b	
Inflammatory (B1)	1 (4.2)
Stricturing (B2)	16 (66.7)
Penetrating (B3)	6 (25.0)
Smoking status at the time of index surgery, n (%) ^c	
Never smoker	5 (20.8)
Past smoker	5 (20.8)
Active smoker	11 (45.8)
CRP > 5 mg/L at the time of index surgery, n (%) ^d	8 (41.7)
Surgical conditions	
Emergency surgery, n (%)	6 (25.0)
Elective surgery, n (%)	18 (75.0)
Anastomosis, n (%)	18 (75.0)
Pre-operative treatment, n (%) ^e	
No treatment or 5-ASA	6 (25.0)
Corticosteroids	3 (12.5)
Immunosuppressors (methotrexate, thiopurines)	14 (58.3)
Anti-TNF	11 (45.8)
Vedolizumab	1 (4.2)
Combotherapy immunosuppressors + biologics	9 (37.5)
Antibiotics	1 (4.2)
Post-operative treatment, n (%) ^{b,e}	
No treatment or 5-ASA	5 (20.8)
Corticosteroids	0 (0.0)
Immunosuppressors (methotrexate, thiopurines)	8 (33.3)
Anti-TNF	10 (41.7)
Vedolizumab	1 (4.2)
Combotherapy immunosuppressors + biologics	4 (16.7)

Antibiotics	2 (8.3)
Presence of granulomata on histological specimens, n (%) ^c	8 (33.3)
Delay of colonoscopy after index surgery (days), median [IQR] ^f	236.5 [167.0-278.8]
Rutgeerts score ^f	
i,0 , n (%)	8 (33.3)
i,1 , n (%)	2 (8.3)
i,2 , n (%)	4 (16.7)
i,3 , n (%)	1 (4.2)
i,4 , n (%)	2 (8.3)
Clinical recurrence at 18 months, n (%)^c	4 (16.7)

Table I: Socio-demographic, clinical, histologic and endoscopic data of patients with Crohn's disease (T cell infiltration analyzes).

Culture number	11
Age year, median (min/max)	68 (43/83)
Sex , Female/male	4/7
Diseases	
Cancer	9/11
Stenosis	1/11
Diverticulitis	1/11
Origin of the myenteric ganglia	
Colon	10/11
Ileum	1/11

Table II : Clinical features on myenteric human EGC used for *in vitro* co-culture

Target	Clone	Reactivity	Isotype	Host	Compagny (dilution)
S100 β	Polyclonal	Rat	na	Rabbit	Dako Agilent (1/3)
S100 β	Polyclonal	Mouse	na	Rabbit	Abcam - ab52642 (1/500)
ICAM-1	1A 29	Rat	IgG1, κ	Mouse	BD Bioscience - 554967 (1/200)
ICAM-1	BBIG-I1 (11C81)	Human	IgG1	Mouse	R&D Biotechne – BBA3 (1/200)
ICAM-1	YN1/1.7.4	Mouse	IgG2b ,κ	Rat	Abcam - ab119871 (1/200)
CD3	17 A2	Mouse	IgG2b ,κ	Rat	BD Bioscience - BD 555273 (1/200)

Tableau II : Table of primary antibodies.

Résultats complémentaires

Nos travaux ont montré que l'activation des lymphocytes T ou le traitement des CGE par des LPS ou de l'IL1- β /TNF- α favorisait l'adhésion des lymphocytes T aux CGE, avec une implication partielle des molécules d'adhésion ICAM-1/LFA-1. Ces résultats ont été obtenus avec des cellules d'origine murine mais également humaine. Pour compléter notre étude sur les interactions cellulaires CGE-LT au sein des plexites, nous avons effectué différentes analyses en co-cultures et sur des résections intestinales de patients contrôle et Crohn.

1. Etude de l'adhésion des LT en fonction de l'origine des CGE (contrôle vs Crohn)

Lors de nos travaux, nous avons utilisé des CGE dérivées de résections issues de patients atteints de cancer, communément considérés comme patients contrôles car les prélèvements ont été effectués à distance de la tumeur. La mise en évidence *in vitro* que les CGE dérivées de patients contrôles avaient des profils et des actions différents de CGE dérivées de patients Crohn (Pochard et al., 2016) nous a incités à comparer l'adhésion des LT dans des co-cultures selon l'origine des cellules gliales myéntériques (contrôles ou de zone macroscopiquement saine de patients Crohn). Les CGE ont été prétraitées, ou non, pendant 24h par du LPS ou de l'IL1 β /TNF α . Quant aux LT, ils ont été triés à partir de PBMC d'un donneur sain et activés par des anticorps anti-CD3/CD28. Après deux heures de co-cultures (ratio 1 :1), les cellules ont été marquées par immunocytochimie.

L'analyse comparative n'a pas révélé de différence significative du nombre de LT adhérant aux CGE contrôles ou Crohn, que ce soit avec des CGE non traitées (Fig. 20A, Glie native, $p=0.38$), prétraitées par du LPS (20-B, $p=0.89$), ou prétraitées par de l'IT (20-C, $p=0.68$).

Nous avons également comparé les niveaux d'expression de l'ARNm d'ICAM-1 dans les CGE issues de donneurs contrôles ou Crohn. Les analyses n'ont pas rapporté de différence significative (Fig.21).

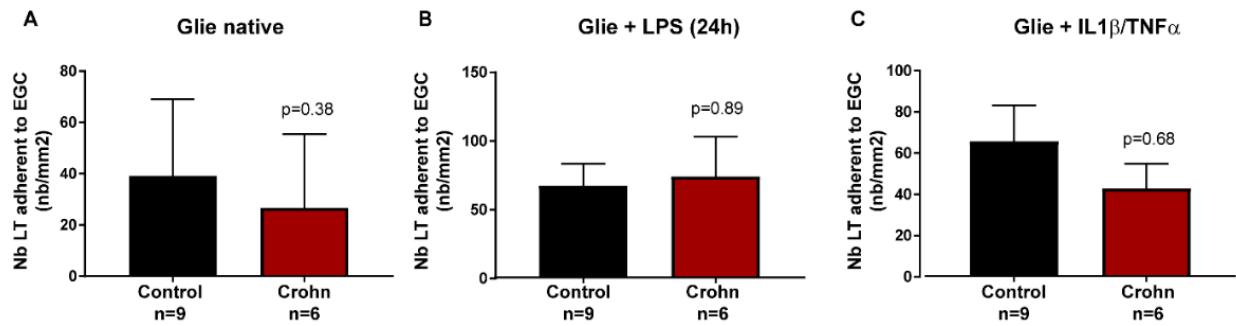


Figure 20 : Nombre de LT adhérant aux CGE issues de patients contrôles ou Crohn. Les LT activés ont été incubés en présence des CGE pendant deux heures, puis le nombre de LT adhérant aux CGE a été estimé et exprimé en fonction de la surface gliale S100 β en mm². **A :** Nombre de LT adhérant aux CGE non traitées. **B :** Nombre de LT adhérant aux CGE prétraitées avec du LPS (24h). **C :** Nombre de LT adhérant aux CGE prétraitées avec de l'IL1- β /TNF α (IT,24h). Les données sont exprimées en moyenne +/- S.E.M. La p-value est le résultat du test non paramétrique Mann-Whitney.

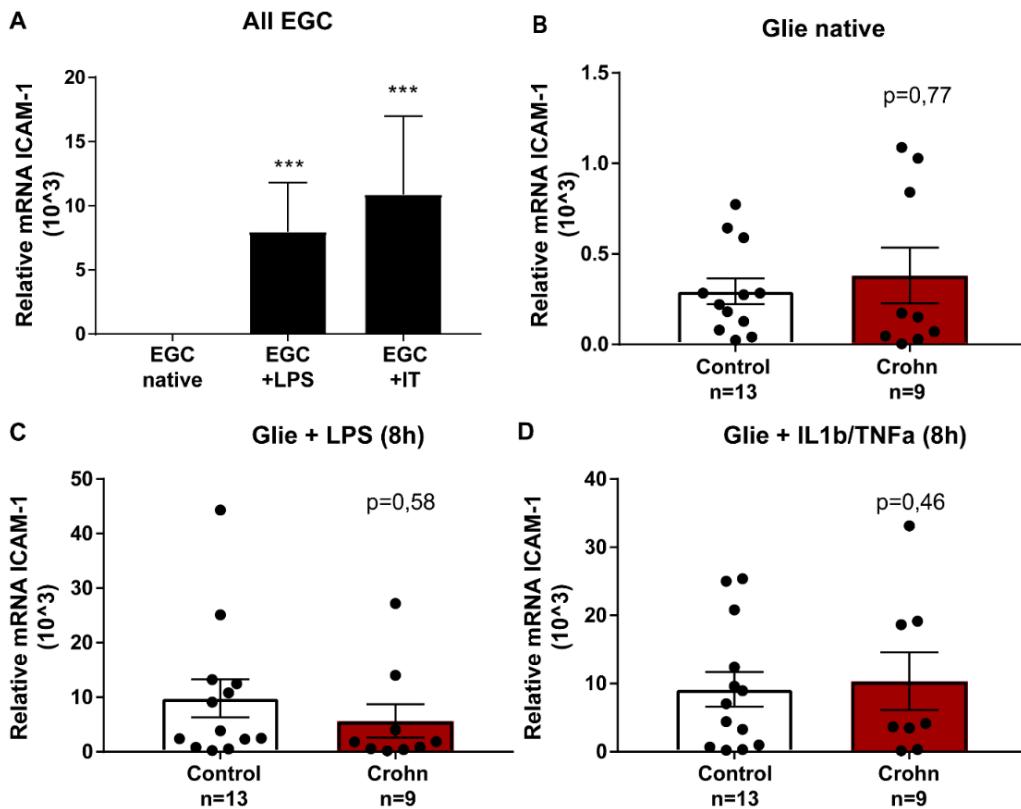


Figure 21 : Expression des transcrits ICAM-1 dans les CGE issues de patients contrôles ou Crohn en condition native (non-traitées) ou après 8h de stimulation par du LPS ou le cocktail IT (IL1 β /TNF α). **A :** Expression relative des transcrits ICAM-1 dans un pool de CGE issues de patients contrôles et Crohn. **B-C-D :** Expression des transcrits ICAM-1 dans les CGE issues de patients contrôles (blanc, control) ou Crohn (rouge, Crohn) sans stimulation (B) ou après une stimulation pro-inflammatoire avec du LPS (C) ou de l'IL1 β /TNF α (D). Les valeurs ont été normalisées par un gène de ménage (RPS6). Les données sont représentées par la moyenne +/- S.E.M. La p-value est le résultat du test non paramétrique Mann-Whitney.

2. Etude de l'adhésion des sous-populations de LT CD4+ et CD8+ d'origine murine

Les travaux mentionnés dans le manuscrit 2 portent sur la population globale de lymphocytes T, mais nous avons également recherché si les sous-populations de LT CD4+ et CD8+ étaient susceptibles d'adhérer préférentiellement aux CGE. Dans un premier temps, les co-cultures ont été réalisées à partir de LT spléniques de rat. Le nombre de cellules CD4+ et CD8+ adhérant aux CGE était significativement plus important lors de co-cultures avec des CGE prétraitées par du LPS ou de l'IL1- β /TNF- α , par rapport à des co-cultures avec des CGE non traitées (Fig. 22A-B). Toutefois, aucune différence dans les proportions de cellules CD4/CD8 n'a été observée (Fig. 22C).

Afin de déterminer si les LT issus des ganglions mésentériques avaient la même capacité d'adhésion, le même protocole de co-culture a été appliqué. Des résultats similaires ont été obtenus (Fig. 22D-F).

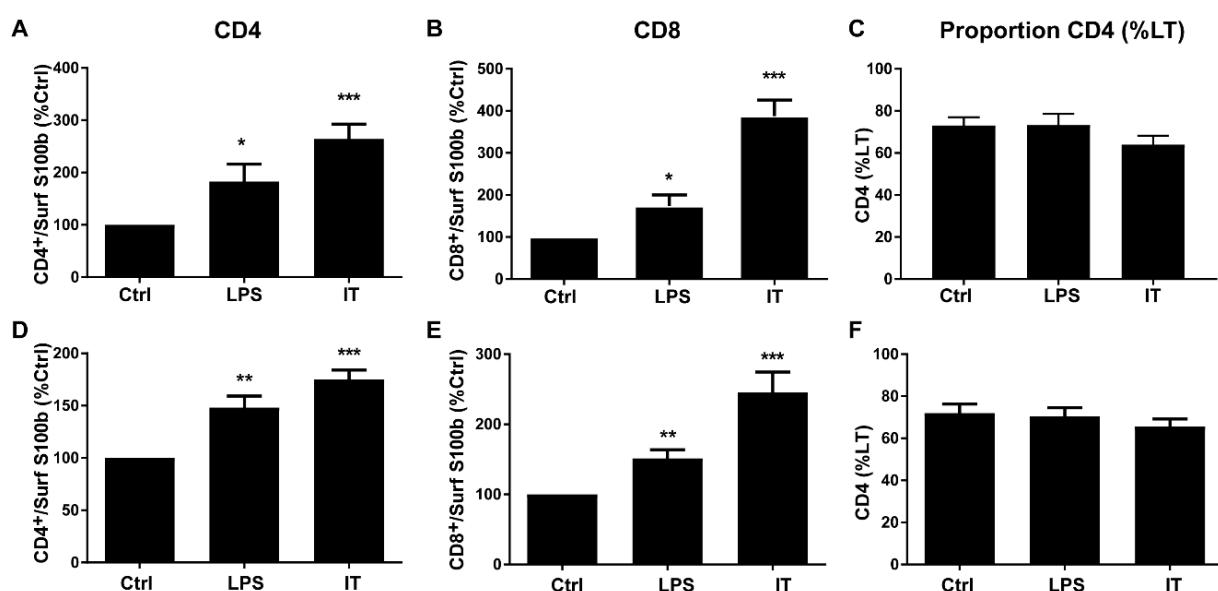


Figure 22 : Etude comparative de l'adhésion des LT CD4+ et CD8+ à des CGE. Des LT issus de splénocytes (A-C, $n=8-10$) ou de ganglions mésentériques (D-F, $n=9-10$) ont été activés et mis en culture pendant deux heures avec des CGE myéntériques de rat, traitées ou non par du LPS ou de l'IL1 β /TNF α . Après immunomarquage, les cellules CD4+ et CD8+ adhérant aux CGE ont été comptées. Les données sont représentées par la moyenne +/- S.E.M et exprimées en pourcentage de la condition contrôle. Le test ANOVA 1 voie non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunn's a été utilisé pour les statistiques avec * $p<0.05$, ** $p<0.01$ et *** $p>0.001$.

3. Implication d'ICAM-1/LFA-1 dans l'adhésion des LT CD4+ et CD8+ d'origine murine

Nos premières expériences *in vitro* ont révélé une implication d'ICAM-1/LFA-1 dans l'adhésion des LT aux CGE. Nous avons poursuivi cette étude en vérifiant l'implication de ces molécules d'adhésion dans l'adhérence des deux sous-types de LT. Pour ce faire, des LT spléniques ou mésentériques ont été incubés avec le lifitegrast, un inhibiteur de la liaison de LFA-1 à ICAM-1, avant leur co-culture avec des CGE prétraitées ou non par de l'IL1- β /TNF- α . L'adhésion des sous-populations CD4 et CD8 a été évaluée par comptage après un marquage par immunocytochimie. Les résultats ont montré que la pré-incubation des LT avec le lifitegrast diminuait significativement le nombre de LT CD4+ et CD8+, d'origine splénique (Fig. 23A-B) ou mésentérique (Fig. 23C-D), adhérant aux CGE prétraitées avec l'IL1- β /TNF- α .

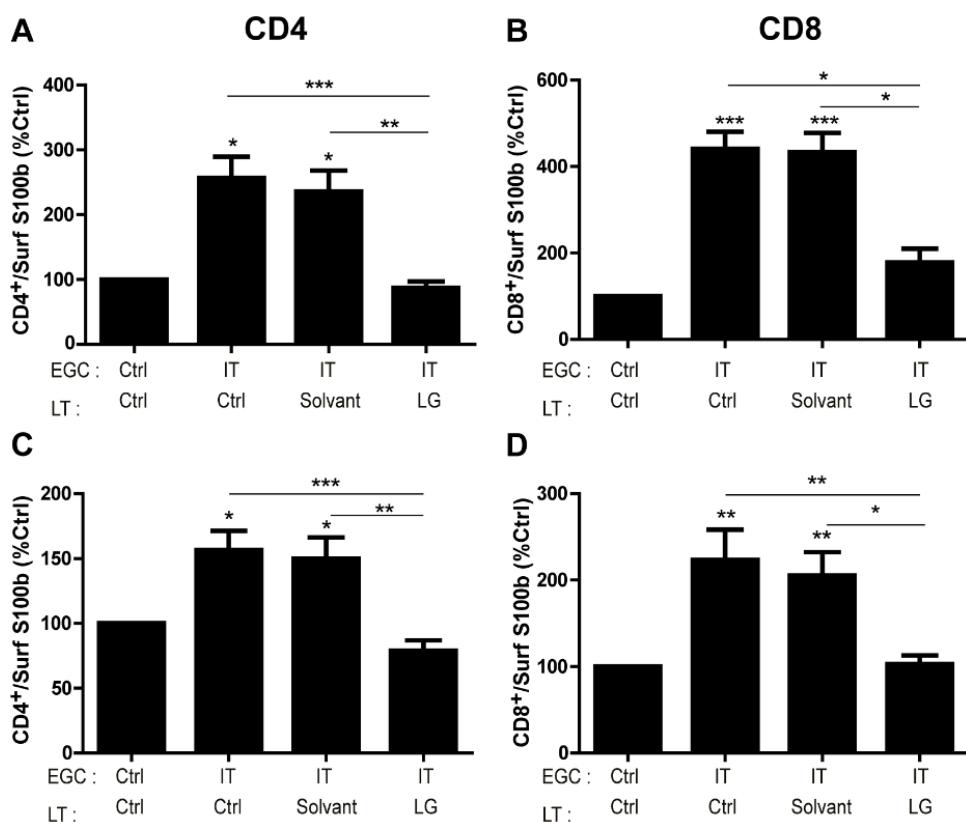


Figure 23 : Implication d'ICAM-1/LFA-1 dans l'adhésion des LT CD4+ et CD8+ aux CGE myentériques. Des LT spléniques (A-B, n=10) ou mésentériques (C-D, n=8) ont été activés, préincubé ou non avec du lifitegrast (LG) puis co-cultivés avec des CGE prétraitées ou non avec de l'IL1- β /TNF- α (IT). Après immunomarquage, les cellules CD4+ et CD8+ adhérant aux CGE ont été comptées. Les résultats sont représentés par la moyenne +/- S.E.M et exprimé en pourcentage de la condition contrôle. Le test ANOVA 1 voie non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunn's a été utilisé pour les statistiques avec * p<0.05, ** p<0.01 et *** p>0.001.

4. Etude de l'adhésion des LT CD4+ et CD8+ aux CGE d'origine humaine

Afin d'étudier l'adhésion des populations LT CD4+ et CD8+ d'origine humaine, les co-cultures ont été reproduites avec des LT dérivés de PBMC d'un donneur sain et des CGE myentériques issues de patients contrôles. Des résultats similaires à ceux observés avec les cultures murines ont été obtenus, à savoir que le prétraitement des CGE humaines par le LPS ou par l'IL1 β /TNF α stimulait l'adhésion des LT CD4+ et CD8+ (Fig. 24A-C) et qu'un prétraitement des LT avec du lifitegrast inhibait significativement l'adhésion des LTCD4+ et CD8+ aux CGE prétraitées par de l'IL1 β /TNF α (Fig. 24D-F).

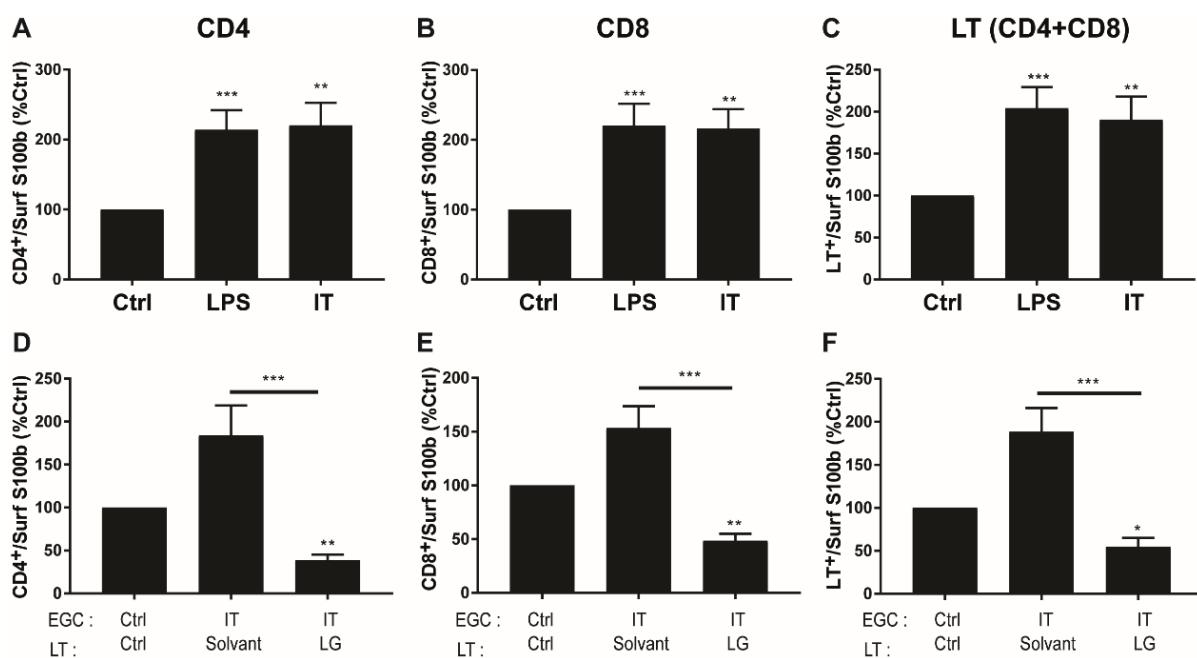


Figure 24 : Etude de l'adhésion des LT CD4+ et CD8+ aux CGE myentériques humaines.

A-C : Nombre de LT CD4+ et CD8+ adhérant aux CGE humaines prétraitées ou non avec du LPS ou de l'IL1- β /TNF- α (IT) ($n=10$). **D-F :** Implication d'ICAM-1/LFA-1 dans l'adhésion des LT CD4+ et CD8+ aux CGE humaines. Des LT issus de PBMC ont été activés, préincubés ou non avec du lifitegrast (LG) puis co-cultivés avec des CGE prétraitées ou non avec de l'IL1- β /TNF- α (IT). Après immunomarquage, les cellules CD4+ et CD8+ adhérant aux CGE ont été comptées ($n=10$). Les résultats sont représentés par la moyenne +/- S.E.M et exprimés en pourcentage de la condition contrôle. Le test ANOVA 1 voie non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunn's a été utilisé pour les statistiques avec * $p<0.05$, ** $p<0.01$ et *** $p>0.001$.

5. Etude des LT CD4+ et CD8+ dans les plexus myentériques de patients Crohn

Afin de compléter nos investigations sur les interactions cellulaires au sein des plexites, nous avons recherché les sous-populations LT CD4+ ou CD8+ au sein de notre cohorte de patients atteints de la maladie de Crohn (n=20) selon la même méthodologie que celle décrite dans l'article 2. Après une double immunohistochimie CD4/S100 β ou CD8/S100 β sur les coupes de résections intestinales proximales, les ganglions myentériques ont été analysés en microscopie apotome. Les observations ont montré la présence de LT CD4+ (Fig.25A-B) et CD8+ (Fig.25 C-D) en étroite proximité avec les CGE S100 β + au sein et autour des ganglions myentériques.

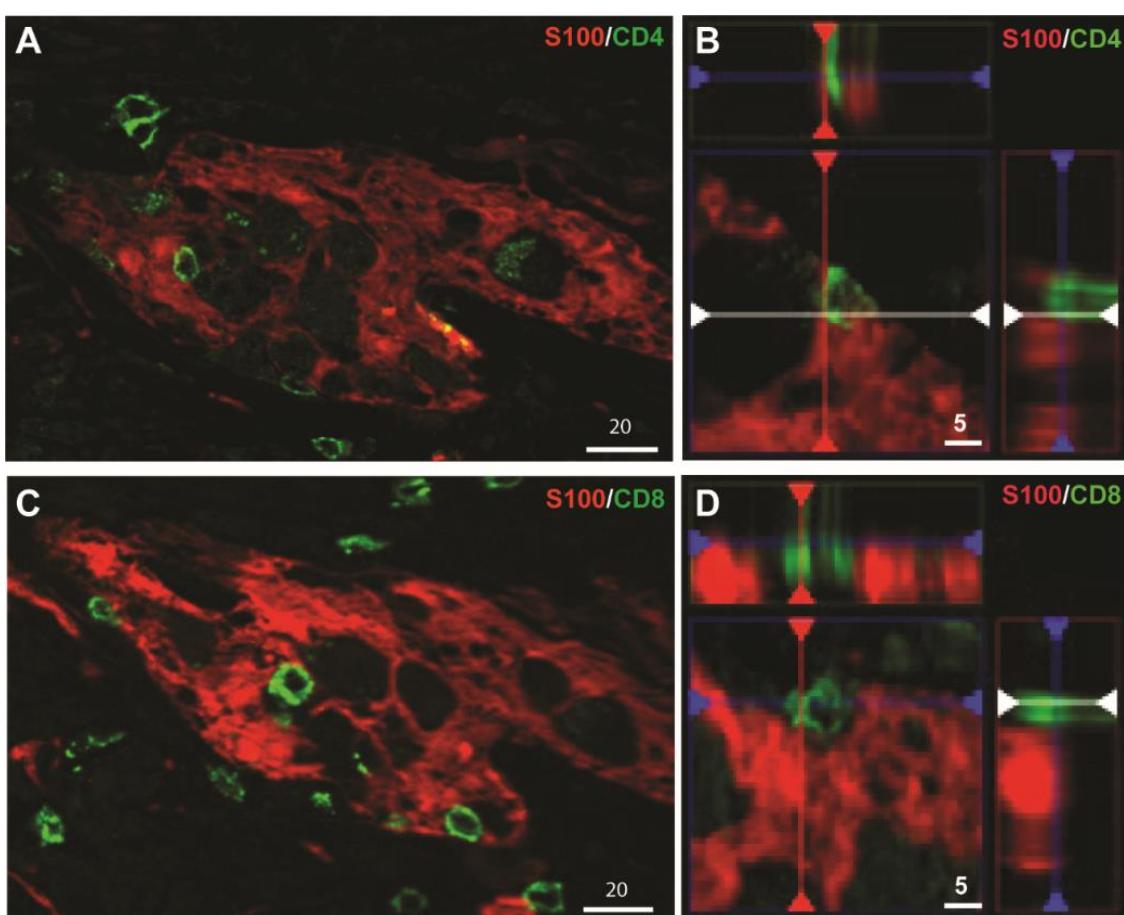


Figure 25 : Microographies illustrant la proximité des CGE S100 β + (rouge) avec les LT CD4+ ou CD8+ (vert). **A-B :** Microographies (A) et vue orthogonale associée (B) montrant l'étroite proximité entre les LT CD4+ (vert) et les CGE S100 β (rouge) au sein d'un ganglion myentérique de patient Crohn. **C-D :** Microographies (C) et vue orthogonale associée (D) montrant l'étroite proximité entre les LT CD8+ (vert) et les CGE S100 β (rouge) au sein d'un ganglion myentérique de patient Crohn.

Nous avons ensuite dénombré les LT CD4+ et CD8+ présents en étroite proximité ($<0,413\mu\text{m}$) avec les CGE S100 β + dans les ganglions myentériques et évalué le pourcentage de ganglions infiltrés par ces LT (Fig.26). Les analyses statistiques effectuées sur l'ensemble des patients Crohn n'ont révélé aucune différence dans le nombre moyen de LT CD4+ (0.70 +/- 0.17) ou de CD8+ (0.78 +/- 0.14) en étroite proximité avec les CGE S100 β +, ni dans les pourcentages de ganglions infiltrés par des LT CD4+ (32.6% +/- 5.7) ou CD8+ (39.3% +/- 5.5) (Fig.26A-B). Nous avons ensuite subdivisé les patients en fonction de la récurrence de la maladie (Fig.26C-F). Concernant les LT CD4+, aucune différence statistique du nombre moyen de CD4+ par ganglion, ni de pourcentage de ganglions infiltrés par des LT CD4+ n'a été observée (Fig. 26C-D). Concernant les LT CD8+, le nombre moyen par ganglion n'était pas augmenté de manière significative mais une tendance à la hausse a été observée (Fig. 26E p = 0,063). En revanche, le pourcentage de ganglions infiltrés par des LT CD8+ était plus important dans le groupe de patients ayant récidivés par rapport au groupe ne présentant pas de récidive (Fig. 26F).

En conclusion, lors de ces analyses complémentaires, nous n'avons pas observé de différence entre les CGE contrôles ou Crohn concernant l'adhésion des LT aux CGE ni dans l'expression des transcrits ICAM-1. L'analyse des LT CD4+ et CD8+ n'a pas révélé d'adhésion préférentielle de l'une ou l'autre sous-populations, que les co-cultures soient réalisées avec des LT isolées à partir de splénocytes, de ganglions mésentériques, ou de PBMC, et que les CGE soient d'origine murine ou humaine. Il est toutefois à noter que le pourcentage de ganglions infiltrés par des LT CD8+ était plus important dans le groupe de patients en récidive par rapport au groupe ne présentant pas de récidive.

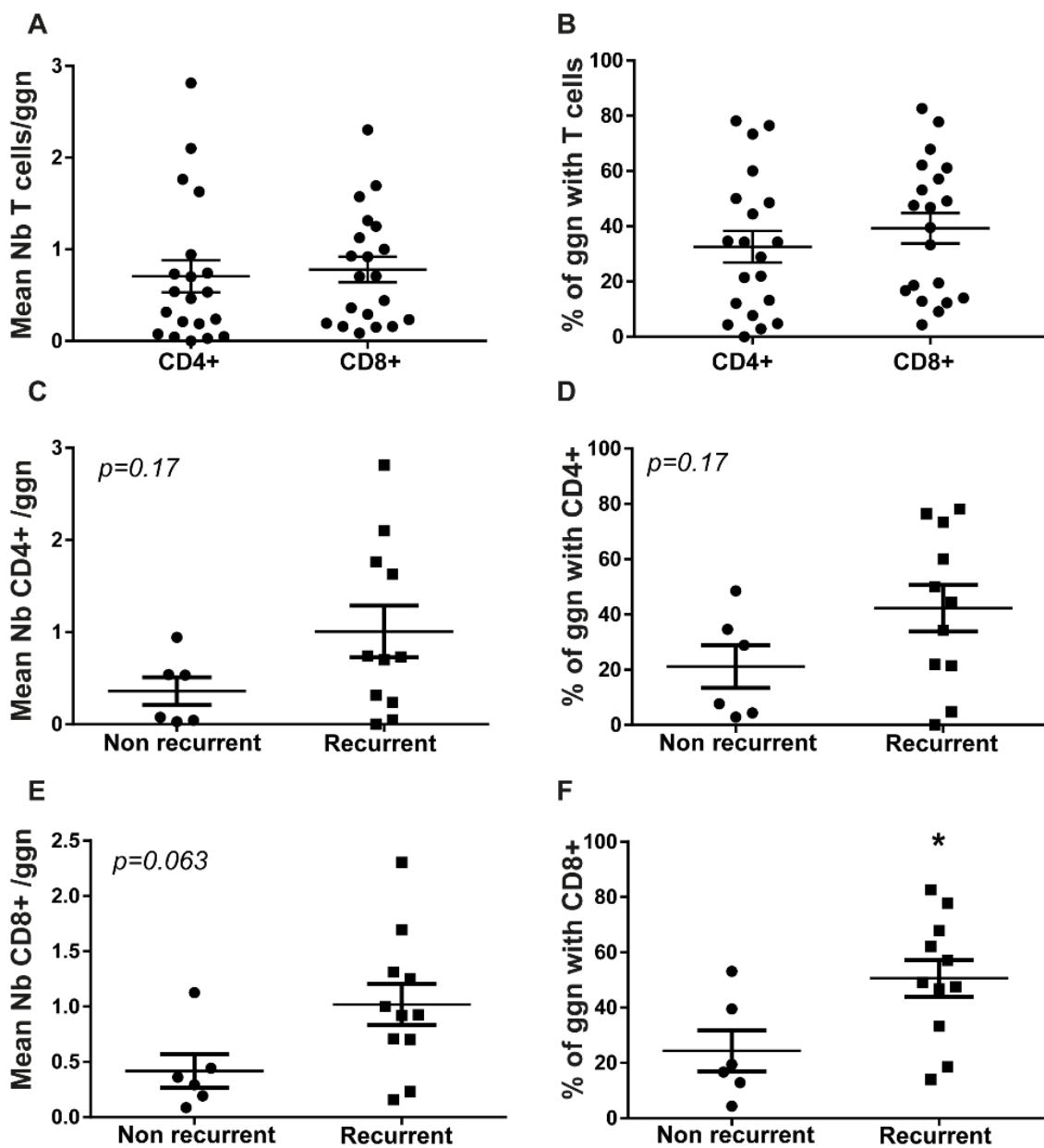


Figure 26 : Etude de l'infiltration des ganglions myentériques par des LT CD4+ ou CD8+ chez les patients Crohn (n=20). A-B : Nombre de LT CD4+ ou CD8+ en étroite proximité avec les CGE S100 β + par ganglion (ggn) myentérique (A) et pourcentage de ganglions infiltrés par les LT CD4+ ou CD8+ en étroite proximité avec les CGE S100 β + (B) chez l'ensemble des patients Crohn. **C-D :** Nombre de LT CD4+ en étroite proximité avec les CGE S100 β + (C) et pourcentage de ganglions infiltrés par des LT CD4+ (D) selon la récurrence de la maladie. **E-F :** Nombre de LT CD8+ en étroite proximité avec les CGE S100 β + (E) et du pourcentage de ganglions infiltrés par des LT CD8+ (F) selon la récurrence de la maladie. Les données sont représentées par la moyenne +/- S.E.M. Le t-test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour les statistiques avec * $p<0.05$.

Discussion & Perspectives

Les travaux de recherche menés durant ma thèse ont confirmé une étroite proximité entre les lymphocytes T et les cellules neurales entériques dans les plexites myentériques de patients Crohn. Ils ont également mis en évidence une implication des CGE dans ces adhésions préférentielles. Quant aux modèles de co-culture CGE-LT, ils ont permis de montrer que l'activation lymphocytaire ou une stimulation pro-inflammatoire des CGE favorisait l'adhésion des LT aux CGE. Les expériences de blocage ont révélé une implication des molécules ICAM-1/LFA-1 dans l'adhésion des LT aux CGE, et l'administration systémique de lifitegrast, un antagoniste chimique de LFA-1 a réduit le nombre de plexites myentériques et amélioré les symptômes de colites dans un modèle de colite spontanée (souris Winnie).

Plexites, une étroite proximité entre les CGE et les LT

Ce projet de recherche en neuro-immunologie fondamentale a porté en majorité sur la formation et la caractérisation des plexites entériques, aussi nommées ganglionites. Définis comme une infiltration de cellules immunitaires en périphérie et/ou au sein des ganglions et/ou des fibres nerveuses, les plexites entériques sont considérés comme une forme de neuropathologie (De Giorgio et al., 2004; De Giorgio and Camilleri, 2004). Elles ont fréquemment été observées dans des pathologies digestives avec des troubles moteurs comme la pseudo-obstruction (McDonald et al., 1985), les dysfonctions motrices généralisées (De Giorgio et al., 2002), l'achalasie (Clark et al., 2000; Facco et al., 2008; Villanacci et al., 2010), ou chez les patients souffrant du syndrome de l'intestin irritable (Törnblom et al., 2002). Dans ces pathologies, les infiltrats immunitaires dans les plexus sous-muqueux et myentérique sont hétérogènes. Chez certains jeunes patients souffrant de pseudo-obstruction, les plexites myentériques sont principalement infiltrées par des éosinophiles juxtaposés à des neurones produisant le chémoattractant IL-5 (Schäppi et al., 2003) mais dans l'ensemble de ces pathologies, l'infiltrat dominant est représenté par des LT (De Giorgio et al., 2004), et dans le cas de l'achalasie par une majorité de LTCD8+ présentant un phénotype activé (Clark et al., 2000).

Dans la maladie de Crohn, la présence de plexites entériques a été décrite depuis plusieurs décennies et souvent envisagée comme responsable d'effets neurotoxiques (Dvorak and Silen, 1985; Geboes et al., 1992; Geboes and Collins, 1998; Stead, 1992). L'intérêt de la communauté scientifique pour ces plexites a récemment connu un rebond grâce à leur reconnaissance comme marqueur prédictif des récidives post-opératoires en cas de localisation au niveau de la marge proximale de résection chez les patients Crohn (Ferrante et al., 2006; Decousus et al., 2016;

Gionchetti et al., 2017; Ryan et al., 2019). La récurrence post-opératoire chez ces patients est d'autant plus dramatique qu'elle est particulièrement fréquente : de 50% pour la récidive clinique à 90% de récidive endoscopique seulement cinq ans après l'intervention chirurgicale (Rutgeerts, 2006; Vaughn and Moss, 2014). D'où la nécessité d'utiliser des marqueurs prédictifs dans l'objectif d'améliorer la prise en charge thérapeutique post-opératoire de ces patients.

Actuellement, la caractérisation des plexites (Ferrante et al., 2006; Decousus et al., 2016; Lemmens et al., 2017) se réalise par l'identification des ganglions nerveux entériques grâce à une coloration hématoxiliné-éosine qui ne renseigne pas sur les cellules neurales impliquées. De plus, la quasi-totalité des études relatives à l'infiltration de cellules immunes dans les ganglions entériques, qu'elles soient réalisées sur des tissus humains ou sur des modèles expérimentaux, rapportent une « proximité cellulaire », « des cellules adjacentes » , « des cellules apposées ou adjacentes aux ganglions » ou bien encore des « analyses centrées sur le ganglion myentérique » sans jamais définir objectivement ces termes, ni associer de notion de distance dans leur méthodologie (Ferrante et al., 2006; Linden et al., 2005; Pontell et al., 2009; Sanovic et al., 1999). Lors de nos analyses, nous avons affiné la définition de plexites en réalisant des immunomarquages des cellules neurales et en établissant des critères stricts de distance entre les cellules neurales et les LT CD3+, CD4+ et CD8+. L'étroite proximité a été définie comme la superposition ou l'absence de pixel noir (0,413 µm) entre les marqueurs. Sur la base de cette définition, nous avons analysé les plexites myentériques sur des coupes effectuées au niveau de la marge proximale de résections intestinales de patients Crohn (n=20) et contrôles (n=9). Une étroite proximité entre des LT CD3+ et les CGE S100 β + a été observée, et les analyses quantitatives ont rapporté un nombre plus important de LT en étroite proximité avec les CGE chez les patients Crohn ayant récidivés comparativement aux patients contrôles. Dans notre étude, aucune différence significative n'a été observée entre les patients Crohn avec (n=11) et sans récidive (n=6), ni entre les patients Crohn sans récidive et les patients contrôles (n=9). L'utilisation d'anticorps contre le marqueur Hu nous a permis d'étudier la présence de LT à proximité des corps cellulaires des neurones. Une étroite proximité entre des LT CD3+ et les neurones Hu+ a été observée. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre le nombre de LT CD3+ à proximité des neurones Hu+ dans les ganglions myentériques de patients contrôles et ceux de patients Crohn (total ou avec/sans récidive). A ce propos, il est à noter que Hu est un marqueur du corps cellulaire et que notre étude a été réalisée sur une cohorte relativement faible.

Dès lors, il serait intéressant de réitérer la même analyse avec des marqueurs de prolongements neuronaux comme PGP9.5, et sur un nombre plus important de patients. De plus, il est à souligner que des plexites de grade 1 correspondant à moins de quatre cellules infiltrantes, ont été détectées dans les ganglions mésentériques de patients contrôles (Hammoudi et al., 2020) tout comme nous avons observé des LTCD3+ à proximité des CGE dans nos tissus témoins. Ces tissus de patients réséqués pour un cancer digestif, même à distance de la tumeur, ne sont peut-être pas les meilleurs témoins, car l'inflammation joue un rôle prépondérant dans les processus tumoraux (Colotta et al., 2009; Mantovani et al., 2008). En revanche, ces observations confortent l'idée de définir un seuil de gravité des plexites selon le nombre de cellules infiltrantes pour aider à discriminer les patients à risques.

En résumé, le marquage spécifique des cellules neurales, notamment des CGE, apparaît comme utile pour mieux détecter les plexites. Combinée à la détermination d'un seuil de gravité des plexites, cette approche technique pourrait permettre d'établir des grilles d'analyses afin d'orienter et améliorer la prise en charge thérapeutique des patients Crohn en post-opératoire.

Parallèlement à cette approche immunohistochimique, des techniques d'imagerie à haute résolution comme le FF-OCT couplé à l'endoscopie, pourraient être développées et utilisées pour détecter sans biopsie ou résection, des plexites chez les patients. Par ailleurs, il est à noter que le suivi des lésions de patient Crohn peut actuellement être effectué par IRM (Zappa et al., 2011). Dès lors, on pourrait envisager le développement d'outils d'imagerie IRM pour un suivi des plexites et/ou des niveaux d'ICAM-1 dans les ganglions myentériques de patients Crohn. En effet, une étude dans un modèle expérimental de sclérose en plaque a indiqué que la récidive ou la rémission peut être prédit par des analyses IRM couplées à la détection de P-selectine vasculaire (Fournier et al., 2017). Ces approches pourraient permettre de détecter les patients à haut risque de récidive avant les interventions chirurgicales et ainsi adapter au plus tôt leur prise en charge thérapeutique.

Caractérisation des LT adhérant aux CGE

Les plexites myentériques sont composés en majorité de lymphocytes (Decousus et al., 2016; Ferrante et al., 2006; Lemmens et al., 2017; Milassin et al., 2017; Sokol et al., 2009) et nos travaux *in vitro* ont montré que les LT adhéraient préférentiellement aux cellules neurales, notamment les CGE. De plus, l'adhésion des LT est favorisée par leur activation ainsi que par le prétraitement des CGE par des stimuli pro-inflammatoires. L'ensemble de ces observations va dans le même sens et constitue une première étape dans l'identification des mécanismes potentiellement impliqués dans la formation *in vivo* des plexites entériques. Au cours de notre étude, nous avons également tenté de caractériser les LT adhérant aux CGE en culture ou infiltrant les ganglions myentériques de patients Crohn.

Concernant l'origine des LT infiltrant les plexites myentériques des patients Crohn, nous avons recherché dans quelle mesure les LT issus des ganglions mésentériques, avaient des propriétés d'adhésion différentes des LT issus de la rate. Pour ce faire, nous avons comparé l'adhésion de LT spléniques à l'adhésion de LT mésentériques dans des co-cultures avec des cellules gliales myentériques. Nos résultats ont rapporté un nombre plus important de LT adhérant (par mm² de surface gliale S100 β) dans des co-cultures réalisées avec des LT mésentériques comparé à des LT spléniques avec ou sans prétraitement des CGE par des stimuli inflammatoire (Manuscrit 2, Fig2.F). Ce résultat est intéressant car les ganglions mésentériques, relais ganglionnaires dédiés à la surveillance antigénique digestive, ont un rôle particulier dans le tropisme intestinal des LT. En effet, des expériences basées sur l'injection de LT CD4 naïfs dans des souris irradiées ont révélé que leur activation dans les ganglions mésentériques induisait l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et du récepteur de chémokine CCR9 favorisant leur recrutement dans la muqueuse intestinale (Kawabe et al., 2013). Des observations similaires ont été rapportées par Campbell et al. qui ont comparé l'expression de molécules d'adhésion dans les LT en fonction du lieu de leur l'activation. Seul l'activation des LT dans les ganglions mésentériques a induit l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ (Campbell and Butcher, 2002). Svensson et al. ont, quant à eux, rapporté la stabilité de l'expression du CCR9 dans les LT CD8 $\alpha\beta$ lorsque ces derniers sont activés dans les ganglions mésentériques (Svensson et al., 2002). Ces particularités seraient en partie dues aux propriétés des cellules dendritiques présentes dans les ganglions mésentériques. En effet, contrairement aux cellules dendritiques de la rate, les cellules dendritiques des ganglions mésentériques sont capables d'induire l'expression du CCR9 et de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ lors de l'activation de LT CD8 (Johansson-Lindbom et al., 2003). Il a également été montré qu'en co-culture, les cellules dendritiques

mésentériques favorisaient plus fortement l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ dans LT comparativement aux cellules dendritiques issues d'autres ganglions ou des plaques de Peyer (Stagg et al., 2002). Ces résultats suggèrent que les LT issus des ganglions mésentériques ont des propriétés particulières et ils seraient intéressant d'analyser quelle différence favoriserait leur adhésion aux CGE.

Dans le but de mettre en évidence une éventuelle différence des propriétés d'adhésion des LT aux CGE, nous avons immunomarqué les LT CD4+ et CD8+ adhérant aux CGE dans des co-cultures. Les observations n'ont pas révélé une adhésion plus importante des LT CD4+ par rapport aux LT CD8+ quelques soient les conditions de cultures. Par ailleurs, le prétraitement des LT par du lifitegrast s'est avéré aussi efficace pour inhiber l'adhésion des LT CD4+ que celle des CD8+ aux CGE.

La dynamique d'adhésion des LT

Les interactions cellulaires étant des évènements dynamiques, nous avons étudié *in vitro* la dynamique spatio-temporelle des interactions entre les cellules neurales entériques et les LT. Grâce à la vidéomicroscopie, nous avons observé qu'en co-culture, des LT adhéraient à la surface des cellules neurales entériques et présentaient un comportement de reconnaissance active de type « scanning » caractérisé par des extensions et rétractations de prolongements cytoplasmiques. Certains LT semblaient également s'immiscer au sein de la culture primaire de système nerveux entérique. Pour compléter ces observations, il serait intéressant d'utiliser des logiciels de suivi cellulaire afin de déterminer les vitesses et les temps de contact qui sont des paramètres importants dans la fonctionnalité des interactions intercellulaires (Duchalais et al., 2018; Stoll et al., 2002).

Concernant la dynamique d'infiltration des cellules immunitaires dans les ganglions entériques, une question majeure est de savoir si l'infiltrat immunitaire précède ou est une conséquence de l'inflammation de la muqueuse. L'analyse des souris Winnie qui développe spontanément des plexites entériques et des colites, ont apporté des informations intéressantes. Nous n'avons pas trouvé de différence significative entre le nombre de plexites myentériques dans le colon distal de souris sauvages en comparaison des souris Winnie âgées de 5 semaines, un âge où elles ne présentent aucun symptôme particulier. En revanche, le nombre de LTCD3+ à proximité des CGES100 β + myentériques n'était toujours pas différent entre les souris sauvages et Winnie à 6 semaines, alors qu'à cet âge, le recrutement aberrant de cellules immunes dans la muqueuse et les désordres histologiques sont avérés (Eri et al., 2011; Heazlewood et al., 2008).

Ces observations suggèrent que l'infiltration immunitaire primaire a lieu au niveau de la muqueuse dans les souris Winnie. D'autre part, les études sur des modèles de colite aigüe ont rapporté une infiltration dans les ganglions entériques transitoire et concomitante à l'infiltration dans la muqueuse. En effet, dans ces modèles et selon le type de cellules immunitaires, une infiltration transitoire précoce a été observée dans les ganglions myentériques à 3h, 6h ou 24h après l'induction de la colite (Linden et al., 2005; Pontell et al., 2009; Sanovic et al., 1999). Selon ces modèles, les ganglions nerveux entériques pourraient être une voie d'entrée et de dissémination des cellules immunitaires vers la muqueuse, comme dans le cas de la dissémination des cellules cancéreuses épithéliales intestinales (Duchalais et al., 2018). Il est à noter que ces modèles de colites induites par une stimulation pro-inflammatoire aigüe ne reproduisent que partiellement les mécanismes et les lésions observées chez les patients Crohn (Kiesler et al., 2015).

Implication d'ICAM-1/LFA-1 dans l'adhésion des LT aux CGE

Les molécules d'adhésion ICAM-1/LFA-1 sont largement connues pour leur rôle dans la diapédèse et la formation de synapse immunologique (Dustin, 2005; Shimizu, 2003). L'intégrine LFA-1 est exprimée à la surface des leucocytes sous la forme d'un hétérodimère composé de la chaîne α L (CD11a) et de la chaîne β 2 (CD18) (Hynes, 1992; Gahmberg, 1997; Shimizu, 2003). Initialement exprimée sous une conformation « fermée » de faible affinité, LFA-1 change de conformation sous l'influence de cytokines, notamment des chémokines, et augmente ainsi son affinité pour ses récepteurs (Walling and Kim, 2018). Son récepteur principal ICAM-1 est un membre de la super-famille des immunoglobulines. Il est composé de cinq domaines « Ig-like » dont le premier est impliqué dans la reconnaissance de ses ligands (Ramos et al., 2014; Roebuck and Finnegan, 1999).

Nos résultats ont montré qu'ICAM-1 est exprimée par les CGE S100 β + et que son expression est augmentée en réponse à une exposition aux LPS ou au cocktail IL-1 β /TNF α . Ces observations sont similaires à celles observées pour d'autres cellules gliales comme les astrocytes (Aloisi et al., 1992; Ballestas and Benveniste, 1995; Lee et al., 1999), les cellules de Schwann (Lisak and Bealmear, 1997; Shen et al., 2008), les oligodendrocytes (Satoh et al., 1991) ou les cellules microgliales (Shrikant et al., 1995). En 2013, une augmentation de l'expression d'ICAM-1 a été montrée dans des ganglions myentériques de patients Crohn réfractaires aux traitements mais cette étude n'a pas caractérisé le type de cellules neurales exprimant ICAM-1 (Smyth et al., 2013).

Nous avons donc analysé par immunohistochimie les coupes de résection intestinale (marge proximale) issues des patients Crohn qui composent notre cohorte. Nos premières observations montrent une expression ponctiforme d'ICAM-1 dans les cellules gliales S100 β + cependant cette expression apparaît relativement faible en comparaison de son expression dans certains neurones (Fig. 27). Ces analyses seront complétées par la recherche d'ICAM-1 dans les CGE et neurones des ganglions myentériques au niveau des zones inflammatoires de résection intestinale des patients Crohn.

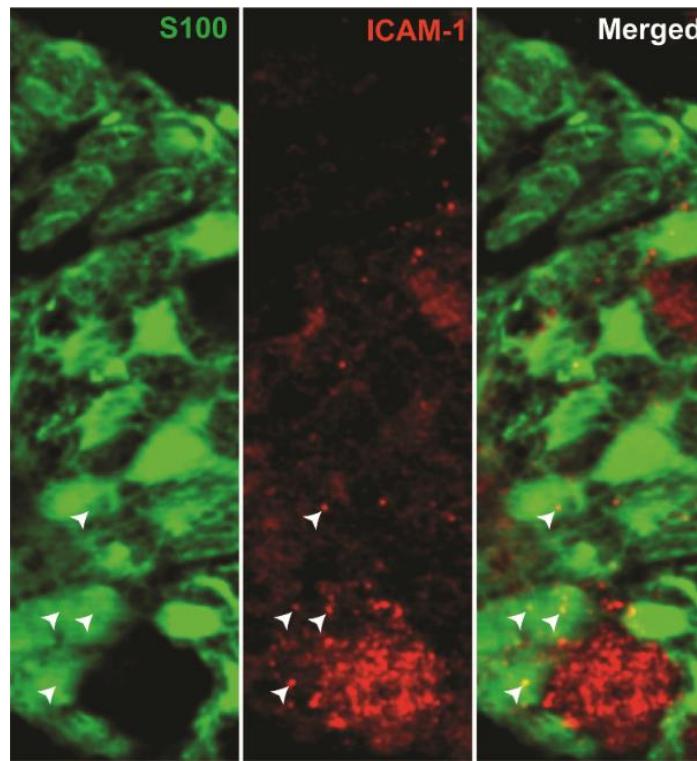


Figure 27 : Expression d'ICAM-1 dans les ganglions myentériques de patients Crohn. Des coupes (5 μ m) effectuées au niveau de la marge proximale de résections iléales ont été immunomarquées avec des anticorps anti-ICAM-1 et anti-S100 β . Une expression ponctiforme d'ICAM-1 (rouge) a été détectée au niveau des CGE S100 β + (vert).

Un autre point important de notre problématique est la signalisation induite par l'activation d'ICAM-1 dans les CGE et ses conséquences. Des études seront réalisées sur ce point dans les CGE mais les expériences de Lee et al., ont montré que l'activation d'ICAM-1 dans des cultures d'astrocytes d'origine murine favorisait l'expression d'IL-1(α,β) et d'IL-6 grâce aux voies MAP kinase kinase MEK pour l'IL-1, et MEK et p38 pour l'IL-6 (Lee et al., 2000). Dans les cellules HUVEC, l'activation d'ICAM-1 favorisait la production des chémokines IL-8 et RANTES (Sano et al., 1998) et était indispensable à l'extravasion des LT vers le cerveau à travers la barrière hémato-encéphalique (Etienne-Manneville et al., 2000).

Les conséquences de l'activation de LFA-1 dans les LT sont également une piste de recherche. En 2017, Verma and Kelleher ont montré que la liaison LFA-1/ICAM-1 favorisait la stabilité des interactions entre les LT et les cellules exprimant ICAM-1 grâce à un réarrangement rapide du cytosquelette. Des effets à moyen terme sur les fonctions des LT ont également été mis en évidence. A savoir qu'un effet sur la prolifération et l'orientation des CD4+ auxiliaires a été observé (Verma and Kelleher, 2017) et que la liaison LFA-1/ICAM-1 rend réfractaire les LT dérivés de PBMC humains, à la signalisation TGF- β en limitant leur production d'IL-2 et leur polarisation *in vitro* vers les profils Treg et Th17 (Verma et al., 2012). D'autre part, il a été montré que la signalisation LFA-1 stimulait la production et la sécrétion d'acétylcholine associée au réflexe cholinergique anti-inflammatoire (Fujii et al., 2007).

Enfin, pour évaluer l'implication spécifique d'ICAM-1 produit par les CGE dans la formation de plexites et le développement de colite, il est prévu d'étudier l'impact de sa délétion spécifique dans les CGE grâce à des souris transgéniques (ICAM-1^{flox-flox} X Sox10^{Cre ERT2}) croisées avec des souris Winnie ou IL10^{-/-} présentant spontanément des plexites et des colites.

Conséquences fonctionnelles des interactions LT-CGE

Nos travaux de recherche ont permis de mettre en évidence des interactions physiques entre les LT et les CGE. Une des prochaines étapes sera de déterminer les conséquences fonctionnelles de ces adhésions, mais aussi des communications solubles paracrines, sur le phénotype des CGE et des LT.

Des travaux récents sur la communication entre les CGE et des cellules de l'immune innée ont déjà été réalisés et ont rapporté un contrôle des fonctions des macrophages et des ILC3 par les CGE. En 2016, Ibiza et al. ont montré que grâce à la sécrétion de GDNF, les CGE régulaient la production d'IL-22 par les ILC3, participant ainsi au maintien de l'intégrité de la BEI (Ibiza et al., 2016). En 2020, Grubisic et al., ont quant à eux, rapporté le rôle déterminant du syncytium glio-entérique dans la production de M-CSF associé à la promotion des fonctions phagocytaires des macrophages musculaires (Grubišić et al., 2020). Cette étude précise une production de M-CSF par les CGE, trois fois plus importante que celle des neurones entériques rapporté par Muller et al. (Muller et al., 2014). Concernant l'impact fonctionnel des interactions glio-lymphocytaires sur les LT, un effet sur l'orientation et la plasticité des profils des LTCD4+ auxiliaires apparaît comme une piste d'étude intéressante.

En effet, après une première polarisation lors de l'activation par une cellule présentatrice d'antigène certains profils LTCD4 auxiliaires, notamment les Th17 et les Treg, peuvent évoluer vers d'autre profils (Fig.28) (Magombedze et al., 2013; Murphy and Stockinger, 2010; Zhou et al., 2009; Zhu, 2018)

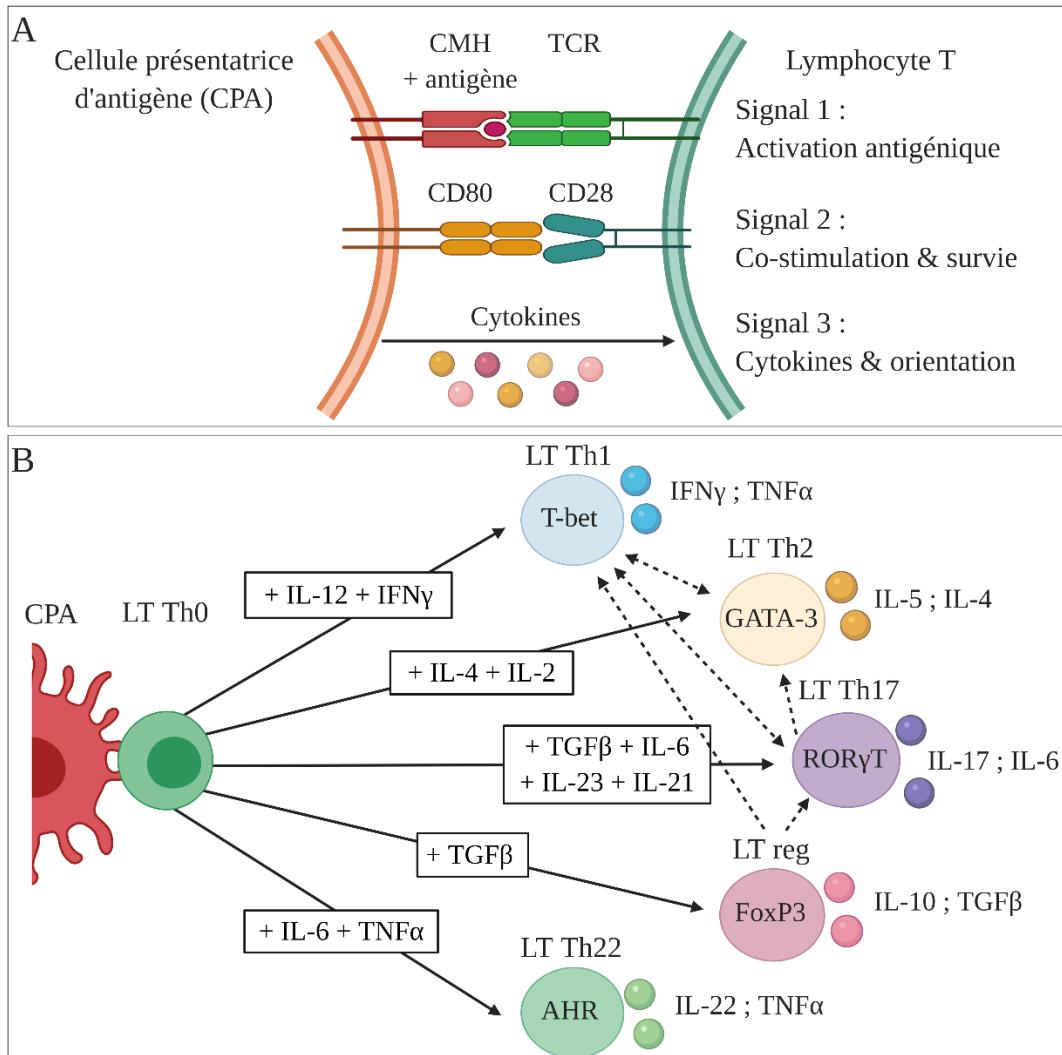


Figure 28 : Activation et différenciation des LT CD4 auxiliaires. A) Lors d'une présentation antigénique par une cellule présentatrice d'antigène (CPA/APC), trois signaux conduisent à l'activation, la survie et l'orientation des LT naïfs vers un profil de LT effecteur. B) Présentation de différents profils de LTCD4 effecteurs selon l'environnement cytokinique, le principal facteur de transcription exprimé et les principales cytokines secrétées. La polarisation vers un profil particulier peut évoluer vers un autre profil selon les signaux environnementaux (flèches pointillées). Crée sur biorender.com à partir de Magombedze et de la these du Dr Asri de référence ffNNT : 2015TOU30084 (Magombedze et al., 2013).

Par exemple, dans l'intestin, un environnement riche en TGF β et IL6 favorise l'orientation des Th1 (T-bet+IFN γ +TNF α +) vers un profil Th17(RoryC+IL17+) (Liu et al., 2015) alors qu'une forte concentration en IL-12 favorise la conversion des Treg FoxP3+ vers des profils Th1 IFN+, Th17 IL-17+ et un profil mixte IFN γ +IL17+ (Feng et al., 2011). De plus, de nouveaux profils sont régulièrement découverts. Ainsi, la production d'IL-22 initialement associée au profil Th17 (Liang et al., 2006) est à présent également associée à un profil Th22 découvert dans une population mémoire de LT dermiques secrétant de l'IL-22 sans expression d'IL-17 ni du facteur de transcription ROR γ T (Duhen et al., 2009; Eyerich et al., 2009).

Différents travaux suggèrent que les cellules gliales pourraient elles-aussi intervenir dans l'orientation des LT. Ainsi, des études ont montré *in vitro* qu'en présence d'astrocytes, des LT CD4+ naïfs évoluaient vers un profil Th1 IFN γ + si la co-culture est supplémentée en anticorps anti-IL4 et anti-IL12, ou vers un profil Treg FOXP3+ si la co-culture est supplémentée en TGF β (Beurel et al., 2014). Il a également été rapporté le rôle des astrocytes dans le maintien de FOXP3 dans des T régulateurs, préalablement différenciés (Xie et al., 2015). Dans l'étude de Filipello et ses collaborateurs, l'adhésion des LT récemment activés aux astrocytes stimulait l'expression des ecto-nucléotidases membranaires CD39 et CD73, et favorisait la polarisation vers un profil immunsupresseur de type Th17 (Filipello et al., 2016). En 2010, Saikali et al., ont également montré qu'en co-culture après une stimulation des astrocytes par des cocktails cytokiniques pro-inflammatoires, le contact astro-lymphocytaire favorisait l'activité cytotoxique des LT CD8+ à travers l'expression membranaire d'IL-15. Cette observation est d'autant plus pertinente que des LTCD8+ ont été détectés à proximité d'astrocytes fortement immunoréactifs à l'IL-15 dans le cerveau de patient atteints de sclérose en plaques (Saikali et al., 2010). Les CGE ont également un impact sur les LT puisqu'une précédente étude de notre groupe a rapporté un effet antiprolifératif des CGE humaines sur les LT activés partiellement dépendant de contacts cellulaires (Kermarrec et al., 2016).

Pour analyser l'effet des interactions physiques et paracines entre les CGE et LT sur la plasticité des LT CD4+ auxiliaires, nous avons établi des co-cultures à partir de LT activés et des CGE prétraitées à l'IT (4 jours, ratio 1 :1). Puis nous avons analysé par Q-PCR l'expression de facteurs de transcription associés aux profils auxiliaires dans les LT flottant dans le surnageant (Flott), adhérant aux CGE (Adh) ou dans les LT co-cultivés avec un séparateur d'une porosité de 0,4 μ m (Trans) (Fig.29).

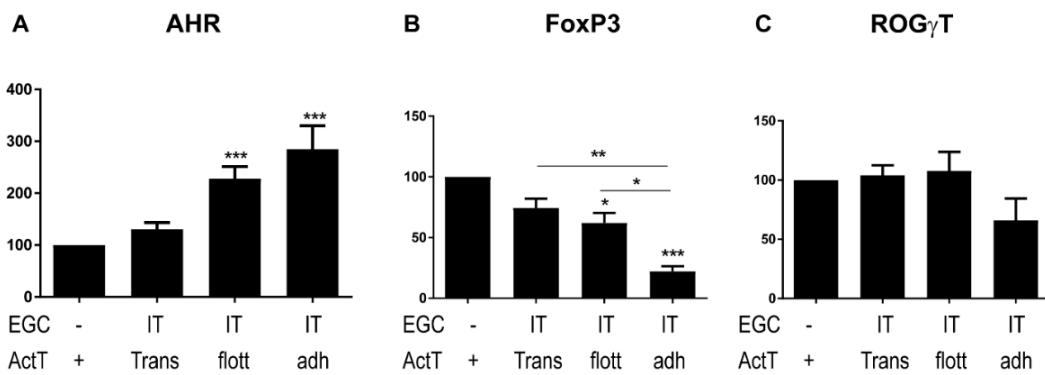


Figure 29 : Expression d’AHR (A), de FoxP3 (B) et de ROR γ T (C) dans les LT en co-culture avec des CGE. Les LT activés ont été cultivés pendant quatre jours en présence de CGE prétraitées avec de l’IL-1 β /TNF- α (IT) pendant six heures ($n=13-25$). Les co-cultures ont été réalisées avec un séparateur aux pores de 0,4 μ m (Trans) ou en contact direct (LT flottant, LT adhérent). Après 4 jours de co-cultures, les LT ont été récupérés et l’expression des ARNm codant pour les facteurs de transcriptions AHR, FoxP3 et ROR γ T a été analysée par PCR quantitative. Les données sont représentées par la moyenne +/- S.E.M et sont exprimé en pourcentage de la condition de lymphocytes T activés sans CGE. Le test ANOVA 1 voie non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour les statistiques avec * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$. EGC : cellules gliales entériques ; ActT : LT activés ; Trans : LT co-cultivés en transwell ; flott : LT flottant ; adh : LT adhérent.

Les résultats ont montré une nette augmentation de l’expression du facteur de transcription AHR dans les LT flottants (Flott) et adhérents (Adh) co-cultivés en contact direct avec des CGE. En revanche, lorsque les LT sont co-cultivés avec un séparateur (Trans), ne permettant pas d’adhésions entre LT et CGE mais la circulation libre de molécules solubles, aucune augmentation du niveau des transcrits AHR n’a été détectée (Fig.29A). Ces observations suggèrent des mécanismes de régulation de l’expression d’AHR contact-dépendants. Les conséquences de cette stimulation de l’expression d’AHR au contact des CGE restent à être déterminer mais différentes données pourront nous guider dans les futures recherches. Tout d’abord, même si AHR est principalement associé au profil Th22 (Trifari et al., 2009), il est également impliqué dans l’induction de Th17 (Kimura et al., 2008; Veldhoen et al., 2008) et le maintien de FoxP3 (Gutiérrez-Vázquez and Quintana, 2018; Quintana and Sherr, 2013). L’augmentation observée du niveau des ARNm AHR dans nos co-cultures pourrait ainsi être le reflet de son expression par plusieurs sous-populations lymphocytaires (Cervantes-Barragan and Colonna, 2018). Par ailleurs, AHR est un facteur de transcription important dans la régulation d’IL-22, une interleukine connue pour ses actions protectrices vis-à-vis de la barrière épithéliale intestinale en favorisant notamment la production de peptides anti-microbiens (Dudakov et al., 2015; Ibiza et al., 2016).

De plus, il a été montré que l'administration d'agonistes d'AHR dans trois modèles de colites (TNBS, DSS, transfert de CD4) avait un effet protecteur sur le développement de la colite grâce à la production d'IL-22 et une réduction de l'IL-17 et du TNF α (Monteleone et al., 2011). Toutefois, les modalités d'action de l'IL-22 peuvent s'avérer complexes car il a récemment été rapporté que la délétion d'IL22 dans le modèle de colite IL10/- protégeait du développement de colites (Gunasekera et al., 2020). La recherche des conséquences de l'augmentation de l'expression d'AHR dans les LT induite par le contact des CGE, devrait donc aboutir à des résultats intéressants.

Par ailleurs, nos résultats préliminaires de l'impact des CGE sur les profils de LT auxiliaires ont montré une diminution significative du facteur de transcription FOXP3, caractéristique du profil Treg. Cette diminution est particulièrement importante dans les LT adhérent aux CGE (Fig.29-B) et il serait intéressant de déterminer si cette diminution drastique est uniquement due à une régulation négative de l'expression de FoxP3 à travers le contact prolongé des LT aux CGE, ou si simplement les LT FOXP3 adhèrent en plus faible nombre aux CGE. Cette diminution de FOXP3 est particulièrement intéressante car il a été montré *in vitro* que l'interaction LFA-1/ICAM-1 inhibait la signalisation TGF β limitant ainsi la polarisation des LT en Treg FOXP3+ via une suppression de la sécrétion d'IL-2 (Verma et al., 2012). Dès lors, il serait intéressant d'analyser la production d'IL-2 par les LT dans les différentes conditions, d'autant plus que des travaux au sein de notre laboratoire ont révélé que les CGE secrétaient du TGF β (Neunlist et al., 2007). Il est à noter que les interactions LT-CGE n'affectent pas tous les facteurs de transcriptions puisqu'aucune différence significative n'a été observée pour ROR γ t (Fig.29C), caractéristique des Th17.

D'autre part, nous nous sommes interrogés quant à l'impact des LT sur le profil des CGE en co-culture direct et indirect (Fig.30). Une précédente étude réalisée à partir d'astrocytes a rapporté une augmentation de la production gliale de TGF β 2 et de la chémokine CCL-2 dans des co-cultures où les astrocytes étaient en contact direct avec des LTCD4+ activés (Filipello et al., 2016). D'autre part, Prajeeth et al. ont rapporté une augmentation de l'expression de chémokines en réponse à une stimulation par des surnageants de culture de LT TH1 (Prajeeth et al., 2017). Nous avons donc analysé l'expression de différents gènes cibles : de l'IL-6, du TNF α , du TGF β , d'ICAM-1, du GDNF et de son récepteur GFR α dans les CGE après quatre jours de co-culture avec des LT activés soit en contact direct soit séparée par un insert poreux (Fig. 30).

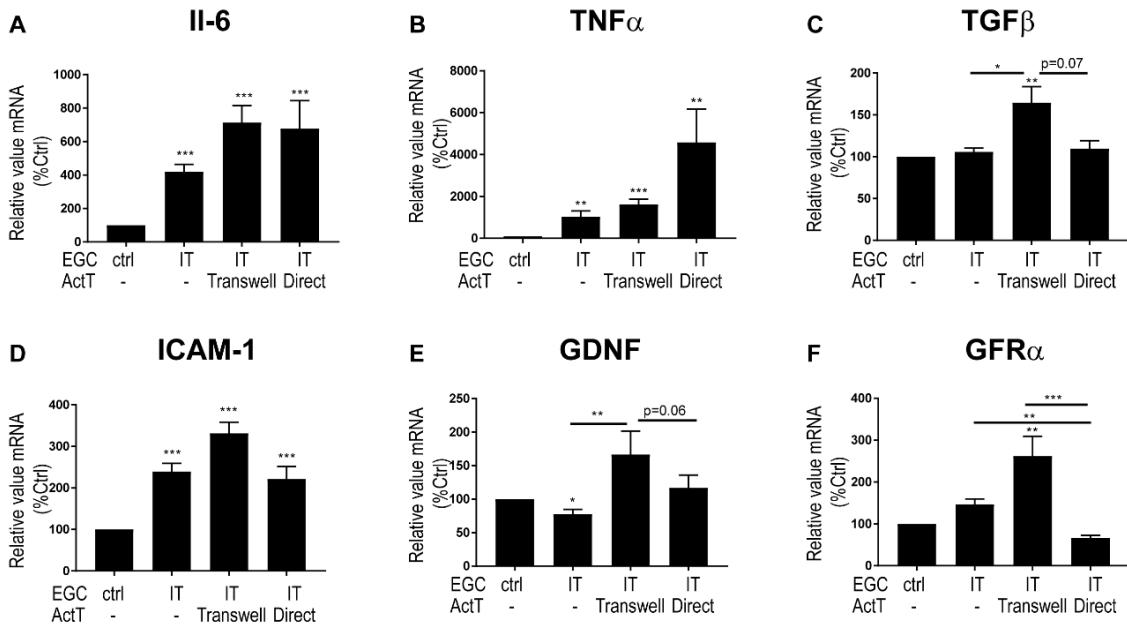


Figure 30 : Expression de médiateurs gliaux dans les co-cultures CGE-LT. Les LT activés (ActT) ont été cultivés pendant quatre jours en présence de CGE prétraitées avec de l'IL-1 β /TNF- α (IT) pendant six heures ($n=13-25$). Les co-cultures ont été réalisées en transwell (Transwell) ou en contact direct (Direct). Après quatre jours de co-cultures, les CGE ont été récupérées et les ARNm codant pour les cytokines IL-6, TNF α , TGF β , la molécule d'adhésion ICAM-1 ; le facteur neurotrophique glial (GDNF) et le récepteur du GDNF (GFR α) ont été analysés par PCR quantitative. Les données sont représentées par la moyenne +/- S.E.M et sont exprimées en pourcentage de la condition contrôle (ctrl). Le test ANOVA 1 voie non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour les statistiques avec * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Les résultats préliminaires ont montré une augmentation de l'expression d'IL-6, du TNF α et d'ICAM-1 dans les CGE en réaction au prétraitement par de l'IL-1 β /TNF- α (IT) (Fig.29A, B, D). Dans des cultures en contact direct, une diminution de l'expression de GFR α est observée dans les CGE suggérant un effet répresseur des contacts glio-lymphocytaires (Fig.29F). Dans des co-cultures sans contact direct, nous avons observé une augmentation de l'expression gliale de TGF β (Fig.29C) et de GDNF (Fig.29E), qui n'a pas été retrouvée dans les co-cultures permettant des contacts entre les CGE et les LT. Ces résultats préliminaires suggèrent une implication de facteurs solubles dans la régulation des transcrits gliaux qui peut être inhibée par les contacts entre CGE et LT. Ces résultats seront complétés par des analyses au niveau protéique en dosant des cytokines cibles (TNF α , IL-6, TGF β , GDNF, IL-2, IL-17, IL-22, IFN γ , IL-10) dans les surnageants de co-culture.

Afin d'explorer l'impact fonctionnel des interactions glio-lymphocytaires sur des populations de LT particulières, il est envisagé de reproduire ces co-cultures à partir de LT enrichis en CD4, ainsi qu'à partir de LT CD4+auxiliaires préalablement différenciés avec un intérêt préférentiel pour les profils Th1, Th17 et Treg impliqués dans la physiopathologie de la maladie de Crohn. Nous utiliserons une approche transcriptomic (RNASeq, DGSeq) pour avoir une image plus complète des régulations et des voies de signalisation impliquées lors des interactions entre des CGE et ces populations particulières de LT.

A noter que les interactions entre des LT et des CGE sont susceptibles d'impacter, et d'être impacté par, d'autres cellules présentes dans leur microenvironnement. Ainsi, une étude dans un système plus complexe par exemple à partir d'organoides (Mahe, 2018; Workman et al., 2017; Yoo and Donowitz, 2019) serait intéressante afin d'avoir une vue plus globale des mécanismes conduisant à une rupture de l'homéostasie digestive.

Le lifitegrast diminue l'infiltration des LT dans les ganglions myentériques des souris Winnie

Egalement référencé sous la dénomination SAR118, le lifitegrast fait partie des molécules chimiques de faible poids moléculaire (<1kDa ; MW615 g/mol) conçu par homologie au site de reconnaissance d'ICAM-1 au LFA-1 (*Fig.31*). C'est un antagoniste compétitif de l'unité α (CD11) de LFA-1 qui par conséquent empêche la liaison de LFA-1 à ICAM-1 (Gadek et al., 2002; Keating et al., 2006; Semba and Gadek, 2016).

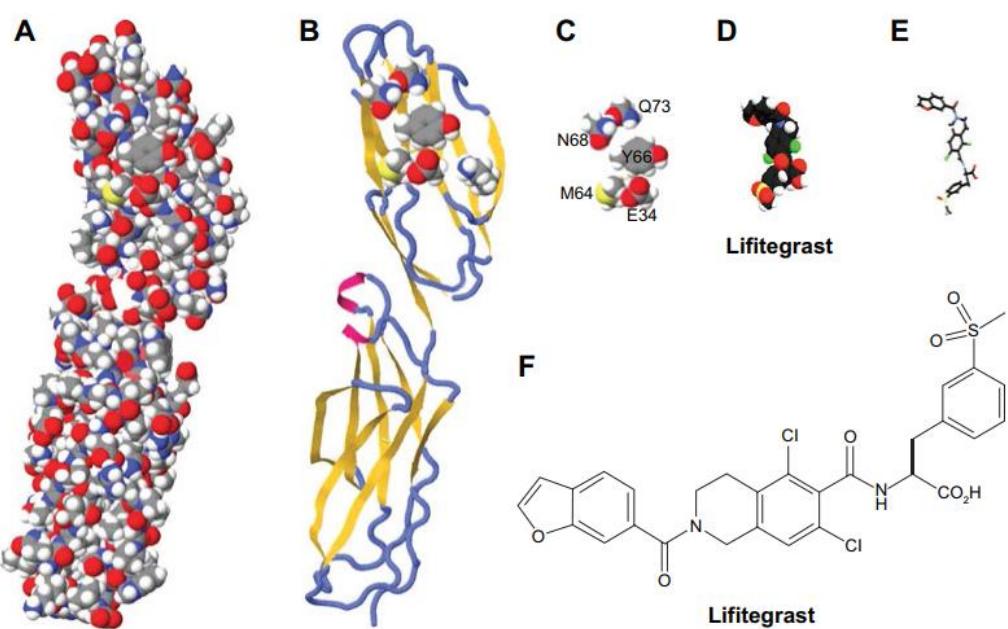


Figure 31 : Représentations schématiques de la structure du lifitegrast (LG, SAR118) (Semba and Gadek, 2016)

Parmi les inhibiteurs synthétiques développés dans les années 2000 (Kelly et al., 1999; Suchard et al., 2010; Zhong et al., 2010), le lifitegrast a été retenu pour traiter les sécheresses oculaires associées à une inflammation chronique de la cornée et au recrutement aberrant de LT (Perez et al., 2016; Semba and Gadek, 2016; Zhong et al., 2012). Son coût de production est moindre par rapport à des anticorps bloquants ou des thérapies par inhibition génique, et il peut être administré oralement (Keating et al., 2006). En 2011, Murphy et al. ont montré que le lifitegrast inhibait *in vitro* l'adhésion de LT immortalisés (Jurkat) et le relargage de cytokines pro-inflammatoires par des PBMC humains activés (Murphy et al., 2011).

De plus, le lifitegrast est actif à très faible dose. Aussi, au cours de nos travaux, nous l'avons utilisé à la concentration de 0,1 mM lors des expériences de blocage *in vitro*, et de 15 mg/kg pour le traitement des souris Winnie, sur la base des travaux de Murphy (Murphy et al., 2011), des tests de toxicité (Zhong et al., 2012, 2010) et des informations fournies dans le dossier de demande d'approbation pour de nouveaux médicaments relatif à la formulation du Xiidra (NDA 208073) désormais proposé aux patients souffrant de sécheresse oculaire.

Nos expérimentations *in vitro* sur des co-cultures ont montré que le lifitegrast inhibait l'adhésion des LT aux CGE murines ou humaines préalablement stimulées par de l'IL-1 β /TNF α . De plus, nous avons montré que son administration curative en systémique réduisait le nombre de plexites myentériques et les signes de colites chez les souris Winnie. Ces observations suggèrent une implication des molécules d'adhésion ICAM-1/LFA-1 dans la formation des plexites et ouvrent la possibilité d'utiliser cet antagoniste synthétique pour limiter les récidives en cas de maladie de Crohn.

Concernant les tentatives pour inhiber les interactions entre ICAM-1 et LFA-1, deux approches ont déjà été évaluées en clinique : l'alicaforzen et l'efalizumab (Fig.32) (Biswas et al., 2019; Zundler et al., 2019).

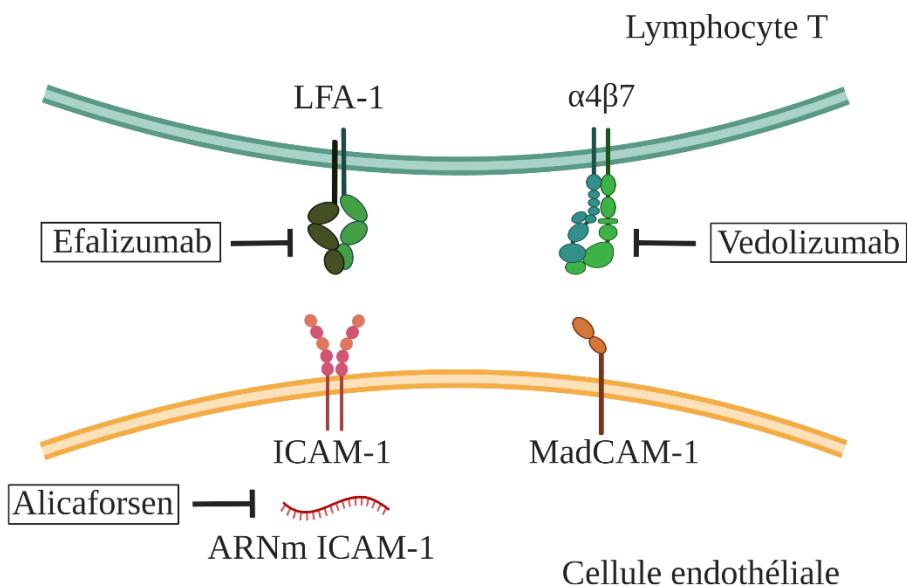


Figure 32 : Représentation schématique d'agents biologiques ciblant les molécules d'adhésion développés pour traiter les patients Crohn. Crée sur biorender.com à partir de Biswas (Biswas et al., 2019).

Historiquement, les premières pistes thérapeutiques ont directement ciblé la protéine ICAM-1 sur la base de l'expression massive d'ICAM-1 dans les zones inflammatoires des patients Crohn (Malizia et al., 1991; Smyth et al., 2013) et son implication déterminante dans la diapédèse. Des anticorps anti-ICAM-1 ont été évalués dans des modèles murins, avec comme résultats soit une inefficacité à limiter seuls les colites dans le modèle DSS (Soriano et al., 2000), soit une efficacité à limiter seuls les colites dans ce même modèle (Hamamoto et al., 1999; Taniguchi et al., 1998), soit une efficacité à limiter les colites en association avec un anticorps anti-VCAM-1 dans le modèle de colite spontanée chez la souris SAMP-1/YIT (Burns et al., 2001). En clinique, seuls des oligonucléotides antisens anti-ICAM-1 (Alicaforse, ISIS 2302) ont été évalués. Une première étude en phase II s'est révélé encourageante (Yacyshyn et al., 1998), mais les essais suivants avec plus de patients n'ont pas rapporté une efficacité suffisante de l'alicaforse en comparaison du placebo (Schreiber et al., 2001; Yacyshyn et al., 2007, 2002).

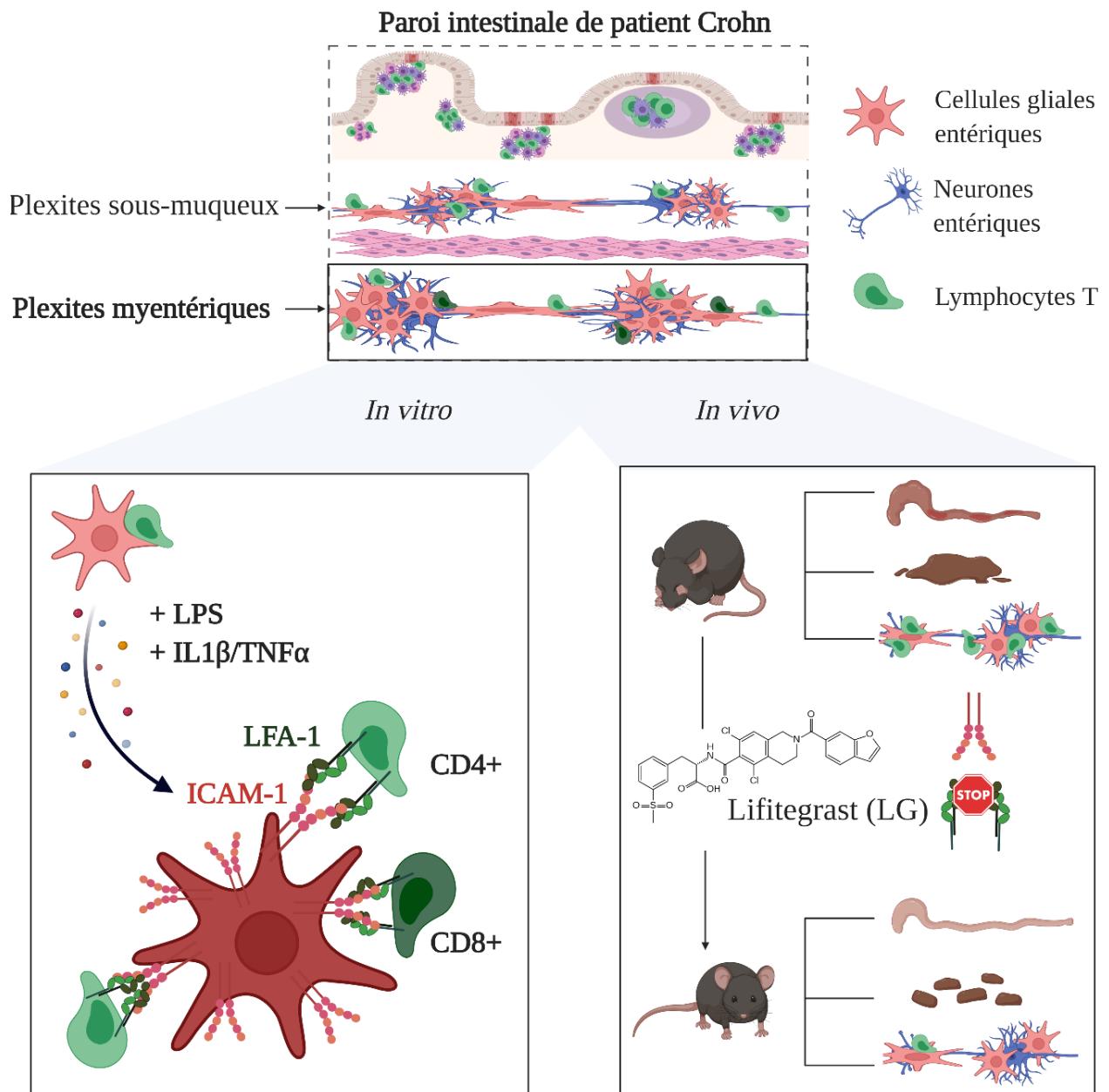
Une seconde piste thérapeutique a consisté à cibler la protéine LFA-1 avec un anticorps anti-CD11a (Efalizumab) préalablement approuvé pour le traitement des psoriasis. Un unique essai a été réalisé sur une faible cohorte de patients Crohn réfractaires ou intolérants aux thérapies standards, qui a rapporté un bénéfice clinique sans effets secondaires après 8 semaines de traitement (James et al., 2011). Cependant, l'Efalizumab a été retiré du marché américain suite à des effets indésirables graves de leuco-encéphalopathies progressives multifocales. Ces observations rappellent que la balance bénéfique/risque doit être considérée avec attention lors de la recherche de nouvelles thérapies. A ce propos, il serait également intéressant de tester l'efficacité d'une administration locale du lifitegrast dans le tractus gastro-intestinal afin de limiter les effets secondaires.

Conclusion

Les résultats obtenus durant ma thèse ont permis de mettre en évidence des adhésions privilégiées entre les LT et les cellules neurales entériques. Ils ont également démontré que l'activation des LT, l'inflammation gliale et l'origine mésentérique des LT favorisaient l'adhésion des LT aux CGE. Des analyses comparatives n'ont pas révélé de différence dans l'adhésion des sous-populations de LT CD4+/CD8+, et les LT semblent adhérer de façon similaire à des CGE dérivées de patients contrôles ou issues de zones saines de patients Crohn. Les analyses rétrospectives sur des coupes de résections intestinales au niveau de la marge proximale, ont quant à elles, révélé une étroite proximité entre les CGE S100 β + et les LT CD4+ et CD8+ dans les ganglions myentériques de patients Crohn et rapporté un nombre plus élevé de LTCD3+ en étroite proximité avec les CGE chez les patients Crohn en récidive.

La recherche des mécanismes à l'origine des interactions entre les LT et les CGE, nous a conduit à étudier les molécules d'adhésion. Les analyses *in vitro* ont démontré une augmentation de l'expression d'ICAM-1 par les CGE sous l'influence de stimulations pro-inflammatoires, et ont révélé l'implication partielle de la liaison LFA-1/ICAM-1 dans les adhésions des LT aux CGE. Enfin, l'administration d'inhibiteur synthétique de LFA-1 dans le modèle de colite spontanée Winnie a diminué efficacement le nombre de LT à proximité des CGE S100 β + dans les ganglions myentériques et démontré son efficacité *in vivo* dans l'amélioration des symptômes de colite.

Pour conclure, nos résultats soulignent l'intérêt d'étudier les interactions glio-lymphocytaire pour une meilleure compréhension de la maladie de Crohn et pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Des analyses complémentaires seront nécessaires afin d'identifier l'ensemble des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des plexites entériques, notamment *in vivo*, et leur implication dans la maladie de Crohn.



*Figure 33 : Schéma de synthèse des travaux de thèse. Les interactions entre les cellules neurales entériques et les LT infiltrant les ganglions myentériques de patient Crohn ont été évaluées *in vitro* et *in vivo*. Les modèles de co-cultures entre CGE et LT ont mis en évidence que la pré-exposition des CGE par un environnement pro-inflammatoire (LPS ou IL-1 β /TNF α) favorisait l'adhésion LTCD4+ et CD8+ aux CGE. La liaison d'ICAM-1 à LFA-1 est impliquée dans l'adhésion des LT aux CGE. L'administration par voie systémique du Lifitegrast, un antagoniste de LFA-1, dans des souris Winnie souffrant de colique chronique, améliore les symptômes, réduit l'inflammation du colon, restaure une consistance de selle « normales » et diminue l'infiltration de LT à proximité de CGE dans les ganglions myentériques. Crée sur biorender.com.*

Références

- Abdo, H., Derkinderen, P., Gomes, P., Chevalier, J., Aubert, P., Masson, D., Galmiche, J.-P., Vanden Berghe, P., Neunlist, M., Lardeux, B., 2010. Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24, 1082–1094. <https://doi.org/10.1096/fj.09-139519>
- Abdo, H., Mahé, M.M., Derkinderen, P., Bach-Ngohou, K., Neunlist, M., Lardeux, B., 2012. The omega-6 fatty acid derivative 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress. *J. Physiol.* 590, 2739–2750. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.222935>
- Agace, W.W., 2008. T-cell recruitment to the intestinal mucosa. *Trends Immunol.* 29, 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.08.003>
- Al Nabhani, Z., Dietrich, G., Hugot, J.-P., Barreau, F., 2017. Nod2: The intestinal gate keeper. *PLoS Pathog.* 13, e1006177. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006177>
- Allez, M., Skolnick, B.E., Wisniewska-Jarosinska, M., Petryka, R., Overgaard, R.V., 2017. Anti-NKG2D monoclonal antibody (NNC0142-0002) in active Crohn's disease: a randomised controlled trial. *Gut* 66, 1918–1925. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311824>
- Aloisi, F., Borsellino, G., Samoggia, P., Testa, U., Chelucci, C., Russo, G., Peschle, C., Levi, G., 1992. Astrocyte cultures from human embryonic brain: characterization and modulation of surface molecules by inflammatory cytokines. *J. Neurosci. Res.* 32, 494–506. <https://doi.org/10.1002/jnr.490320405>
- Aloisi, F., Ria, F., Penna, G., Adorini, L., 1998. Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 160, 4671–4680.
- Ananthakrishnan, A.N., 2015. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 205–217. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.34>
- Anitha, M., Gondha, C., Sutliff, R., Parsadanian, A., Mwangi, S., Sitaraman, S.V., Srinivasan, S., 2006. GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. *J. Clin. Invest.* 116, 344–356. <https://doi.org/10.1172/JCI26295>
- Anitha, M., Vijay-Kumar, M., Sitaraman, S.V., Gewirtz, A.T., Srinivasan, S., 2012. Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling. *Gastroenterology* 143, 1006-1016.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.034>
- Annese, V., Beaugerie, L., Egan, L., Biancone, L., Bolling, C., Brandts, C., Dierickx, D., Dummer, R., Fiorino, G., Gornet, J.M., Higgins, P., Katsanos, K.H., Nissen, L., Pellino, G., Rogler, G., Scaldaferri, F., Szymanska, E., Eliakim, R., ECCO, 2015. European Evidence-based Consensus:

- Inflammatory Bowel Disease and Malignancies. *J. Crohns Colitis* 9, 945–965.
<https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv141>
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Filì, L., Ferri, S., Frosali, F., Giudici, F., Romagnani, P., Parronchi, P., Tonelli, F., Maggi, E., Romagnani, S., 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 204, 1849–1861.
<https://doi.org/10.1084/jem.20070663>
- Artis, D., Spits, H., 2015. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 517, 293–301.
<https://doi.org/10.1038/nature14189>
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S., Fritz, J.V., Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H., Olle, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., 2013. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500, 232–236. <https://doi.org/10.1038/nature12331>
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I.I., Umesaki, Y., Itoh, K., Honda, K., 2011. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* 331, 337–341. <https://doi.org/10.1126/science.1198469>
- Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Müllberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schütz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J.F., Lehr, H.A., Autschbach, F., Schürmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P.R., Rose-John, S., Neurath, M.F., 2000. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat. Med.* 6, 583–588. <https://doi.org/10.1038/75068>
- Aube, A.-C., 2006. Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 55, 630–637.
<https://doi.org/10.1136/gut.2005.067595>
- Bain, C.C., Mowat, A.M., 2014. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol. Rev.* 260, 102–117.
- Ballestas, M.E., Benveniste, E.N., 1995. Interleukin 1-beta- and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of ICAM-1 gene expression in astrocytes requires protein kinase C activity. *Glia* 14, 267–278. <https://doi.org/10.1002/glia.440140404>
- Barajon, I., Serrao, G., Arnaboldi, F., Opizzi, E., Ripamonti, G., Balsari, A., Rumio, C., 2009. Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 57, 1013–1023.
<https://doi.org/10.1369/jhc.2009.953539>

- Barbara, G., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Cremon, C., Cottrell, G.S., Santini, D., Pasquinelli, G., Morselli-Labate, A.M., Grady, E.F., Bennett, N.W., Collins, S.M., Corinaldesi, R., 2004. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 126, 693–702. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.11.055>
- Basso, L., Boué, J., Augé, C., Deraison, C., Blanpied, C., Cenac, N., Lluel, P., Vergnolle, N., Dietrich, G., 2018. Mobilization of CD4+ T lymphocytes in inflamed mucosa reduces pain in colitis mice: toward a vaccinal strategy to alleviate inflammatory visceral pain. *Pain* 159, 331–341. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001103>
- Baumgart, D.C., Dignass, A.U., 2002. Intestinal barrier function. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5, 685–694. <https://doi.org/10.1097/00075197-200211000-00012>
- Baumgart, D.C., Sandborn, W.J., 2012. Crohn's disease. *Lancet Lond. Engl.* 380, 1590–1605. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60026-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60026-9)
- Bayliss, W.M., Starling, E.H., 1899. The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol.* 24, 99–143.
- Belai, A., Boulos, P.B., Robson, T., Burnstock, G., 1997. Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut* 40, 767–774. <https://doi.org/10.1136/gut.40.6.767>
- Berg, D.J., Davidson, N., Kühn, R., Müller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson-Snipes, L., Leach, M.W., Rennick, D., 1996. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J. Clin. Invest.* 98, 1010–1020. <https://doi.org/10.1172/JCI118861>
- Bernink, J.H., Krabbendam, L., Germar, K., de Jong, E., Gronke, K., Kofoed-Nielsen, M., Munneke, J.M., Hazenberg, M.D., Villaudy, J., Buskens, C.J., Bemelman, W.A., Diefenbach, A., Blom, B., Spits, H., 2015. Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127+ Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina Propria. *Immunity* 43, 146–160. <https://doi.org/10.1016/j.jimmuni.2015.06.019>
- Bernink, J.H., Peters, C.P., Munneke, M., te Velde, A.A., Meijer, S.L., Weijer, K., Hreggvidsdottir, H.S., Heinsbroek, S.E., Legrand, N., Buskens, C.J., Bemelman, W.A., Mjösberg, J.M., Spits, H., 2013. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat. Immunol.* 14, 221–229. <https://doi.org/10.1038/ni.2534>
- Bertrand, P.P., Kunze, W.A., Bornstein, J.C., Furness, J.B., Smith, M.L., 1997. Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am. J. Physiol.* 273, G422-435. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.273.2.G422>
- Beurel, E., Harrington, L.E., Buchser, W., Lemmon, V., Jope, R.S., 2014. Astrocytes modulate the polarization of CD4+ T cells to Th1 cells. *PLoS One* 9, e86257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086257>

- Bhamre, R., Sawrav, S., Adarkar, S., Sakaria, R., J Bhatia, S., 2018. Psychiatric comorbidities in patients with inflammatory bowel disease. *Indian J. Gastroenterol. Off. J. Indian Soc. Gastroenterol.* 37, 307–312. <https://doi.org/10.1007/s12664-018-0870-9>
- Birchenough, G.M.H., Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Bergström, J.H., Hansson, G.C., 2015. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol.* 8, 712–719. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.32>
- Bischoff, S.C., 2016. Mast cells in gastrointestinal disorders. *Eur. J. Pharmacol.* 778, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.02.018>
- Biswas, S., Bryant, R.V., Travis, S., 2019. Interfering with leukocyte trafficking in Crohn's disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 38–39, 101617. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2019.05.004>
- Bjarnason, I., O'Morain, C., Levi, A.J., Peters, T.J., 1983. Absorption of 51chromium-labeled ethylenediaminetetraacetate in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 85, 318–322.
- Boehm, T., Hess, I., Swann, J.B., 2012. Evolution of lymphoid tissues. *Trends Immunol., Special focus: Structure and function of lymphoid tissues* 33, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.005>
- Boesmans, W., Cirillo, C., Van den Abbeel, V., Van den Haute, C., Depoortere, I., Tack, J., Vanden Berghe, P., 2013. Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 25, e151-160. <https://doi.org/10.1111/nmo.12065>
- Boesmans, W., Hao, M.M., Fung, C., Li, Z., Van den Haute, C., Tack, J., Pachnis, V., Vanden Berghe, P., 2019. Structurally defined signaling in neuro-glia units in the enteric nervous system. *Glia* 67, 1167–1178. <https://doi.org/10.1002/glia.23596>
- Boesmans, W., Lasrado, R., Vanden Berghe, P., Pachnis, V., 2015. Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system: Enteric Glial Cell Heterogeneity. *Glia* 63, 229–241. <https://doi.org/10.1002/glia.22746>
- Bogunovic, M., 2016. ILC3s and the Willow Tree of Voices. *Immunity* 45, 238–239. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.004>
- Bohórquez, D.V., Samsa, L.A., Roholt, A., Medicetty, S., Chandra, R., Liddle, R.A., 2014. An enteroendocrine cell-enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy. *PloS One* 9, e89881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089881>
- Bonaz, B.L., Bernstein, C.N., 2013. Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 144, 36–49. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.10.003>
- Bonen, D.K., Cho, J.H., 2003. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 124, 521–536. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50045>

- Bonnamain, V., Mathieu, E., Thinard, R., Thebault, P., Nerriere-Daguin, V., Leveque, X., Anegon, I., Vanhove, B., Neveu, I., Naveilhan, P., 2012. Expression of Heme Oxygenase-1 in Neural Stem/Progenitor Cells as a Potential Mechanism to Evade Host Immune Response. *Stem Cells* 30, 2342–2353. <https://doi.org/10.1002/stem.1199>
- Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458–462. <https://doi.org/10.1038/35013070>
- Boué, J., Basso, L., Cenac, N., Blanpied, C., Rolli-Derkinderen, M., Neunlist, M., Vergnolle, N., Dietrich, G., 2014. Endogenous regulation of visceral pain via production of opioids by colitogenic CD4(+) T cells in mice. *Gastroenterology* 146, 166–175. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.09.020>
- Boyer, L., Ghoreishi, M., Templeman, V., Vallance, B.A., Buchan, A.M., Jevon, G., Jacobson, K., 2005. Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 117, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2004.10.006>
- Brand, S., 2009. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 58, 1152–1167. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.163667>
- Brehmer, A., 2006. Structure of enteric neurons. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 186, 1–91.
- Brehmer, A., Rupprecht, H., Neuhuber, W., 2010. Two submucosal nerve plexus in human intestines. *Histochem. Cell Biol.* 133, 149–161. <https://doi.org/10.1007/s00418-009-0657-2>
- Brehmer, A., Schrödl, F., Neuhuber, W., 1999. Morphological classifications of enteric neurons — 100 years after Dogiel. *Anat. Embryol. (Berl.)* 200, 125–135. <https://doi.org/10.1007/s004290050267>
- Brendolan, A., Rosado, M.M., Carsetti, R., Selleri, L., Dear, T.N., 2007. Development and function of the mammalian spleen. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 29, 166–177. <https://doi.org/10.1002/bies.20528>
- Bressenot, A., Chevaux, J.-B., Williet, N., Oussalah, A., Germain, A., Gauchotte, G., Wissler, M.-P., Vignaud, J.-M., Bresler, L., Bigard, M.-A., Plénat, F., Guéant, J.-L., Peyrin-Biroulet, L., 2013. Submucosal plexitis as a predictor of postoperative surgical recurrence in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 1654–1661. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e318281f336>
- Bressenot, A., Peyrin-Biroulet, L., 2015. Histologic features predicting postoperative Crohn's disease recurrence. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 468–475. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000224>

- Brewer, D.B., Thompson, H., Haynes, I.G., Alexander-Williams, J., 1990. Axonal damage in Crohn's disease is frequent, but non-specific. *J. Pathol.* 161, 301–311. <https://doi.org/10.1002/path.1711610406>
- Brierley, S.M., Linden, D.R., 2014. Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.103>
- Brown, D.R., Price, L.D., 2008. Catecholamines and sympathomimetic drugs decrease early *Salmonella Typhimurium* uptake into porcine Peyer's patches. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 29–35. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00348.x>
- Brun, P., Giron, M.C., Qesari, M., Porzionato, A., Caputi, V., Zoppellaro, C., Banzato, S., Grillo, A.R., Spagnol, L., De Caro, R., Pizzuti, D., Barbieri, V., Rosato, A., Sturniolo, G.C., Martines, D., Zaninotto, G., Palù, G., Castagliuolo, I., 2013. Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system. *Gastroenterology* 145, 1323–1333. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.08.047>
- Buisine, M.P., Desreumaux, P., Debailleul, V., Gambiez, L., Geboes, K., Ectors, N., Delescaut, M.P., Degand, P., Aubert, J.P., Colombel, J.F., Porchet, N., 1999. Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 5, 24–32. <https://doi.org/10.1097/00054725-199902000-00004>
- Buisine, M.P., Desreumaux, P., Leteurtre, E., Copin, M.C., Colombel, J.F., Porchet, N., Aubert, J.P., 2001. Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut* 49, 544–551.
- Buonocore, S., Ahern, P.P., Uhlig, H.H., Ivanov, I.I., Littman, D.R., Maloy, K.J., Powrie, F., 2010. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* 464, 1371–1375. <https://doi.org/10.1038/nature08949>
- Burgueño, J.F., Barba, A., Eyre, E., Romero, C., Neunlist, M., Fernández, E., 2016. TLR2 and TLR9 modulate enteric nervous system inflammatory responses to lipopolysaccharide. *J. Neuroinflammation* 13, 187. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0653-0>
- Burns, R.C., Rivera-Nieves, J., Moskaluk, C.A., Matsumoto, S., Cominelli, F., Ley, K., 2001. Antibody blockade of ICAM-1 and VCAM-1 ameliorates inflammation in the SAMP-1/Yit adoptive transfer model of Crohn's disease in mice. *Gastroenterology* 121, 1428–1436. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.29568>
- Bush, T.G., Savidge, T.C., Freeman, T.C., Cox, H.J., Campbell, E.A., Mucke, L., Johnson, M.H., 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., Liblau, R.S., 2003. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41, 81–93. <https://doi.org/10.1002/glia.10169>

- Caér, C., Wick, M.J., 2020. Human Intestinal Mononuclear Phagocytes in Health and Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.* 11, 410. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00410>
- Campbell, D.J., Butcher, E.C., 2002. Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* 195, 135–141. <https://doi.org/10.1084/jem.20011502>
- Capurso, L., Friedmann, C.A., Parks, A.G., 1968. Adrenergic fibres in the human intestine. *Gut* 9, 678–682. <https://doi.org/10.1136/gut.9.6.678>
- Cardoso, V., Chesné, J., Ribeiro, H., García-Cassani, B., Carvalho, T., Bouchery, T., Shah, K., Barbosa-Morais, N.L., Harris, N., Veiga-Fernandes, H., 2017. Neuronal regulation of type 2 innate lymphoid cells via neuromedin U. *Nature* 549, 277–281. <https://doi.org/10.1038/nature23469>
- Cario, E., Podolsky, D.K., 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.* 68, 7010–7017. <https://doi.org/10.1128/iai.68.12.7010-7017.2000>
- Carvajal Gonczi, C.M., Tabatabaei Shafiei, M., East, A., Martire, E., Maurice-Ventouris, M.H.I., Darlington, P.J., 2017. Reciprocal modulation of helper Th1 and Th17 cells by the β 2-adrenergic receptor agonist drug terbutaline. *FEBS J.* 284, 3018–3028. <https://doi.org/10.1111/febs.14166>
- Cervantes-Barragan, L., Colonna, M., 2018. AHR signaling in the development and function of intestinal immune cells and beyond. *Semin. Immunopathol.* 40, 371–377. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0694-9>
- Charo, I.F., Ransohoff, R.M., 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* 354, 610–621. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052723>
- Chassaing, B., Darfeuille-Michaud, A., 2011. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 1720–1728. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.054>
- Chassaing, B., Srinivasan, G., Delgado, M.A., Young, A.N., Gewirtz, A.T., Vijay-Kumar, M., 2012. Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS One* 7, e44328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044328>
- Cheadle, G.A., Costantini, T.W., Lopez, N., Bansal, V., Eliceiri, B.P., Coimbra, R., 2013. Enteric glia cells attenuate cytomix-induced intestinal epithelial barrier breakdown. *PLoS One* 8, e69042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069042>
- Chiocchetti, R., Mazzuoli, G., Albanese, V., Mazzoni, M., Clavenzani, P., Lalatta-Costerbosa, G., Lucchi, M.L., Di Guardo, G., Marruchella, G., Furness, J.B., 2008. Anatomical evidence for ileal Peyer's patches innervation by enteric nervous system: a potential route for prion neuroinvasion? *Cell Tissue Res.* 332, 185–194. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0583-y>

- Chou, R.C., Stinson, M.W., Noble, B.K., Spengler, R.N., 1996. Beta-adrenergic receptor regulation of macrophage-derived tumor necrosis factor-alpha production from rats with experimental arthritis. *J. Neuroimmunol.* 67, 7–16. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(96\)00023-9](https://doi.org/10.1016/0165-5728(96)00023-9)
- Cirillo, C., Sarnelli, G., Turco, F., Mango, A., Grosso, M., Aprea, G., Masone, S., Cuomo, R., 2011. Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglial cells and induces autocrine nitric oxide production. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 23, e372–382. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01748.x>
- Clairembault, T., Kamphuis, W., Leclair-Visonneau, L., Rolli-Derkinderen, M., Coron, E., Neunlist, M., Hol, E.M., Derkinderen, P., 2014. Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 130, 805–815. <https://doi.org/10.1111/jnc.12742>
- Clark, S.B., Rice, T.W., Tubbs, R.R., Richter, J.E., Goldblum, J.R., 2000. The nature of the myenteric infiltrate in achalasia: an immunohistochemical analysis. *Am. J. Surg. Pathol.* 24, 1153–1158. <https://doi.org/10.1097/00000478-200008000-00014>
- Cohen, R.D., 2002. The quality of life in patients with Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16, 1603–1609. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2002.01323.x>
- Collins, J., Borojevic, R., Verdu, E.F., Huizinga, J.D., Ratcliffe, E.M., 2014. Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 26, 98–107. <https://doi.org/10.1111/nmo.12236>
- Collins, S.M., Hurst, S.M., Main, C., Stanley, E., Khan, I., Blennerhassett, P., Swain, M., 1992. Effect of inflammation of enteric nerves. Cytokine-induced changes in neurotransmitter content and release. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 664, 415–424. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb39780.x>
- Colombel, J.F., Sandborn, W.J., Reinisch, W., Mantzaris, G.J., Kornbluth, A., Rachmilewitz, D., Lichtiger, S., D'Haens, G., Diamond, R.H., Broussard, D.L., Tang, K.L., van der Woude, C.J., Rutgeerts, P., SONIC Study Group, 2010. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 1383–1395. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904492>
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., Mantovani, A., 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073–1081. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>
- Coquenlorge, S., Duchalais, E., Chevalier, J., Cossais, F., Rolli-Derkinderen, M., Neunlist, M., 2014. Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system. *J. Neuroinflammation* 11, 202. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0202-7>
- Corica, D., Romano, C., 2017. Biological Therapy in Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *J. Clin. Gastroenterol.* 51, 100–110. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000696>

- Cornet, A., Savidge, T.C., Cabarrocas, J., Deng, W.L., Colombel, J.F., Lassmann, H., Desreumaux, P., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.231474098>
- Costagliola, A., Van Nassauw, L., Snyders, D., Adriaensen, D., Timmermans, J.-P., 2009. Voltage-gated delayed rectifier K_v 1-subunits may serve as distinctive markers for enteroglial cells with different phenotypes in the murine ileum. *Neurosci. Lett.* 461, 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.053>
- Costes, L.M., Boeckxstaens, G.E., Jonge, W.J. de, Cailotto, C., 2013. Neural networks in intestinal immunoregulation. *Organogenesis* 9, 216. <https://doi.org/10.4161/org.25646>
- Cumano, A., Berthault, C., Ramond, C., Petit, M., Golub, R., Bandeira, A., Pereira, P., 2019. New Molecular Insights into Immune Cell Development. *Annu. Rev. Immunol.* 37, 497–519. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041319>
- Cyster, J.G., Allen, C.D.C., 2019. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* 177, 524–540. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.016>
- da Cunha Franceschi, R., Nardin, P., Machado, C.V., Tortorelli, L.S., Martinez-Pereira, M.A., Zanotto, C., Gonçalves, C.-A., Zancan, D.M., 2017. Enteric glial reactivity to systemic LPS administration: Changes in GFAP and S100B protein. *Neurosci. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.neures.2016.12.005>
- da Silveira, A.B.M., de Oliveira, E.C., Neto, S.G., Luquetti, A.O., Fujiwara, R.T., Oliveira, R.C., Brehmer, A., 2011. Enteroglial cells act as antigen-presenting cells in chagasic megacolon. *Hum. Pathol.* 42, 522–532. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.06.016>
- Dahlhamer, J.M., Zammitti, E.P., Ward, B.W., Wheaton, A.G., Croft, J.B., 2016. Prevalence of Inflammatory Bowel Disease Among Adults Aged ≥18 Years - United States, 2015. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 1166–1169. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6542a3>
- Danese, S., Fiocchi, C., 2016. Endothelial Cell-Immune Cell Interaction in IBD. *Dig. Dis.* 34, 43–50. <https://doi.org/10.1159/000442925>
- D'Autréaux, F., Margolis, K.G., Roberts, J., Stevanovic, K., Mawe, G., Li, Z., Karamooz, N., Ahuja, A., Morikawa, Y., Cserjesi, P., Setlick, W., Gershon, M.D., 2011. Expression level of Hand2 affects specification of enteric neurons and gastrointestinal function in mice. *Gastroenterology* 141, 576–587, 587.e1–6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.059>
- de Buck van Overstraeten, A., Eshuis, E.J., Vermeire, S., Van Assche, G., Ferrante, M., D'Haens, G.R., Ponsioen, C.Y., Belmans, A., Buskens, C.J., Wolthuis, A.M., Bemelman, W.A., D'Hoore, A., 2017. Short- and medium-term outcomes following primary ileocaecal resection for Crohn's disease in two specialist centres. *Br. J. Surg.* 104, 1713–1722. <https://doi.org/10.1002/bjs.10595>

- De Giorgio, R., Barbara, G., Stanghellini, V., De Ponti, F., Salvioli, B., Tonini, M., Velio, P., Bassotti, G., Corinaldesi, R., 2002. Clinical and morphofunctional features of idiopathic myenteric ganglionitis underlying severe intestinal motor dysfunction: a study of three cases. *Am. J. Gastroenterol.* 97, 2454–2459. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.06002.x>
- De Giorgio, R., Camilleri, M., 2004. Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 16, 515–531. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2004.00538.x>
- De Giorgio, R., Giancola, F., Boschetti, E., Abdo, H., Lardeux, B., Neunlist, M., 2012. Enteric glia and neuroprotection: basic and clinical aspects. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 303, G887–G893. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00096.2012>
- De Giorgio, R., Guerrini, S., Barbara, G., Stanghellini, V., De Ponti, F., Corinaldesi, R., Moses, P.L., Sharkey, K.A., Mawe, G.M., 2004. Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system☆. *Gastroenterology* 126, 1872–1883. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.02.024>
- de Lange, K.M., Barrett, J.C., 2015. Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics. *J. Autoimmun.* 64, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.07.013>
- de las Casas-Engel, M., Domínguez-Soto, A., Sierra-Filardi, E., Bragado, R., Nieto, C., Puig-Kroger, A., Samaniego, R., Loza, M., Corcuera, M.T., Gómez-Aguado, F., Bustos, M., Sánchez-Mateos, P., Corbí, A.L., 2013. Serotonin skews human macrophage polarization through HTR2B and HTR7. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 190, 2301–2310. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201133>
- De Palma, G., Lynch, M.D.J., Lu, J., Dang, V.T., Deng, Y., Jury, J., Umeh, G., Miranda, P.M., Pigrau Pastor, M., Sidani, S., Pinto-Sanchez, M.I., Philip, V., McLean, P.G., Hagelsieb, M.-G., Surette, M.G., Bergonzelli, G.E., Verdu, E.F., Britz-McKibbin, P., Neufeld, J.D., Collins, S.M., Bercik, P., 2017. Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. *Sci. Transl. Med.* 9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6397>
- De Schepper, S., Verheijden, S., Aguilera-Lizarraga, J., Viola, M.F., Boesmans, W., Stakenborg, N., Voytyuk, I., Smidt, I., Boeckx, B., Dierckx de Casterlé, I., Baekelandt, V., Dominguez Gonzalez, E., Mack, M., Depoortere, I., De Strooper, B., Sprangers, B., Himmelreich, U., Soenen, S., Guilliams, M., Vanden Berghe, P., Jones, E., Lambrechts, D., Boeckxstaens, G., 2018. Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis. *Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.048>
- de Souza, H.S.P., Fiocchi, C., 2016. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 13–27. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.186>

- Decousus, S., Boucher, A.-L., Joubert, J., Pereira, B., Dubois, A., Goutorbe, F., Déchelotte, P.J., Bommelaer, G., Buisson, A., 2016. Myenteric plexitis is a risk factor for endoscopic and clinical postoperative recurrence after ileocolonic resection in Crohn's disease. *Dig. Liver Dis. Off. Ital. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 48, 753–758. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2016.02.023>
- Delgado, M., Gonzalez-Rey, E., Ganea, D., 2005. The neuropeptide vasoactive intestinal peptide generates tolerogenic dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 7311–7324. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7311>
- Deshmukh, H.S., Liu, Y., Menkiti, O.R., Mei, J., Dai, N., O'Leary, C.E., Oliver, P.M., Kolls, J.K., Weiser, J.N., Worthen, G.S., 2014. The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to *Escherichia coli* K1 sepsis in neonatal mice. *Nat. Med.* 20, 524–530. <https://doi.org/10.1038/nm.3542>
- Dhawan, S., De Palma, G., Willemze, R.A., Hilbers, F.W., Verseijden, C., Luyer, M.D., Nuding, S., Wehkamp, J., Souwer, Y., de Jong, E.C., Seppen, J., van den Wijngaard, R.M., Wehner, S., Verdu, E., Bercik, P., de Jonge, W.J., 2016. Acetylcholine-producing T cells in the intestine regulate antimicrobial peptide expression and microbial diversity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 311, G920–G933. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00114.2016>
- Diefenbach, A., Colonna, M., Koyasu, S., 2014. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity* 41, 354–365. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.005>
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., Giambanco, I., 2009. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1008–1022. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.009>
- Drayton, D.L., Liao, S., Mounzer, R.H., Ruddle, N.H., 2006. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat. Immunol.* 7, 344–353. <https://doi.org/10.1038/ni1330>
- Duchalais, E., Guilluy, C., Nedellec, S., Touvron, M., Bessard, A., Touchefeu, Y., Bossard, C., Boudin, H., Louarn, G., Neunlist, M., Van Landeghem, L., 2018. Colorectal Cancer Cells Adhere to and Migrate Along the Neurons of the Enteric Nervous System. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 31–49. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.10.002>
- Dudakov, J.A., Hanash, A.M., van den Brink, M.R.M., 2015. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 747–785. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112123>
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 10, 857–863. <https://doi.org/10.1038/ni.1767>

- Dulai, P.S., Siegel, C.A., Colombel, J.-F., Sandborn, W.J., Peyrin-Biroulet, L., 2014. Systematic review: Monotherapy with antitumour necrosis factor α agents versus combination therapy with an immunosuppressive for IBD. *Gut* 63, 1843–1853. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307126>
- Dustin, M.L., 2005. A dynamic view of the immunological synapse. *Semin. Immunol.* 17, 400–410. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2005.09.002>
- Dustin, M.L., Baldari, C.T., 2017. The Immune Synapse: Past, Present, and Future. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1584, 1–5. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6881-7_1
- Dustin, M.L., Colman, D.R., 2002. Neural and immunological synaptic relations. *Science* 298, 785–789. <https://doi.org/10.1126/science.1076386>
- Dvorak, A.M., Osage, J.E., Monahan, R.A., Dickersin, G.R., 1980. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. III. Target tissues. Proliferation of and injury to smooth muscle and the autonomic nervous system. *Hum. Pathol.* 11, 620–634. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(80\)80073-6](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(80)80073-6)
- Dvorak, A.M., Silen, W., 1985. Differentiation between Crohn's disease and other inflammatory conditions by electron microscopy. *Ann. Surg.* 201, 53–63.
- Emmrich, J., Seyfarth, M., Fleig, W.E., Emmrich, F., 1991. Treatment of inflammatory bowel disease with anti-CD4 monoclonal antibody. *Lancet Lond. Engl.* 338, 570–571. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91133-f](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91133-f)
- Enomoto, H., Araki, T., Jackman, A., Heuckeroth, R.O., Snider, W.D., Johnson, E.M., Milbrandt, J., 1998. GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* 21, 317–324. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80541-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80541-3)
- Eri, R.D., Adams, R.J., Tran, T.V., Tong, H., Das, I., Roche, D.K., Oancea, I., Png, C.W., Jeffery, P.L., Radford-Smith, G.L., Cook, M.C., Florin, T.H., McGuckin, M.A., 2011. An intestinal epithelial defect conferring ER stress results in inflammation involving both innate and adaptive immunity. *Mucosal Immunol.* 4, 354–364. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.74>
- Erspamer, V., Asero, B., 1952. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169, 800–801. <https://doi.org/10.1038/169800b0>
- Etienne-Manneville, S., Manneville, J.B., Adamson, P., Wilbourn, B., Greenwood, J., Couraud, P.O., 2000. ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J. Immunol.* Baltim. Md 1950 165, 3375–3383.
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., Durham, S.R., Schmidt-Weber, C.B., Cavani, A., 2009. Th22

- cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J. Clin. Invest.* 119, 3573–3585. <https://doi.org/10.1172/JCI40202>
- Facco, M., Brun, P., Baesso, I., Costantini, M., Rizzetto, C., Berto, A., Baldan, N., Palù, G., Semenzato, G., Castagliuolo, I., Zaninotto, G., 2008. T cells in the myenteric plexus of achalasia patients show a skewed TCR repertoire and react to HSV-1 antigens. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 1598–1609. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2008.01956.x>
- Fantini, M.C., Rizzo, A., Fina, D., Caruso, R., Sarra, M., Stolfi, C., Becker, C., Macdonald, T.T., Pallone, F., Neurath, M.F., Monteleone, G., 2009. Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression. *Gastroenterology* 136, 1308–1316, e1-3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.053>
- Farber, D.L., Netea, M.G., Radbruch, A., Rajewsky, K., Zinkernagel, R.M., 2016. Immunological memory: lessons from the past and a look to the future. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 124–128. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.13>
- Feagan, B.G., Sandborn, W.J., D'Haens, G., Panés, J., Kaser, A., Ferrante, M., Louis, E., Franchimont, D., Dewit, O., Seidler, U., Kim, K.-J., Neurath, M.F., Schreiber, S., Scholl, P., Pamulapati, C., Lalovic, B., Visvanathan, S., Padula, S.J., Herichova, I., Soaita, A., Hall, D.B., Böcher, W.O., 2017. Induction therapy with the selective interleukin-23 inhibitor risankizumab in patients with moderate-to-severe Crohn's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Lond. Engl.* 389, 1699–1709. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30570-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30570-6)
- Felten, D.L., Felten, S.Y., Bellinger, D.L., Carlson, S.L., Ackerman, K.D., Madden, K.S., Olschowki, J.A., Livnat, S., 1987. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol. Rev.* 100, 225–260. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1987.tb00534.x>
- Felten, D.L., Felten, S.Y., Carlson, S.L., Olschowka, J.A., Livnat, S., 1985. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 135, 755s–765s.
- Feng, T., Cao, A.T., Weaver, C.T., Elson, C.O., Cong, Y., 2011. Interleukin-12 converts Foxp3+ regulatory T cells to interferon- γ -producing Foxp3+ T cells that inhibit colitis. *Gastroenterology* 140, 2031–2043. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.03.009>
- Ferrante, M., de Hertogh, G., Hlavaty, T., D'Haens, G., Penninckx, F., D'Hoore, A., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Geboes, K., van Assche, G., 2006. The value of myenteric plexitis to predict early postoperative Crohn's disease recurrence. *Gastroenterology* 130, 1595–1606. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.02.025>
- Ferrari, M., Cosentino, M., Marino, F., Bombelli, R., Rasini, E., Lecchini, S., Frigo, G., 2004. Dopaminergic D1-like receptor-dependent inhibition of tyrosine hydroxylase mRNA expression and

- catecholamine production in human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 67, 865–873. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.10.004>
- Ferri, G.L., Probert, L., Cocchia, D., Michetti, F., Marangos, P.J., 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. <https://doi.org/10.1038/297409a0>
- Feuerstein, J.D., Cheifetz, A.S., 2017. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clin. Proc.* 92, 1088–1103. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.04.010>
- Filipello, F., Pozzi, D., Proietti, M., Romagnani, A., Mazzitelli, S., Matteoli, M., Verderio, C., Grassi, F., 2016. Ectonucleotidase activity and immunosuppression in astrocyte-CD4 T cell bidirectional signaling. *Oncotarget* 7, 5143–5156. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6914>
- bidirectional signaling. *Oncotarget* 7, 5143–5156. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6914>
- Filippone, R.T., Robinson, A.M., Jovanovska, V., Stavely, R., Apostolopoulos, V., Bornstein, J.C., Nurgali, K., 2018. Targeting eotaxin-1 and CCR3 receptor alleviates enteric neuropathy and colonic dysfunction in TNBS-induced colitis in guinea pigs. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 30, e13391. <https://doi.org/10.1111/nmo.13391>
- Finney, H.M., Akbar, A.N., Lawson, A.D.G., 2004. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 104–113. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.104>
- Fiocchi, C., 1997. Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 273, G769–G775.
- Fiorino, G., Bonifacio, C., Peyrin-Biroulet, L., Danese, S., 2016. Preventing Collateral Damage in Crohn's Disease: The Lémann Index. *J. Crohns Colitis* 10, 495–500. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv240>
- Flamant, M., Aubert, P., Rolli-Derkinderen, M., Bourreille, A., Neunlist, M.R., Mahé, M.M., Meurette, G., Marteyn, B., Savidge, T., Galmiche, J.P., Sansonetti, P.J., Neunlist, M., 2011. Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut* 60, 473–484. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.229237>
- Fletcher, E.L., Clark, M.J., Furness, J.B., 2002. Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus. *Cell Tissue Res.* 308, 339–346. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0566-3>
- Fonseca-Pereira, D., Arroz-Madeira, S., Rodrigues-Campos, M., Barbosa, I.A.M., Domingues, R.G., Bento, T., Almeida, A.R.M., Ribeiro, H., Potocnik, A.J., Enomoto, H., Veiga-Fernandes, H., 2014. The neurotrophic factor receptor RET drives haematopoietic stem cell survival and function. *Nature* 514, 98–101. <https://doi.org/10.1038/nature13498>

- Forsythe, P., Bienenstock, J., Kunze, W.A., 2014. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Adv. Exp. Med. Biol.* 817, 115–133. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_5
- Fournier, A.P., Quenault, A., Martinez de Lizarrondo, S., Gauberti, M., Defer, G., Vivien, D., Docagne, F., Macrez, R., 2017. Prediction of disease activity in models of multiple sclerosis by molecular magnetic resonance imaging of P-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 6116–6121. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619424114>
- Fritz, T., Niederreiter, L., Adolph, T., Blumberg, R.S., Kaser, A., 2011. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut* 60, 1580–1588. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.206466>
- Frohman, E.M., Frohman, T.C., Dustin, M.L., Vayuvegula, B., Choi, B., Gupta, A., van den Noort, S., Gupta, S., 1989. The induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression on human fetal astrocytes by interferon-gamma, tumor necrosis factor alpha, lymphotoxin, and interleukin-1: relevance to intracerebral antigen presentation. *J. Neuroimmunol.* 23, 117–124. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(89\)90030-1](https://doi.org/10.1016/0165-5728(89)90030-1)
- Frolkis, A.D., Dykeman, J., Negrón, M.E., Debruyn, J., Jette, N., Fiest, K.M., Frolkis, T., Barkema, H.W., Rioux, K.P., Panaccione, R., Ghosh, S., Wiebe, S., Kaplan, G.G., 2013. Risk of surgery for inflammatory bowel diseases has decreased over time: a systematic review and meta-analysis of population-based studies. *Gastroenterology* 145, 996–1006. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.07.041>
- Fujii, T., Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Ono, S., Horiguchi, K., Kawashima, K., 2017. Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. *Front. Immunol.* 8, 1085. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01085>
- Fujii, T., Takada-Takatori, Y., Kawashima, K., 2007. Roles played by lymphocyte function-associated antigen-1 in the regulation of lymphocytic cholinergic activity. *Life Sci.* 80, 2320–2324. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.01.012>
- Fung, C., Boesmans, W., Cirillo, C., Foong, J.P.P., Bornstein, J.C., Vanden Berghe, P., 2017. VPAC Receptor Subtypes Tune Purinergic Neuron-to-Glia Communication in the Murine Submucosal Plexus. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 118. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00118>
- Furness, J.B., 2012. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 286–294. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>
- Furness, J.B., 2006. Novel gut afferents: Intrinsic afferent neurons and intestinofugal neurons. *Auton. Neurosci.* 125, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.01.007>
- Furness, J.B., 2000. Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 87–96.

- Furness, J.B., Jones, C., Nurgali, K., Clerc, N., 2004. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.* 72, 143–164.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2003.12.004>
- Furness, J.B., Rivera, L.R., Cho, H.-J., Bravo, D.M., Callaghan, B., 2013. The gut as a sensory organ. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.180>
- Fuss, I.J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J.S., de la Motte, C., Strong, S.A., Fiocchi, C., Strober, W., 1996. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 157, 1261–1270.
- Gabanyi, I., Muller, P.A., Feighery, L., Oliveira, T.Y., Costa-Pinto, F.A., Mucida, D., 2016. Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages. *Cell* 164, 378–391.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.023>
- Gabay, C., 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res. Ther.* 8 Suppl 2, S3.
<https://doi.org/10.1186/ar1917>
- Gabella, G., 1981. Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience* 6, 425–436.
- Gabella, G., 1972. Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J. Anat.* 111, 69–97.
- Gadek, T.R., Burdick, D.J., McDowell, R.S., Stanley, M.S., Marsters, J.C., Paris, K.J., Oare, D.A., Reynolds, M.E., Ladner, C., Zioncheck, K.A., Lee, W.P., Gribling, P., Dennis, M.S., Skelton, N.J., Tumas, D.B., Clark, K.R., Keating, S.M., Beresini, M.H., Tilley, J.W., Presta, L.G., Bodary, S.C., 2002. Generation of an LFA-1 antagonist by the transfer of the ICAM-1 immunoregulatory epitope to a small molecule. *Science* 295, 1086–1089. <https://doi.org/10.1126/science.295.5557.1086>
- Gahmberg, C.G., 1997. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 643–650. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(97\)80117-2](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(97)80117-2)
- Galligan, J.J., LePard, K.J., Schneider, D.A., Zhou, X., 2000. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 97–103.
[https://doi.org/10.1016/s0165-1838\(00\)00130-2](https://doi.org/10.1016/s0165-1838(00)00130-2)
- Gampierakis, I.-A., Koutmani, Y., Semitekolou, M., Morianos, I., Charalampopoulos, I., Xanthou, G., Gravanis, A., Karalis, K.P., 2020. Hippocampal neural stem cells and microglia response to experimental inflammatory bowel disease (IBD). *Mol. Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1038/s41380-020-0651-6>
- Geboes, K., Collins, S., 1998. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 10, 189–202.

- Geboes, K., Rutgeerts, P., Ectors, N., Mebis, J., Penninckx, F., Vantrappen, G., Desmet, V.J., 1992. Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. *Gastroenterology* 103, 439–447. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)90832-j](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)90832-j)
- Geginat, J., Paroni, M., Facciotti, F., Gruarin, P., Kastirr, I., Caprioli, F., Pagani, M., Abrignani, S., 2013. The CD4-centered universe of human T cell subsets. *Semin. Immunol.* 25, 252–262. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.012>
- Geremia, A., Arancibia-Cárcamo, C.V., 2017. Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. *Front. Immunol.* 8, 1296. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01296>
- Geremia, A., Arancibia-Cárcamo, C.V., Fleming, M.P.P., Rust, N., Singh, B., Mortensen, N.J., Travis, S.P.L., Powrie, F., 2011. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* 208, 1127–1133. <https://doi.org/10.1084/jem.20101712>
- Gershon, M.D., 1999. The enteric nervous system: a second brain. *Hosp. Pract.* 1995 34, 31–32, 35–38, 41–42 passim.
- Gershon, M.D., Rothman, T.P., 1991. Enteric glia. *Glia* 4, 195–204. <https://doi.org/10.1002/glia.440040211>
- Gionchetti, P., Dignass, A., Danese, S., Magro Dias, F.J., Rogler, G., Lakatos, P.L., Adamina, M., Ardizzone, S., Buskens, C.J., Sebastian, S., Laureti, S., Sampietro, G.M., Vucelic, B., van der Woude, C.J., Barreiro-de Acosta, M., Maaser, C., Portela, F., Vavricka, S.R., Gomollón, F., ECCO, 2017. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 2: Surgical Management and Special Situations. *J. Crohns Colitis* 11, 135–149. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw169>
- Gklavas, A., Dellaportas, D., Papaconstantinou, I., 2017. Risk factors for postoperative recurrence of Crohn's disease with emphasis on surgical predictors. *Ann. Gastroenterol.* 30, 598–612. <https://doi.org/10.20524/aog.2017.0195>
- Godinho-Silva, C., Cardoso, F., Veiga-Fernandes, H., 2019. Neuro-Immune Cell Units: A New Paradigm in Physiology. *Annu. Rev. Immunol.* 37, 19–46. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041812>
- Gold, M.S., Gebhart, G.F., 2010. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat. Med.* 16, 1248–1257. <https://doi.org/10.1038/nm.2235>
- Goldstein, A.M., Hofstra, R.M.W., Burns, A.J., 2013. Building a brain in the gut: development of the enteric nervous system. *Clin. Genet.* 83, 307–316. <https://doi.org/10.1111/cge.12054>
- Gomez de Agüero, M., Ganal-Vonarburg, S.C., Fuhrer, T., Rupp, S., Uchimura, Y., Li, H., Steinert, A., Heikenwalder, M., Hapfelmeier, S., Sauer, U., McCoy, K.D., Macpherson, A.J., 2016. The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science* 351, 1296–1302. <https://doi.org/10.1126/science.aad2571>

- Gomollón, F., Dignass, A., Annese, V., Tilg, H., Van Assche, G., Lindsay, J.O., Peyrin-Biroulet, L., Cullen, G.J., Daperno, M., Kucharzik, T., Rieder, F., Almer, S., Armuzzi, A., Harbord, M., Langhorst, J., Sans, M., Chowers, Y., Fiorino, G., Juillerat, P., Mantzaris, G.J., Rizzello, F., Vavricka, S., Gionchetti, P., ECCO, 2017. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J. Crohns Colitis* 11, 3–25. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw168>
- Goyal, R.K., Hirano, I., 1996. The enteric nervous system. *N. Engl. J. Med.* 334, 1106–1115. <https://doi.org/10.1056/NEJM199604253341707>
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., Dustin, M.L., 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221–227.
- Grubišić, V., Gulbransen, B.D., 2017. Enteric glia: the most alimentary of all glia: Enteric glia. *J. Physiol.* 595, 557–570. <https://doi.org/10.1113/JP271021>
- Grubišić, V., McClain, J.L., Fried, D.E., Grants, I., Rajasekhar, P., Csizmadia, E., Ajijola, O.A., Watson, R.E., Poole, D.P., Robson, S.C., Christofi, F.L., Gulbransen, B.D., 2020. Enteric Glia Modulate Macrophage Phenotype and Visceral Sensitivity following Inflammation. *Cell Rep.* 32, 108100. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108100>
- Grubišić, V., Parpura, V., 2017. Two modes of enteric gliotransmission differentially affect gut physiology. *Glia* 65, 699–711. <https://doi.org/10.1002/glia.23121>
- Guedia, J., Brun, P., Bhave, S., Fitting, S., Kang, M., Dewey, W.L., Hauser, K.F., Akbarali, H.I., 2016. HIV-1 Tat exacerbates lipopolysaccharide-induced cytokine release via TLR4 signaling in the enteric nervous system. *Sci. Rep.* 6, 31203. <https://doi.org/10.1038/srep31203>
- Gulbransen, B.D., Sharkey, K.A., 2012. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 625–632. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.138>
- Gulbransen, B.D., Sharkey, K.A., 2009. Purinergic neuron-to-glia signaling in the enteric nervous system. *Gastroenterology* 136, 1349–1358. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.058>
- Gunasekera, D.C., Ma, J., Vacharathit, V., Shah, P., Ramakrishnan, A., Upadhyay, P., Shen, Z., Sheh, A., Brayton, C.F., Whary, M.T., Fox, J.G., Bream, J.H., 2020. The development of colitis in IL10-/mice is dependent on IL-22. *Mucosal Immunol.* 13, 493–506. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0252-3>
- Gutiérrez-Vázquez, C., Quintana, F.J., 2018. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity* 48, 19–33. <https://doi.org/10.1016/j.jimmuni.2017.12.012>

- Gwynne, R.M., Thomas, E.A., Goh, S.M., Sjövall, H., Bornstein, J.C., 2004. Segmentation induced by intraluminal fatty acid in isolated guinea-pig duodenum and jejunum. *J. Physiol.* 556, 557–569. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.057182>
- Hamamoto, N., Maemura, K., Hirata, I., Murano, M., Sasaki, S., Katsu, K., 1999. Inhibition of dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice by intracolonically administered antibodies against adhesion molecules (endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) or intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)). *Clin. Exp. Immunol.* 117, 462–468. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00985.x>
- Hammoudi, N., Cazals-Hatem, D., Auzolle, C., Gardair, C., Ngollo, M., Bottois, H., Nancey, S., Pariente, B., Buisson, A., Treton, X., Fumery, M., Bezault, M., Seksik, P., Le Bourhis, L., REMIND Study Group Investigators, Flejou, J.-F., Allez, M., 2020. Association Between Microscopic Lesions at Ileal Resection Margin and Recurrence After Surgery in Patients With Crohn's Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 18, 141-149.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.04.045>
- Hanani, M., Francke, M., Härtig, W., Grosche, J., Reichenbach, A., Pannicke, T., 2000. Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, G644-651. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.278.4.G644>
- Hanani, M., Reichenbach, A., 1994. Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 278, 153–160.
- Hanani, M., Zamir, O., Baluk, P., 1989. Glial cells in the guinea pig myenteric plexus are dye coupled. *Brain Res.* 497, 245–249. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90269-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90269-2)
- Hao, M.M., Bornstein, J.C., Vanden Berghe, P., Lomax, A.E., Young, H.M., Foong, J.P.P., 2013. The emergence of neural activity and its role in the development of the enteric nervous system. *Dev. Biol.* 382, 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.006>
- Harbord, M., Annese, V., Vavricka, S.R., Allez, M., Barreiro-de Acosta, M., Boberg, K.M., Burisch, J., De Vos, M., De Vries, A.-M., Dick, A.D., Juillerat, P., Karlsen, T.H., Koutroubakis, I., Lakatos, P.L., Orchard, T., Papay, P., Raine, T., Reinshagen, M., Thaci, D., Tilg, H., Carbonnel, F., European Crohn's and Colitis Organisation, 2016. The First European Evidence-based Consensus on Extra-intestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohns Colitis* 10, 239–254. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv213>
- Harrison, O.J., Powrie, F.M., 2013. Regulatory T cells and immune tolerance in the intestine. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018341>
- Hart, A.L., Al-Hassi, H.O., Rigby, R.J., Bell, S.J., Emmanuel, A.V., Knight, S.C., Kamm, M.A., Stagg, A.J., 2005. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 129, 50–65. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.013>

- Heanue, T.A., Pachnis, V., 2007. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 466–479. <https://doi.org/10.1038/nrn2137>
- Heazlewood, C.K., Cook, M.C., Eri, R., Price, G.R., Tauro, S.B., Taupin, D., Thornton, D.J., Png, C.W., Crockford, T.L., Cornall, R.J., Adams, R., Kato, M., Nelms, K.A., Hong, N.A., Florin, T.H.J., Goodnow, C.C., McGuckin, M.A., 2008. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med.* 5, e54. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050054>
- Heizmann, C.W., 2002. The multifunctional S100 protein family. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 172, 69–80. <https://doi.org/10.1385/1-59259-183-3:069>
- Hens, J., Vanderwinden, J.M., De Laet, M.H., Scheuermann, D.W., Timmermans, J.P., 2001. Morphological and neurochemical identification of enteric neurones with mucosal projections in the human small intestine. *J. Neurochem.* 76, 464–471. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00032.x>
- Herrera, J.L., Gonzalez-Rey, E., Fernandez-Montesinos, R., Quintana, F.J., Najmanovich, R., Pozo, D., 2009. Toll-like receptor stimulation differentially regulates vasoactive intestinal peptide type 2 receptor in macrophages. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 3209–3217. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00662.x>
- Hoff, S., Zeller, F., von Weyhern, C.W.H., Wegner, M., Schemann, M., Michel, K., 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. <https://doi.org/10.1002/cne.21769>
- Hogg, N., Patzak, I., Willenbrock, F., 2011. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 416–426. <https://doi.org/10.1038/nri2986>
- Hoyle, C.H., Burnstock, G., 1989. Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *J. Anat.* 166, 7–22.
- Huang, H., Fang, M., Jostins, L., Umićević Mirkov, M., Boucher, G., Anderson, C.A., Andersen, V., Cleynen, I., Cortes, A., Crins, F., D'Amato, M., Deffontaine, V., Dmitrieva, J., Docampo, E., Elansary, M., Farh, K.K.-H., Franke, A., Gori, A.-S., Goyette, P., Halfvarson, J., Haritunians, T., Knight, J., Lawrence, I.C., Lees, C.W., Louis, E., Mariman, R., Meuwissen, T., Mni, M., Momozawa, Y., Parkes, M., Spain, S.L., Théâtre, E., Trynka, G., Satsangi, J., van Sommeren, S., Vermeire, S., Xavier, R.J., International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium, Weersma, R.K., Duerr, R.H., Mathew, C.G., Rioux, J.D., McGovern, D.P.B., Cho, J.H., Georges, M., Daly, M.J., Barrett, J.C., 2017. Fine-mapping inflammatory bowel disease loci to single-variant resolution. *Nature* 547, 173–178. <https://doi.org/10.1038/nature22969>

- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., Thomas, G., 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599–603. <https://doi.org/10.1038/35079107>
- Hynes, R.O., 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11–25. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90115-s](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90115-s)
- 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., Eberl, G., Grice, E.A., Veiga-Fernandes, H., 2016. Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature* 535, 440–443. <https://doi.org/10.1038/nature18644>
- Imam, T., Park, S., Kaplan, M.H., Olson, M.R., 2018. Effector T Helper Cell Subsets in Inflammatory Bowel Diseases. *Front. Immunol.* 9, 1212. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01212>
- Ishikawa, H., Naito, T., Iwanaga, T., Takahashi-Iwanaga, H., Suematsu, M., Hibi, T., Nanno, M., 2007. Curriculum vitae of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral characteristics. *Immunol. Rev.* 215, 154–165.
- Jairath, V., Khanna, R., Feagan, B.G., 2017. Alicaforseen for the treatment of inflammatory bowel disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* 26, 991–997. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1349753>
- Jakob, M.O., Murugan, S., Klose, C.S.N., 2020. Neuro-Immune Circuits Regulate Immune Responses in Tissues and Organ Homeostasis. *Front. Immunol.* 11, 308. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00308>
- James, D.G., Seo, D.H., Chen, J., Vemulapalli, C., Stone, C.D., 2011. Efalizumab, a human monoclonal anti-CD11a antibody, in the treatment of moderate to severe Crohn's Disease: an open-label pilot study. *Dig. Dis. Sci.* 56, 1806–1810. <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1525-6>
- Jang, H.-J., Kang, B., Choe, B.-H., 2019. The difference in extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease for children and adults. *Transl. Pediatr.* 8, 4–15. <https://doi.org/10.21037/tp.2019.01.06>
- Jarret, A., Jackson, R., Duizer, C., Healy, M.E., Zhao, J., Rone, J.M., Bielecki, P., Sefik, E., Roulis, M., Rice, T., Sivanathan, K.N., Zhou, T., Solis, A.G., Honcharova-Biletska, H., Vélez, K., Hartner, S., Low, J.S., Qu, R., de Zoete, M.R., Palm, N.W., Ring, A.M., Weber, A., Moor, A.E., Kluger, Y., Nowarski, R., Flavell, R.A., 2020. Enteric Nervous System-Derived IL-18 Orchestrates Mucosal Barrier Immunity. *Cell* 180, 50-63.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.016>

- Jess, T., Gamborg, M., Matzen, P., Munkholm, P., Sørensen, T.I.A., 2005. Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Am. J. Gastroenterol.* 100, 2724–2729. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.00287.x>
- Jessen, K.R., Mirsky, R., 1980. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 286, 736–737. <https://doi.org/10.1038/286736a0>
- Jeziorska, M., Haboubi, N., Schofield, P., Woolley, D.E., 2001. Distribution and activation of eosinophils in inflammatory bowel disease using an improved immunohistochemical technique. *J. Pathol.* 194, 484–492. <https://doi.org/10.1002/path.904>
- Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Wurbel, M.-A., Malissen, B., Márquez, G., Agace, W., 2003. Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J. Exp. Med.* 198, 963–969. <https://doi.org/10.1084/jem.20031244>
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Schumm, L.P., Sharma, Y., Anderson, C.A., Essers, J., Mitrovic, M., Ning, K., Cleynen, I., Theatre, E., Spain, S.L., Raychaudhuri, S., Goyette, P., Wei, Z., Abraham, C., Achkar, J.-P., Ahmad, T., Amininejad, L., Ananthakrishnan, A.N., Andersen, V., Andrews, J.M., Baidoo, L., Balschun, T., Bampton, P.A., Bitton, A., Boucher, G., Brand, S., Büning, C., Cohain, A., Cichon, S., D'Amato, M., De Jong, D., Devaney, K.L., Dubinsky, M., Edwards, C., Ellinghaus, D., Ferguson, L.R., Franchimont, D., Fransen, K., Gearry, R., Georges, M., Gieger, C., Glas, J., Haritunians, T., Hart, A., Hawkey, C., Hedl, M., Hu, X., Karlsen, T.H., Kupcinskas, L., Kugathasan, S., Latiano, A., Laukens, D., Lawrence, I.C., Lees, C.W., Louis, E., Mahy, G., Mansfield, J., Morgan, A.R., Mowat, C., Newman, W., Palmieri, O., Ponsioen, C.Y., Potocnik, U., Prescott, N.J., Regueiro, M., Rotter, J.I., Russell, R.K., Sanderson, J.D., Sans, M., Satsangi, J., Schreiber, S., Simms, L.A., Sventoraityte, J., Targan, S.R., Taylor, K.D., Tremelling, M., Verspaget, H.W., De Vos, M., Wijmenga, C., Wilson, D.C., Winkelmann, J., Xavier, R.J., Zeissig, S., Zhang, B., Zhang, C.K., Zhao, H., International IBD Genetics Consortium (IIBDGC), Silverberg, M.S., Annese, V., Hakonarson, H., Brant, S.R., Radford-Smith, G., Mathew, C.G., Rioux, J.D., Schadt, E.E., Daly, M.J., Franke, A., Parkes, M., Vermeire, S., Barrett, J.C., Cho, J.H., 2012. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491, 119–124. <https://doi.org/10.1038/nature11582>
- Jp, F., Tv, N., Jb, F., Jc, B., Hm, Y., 2012. Myenteric neurons of the mouse small intestine undergo significant electrophysiological and morphological changes during postnatal development. *J. Physiol.* 590, 2375–2390. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.225938>

- Kabouridis, P.S., Lasrado, R., McCallum, S., Chng, S.H., Snippert, H.J., Clevers, H., Pettersson, S., Pachnis, V., 2015. Microbiota Controls the Homeostasis of Glial Cells in the Gut Lamina Propria. *Neuron* 85, 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.037>
- Kabouridis, P.S., Pachnis, V., 2015. Emerging roles of gut microbiota and the immune system in the development of the enteric nervous system. *J. Clin. Invest.* 125, 956–964. <https://doi.org/10.1172/JCI76308>
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., Sakuraba, A., Kitazume, M.T., Sugita, A., Koganei, K., Akagawa, K.S., Hibi, T., 2008. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J. Clin. Invest.* 118, 2269–2280. <https://doi.org/10.1172/JCI34610>
- Kaser, A., Zeissig, S., Blumberg, R.S., 2010. Inflammatory Bowel Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 573–621. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101225>
- Kawabe, T., Sun, S.-I., Fujita, T., Yamaki, S., Asao, A., Takahashi, T., So, T., Ishii, N., 2013. Homeostatic Proliferation of Naive CD4+ T Cells in Mesenteric Lymph Nodes Generates Gut-Tropic Th17 Cells. *J. Immunol.* 190, 5788–5798. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203111>
- Kawashima, K., Yoshikawa, K., Fujii, Y.X., Moriwaki, Y., Misawa, H., 2007. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. *Life Sci.* 80, 2314–2319. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.02.036>
- Keating, G.M., 2017. Lifitegrast Ophthalmic Solution 5%: A Review in Dry Eye Disease. *Drugs* 77, 201–208. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0681-1>
- Keating, S.M., Clark, K.R., Stefanich, L.D., Arellano, F., Edwards, C.P., Bodary, S.C., Spencer, S.A., Gadek, T.R., Marsters, J.C., Beresini, M.H., 2006. Competition between intercellular adhesion molecule-1 and a small-molecule antagonist for a common binding site on the alphal subunit of lymphocyte function-associated antigen-1. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 15, 290–303. <https://doi.org/10.1110/ps.051583406>
- Kelly, T.A., Jeanfavre, D.D., McNeil, D.W., Woska, J.R., Reilly, P.L., Mainolfi, E.A., Kishimoto, K.M., Nabozny, G.H., Zinter, R., Bormann, B.J., Rothlein, R., 1999. Cutting edge: a small molecule antagonist of LFA-1-mediated cell adhesion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 5173–5177.
- Kermarrec, L., Durand, T., Gonzales, J., Pabois, J., Hulin, P., Neunlist, M., Neveu, I., Naveilhan, P., 2019. Rat enteric glial cells express novel isoforms of Interleukine-7 regulated during inflammation. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 31, e13467. <https://doi.org/10.1111/nmo.13467>
- Kermarrec, L., Durand, T., Neunlist, M., Naveilhan, P., Neveu, I., 2016. Enteric glial cells have specific immunosuppressive properties. *J. Neuroimmunol.* 295–296, 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.04.011>

- Keshavarzian, A., Banan, A., Farhadi, A., Komanduri, S., Mutlu, E., Zhang, Y., Fields, J.Z., 2003. Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 52, 720–728. <https://doi.org/10.1136/gut.52.5.720>
- Khalili, H., Håkansson, N., Chan, S.S., Chen, Y., Lochhead, P., Ludvigsson, J.F., Chan, A.T., Hart, A.R., Olén, O., Wolk, A., 2020. Adherence to a Mediterranean diet is associated with a lower risk of later-onset Crohn's disease: results from two large prospective cohort studies. *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319505>
- Kiesler, P., Fuss, I.J., Strober, W., 2015. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 1, 154–170. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.01.006>
- Kimura, A., Naka, T., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., Kishimoto, T., 2008. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9721–9726. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804231105>
- Kioussis, D., Pachnis, V., 2009. Immune and Nervous Systems: More Than Just a Superficial Similarity? *Immunity* 31, 705–710. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.009>
- Klinzing, J.G., Niethard, N., Born, J., 2019. Mechanisms of systems memory consolidation during sleep. *Nat. Neurosci.* 22, 1598–1610. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0467-3>
- Klose, C.S.N., Mahlaköiv, T., Moeller, J.B., Rankin, L.C., Flamar, A.-L., Kabata, H., Monticelli, L.A., Moriyama, S., Putzel, G.G., Rakhilin, N., Shen, X., Kostenis, E., König, G.M., Senda, T., Carpenter, D., Farber, D.L., Artis, D., 2017. The neuropeptide neuromedin U stimulates innate lymphoid cells and type 2 inflammation. *Nature* 549, 282–286. <https://doi.org/10.1038/nature23676>
- Knight, S.C., 2016. Dendritic Cell-T-Cell Circuitry in Health and Changes in Inflammatory Bowel Disease and Its Treatment. *Dig. Dis. Basel Switz.* 34, 51–57. <https://doi.org/10.1159/000442926>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90736-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90736-7)
- Komuro, T., Bałuk, P., Burnstock, G., 1982. An ultrastructural study of neurons and non-neuronal cells in the myenteric plexus of the rabbit colon. *Neuroscience* 7, 1797–1806. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(82\)90037-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(82)90037-9)
- Koretz, K., Momburg, F., Otto, H.F., Möller, P., 1987. Sequential induction of MHC antigens on autochthonous cells of ileum affected by Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* 129, 493–502.
- Kumar, B.V., Connors, T.J., Farber, D.L., 2018. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* 48, 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
- Kuriyama, M., Kato, J., Morimoto, N., Fujimoto, T., Okada, H., Yamamoto, K., 2008. Specific gastroduodenoscopic findings in Crohn's disease: Comparison with findings in patients with ulcerative colitis and gastroesophageal reflux disease. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 40, 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2008.01.008>

- Laranjeira, C., Pachnis, V., 2009. Enteric nervous system development: Recent progress and future challenges. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 151, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2009.09.001>
- Le Berre, C., Peyrin-Biroulet, L., Buisson, A., Olympie, A., Ravel, M.-H., Bienenfeld, C., Gonzalez, F., 2019. Impact of inflammatory bowel diseases on working life: A French nationwide survey. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 51, 961–966. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2019.01.024>
- Le Berre-Scoul, C., Chevalier, J., Oleynikova, E., Cossais, F., Talon, S., Neunlist, M., Boudin, H., 2017. A novel enteric neuron-glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development. *J. Physiol.* 595, 583–598. <https://doi.org/10.1113/JP271989>
- Lee, S.J., Drabik, K., Van Wagoner, N.J., Lee, S., Choi, C., Dong, Y., Benveniste, E.N., 2000. ICAM-1-induced expression of proinflammatory cytokines in astrocytes: involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 165, 4658–4666. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.8.4658>
- Lee, S.J., Park, J.Y., Hou, J., Benveniste, E.N., 1999. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by proinflammatory cytokines in human astrocytes. *Glia* 25, 21–32. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(19990101\)25:1<21::aid-glia3>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(19990101)25:1<21::aid-glia3>3.0.co;2-r)
- Lemmens, B., de Buck van Overstraeten, A., Arijs, I., Sagaert, X., Van Assche, G., Vermeire, S., Tertychnyy, A., Geboes, K., Wolthuis, A., D'Hoore, A., De Hertogh, G., Ferrante, M., 2017. Submucosal Plexitis as a Predictive Factor for Postoperative Endoscopic Recurrence in Patients with Crohn's Disease Undergoing a Resection with Ileocolonic Anastomosis: Results from a Prospective Single-centre Study. *J. Crohns Colitis* 11, 212–220. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw135>
- León-Ponte, M., Ahern, G.P., O'Connell, P.J., 2007. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT₇ receptor. *Blood* 109, 3139–3146. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-052787>
- Ley, K., Hoffman, H.M., Kubis, P., Cassatella, M.A., Zychlinsky, A., Hedrick, C.C., Catz, S.D., 2018. Neutrophils: New insights and open questions. *Sci. Immunol.* 3. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat4579>
- Liang, S.C., Tan, X.-Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., Fouser, L.A., 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* 203, 2271–2279. <https://doi.org/10.1084/jem.20061308>
- Liñán-Rico, A., Turco, F., Ochoa-Cortes, F., Harzman, A., Needleman, B.J., Arsenescu, R., Abdel-Rasoul, M., Fadda, P., Grants, I., Whitaker, E., Cuomo, R., Christofi, F.L., 2016. Molecular Signaling and

Dysfunction of the Human Reactive Enteric Glial Cell Phenotype: Implications for GI Infection, IBD, POI, Neurological, Motility, and GI Disorders. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 1812–1834. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000854>

Linden, D.R., Couvrette, J.M., Ciolino, A., McQuoid, C., Blaszyk, H., Sharkey, K.A., Mawe, G.M., 2005. Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 17, 751–760. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2005.00703.x>

Lisak, R.P., Bealmear, B., 1997. Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on rat Schwann cells in vitro: comparison of interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* 2, 233–243.

Liu, H.-P., Cao, A.T., Feng, T., Li, Q., Zhang, W., Yao, S., Dann, S.M., Elson, C.O., Cong, Y., 2015. TGF- β converts Th1 cells into Th17 cells through stimulation of Runx1 expression. *Eur. J. Immunol.* 45, 1010–1018. <https://doi.org/10.1002/eji.201444726>

Liu, Y.A., Chung, Y.C., Pan, S.T., Shen, M.Y., Hou, Y.C., Peng, S.J., Pasricha, P.J., Tang, S.C., 2013. 3-D imaging, illustration, and quantitation of enteric glial network in transparent human colon mucosa. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 25, e324-338. <https://doi.org/10.1111/nmo.12115>

Lodes, M.J., Cong, Y., Elson, C.O., Mohamath, R., Landers, C.J., Targan, S.R., Fort, M., Hershberg, R.M., 2004. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J. Clin. Invest.* 113, 1296–1306. <https://doi.org/10.1172/JCI20295>

Lotz, M., Vaughan, J.H., Carson, D.A., 1988. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 241, 1218–1221.

Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., Xia, B., 2012. CD4 $^{+}$ T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 925135. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>

Ma, B., von Wasielewski, R., Lindenmaier, W., Dittmar, K.E.J., 2007. Immunohistochemical study of the blood and lymphatic vasculature and the innervation of mouse gut and gut-associated lymphoid tissue. *Anat. Histol. Embryol.* 36, 62–74. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2006.00741.x>

Maaser, C., Sturm, A., Vavricka, S.R., Kucharzik, T., Fiorino, G., Annese, V., Calabrese, E., Baumgart, D.C., Bettenworth, D., Borralho Nunes, P., Burisch, J., Castiglione, F., Eliakim, R., Ellul, P., González-Lama, Y., Gordon, H., Halligan, S., Katsanos, K., Kopylov, U., Kotze, P.G., Krustinš, E., Laghi, A., Limdi, J.K., Rieder, F., Rimola, J., Taylor, S.A., Tolan, D., van Rheenen, P., Verstockt, B., Stoker, J., European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO] and the European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology [ESGAR], 2019. ECCO-ESGAR Guideline for

- Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *J. Crohns Colitis* 13, 144–164. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy113>
- MacDermott, R.P., Nash, G.S., Nahm, M.H., 1989. Antibody secretion by human intestinal mononuclear cells from normal controls and inflammatory bowel disease patients. *Immunol. Invest.* 18, 449–457. <https://doi.org/10.3109/08820138909112255>
- Magomedze, G., Reddy, P.B.J., Eda, S., Ganusov, V.V., 2013. Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses. *Front. Physiol.* 4, 206. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00206>
- Mahe, M.M., 2018. Engineering a second brain in a dish. *Brain Res.* 1693, 165–168. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.04.015>
- Malizia, G., Calabrese, A., Cottone, M., Raimondo, M., Trejdosiewicz, L.K., Smart, C.J., Oliva, L., Pagliaro, L., 1991. Expression of leukocyte adhesion molecules by mucosal mononuclear phagocytes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 100, 150–159. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(91\)90595-c](https://doi.org/10.1016/0016-5085(91)90595-c)
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444. <https://doi.org/10.1038/nature07205>
- Margolis, K.G., Gershon, M.D., Bogunovic, M., 2016. Cellular Organization of Neuroimmune Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Trends Immunol.* 37, 487–501. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.05.003>
- Margolis, K.G., Stevanovic, K., Karamooz, N., Li, Z.S., Ahuja, A., D'Autréaux, F., Saurman, V., Chalazonitis, A., Gershon, M.D., 2011. Enteric Neuronal Density Contributes to the Severity of Intestinal Inflammation. *Gastroenterology* 141, 588-598.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.047>
- Matheis, F., Muller, P.A., Graves, C.L., Gabanyi, I., Kerner, Z.J., Costa-Borges, D., Ahrends, T., Rosenstiel, P., Mucida, D., 2020. Adrenergic Signaling in Muscularis Macrophages Limits Infection-Induced Neuronal Loss. *Cell* 180, 64-78.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.002>
- Maudlej, N., Hanani, M., 1992. Modulation of dye coupling among glial cells in the myenteric and submucosal plexuses of the guinea pig. *Brain Res.* 578, 94–98.
- Maul, J., Loddenkemper, C., Mundt, P., Berg, E., Giese, T., Stallmach, A., Zeitz, M., Duchmann, R., 2005. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 128, 1868–1878. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.043>
- Mawe, G.M., 2015. Colitis-induced neuroplasticity disrupts motility in the inflamed and post-inflamed colon. *J. Clin. Invest.* 125, 949–955. <https://doi.org/10.1172/JCI76306>

- Mawe, G.M., Strong, D.S., Sharkey, K.A., 2009. Plasticity of enteric nerve functions in the inflamed and postinflamed gut. *Neurogastroenterol. Motil.* 21, 481–491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01291.x>
- Mayne, C.G., Williams, C.B., 2013. Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 1772–1788. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e318281f5a3>
- McClain, J., Grubišić, V., Fried, D., Gomez-Suarez, R.A., Leinninger, G.M., Sévigny, J., Parpura, V., 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. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.061>
- McDonald, G.B., Schuffler, M.D., Kadin, M.E., Tytgat, G.N., 1985. Intestinal pseudoobstruction caused by diffuse lymphoid infiltration of the small intestine. *Gastroenterology* 89, 882–889. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(85\)90587-6](https://doi.org/10.1016/0016-5085(85)90587-6)
- McLean, L.P., Smith, A., Cheung, L., Sun, R., Grinchuk, V., Vanuytsel, T., Desai, N., Urban, J.F., Zhao, A., Raufman, J.-P., Shea-Donohue, T., 2015. Type 3 Muscarinic Receptors Contribute to Clearance of *Citrobacter rodentium*. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 1860–1871. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000408>
- McVey Neufeld, K.A., Mao, Y.K., Bienenstock, J., Foster, J.A., Kunze, W.A., 2013. The microbiome is essential for normal gut intrinsic primary afferent neuron excitability in the mouse. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 25, 183-e88. <https://doi.org/10.1111/nmo.12049>
- Medzhitov, R., 2010. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140, 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>
- Meir, M., Flemming, S., Burkard, N., Bergauer, L., Metzger, M., Germer, C.-T., Schlegel, N., 2015. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes barrier maturation and wound healing in intestinal epithelial cells in vitro. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 309, G613-624. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00357.2014>
- Merga, Y., Campbell, B.J., Rhodes, J.M., 2014. Mucosal Barrier, Bacteria and Inflammatory Bowel Disease: Possibilities for Therapy. *Dig. Dis.* 32, 475–483. <https://doi.org/10.1159/000358156>
- Mestres, P., Diener, M., Rummel, W., 1992. Electron microscopy of the mucosal plexus of the rat colon. *Acta Anat. (Basel)* 143, 275–282. <https://doi.org/10.1159/000147262>
- Middel, P., Raddatz, D., Gunawan, B., Haller, F., Radzun, H.-J., 2006. Increased number of mature dendritic cells in Crohn's disease: evidence for a chemokine mediated retention mechanism. *Gut* 55, 220–227. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.063008>

- Milassin, Á., Sejben, A., Tiszlavicz, L., Reisz, Z., Lázár, G., Szűcs, M., Bor, R., Bálint, A., Rutka, M., Szepes, Z., Nagy, F., Farkas, K., Molnár, T., 2017. Analysis of risk factors - especially different types of plexitis - for postoperative relapse in Crohn's disease. *World J. Gastrointest. Surg.* 9, 167–173. <https://doi.org/10.4240/wjgs.v9.i7.167>
- Misteli, H., Koh, C.E., Wang, L.M., Mortensen, N.J., George, B., Guy, R., 2015. Myenteric plexitis at the proximal resection margin is a predictive marker for surgical recurrence of ileocaecal Crohn's disease. *Colorectal Dis. Off. J. Assoc. Coloproctology G. B. Irel.* 17, 304–310. <https://doi.org/10.1111/codi.12896>
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., Kupfer, A., 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82–86. <https://doi.org/10.1038/25764>
- Monteleone, I., Rizzo, A., Sarra, M., Sica, G., Sileri, P., Biancone, L., MacDonald, T.T., Pallone, F., Monteleone, G., 2011. Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 141, 237–248, 248.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.007>
- Moore, M.W., Klein, R.D., Fariñas, I., Sauer, H., Armanini, M., Phillips, H., Reichardt, L.F., Ryan, A.M., Carver-Moore, K., Rosenthal, A., 1996. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 76–79. <https://doi.org/10.1038/382076a0>
- Mora, J.R., Bono, M.R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L.L., Rosemblatt, M., Von Andrian, U.H., 2003. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 424, 88–93. <https://doi.org/10.1038/nature01726>
- Moriyama, S., Brestoff, J.R., Flamar, A.-L., Moeller, J.B., Klose, C.S.N., Rankin, L.C., Yudanin, N.A., Monticelli, L.A., Putzel, G.G., Rodewald, H.-R., Artis, D., 2018. β 2-adrenergic receptor-mediated negative regulation of group 2 innate lymphoid cell responses. *Science* 359, 1056–1061. <https://doi.org/10.1126/science.aan4829>
- Mottet, C., Uhlig, H.H., Powrie, F., 2003. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 170, 3939–3943. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.8.3939>
- Mow, W.S., Vasiliauskas, E.A., Lin, Y.-C., Fleshner, P.R., Papadakis, K.A., Taylor, K.D., Landers, C.J., Abreu-Martin, M.T., Rotter, J.I., Yang, H., Targan, S.R., 2004. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 126, 414–424. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.11.015>
- Muller, P.A., Koscsó, B., Rajani, G.M., Stevanovic, K., Berres, M.-L., Hashimoto, D., Mortha, A., Leboeuf, M., Li, X.-M., Mucida, D., Stanley, E.R., Dahan, S., Margolis, K.G., Gershon, M.D., Merad, M., Bogunovic, M., 2014. Crosstalk between Muscularis Macrophages and Enteric Neurons

Regulates Gastrointestinal Motility. Cell 158, 300–313.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.050>

Muller, P.A., Matheis, F., Mucida, D., 2020. Gut macrophages: key players in intestinal immunity and tissue physiology. *Curr. Opin. Immunol.* 62, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.coic.2019.11.011>

Murakami, M., Ohta, T., 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. <https://doi.org/10.1002/jnr.22036>

Murakami, M., Ohta, T., Otsuguro, K.-I., 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.12.052>

Murphy, C.J., Bentley, E., Miller, P.E., McIntyre, K., Leatherberry, G., Dubielzig, R., Giuliano, E., Moore, C.P., Phillips, T.E., Smith, P.B., Prescott, E., Miller, J.M., Thomas, P., Scagliotti, R., Esson, D., Gadek, T., O'Neill, C.A., 2011. The Pharmacologic Assessment of A Novel Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 Antagonist (SAR 1118) for the Treatment of Keratoconjunctivitis Sicca in Dogs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 3174–3180. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-5078>

Murphy, K.M., Stockinger, B., 2010. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat. Immunol.* 11, 674–680. <https://doi.org/10.1038/ni.1899>

Mwizerwa, O., Das, P., Nagy, N., Akbareian, S.E., Mably, J.D., Goldstein, A.M., 2011. Gdnf is mitogenic, neurotrophic, and chemoattractive to enteric neural crest cells in the embryonic colon. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 240, 1402–1411. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22630>

Nagahama, M., Semba, R., Tsuzuki, M., Aoki, E., 2001. L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol. Signals Recept.* 10, 336–340. <https://doi.org/10.1007/BF02474690>

Nagy, N., Goldstein, A.M., 2017. Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Semin. Cell Dev. Biol.* 66, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.01.006>

Nakai, A., Hayano, Y., Furuta, F., Noda, M., Suzuki, K., 2014. Control of lymphocyte egress from lymph nodes through β 2-adrenergic receptors. *J. Exp. Med.* 211, 2583–2598. <https://doi.org/10.1084/jem.20141132>

Nasser, Y., Fernandez, E., Keenan, C.M., Ho, W., Oland, L.D., Tibbles, L.A., Schemann, M., MacNaughton, W.K., Rühl, A., Sharkey, K.A., 2006. 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. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00067.2006>

- Natarajan, D., Marcos-Gutierrez, C., Pachnis, V., de Graaff, E., 2002. Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 129, 5151–5160.
- Natoli, G., Ostuni, R., 2019. Adaptation and memory in immune responses. *Nat. Immunol.* 20, 783–792. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0399-9>
- Neunlist, M., Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Ruhl, A., Lardeux, B., Savidge, T., Paris, F., Galmiche, J.P., 2007. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G231-241. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00276.2005>
- Neunlist, M., Schemann, M., 2014. Nutrient-induced changes in the phenotype and function of the enteric nervous system. *J. Physiol.* 592, 2959–2965. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.272948>
- Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahé, M.M., Derkinderen, P., des Varannes, S.B., Rolli-Derkinderen, M., 2013. The digestive neuronal-glial-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 90–100. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.221>
- Ng, S.C., Shi, H.Y., Hamidi, N., Underwood, F.E., Tang, W., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., Kaplan, G.G., 2018. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet Lond. Engl.* 390, 2769–2778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)
- Norcross, M.A., 1984. A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann. Immunol.* 135D, 113–134. [https://doi.org/10.1016/s0769-2625\(84\)81105-8](https://doi.org/10.1016/s0769-2625(84)81105-8)
- Nourshargh, S., Alon, R., 2014. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 41, 694–707. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>
- Obata, Y., Pachnis, V., 2016. The Effect of Microbiota and the Immune System on the Development and Organization of the Enteric Nervous System. *Gastroenterology* 151, 836–844. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.07.044>
- Ochoa-Cortes, F., Turco, F., Linan-Rico, A., Soghomonyan, S., Whitaker, E., Wehner, S., Cuomo, R., Christofi, F.L., 2016. Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 433–449. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000667>
- Oligschlaeger, Y., Yadati, T., Houben, T., Condello Oliván, C.M., Shiri-Sverdlov, R., 2019. Inflammatory Bowel Disease: A Stressed “Gut/Feeling.” *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8070659>
- Olivares-Villagómez, D., Van Kaer, L., 2017. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier. *Trends Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.11.003>

- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M.P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J.N., Siebert, R., Baron, R.M., Kasper, D.L., Blumberg, R.S., 2012. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 336, 489–493. <https://doi.org/10.1126/science.1219328>
- Onyiah, J.C., Colgan, S.P., 2016. Cytokine responses and epithelial function in the intestinal mucosa. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 4203–4212. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2289-8>
- Ordovas-Montanes, J., Rakoff-Nahoum, S., Huang, S., Rioli-Blanco, L., Barreiro, O., von Andrian, U.H., 2015. The Regulation of Immunological Processes by Peripheral Neurons in Homeostasis and Disease. *Trends Immunol.* 36, 578–604. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.08.007>
- Ott, C., Schölmerich, J., 2013. Extraintestinal manifestations and complications in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 585–595. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.117>
- Pabois, J., Durand, T., Le Berre, C., Gonzales, J., Neunlist, M., Bourreille, A., Naveilhan, P., Neveu, I., 2020. T cells show preferential adhesion to enteric neural cells in culture and are close to neural cells in the myenteric ganglia of Crohn's patients. *J. Neuroimmunol.* 349, 577422. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577422>
- Pariente, B., Cosnes, J., Danese, S., Sandborn, W.J., Lewin, M., Fletcher, J.G., Chowers, Y., D'Haens, G., Feagan, B.G., Hibi, T., Hommes, D.W., Irvine, E.J., Kamm, M.A., Loftus, E.V., Louis, E., Michetti, P., Munkholm, P., Oresland, T., Panés, J., Peyrin-Biroulet, L., Reinisch, W., Sands, B.E., Schoelmerich, J., Schreiber, S., Tilg, H., Travis, S., van Assche, G., Vecchi, M., Mary, J.-Y., Colombel, J.-F., Lémann, M., 2011. Development of the Crohn's disease digestive damage score, the Lémann score. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 1415–1422. <https://doi.org/10.1002/ibd.21506>
- Park, E.J., Peixoto, A., Imai, Y., Goodarzi, A., Cheng, G., Carman, C.V., Von Andrian, U.H., Shimaoka, M., 2010. Distinct roles for LFA-1 affinity regulation during T-cell adhesion, diapedesis, and interstitial migration in lymph nodes. *Blood* 115, 1572–1581.
- Parkin, J., Cohen, B., 2001. An overview of the immune system. *Lancet Lond. Engl.* 357, 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Patel, A., Harker, N., Moreira-Santos, L., Ferreira, M., Alden, K., Timmis, J., Foster, K., Garefalaki, A., Pachnis, P., Andrews, P., Enomoto, H., Milbrandt, J., Pachnis, V., Coles, M.C., Kioussis, D., Veiga-Fernandes, H., 2012. Differential RET signaling pathways drive development of the enteric lymphoid and nervous systems. *Sci. Signal.* 5, ra55. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002734>
- Pearson, C., Uhlig, H.H., Powrie, F., 2012. Lymphoid microenvironments and innate lymphoid cells in the gut. *Trends Immunol.* 33, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.04.004>
- Pereda, A.E., 2014. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 250–263. <https://doi.org/10.1038/nrn3708>

- Perez, V.L., Pflugfelder, S.C., Zhang, S., Shojaei, A., Haque, R., 2016. Lifitegrast, a Novel Integrin Antagonist for Treatment of Dry Eye Disease. *Ocul. Surf.* 14, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2016.01.001>
- Peterson, L.W., Artis, D., 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 141–153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Peyrin-Biroulet, L., Loftus, E.V., Colombel, J.-F., Sandborn, W.J., 2010. The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 289–297. <https://doi.org/10.1038/ajg.2009.579>
- Pinho-Ribeiro, F.A., Verri, W.A., Chiu, I.M., 2017. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends Immunol.* 38, 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.001>
- Piovani, D., Danese, S., Peyrin-Biroulet, L., Nikolopoulos, G.K., Lytras, T., Bonovas, S., 2019. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology* 157, 647–659.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.04.016>
- Pochard, C., Coquenlorge, S., Freyssinet, M., Naveilhan, P., Bourreille, A., Neunlist, M., Rolli-Derkinderen, M., 2018. The multiple faces of inflammatory enteric glial cells: is Crohn's disease a gliopathy? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 315, G1–G11. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00016.2018>
- Pochard, C., Coquenlorge, S., Jaulin, J., Cenac, N., Vergnolle, N., Meurette, G., Freyssinet, M., Neunlist, M., 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. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.038>
- Pontell, L., Castelucci, P., Bagyánszki, M., Jovic, T., Thacker, M., Nurgali, K., Bron, R., Furness, J.B., 2009. Structural changes in the epithelium of the small intestine and immune cell infiltration of enteric ganglia following acute mucosal damage and local inflammation. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 455, 55–65. <https://doi.org/10.1007/s00428-009-0795-x>
- Pradeu, T., Du Pasquier, L., 2018. Immunological memory: What's in a name? *Immunol. Rev.* 283, 7–20. <https://doi.org/10.1111/imr.12652>
- Prajeeth, C.K., Kronisch, J., Khorooshi, R., Knier, B., Toft-Hansen, H., Gudi, V., Floess, S., Huehn, J., Owens, T., Korn, T., Stangel, M., 2017. Effectors of Th1 and Th17 cells act on astrocytes and augment their neuroinflammatory properties. *J. Neuroinflammation* 14, 204. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0978-3>
- Pronovost, G.N., Hsiao, E.Y., 2019. Perinatal Interactions between the Microbiome, Immunity, and Neurodevelopment. *Immunity* 50, 18–36. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.016>
- Quintana, F.J., Sherr, D.H., 2013. Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. *Pharmacol. Rev.* 65, 1148–1161. <https://doi.org/10.1124/pr.113.007823>

- Rahman, A.A., Robinson, A.M., Jovanovska, V., Eri, R., Nurgali, K., 2015. Alterations in the distal colon innervation in Winnie mouse model of spontaneous chronic colitis. *Cell Tissue Res.* 362, 497–512. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2251-3>
- Ramos, T.N., Bullard, D.C., Barnum, S.R., 2014. ICAM-1: isoforms and phenotypes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 192, 4469–4474. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400135>
- Rao, M., Nelms, B.D., Dong, L., Salinas-Rios, V., Rutlin, M., Gershon, M.D., Corfas, G., 2015. Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. *Glia*. <https://doi.org/10.1002/glia.22876>
- Rao, M., Rastelli, D., Dong, L., Chiu, S., Setlik, W., Gershon, M.D., Corfas, G., 2017. Enteric Glia Regulate Gastrointestinal Motility but Are Not Required for Maintenance of the Epithelium in Mice. *Gastroenterology* 153, 1068–1081.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.07.002>
- Roberts, R.R., Murphy, J.F., Young, H.M., Bornstein, J.C., 2007. Development of colonic motility in the neonatal mouse-studies using spatiotemporal maps. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G930-938. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00444.2006>
- Roda, G., Chien Ng, S., Kotze, P.G., Argollo, M., Panaccione, R., Spinelli, A., Kaser, A., Peyrin-Biroulet, L., Danese, S., 2020. Crohn's disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* 6, 22. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0156-2>
- Roebuck, K.A., Finnegan, A., 1999. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 66, 876–888. <https://doi.org/10.1002/jlb.66.6.876>
- Rosas-Ballina, M., Ochani, M., Parrish, W.R., Ochani, K., Harris, Y.T., Huston, J.M., Chavan, S., Tracey, K.J., 2008. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11008–11013. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803237105>
- Rosas-Ballina, M., Olofsson, P.S., Ochani, M., Valdés-Ferrer, S.I., Levine, Y.A., Reardon, C., Tusche, M.W., Pavlov, V.A., Andersson, U., Chavan, S., Mak, T.W., Tracey, K.J., 2011. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* 334, 98–101. <https://doi.org/10.1126/science.1209985>
- Rosas-Ballina, M., Tracey, K.J., 2009. Cholinergic control of inflammation. *J. Intern. Med.* 265, 663–679. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02098.x>
- Rosenbaum, C., Schick, M.A., Wollborn, J., Heider, A., Scholz, C.-J., Cecil, A., Niesler, B., Hirrlinger, J., Walles, H., Metzger, M., 2016. Activation of Myenteric Glia during Acute Inflammation In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE* 11, e0151335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151335>
- Rossi, M., Young, J.W., 2005. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 175, 1373–1381. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1373>

- Rothenberg, M.E., Mishra, A., Brandt, E.B., Hogan, S.P., 2001. Gastrointestinal eosinophils. *Immunol. Rev.* 179, 139–155.
- Round, J.L., Mazmanian, S.K., 2010. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12204–12209.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0909122107>
- Rühl, A., Franzke, S., Collins, S.M., Stremmel, W., 2001a. Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 280, G1163–G1171.
- Rühl, A., Franzke, S., Stremmel, W., 2001b. IL-1beta and IL-10 have dual effects on enteric glial cell proliferation. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 13, 89–94.
- Russell, J.H., Ley, T.J., 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 323–370.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100201.131730>
- Russell, S.L., Gold, M.J., Hartmann, M., Willing, B.P., Thorson, L., Włodarska, M., Gill, N., Blanchet, M.-R., Mohn, W.W., McNagny, K.M., Finlay, B.B., 2012. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep.* 13, 440–447.
<https://doi.org/10.1038/embor.2012.32>
- Rutgeerts, P., 2006. Review article: recurrence of Crohn's disease after surgery - the need for treatment of new lesions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24 Suppl 3, 29–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.03056.x>
- Rutgeerts, P., Geboes, K., Vantrappen, G., Beyls, J., Kerremans, R., Hiele, M., 1990. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 99, 956–963.
- Ryan, J.M., Rogers, A.C., O'Toole, A., Burke, J.P., 2019. Meta-analysis of Histological Margin Positivity in the Prediction of Recurrence After Crohn's Resection. *Dis. Colon Rectum* 62, 882–892.
<https://doi.org/10.1097/DCR.0000000000001407>
- Saikali, P., Antel, J.P., Pittet, C.L., Newcombe, J., Arbour, N., 2010. Contribution of astrocyte-derived IL-15 to CD8 T cell effector functions in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 5693–5703. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002188>
- Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Rutgeerts, P., Hanauer, S., Colombel, J.-F., Sands, B.E., Lukas, M., Fedorak, R.N., Lee, S., Bressler, B., Fox, I., Rosario, M., Sankoh, S., Xu, J., Stephens, K., Milch, C., Parikh, A., GEMINI 2 Study Group, 2013. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 369, 711–721.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215739>
- Sandborn, W.J., Gasink, C., Gao, L.-L., Blank, M.A., Johanns, J., Guzzo, C., Sands, B.E., Hanauer, S.B., Targan, S., Rutgeerts, P., Ghosh, S., de Villiers, W.J.S., Panaccione, R., Greenberg, G., Schreiber, S., Lichtiger, S., Feagan, B.G., CERTIFI Study Group, 2012. Ustekinumab induction and

maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 367, 1519–1528. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203572>

Sandefur, K., Kahleova, H., Desmond, A.N., Elfrink, E., Barnard, N.D., 2019. Crohn's Disease Remission with a Plant-Based Diet: A Case Report. *Nutrients* 11, 1385. <https://doi.org/10.3390/nu11061385>

Sands, B.E., Chen, J., Feagan, B.G., Penney, M., Rees, W.A., Danese, S., Higgins, P.D.R., Newbold, P., Faggioni, R., Patra, K., Li, J., Klekotka, P., Morehouse, C., Pulkstenis, E., Drappa, J., van der Merwe, R., Gasser, R.A., 2017. Efficacy and Safety of MEDI2070, an Antibody Against Interleukin 23, in Patients With Moderate to Severe Crohn's Disease: A Phase 2a Study. *Gastroenterology* 153, 77-86.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.03.049>

Sano, H., Nakagawa, N., Chiba, R., Kurasawa, K., Saito, Y., Iwamoto, I., 1998. Cross-linking of intercellular adhesion molecule-1 induces interleukin-8 and RANTES production through the activation of MAP kinases in human vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 694–698. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9385>

Sanovic, S., Lamb, D.P., Blennerhassett, M.G., 1999. Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am. J. Pathol.* 155, 1051–1057. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65207-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65207-8)

Satoh, J., Kastrukoff, L.F., Kim, S.U., 1991. Cytokine-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cultured human oligodendrocytes and astrocytes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 50, 215–226. <https://doi.org/10.1097/00005072-199105000-00004>

Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., Sofroniew, M.V., 2007. Enteric Glia Regulate Intestinal Barrier Function and Inflammation Via Release of S-Nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 132, 1344–1358. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.01.051>

Schäppi, M.G., Smith, V.V., Milla, P.J., Lindley, K.J., 2003. Eosinophilic myenteric ganglionitis is associated with functional intestinal obstruction. *Gut* 52, 752–755. <https://doi.org/10.1136/gut.52.5.752>

Schemann, M., 2005. Control of gastrointestinal motility by the “gut brain”—the enteric nervous system. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 41 Suppl 1, S4-6. <https://doi.org/10.1097/01.scs.0000180285.51365.55>

Schemann, M., Neunlist, M., 2004. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 16 Suppl 1, 55–59. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00476.x>

Schneider, J., Jehle, E.C., Starlinger, M.J., Neunlist, M., Michel, K., Hoppe, S., Schemann, M., 2001. Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-

- inflamed rectum of patients with Crohn's disease. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 13, 255–264. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2982.2001.00265.x>
- Schreiber, S., Nikolaus, S., Malchow, H., Kruis, W., Lochs, H., Raedler, A., Hahn, E.G., Krummenerl, T., Steinmann, G., German ICAM-1 Study Group, 2001. Absence of efficacy of subcutaneous antisense ICAM-1 treatment of chronic active Crohn's disease. *Gastroenterology* 120, 1339–1346. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.24015>
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., Pachnis, V., 1994. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367, 380–383. <https://doi.org/10.1038/367380a0>
- Scott, M.G., Nahm, M.H., Macke, K., Nash, G.S., Bertovich, M.J., MacDermott, R.P., 1986. Spontaneous secretion of IgG subclasses by intestinal mononuclear cells: differences between ulcerative colitis, Crohn's disease, and controls. *Clin. Exp. Immunol.* 66, 209–215.
- Seillet, C., Luong, K., Tellier, J., Jacquelot, N., Shen, R.D., Hickey, P., Wimmer, V.C., Whitehead, L., Rogers, K., Smyth, G.K., Garnham, A.L., Ritchie, M.E., Belz, G.T., 2020. The neuropeptide VIP confers anticipatory mucosal immunity by regulating ILC3 activity. *Nat. Immunol.* 21, 168–177. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0567-y>
- Semba, C.P., Gadek, T.R., 2016. Development of lifitegrast: a novel T-cell inhibitor for the treatment of dry eye disease. *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* 10, 1083–1094. <https://doi.org/10.2147/OPTH.S110557>
- Shajib, M.S., Khan, W.I., 2015. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 213, 561–574. <https://doi.org/10.1111/apha.12430>
- Shen, A., Yang, J., Gu, Y., Zhou, D., Sun, L., Qin, Y., Chen, J., Wang, P., Xiao, F., Zhang, L., Cheng, C., 2008. Lipopolysaccharide-evoked activation of p38 and JNK leads to an increase in ICAM-1 expression in Schwann cells of sciatic nerves. *FEBS J.* 275, 4343–4353. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06577.x>
- Shimizu, Y., 2003. LFA-1: more than just T cell Velcro. *Nat. Immunol.* 4, 1052–1054. <https://doi.org/10.1038/ni1103-1052>
- Shrikant, P., Weber, E., Jilling, T., Benveniste, E.N., 1995. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression by glial cells. Differential mechanisms of inhibition by IL-10 and IL-6. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 155, 1489–1501.
- Sjölund, K., Schaffalitzky, O.B., Muckadell, D.E., Fahrenkrug, J., Håkanson, R., Peterson, B.G., Sundler, F., 1983. Peptide-containing nerve fibres in the gut wall in Crohn's disease. *Gut* 24, 724–733. <https://doi.org/10.1136/gut.24.8.724>

- Smith, A., Stanley, P., Jones, K., Svensson, L., McDowall, A., Hogg, N., 2007. The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. *Immunol. Rev.* 218, 135–146.
- Smyth, C.M., Akasheh, N., Woods, S., Kay, E., Morgan, R.K., Thornton, M.A., O’Grady, A., Cummins, R., Sheils, O., Smyth, P., Gleich, G.J., Murray, F.M., Costello, R.W., 2013. Activated eosinophils in association with enteric nerves in inflammatory bowel disease. *PLoS One* 8, e64216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064216>
- Soderholm, A.T., Pedicord, V.A., 2019. Intestinal epithelial cells: at the interface of the microbiota and mucosal immunity. *Immunology* 158, 267–280. <https://doi.org/10.1111/imm.13117>
- Sokol, H., Polin, V., Lavergne-Slove, A., Panis, Y., Treton, X., Dray, X., Bouhnik, Y., Valleur, P., Marteau, P., 2009. Plexitis as a predictive factor of early postoperative clinical recurrence in Crohn’s disease. *Gut* 58, 1218–1225. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.177782>
- Soret, R., Chevalier, J., De Coppet, P., Poupeau, G., Derkinderen, P., Segain, J.P., Neunlist, M., 2010. Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats. *Gastroenterology* 138, 1772–1782. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.053>
- Soret, R., Coquenlorge, S., Cossais, F., Meurette, G., Rolli-Derkinderen, M., Neunlist, M., 2013. Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 25, e755-764. <https://doi.org/10.1111/nmo.12200>
- Soriano, A., Salas, A., Salas, A., Sans, M., Gironella, M., Elena, M., Anderson, D.C., Piqué, J.M., Panés, J., 2000. VCAM-1, but not ICAM-1 or MAdCAM-1, immunoblockade ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 80, 1541–1551.
- Spencer, N.J., Hu, H., 2020. Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0271-2>
- Stagg, A.J., Kamm, M.A., Knight, S.C., 2002. Intestinal dendritic cells increase T cell expression of alpha4beta7 integrin. *Eur. J. Immunol.* 32, 1445–1454. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200205\)32:5<1445::AID-IMMU1445>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200205)32:5<1445::AID-IMMU1445>3.0.CO;2-E)
- Stanisz, A.M., Befus, D., Bienenstock, J., 1986. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer’s patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 136, 152–156.
- Stavely, R., Abalo, R., Nurgali, K., 2020. Targeting Enteric Neurons and Plexitis for the Management of Inflammatory Bowel Disease. *Curr. Drug Targets*. <https://doi.org/10.2174/1389450121666200516173242>

- Stavely, R., Fraser, S., Sharma, S., Rahman, A.A., Stojanovska, V., Sakkal, S., Apostolopoulos, V., Bertrand, P., Nurgali, K., 2018. The Onset and Progression of Chronic Colitis Parallels Increased Mucosal Serotonin Release via Enterochromaffin Cell Hyperplasia and Downregulation of the Serotonin Reuptake Transporter. *Inflamm. Bowel Dis.* 24, 1021–1034. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy016>
- Stead, R.H., 1992. Nerve remodelling during intestinal inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 664, 443–455. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb39782.x>
- Stefulj, J., Jernej, B., Cicin-Sain, L., Rinner, I., Schauenstein, K., 2000. mRNA expression of serotonin receptors in cells of the immune tissues of the rat. *Brain. Behav. Immun.* 14, 219–224. <https://doi.org/10.1006/brbi.1999.0579>
- Steinhoff, M.M., Kodner, I.J., DeSchryver-Kecskemeti, K., 1988. Axonal degeneration/necrosis: a possible ultrastructural marker for Crohn's disease. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 1, 182–187.
- Stoll, S., Delon, J., Brotz, T.M., Germain, R.N., 2002. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 296, 1873–1876. <https://doi.org/10.1126/science.1071065>
- Straub, R.H., Pongratz, G., Weidler, C., Linde, H.-J., Kirschning, C.J., Glück, T., Schölmerich, J., Falk, W., 2005. Ablation of the sympathetic nervous system decreases gram-negative and increases gram-positive bacterial dissemination: key roles for tumor necrosis factor/phagocytes and interleukin-4/lymphocytes. *J. Infect. Dis.* 192, 560–572. <https://doi.org/10.1086/432134>
- Strober, W., Fuss, I., Mannon, P., 2007. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 117, 514–521. <https://doi.org/10.1172/JCI30587>
- Stronkhorst, A., Radema, S., Yong, S.L., Bijl, H., ten Berge, I.J., Tytgat, G.N., van Deventer, S.J., 1997. CD4 antibody treatment in patients with active Crohn's disease: a phase 1 dose finding study. *Gut* 40, 320–327. <https://doi.org/10.1136/gut.40.3.320>
- Suchard, S.J., Stetsko, D.K., Davis, P.M., Skala, S., Potin, D., Launay, M., Dhar, T.G.M., Barrish, J.C., Susulic, V., Shuster, D.J., McIntyre, K.W., McKinnon, M., Salter-Cid, L., 2010. An LFA-1 (alpha β 2) small-molecule antagonist reduces inflammation and joint destruction in murine models of arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 184, 3917–3926. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901095>
- Sun, W., Tadmori, I., Yang, L., Delgado, M., Ganea, D., 2000. Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits TGF-beta1 production in murine macrophages. *J. Neuroimmunol.* 107, 88–99. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(00\)00245-9](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(00)00245-9)
- Sun, Y., Zhang, R., Gadek, T.R., O'Neill, C.A., Pearlman, E., 2013. Corneal inflammation is inhibited by the LFA-1 antagonist, lifitegrast (SAR 1118). *J. Ocul. Pharmacol. Ther. Off. J. Assoc. Ocul. Pharmacol. Ther.* 29, 395–402. <https://doi.org/10.1089/jop.2012.0102>

- Svensson, M., Marsal, J., Ericsson, A., Carramolino, L., Brodén, T., Márquez, G., Agace, W.W., 2002. CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alphabeta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J. Clin. Invest.* 110, 1113–1121. <https://doi.org/10.1172/JCI15988>
- Tait Wojno, E.D., Artis, D., 2012. Innate lymphoid cells: balancing immunity, inflammation, and tissue repair in the intestine. *Cell Host Microbe* 12, 445–457. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.003>
- Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Talbot, J., Hahn, P., Kroehling, L., Nguyen, H., Li, D., Littman, D.R., 2020. Feeding-dependent VIP neuron-ILC3 circuit regulates the intestinal barrier. *Nature* 579, 575–580. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2039-9>
- Taniguchi, T., Tsukada, H., Nakamura, H., Kodama, M., Fukuda, K., Saito, T., Miyasaka, M., Seino, Y., 1998. Effects of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody on dextran sodium sulphate-induced colitis in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 945–949. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.1998.tb00766.x>
- Taraviras, S., Marcos-Gutierrez, C.V., Durbec, P., Jani, H., Grigoriou, M., Sukumaran, M., Wang, L.C., Hynes, M., Raisman, G., Pachnis, V., 1999. Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. *Dev. Camb. Engl.* 126, 2785–2797.
- Thia, K.T., Sandborn, W.J., Harmsen, W.S., Zinsmeister, A.R., Loftus, E.V., 2010. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology* 139, 1147–1155. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.070>
- Tixier, E., Galmiche, J.-P., Neunlist, M., 2006. Intestinal neuro-epithelial interactions modulate neuronal chemokines production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 554–561. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.159>
- Tonegawa, S., Pignatelli, M., Roy, D.S., Ryan, T.J., 2015. Memory engram storage and retrieval. *Curr. Opin. Neurobiol.* 35, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.07.009>
- Törnblom, H., Lindberg, G., Nyberg, B., Veress, B., 2002. Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 123, 1972–1979. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.37059>
- Torres, J., Ellul, P., Langhorst, J., Mikocka-Walus, A., Barreiro-de Acosta, M., Basnayake, C., Ding, N.J.S., Gilardi, D., Katsanos, K., Moser, G., Opheim, R., Palmela, C., Pellino, G., Van der Marel, S., Vavricka, S.R., 2019. European Crohn's and Colitis Organisation Topical Review on Complementary Medicine and Psychotherapy in Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohns Colitis* 13, 673–685e. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz051>

- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F., Peyrin-Biroulet, L., 2017. Crohn's disease. *Lancet Lond. Engl.* 389, 1741–1755. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31711-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1)
- Tournier, J.N., Hellmann, A.Q., 2003. Neuro-immune connections: evidence for a neuro-immunological synapse. *Trends Immunol.* 24, 114–115. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(03\)00002-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(03)00002-4)
- Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K., Spits, H., 2009. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat. Immunol.* 10, 864–871. <https://doi.org/10.1038/ni.1770>
- Turco, F., Sarnelli, G., Cirillo, C., Palumbo, I., De Giorgi, F., D'Alessandro, A., Cammarota, M., Giuliano, M., Cuomo, R., 2014. Enteroglial-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. *Gut* 63, 105–115. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302090>
- Uniken Venema, W.T., Voskuil, M.D., Dijkstra, G., Weersma, R.K., Festen, E.A., 2017. The genetic background of inflammatory bowel disease: from correlation to causality: Genetics and causality in IBD. *J. Pathol.* 241, 146–158. <https://doi.org/10.1002/path.4817>
- Vainer, B., Nielsen, O.H., 2000. Changed colonic profile of P-selectin, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-2, and ICAM-3 in inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* 121, 242–247. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01296.x>
- Valès, S., Touvron, M., Van Landeghem, L., 2018. Enteric glia: Diversity or plasticity? *Brain Res.* 1693, 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.02.001>
- van de Wouw, M., Schellekens, H., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2017. Microbiota-Gut-Brain Axis: Modulator of Host Metabolism and Appetite. *J. Nutr.* 147, 727–745. <https://doi.org/10.3945/jn.116.240481>
- van der Gracht, E., Zahner, S., Kronenberg, M., 2016. When Insult Is Added to Injury: Cross Talk between ILCs and Intestinal Epithelium in IBD. *Mediators Inflamm.* 2016, 9765238. <https://doi.org/10.1155/2016/9765238>
- Van Landeghem, L., Chevalier, J., Mahé, M.M., Wedel, T., Urvil, P., Derkinderen, P., Savidge, T., Neunlist, M., 2011. Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G976–G987. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00427.2010>
- Vaughn, B.P., Moss, A.C., 2014. Prevention of post-operative recurrence of Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* 20, 1147–1154. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i5.1147>
- Veiga-Fernandes, H., Coles, M.C., Foster, K.E., Patel, A., Williams, A., Natarajan, D., Barlow, A., Pachnis, V., Kioussis, D., 2007. Tyrosine kinase receptor RET is a key regulator of Peyer's Patch organogenesis. *Nature* 446, 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature05597>

- Veiga-Fernandes, H., Mucida, D., 2016. Neuro-Immune Interactions at Barrier Surfaces. *Cell* 165, 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.041>
- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A.M., Buer, J., Dumoutier, L., Renaud, J.-C., Stockinger, B., 2008. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453, 106–109. <https://doi.org/10.1038/nature06881>
- Verma, N.K., Dempsey, E., Long, A., Davies, A., Barry, S.P., Fallon, P.G., Volkov, Y., Kelleher, D., 2012. Leukocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction induces a novel genetic signature resulting in T-cells refractory to transforming growth factor- β signaling. *J. Biol. Chem.* 287, 27204–27216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.376616>
- Verma, N.K., Kelleher, D., 2017. Not Just an Adhesion Molecule: LFA-1 Contact Tunes the T Lymphocyte Program. *J. Immunol.* 199, 1213–1221. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700495>
- Vermeire, S., Van Assche, G., Rutgeerts, P., 2006. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 55, 426–431. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.069476>
- Villanacci, V., Annese, V., Cuttitta, A., Fisogni, S., Scaramuzzi, G., De Santo, E., Corazzi, N., Bassotti, G., 2010. An immunohistochemical study of the myenteric plexus in idiopathic achalasia. *J. Clin. Gastroenterol.* 44, 407–410. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3181bc9ebf>
- Villanacci, V., Bassotti, G., Nascimbeni, R., Antonelli, E., Cadei, M., Fisogni, S., Salerni, B., Geboes, K., 2008. Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 20, 1009–1016. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2008.01146.x>
- von Andrian, U.H., Mempel, T.R., 2003. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 867–878. <https://doi.org/10.1038/nri1222>
- von Boyen, G.B., Schulte, N., Pflüger, C., Spaniol, U., Hartmann, C., Steinkamp, M., 2011. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol.* 11, 3.
- von Boyen, G.B.T., 2004. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* 53, 222–228. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.012625>
- von Boyen, Georg B. T., Steinkamp, M., Adler, G., Kirsch, J., 2006. Glutamate receptor subunit expression in primary enteric glia cultures. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 26, 329–336. <https://doi.org/10.1080/10799890600778821>
- von Boyen, G. B. T., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schäfer, K.-H., Adler, G., Kirsch, J., 2006. Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines. *J. Neuroendocrinol.* 18, 820–825. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01478.x>

- von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schäfer, K.-H., Adler, G., Kirsch, J., 2004. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* 53, 222–228.
- Vulchanova, L., Casey, M.A., Crabb, G.W., Kennedy, W.R., Brown, D.R., 2007. Anatomical evidence for enteric neuroimmune interactions in Peyer's patches. *J. Neuroimmunol.* 185, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.01.014>
- Wallace, A.S., 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. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1023-2>
- Walling, B.L., Kim, M., 2018. LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation. *Front. Immunol.* 9, 952. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00952>
- Wang, Hong, Yu, M., Ochani, M., Amella, C.A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J.H., Wang, Haichao, Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C.J., Tracey, K.J., 2003. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421, 384–388. <https://doi.org/10.1038/nature01339>
- Watshaw, D.A., Brookes, S.J., Costa, M., 1995. The morphology and projections of retrogradely labeled myenteric neurons in the human intestine. *Gastroenterology* 109, 866–875. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90396-8](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90396-8)
- Wedel, T., Roblick, U., Gleiss, J., Schiedeck, T., Bruch, H.P., Kühnel, W., Krammer, H.J., 1999. Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus. *Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.* 181, 327–337. [https://doi.org/10.1016/S0940-9602\(99\)80122-8](https://doi.org/10.1016/S0940-9602(99)80122-8)
- Willemze, R.A., Brinkman, D.J., Welting, O., van Hamersveld, P.H.P., Verseijden, C., Luyer, M.D., Wildenberg, M.E., Seppen, J., de Jonge, W.J., 2019. Acetylcholine-producing T cells augment innate immune-driven colitis but are redundant in T cell-driven colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 317, G557–G568. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00067.2019>
- Willemze, R.A., Luyer, M.D., Buurman, W.A., de Jonge, W.J., 2015. Neural reflex pathways in intestinal inflammation: hypotheses to viable therapy. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 353–362. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.56>
- Workman, M.J., Mahe, M.M., Trisno, S., Poling, H.M., Watson, C.L., Sundaram, N., Chang, C.-F., Schiesser, J., Aubert, P., Stanley, E.G., Elefanty, A.G., Miyaoka, Y., Mandegar, M.A., Conklin, B.R., Neunlist, M., Brugmann, S.A., Helmrath, M.A., Wells, J.M., 2017. Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nat. Med.* 23, 49–59. <https://doi.org/10.1038/nm.4233>

- Wosen, J.E., Mukhopadhyay, D., Macaubas, C., Mellins, E.D., 2018. Epithelial MHC Class II Expression and Its Role in Antigen Presentation in the Gastrointestinal and Respiratory Tracts. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02144>
- Woywodt, A., Neustock, P., Kruse, A., Schwarting, K., Ludwig, D., Stange, E.F., Kirchner, H., 1994. Cytokine expression in intestinal mucosal biopsies. In situ hybridisation of the mRNA for interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in inflammatory bowel disease. *Eur. Cytokine Netw.* 5, 387–395.
- Xia, Y., Hu, H.Z., Liu, S., Ren, J., Zafirov, D.H., Wood, J.D., 1999. IL-1beta and IL-6 excite neurons and suppress nicotinic and noradrenergic neurotransmission in guinea pig enteric nervous system. *J. Clin. Invest.* 103, 1309–1316. <https://doi.org/10.1172/JCI5823>
- Xiao, W., Wang, W., Chen, W., Sun, L., Li, X., Zhang, C., 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. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8730-9>
- Xie, L., Choudhury, G.R., Winters, A., Yang, S.-H., Jin, K., 2015. Cerebral regulatory T cells restrain microglia/macrophage-mediated inflammatory responses via IL-10. *Eur. J. Immunol.* 45, 180–191. <https://doi.org/10.1002/eji.201444823>
- Yacyshyn, B., Chey, W.Y., Wedel, M.K., Yu, R.Z., Paul, D., Chuang, E., 2007. A randomized, double-masked, placebo-controlled study of alicaforsen, an antisense inhibitor of intercellular adhesion molecule 1, for the treatment of subjects with active Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 5, 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.11.001>
- Yacyshyn, B.R., Bowen-Yacyshyn, M.B., Jewell, L., Tami, J.A., Bennett, C.F., Kisner, D.L., Shanahan, W.R., 1998. A placebo-controlled trial of ICAM-1 antisense oligonucleotide in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* 114, 1133–1142.
- Yacyshyn, B.R., Chey, W.Y., Goff, J., Salzberg, B., Baerg, R., Buchman, A.L., Tami, J., Yu, R., Gibiansky, E., Shanahan, W.R., ISIS 2302-CS9 Investigators, 2002. Double blind, placebo controlled trial of the remission inducing and steroid sparing properties of an ICAM-1 antisense oligodeoxynucleotide, alicaforsen (ISIS 2302), in active steroid dependent Crohn's disease. *Gut* 51, 30–36. <https://doi.org/10.1136/gut.51.1.30>
- Yamamoto, M., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Ito, H., 2000. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 164, 4878–4882. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.9.4878>

- Yamamoto, T., Umegae, S., Kitagawa, T., Matsumoto, K., 2004. Mucosal cytokine production during remission after resection for Crohn's disease and its relationship to future relapse. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 19, 671–678. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.01899.x>
- Yntema, C.L., Hammond, W.S., 1954. The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 101, 515–541. <https://doi.org/10.1002/cne.901010212>
- Yokosuka, T., Saito, T., 2009. Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunol. Rev.* 229, 27–40. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00779.x>
- Yoo, B.B., Mazmanian, S.K., 2017. The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity* 46, 910–926. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.05.011>
- Yoo, J.-H., Donowitz, M., 2019. Intestinal enteroids/organoids: A novel platform for drug discovery in inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* 25, 4125–4147. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i30.4125>
- Young, H.M., Hearn, C.J., Farlie, P.G., Canty, A.J., Thomas, P.Q., Newgreen, D.F., 2001. GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells. *Dev. Biol.* 229, 503–516. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0100>
- Zappa, M., Stefanescu, C., Cazals-Hatem, D., Bretagnol, F., Deschamps, L., Attar, A., Larroque, B., Tréton, X., Panis, Y., Vilgrain, V., Bouhnik, Y., 2011. Which magnetic resonance imaging findings accurately evaluate inflammation in small bowel Crohn's disease? A retrospective comparison with surgical pathologic analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 984–993. <https://doi.org/10.1002/ibd.21414>
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J.-D., 2007a. 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. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.094375>
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J.-D., 2007b. 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. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.094375>
- Zhang, N., Bevan, M.J., 2011. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 35, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.010>
- Zhang, W., Segura, B.J., Lin, T.R., Hu, Y., Mulholland, M.W., 2003. Intercellular calcium waves in cultured enteric glia from neonatal guinea pig. *Glia* 42, 252–262. <https://doi.org/10.1002/glia.10215>

- Zhong, M., Gadek, T.R., Bui, M., Shen, W., Burnier, J., Barr, K.J., Hanan, E.J., Oslob, J.D., Yu, C.H., Zhu, J., Arkin, M.R., Evanchik, M.J., Flanagan, W.M., Hoch, U., Hyde, J., Prabhu, S., Silverman, J.A., Wright, J., 2012. Discovery and Development of Potent LFA-1/ICAM-1 Antagonist SAR 1118 as an Ophthalmic Solution for Treating Dry Eye. *ACS Med. Chem. Lett.* 3, 203–206.
<https://doi.org/10.1021/ml2002482>
- Zhong, M., Shen, W., Barr, K.J., Arbitrario, J.P., Arkin, M.R., Bui, M., Chen, T., Cunningham, B.C., Evanchik, M.J., Hanan, E.J., Hoch, U., Huen, K., Hyde, J., Kumer, J.L., Lac, T., Lawrence, C.E., Martell, J.R., Oslob, J.D., Paulvannan, K., Prabhu, S., Silverman, J.A., Wright, J., Yu, C.H., Zhu, J., Flanagan, W.M., 2010. Discovery of tetrahydroisoquinoline (THIQ) derivatives as potent and orally bioavailable LFA-1/ICAM-1 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 5269–5273.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.06.145>
- Zhou, L., Chong, M.M.W., Littman, D.R., 2009. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30, 646–655. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.001>
- Zhu, J., 2018. T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030338>
- Zundler, S., Becker, E., Schulze, L.L., Neurath, M.F., 2019. Immune cell trafficking and retention in inflammatory bowel disease: mechanistic insights and therapeutic advances. *Gut* 68, 1688–1700. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317977>

Rôle du système nerveux entérique et de l'inflammation dans la formation des plexites entériques

Mots clés : Maladie de Crohn, Plexite, Cellule Gliale Entérique, Lymphocyte T, Inflammation

Résumé : La maladie de Crohn est une pathologie inflammatoire chronique de l'intestin qui se manifeste par l'alterance de période de rémission et de poussées inflammatoires aboutissant à des lésions irréversibles de la paroi intestinale. Le recours à la chirurgie est souvent nécessaire et la récidive post-opératoire est fréquente. Un facteur de risque de récidive précoce est la présence de plexites entériques en marge proximale de résection. Les caractéristiques de ces infiltrations de cellules immunes au sein des ganglions nerveux entériques étant peu connues, ce travail de thèse avait pour objectif de caractériser les interactions neuro-immunes dans les plexites entériques en cas de maladie de Crohn. Les immunomarquages à partir de résections de patients Crohn ont montré une étroite proximité entre les cellules gliales entériques (EGC) et les lymphocytes T (LT) infiltrés, un nombre plus élevé de LTCD3+ à proximité des EGC, ainsi qu'une proportion plus

importante de ganglions myentériques infiltrés par des LTCD3+ chez les patients Crohn en récidive. Les études dans des modèles de co-culture ont révélé que l'activation lymphocytaire ou un environnement pro-inflammatoire pour les CGE favorisait l'adhésion des LTCD4+ et CD8+ aux CGE impliquant partiellement les molécules ICAM-1 et LFA-1. Enfin, l'administration par voie systémique d'un antagoniste chimique de LFA-1, le lifitegrast, à des souris Winnie développant spontanément des colites chroniques, a amélioré les signes de colites (symptômes, histologie, motricité intestinale) et réduit l'infiltration de LTCD3+ à proximité des CGE dans les ganglions myentériques. Ces travaux montrent une augmentation anormale des interactions entre les CGE et les LT au cours de processus inflammatoires chroniques, qui incitent à l'étude de leurs conséquences fonctionnelles dans la maladie de Crohn.

Title: Role of the enteric nervous system and inflammation in the formation of enteric plexitis

Keywords: Crohn's disease, Plexitis, Enteric Glial Cell, T lymphocyte, Inflammation

Abstract: Crohn's disease is a chronic inflammatory bowel disease that manifests by alternating periods of remission and inflammatory flare-ups leading to irreversible damage of the intestinal wall. Surgery is often necessary and post-operative recurrence is frequent. A risk factor for early post-operative recurrence is the presence of enteric plexitis at the proximal margin of resection. Since the characteristics of these immune cell infiltrations within the enteric nerve ganglia are not well known, the aim of this thesis was to characterize the neuro-immune interactions in the enteric plexitis in Crohn's disease. Double immunostaining on resection from Crohn's patients showed a close proximity between enteric glial cells (EGC) and infiltrated T lymphocytes (TL), a higher number of LTCD3+

close to the EGC, and a higher proportion of myenteric nodes infiltrated by LTCD3+ in recurrent Crohn's patients. Studies in co-culture models revealed that lymphocyte activation or a pro-inflammatory environment for the EGC promoted LTCD4+ and CD8+ adhesion to EGC partially involving ICAM-1 and LFA-1. Finally, the systemic administration of a synthetic LFA-1 antagonist, the lifitegrast, in Winnie mice spontaneously developing chronic colitis, improved the signs of colitis (symptoms, histology, intestinal motility) and reduced T cell infiltration near the EGC in the myenteric ganglia.

This work shows an abnormal increase in the interactions between EGC and T cells during chronic inflammatory processes, encouraging the study of their functional consequences in Crohn's disease.