Les cellules gliales entériques : source de 15d-PGJ2 impliquée dans le contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale et dans la survie neuronale

Maxime Mahé

▶ **To cite this version:**

Maxime Mahé. Les cellules gliales entériques : source de 15d-PGJ2 impliquée dans le contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale et dans la survie neuronale. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de nantes, 2012. Français. NNT : . tel-02538062

HAL Id: tel-02538062
https://hal.science/tel-02538062

Submitted on 9 Apr 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

École Doctorale Biologie Santé

Année 2012

N° attribué par la bibliothèque

LES CELLULES GLIALES ENTERIQUES : SOURCE DE 15d-PGJ$_2$ IMPLIQUÉE DANS LE CONTRÔLE DES FONCTIONS DE LA BARRIÈRE EPITHÉLIALE INTESTINALE ET DANS LA SURVIE NEURONALE.

THÈSE DE DOCTORAT

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

Présentée et soutenue publiquement par

Maxime Mahé

Le 12 janvier 2012, devant le jury ci-dessous

Président
Dr Michel NEUNLIST, Directeur de Recherche INSERM 913, Nantes
Rapporteurs
Pr Anne DUITTOZ, Professeur des Universités, Tours
Dr Nathalie VERGNOLLE, Directeur de Recherche INSERM 1043, Toulouse
Examinateur
Dr Muriel JACQUIER-SARLIN, Maître de Conférences Universitaire, Grenoble
Directeur de thèse
Dr Bernard LARDEUX, Chargé de Recherche CNRS, INSERM 913, Nantes
Co-encadrant de thèse
Dr Kalyane BACH-NGOHOU, Maître de Conférences Universitaire – Praticien Hospitalier, Nantes

SOMMAIRE

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES CONFERENCES 7
LISTE DES FIGURES 9
LISTE DES ABREVIATIONS 12
Avant-propos : l'unité neuro-glio-épithéliale 15
I. INTRODUCTION.....16
I.1. L'unité neuro-glio-épithéliale 19
I.1.1. L'épithélium digestif 19
I.1.1.1. Généralités 19
I.1.1.2. L'épithélium intestinal 19
I.1.1.2.1. Organisation de l'épithélium intestinal 19
I.1.1.2.2. Les cellules spécialisées de la barrière épithéliale intestinale 21
I.1.1.2.2.1. Les cellules souches épithéliales intestinales 22
I.1.1.2.2.2. Les entérocytes 23
I.1.1.2.2.3. Les cellules mucosécrétantes ou caliciformes 23
I.1.1.2.2.4. Les cellules de Paneth 23
I.1.1.2.2.5. Les cellules entéroendocrines 24
I.1.1.3. L'épithélium colique 25
I.1.1.3.1. Organisation de l'épithélium colique 25
I.1.1.3.2. Les cellules spécialisées de la barrière épithéliale intestinale colique 26
I.1.1.4. L'homéostasie de l'épithélium intestinale 26
I.1.1.4.1. La prolifération des cellules épithéliales intestinales 27
I.1.1.4.2. La différenciation des cellules épithéliales intestinales 28
I.1.1.4.3. La mort des cellules épithéliales intestinales 29
I.1.1.4.4. La réparation de la barrière épithéliale intestinale 29
I.1.2. L'unité neuro-gliale : le système nerveux entérique 32
I.1.2.1. Généralités 32
I.1.2.2. Ontogénèse du système nerveux entérique 33
I.1.2.3. Développement des cellules gliales entériques 36
I.1.2.4. Les neurones entériques 36
I.1.2.4.1. Les neurones afférents primaires intrinsèques 37
I.1.2.4.2. Les interneurones 38
I.1.2.4.3. Les neurones moteurs 38
I.1.2.4.4. Le codage neurochimique 39
I.1.2.5. La cellule gliale entérique 39
I.1.2.5.1. Les cellules gliales entériques : morphologie et marqueurs spécifiques 39
I.1.2.5.2. Fonctions physiologiques des cellules gliales entériques 42
I.1.3. L'unité neuro-glio-épithéliale dans la physiologie digestive 43
I.1.3.1. Rôles des cellules épithéliales intestinales sur l'unité neuro-gliale 43
I.1.3.2. Rôles des neurones entériques sur l'unité glio-épithéliale 43
I.1.3.2.1. Contrôle de la motricité intestinale 43
I.1.3.2.2. Contrôle de la sécrétion intestinale 45
I.1.3.2.3. Contrôle de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale 46
I.1.3.2.4. Contrôle de la prolifération des cellules épithéliales intestinales 47
I.1.3.3. Rôles des cellules gliales entériques sur l'unité neuro-épithéliale 47
I.1.3.3.1. La cellule gliale entérique comme élément de support neuronal 47
I.1.3.3.2. Contrôle de la neurotransmission 48
I.1.3.3.3. Contrôle de la survie neuronale 49
I.1.3.3.4. Contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale 51
I.1.4. L'unité neuro-glio-épithéliale en pathologie digestive 53
I.1.4.1. Colites inflammatoires et cancers 53
I.1.4.2. Autres pathologies digestives 55

I.2. De nouveaux médiateurs potentiellement secrétés par les cellules gliales entériques : les prostaglandines 58
I.2.1. Voies des prostaglandines *58*
I.2.1.1. Les phospholipases A_2 et la production d'acide arachidonique *58*
I.2.1.2. Biosynthèse des endoperoxydes et des prostaglandines primaires par les cyclooxygénases *60*
I.2.1.3. Les prostaglandines E synthases *62*
I.2.1.3.1. Prostaglandine E synthase-1 microsomale 62
I.2.1.3.2. Prostaglandine E synthase-2 microsomale 63
I.2.1.3.3. Prostaglandine E synthase cytosolique 64
I.2.1.4. Les prostaglandines D synthases *64*
I.2.1.4.1. Prostaglandine D synthase hématopoïétique 65
I.2.1.4.2. Prostaglandine D synthase lipocaline 66
I.2.1.5. Production non-enzymatique des dérivés de la PGD_2 ..... *68*
I.2.2. Rôles des prostaglandines E_2 et D_2 dans le tube digestif *70*
I.2.2.1. Rôles de la prostaglandine E_2 dans l'homéostasie du tube digestif *70*
I.2.2.2. Rôles de la prostaglandine D_2 dans l'homéostasie du tube digestif *71*
I.2.3. Dérivé de la PGD_2 : la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$-Prostaglandine J_2 ..... *73*
I.2.3.1. Voies de signalisation connues de la 15d-PGJ_2 ..... *73*
I.2.3.1.1. Récepteurs membranaires de la 15d-PGJ_2 73
I.2.3.1.2. Cibles de la 15d-PGJ_2 73
I.2.4. La voie de signalisation PPARγ *76*
I.2.4.1. Le gène codant pour PPARγ *76*
I.2.4.2. La protéine PPARγ *77*
I.2.4.3. Distribution tissulaire de PPARγ *79*
I.2.4.4. Les ligands de PPARγ *80*
I.2.4.4.1. Les ligands naturels 80
I.2.4.4.2. Les ligands synthétiques 81
I.2.4.5. PPARγ et inflammation *82*
I.2.4.6. PPARγ et cancer *82*
I.1.1.1. PPARγ et neurones *83*
I.2.5. La voie de signalisation Nrf2 ..... *84*
I.2.5.1. Le gène codant pour Nrf2 ..... *84*
I.2.5.2. La protéine Nrf2 ..... *84*
I.2.5.3. Distribution tissulaire de Nrf2 ..... *86*
I.2.5.4. Les inducteurs de Nrf2 ..... *87*
I.2.5.5. Nrf2 et inflammation *87*
I.2.5.6. Nrf2 et cancer *88*
II. OBJECTIFS 89
III. Partie 1 : Régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales et de la neuroprotection par les cellules gliales entériques : rôle de la 15-déoxy-$\Delta^{12,14}$-Prostaglandine J_2 (15d-PGJ_2) 92
III.1. Introduction 93
III.2. Méthodes expérimentales utilisées 95
III.2.1. Modèles cellulaires *95*
III.2.2. CGE génétiquement modifiées *97*
III.3. Article 1 : La glie entérique module la prolifération et la différentiation des cellules épithéliales intestinales par la 15d-PGJ_2. 99

III.4. Article 2 : La 15d-PGJ_2 est impliquée dans la neuroprotection par les cellules gliales entériques contre un stress oxydant *via* une voie Nrf2 dépendante....115
III.5. Conclusion....152
IV. Partie 2 : Organisation du réseau glial entérique et implications des enzymes de synthèse des prostaglandines dans l'apparition des lésions pré-cancéreuses dans un modèle murin de carcinogénèse colique. 154
IV.1. Introduction....155
IV.2. Approches expérimentales utilisées....155
IV.2.1. Modèle animal....155
IV.2.2. Collection des tissus coliques....156
IV.2.3. Analyses histologiques des tissus coliques....156
IV.2.4. Analyses de l'expression des ARNm et des protéines dans les tissus coliques 157
IV.2.5. Analyses statistiques....158
IV.3. Résultats : Organisation du réseau glial entérique et implications des enzymes de synthèse des prostaglandines dans l'apparition des lésions pré-cancéreuses dans un modèle murin de carcinogénèse colique....159
IV.4. Article 3 : Méthode d'analyse simultanée et sans dissection, des plexus myentériques et sous-muqueux par microscopie à fluorescence et confocale. 164
IV.5. Conclusion....183
V. DISCUSSION....184
V.1. Expression de la prostaglandine D synthase de type lipocaline dans les cellules gliales entériques :....185
V.2. Effets des cellules gliales entériques et de la 15d-PGJ_2 sur les cellules épithéliales intestinales :....188
V.3. Effets des cellules gliales entériques sur les neurones entériques :....193
V.4. L'unité neuro-glio-épithéliale dans les pathologies digestives :....198
VI. CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES....201
ANNEXES....207
Annexe 1 : Regulation of Intestinal Epithelial Cells transcriptome by Enteric Glial Cells: impact on Intestinal Epithelial Barrier functions....208
Annexe 2: Enteric glia protect against Shigella flexneri invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione....229
Annexe 3: Enteric glia promotes intestinal mucosal healing via activation of Focal Adhesion Kinase and release of proEGF....242
Annexe 4: Tableau récapitulatif des principaux médiateurs impliqués dans les communications neuro-glio-épithéliales....254
BIBLIOGRAPHIE....255

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES CONFERENCES

Publications :

- Articles présentés pour la thèse :

- Mahé MM, Hulin P, Masson D, Neunlist M, Bach-Ngohou K. **A simple, muscular layer microdissection-free method for simultaneous wild field or confocal analysis of submucosal and myenteric plexi.** (En préparation)

- Abdo H, Mahé MM, Derkinderen P, Bach-Ngohou K, Neunlist M, Lardeux B. **The omega-6 derivative 15d-PGJ2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress via a Nrf2-dependent pathway.** J Physiol. (soumis)

- Bach-Ngohou K*, Mahé MM*, Aubert P, Abdo H, Boni S, Bourreille A, Denis MG, Lardeux B, Neunlist M, Masson D. **Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differenciation through 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J2.** J Physiol. Jul 2010. (*co-auteurs)

- Articles annexes à la thèse :

- Van Landeghem L, Chevalier J, Mahé MM, Wedel T, Urvil P, Derkinderen P, Neunlist M.**Enteric glia promotes intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. Feb 2011.

- Flamant M, Aubert P, Rolli-Derkinderen M, Bourreille A, Neunlist MR, Mahé MM, Meurette G, Marteyn B, Savidge T, Galmiche JP, Sansonetti PJ, Neunlist M. **Enteric glia protect against Shigella flexneri invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione.** Gut. Dec 2010.

- Paillusson S, Tasselli M, Lebouvier T, Mahé MM, Chevalier J, Biraud M, Cario-Toumaniantz C, Neunlist M, Derkinderen P.**α-Synuclein expression is induced by depolarization and cyclic AMP in enteric neurons.** J Neurochem. Nov 2010.

- Van Landeghem L, Mahé MM, Teusan R, Léger J, Guisle I, Houlgatte R, Neunlist M. **Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: impact on intestinal epithelial barrier functions.** BMC Genomics. Nov 2009.

Communications orales lors de congrès :

- Mahé M. **Inflammation et barrière épithéliale intestinale: rôle des cellules gliales entériques.** Journée de l'Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Juin 2011.

- Mahé M, Abdo H, Masson D, Denis M, Neunlist M, Lardeux B, Bach-NGohou K. **Enteric glial cells: source of Omega-6 derivative involved in the neuroprotection and in the control of intestinal barrier functions.** 18th United European Gastroenterology Week "UEGW 2010" Barcelona Spain, 23-27 October 2010.

- Mahé M, Bach-Ngohou K, Aubert P, Van Landeghem L, Lardeux B, Denis M, Neunlist M, Masson D. **Les cellules gliales entériques : une source de ligands naturels de PPARγ impliquée dans le contrôle de la prolifération des cellules épithéliales intestinales.** Novembre 2009 (Forum des doctorants - Nantes).

- Mahé M, Bach-Ngohou K, Aubert P, Van Landeghem L, Lardeux B, Denis M, Neunlist M, Masson D. **Régulation des fonctions de la barrière épithéliale intestinale par les cellules gliales entériques : implication de la 15dPGJ2.** Mars 2009 (27e Réunion du Club d'Etudes des Cellules Epithéliales Digestives – CECED).

- Van Landeghem L, Mahé M, Aubert P, Derkinderen P, Léger J, Guisle I, Savidge T, Neunlist M. **Régulation des fonctions des cellules épithéliales intestinales par les cellules gliales entériques.** Juin 2007 (21ème Réunion du Club Français de Motricité Digestive- CFMD).

Posters lors de congrès :

- Mahé M, Bach K, Aubert P, Boni S, Denis M, Masson D, Neunlist M. **Les cellules gliales entériques : une source de ligands naturels de PPARγ impliquée dans le contrôle de la prolifération des cellules épithéliales intestinales.** Mars 2010 (Journée Francophone d'Hépatho-gastroentérologie et d'oncologie digestive-JFHOD).

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de l'appareil digestif chez l'homme 17
Figure 2 : Schéma de la paroi intestinale chez l'homme 18
Figure 3 : Schéma de l'organisation de l'épithélium intestinal 20
Figure 4 : Cellules spécialisées des cryptes intestinales 21
Figure 5 : Schéma des différents compartiments d'une villosité de l'intestin grêle .. 22
Figure 6 : Schéma simplifié de l'organisation de l'épithélium colique 25
Figure 7 : Schéma des différents compartiments d'une crypte du côlon 26
Figure 8 : Contrôle de la prolifération des CEI par la voie Wnt 27
Figure 9 : Contrôle de la différenciation des CEI par la voie Notch 29
Figure 10 : Etapes de la réparation de la barrière épithéliale intestinale 31
Figure 11 : Représentation schématique d'une demi section transversale de l'intestin 33
Figure 12 : Ontogenèse du système nerveux entérique : colonisation du tube digestif par les cellules de crête neurale, leur migration et contrôle génétique 35
Figure 13 : Types morphologiques principaux de neurones entériques retrouvés dans l'intestin grêle chez le cobaye selon la classification de Dogiel 37
Figure 14 : Organisation des cellules gliales entériques 40
Figure 15 : Localisation des cellules gliales entérique dans le tube digestif 41
Figure 16: Schéma représentant le réflexe péristaltique dans l'intestin grêle 44
Figure 17 : Le réflexe sécrétomoteur 46
Figure 18 : Hydrolyse d'un phospholipide par la PLA_2 59
Figure 19 : Biosynthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique 60
Figure 20 : Structure protéique des cyclo-oxygénases 1 et 2. 61
Figure 21 : Biosynthèse des prostaglandines E_2 à partir des prostaglandines E synthases. 62
Figure 22 : Structure tridimensionnelle de la L-PGDS 67
Figure 23 : Synthèse des dérivés de la PGD_2 69
Figure 24 : Mécanismes de modulation des voies NFκB et AP-1 par la 15d-PGJ_2 ... 74
Figure 25 : Schéma simplifié du mécanisme d'activation de PPARγ par la 15d-PGJ_2 75
Figure 26 : Schéma simplifié du mécanisme d'activation de Nrf2 par la 15d-PGJ_2 .. 76

Figure 27 : Schéma de la structure protéique de PPARγ 78
Figure 28 : Mécanismes d'activation de PPARγ 79
Figure 29 : Structure de Nrf2 et de Keap1 84
Figure 30 : Schéma simplifié du mécanisme de répression de Nrf2 par Keap2 86
Figure 31 : Modèles de culture utilisés pour l'étude des interactions entre les cellules gliales entériques et les cellules épithéliales intestinales 95
Figure 32 : Modèles de culture utilisés pour l'étude des interactions entre les cellules gliales entériques et les neurones 96
Figure 33 : Modèle de culture primaire de système nerveux entérique utilisé pour l'étude des effets de la 15d-PGJ_2 sur les neurones entériques 97
Figure 34: Carte du plasmide d'expression pLKO 1.0 codant pour un shRNA dirigé contre la prostaglandine D synthase lipocaline 98
Figure 35 : Schéma récapitulatif de la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales par la 15d-PGJ_2 gliale 102
Figure 36 : Schéma récapitulatif de la régulation de la neuroprotection par la 15d-PGJ_2 gliale 119
Figure 37 : Effets de la 15d-PGJ_2 gliale sur les cellules épithéliales intestinales et les neurones 152
Figure 38 : Protocole de traitement par l'azoxyméthane (AOM) et le sulfate de dextran (DSS) des souris BALB/c 156
Figure 39 : Analyse microscopique de la muqueuse colique au cours des états précancéreux 159
Figure 40 : Expression de la GFAP dans les lésions précancéreuses coliques 160
Figure 41 : Expression de la S100-β dans les lésions précancéreuses coliques 161
Figure 42 : Expression de la mPGES-1 dans les lésions précancéreuses coliques .. 162
Figure 43 : Expression de la L-PGDS dans les lésions précancéreuses coliques 162
Figure 44 : Effets potentiels des cellules gliales entériques sur les cellules épithéliales intestinales en condition pathologique 183
Figure 45 : Synthèse des dérivés lipidiques d'origine gliale et possibilités de transport de la 15d-PGJ_2 187
Figure 46 : Schéma récapitulatif des interactions glio-épithéliales 191
Figure 47 : Analogies entre la barrière épithéliale intestinale et la barrière hémato-encéphalique 192

Figure 48 : Schéma récapitulatif des interactions neuro-gliales 197
Figure 49 : Rôle des cellules gliales entériques en pathologie..... 200
Figure 50 : 15d-PGJ_2 et l'unité neuro-glio-épithéliale (UNGE) 202
Figure 51 : L'unité neuro-glio-épithéliale et le microenvironnement intestinal 204

LISTE DES ABREVIATIONS

15d-PGJ$_2$	15-désoxy-D^{12,14}-prostaglandine J$_2$
5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
7-AAD	7-amino actinomycin D
AA	Acide arachidonique
ACh	Acétylcholine
AF	Activation fonction
AOM	Azoxyméthane
AP-1	Activator protein-1
APC	Adenomatous polyposis coli
ARE	Antioxidant response element
BCL	B-cell leukemia/lymphoma
BEI	Barrière épithéliale intestinale
BHE	Barrière hémato-encéphalique
bHLX	Basic helix-loop-helix
BMP-2	Bone morphogenetic protein 2
bZIP	Basic leucine zipper
CBP	CREB binding protein
CEI	Cellules épithéliales intestinales
CGE	Cellules gliales entériques
CK	Casein kinase
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
c-myc	Cellular myc
CNC	Cap n'collar
CNFT	Ciliary neurotrophic factor
COX	Cyclooxygénase
cPGES	Prostaglandine E synthase cytosolique
cPLA$_2$	Phospholipase A$_2$ cytosolique
DBD	DNA Binding domain
DCC	Deleted in colorectal cancer
DSS	Dextran sodium sulfate
DTT	Dithiothréitol
Dkk1	Dickkopf-1
ECE-1	Endothelin-Converting Enzyme-1
EDN-3	Endothéline 3
EDNR(B)	Endothelin receptor (type B)
EGF	Endothelial growth factor
EGFR	EGF receptor
FAK	Focal Adhesion kinase
Fz	Frizzled
GABA	Gamma amino butyric acid
GAT2	GABA transporter 2
GCL	Glutamate cystéine ligase
GCLc	sous-unité catalytique de la GCL
GCV	Ganciclovir
GDNF	Glial derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFRα1	GDNF family receptor alpha-1

GIP	Gastric inhibitory polypeptide
GLP-2	Glucagon-like peptide 2
GPx	Glutathion peroxydase
GS	Glutathion synthétase
GSH	Glutathion réduit
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3β
GSNO	S-nitrosoglutathione
GSSG	Glutathion oxide
GST	Glutathion S-transférase
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HA	Hémagglutinine
Hes-1	Hairy/Enhancer of Split 1
HIF	Hypoxia induced factor
HO-1	Heme oxygenase 1
H-PGDS	Prostaglandine D synthase hématopoïetique
HRE	Hormone response element
HSP	Heat shock protein
HSV	Herpes simplex virus
HSV-TK	Herpes simplex virus-thymidine kinase
INF γ	Interferon γ
IL	Interleukine
IPAN	Intrinsic primary afferent neuron
iPLA$_2$	Phospholipase A_2 intracellulaire
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LBD	Ligand binding domain
LIF	Leukemia inhibitory factor
L-PGDS	Prostaglandine D synthase lipocaline
LPS	Lipopolysaccharide
MBD	Membrane binding domain
MC	Maladie de Crohn
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MOAT	Mediated organic anion transport
mPGES-1	Prostaglandine E synthase microsomale 1
mPGES-2	Prostaglandine E synthase microsomale 1
MRP1	Multidrug resistance protein 1
NCC	Cellules de la crête neurale
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGF	Nerve growth factor
NICD	Notch intracellular domain
NLS	Nuclear localization sequence
NO	Nitric Oxide (13onoxide d'azote)
NQO1	NADPH quinone oxidoreductase
Nrf2	Nuclear erythroid ***2*** p45-related factor ***2***
NSE	Neuronal specific enolase
NT-3	Neurotrophine-3
NTPDase 2	Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2

PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PEPT2	Peptide transporter 2
PGs	Prostaglandines
PGD_2	Prostaglandine D_2
PGDS	Prostaglandine D synthase
PGES	Prostaglandine E synthase
PGE_2	Prostaglandine E_2
PGG_2	Prostaglandine G_2
PGH_2	Prostaglandine H_2
PGJ_2	Prostaglandine J_2
PGP 9.5	Protein gene product 9.5
PGT	Prostaglandin transporter
PLA_2	Phospholipase A_2
POIC	Pseudo-obstruction intestinale chronique
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
PPRE	PPAR response element
PYY	Pancreatic polypetide-like peptide with N-terminal tyrosine amide
RCH	Rectocolite hémorragique
RET	Récepteur tyrosine-kinase Rearranged during Transfection
RXR	Retinoid X receptor
S100-β	S100 calcium-binding protein beta
SNC	Système nerveux central
SNE	Système nerveux entérique
$sPLA_2$	Phospholipase A_2 secrétée
SRC-1	Steroid receptor coactivator 1
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TCF4/LEF	T-cell factor 4/Lymphoid enhancing factor
TD	Tube digestif
TFF	Trefoil factor
TGF-β	Transforming growth factor beta
TK	Thymidine kinase
TNBS	Trinitrobenzène
TNF	Tumor necrosis factor
VIP	Vasoactive intestinal peptide
ZO-1	Zonula Occludens-1
γGT	Gamma glutamyl transpeptidase

Avant-propos : l'unité neuro-glio-épithéliale

La neurogastroentérologie connaît un essor important depuis ces 30 dernières années et la compréhension des mécanismes de régulation des fonctions digestives par le système nerveux entérique (SNE) est devenue un sujet d'étude important. Le SNE est composé de deux types cellulaires, les neurones entériques et les cellules gliales entériques (CGE). Les différents types de neurones composant le SNE, ont été caractérisés grâce à la combinaison d'approches immunohistochimiques et fonctionnelles. Ces travaux démontrent leur rôle essentiel dans le contrôle des fonctions motrices et sécrétoires de l'intestin.

Bien qu'elles aient principalement été considérées comme étant uniquement des cellules de soutien des neurones, les CGE ont suscité un regain d'intérêt grâce à des travaux plus récents décrivant leurs effets sur les composants du microenvironnement intestinal. Il a ainsi été montré que les CGE protégeaient les neurones entériques contre le stress oxydant et qu'elles participaient à l'homéostasie de l'épithélium digestif en favorisant les processus de réparation de la barrière épithéliale intestinale.

A l'inverse, les neurones joueraient un rôle régulateur sur les CGE et des études récentes, effectuées dans notre laboratoire ont décrit le rôle des cellules épithéliales intestinales (CEI) sur le SNE. Un système « tripartite », constitué par les neurones entériques, les CGE et les CEI, pourrait ainsi former une unité fonctionnelle, l'unité neuro-glio-épithéliale (UNGE).

L'UNGE pourrait jouer un rôle potentiel dans la pathogénie de certaines maladies de l'intestin, telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) ou le cancer colorectal. Cependant, le rôle des composants de cette unité, et notamment des CGE, dans ces pathologies n'est pas clairement connu. Dans ce contexte, ce travail de thèse a pour but de mieux comprendre le rôle des CGE au sein de l'UNGE.

I. INTRODUCTION

Chez l'homme, les organes de l'appareil digestif sont divisés en deux groupes : les organes du tube digestif (TD) et les organes digestifs annexes (Figure 1). Le TD est composé par la cavité buccale, l'œsophage, l'estomac et l'intestin. L'intestin est divisé en deux parties : l'intestin grêle (composé par le duodénum, le jéjunum et l'iléon) et l'intestin distal ou gros intestin (composé par le caecum, le côlon droit, le côlon transverse, le côlon gauche, le rectum et se terminant par l'anus). La valvule iléo-caecale de Bauhin sépare physiquement ces deux parties.

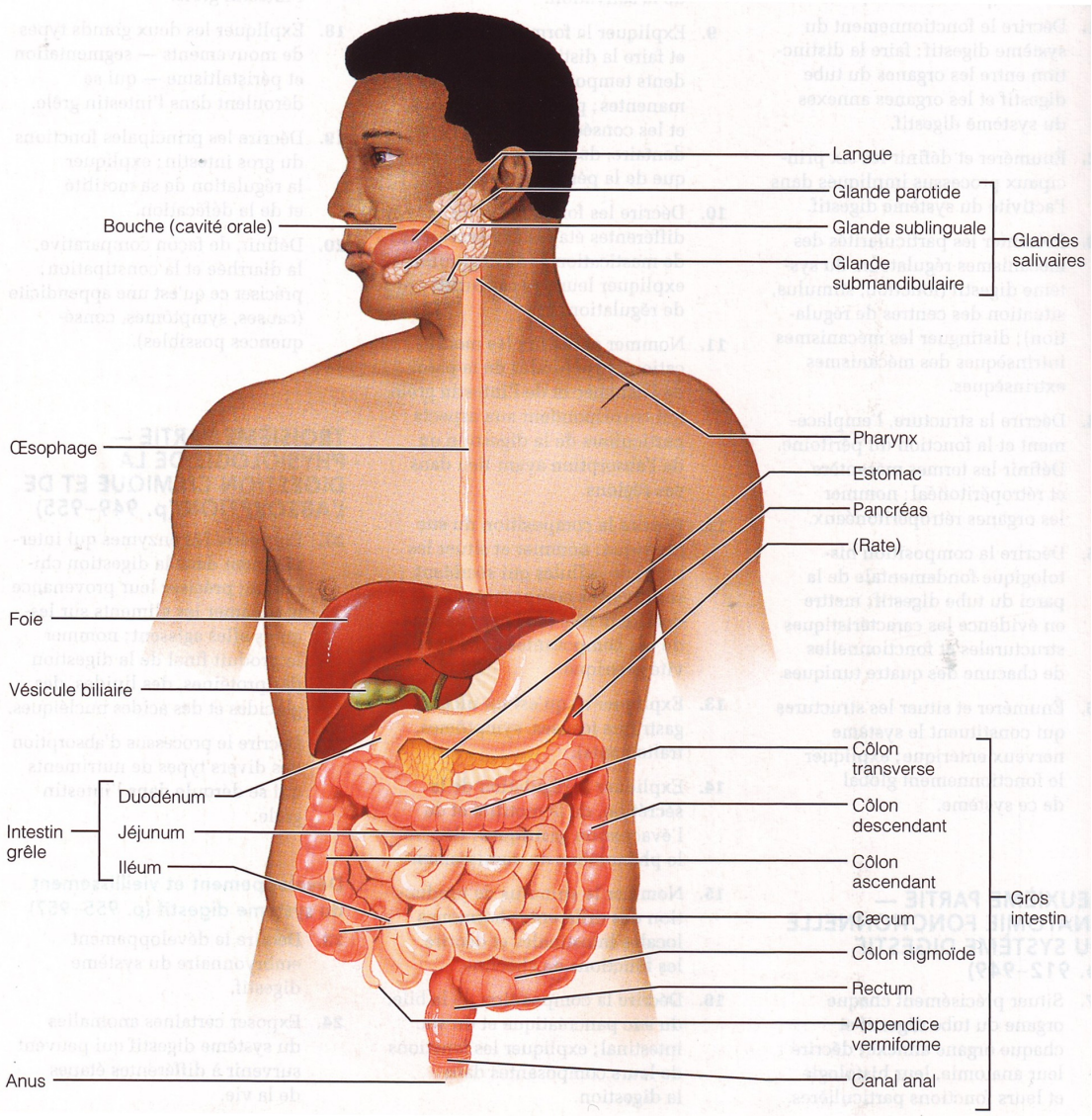


Figure 1 : Schéma de l'appareil digestif chez l'homme

Les organes du tube digestif sont la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin qui se termine par un orifice, l'anus. Les organes annexes sont les dents, la langue, la vésicule biliaire et un certain nombre de glandes digestives telles que les glandes salivaires, le foie et le pancréas (Marieb E. N. Anatomie et physiologie humaines, Edition Pearson Education, 2005. 1288. ISBN 2-7440-7118-8).

La paroi du TD est composée de 4 tuniques successives (Figure 2) : la séreuse, la musculeuse, la sous-muqueuse et la muqueuse, elle-même recouverte d'un épithélium spécialisé.

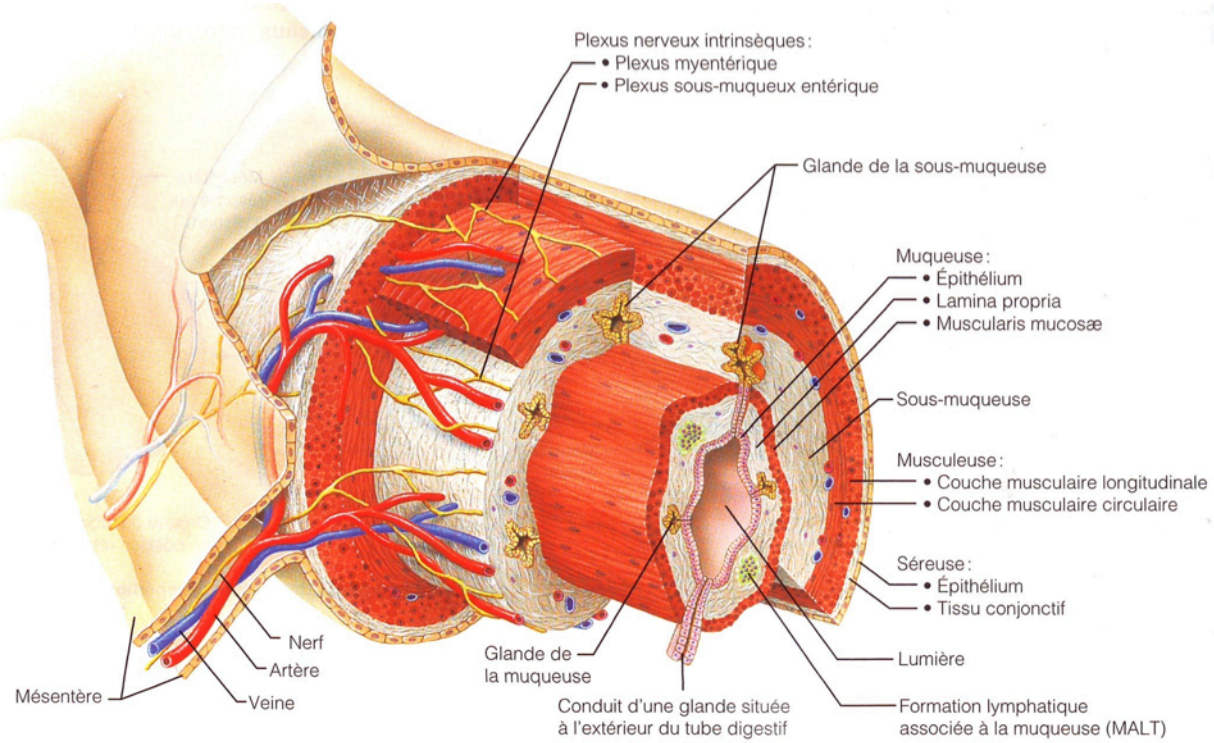


Figure 2 : Schéma de la paroi intestinale chez l'homme

Le tube digestif est composé, de l'extérieur vers l'intérieur, de la séreuse, du muscle longitudinale lisse, du muscle circulaire lisse, de la sous-muqueuse et de la muqueuse intestinale. Cette dernière est en contact avec le milieu extérieur au niveau de la lumière digestive (Marieb E. N. Anatomie et physiologie humaines, Edition Pearson Education, 2005. 1288. ISBN 2-7440-7118-8).

La séreuse, la couche la plus externe des organes intrapéritonéaux, a un rôle protecteur. Elle est formée par le péritoine viscéral. Accolée à la séreuse, la musculeuse permet la segmentation et le péristaltisme intestinal. Cette dernière comporte une couche interne de muscles lisses circulaires et une couche externe de muscles lisses longitudinaux. La sous-muqueuse, en contact avec la muqueuse, est un tissu conjonctif lâche qui renferme des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des follicules lymphatiques et des fibres nerveuses. Enfin, la muqueuse est la couche la plus interne. Elle se compose d'un épithélium digestif qui recouvre la lumière du TD.

I.1. L'unité neuro-glio-épithéliale

I.1.1. L'épithélium digestif

I.1.1.1. Généralités

L'épithélium digestif tapisse l'œsophage jusqu'au rectum et constitue une barrière physique entre l'organisme et son environnement extérieur. Chaque partie du TD présente un épithélium spécialisé dans son organisation morphologique et dans les types cellulaires qui le compose. Chez l'homme, l'intestin grêle est le lieu d'absorption des nutriments, des électrolytes, des vitamines et de l'eau. Au niveau du côlon, les résidus non digestibles du bol alimentaire sont transformés en fèces par réabsorption de l'eau et des sels solubles. Ces fonctions distinctes sont notamment permises par des spécialisations morphologiques et cellulaires de l'épithélium de ces deux parties. Dans ce manuscrit, seuls les épithéliums des parois intestinales et coliques seront décrits.

I.1.1.2. L'épithélium intestinal

I.1.1.2.1. Organisation de l'épithélium intestinal

Au niveau de l'intestin grêle, la muqueuse intestinale offre une importante surface d'échanges avec la lumière digestive qui favorise une absorption efficace des nutriments. Sa longueur lui confère une grande surface d'absorption. De plus, cette muqueuse possède 3 niveaux d'organisation qui accroissent énormément cette surface (Figure 3) : les plis circulaires transversaux ou valvules conniventes, les villosités intestinales et les microvillosités de la bordure en brosse des entérocytes.

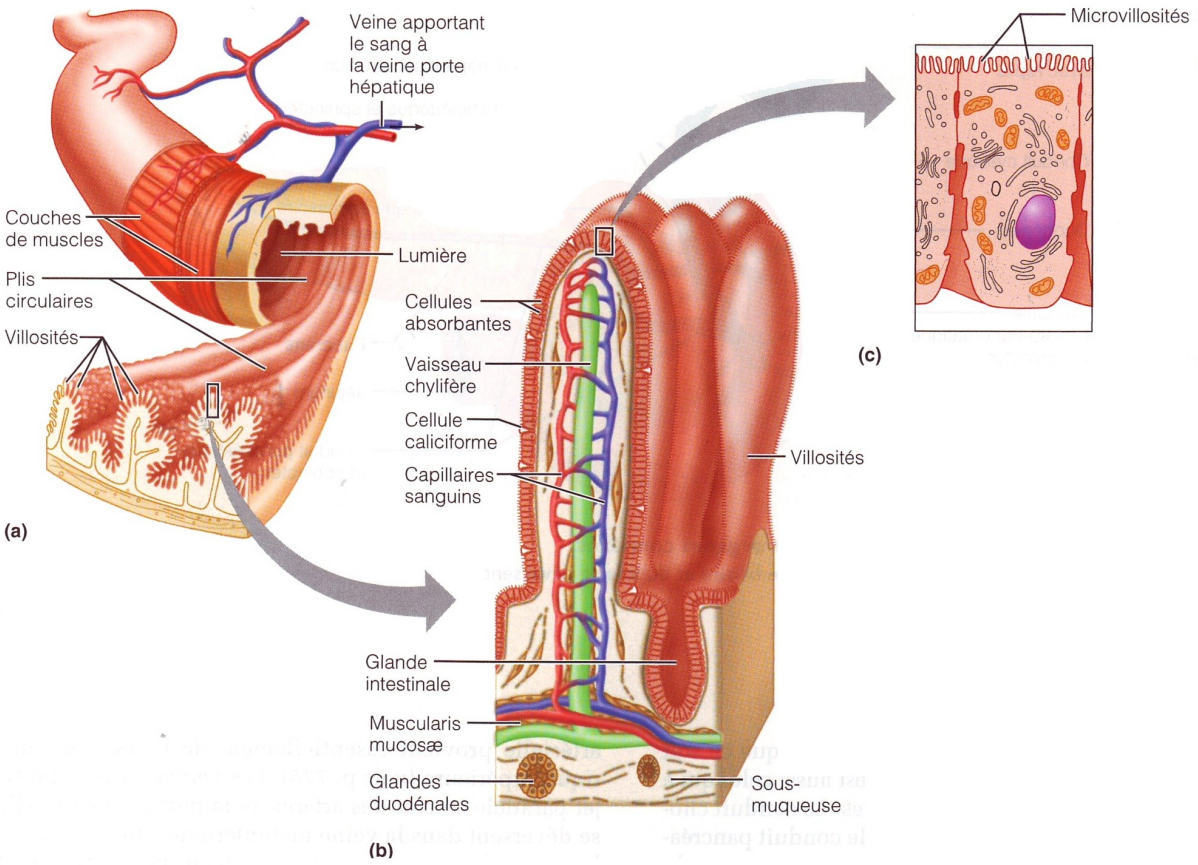


Figure 3 : Schéma de l'organisation de l'épithélium intestinal

(a) Coupe du tube digestif montrant des plis circulaires composés de villosités intestinales. (b) Structure d'une villosité intestinale. (c) Cellules épithéliales intestinales présentant des microvillosités sur leur pôle apical (Marieb E. N. Anatomie et physiologie humaines, Edition Pearson Education, 2005. 1288. ISBN 2-7440-7118-8).

La muqueuse intestinale est constituée de trois couches successives (Figure 2) : (1) la *muscularis mucosae* est composée de deux couches fines de muscles lisses, la longitudinale externe et la circulaire interne, (2) la *lamina propria*, aussi appelée chorion, est un tissu conjonctif riche en capillaires sanguins et lymphatiques, hébergeant des follicules lymphatiques et des neurones et (3) la barrière épithéliale intestinale (BEI) constitue la dernière couche cellulaire, en contact avec la lumière intestinale. La BEI est ainsi constituée d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEI) polarisées reposant sur une matrice ou lame basale. Il existe quatre types de CEI (Figure 4) : les cellules absorbantes ou entérocytes, les cellules mucosécrétantes ou cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth.

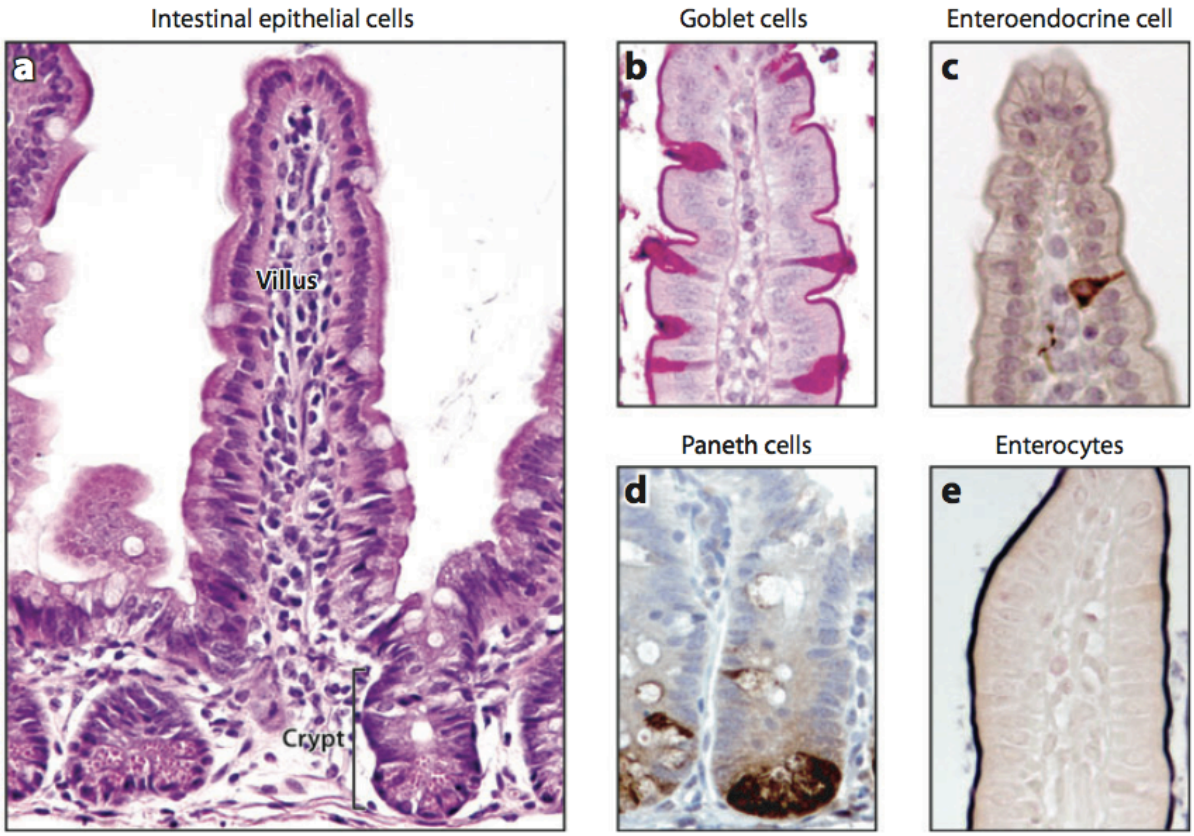


Figure 4 : Cellules spécialisées des cryptes intestinales

Quatre types de cellules épithéliales spécialisées sont retrouvés au niveau de la barrière épithéliale intestinale. (a) Morphologie de l'intestin de souris après marquage à l'hématoxyline-éosine. L'intestin est composé d'une monocouche de cellules épithéliales formant des invaginations appelées cryptes de Lieberkühn et des protrusions appelées villosités (Villi). (b) Cellules mucosécrétantes ou cellules caliciformes (Goblet cells) marquées par l'acide périodique et le réactif de Schiff. (c) Cellules entéroendocrines détectées par un anticorps anti-synaptophysine. (d) Cellules de Paneth marquées par le lysosyme. (e) Entérocytes marqués par la phosphatase alcaline (D'après van der Flier & Clevers, 2008).

I.1.1.2.2. Les cellules spécialisées de la barrière épithéliale intestinale

Les différents types de CEI sont issus de la différenciation des cellules souches intestinales présentes au fond des cryptes. Le renouvellement de la BEI résulte d'un équilibre entre les différents compartiments de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire programmée aboutissant à l'exfoliation des CEI (Potten, 1997, 1998) (Figure 5). Les cellules de Paneth se différencient en migrant vers le fond des cryptes. Les trois autres types cellulaires migrent vers le haut des cryptes selon l'axe crypto-villositaire lors de leur différenciation.

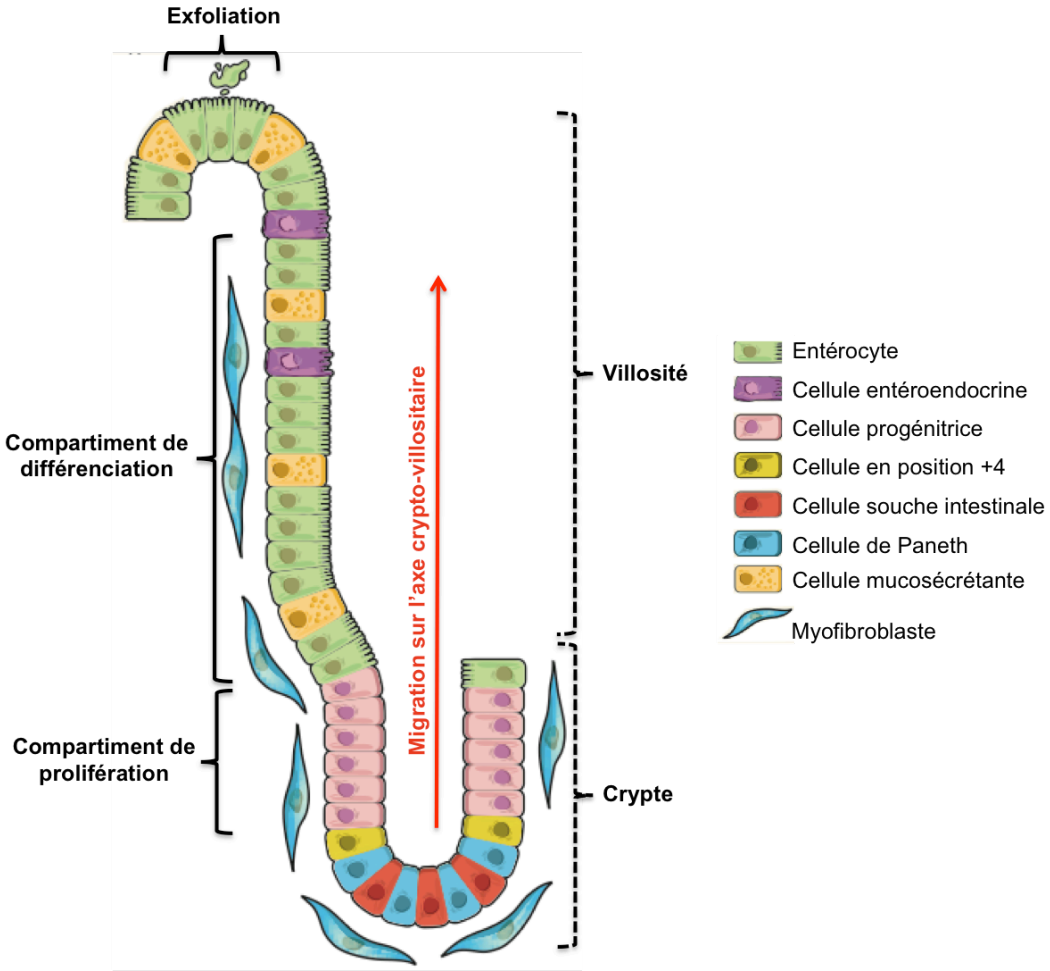


Figure 5 : Schéma des différents compartiments d'une villosité de l'intestin grêle

Les cellules souches columnaires et les cellules progénitrices, situées entre les cellules de Paneth, forment le compartiment des cellules souches à la base des cryptes intestinales. Les cellules de Paneth migrent et demeurent à la base de la crypte intestinale. Les cellules entéroendocrines, les cellules mucosécrétantes et les entérocytes migrent le long de l'axe crypto-villositaire et sont exfoliées au sommet de la villosité intestinale (D'après Potten, 1997 et Medema & Vermeulen, 2011).

I.1.1.2.2.1. Les cellules souches épithéliales intestinales

Les cellules souches intestinales sont localisées à la base des cryptes villositaires. Cependant, la localisation exacte de la niche des cellules souches n'est pas clairement identifiée. Deux modèles sont principalement envisagés. Le premier modèle (« +4 position ») suggère que les cellules souches intestinales sont situées spécifiquement en position +4 par rapport à l'axe crypto-villositaire, ce qui implique que le fond des cryptes est exclusivement constitué de cellules de Paneth différenciées (Marshman *et al.*, 2002). Le deuxième modèle, appelé « stem cell zone », suggère que ce sont de petites cellules indifférenciées et en

division, appelées cellules columnaires de la base des cryptes et situées entre les cellules de Paneth, qui sont les vraies cellules souches intestinales (Barker *et al*., 2008; Sangiorgi & Capecchi, 2008).

I.1.1.2.2.2. Les entérocytes

Les cellules absorbantes ou entérocytes sont présentes au sommet des villosités et des cryptes. Elles représentent 80% des CEI. Les entérocytes assurent l'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes. A leur pôle apical, elles présentent des microvillosités qui constituent la bordure en brosse. Cette bordure en brosse est riche en glycoprotéines constituant notamment les enzymes digestives et les divers transporteurs. Ces villosités sont recouvertes de glycolipides, formant le glycocalyx, dont le rôle est de protéger la BEI (Menard & Pothier, 1987; Patsos & Corfield, 2009).

I.1.1.2.2.3. Les cellules mucosécrétantes ou caliciformes

Les cellules mucosécrétantes ou cellules caliciformes sont retrouvées en nombre croissant depuis le duodénum jusqu'au côlon distal et représentent 15% des CEI. Elles contiennent à leur pôle apical de très nombreuses granules contenant des mucines, famille de glycoprotéines de haut poids moléculaire, membranaires ou sécrétées. Les mucines sécrétées et libérées dans la lumière digestive par exocytose déterminent les propriétés rhéologiques du mucus qui recouvre la BEI. Ce mucus joue un rôle de lubrificateur, limitant les forces de frottements induits par le passage du bol alimentaire. Il protège également la muqueuse intestinale en formant une barrière physique vis à vis des pathogènes potentiels et des molécules de grande taille présentes dans la lumière (toxines ou protéases), en raison de l'encombrement stérique créé par les chaînes oligosaccharidiques. Grâce aux mucines chargées négativement, le mucus constitue également une barrière de diffusion sélective envers les petites molécules anioniques (Allen *et al*., 1998).

I.1.1.2.2.4. Les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth sont situées au fond des cryptes de l'intestin grêle et renferment à leur pôle apical des granules de sécrétion. Elles sécrètent de nombreuses

substances antimicrobiennes dans la lumière intestinale et jouent ainsi un rôle majeur dans l'immunité innée. Parmi les principales substances antimicrobiennes, on trouve la famille des α-défensines (6 membres chez l'homme, le plus exprimé étant la HD5 (human α-défensin 5)), le lysozyme et la phospholipase A_2 (PLA_2) (Wehkamp & Stange, 2006).

I.1.1.2.2.5. Les cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines, moins nombreuses, sont localisées majoritairement dans les glandes ou à la base des villosités. Elles présentent à leur pôle basal des granules de sécrétion. La position et l'organisation de ces cellules permettent la libération du contenu de leurs granules de sécrétion directement au niveau de la *lamina propria*. Dans l'intestin, il existe 10 types de cellules entéroendocrines, différenciées par la nature des substances qu'elles libèrent.

Les cellules entéroendocrines prédominantes, présentes tout au long de l'intestin, sont les cellules entérochromaffines qui libèrent la sérotonine (5-HT ou 5-hydroxytryptamine), une monoamine servant de neurotransmetteur. Les cellules entéroendocrines I, S, K, M et N sécrètent respectivement la cholécystokinine ou hormone anorexigène, la sécrétine ou hormone entrainant la sécrétion d'enzymes digestives, le GIP (gastric inhibitory polypeptide) ou polypeptide inhibant les sécrétions gastriques, la motiline ou polypeptide régulant l'activité motrice de l'estomac et de la neurotensine ou polypeptide participant au contrôle de la glycémie. Ces cellules sont présentes uniquement dans l'intestin grêle. Les cellules entéroendocrines L et D, sécrètent respectivement le PYY (Pancreatic Polypeptide-like peptide with N-terminal tyrosine amide) ou polypeptide orexigène, et la somatostatine, impliquée dans l'inhibition de la sécrétion des hormones du TD. Les cellules entéroendocrines L et D sont localisées dans toutes les parties de l'intestin. D'autres cellules entéroendocrines sont capables de sécréter des hormones, telles que la gastrine et l'entéroglucagon, ou des neurotransmetteurs, tels que la substance P et le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) (Rindi *et al*., 2004).

I.1.1.3. L'épithélium colique

I.1.1.3.1. Organisation de l'épithélium colique

La paroi du côlon diffère par plusieurs aspects de celle de l'intestin grêle (Figure 6). Elle intervient principalement dans l'absorption de l'eau et des électrolytes provenant des résidus alimentaires indigestibles. La muqueuse, composée d'un épithélium simple prismatique, ne possède ni plis circulaires, ni villosités. Elle est plane et ponctuée d'invaginations cryptiques. La muqueuse du côlon est plus épaisse et présente des glandes plus nombreuses et plus profondes (Sancho *et al*., 2004).

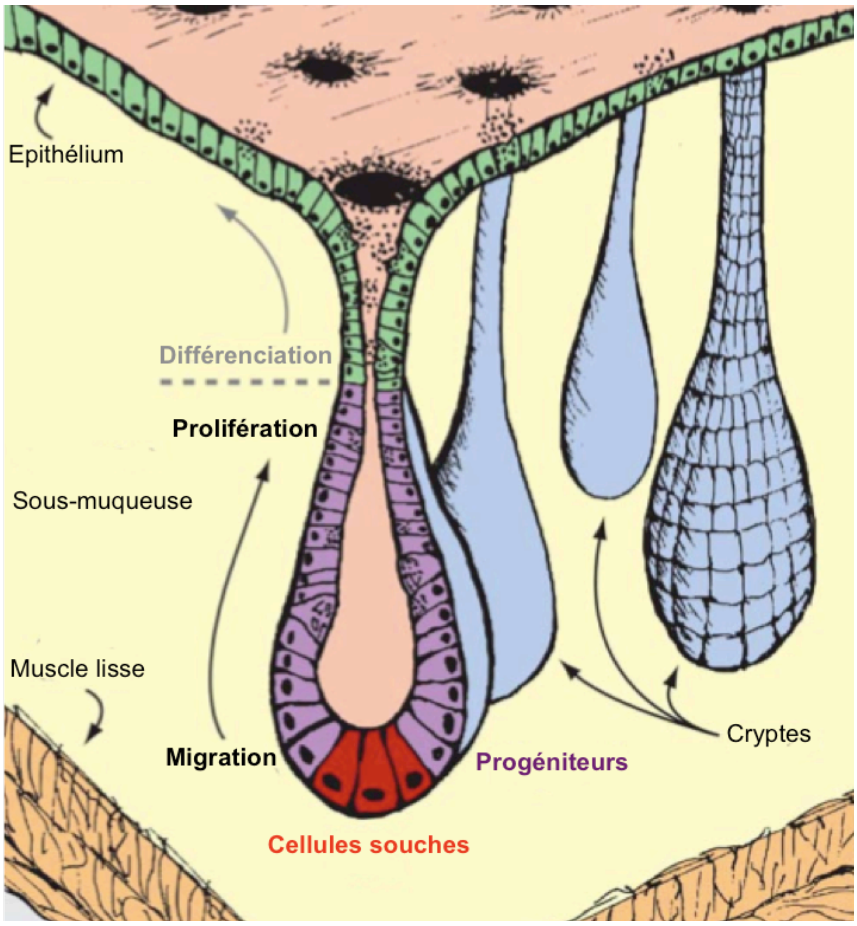


Figure 6 : Schéma simplifié de l'organisation de l'épithélium colique

L'épithélium colique est plan et forme des cryptes profondes. Les cellules souches résident au fond des cryptes. Les progéniteurs prolifèrent le long de l'axe cryptique. L'arrêt de la prolifération cellulaire est suivi par la différenciation des CEI en colonocytes et en cellules spécialisées de la barrière épithéliale (D'après Sancho et al, 2004).

I.1.1.3.2. Les cellules spécialisées de la barrière épithéliale intestinale colique

Comme pour l'intestin grêle, le renouvellement de la BEI résulte d'un équilibre entre le compartiment de prolifération et de différenciation (Figure 7). Les différents types cellulaires migrent vers le haut des cryptes lors de leur différenciation.

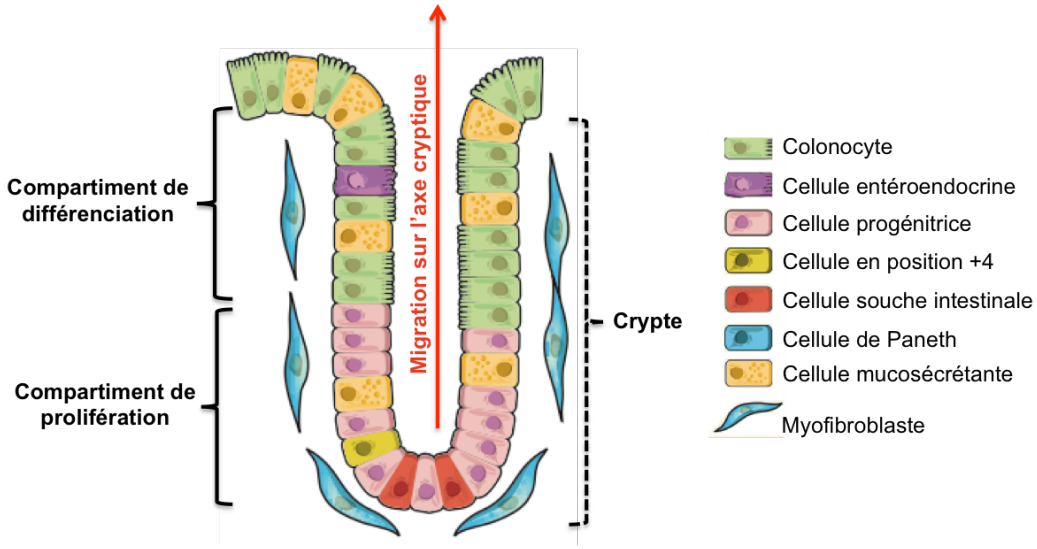


Figure 7 : Schéma des différents compartiments d'une crypte du côlon

Les cellules souches sont localisées à la base des cryptes coliques. Les cellules entéroendocrines, les cellules mucosécrétantes et les colonocytes migrent le long de l'axe crypto-villositaire (D'après Medema & Vermeulen, 2011).

La muqueuse colique possède des types cellulaires similaires à ceux de l'intestin grêle. Les cellules absorbantes ou colonocytes sont retrouvés en majorité dans la muqueuse. Les cellules caliciformes sont également présentes mais en nombre plus important que dans l'intestin grêle. A l'inverse, les cellules entéroendocrines sont faiblement représentées et les cellules de Paneth sont absentes de la muqueuse colique (Medema & Vermeulen, 2011).

I.1.1.4. L'homéostasie de l'épithélium intestinale

L'épithélium est remplacé intégralement tous les 4-5 jours chez l'homme et nécessite la production d'environ 10 milliards de cellules par jour (Bullen *et al*., 2006; van der Flier & Clevers, 2008). Ce renouvellement résulte d'une régulation coordonnée de la prolifération

cellulaire, de la différenciation et de la migration le long des cryptes et enfin de la mort cellulaire, résultant en une exfoliation des cellules de l'épithélium.

I.1.1.4.1. La prolifération des cellules épithéliales intestinales

La prolifération des CEI est contrôlée par la voie Wnt/β-caténine (Figure 8). Les ligands Wnt sont des glycoprotéines sécrétées de manière paracrine par de nombreux types cellulaires. En l'absence de stimulation par des ligands Wnt, la protéine β-caténine est séquestrée par un complexe de dégradation multiprotéique (contenant la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli), l'axine, la GSK3β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) et la CK1 (Casein Kinase 1), phosphorylée et dégradée par le protéasome. A l'inverse, la fixation d'un ligand Wnt au récepteur transmembranaire Fz (Frizzled) entraîne l'inhibition de la formation du complexe de dégradation. La β-caténine s'accumule alors dans le cytoplasme sous sa forme stable, non phosphorylée (Pinto & Clevers, 2005). Après translocation nucléaire, elle s'associe au complexe transcriptionnel TCF4/LEF (T-cell factor 4/lymphoid enhancing factor). En activant la transcription des gènes cibles de la voie Wnt tels que l'oncogène c-myc (cellular myc) ou encore BCL1 (B-cell leukemia/lymphoma 1) codant pour la cycline D1 (Tetsu & McCormick, 1999), la β-caténine induit la prolifération cellulaire (Pinto & Clevers, 2005).

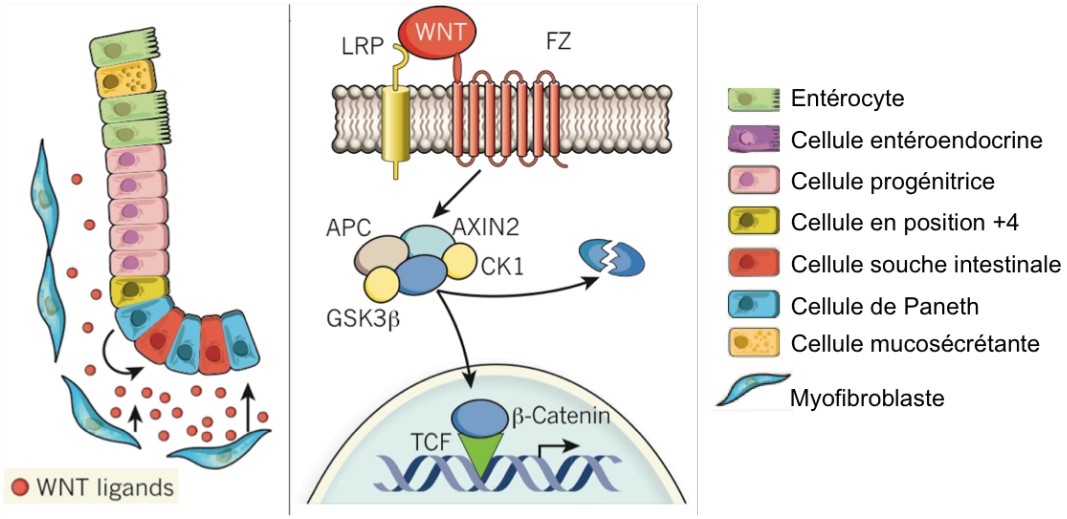


Figure 8 : Contrôle de la prolifération des CEI par la voie Wnt

Les ligands Wnt sont sécrétés à proximité de la base des cryptes intestinales. A travers le récepteur frizzled (FZ) et le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LRP), ils inhibent la formation du complexe de dégradation et libèrent la β-caténine. Ainsi, la translocation nucléaire de la β-caténine et l'activation des gènes cibles de la voie Wnt ont lieu (D'après Medema & Vermeulen, 2011).

I.1.1.4.2. La différenciation des cellules épithéliales intestinales

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

Des études *in vivo* ont montré le rôle essentiel de la voie Wnt/β-caténine dans le devenir des CEI le long de l'axe crypto-villositaire. En effet, dans un modèle de souris transgénique, la surexpression d'un antagoniste des Wnt, Dkk1 (Dickkopf-1), provoque l'inhibition de la prolifération des CEI tout au long de l'intestin, entraînant une perte progressive de l'architecture glandulaire et des ulcérations de la muqueuse (Pinto *et al*., 2003; Kuhnert *et al*., 2004). Chez des souris invalidées conditionnellement pour APC, il a été observé une repopulation des villi par des cellules phénotypiquement comparables aux cellules des cryptes, présentant une accumulation nucléaire de β-caténine, et étant incapables de migrer et de se différencier (Sansom *et al*., 2004). Chez les souris $APC^{-/-}$, il a été observé également une augmentation du nombre de cellules se différenciant en cellules de Paneth (Andreu *et al*., 2008). Enfin, l'invalidation spécifique du gène codant pour la β-caténine dans l'épithélium colique de souris entraîne une inhibition de la prolifération au niveau des cryptes et une différenciation prématurée des CEI concernant, notamment, le compartiment de prolifération comprenant les cellules souches (Fevr *et al*., 2007).

La voie de signalisation des Notch semble également jouer un rôle majeur dans la différenciation des CEI (Figure 9). L'interaction d'un ligand avec un récepteur Notch induit le clivage du récepteur Notch et la libération de son domaine intracellulaire NICD (Notch intracellular domain). Le domaine NICD libre subit ensuite une translocation nucléaire, activant la transcription des gènes cibles de la voie Notch, notamment Hes1 (Hairy/Enhancer of Split 1). Les Hes sont des répresseurs de facteurs de transcription appelés bHLH (basic helix-loop-helix). Lorsque les facteurs de transcription bHLH sont activés, ils induisent la différenciation des CEI (van der Flier & Clevers, 2008).

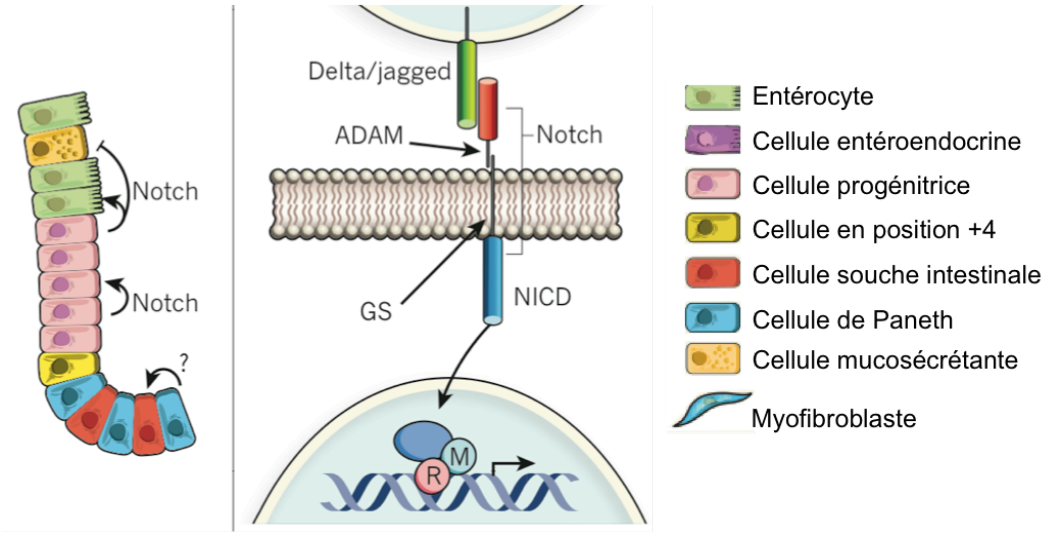


Figure 9 : Contrôle de la différenciation des CEI par la voie Notch

Les ligands Delta et jagged activent le récepteur Notch. Le récepteur est alors clivé par une protéine ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) et la protéase γ-sécretase (GS). Cette protéolyse entraine la libération du NICD (Notch intracellular domain). La translocation nucléaire et la fixation du NICD sur l'ADN active les gènes cibles de la voie Notch (D'après Medema & Vermeulen, 2011).

I.1.1.4.3. La mort des cellules épithéliales intestinales

Lorsque les CEI atteignent l'apex des villosités, elles entrent en anoïkose et subissent une exfoliation. L'anoïkose est une forme d'apoptose régulée principalement par les interactions cellule-matrice extracellulaires, médiées par les intégrines. Les CEI indifférenciées du fond de la crypte peuvent également entrer spontanément en apoptose, le but étant d'éliminer les CEI endommagées ou défectueuses (Vachon, 2006). Il existe ainsi une régulation distincte de la survie des CEI, selon leur état de différenciation qui est couplée à des gradients d'expression de protéines pro-apoptotiques le long de l'axe crypto-villositaire, tels que des homologues de Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Vachon *et al.*, 2000; Vachon, 2006).

I.1.1.4.4. La réparation de la barrière épithéliale intestinale

La BEI est en permanence soumise à des agressions physiques, telles que les déformations répétitives de la muqueuse liées au péristaltisme intestinal, ou encore le passage du bol alimentaire. Ces agressions peuvent conduire à la formation de lésions « physiologiques » générant des défauts de continuité de la BEI (Chaturvedi *et al.*, 2007). En conditions pathologiques, lors d'infections ou lors d'états inflammatoires chroniques,

d'importantes desquamations de l'épithélium peuvent également se produire. Des processus de réparation de la BEI sont alors nécessaires pour maintenir son intégrité. Un défaut dans les processus de réparation peut conduire à des ulcérations de la muqueuse (Sturm & Dignass, 2008).

Le processus de réparation de la BEI est schématiquement constitué de trois étapes séquentielles qui se superposent chronologiquement *in vivo* (Figure 10) (Sturm & Dignass, 2008). La première étape de la réparation de la muqueuse est appelée la restitution épithéliale. Elle consiste en la migration et l'étalement des cellules viables entourant la zone lésée pour aboutir à un rétablissement rapide de la continuité de la BEI (Lacy, 1988). La restitution épithéliale résulte directement de la motilité de la CEI. Elle est admise comme étant indépendante des mécanismes de prolifération cellulaire (Mammen & Matthews, 2003). Ce mécanisme précoce de réparation est un processus primordial, mis en jeu quelle que soit la cause ou la sévérité de la lésion (Podolsky, 1999). Suite à la restitution épithéliale, s'en suivront en général les deux dernières étapes des processus de prolifération et de différenciation des CEI, permettant d'aboutir à une régénération de la continuité et des fonctions de la BEI (Sturm & Dignass, 2008).

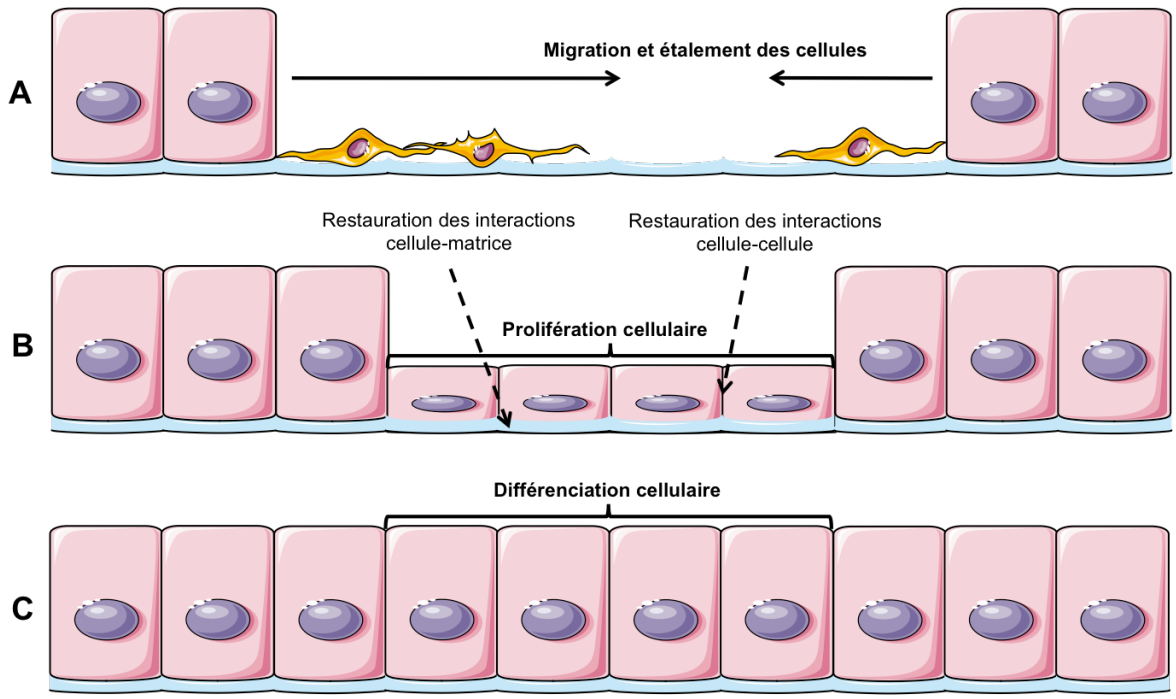


Figure 10 : Etapes de la réparation de la barrière épithéliale intestinale

(A) Lors de la restitution épithéliale, les cellules viables migrent et s'étalent de telle façon à recouvrir la zone lésée. (B) Dans un deuxième temps, les cellules prolifèrent. (C) Enfin, les cellules se différencient afin de reconstituer une barrière épithéliale intestinale fonctionnelle (D'après Taupin & Podolsky, 2003).

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

Les processus de réparation peuvent être modulés par différents facteurs tels que des facteurs de croissance, des cytokines, des polyamines ou les TFF (trefoil factor) (Taupin & Podolsky, 2003; Blikslager *et al*., 2007; Sturm & Dignass, 2008).

I.1.2. L'unité neuro-gliale : le système nerveux entérique

I.1.2.1. Généralités

Chez les mammifères, le système nerveux entérique (SNE) est organisé en deux plexus majeurs (le plexus myentérique ou d'Auerbach et le plexus sous-muqueux ou plexus de Meissner) (Figure 11) (Meissner, 1857; Auerbach, 1864). Plusieurs plexus aganglionnaires présents dans les différentes couches de la paroi digestive sont également retrouvés. Le plexus myentérique est situé entre la couche musculaire longitudinale externe et la couche musculaire circulaire interne. Il est présent dans toutes les parties du tractus digestif. Le plexus sous-muqueux est localisé dans la couche sous-muqueuse. Il est présent principalement dans la paroi de l'intestin et, est peu développé dans l'estomac (Anlauf *et al*., 2003). Chez les grands mammifères, le plexus sous-muqueux est constitué de plusieurs réseaux situés sur plusieurs couches : un réseau interne localisé du côté séreux de la *muscularis mucosae* (plexus de Meissner) et un plexus externe proche du côté luminal de la couche musculaire circulaire (plexus de Scabadasch) (Scabadasch, 1930). Un troisième plexus a été identifié chez l'homme, situé entre les deux premiers. D'autres plexus, dépourvus de structures ganglionnaires, sont retrouvés dans les différentes couches de la paroi digestive (Timmermans *et al*., 1992; Costa *et al*., 2000; Furness, 2000; Furness *et al*., 2000a; Kunze *et al*., 2000; Lomax & Furness, 2000).

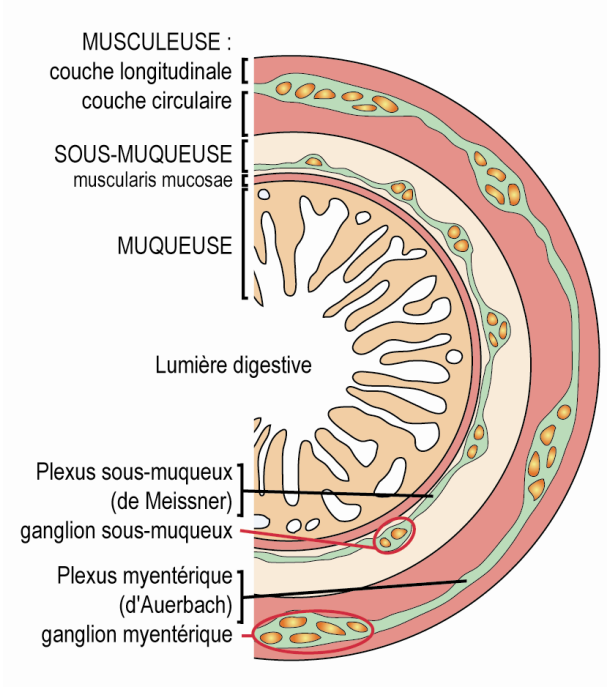


Figure 11 : Représentation schématique d'une demi section transversale de l'intestin

Le système nerveux entérique est constitué de ganglions organisés en deux plexus principaux : le plexus myentérique ou plexus d'Auerbach situé entre la couche musculaire circulaire et la couche musculaire longitudinale ; et le plexus sous-muqueux ou plexus de Meissner situé à proximité de la muqueuse (D'après Heanue & Pachnis, 2007).

Chez l'homme, 100 millions de neurones environ composent le SNE, avec une densité neuronale dans le plexus myentérique supérieure à celle du plexus sous-muqueux (Wood *et al*., 1999).

I.1.2.2. Ontogénèse du système nerveux entérique

Les différents types cellulaires du SNE proviennent des cellules de la crête neurale qui migrent à partir des segments vagal, sacré et rostro-troncal du neurectoderme (Burns & Le Douarin, 2001; Newgreen & Young, 2002). La majorité des cellules du SNE dérivent du segment vagal. Les cellules de la crête neurale du segment sacré vont coloniser uniquement la partie post-ombilicale du tube digestif (TD) et les cellules de la crête neurale du segment rostro-troncal vont, quant à elles, coloniser la partie antérieure du TD (œsophage et estomac supérieur) (Gershon, 1997). Le développement des fonctions du SNE débute au cours de la vie fœtale et se poursuit après la naissance. La formation du plexus sous-muqueux a lieu deux à trois jours après celle du plexus myentérique chez la souris, et deux à trois semaines chez

l'homme. On suppose que les cellules du plexus sous-muqueux dérivent du plexus myentérique (Wallace & Burns, 2005). Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement dans une étude montrant que les cellules neurales progénitrices migrent du plexus myentérique vers la sous-muqueuse sous l'influence des Nétrines et de leurs récepteurs DCC (Deleted in colorectal cancer) (Jiang *et al*., 2003).

Quand les cellules dérivées des crêtes neurales commencent à coloniser le TD, elles se différencient en cellules gliales ou en différents types de neurones (Young *et al*., 2003). La génération des différents types de neurones entériques est contrôlée par un ensemble de facteurs intrinsèques et extrinsèques qui permettent de diriger et de coordonner la destinée des cellules neurales entériques. Les facteurs intrinsèques qui ont été mis en évidence sont les facteurs de transcription Mash-1 et Sox-10. Mash-1 est impliqué dans le développement des neurones sérotonergiques (Blaugrund *et al*., 1996), et Sox-10 est essentiel à la différenciation des cellules gliales entériques (CGE) (Kelsh, 2006). De plus, différents types de molécules produits par le mésenchyme intestinal, comme le GDNF (Glial derived neurotrophic factor), l'EDN-3 (endothéline-3) et le BMP-2 (Bone morphogenetic protein 2), jouent un rôle majeur dans la différenciation des cellules progénitrices en neurones ou en cellules gliales.

La migration des cellules progénitrices dans le TD, leur maturation et leur différenciation sont contrôlées et dirigées par une série de signaux et de voies de signalisations activés, ou inhibés en fonction du stade de développement (Figure 12). L'ensemble des processus conduisant à la formation et à la maturation du SNE est contrôlé par deux voies de signalisation majeures : la voie Ret/GFRα1 (GDNF family receptor α1)/GDNF et la voie EDNRB (Endothelin Receptor B) / EDN-3 (Barlow *et al*., 2003). En effet, des mutations dans les gènes codant pour le GDNF, Ret , l'EDN-3, EDNRB et ECE-1 (Endothelin-Converting Enzyme 1) ont été identifiées chez des patients atteints de la maladie de Hirschsprung, pathologie digestive caractérisée par une absence de ganglions entériques (aganglionose) dans le côlon distal (Heanue & Pachnis, 2007).

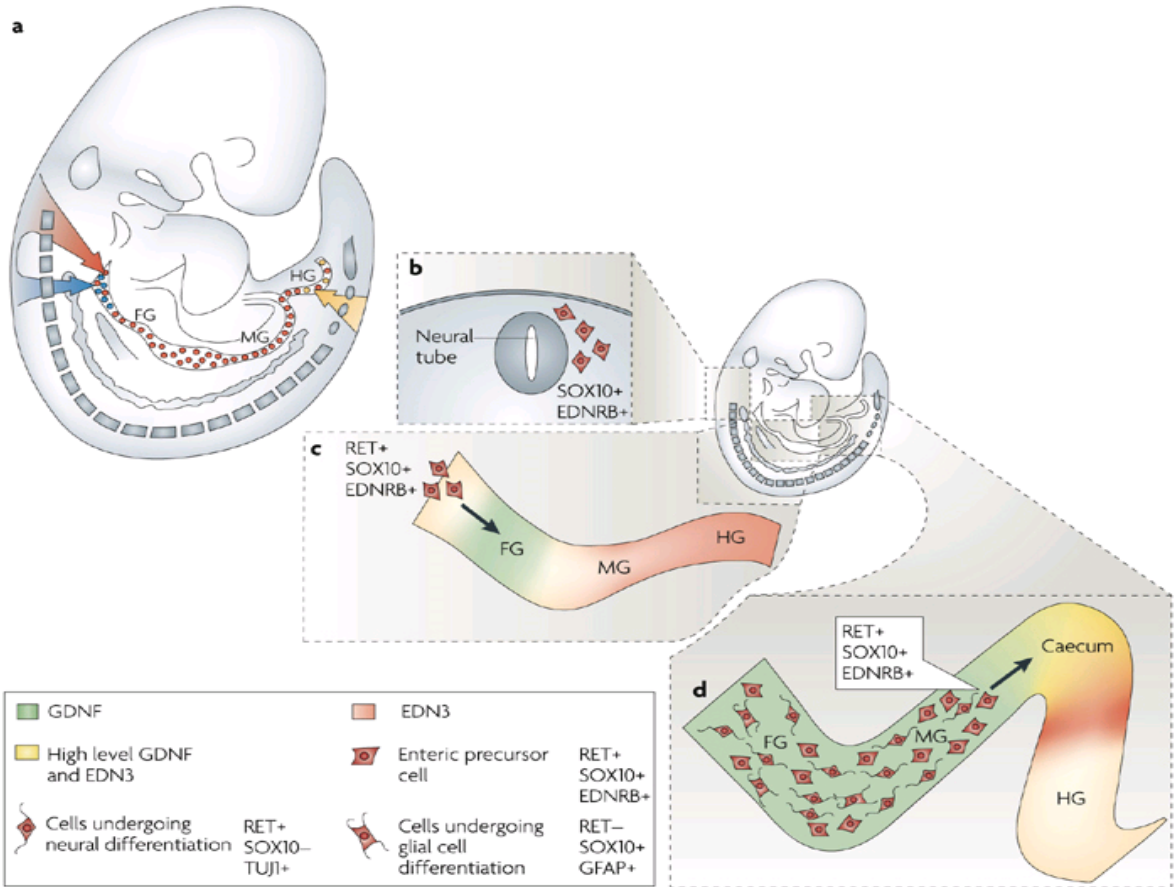


Figure 12 : Ontogenèse du système nerveux entérique : colonisation du tube digestif par les cellules de crête neurale, leur migration et contrôle génétique

Le schéma montre une description de la colonisation du tube digestif par les cellules de la crête neurale, leur migration et le contrôle génétique.

***(a)** Au stade E8.5- 9 chez l'embryon de souris, les cellules de la crête neurale (NCC) du segment vagal (flèche rouge) pénètrent dans la partie supérieure du tube digestif (TD) et migrent dans le sens rostro-caudal afin de coloniser de façon séquentielle la partie antérieure (FG), la partie médiane (MG) et la partie postérieure (HG) (pointillés rouges). Les NCC de la partie la plus caudale du segment vagal proviennent d'une région qui se superpose avec les NCC de la partie du segment rostro-troncal la plus antérieure (flèche bleue). Ces cellules participent à la colonisation de l'œsophage et de la partie supérieure de l'estomac. Les NCC du segment sacré (flèche jaune) commencent leur migration plus tardivement (E13,5) dans le sens caudo-rostral pour coloniser le côlon. **(b)** Les NCC d'origine vagale expriment Sox-10 et EDNRB lorsqu'elles émigrent du tube neural. (**c)** Vers le 9^{e} jour, les cellules dérivées des NCC expriment le récepteur RET. Dans le mésenchyme intestinal, son ligand GDNF est fortement exprimé dans l'estomac (vert) et le ligand de l'EDNRB EDN3 est exprimé dans les parties médiane et postérieure du TD (rose). **(d)** Au stade E11, les cellules dérivées des NCC rencontrent de hauts niveaux d'expression de GDNF et d'EDN3 dans le cæcum (high level GDNF and EDN3) (jaune). Les cellules en aval du front de migration commencent progressivement à se différencier (cells undergoing neural/ glial cell differentiation). GDNF et EDN3 sont ensuite exprimés dans la partie distale du TD postérieur (D'après Heanue & Pachnis, 2007).*

I.1.2.3. Développement des cellules gliales entériques

Les CGE dérivent des cellules de la crête neurale, qui donnent naissance à la fois aux précurseurs neuronaux et aux précurseurs gliaux (Gershon & Rothman, 1991; Young *et al*., 2003). Les précurseurs qui entrent dans le TD et entament une migration dans le sens rostro-caudal vont se séparer en deux populations : les précurseurs neuronaux et les précurseurs gliaux. Alors que les neurones entériques se différencient à partir du stade E10.5 et sont identifiés au niveau du front de migration, les CGE restent en aval à une certaine distance du front de migration (Young *et al*., 2003). La migration et la différenciation des précurseurs gliaux est sous le contrôle de différents gènes et facteurs environnementaux, principalement la neurotrophine-3 (NT-3) qui active le récepteur à tyrosine kinase TrkC (Chalazonitis *et al*., 1998). D'autres facteurs sont également impliqués dans le développement des CGE : le CNTF (ciliary neurotrophic factor) et le LIF (leukemia inhibitory factor) (Chalazonitis *et al*., 1998) ; les neurégulines (NRGs) via le récepteur ErbB3 et son corécepteur ErbB2 (Marchionni *et al*., 1993). Enfin, les facteurs de transcription Sox-8 et Sox-10 jouent un rôle crucial dans le développement des CGE puisque Sox-10 contrôle l'expression du récepteur ErbB3 par les cellules de la crête neurale (Britsch *et al*., 2001; Maka *et al*., 2005).

I.1.2.4. Les neurones entériques

Les neurones du SNE ont été classés en se basant sur différents critères, comme leur morphologie (Figure 13), leurs caractéristiques électrophysiologiques, leurs propriétés pharmacologiques ou encore les connections qu'ils établissent avec les autres neurones, les cellules musculaires et les cellules épithéliales. Tous ces paramètres peuvent varier d'une espèce à l'autre et d'une région à l'autre du TD. Une avancée majeure de ces 20 dernières années fut l'établissement de liaisons entre la plupart de ces critères de classement (Lomax *et al*., 1999). Tous les types de neurones ont été caractérisés chez le cobaye, où ont été effectuées la plupart des études et des classifications du SNE. Les autres mammifères présentent une organisation et un fonctionnement assez similaires. Il existe néanmoins des différences de morphologie neuronale et de phénotype entre les différentes espèces. Les neurones entériques ont été également classés selon leurs fonctions physiologiques présumées en se basant sur leur implication dans l'activité réflexe entérique, leurs formes et leurs projections ainsi que sur l'expression des différents neurotransmetteurs et de leurs

récepteurs. Les études effectuées sur le cobaye ont permis d'établir une définition des différentes catégories de neurones dans l'intestin grêle (Furness, 2000), dans le côlon (Lomax & Furness, 2000) et dans l'estomac (Schemann *et al*., 1995; Reiche *et al*., 1998).

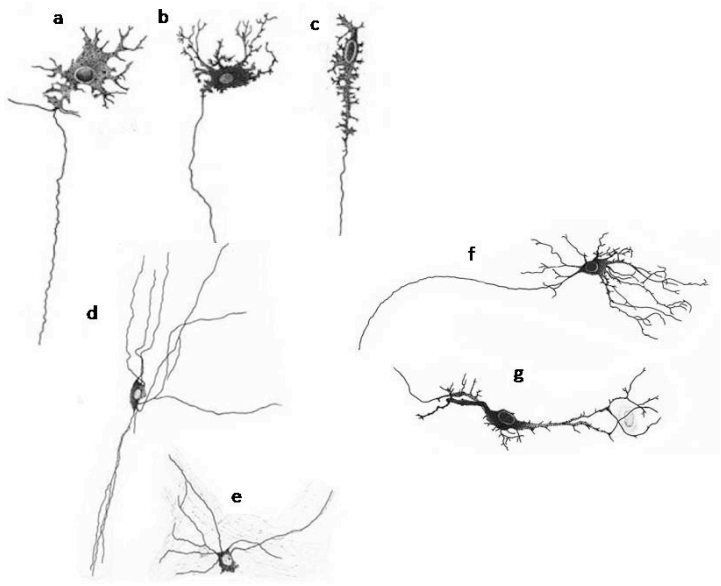


Figure 13 : Types morphologiques principaux de neurones entériques retrouvés dans l'intestin grêle chez le cobaye selon la classification de Dogiel
***(a-c)** Neurones de type Dogiel I uniaxonaux avec plusieurs dendrites courtes. (**d-e)** neurones de type Dogiel II pluriaxonaux. **(f-g)** neurones de type Dogiel III uniaxonaux ayant plusieurs longues dendrites (Furness J.B. The enteric nervous system. 2006. Blackwell publishing, ISBN-13 : 978-1-4051-3376-0).*

I.1.2.4.1. Les neurones afférents primaires intrinsèques

Les neurones afférents primaires intrinsèques (IPANs) représentent 20% des neurones entériques (de l'ordre de 500 millions) et jouent un rôle crucial dans le contrôle et la régulation de l'état fonctionnel du TD et de ses réponses aux différents stimuli chimiques et mécaniques (Furness *et al*., 1998). Les IPANs peuvent avoir deux origines bien distinctes. On distingue ainsi les neurones afférents intrinsèques qui ont leurs corps cellulaires, leurs prolongements et leurs synapses dans le TD, et les neurones d'origine extrinsèque, dont les corps cellulaires sont situés dans les ganglions jugulaires et nodaux (afférents vagaux) ou dans les ganglions de la racine dorsale (afférents spinaux) (Furness *et al*., 1998). La principale fonction des IPANs consiste à transduire et codifier les informations concernant l'environnement chimique et l'état physique des tissus qu'ils innervent. Ils transmettent ces

informations au circuit intégratif à travers lequel l'état fonctionnel de l'organe peut être modifié.

I.1.2.4.2. Les interneurones

Des interneurones ont été identifiés dans toutes les régions du TD. Dans le plexus myentérique, les interneurones forment des chaînes qui s'étendent dans le sens anal ou oral (Pompolo & Furness, 1993). On distingue trois types d'interneurones descendants et un type d'interneurones ascendants dans l'intestin grêle de cobaye.

Les réflexes locaux de motricité impliquent deux types d'interneurones descendants exprimant l'acétylcholine (ACh) et la 5-HT ainsi que les interneurones ascendants (Furness 2000). Le 3ème type d'interneurones descendants exprimant l'ACh et la somatostatine est plutôt impliqué dans la propagation du complexe de migration myoélectrique (Pompolo & Furness, 1998).

I.1.2.4.3. Les neurones moteurs

On distingue cinq types de neurones moteurs : les neurones excitateurs du muscle, les neurones inhibiteurs du muscle, les neurones sécrétomoteurs-vasodilatateurs, les neurones sécrétomoteurs non vasodilatateurs et les neurones innervant les cellules endocrines de l'estomac (Furness *et al*., 2000b).

Les neurones moteurs, excitateurs et inhibiteurs, innervent les muscles circulaires et longitudinaux ainsi que la *muscularis mucosæ* tout au long du TD. Les neurotransmetteurs primaires des neurones excitateurs sont l'ACh et les tachykinines alors que les neurones inhibiteurs produisent différents neurotransmetteurs comme le monoxyde d'azote (NO), le VIP et l'ATP qui peuvent être libérés par le même neurone (Furness, 2000).

Les neurones sécrétomoteurs innervent la muqueuse intestinale et régulent la sécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale. Certains innervent à la fois la muqueuse et les artérioles présentes dans la paroi digestive (neurones

sécrétomoteurs/vasodilatateurs), ce qui leur permet de réguler à la fois les fonctions de sécrétion et de vasodilatation.

I.1.2.4.4. Le codage neurochimique

Les neurones entériques produisent et libèrent une trentaine de substances différentes (McConalogue & Furness, 1994). L'expression de ces neuromédiateurs varie dans les différents groupes de neurones et chez les différentes espèces animales. L'expression d'une certaine combinaison de ces différentes substances par les neurones constitue le codage neurochimique de ces neurones. Ce codage neurochimique peut être utilisé pour identifier et mettre en évidence les différents types de neurones et constitue un très bon outil pour l'étude fonctionnelle des neurones entériques (Costa *et al*., 1996).

I.1.2.5. La cellule gliale entérique

I.1.2.5.1. Les cellules gliales entériques : morphologie et marqueurs spécifiques

En 1891, Dogiel a noté la présence dans le SNE de cellules satellites nucléées à proximité des neurones entériques. Ces cellules, assimilées d'abord à des cellules de Schwann, sont retrouvées en très grand nombre en périphérie des corps cellulaires neuronaux et tout au long des fibres nerveuses (Stohr, 1952) (Figure 14). La caractérisation de cette population a pu être réalisée grâce aux techniques d'immunohistochimie qui ont montré que ces cellules exprimaient la GFAP (Glial fibrillary acidic protein) (Jessen & Mirsky, 1983) et la S100-β (S100 Ca^{2+} binding protein β) (Ferri *et al*., 1982), deux protéines caractéristiques des astrocytes du SNC. Les CGE expriment également la protéine nucléaire Sox-10 (Ruhl, 2005). Confortant ces données, les observations en microscopie électronique ont montré que ces cellules gliales étaient très différentes des cellules de Schwann présentes dans les ganglions périphériques, mais similaires dans leur structure aux astrocytes (Gabella, 1971; Cook & Burnstock, 1976).

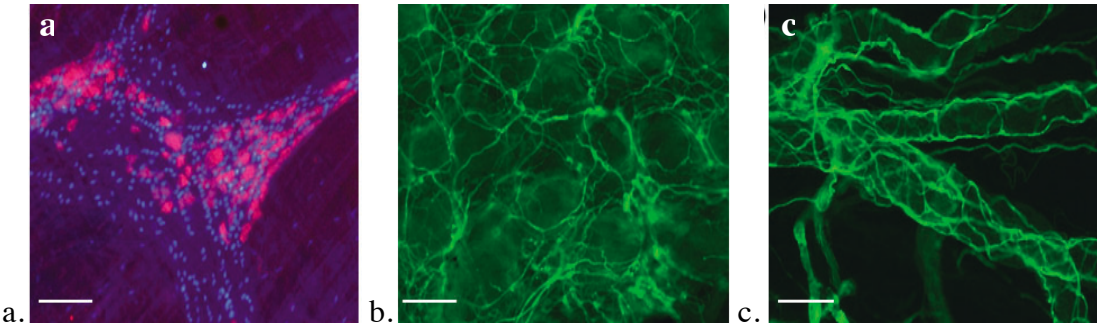


Figure 14 : Organisation des cellules gliales entériques

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

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

Ces cellules, de type astrocytaire, appelées cellules gliales entériques (CGE) sont beaucoup plus nombreuses que les neurones entériques. Ainsi, le rapport nombre de CGE/nombre de neurones entériques chez le cobaye est de 0,8-1,0 dans le plexus sous-muqueux *versus* 1,7 dans le plexus myentérique. Chez l'homme, le rapport nombre de CGE/nombre de neurones est de 1,3 à 1,9 dans le plexus sous-muqueux versus 5,9 à 7,0 dans le plexus myentérique (Hoff *et al*., 2008). Les CGE sont présentes dans les ganglions, autour des fibres interganglionnaires des plexus myentérique et sous-muqueux et à proximité de la BEI, où les CGE entourent les villosités et les vaisseaux sanguins (Figure 14). Elles forment ainsi un réseau glial dense et étendu à tous les niveaux du TD (Ruhl, 2005) (Figure 15).

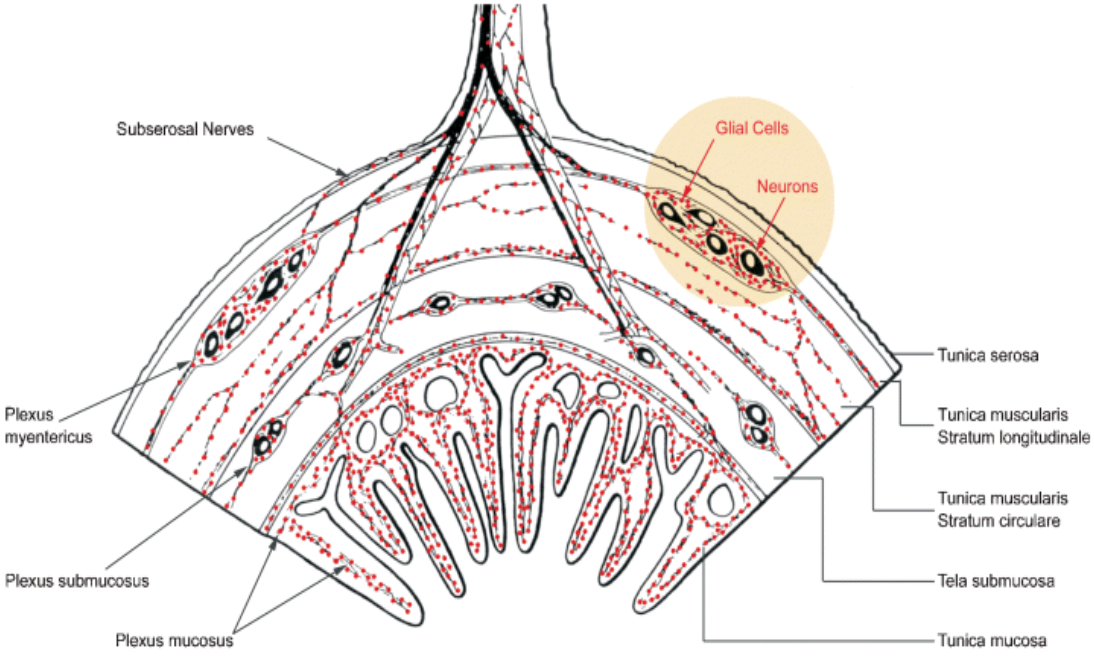


Figure 15 : Localisation des cellules gliales entérique dans le tube digestif

Chez l'homme, les cellules gliales (en rouge) sont localisées dans l'ensemble des tuniques du tube digestif. Elles sont retrouvées majoritairement à proximité des fibres neuronales (D'après Ruhl, 2005).

Comme les astrocytes, les CGE sont des cellules étoilées de petite taille présentant des extensions de taille et de forme variées. Au sein des ganglions, les CGE ont des extensions très courtes et sont empaquetées autour des neurones alors qu'au niveau des fibres interganglionnaires, les CGE ont de très longues extensions entourant les axones de plusieurs neurones. Une seule CGE peut entourer plusieurs neurones à la fois (Maudlej & Hanani, 1992).

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

Du point de vue cytologique, le noyau des CGE se distingue très facilement du noyau des neurones. Il se caractérise par la présence de blocs de chromatine situés à proximité de la membrane nucléaire, elle-même caractérisée par la présence d'invaginations profondes. Par ailleurs, les CGE contiennent des gliofilaments caractéristiques, de 10 nm de diamètre. Des faisceaux de gliofilaments semblent ancrés à des agrégats moléculaires à la surface de la membrane. Ces faisceaux traversent le corps cellulaire et se projettent dans l'axe des extensions gliales, leur permettant d'adhérer aux surfaces ganglionnaires (Gabella, 1981). La composante majeure de ces gliofilaments est la GFAP (Jessen & Mirsky, 1980). Les CGE expriment d'autres marqueurs spécifiques comme la vimentine, la protéine S100-α mais aussi certaines enzymes comme la glutamine synthétase et ainsi que l'antigène de surface Ran-2 (Jessen & Mirsky, 1985).

Certaines études suggèrent l'existence de populations bien distinctes de CGE. Cette distinction était quelquefois basée sur des différences morphologiques entre les CGE entourant les corps cellulaires, qui possèdent des extensions très courtes, et celles localisées au niveau des fibres nerveuses qui ont de très longues extensions. L'existence de CGE présentant les deux types d'extensions empêche cependant toute distinction basée sur ce critère. D'autres études se sont basées sur les différences d'expression de la GFAP ou de production de cytokines entre les CGE. L'expression de ces protéines étant modulée par différents facteurs environnementaux, il est cependant difficile de confirmer l'homogénéité ou l'hétérogénéité des populations gliales (Ruhl, 2005).

I.1.2.5.2. Fonctions physiologiques des cellules gliales entériques

Pendant des années les cellules gliales ont été considérées comme des simples cellules de support du système nerveux, ce qui leur a donné leur nom (glie = 'glue' en grec). Ce concept est maintenant totalement dépassé, du fait des nombreux travaux montrant l'implication des cellules gliales dans le contrôle des fonctions neuronales (Ruhl, 2005; Abdo *et al*., 2010). Par ailleurs, les CGE interagissent avec les autres types cellulaires présents dans leur environnement et interviennent dans la régulation de leurs fonctions. Des études montrent par exemple le rôle des CGE dans le contrôle des fonctions de la BEI, ce qui autorise certaines analogies avec le contrôle de la barrière hémato-encéphalique exercé par les astrocytes du SNC (Neunlist *et al*., 2008).

I.1.3. L'unité neuro-glio-épithéliale dans la physiologie digestive

I.1.3.1. Rôles des cellules épithéliales intestinales sur l'unité neuro-gliale

Peu d'études se sont penchées sur le rôle des CEI sur les neurones. Il est connu que la BEI et en particulier les cellules entéroendocrines sont capables de transduire un signal luminal vers les neurones à travers la sécrétion de 5-HT pour activer les réflexes entériques contrôlant le péristaltisme intestinal et la sécrétion mucosale (Cooke *et al*., 1997). La déformation mécanique de la muqueuse entraîne également une augmentation de l'activité des neurones myentériques (Bornstein *et al*., 1991). De manière concomitante, il a été montré sur des explants intestinaux de cochons d'Inde, que le retrait de la muqueuse réduit l'excitabilité des neurones entériques (Kunze *et al*., 1997). Enfin, la muqueuse intestinale est nécessaire à l'effet des acides gras à chaînes courtes ou de l'acidité sur l'activation des neurones myentériques (Bertrand *et al*., 1997).

Une étude récente, effectuée dans notre laboratoire, a montré que les CEI étaient capables de protéger les neurones du stress oxydant induit par la dopamine (Moriez *et al*., 2009). Ce rôle protecteur pourrait être médié par le NGF (Nerve Growth Factor) secrété par les CEI. Par ailleurs, la co-culture de CEI avec une lignée cellulaire de neuroblastomes humain, SH-SY5Y, entraîne une modification du codage neurochimique de cette dernière, en augmentant le pourcentage de neurones immunoréactifs pour le VIP et en augmentant significativement l'expression de l'ARNm codant pour le VIP. L'effet du NGF étant de diminuer l'expression du VIP au sein des neurones, il est probable que d'autres facteurs épithéliaux agissant sur les neurones ou les CGE restent encore à identifier.

I.1.3.2. Rôles des neurones entériques sur l'unité glio-épithéliale

I.1.3.2.1. Contrôle de la motricité intestinale

La motricité gastro-intestinale est un processus intégré qui comprend différentes composantes comme l'activité myoélectrique, l'activité contractile, le tonus et le transit intestinal. Chez les mammifères, les cellules musculaires lisses du TD sont organisées en deux couches distinctes : une première couche externe assez fine, constituée de fibres

musculaires longitudinales et une couche interne plus épaisse, constituée de fibres musculaires circulaires (Olsson & Holmgren, 2001).

La notion de péristaltisme intestinal a été introduite par Modlin *et al* en 2000 mais cette propriété a été démontrée dès 1899 par Bayliss et Starling (Bayliss & Starling, 1899; Modlin *et al*., 2000). Il s'agit d'un réflexe activant un circuit nerveux, aboutissant à une contraction du côté oral et une relaxation du côté anal du stimulus (Figure 16). Répété de manière séquentielle le long du TD, ce réflexe permet la progression du bol alimentaire dans l'intestin.

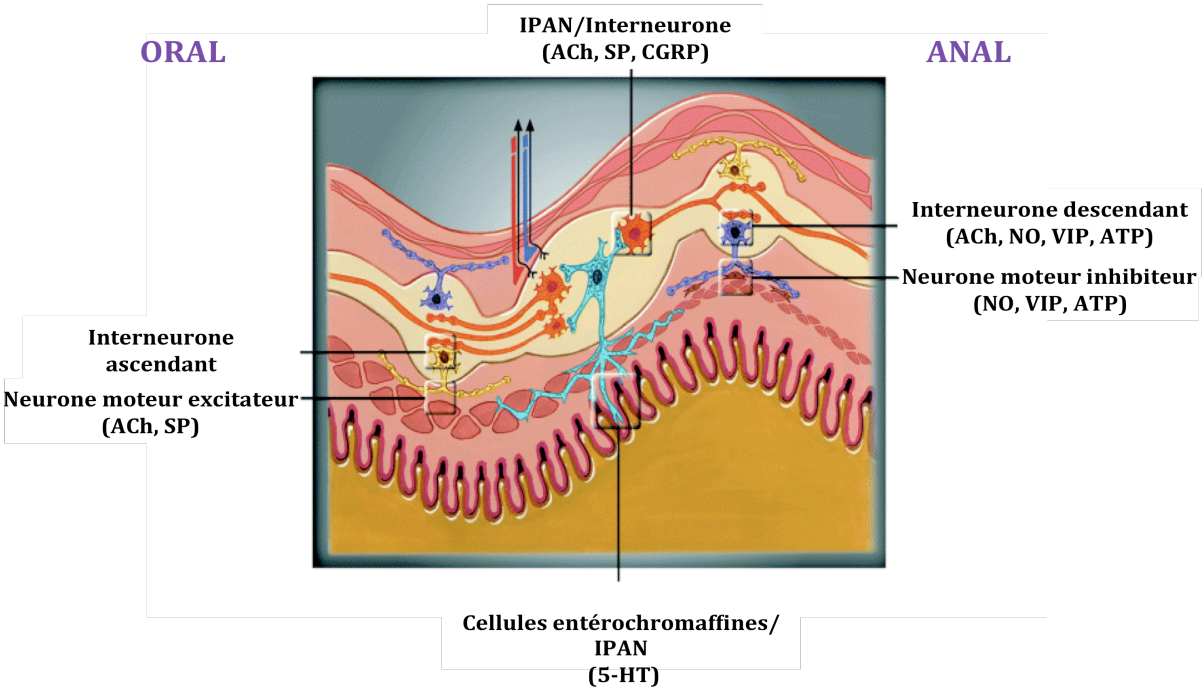


Figure 16: Schéma représentant le réflexe péristaltique dans l'intestin grêle (D'après Hansen et al, 2003)

Le réflexe péristaltique peut être initié par un stimulus au niveau de la lumière intestinale. Ce stimulus peut être mécanique (distension mécanique ou frottement de la muqueuse dus au passage du bol alimentaire) ou chimique (diminution du pH, variation de l'osmolarité, présence d'acides gras ou de glucides). Ces différents stimuli vont ainsi activer les cellules endocrines de la muqueuse comme les cellules entéroendocrines. Les cellules entérochromaffines activées vont libérer la 5-HT et activer ainsi les terminaisons nerveuses des IPANs, présentes dans la muqueuse intestinale au niveau du plexus sous-muqueux (Figure 16). Les IPANs connectés aux interneurones libéreront alors différents neuromédiateurs (Furness, 2000; Wolf *et al*., 2007). Les interneurones ascendants et

descendants établissent des connections avec les neurones moteurs, éléments terminaux dans le circuit du réflexe péristaltique. L'activation des neurones moteurs ascendants excitateurs, provoque une contraction du muscle. A l'inverse, les neurones descendants sont inhibiteurs et induisent une relaxation du muscle.

Par ailleurs, le TD est relié au système nerveux central (SNC) par les afférences et efférences du SN autonome, constituant l'axe cerveau-tube digestif. Le SNC est donc aussi capable de moduler indirectement l'activité motrice du TD par le SN sympathique ou parasympathique.

I.1.3.2.2. Contrôle de la sécrétion intestinale

La muqueuse intestinale est constituée par une monocouche de CEI qui forme une barrière séparant l'organisme du milieu extérieur (lumière intestinale). Les CEI absorbent de très grandes quantités d'eau et d'ions de façon quotidienne. En présence d'agents pathogènes ou de toxines bactériennes, la muqueuse intestinale réagit en sécrétant du mucus dans la lumière intestinale et en accélérant le transit afin de les éliminer. Le contrôle de la BEI et des processus d'absorption et de sécrétion est assuré en partie par le SNE.

Les réflexes sécrétomoteurs sont initiés par des interactions chimiques et mécaniques avec le contenu de la lumière intestinale (Figure 17). Un des stimuli importants de la sécrétion est le transport actif de nutriments, comme le glucose (Kunze & Furness, 1999). Les réponses réflexes locales sont médiées, pour la plupart, par des neurones non cholinergiques via la libération de VIP, de substance P, ou de neuromodulateurs comme l'ATP ou le PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide). Un autre neuromédiateur important est la 5-HT, libérée par les cellules entéroendocrines. La 5-HT active les IPANs. Ces derniers stimulent alors des neurones sécrétomoteurs cholinergiques et VIPergiques. L'activation de ces neurones dans le plexus sous-muqueux se fait via les récepteurs nicotiniques ou les récepteurs aux neurokinines NK1 et NK2. L'ACh et le VIP libérés par les neurones sécrétomoteurs vont se lier aux récepteurs des cellules épithéliales, stimuler la sécrétion d'ions chlorures et de fluides et empêcher l'entrée d'ions sodium (Hansen & Skadhauge, 1997). Par ailleurs, de nombreuses substances comme le glutamate et le PACAP modulent

l'activité de ces neurones sécrétomoteurs afin d'augmenter ou d'inhiber la sécrétion d'eau et d'ions par les cellules épithéliales (Cooke, 2000).

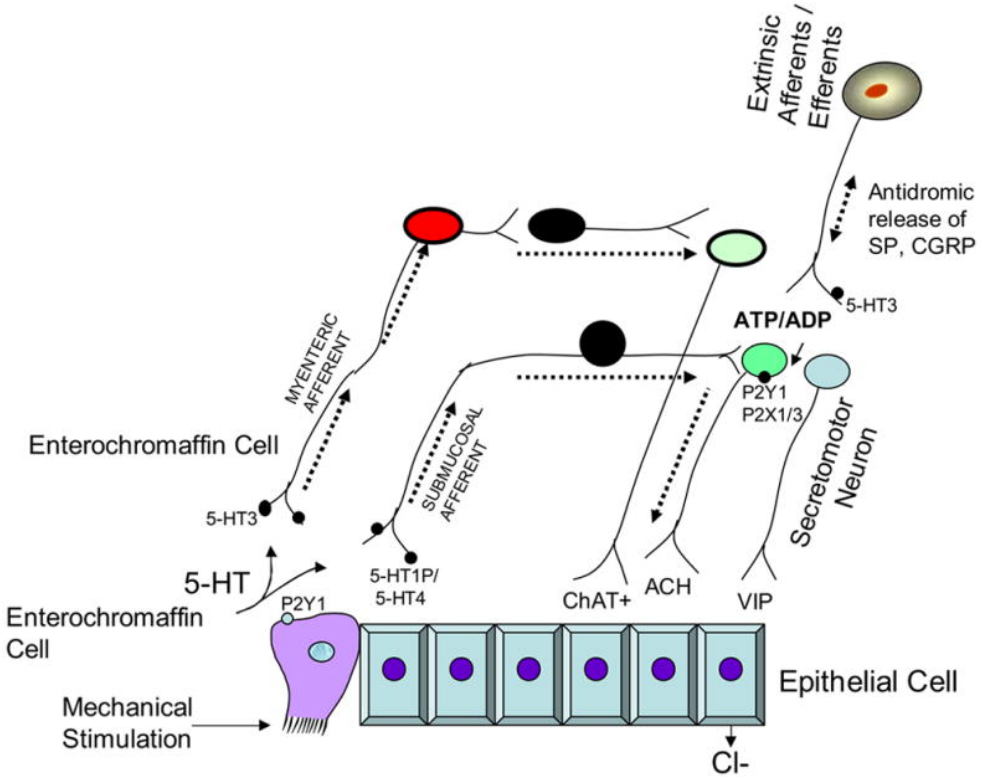


Figure 17 : Le réflexe sécrétomoteur
(D'après Cooke, 2000)

I.1.3.2.3. Contrôle de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale

La perméabilité membranaire comporte deux composantes majeures. La composante paracellulaire permet un passage sélectif des molécules grâce aux jonctions serrées situées au niveau du pôle apical des CEI. Il a ainsi été montré que les voies VIPergiques, issues du plexus sous-muqueux, induisaient une diminution de la perméabilité paracellulaire des lignées épithéliales HT-29 et Caco-2 en augmentant l'expression d'une des protéines impliquées des jonctions serrées : la protéine ZO-1 (*zonula occludens* 1) (Neunlist *et al.*, 2003).

La deuxième composante, transcellulaire, est responsable du transport de molécules de grande taille jusqu'à la *lamina propria* par des endosomes situés dans les CEI. La

régulation de la perméabilité par des neurotransmetteurs comme l'ACh, le VIP ou la substance P a été montrée à la fois *in vivo* et *in vitro* (Hallgren *et al*., 1998; Hardin *et al*., 1999; Hayden & Carey, 2000). Cameron et Perdue ont montré que l'ACh augmentait la perméabilité transcellulaire des macromolécules *via* les récepteurs muscariniques (isoforme M3) exprimés par les CEI (Cameron & Perdue, 2007). Par ailleurs, l'effet des neurones entériques sous-muqueux, sur la BEI, a été montré sur des modèles *in vitro* de culture d'explant de tissu du TD (Hallgren *et al*., 1998; Neunlist *et al*., 2003).

I.1.3.2.4. Contrôle de la prolifération des cellules épithéliales intestinales

Le SNE est impliqué dans le contrôle de la prolifération des CEI. *In vivo*, le GLP-2 (glucagon-like peptide 2), provenant des CEI, augmenterait la prolifération des cellules précurseurs des CEI à travers l'activation des neurones entériques (Bjerknes & Cheng, 2001). Une autre étude, réalisée sur un modèle de co-culture *in vitro*, montre, à l'inverse, que certains neurones sous-muqueux humains inhibent la prolifération des CEI *via* la voie VIPergique (Toumi *et al*., 2003). D'autres neuromédiateurs jouent un rôle dans la modulation de la prolifération comme la somatostatine, qui inhibe la prolifération des CEI (Thompson *et al*., 1993) ou l'ATP et l'ADP qui inhibent également la prolifération des CEI tout en stimulant leur migration (Dignass *et al*., 1998).

I.1.3.3. Rôles des cellules gliales entériques sur l'unité neuro-épithéliale

I.1.3.3.1. La cellule gliale entérique comme élément de support neuronal

Le rôle de support a été le premier rôle attribué à la cellule gliale. En effet, les CGE jouent un rôle de soutien mécanique et nutritionnel des neurones entériques. Il a tout d'abord été montré que les CGE favorisaient la mise en place et la structuration spatiale des ganglions entériques. Ceci est dû principalement à la présence des gliofilaments qui permettent l'ancrage des CGE à la surface des ganglions (Gabella, 1990). Il en résulte un réseau dense de CGE entourant la surface ganglionnaire. Néanmoins, loin d'assurer un soutien passif, les CGE répondent aux stimulations mécaniques par une surexpression du gène c-fos (gène de réponse précoce souvent utilisé comme marqueur d'activité neuronale) mais aussi par une

augmentation de leur taux intracellulaire de calcium. Les ondes calciques peuvent se propager vers les autres CGE (Sharkey *et al*., 1999; Zhang *et al*., 2003).

Les CGE jouent également un rôle de support nutritionnel et de protection en garantissant aux neurones un microenvironnement protégé. Ce rôle est illustré principalement par la production de facteurs neurotrophiques comme le GDNF et la NT-3 (Hoehner *et al*., 1996; Bar *et al*., 1997).

I.1.3.3.2. Contrôle de la neurotransmission

De nombreuses études ont montré que les CGE jouaient un rôle dans la neurotransmission. Les CGE semblent être impliquées à la fois dans la synthèse et l'élimination de neurotransmetteurs, mais elles peuvent aussi jouer un rôle actif dans le processus de neurotransmission.

Ainsi, les CGE contrôlent les neurotransmissions GABAergiques. Des études immunohistochimiques ont montré l'expression exclusive de la glutamine synthétase par les CGE (Jessen & Mirsky, 1983). Cette enzyme responsable de la conversion du glutamate en glutamine assure un double rôle : le premier est de détoxifier le milieu extracellulaire des molécules de glutamate qui peuvent être excitotoxiques à forte concentration ; le second consiste à approvisionner les neurones en glutamine nécessaire à la synthèse de deux neuromédiateurs, le glutamate et l'acide γ-amino-butyrique (GABA) (Galligan *et al*., 2000). De plus, il a été montré que le transporteur GAT2 (γ-aminobutyric acid (GABA) transporter) est préférentiellement exprimé par les CGE, ce qui suggère leur implication dans l'élimination des molécules de GABA de l'espace extracellulaire (Fletcher *et al*., 2002).

Par ailleurs, les CGE contrôlent également les neurotransmissions VIPergiques. En effet, il a été montré que les transporteurs d'oligopeptides 2 (PEPT2) sont exprimés majoritairement par les CGE (Ruhl *et al*., 2005), leur permettant ainsi de récupérer et d'éliminer les produits de dégradation des neuropeptides tels que le VIP afin de les recycler.

Les CGE sont également impliquées dans la transmission nitrergique. Les CGE sont la principale source de L-arginine, précurseur du NO neuronal (Nagahama *et al*., 2001;

Fletcher *et al*., 2002). L'implication des CGE dans la transmission nitrergique, mais également VIPergique, a été mise en évidence de manière indirecte par la destruction partielle des CGE. Cette destruction induisait une diminution du niveau d'expression des deux neuromédiateurs, NO et VIP, dans les neurones entériques (Aube *et al*., 2006).

Les CGE joueraient aussi un rôle dans la transmission purinergique. En effet, l'expression de la NTPDase-2 (ecto-nucléotidase 2) localisée à la surface des CGE, mais absente des neurones, suggère que les CGE pourraient contrôler la disponibilité des bases purinergiques ATP et ADP (Braun *et al*., 2004). Par ailleurs, il a été montré que les CGE expriment des purinorécepteurs (sous types P2X7 et P2Y2) (Kimball & Mulholland, 1996; Vanderwinden *et al*., 2003) et répondent aux agonistes ATP et UTP par une augmentation du calcium intracellulaire (Sarosi *et al*., 1998). Une autre étude montre que les CGE produisent l'ATP permettant la propagation d'ondes de calcium entre les CGE (Zhang *et al*., 2003). Ces ondes calciques sont principalement dues à la présence de jonctions communicantes entre les CGE (Hanani *et al*., 1989) et sont capables d'induire une réponse neuronale, ce qui confirme l'implication active des CGE dans le processus de neurotransmission.

Enfin, les CGE expriment des canaux potassiques voltage-dépendants, ce qui leur permet de réguler la concentration extracellulaire d'ions K^+, et ainsi réguler l'activité neuronale (Hanani *et al*., 2000).

I.1.3.3.3. Contrôle de la survie neuronale

L'étude des effets du SNE sur son environnement (i.e. BEI, CEI) a été rendue possible par le développement de modèles de culture cellulaire. Des lignées de CGE ont été obtenues à partir de tissus intestinaux. Ainsi, les lignées de CGE non transformées, NT et de CGE transformées, CRL2690, ont été les premières isolées à partir du plexus myentérique de rat adulte (Ruhl *et al*., 2001b). De nouvelles lignées de CGE récemment isolées à partir de culture primaire de SNE d'embryons de rat, la lignée JUG2, ou à partir de plexus myentérique de rat adulte, la lignée ROG (Article 2), constituent des outils supplémentaires pour l'étude du rôle des CGE. Enfin, un modèle de culture primaire de SNE, isolé à partir d'embryons de rats (Chevalier *et al*., 2008), comprenant CGE et neurones, a également

permis la caractérisation du rôle des CGE, en particulier sur le contrôle de la survie neuronale.

Leur implication a été suggérée par analogie avec les astrocytes du SNC. En effet, les CGE produisent et sécrètent des facteurs connus pour leurs rôles neurotrophiques et neuroprotecteurs pour les neurones du SNC. Les CGE produisent et sécrètent différents types de molécules actives sur les fonctions neuronales. On distingue les facteurs neurotrophiques tels que le GDNF, le NGF, la neurotrophine-3, mais aussi des cytokines comme l'IL-6 (Interleukine 6) et le TGF-β (Transforming growth factor beta) (Hoehner *et al*., 1996; Bar *et al*., 1997; Carlson *et al*., 1999; Ruhl *et al*., 2001a; von Boyen *et al*., 2006b; Neunlist *et al*., 2007). Ces médiateurs gliaux peuvent être impliqués dans le contrôle de la croissance et de la différenciation des neurones entériques. Différentes études ont mis en évidence le rôle protecteur de certains de ces médiateurs. Le GDNF protège par exemple les neurones entériques contre le stress oxydant induit par l'hyperglycémie (Anitha *et al*., 2006a; Anitha *et al*., 2006b). Le TGF-β produit par les astrocytes a un effet protecteur contre le stress nitrosylant (Dhandapani & Brann, 2003). Une molécule plus récemment identifiée, le glutathion sous sa forme réduite (GSH), protège les neurones contre le stress oxydant induit par la dopamine (Abdo *et al*., 2010).

Le GSH, ou tripeptide γ-L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine secrété par les CGE, représente le plus abondant thiol libre non protéique. Il existe sous une forme réduite, le GSH, majoritaire dans le milieu intracellulaire, et peut se transformer sous une forme oxydée, le GSSG, correspondant à deux molécules de GSH reliées par un pont disulfure au niveau des résidus cystéine. Le GSH est impliqué dans de nombreuses fonctions (Lu, 2009): (1) détoxification de certaines molécules par les glutathion-S-transférases ou de concentrations toxiques de NO par la formation de GSNO (nitrosoglutathion) ; (2) stockage de la cystéine évitant une auto-oxydation rapide sous forme de cystine et mise à disposition de la cystéine stockée par l'action conjointe de la γGT (γglutamyl transpeptidase) et d'une dipeptidase ; (3) protection contre le stress oxydant. Le glutathion agit également et surtout comme co-facteur indispensable pour certaines enzymes comme les glutathion peroxydases (GPx), la sélénoprotéine P, certaines peroxirédoxines et les glutarédoxines (Kalinina *et al*., 2008). Par ailleurs, le glutathion forme des liaisons disulfures avec les groupements thiols des protéines sous l'action des glutathion S-transférases (GST). Ce mécanisme appelé S-glutathionylation

protège les protéines d'oxydations irréversibles et peut également intervenir dans la régulation de leurs fonctions (Giustarini *et al*., 2004).

I.1.3.3.4. Contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale

D'un point de vue structural, les interactions glio-épithéliales sont très similaires à celles existant au sein du SNC entre les astrocytes et les cellules endothéliales formant la barrière hémato-encéphalique (BHE). Plusieurs études ont montré dans des modèles *in vivo* et *in vitro* que les astrocytes contrôlaient les fonctions de la BHE (Beck *et al*., 1984; Janzer & Raff, 1987). Par analogie aux astrocytes du SNC, on a donc prêté aux CGE un rôle similaire sur la BEI. Quelques éléments en faveur de cette hypothèse sont issus de l'étude d'un modèle murin transgénique déplété en CGE (souris GFAP-HSV-TK) (Bush *et al*., 1998). La déplétion des CGE a entraîné chez ces souris des altérations majeures de l'intégrité de la BEI. Ces effets, notamment une augmentation de la perméabilité paracellulaire, ont été confirmés *in vitro* par des expériences de coculture de CGE et CEI. Dans ce modèle, ils augmentent l'expression de la protéine des jonctions serrées ZO-1. Ces effets seraient médiés par le GSNO, molécule produite et sécrétée par les CGE (Savidge *et al*., 2007a).

Dans le modèle de co-culture de CGE et CEI, il a également été montré que les CGE inhibaient la prolifération des cellules épithéliales Caco-2, et induisaient une augmentation de leur résistance transépithéliale. Dans ce contexte, les effets antiprolifératifs des CGE seraient associés à la libération de TGF-β1 (Neunlist *et al*., 2007). Les CGE moduleraient la réparation et la restitution épithéliale en augmentant l'étalement des CEI. Cet effet serait médié par le proEGF, protéine précurseur de l'EGF, produite par les CGE (Van Landeghem *et al*., 2011). Le proEGF entraînerait une augmentation de l'expression et de l'activité de la protéine FAK (Focal adhesion kinase) dans les cellules Caco-2 via une voie dépendante du récepteur EGFR (Epidermal growth factor receptor) (Van Landeghem *et al*., 2011).

Une étude récente a montré que les CGE pouvaient aussi prévenir de l'agression par un pathogène entéro-invasif, *Shigella flexneri*. Ces effets protecteurs seraient médiés par le GSNO à travers l'activation de la petite GTPase cdc42 et le remaniement du cytosquelette de la CEI (Flamant *et al*., 2011).

D'autres médiateurs gliaux comme le GDNF, S100-β ou l'IL-6 semblent également impliqués dans la modulation des fonctions de la BEI, même si leur implication n'est pas directement démontrée (Bar *et al*., 1997; Ruhl *et al*., 2001a; Neunlist *et al*., 2008). Les principaux médiateurs importants dans les communications neuro-glio-épithéliales ont été répertoriés en annexe (Annexe 4).

De manière intéressante, une étude du transcriptome des CEI après 24h de co-culture avec les CGE, a permis de mettre en évidence le rôle régulateur de ces dernières. En effet, il a été montré que les CGE modulaient l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation, la motilité, l'adhésion et l'apoptose des CEI. En particulier, il a été décrit une augmentation de l'expression du gène PPARγ et d'un cluster de gènes dit 'PPARγ like' (Van Landeghem *et al*., 2009). Cette étude laisse supposer que des médiateurs gliaux activant la voie PPARγ et notamment des ligands naturels tels que les dérivés des oméga-6, pourraient être secrétés par les CGE. Au cours de ce travail de thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'agoniste naturel de PPARγ le plus connu : la 15-déoxy-$\Delta^{12,14}$-Prostaglandine J_2.

I.1.4. L'unité neuro-glio-épithéliale en pathologie digestive

I.1.4.1. Colites inflammatoires et cancers

Chez l'homme, des modifications de l'expression des marqueurs gliaux tels que GFAP et S100-β, a été montrée dans la maladie de Crohn et dans l'entérocolite nécrosante (Wedel *et al*., 1998; Cornet *et al*., 2001). Les modifications de l'expression des marqueurs gliaux dans la maladie de Crohn ont été observées en zones non inflammées. De façon intéressante, il a été montré au cours de cette pathologie que les CGE exprimaient le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et interagissaient d'une façon active avec les lymphocytes activés (Geboes *et al*., 1992). Ceci suggère que les CGE peuvent jouer, dans ces conditions, le rôle de cellules présentatrices d'antigènes. Par ailleurs, la capacité des CGE à être infectées par un agent infectieux impliqué dans la maladie de Crohn, le *mycobacterium avium* (sous-espèce *paratuberculosis*), suggère leur rôle potentiel dans l'étiologie de cette maladie (Chamberlin *et al*., 2001; Sechi *et al*., 2007).

L'implication des CGE dans le contrôle des fonctions gastro-intestinales a pu être mise en évidence de façon indirecte grâce à la mise en place de différents modèles animaux de délétion des CGE *in vivo*. Ces modèles ont permis de reproduire les altérations de la population gliale observée au cours des différentes pathologies citées précédemment.

Le premier modèle est un modèle de souris transgénique exprimant la thymidine kinase du virus de l'herpès (HSV-TK) sous le contrôle du promoteur de la GFAP, protéine exclusivement exprimée par les CGE. Le traitement de ces souris par le ganciclovir (GCV) entrainera ainsi la destruction spécifique des CGE. Le GCV est, en effet, transformé par la thymidine kinase virale en analogues toxiques de bases puriques (Bush *et al*., 1998). Les auteurs ont ainsi observé une perte massive des CGE au niveau du jéjunum et de l'iléon, ainsi que des altérations morphologiques des CGE restantes, détectables dès 6 jours de traitement. Ces souris développent une jéjuno-iléite fulminante au 11ème jour et meurent au 19ème jour.

Le deuxième modèle est également un modèle de souris transgénique aboutissant à une destruction plus modérée des CGE (Aube *et al*., 2006). Ce modèle a été adapté à partir d'un premier modèle double transgénique développé par Cornet *et al* (2001), qui induisait

une destruction massive des CGE (Cornet *et al*., 2001). Le modèle de Cornet a été mis en place en croisant des souris transgéniques exprimant l'hémagglutinine (HA) sous le contrôle du promoteur de la GFAP avec des souris exprimant le récepteur de l'HA à la surface de leurs lymphocytes. Les auteurs ont ainsi obtenu des souris transgéniques dont les CGE, exprimant spécifiquement l'HA, sont détruites par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques dirigés contre l'antigène HA. Ces souris meurent au 4ème jour après avoir développé une entérocolite fulminante. Ce modèle a ensuite été adapté par Aube, en injectant aux souris transgéniques exprimant l'HA sous le contrôle du promoteur de la GFAP, des quantités moins importantes et bien définies de lymphocytes T CD8+ dirigés contre l'HA, autorisant une destruction spécifique mais contrôlée des CGE (Aube *et al*., 2006).

Le troisième modèle est basé sur l'utilisation d'un agent toxique ciblant spécifiquement les CGE, le fluorocitrate. Le fluorocitrate ne détruit pas les CGE mais inhibe leur métabolisme mitochondrial en inhibant l'activité de l'aconitase, une enzyme-clef du cycle de Krebs (Nasser *et al*., 2006). Cette molécule aurait un effet inhibiteur préférentiel sur les astrocytes du SNC (Hassel *et al*., 1992). Suite à l'injection intra-péritonéale du fluorocitrate pendant 7 jours, une diminution spécifique de la capture de dipeptides par les CGE a été observée. Par contre, les auteurs n'ont observé aucune modification morphologique et aucune diminution du nombre des CGE chez les animaux traités.

La mise en place de ces différents modèles animaux de délétion de la glie a permis d'évaluer les conséquences de cette ablation sur les différentes structures et fonctions du tube digestif. Les répercussions de la perte des CGE sur le SNE varient énormément selon le caractère total ou partiel de l'ablation gliale. Ainsi la perte totale de CGE obtenue dans le modèle transgénique de Bush et al. induisait une dégénérescence massive des neurones entériques (Bush *et al*., 1998). Cet effet confirme le rôle des CGE dans le contrôle de la survie neuronale. A l'inverse, la destruction modérée et non inflammatoire réalisée dans le modèle d'Aubé et al. induisait une modification du codage neurochimique au sein du SNE (Aube *et al*., 2006), avec une perte des neurones VIPergiques dans le plexus sous-muqueux et une diminution de la proportion de neurones nitrergiques dans le plexus myentérique. Enfin, l'utilisation du gliotoxique fluorocitrate par Nasser et al. n'induisait aucune modification au sein du SNE, cohérente avec l'absence de réelle destruction des CGE dans ce modèle (Nasser *et al*., 2006).

L'ablation des CGE se traduit également par des conséquences sur la motricité digestive. En effet, une diminution de la motricité digestive est observée suite à l'ablation modérée de CGE dans les modèles d'Aubé et al. et de Nasser et al. Une baisse du transit intestinal (Aube *et al*., 2006; Nasser *et al*., 2006) et de la vidange gastrique (Aube *et al*., 2006) est observée, sans modification du transit colique (Nasser *et al*., 2006). La diminution de la proportion de neurones nitrergiques, impliqués dans la relaxation des muscles lisses lors du péristaltisme intestinal, permet d'expliquer en partie ces altérations de la motricité (Aube *et al*., 2006).

Dans les modèles de délétion des CGE, une augmentation de la perméabilité intestinale était observée, associée à une inflammation intestinale aigüe dans le cas d'une ablation importante (Savidge *et al*., 2007a). Cette augmentation de la perméabilité était associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire dans la muqueuse intestinale (Bush *et al*., 1998; Cornet *et al*., 2001; Aube *et al*., 2006).

Un modèle de destruction des CGE *in vitro* a été mis au point dans notre laboratoire. Des adénovirus de type 5, exprimant le gène HSV-TK sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus (CMV) ont été utilisés pour infecter les CGE dans des cultures primaires de SNE. L'adénovirus infectant de manière spécifique les CGE, le traitement de la culture primaire par le GCV entraine la destruction spécifique des CGE. Ce modèle a permis de mettre en évidence le rôle des CGE sur le contrôle de la survie neuronale (Abdo *et al*., 2010).

Enfin, des altérations des réseaux gliaux ont été observées au cours de cancers colorectaux. Dans ce contexte, il a été montré une perte d'expression du marqueur glial S100-β aussi bien dans la zone tumorale ainsi qu'en berge de la tumeur, dans une zone macroscopiquement saine (Neunlist *et al*., 2007).

I.1.4.2. Autres pathologies digestives

De nombreuses études ont montré une modification du réseau glial au cours de pathologies digestives diverses, avec une disparition ou une baisse d'expression des marqueurs gliaux en immunohistochimie. Cependant, l'implication fonctionnelle de ces

altérations n'a pas été caractérisée. L'ensemble des atteintes gliales et neuronales observées dans différentes pathologies est résumé dans le tableau I.

Pathologie	Neurones entériques	Cellules gliales entériques (CGE)
Maladie de Crohn	Modification du codage neurochimique Mort neuronale	↘ Expression GFAP dans la muqueuse non inflammée ↗ Expression CMH II
Rectocolite hémorragique	Modification du codage neurochimique Mort neuronale	↗ Expression GFAP dans la muqueuse non inflammée ↗ Expression CMH II
Entérocolite nécrosante	Mort neuronale	↘ Expression GFAP
Diabète	↘ Expression nNOS Mort neuronale	↘ Expression GFAP
Atrésie	Diminution de la densité neuronale	↘ Expression GFAP
Intestinal slow transit constipation	Modification du codage neurochimique	↘ Nombre CGE S100-β positives
Maladie de Chagas	Perte massive dans les régions dilatées (mégacôlon, mégaoesophage)	↘ expression S100-β préalable à la destruction neuronale
Cancer colorectal	-	↘ expression S100-β dans les berges et la tumeur

Tableau I : Altération des fonctions neuronales et gliales au cours des pathologies digestives (D'après Savidge et al, 2007).

Une diminution des marqueurs gliaux S100-β et GFAP a été observée au cours de pathologies de la motricité digestive comme la diverticulose colique ou la constipation (Bassotti *et al*., 2005; Bassotti *et al*., 2006). Une altération des CGE a également été reportée dans des pathologies digestives d'origine infectieuse. Ainsi, une étude récente a mis en évidence une diminution de l'expression de la protéine S100-β, chez les patients atteints de la maladie de Chagas (infection parasitaire causée par le *Trypanosoma cruzi*) et présentant un mégacôlon (da Silveira *et al*., 2009). Une autre étude récente a montré l'infection spécifique

des CGE par le JC virus, un polyomavirus qui infecte la population gliale du SNC. Cette étude a montré la présence de JC virus dans les CGE chez 70% des patients atteints de pseudo-obstruction intestinale chronique (POIC) (Selgrad *et al*., 2009).

I.2. De nouveaux médiateurs potentiellement secrétés par les cellules gliales entériques : les prostaglandines

Les prostaglandines (PGs) constituent une famille de molécules dérivant principalement d'un acide gras poly-insaturé à 20 carbones, l'acide arachidonique (AA). Celles-ci sont retrouvées dans la plupart des cellules des mammifères et sont considérées comme des hormones à actions systémiques ou locales (Dajani *et al*., 2003). Les PGs sont des composants métaboliques instables et ne sont donc pas stockés dans l'organisme. Leur présence dans les cellules et dans le milieu extracellulaire leur confère une variété importante d'actions physiologiques. Le rôle des PGs dans la régulation de la physiologie du tractus gastro-intestinal ou dans les pathologies digestives en particulier les MICI, n'est pas clairement élucidé. Ce chapitre fera une revue des différentes voies de synthèse des PGs, de leurs rôles, notamment en physiologie et en pathologie digestive. Une attention particulière sera portée aux effets d'un dérivé de la PGD_2 potentiellement secrétée par les CGE : la 15-déoxy-$\Delta^{12,14}$-Prostaglandine J_2 (15d-PGJ_2), celui-ci constituant un agoniste naturel du récepteur nucléaire PPARγ.

I.2.1. Voies des prostaglandines

Les phospholipases A_2 hydrolysent les phospholipides membranaires afin de libérer l'AA. Celle-ci sera métabolisée par les cyclooxygénases pour donner de la prostaglandine H_2. Cette prostaglandine servira ensuite de substrat aux prostaglandines synthases.

I.2.1.1. Les phospholipases A_2 et la production d'acide arachidonique

Les phospholipases A_2 (PLA_2) constituent une superfamille d'enzymes catalysant l'hydrolyse des phospholipides membranaires en position *sn-2* générant ainsi la libération d'un acide gras libre et d'un lysophospholipide (Figure 18) (Balsinde *et al*., 2002). Les phospholipides des cellules de mammifères étant particulièrement riches en AA en position *sn-2*, l'hydrolyse par les PLA_2 est la réaction principale associée à la libération de l'AA, précurseur majeur de la famille des eicosanoïdes dont les PGs font partie (Bonventre, 1992).

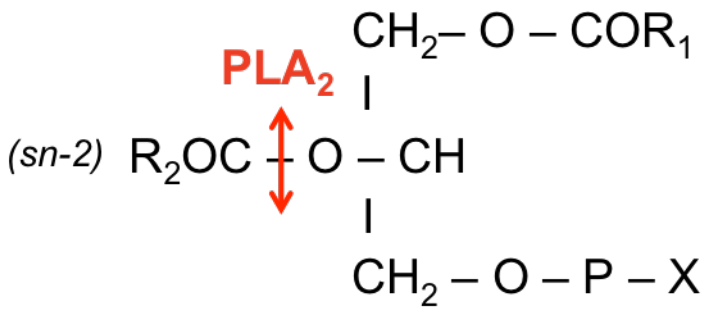


Figure 18 : Hydrolyse d'un phospholipide par la PLA_2

L'enzyme PLA_2 hydrolyse la liaison ester en position sn-2 du phospholipide. Cette hydrolyse génère la libération d'un lysophospholipide et d'un acide gras libre tel que l'acide arachidonique. Les radicaux R_1 et R_2 sont deux acides gras. Le groupement X du phospholipide est un composé polaire hydroxylé constitué par la choline, l'inositol, l'éthanolamine ou la sérine.

Les PLA_2 sont classées en 15 groupes distincts chez les Mammifères et sont réparties en 3 classes principales (Burke & Dennis, 2009).

Les phospholipases sécrétées ($sPLA_2$) sont des enzymes de petite taille (13-15 kDa). Il en existe au moins 10 formes différentes chez les Mammifères. Elles sont exprimées, chez la souris, chez le rat et chez l'homme dans les organes lymphoïdes et le tractus digestif. Leur activité enzymatique nécessite la présence d'ions Ca^{2+} et n'est pas spécifique de l'acide gras hydrolysé. Les $sPLA_2$ hydrolysent les phospholipides constituant la couche externe des membranes cellulaires, l'acide gras libéré pouvant être ensuite recapté par les cellules (Balsinde *et al.*, 1999).

Les phospholipases intracellulaire ($iPLA_2$) sont des enzymes de masse moléculaire supérieure aux $sPLA_2$ (85-90 kDa). Il en existe deux isoformes principales. Elles sont exprimées de façon ubiquitaire dans la plupart des cellules et des tissus chez la souris, le rat et l'homme. L'activité enzymatique des $iPLA_2$ est indépendante du calcium. Les $iPLA_2$ jouent un rôle dans le remodelage des phospholipides et dans les réparations membranaires. Comme pour les $sPLA_2$, elles ne sont pas spécifiques de l'acide gras porté en sn-2 (Balsinde *et al.*, 2002).

Les phospholipases cytosoliques ($cPLA_2$) existent sous trois isoformes. Elles sont de grande taille (85-110 kDa) et sont faiblement calcium-dépendantes. Elles sont exprimées de façon ubiquitaire chez l'homme, dans le cerveau, le poumon, les reins, le coeur, la rate, le

placenta et le pancréas (Hirabayashi & Shimizu, 2000). Bien que toutes les PLA_2 soient capables de libérer de l'AA, la $cPLA_2$ semble être l'enzyme préférentielle dans la libération d'AA, nécessaire à la synthèse des eicosanoïdes (prostaglandines et thromboxanes) (Burke & Dennis, 2009).

I.2.1.2. Biosynthèse des endoperoxydes et des prostaglandines primaires par les cyclooxygénases

Les cyclo-oxygénases (COX) sont les enzymes catalysant la première étape de la synthèse des eicosanoïdes (Figure 19). Elles portent également le nom de prostaglandine endoperoxyde H synthases. On en connaît deux isoformes majeures, COX-1 et COX-2. Une troisième isoforme, COX-3, a été identifiée en 2002 mais son rôle reste actuellement discuté (Botting, 2000).

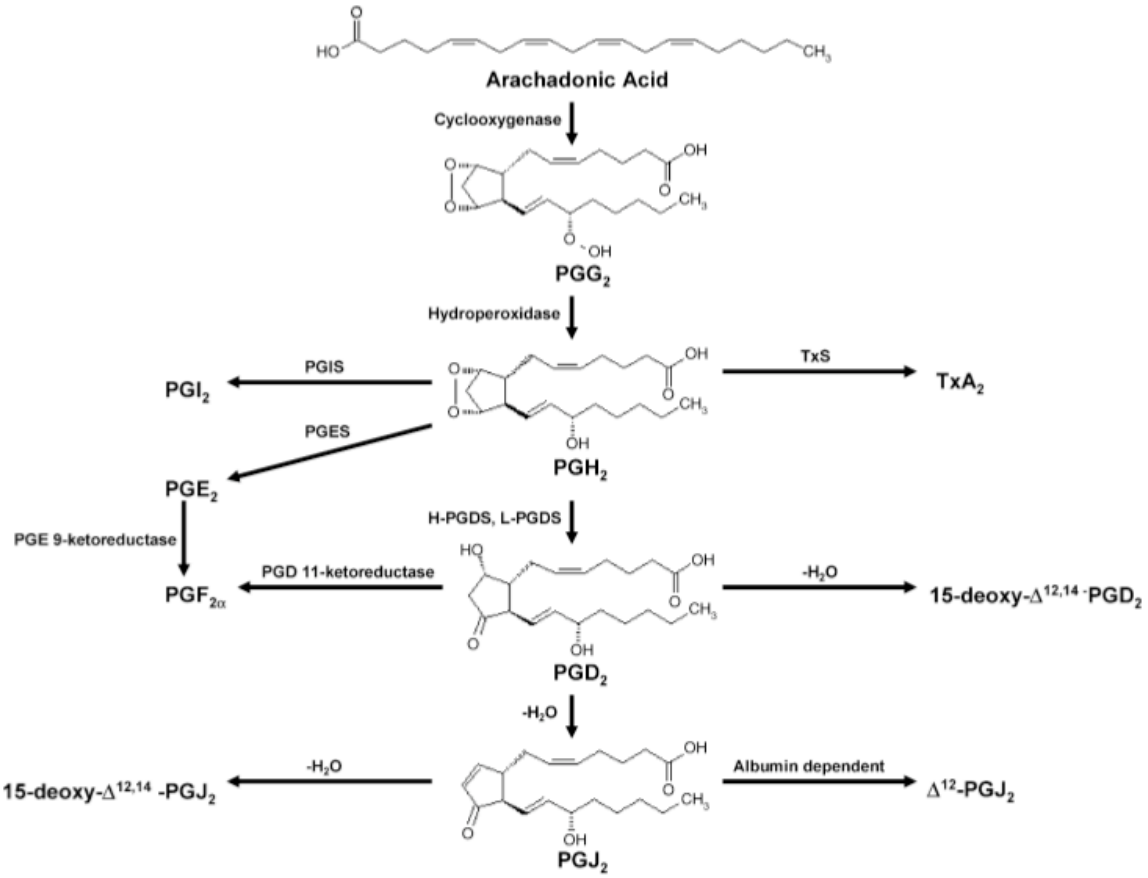


Figure 19 : Biosynthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique

COX-1 est une enzyme de 70 kDa, exprimée de façon constitutive dans la plupart des cellules. COX-1 est ainsi impliquée dans la synthèse basale des PGs et participe au maintien de l'homéostasie tissulaire. A l'intérieur de la cellule, il a été montré que COX-1, dans le cytoplasme, est enchâssée dans la membrane nucléaire et au réticulum endoplasmique par sa parie N-terminale (Smith *et al.*, 2000).

COX-2 est elle aussi une protéine de 72 kDa. A la différence de COX-1, COX-2 n'est pas exprimée dans tous les tissus. A l'exception du système nerveux central, où elle est exprimée de façon constitutive, son expression est fortement induite sous l'effet de stimuli, notamment lors de processus inflammatoires (Tanabe & Tohnai, 2002). Comme COX-1, sa localisation cellulaire est cytoplasmique et elle est liée essentiellement à la membrane du réticulum endoplasmique (Smith *et al.*, 2000).

Bien que codées par des gènes distincts, COX-1 et COX-2 possèdent une grande homologie de structure (Figure 20). Ces enzymes ont une activité catalytique double, à la fois cyclo-oxygénase et peroxydase. COX-1 et COX-2 existent sous forme d'homodimères. Chaque monomère est lié à une molécule d'hème ferrique (Garavito & DeWitt, 1999) et comporte quatre domaines : un domaine N-terminal EGF-like, un domaine MBD (membrane-binding domain) composé de quatre hélices amphiphiles, formant l'entrée du site actif cyclo-oxygénase, un domaine catalytique double, comprenant les sites cyclo-oxygénase (COX) et peroxydase (POX) et un site d'adressage au réticulum endoplasmique. L'AA est d'abord oxydé, au niveau du site COX, en prostaglandine G_2 (PGG_2), l'intermédiaire bicyclique. PGG_2 migre ensuite vers le site POX de l'enzyme, plus en surface de la protéine, où il est réduit en PGH_2. Bien que les sites COX des 2 enzymes diffèrent, leur affinité pour l'AA est similaire (Smith *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2006).

Figure 20 : Structure protéique des cyclo-oxygénases 1 et 2.

Les deux isoformes COX-1 et COX-2 présentent des homologies de structure tel qu'un domaine de liaison à l'EGF, un domaine MDB et un double site catalytique combinant les activités COX et POX. La partie N-

terminale possède un signal de liaison au réticulum endoplasmique (PTEL ou STEL) (D'après Murakami & Kudo, 2004).

Ainsi, après libération à partir des phospholipides membranaires sous l'action de la PLA_2, l'AA est transformé en PGG_2 puis en PGH_2 par les activités cyclooxygénase et peroxydase des COX-1 et COX-2. La PGH_2 est une molécule peu stable. Elle subira rapidement des catalyses enzymatiques, donnant naissance à une série de molécules actives, notamment la prostaglandine D_2 (PGD_2).

I.2.1.3. Les prostaglandines E synthases

Les prostaglandines E synthases (PGES) sont les enzymes catalysant la transformation de la PGH_2 en prostaglandine E_2 (PGE_2). A ce jour, trois isoformes des PGES ont été identifiées (Figure 21), 2 microsomales, 1 cytosolique.

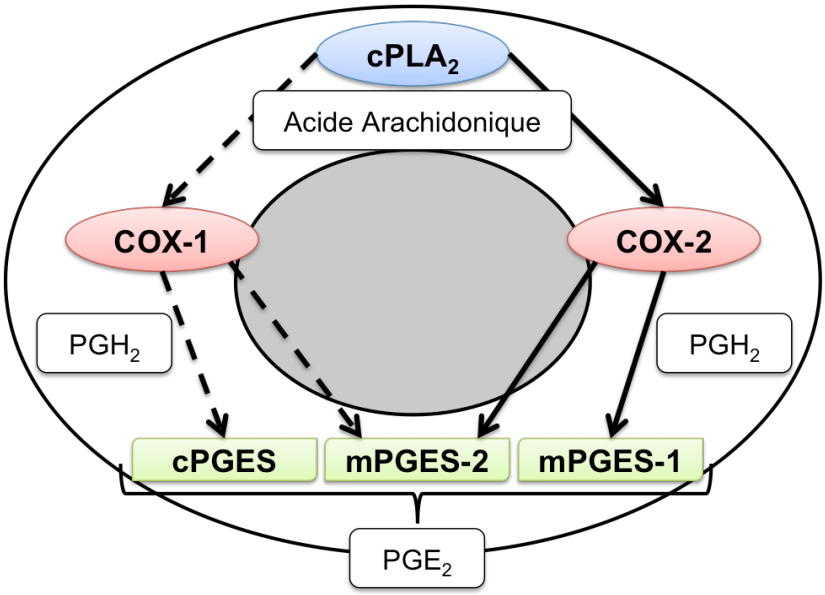


Figure 21 : Biosynthèse des prostaglandines E_2 à partir des prostaglandines E synthases.
Le substrat PGH_2, issue de la transformation de l'acide arachidonique par la $cPLA_2$ et les COX, est utilisé par les prostaglandines E synthases. Il en résulte la formation de prostaglandine E_2 (D'après Hara et al, 2010).

I.2.1.3.1. Prostaglandine E synthase-1 microsomale

La prostaglandine E synthase-1 microsomale (mPGES-1) convertit spécifiquement la PGH_2 en PGE_2 (Jakobsson et al., 1999). La mPGES-1 est une protéine de 16 kDa localisée

sur la membrane du réticulum endoplasmique. Son activité enzymatique requiert la présence du GSH (Murakami et al., 2000; Tanioka et al., 2000). Contrairement aux autres PGES, la mPGES-1 est inductible par des stimuli inflammatoires. Suite à l'administration de lipopolysaccharides (LPS), il a été montré une augmentation de l'expression de l'enzyme dans différents tissus, chez le rat mais également *in vitro* sur des lignées cellulaires épithéliales humaines et endothéliales de rat (Thoren & Jakobsson, 2000; Mancini et al., 2001; Yamagata et al., 2001). La co-localisation de mPGES-1 avec COX-2 au niveau membranaire permet un couplage direct de ces deux enzymes et favorise ainsi le transfert du substrat PGH_2 d'une enzyme vers l'autre et la production de PGE_2 (Murakami et al., 2000).

La génération de modèle de souris invalidées pour le gène mPGES-1 a permis de caractériser son rôle (Murakami et al., 2000). Le rôle de mPGES-1 et notamment de la PGE_2 dans l'homéostasie du TD, sera détaillé dans les chapitres suivants. Dans des conditions pathologiques, plusieurs études ont suggéré que la mPGES-1 pourrait jouer un rôle essentiel dans la production de PGE_2 (Mancini et al., 2001; Yamagata et al., 2001).

I.2.1.3.2. Prostaglandine E synthase-2 microsomale

De la même manière que la mPGES-1, la prostaglandine E synthase microsomale 2 (mPGES-2) convertit spécifiquement la PGH_2 en PGE_2. La mPGES-2 est une protéine de 41 kDa, structuralement différente de la mPGES-1 et ne nécessite pas la présence du GSH pour son activité catalytique (Tanikawa et al., 2002). Après synthèse, la mPGES-2 est d'abord exprimée de façon membranaire au niveau de l'appareil de Golgi. Après clivage protéolytique de son domaine N-terminal hydrophobe, elle est libérée dans le cytosol sous forme mature (Murakami et al., 2003). Son expression reste néanmoins essentiellement péri-nucléaire, associée aussi bien avec COX-1 que COX-2 pour produire la PGE_2. Ainsi, la mPGES-2 est fonctionnelle aussi bien sous sa forme cytosolique que membranaire (Murakami et al., 2003). Elle est majoritairement présente dans le cerveau, le cœur, le muscle squelettique, les reins et le foie (Tanikawa et al., 2002). L'expression de la mPGES-2 est constitutive et n'augmente pas au cours de l'inflammation ou en cas de lésions tissulaires. Cependant, une expression protéique importante de la mPGES-2 est retrouvée dans les cancers colorectaux humains tout comme celle de la mPGES-1 (Murakami et al., 2003).

Son rôle physiologique n'a néanmoins pas clairement été établi. En effet, le modèle de souris invalidée pour la mPGES-2 ne présente pas de modification phénotypique ni d'altération de la production de PGE_2. Ces résultats suggèrent que la mPGES-2 serait peu impliquée dans la production de PGE_2, dans les conditions testées jusqu'à présent (Jania et al., 2009).

I.2.1.3.3. Prostaglandine E synthase cytosolique

La prostaglandine E synthase cytosolique (cPGES) convertit également la PGH_2 en PGE_2. La cPGES est une protéine de 23 kDa, localisée dans le cytoplasme, présente une activité dépendante du GSH (Tanioka et al., 2000). La cPGES est directement associée et phosphorylée par la protéine kinase CK2 (Casein Kinase II) qui permet ainsi l'augmentation de l'activité de l'enzyme et la production de PGE_2. La formation d'un complexe entre la cPGES, la protéine CK2 et également la protéine Hsp90 (Heat shock protein 90) est essentielle à l'activité de la cPGES dans la cellule. La cPGES est exprimée de manière ubiquitaire dans de nombreux tissus et cellules (Kobayashi et al., 2004). Son expression est constitutive et ne semble pas être affectée par des stimuli inflammatoires bien que quelques exceptions aient été décrites. La localisation cytoplasmique de cPGES permet un couplage préférentiel avec COX-1 au niveau du réticulum endoplasmique.

Le couplage fonctionnel entre cPGES et COX-1 suggère que l'activité de cette enzyme est dépendante de celle de COX-1. Afin de caractériser le rôle de cPGES *in vivo*, des souris ont été invalidées pour ce gène. Cependant, la génération de ce modèle n'a pas permis d'élucider le rôle de cPGES. En effet, tandis que les souris hétérozygotes ne présentaient pas de problèmes particuliers, les souris homozygotes n'étaient pas viables après la parturition. Ces dernières présentaient un retard de croissance, un défaut de développement du foie ainsi qu'un retard dans la maturation de la peau (Lovgren et al., 2007; Nakatani et al., 2007). Des nouvelles études *in vivo*, utilisant l'invalidation de la cPGES de manière tissue spécifique, seront nécessaires pour établir le rôle fonctionnel de cette enzyme.

I.2.1.4. Les prostaglandines D synthases

Les prostaglandines D synthases (PGDS) sont les enzymes catalysant la transformation de la PGH_2 en prostaglandine D_2 (PGD_2). A ce jour, deux isoformes ont été identifiées (Tableau II).

Enzymes	PGDS Lipocaline	PGDS Hématopoiëtique
Classe	Isomérase	Isomérase
Rôles	$PGH_2 \rightarrow PGD_2$ Transport de molécules lipophiles	$PGH_2 \rightarrow PGD_2$
Taille (kDa)	26	26
Localisation cellulaire	Cytosolique et Extracellulaire	Cytosolique
Type cellulaire	Cellules du SNC, cellules de Leydig et de l'épididyme	Cellules immunitaires (TH2…), entérocytes
Co-enzyme	Glutathion indépendante	Glutathion dépendante

Tableau II : Comparatif des deux prostaglandines D synthases humaines, forme lipocaline et forme hématopiëtique.

I.2.1.4.1. Prostaglandine D synthase hématopoïétique

La prostaglandine D synthase de forme hématopoïétique (H-PGDS) catalyse la conversion de la PGH_2 en PGD_2 (Kanaoka *et al*., 1997). Les gènes codant pour la H-PGDS chez l'homme et la souris ont été clonés et leur localisation chromosomique a été identifiée respectivement sur le chromosome 4q21-22 et 3D-E. Le gène de la H-PGDS chez l'homme mesure 41 Kb et 28 Kb chez la souris (Kanaoka *et al*., 1997). La structure génomique du gène de la H-PGDS est fortement conservé chez les vertébrés et est similaire à la structure des gènes de la famille des GST.

Le gène code pour une protéine cytosolique, composée de 199 acides-aminés (26 kDa) dépourvue de peptide signal ou de site de glycosylation (Urade *et al*., 1990). La H-PGDS a besoin du GSH pour son activité enzymatique. Les activateurs enzymatiques de la H-PGDS sont des cations divalents comme le Ca^{2+} ou le Mg^{2+} (Matsushita *et al*., 1998a;

Matsushita *et al*., 1998b; Thomson *et al*., 1998). Ses inhibiteurs enzymatiques sont le bleu de Cibachrome et l'antagoniste HQL-79.

La H-PGDS est largement distribuée dans les tissus périphériques et est localisée dans les cellules présentatrices d'antigènes, les mastocytes et les lymphocytes Th2 (Tanaka *et al*., 2000). La H-PGDS est également retrouvée dans les entérocytes. De manière intéressante, il a été montré que des souris $APC^{-/-}$ invalidées également pour la H-PGDS, développaient plus rapidement des lésions tumorales, indiquant le rôle important de cette enzyme dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Park *et al*., 2007)

I.2.1.4.2. Prostaglandine D synthase lipocaline

La prostaglandine D synthase de forme lipocaline (Lipocalin-type ou L-PGDS) est un membre de la famille de gènes des lipocalines (lipophilic ligand-carrier protein) (Urade & Hayaishi, 2000b). Cette famille est composée d'une variété de protéines sécrétées, comme la β-lactoglubuline ou la protéine plasmatique de liaison au rétinol, qui sont impliquées dans la liaison et le transport des petites molécules hydrophobes (Kumasaka *et al*., 2009). La L-PGDS est le premier membre de cette famille à être reconnu comme étant une enzyme et une protéine fortement glycosylée (Beuckmann *et al*., 1999a; Diamandis *et al*., 1999; Mase *et al*., 1999; Baeker *et al*., 2002).

L'ADNc de la L-PGDS a été isolé à partir de plusieurs espèces de mammifères, dont l'homme et la souris. Le gène est localisé sur le chromosome 2B-C1 chez la souris et le chromosome 9q34.2-34.3 chez l'homme. Chez l'homme, le gène de la L-PGDS s'étend sur 4,3 Kb et code pour un seul ARNm composé de 7 exons (Urade & Eguchi, 2002).

Le gène code pour une protéine composée de 185 à 194 acides-aminés mesurant de 20 à 31 kDa. La L-PGDS est une protéine monomérique de 26 kDa. Toutefois, La protéine possède deux sites de N-glycosylation. Le poids de la L-PGDS varie alors de 20 à 31 kDa suivant la taille du radical glycosyl fixé (Grunewald *et al*., 1999; Manya *et al*., 2000). La L-PGDS est composée principalement de feuillets β. Elle est constituée par un feuillet β formant un tonneau, de deux séries de feuillets β anti-parallèle et d'une hélice α (Tanaka *et al*., 1997). La cystéine 65, responsable de l'activité enzymatique, est localisée au sein d'une

poche hydrophobe formée par les feuillets β (Figures 22). Cette poche hydrophobe permet également de lier et transporter les rétinoïdes, la biliverdine, la bilirubine, et des hormones thyroïdiennes (Toh *et al*., 1996; Tanaka *et al*., 1997; Beuckmann *et al*., 1999a). La L-PGDS peut subit une phosphorylation (Angenstein *et al*., 1999) ou être oxydée au niveau d'une cystéine (Baeker *et al*., 2002). Ces modifications post-traductionnelles diminuent l'activité enzymatique de la protéine.

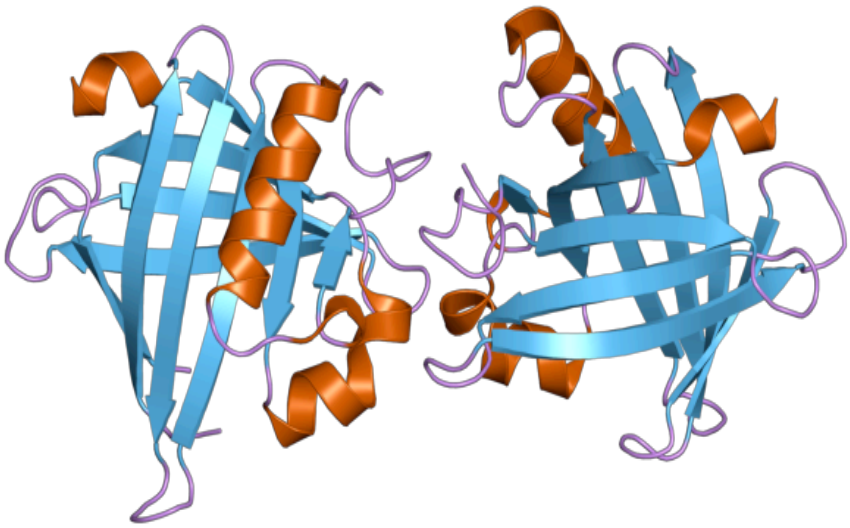


Figure 22 : Structure tridimensionnelle de la L-PGDS

Les feuillets β forme un tonneau au milieu duquel se trouve le site catalytique de la L-PGDS. Ce site est en face de l'ouverture de la poche catalytique. (Bleu : feuillet β ; orange : hélice α) *(D'après Kumasaka et al, 2005).*

L'activité enzymatique de la L-PGDS nécessite la présence de composés thiols tels que le β-mercaptoéthanol, le dithiothreitol (DTT) ou le GSH. En revanche, la L-PGDS peut être inactivée par la modification chimique du groupement thiol localisée sur la cystéine 65, notamment avec le iodoacétamide ou le N-éthylmaléimide. L'enzyme est également inhibée par des composés inorganiques quadrivalents comme le tétrachlorure de sélénium et des ligands hydrophobes tels que des acides gras (Tanaka *et al*., 1997; Beuckmann *et al*., 1999b; Inui *et al*., 1999).

La L-PGDS présente une localisation variée dans les organismes mammifères. Elle est retrouvée dans le SNC, les organes génitaux mâles, le cœur, et dans différentes parties du TD telles que l'estomac ou le côlon (Urade, 1985; Eguchi *et al*., 1997; Mase *et al*., 1999; Hokari *et al*., 2009; Hokari *et al*., 2011). La L-PGDS est aussi secrétée dans de nombreux

fluides tels que, le liquide céphalo-rachidien, le plasma séminal ou encore la bile (Beuckmann *et al*., 1999a; Diamandis *et al*., 1999; Mase *et al*., 1999; Baeker *et al*., 2002).

Outre son rôle de transporteur lipophillique, d'autres fonctions de la L-PGDS ont été déterminées au travers de plusieurs études portant principalement sur le SNC. Des souris invalidées pour le gène de la L-PGDS, présentent une croissance et un développement normal. Cependant, des altérations de la nociception, avec une perte de la sensibilité à la douleur et des perturbations du cycle du sommeil ont été observées (Eguchi *et al*., 1999). A l'inverse, des souris transgéniques, surexprimant la L-PGDS, montrent une altération du sommeil profond et une sensibilité allergique (Pinzar *et al*., 2000; Fujitani *et al*., 2002). D'autres études ont permis d'étudier le rôle central de la L-PGDS dans le cœur. En effet, la production de PGD_2 par la L-PGDS permet de protéger les rats d'une ischémie cardiaque (Tokudome *et al,* 2009). De même, une hypoxie cardiaque, provoqué chez des souris, entraine une augmentation de l'expression de la L-PGDS (Han *et al*., 2009). La L-PGDS intervient dans de nombreux processus et notamment à travers la production de PGD_2. C'est le cas dans les chondrocytes et les adipocytes (Zhu *et al*., 2010; Chowdhury *et al*., 2011). De manière intéressante, il a été montré que la L-PGDS peut être induite, notamment grâce à des stimuli inflammatoires. Au sein du TD, il a été montré une augmentation de l'expression de la L-PGDS lors d'une infection par *Helicobacter pylori*. De même, lors d'une colite inflammatoire induite au DSS chez des souris, il a été observé une augmentation de l'expression transcriptionnelle de la L-PGDS. De plus, l'augmentation de l'expression de la L-PGDS dans ce contexte était associée à une exacerbation de la colite chez les souris (Hokari *et al*., 2009).

I.2.1.5. Production non-enzymatique des dérivés de la PGD_2

La PGD_2 subit une série de réactions non-enzymatiques donnant lieu à la formation de plusieurs sortes de dérivés, notamment les PGs de la série J_2 (Figure 23) (Scher & Pillinger, 2005).

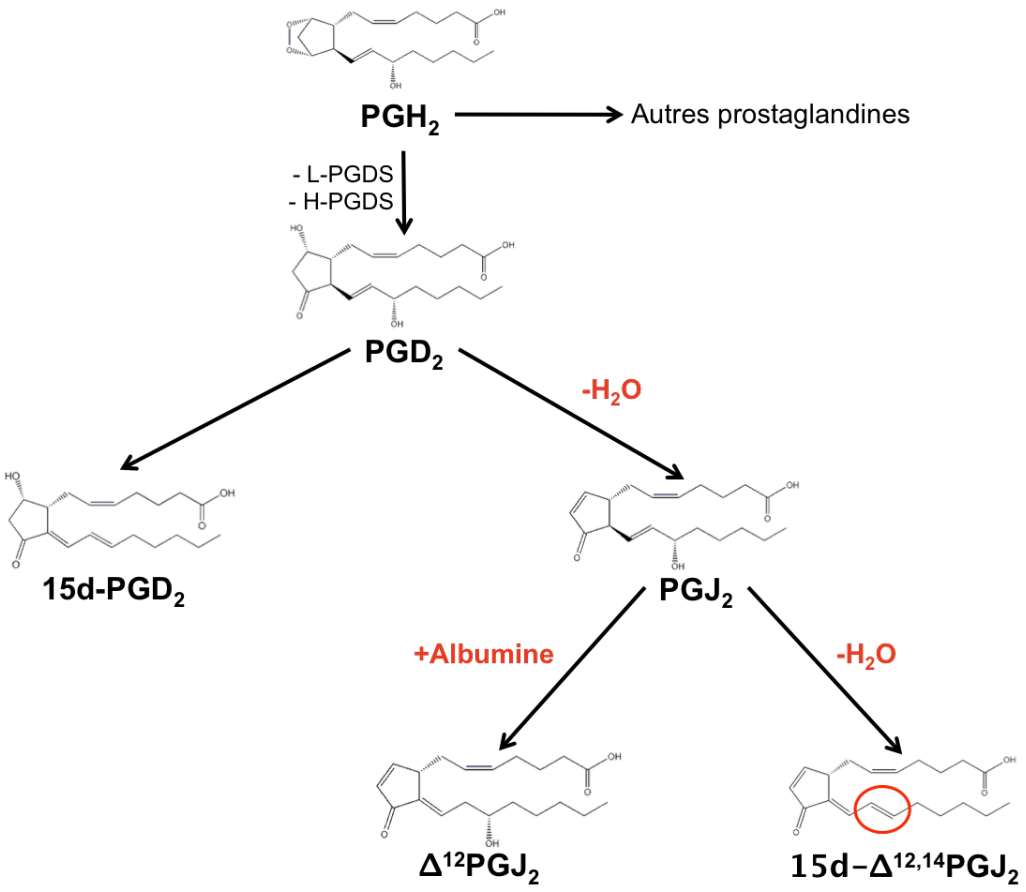


Figure 23 : Synthèse des dérivés de la PGD_2

(D'après Scher & Pillinger, 2005)

La prostaglandine J_2 (PGJ_2) est produite par la déshydratation de la PGD_2. En présence d'albumine, la PGJ_2 subit une nouvelle transformation en Δ^{12}-PGJ_2. En revanche, en absence d'albumine, la PGJ_2 subit une déshydratation et la formation d'une double liaison en position 13-14. Cette réaction aboutit à la formation de la 15d-PGJ_2 (Kikawa *et al*., 1984; Shibata *et al*., 2002).

La 15d-PGJ_2 possède des propriétés biologiques particulières dues à la présence de groupements électrophiles, sur son cycle pentenone, qui vont réagir avec des composés nucléophiles cellulaires comme les groupements thiols des cystéines (Scher & Pillinger, 2005). Ainsi, la 15d-PGJ_2 est capable d'inhiber ou activer des protéines en interagissant avec leur structure tertiaire.

I.2.2. Rôles des prostaglandines E_2 et D_2 dans le tube digestif

I.2.2.1. Rôles de la prostaglandine E_2 dans l'homéostasie du tube digestif

La PGE_2 est issue de la transformation de la PGH_2 par les enzymes PGES. Cette PG peut être produite de façon ubiquitaire. La PGE_2 agit après fixation sur des récepteurs membranaires. Il existe quatre récepteurs de la PGE_2 (EP 1-4), codés par des gènes distincts. Ces récepteurs des prostanoïdes font partie d'une famille de récepteurs de type rhodopsine, couplés par leur extrémité intracellulaire à de petites protéines G. Bien que chacun des récepteurs présente une forte affinité pour la PGE_2, des fixations croisées des différentes PGs sont possibles (Breyer *et al*., 2001). La PGE_2 est impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques tels que les processus d'ovulation et de fertilisation, de résorption osseuse, de sécrétion duodénale de bicarbonate mais également dans l'hypertension ou l'augmentation de la carcinogenèse colique (Ushikubi *et al*., 2000). Bien que la PGE_2 soit impliquée dans de nombreux processus, nous présenterons son rôle physiopahologique dans le TD.

La PGE_2 est classiquement décrite comme étant une PG pro-inflammatoire. De façon cohérente avec cette hypothèse, des concentrations importantes de PGE_2 ont été mesurées au niveau des zones inflammatoires de patients atteints de maladie de Crohn (MC) ou de recto-colite hémorragique (RCH). Ces concentrations étaient très corrélées à l'activité de la maladie (Sharon *et al*., 1978).

Il a été montré dans un modèle de colite induite au trinitrobenzène (TNBS) chez la souris que la production de PGE_2 exacerbait le processus inflammatoire en augmentant la production des interleukines pro-inflammatoires IL-23 et IL-17 (Sheibanie *et al*., 2007). Par ailleurs, PGE_2 jouerait un rôle prédominant dans le développement des cancers colorectaux en activant ainsi plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération, l'angiogenèse et dans la progression tumorale (Wang & Dubois, 2006; Greenhough *et al*., 2009).

Parallèlement à ce rôle délétère, pro-inflammatoire et pro-tumorale, plusieurs études ont montré, à l'inverse, que la PGE_2 pouvait jouer un rôle anti-inflammatoire. Une première

étude a montré que l'utilisation des inhibiteurs de COX, utilisés pour diminuer la quantité de PGE_2, pouvait, au contraire, favoriser ou aggraver la maladie (Bjarnason *et al*., 1993).

D'autres études ont montré que la PGE_2 était nécessaire pour supprimer les symptômes d'une colite et pour protéger l'épithélium contre les lésions induites par l'inflammation. Des souris invalidées pour COX-2 ou pour un récepteur de la PGE_2, le récepteur EP4 (PGE_2 receptor 4), ont été décrites pour être plus sensibles au développement d'une colite expérimentale. A l'inverse, l'utilisation d'agoniste du récepteur EP4 améliorait la colite chez les souris sauvages (Morteau *et al*., 2000; Kabashima *et al*., 2002). De la même manière, l'invalidation du gène mPGES-1 chez des souris soumises à une colite induite par du DSS 5%, entraîne une exacerbation des symptômes de la colite. Dans ce modèle, la diminution de production de PGE_2 associée à une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires a été observée. De plus, l'absence de mPGES-1, entraînait une perte des CEI ainsi que des abcès cryptiques. Ces résultats suggèrent que la PGE_2 produite par la mPGES-1, contribuerait à la défense de la muqueuse au cours d'une colite et modulerait négativement les lésions coliques aigües. Une autre étude a mis en évidence une diminution de la production de PGE_2 par la mPGES-1 associée à COX-1, dans l'estomac de souris invalidées pour la mPGES-1. Ces résultats suggéraient que la production de PGE_2 contribuerait également à la protection de la muqueuse gastrique (Boulet *et al*., 2004).

I.2.2.2. Rôles de la prostaglandine D_2 dans l'homéostasie du tube digestif

La PGD_2 est issue de la transformation de la PGH_2 par les enzymes PGDS. Cette PG peut être produite de façon ubiquitaire. La PGD_2 agit à travers sa fixation sur deux récepteurs membranaires (DP1 et DP2). Le récepteur DP1 est un récepteur transmembranaire couplé aux protéines Gs (Boie *et al*., 1995). Il est localisé au niveau des muscles lisses bronchiques et vasculaires et également au niveau des plaquettes, des cellules épithéliales, des fibroblastes et des cellules dendritiques (Pettipher & Hansel, 2008). Le récepteur DP2 est également un récepteur transmembranaire couplé aux petites protéines Gi et exprimé par les lymphocytes Th2, les basophiles, les éosinophiles et les monocytes (Pettipher & Hansel, 2008). La PGD_2 possède de nombreux rôles physiologiques dans la régulation du sommeil, dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, dans la relaxation des contractions des muscles lisses, dans la bronchoconstriction et dans l'attraction des cellules immunitaires telles que les lymphocytes

Th2 (Kanaoka & Urade, 2003). Dans ce manuscrit, nous développerons particulièrement le rôle physiopathologique de la PGD_2 dans le TD.

Plusieurs études sur des colites expérimentales suggèrent que la PGD_2 joue un rôle important dans la résolution de l'inflammation et dans le maintien des altérations des colonocytes et des fonctions de la BEI (Vong *et al*., 2010).

Tout d'abord, dans un modèle de colite induite par le TNBS chez le rat, Ajuebor *et al* a décrit le rôle anti-inflammatoire de la PGD_2 produite par la H-PGDS. Il a été ainsi montré une rapide augmentation de la PGD_2 suite à l'induction de la colite, associée à une diminution de l'infiltrat granulocytaire dans la muqueuse colique. Ces effets étaient probablement médiés par l'activation des récepteurs DP (Ajuebor *et al*., 2000). De plus, une étude sur des patients, atteints de RCH, en rémission depuis 5 ans au moins, a permis de mettre en évidence une concentration de PGD_2 colique importante. Cette étude suggère que la PGD_2, dans le cas de la RCH, constitue un médiateur pro-résolutif de l'inflammation (Vong *et al*., 2010). Cet effet a été confirmé par une étude réalisée dans la muqueuse gastrique de rat. Lors d'une gastrite induite par *Helicobacter pylori*, l'expression de la protéine L-PGDS est augmentée dans les fibroblastes et dans la muqueuse gastrique ainsi que la production de PGD_2. Ces résultats montrent que la PGD_2 pourrait être associée à un rôle protecteur sur la muqueuse gastrique lors de l'inflammation induite par l'infection (Hokari *et al*., 2009).

D'autres études suggèrent, à l'inverse, un rôle pro-inflammatoire de la PGD_2. Lors d'une colite induite par le TNBS chez le rat, il a été suggéré que l'activité de COX-2 et la production de PGD_2 associée, participerait à la sécrétion anormale de chlore et augmenterait la susceptibilité de la BEI aux infections (Zamuner *et al*., 2003). De la même manière, la production prolongée de PGD_2 après la résolution de la colite favoriserait le processus de tumorigénèse colique (Zamuner *et al*., 2005). Cette hypothèse est également suggérée dans l'étude de Vong *et al* ou la production de PGD_2 dans la muqueuse pourrait à long terme favoriser l'apparition d'un cancer colorectal (Vong *et al*., 2010). Une autre étude décrit le rôle de la L-PGDS et de la production de PGD_2 dans un modèle murin de colite au DSS. Il a été montré que la L-PGDS était surexprimée et jouait un rôle pro-inflammatoire au cours de la colite. Cependant, un modèle de souris invalidées pour la L-PGDS soumis au DSS, ne présentait pas d'amélioration ni d'aggravation de la colite par rapport aux témoins (Hokari *et*

al., 2011). De façon similaire, il a été observé le même phénomène chez des patients atteints de RCH (Hokari *et al*., 2011).

I.2.3. Dérivé de la PGD_2 : la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$-Prostaglandine J_2

I.2.3.1. Voies de signalisation connues de la 15d-PGJ_2

I.2.3.1.1. Récepteurs membranaires de la 15d-PGJ_2

La 15d-PGJ_2, comme les autres PGs, agit à proximité de son site de production, de façon autocrine et/ou paracrine. Contrairement aux autres PG, aucun récepteur spécifique de la 15d-PGJ_2 n'a été identifié. Certaines études ont montré que la 15d-PGJ_2 pouvait se lier au récepteur DP2 et induire une augmentation du taux de calcium intracellulaire (Monneret *et al*., 2002; Monneret *et al*., 2003). Néanmoins, l'activité de la 15d-PGJ_2 résulterait principalement des liaisons covalentes qu'elle formerait avec des cibles intracellulaires après son passage au travers de la membrane plasmique soit par diffusion soit par l'utilisation de transporteurs membranaires tels que le transporteur aux PG (PGT) ou le transporteur MOAT (Mediated Organic Anion Transport) (Narumiya & Fukushima, 1986; Scher & Pillinger, 2005).

I.2.3.1.2. Cibles de la 15d-PGJ_2

La 15d-PGJ_2 peut réagir avec une large gamme de protéines, notamment des facteurs de transcriptions (Straus & Glass, 2001) et peut aussi interagir avec d'autres protéines et moduler différentes voies de signalisation telles que la voie NFκB (Nuclear factor κB), AP-1 (Activator protein1), STAT (Signal transducers and activators of transcription), p53, HIF-1 (Hypoxia inducible factor 1), PPARγ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ) et la voie Nrf2 (NF-E2 related factor). La 15d-PGJ_2 peut avoir un impact différent en fonction des voies de signalisation ciblées (Kim & Surh, 2006).

La 15d-PGJ_2 peut interagir directement avec AP-1 en se fixant à la protéine c-Jun (Figure 24). Cette liaison a pour effet de diminuer l'activité transcriptionnelle de AP-1 et sa fixation sur l'ADN. En conséquence, cette inhibition favorise un effet anti-inflammatoire. De

la même manière, la 15d-PGJ_2 se fixe à la sous-unité IKKβ ou les sous-unités du complexe NFκB pour en diminuer son activité (Figure 24). La voie STAT peut également être régulée par la 15d-PGJ_2. Il en résulte une diminution de l'activité transcriptionnelle et de la fixation de STAT sur l'ADN. La 15d-PGJ_2 induit un effet anti-inflammatoire en inhibant la voie STAT. Il en est de même pour le facteur HIF-1. En ce qui concerne p53, la 15d-PGJ_2 peut se lier de façon covalente et augmenter l'expression, l'accumulation nucléaire, la phosphorylation ainsi que la fixation sur l'ADN de la protéine p53, conduisant à une induction l'apoptose (Kim & Surh, 2006).

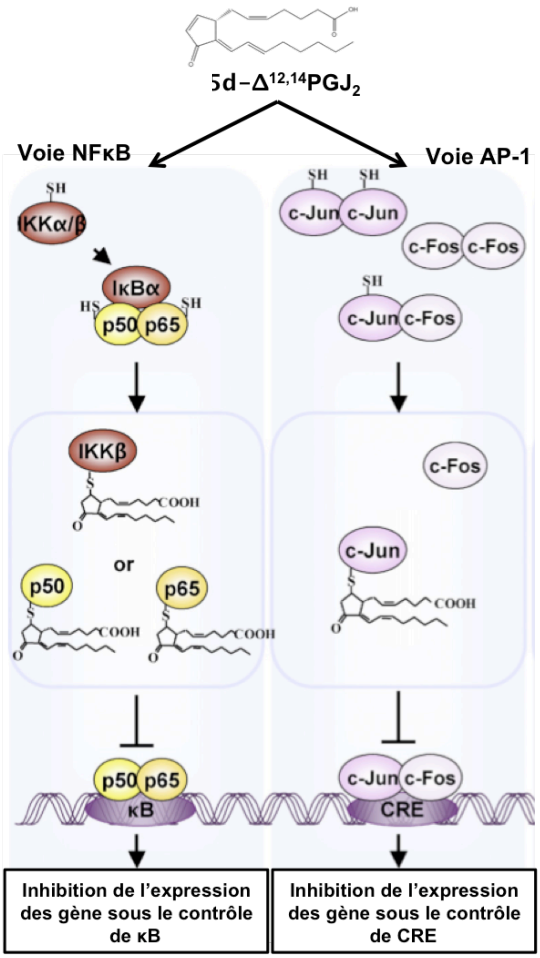


Figure 24 : Mécanismes de modulation des voies NFκB et AP-1 par la 15d-PGJ_2

Pour la voie NFκB, la 15d-PGJ_2 se fixe sur la sous-unité IKKβ, p50 ou p65 afin d'empêcher la formation du complexe p50/p65, nécessaire à la transcription des gènes dépendants de NFκB. Pour la voie AP-1, la 15d-PGJ_2 se fixe sur c-Jun. La formation du complexe AP-1 (c-Jun/c-Fos) est inhibée ainsi que la transcription des gènes dépendants de AP-1 (D'après Kim & Surh, 2006).

Les deux cibles intracellulaires principales de la 15d-PGJ_2 sont le récepteur nucléaire PPARγ et le facteur de transcription Nrf2. Le récepteur nucléaire PPARγ découvert au début

des années 90, était jusqu'alors surtout connu pour son rôle dans le métabolisme lipidique et la différenciation des adipocytes (Alarcon de la Lastra *et al*., 2004). Une grande partie des fonctions de la 15d-PGJ_2 serait médiée par l'activation de PPARγ (Cuzzocrea *et al*., 2003; Munoz *et al*., 2005; Yuan *et al*., 2005; Kim & Surh, 2006) (Figure 25). Il est connu que la 15d-PGJ_2 peut se lier de façon covalente à la cystéine 285 de la protéine PPARγ. La 15d-PGJ_2 co-active PPARγ qui va subir une translocation nucléaire et se fixer sur l'élément de réponse PPRE (PPAR response element) (Kim & Surh, 2006).

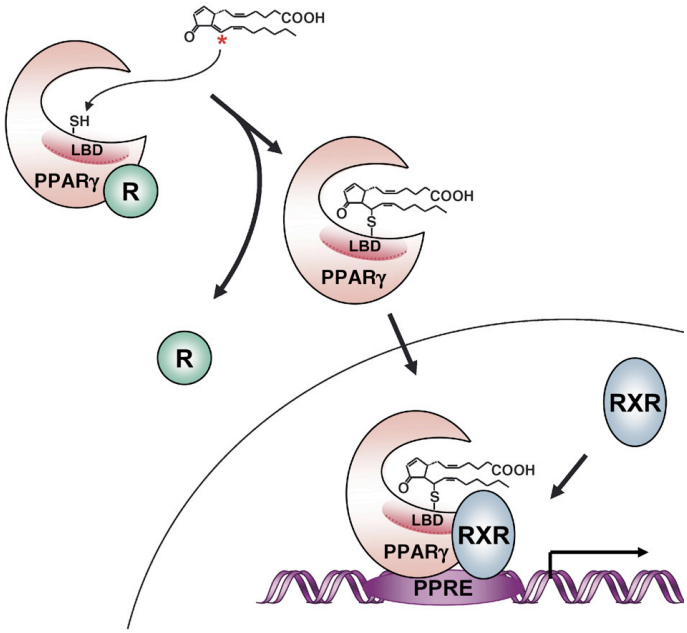


Figure 25 : Schéma simplifié du mécanisme d'activation de PPARγ par la 15d-PGJ_2

La fixation de la 15d-PGJ_2 sur la cystéine 285, du domaine de liaison au ligand (LBD) de PPARγ, entraîne une libération du co-répresseur (R). La translocation de PPARγ précède sa dimérisation avec le récepteur nucléaire RXR (retinoid X receptor). L'hétérodimère ainsi formé se fixe sur l'élément de réponse PPRE afin d'activer l'expression des gènes sous son contrôle (D'après Kim et Surh 2006).

L'autre cible intracellulaire importante de la 15d-PGJ_2 est le facteur de transcription Nrf2 (NF-E2 related protein 2). Découvert en 1994, Nrf2 est connu pour son rôle dans l'activation des gènes anti-oxydants (Moi *et al*., 1994). L'activité de Nrf2 est régulée en partie par la protéine inhibitrice Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), protéine cytoplasmique avec un domaine C-terminal " Kelch " de liaison avec le domaine N-terminal " Neh2 "de Nrf2 permettant de maintenir le facteur de transcription dans le cytoplasme et d'induire sa dégradation par le protéasome (Itoh *et al*., 1999). L'activité transcriptionnelle de Nrf2 peut être directement augmentée par différentes molécules dérivées des prostaglandines, comme la 15d-PGJ_2. Dans ce contexte, la 15d-PGJ_2 se lit de façon covalente à Keap1 afin de

libérer Nrf2 et permettre sa translocation dans le noyau (Itoh *et al*., 2004; Levonen *et al*., 2004) (Figure 26).

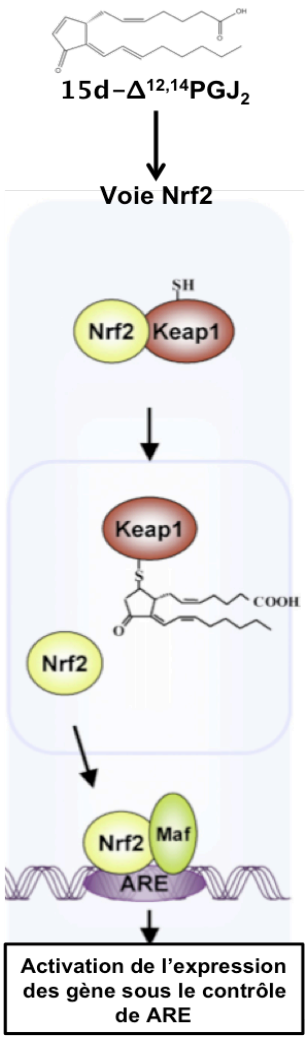


Figure 26 : Schéma simplifié du mécanisme d'activation de Nrf2 par la 15d-PGJ$_2$

La fixation de la 15d-PGJ$_2$ sur Keap 1 empêche sa fixation avec Nrf2. Par conséquent, Nrf2 n'est pas dégradé et se fixe sur l'élément de réponse ARE afin d'activer l'expression des gènes sous son contrôle (D'après Kim et Surh 2006).

I.2.4. La voie de signalisation PPARγ

I.2.4.1. Le gène codant pour PPARγ

Les PPARs appartiennent à la super-famille des récepteurs nucléaires. Ils modulent la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines,

l'homéostasie du glucose, la prolifération cellulaire et la différenciation. Trois isoformes de PPAR ont été identifiées : PPARα, PPARβ/δ et PPARγ (Berger & Moller, 2002)

Le gène PPARγ est localisé sur le chromosome 6 de la souris et le chromosome 3 chez l'homme (Sher *et al*., 1993; Greene *et al*., 1995). Le gène PPARγ contient 6 exons et s'étend sur une longueur de 125 Kb (Zhu *et al*., 1993; Fajas *et al*., 1997). Chez l'homme, l'ARNm peut subir un épissage alternatif générant 4 transcrits avec 4 promoteurs distincts : PPARγ1, PPARγ2, PPARγ3 et PPARγ4 (Fajas *et al*., 1997). PPARγ1 est l'isoforme qui prédomine largement dans le côlon. PPARγ2 n'est pas détecté dans la muqueuse colique (Gupta & Dubois, 2002). PPARγ3 est également présent dans le côlon.

I.2.4.2. La protéine PPARγ

La protéine PPARγ est caractérisée par 6 domaines fonctionnels notés de A à F (Figure 27). Le domaine A/B situé du côté N terminal possède un site de transactivation AF-1 (Activation Function 1), indépendant du ligand et responsable de la modulation de l'activité de PPARγ (Shao *et al*., 1998). La région C ou DBD (DNA Binding Domain), correspond au domaine de fixation du récepteur sur l'ADN. Ce domaine comporte deux régions en doigts de zinc comprenant chacune 4 cystéines. Le premier doigt de zinc possède une séquence appelée P-box permettant le contact spécifique avec les nucléotides de l'élément de réponse (Myers *et al*., 1997). La séquence du second doigt de zinc (D-box) est impliquée dans la dimérisation du récepteur avec ses partenaires RXR (Retinoid X Receptor). Le domaine D contient une séquence NLS (Nuclear Localisation Sequence) responsable de la translocation nucléaire de PPARγ. Ce domaine interagit avec des protéines coactivatrices ou des corépresseurs. Le domaine E/F ou LBD (Ligand Binding Domain) est le domaine de fixation du ligand. Il contient un site AF-2 (Activation Function 2). Il s'agit du site de transactivation du récepteur, dépendant du ligand et impliqué dans la dimérisation avec RXRα.

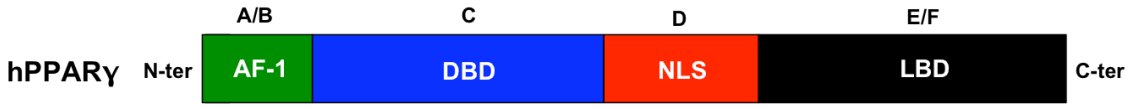


Figure 27 : Schéma de la structure protéique de PPARγ

PPARγ est possède 6 domaines fonctionnels. Le domaine A/B contient un site de transactivation AF-1 (Activation Function 1). Le domaine C correspond à la région de liaison à l'ADN. Le domaine D contient le signal de translocation nucléaire (NLS). Le domaine E/F correspond à la région de liaison du ligand et au site de transactivation du récepteur.

PPARγ régule l'expression de ses gènes cibles en formant un hétérodimère avec les RXRs. Il se lie à des HREs (Hormone Response Element) qui lui sont spécifiques : les PPREs (Peroxisome Proliferator Responsive Element) (Tugwood *et al*., 1992). PPARγ peut agir de deux manières (Figure 28). Soit, l'hétérodimère PPAR-RXR se lie à l'ADN en présence d'un ligand et active la transcription d'un gène cible (Murphy & Holder, 2000). Soit, PPARγ activé, régule négativement la transcription de gènes par transrépression. Cette dernière serait à l'origine des effets anti-inflammatoires de PPARγ. Par l'intermédiaire de cette transrépression. PPARγ interférerait avec d'autres voies de signalisation, en modulant des interactions avec des corépresseurs selon un mode dépendant de la liaison d'un ligand (Marx *et al*., 2004), induisant ainsi l'inhibition de la transcription des gènes concernés.

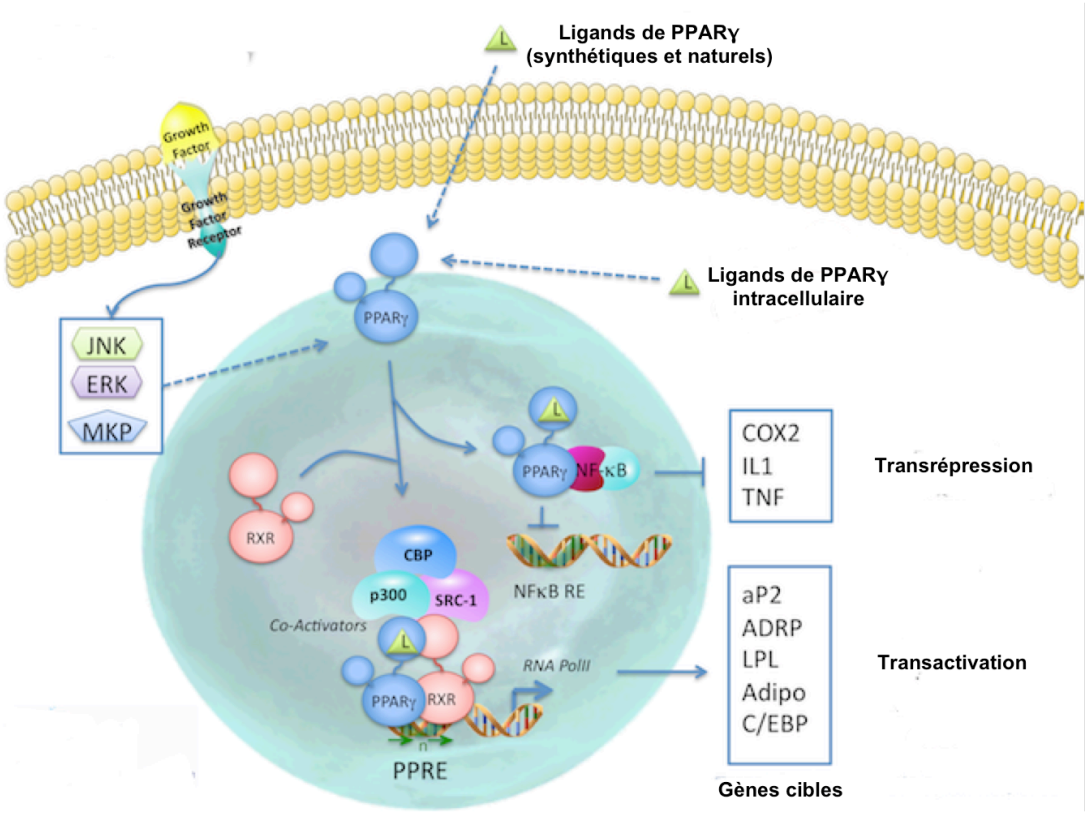


Figure 28 : Mécanismes d'activation de PPARγ

PPARγ est activé après sa liaison avec un ligand et subit une translocation nucléaire. PPARγ forme ensuite un homodimère avec RXR pour se fixer sur l'élément de réponse PPRE et activé la transcription des gènes cibles. PPARγ peut également former un dimère avec des co-répresseurs tel que NFκB. Ce dernier va alors transréprimer des gènes cibles et inhiber leur trancription (D'après Nuclear Response Resource ; http://nrresource.org).

I.2.4.3. Distribution tissulaire de PPARγ

Les deux tissus exprimant fortement PPARγ sont le tissu adipeux et le côlon (Dubuquoy *et al*., 2000). Des expressions intermédiaires de PPARγ sont retrouvées dans les reins, le foie, le cœur, l'intestin grêle (Guan *et al*., 1997; Vidal-Puig *et al*., 1997), la prostate (Mueller et al., 2000) et les macrophages (Willson *et al*., 2000). Enfin, de faibles quantités de PPARγ sont détectées dans le muscle squelettique (Fajas *et al*., 1997). Le côlon est le second site majeur d'expression de PPARγ après le tissu adipeux. Les cellules coliques l'exprimant le plus fortement sont les cellules épithéliales coliques différenciées, post-mitotiques, présentes au niveau de la lumière du TD. Les cellules moins différenciées, situées au fond des cryptes coliques, expriment de faibles taux de PPARγ. Par ailleurs, les niveaux d'expression

de PPARγ augmentent du segment colique proximal vers le segment distal (Lefebvre *et al*., 1999).

I.2.4.4. Les ligands de PPARγ

I.2.4.4.1. Les ligands naturels

In vitro, de nombreux acides gras polyinsaturés (Acides oléique, linoléique, arachidonique) et des dérivés d'eicosanoïdes, lient et activent le récepteur PPARγ à des concentrations de l'ordre du micromolaire, concentrations équivalentes à celles trouvées dans le sérum humain (Tableau III). Parmi les eicosanoïdes, la prostaglandine 15d-PGJ_2 est le ligand naturel de PPARγ le plus largement utilisé dans les études portant sur les effets de PPARγ. Cependant, comme développé dans le chapitre précédent, la 15d-PGJ_2 peut également avoir des effets indépendants de la voie PPARγ (Willson *et al*., 2000).

Modulators	EC50/Ki	Plasma concentration	Sources
PUFAs[41]			
Omega 3			
α-linolenic acid	ND	0.27 mM	High fat fish, marine mammals, milk
γ-linolenic acid	ND		High fat fish, marine mammals, milk
Eicosapentanoic acid	ND	1.01 mM	High fat fish, marine mammals, milk
Docohexanoic acid	ND	3.54 mM	High fat fish, marine mammals, milk
Omega 6			
Linoleic acid	−/~10 μM	21.45 mM	Meats, eggs, milk, vegetable oils
Dihomo-γ-linolenic acid	ND	3.06 mM	Meats, eggs, milk, vegetable oils
Arachidonic acid	ND	11.36 mM	Meats, eggs, milk, vegetable oils
Omega 9			
Palmitoleic acid	ND		Rapeseed
Oleic acid	ND		Olive oil
Derivatives			
Conjugated linoleic acid[42]	ND	–	Milk, meat, seeds
Nitrolinoleic acid[43]	−/133 nM	500 nM	Endogenous
Nitrooleic acid[44]	−/100 nM	619 nM	Endogenous
Eicosanoids:[41]			
8S-hydroxyeicosapentaenoic acid	ND	–	Endogenous
12-hydroxyeicosatetraenoic acid	ND	–	Endogenous
15-hydroxyeicosatetraenoic acid	ND	–	Endogenous
9-hydroxyoctodecadienoic acid	ND	–	Endogenous
13-hydroxyoctodecadienoic acid	ND	–	Endogenous
15dPGJ2[45]	1 μM/–	–	Endogenous
Miscellaneous			
Swietenia mahagony extract[46]	50 μg/l	–	S mahagony
Lysophosphatidic acid[47]	2 μM	5–25 μM	Platelets
9-tetrahydrocannabinol[48]	ND	–	Cannabis sativa
Soy isoflavavone[49]	ND	–	Soy

15dPGJ2, 15-deoxy-Δ12,14-prostaglandin J2; ND, not determined; PUFAs, polyunsaturated fatty acids.

Tableau III : Affinité et rôles physiologiques des ligands naturels de PPARγ (Dubuquoy et al., 2006)

I.2.4.4.2. Les ligands synthétiques

Les drogues de la famille des thiazolidinediones sont des ligands spécifiques et activateurs de PPARγ (Tableau IV) (Lehmann *et al*., 1995; Spiegelman, 1998). D'autres agonistes synthétiques de PPARγ ont été développés tel que le GW7845 (Alarcon de la Lastra *et al*., 2004). Enfin, certains anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont capables de lier et d'activer PPARγ à de fortes concentrations, de l'ordre du micromolaire. Il s'agit de l'indométhacine, de l'ibuprofène, du fénoprofène et de l'acide flufénamique (Lehmann *et al*., 1997).

Modulators	EC50/Ki	Effects in colon through PPARγ
Glitazones		
Rosiglitazone[45]	89 nM/8 nM	Yes
Ciglitazone[57]	3 μM/–	ND
Troglitazone[45]	0.54 μM/474 nM	Yes
Pioglitazone[45]	0.59 μM/364 nM	Yes
Netoglitazone (MCC-555)[58]	8 μM/–	ND
Glitazars		
Muraglitazar[59]	110 nM/–	ND
Tesaglitazar[60]	0.25 μM/18 nM	ND
Farglitazar[61]	0.0034 μM/–	ND
Ragaglitazar[62]	2.1 μM/–	ND
NSAIDs[56]		
Indomethacin	40 μM/–	ND
Flufenamic acid	ND	ND
Fenoprofen	ND	ND
Ibuprofen	ND	ND
L-Tyrosine derived compounds		
FMOC-L-Leu[63]	–/15 μM	Yes
Miscellaneous		
5-ASA[64]	–/28.7 mM	Yes
CDDO[65]	–/310 nM	Yes
COOH[66]	ND	ND
Triphenyltin[67]	95 nM/–	ND
BADGE[68]	ND	ND

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

Tableau IV : Affinité et effets dur le côlon des ligands synthétiques de PPARγ (Duboquoy et al, 2006)

I.2.4.5. PPARγ et inflammation

Certaines études ont suggéré que PPARγ pouvait être un acteur clé de l'inflammation colique. Dans les cellules épithéliales coliques, il inhiberait l'inflammation par transrépression en se fixant sur certains facteurs de transcription, comme NFκB, STAT1 ou AP-1. Ces facteurs de transcription contrôlent l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires comme l'Il-1β, l'Il-6, l'Il-8, le TNFα (Tumour Necrosis Factor α) ou l'IFNγ (Interferon γ). PPARγ réprimerait les activités transcriptionnelles de STAT1, AP-1 et NFκB en interagissant directement avec le co-activateur de transcription CBP (CREB Binding Protein) et en établissant des ponts avec des co-répresseurs comme SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator 1) (Li et al., 2000). Il a aussi été émis l'hypothèse que si l'activation de PPARγ régule négativement l'activité de NFκB, ceci pourrait se faire *via* une régulation différentielle des isoformes de NFκB favorisant l'expression de p50 et inhibant celle de p65 (Bassaganya-Riera et al., 2002).

I.2.4.6. PPARγ et cancer

Dans les cellules épithéliales cancéreuses coliques humaines, PPARγ a une action anti-tumorale, caractérisée par des effets anti-prolifératifs et pro-différenciateurs.

L'action anti-proliférative de PPARγ est expliquée en partie par la régulation de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire. Les CKI (Cycline dependent Kinase Inhibitor) $p21^{Waf1}$ et $p27^{Kip1}$ sont deux cyclines qui inhibent l'entrée en phase S du cycle cellulaire. Dans les cellules de la lignée de CEI HT-29, un agoniste de PPARγ, la Troglitazone, induit un arrêt du cycle en phase G1, accompagné d'une augmentation de l'expression des ARNm codant pour $p21^{Waf1}$ (Yoshimuzi et al., 2004). De la même manière, un autre agoniste de PPARγ, la Ciglitazone, augmente l'expression de $p27^{Kip1}$ dans les cellules HT-29 (Chen et al., 2005). De plus, il a été montré dans les cellules de la lignée Moser que l'activation de PPARγ réduisait l'expression de la cycline D1, cycline importante pour l'entrée du cycle cellulaire. Par ailleurs, l'expression du gène codant pour le récepteur à l'EGF était également diminuée par PPARγ. De manière intéressante, ces deux gènes, cycline D1 et récepteur à l'EGF, sont surexprimés dans les cancers colorectaux (Chen et al., 2005).

L'induction de la différenciation des cellules épithéliales coliques par les ligands de PPARγ est visible d'un point de vue morphologique (Sarraf et al., 1998). Les agonistes de PPARγ augmentent l'expression de gènes marqueurs de la différenciation cellulaire comme ceux codant pour l'ACE (antigène carcino-embryonnaire), les cytokératines 18, 19 et 20, la villine ainsi que la phosphatase alkaline (Sarraf et al. 1998 ; Kitamura et al., 1999 ; Gupta et al., 2001). A l'inverse, des gènes codant pour des protéines inhibitrices de la maturation des CEI ou inductrices de prolifération, tels que le facteur mitogène RegIA (Regenerating gene IA), sont réprimés par les ligands de PPARγ (Gupta et al., 2001).

Il a été suggéré très tôt que PPARγ pouvait jouer un rôle dans le cancer colorectal. Néanmoins, les données épidémiologiques, liées à la consommation d'agonistes de PPARγ, permettant d'établir un lien entre le cancer du côlon et PPARγ sont contradictoires. En effet, tandis que certaines études montrent que la consommation d'acides gras polyinsaturés (AGPI) est positivement corrélée avec une augmentation du risque de cancers, impliquant PPARγ dans la survenue de ces cancers (Giovanucci et al, 1994 ; Wasan et al, 1997). D'autres études montrent, à l'inverse, que la prise d'agonistes comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, était corrélée positivement à une réduction du risque de cancers (Lehmann et al, 1995).

I.1.1.1. PPARγ et neurones

Plusieurs études ont fortement suggéré que PPARγ pouvait jouer un rôle important dans le développement du SNC. En effet, chez la souris, tandis que l'expression de PPARγ est faible dans le SNC du nouveau-né et de l'adulte, une expression élevée de PPARγ est observée dans l'embryon et le cerveau du fœtus (Wada & Kamisaki, 2003). Plus récemment, il a été suggéré que PPARγ pouvait induire la prolifération, la migration et la différenciation des cellules souches neurales à travers l'activation des voies de signalisation Wnt ou STAT3 (Cimini & Ceru, 2008). Enfin, l'activation de PPARγ permettrait également de réduire la mort neuronale en protégeant les neurones d'un stress oxydant généré par une ischémie cérébrale ou une épilepsie (Yu *et al*., 2008; Pei *et al*., 2011).

I.2.5. La voie de signalisation Nrf2

I.2.5.1. Le gène codant pour Nrf2

Nrf-2 (NF-E2 related factor 2) appartient à une famille de gènes humains codant pour les facteurs de transcription bZIP (basic leucine zipper). Les facteurs de transcription de la famille bZIP sont retrouvés dans tous les organismes et sont impliqués dans la synthèse des hormones stéroïdiennes par les cellules endocrines, dans les fonctions de reproduction et également dans le développement des cancers dans les tissus épithéliaux (Chan *et al*., 1995).

Le gène NFE2L2, codant pour Nrf2, est localisé chez a souris sur le chromosome 2 et sur le chromosome 2q31 chez l'homme. Le gène de Nrf2 est conservé chez les mammifères et contient 5 exons sur une longueur de 35 Kb. Chez l'homme un épissage alternatif génère 3 transcrits qui code pour une même protéine (Hillier et al, 2005).

I.2.5.2. La protéine Nrf2

Nrf2 est une protéine de type bZIP de 45 kDa (Figure 29). Le facteur Nrf2 est activé dans le noyau lorsqu'il est complexé à son coactivateur, protéine de 18 KDa de la famille Maf. Nrf2 est composé de 6 domaines fonctionnels Neh. Neh2 est impliquée dans l'ubiquitinylation et la liaison à Keap1. Neh 4 et 5 correspondent au domaine de transactivation de Nrf2 sur son élément de réponse à l'ADN. Neh1 permet la dimérisation de Nrf2 à une protéine Maf (Andrews, 1997).

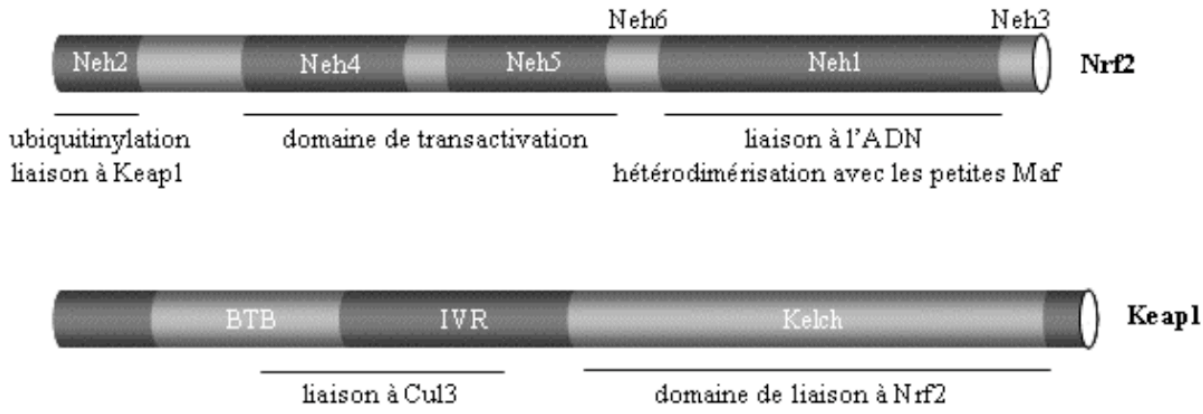


Figure 29 : Structure de Nrf2 et de Keap1

(D'après Andrews, 1997)

Nrf2 est également un membre de la sous-famille *Cap n'collar* (CNC) des protéines bZIP qui se caractérisent par un domaine de dimérisation et un domaine de liaison à l'ADN bien conservés (Motohashi *et al*., 2002). Nrf2 se lie à l'ADN au niveau de la séquence ARE (Antioxydant response element) sous forme d'hétérodimère avec une des petites protéines Maf. Le facteur de transcription Nrf2 est associé à la régulation de l'expression de gènes codant pour de nombreuses protéines : protéines de la réponse antioxydante, protéines chaperones, et protéines impliquées dans la protéolyse dépendante de l'ubiquitine, la croissance cellulaire et l'apoptose (McMahon *et al*., 2001; Lee *et al*., 2003). L'absence de Nrf2 n'altère pas le développement embryonnaire chez la souris mais provoque une sensibilité accrue au stress oxydant (Enomoto *et al*., 2001; Yoh *et al*., 2001; Cho *et al*., 2002).

L'activité de Nrf2 est régulée en partie par la protéine Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), protéine cytoplasmique avec un domaine C-terminal " Kelch " de liaison avec le domaine N-terminal " Neh2 "de Nrf2 (Figure 30) permettant de maintenir le facteur de transcription dans le cytoplasme (Itoh *et al*., 1999). Ce domaine " Kelch " se lie également aux molécules d'actine et cette liaison semble impliquée dans la séquestration de Nrf2. En effet, il a été démontré que l'altération du cytosquelette d'actine favorisait la translocation de Nrf2 dans le noyau (Kang *et al*., 2004). Keap1 séquestrerait ainsi Nrf2 dans le cytoplasme, l'empêchant ainsi d'aller agir comme facteur de transcription dans le noyau (Figure 30). Mais des études récentes suggèrent un autre mécanisme de répression de Nrf2 : la protéine Nrf2, très instable, est dégradée par le protéasome après ubiquitinylation par un complexe E3 ligase constitué de plusieurs protéines, dont Keap1 (McMahon *et al*., 2003; Nguyen *et al*., 2003; Cullinan *et al*., 2004; Zhang *et al*., 2004).

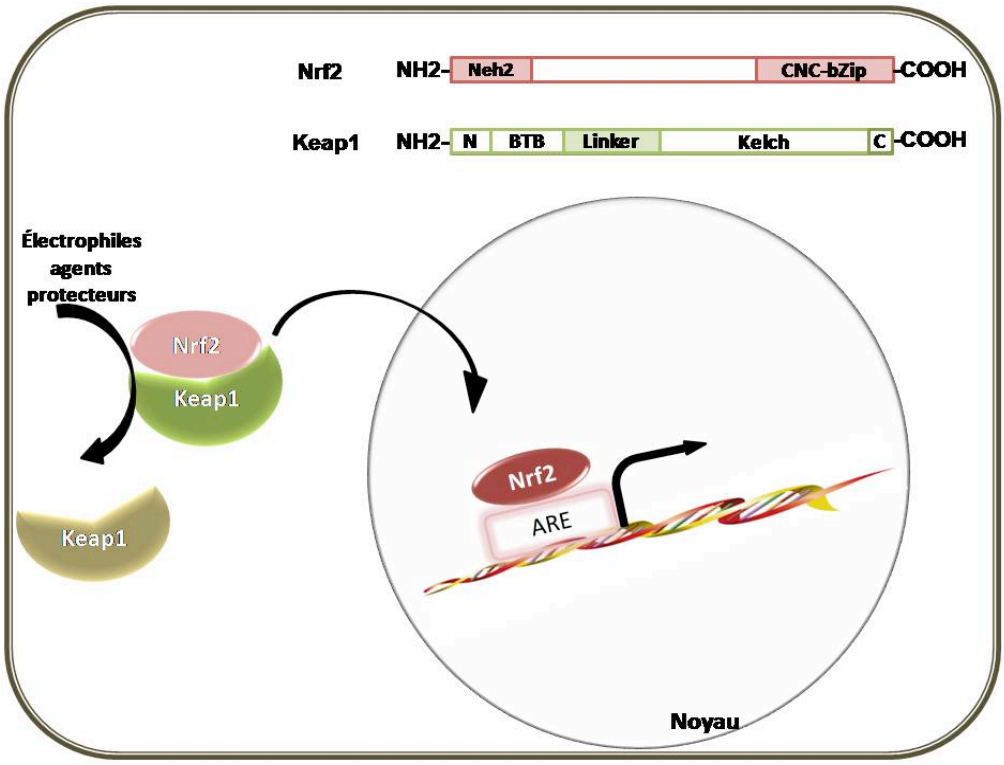


Figure 30 : Schéma simplifié du mécanisme de répression de Nrf2 par Keap2

Dans ce modèle, le mécanisme de répression par Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) consiste à séquestrer Nrf2 (Nuclear factor E2-related factor 2) dans le cytoplasme. L'activation de Nrf2 survient sous l'effet d'électrophiles ou d'autres agents protecteurs qui vont se lier à Nrf2 au niveau des résidus cystéine. Suite à cette liaison, Nrf2 est libéré, ce qui va permettre sa translocation dans le noyau. Il y exerce son rôle de facteur de transcription en se fixant à la séquence ARE (Antioxidant response element). En haut à gauche sont représentées les structures des deux protéines Nrf2 et Keap1. On suppose que l'interaction entre les deux protéines se fait au niveau du domaine Neh2 de Nrf2 et du domaine Kelch de Keap 1.

I.2.5.3. Distribution tissulaire de Nrf2

La protéine Nrf2 a été pour la première fois identifiée dans les extraits de cellules érythroïdes où elle est fortement exprimée. Depuis, il a été montré que la protéine Nrf2 est majoritairement exprimée dans les progéniteurs hématopoïétiques, les cellules érythroïdes et les mastocytes (Andrews, 1997). Cependant, l'expression de Nrf2 n'est pas restreinte à ces types cellulaires et elle est retrouvée de manière ubiquitaire avec les concentrations les plus élevées (par ordre décroissant) dans les reins, les muscles, les poumons, le cœur, le foie et le cerveau.

I.2.5.4. Les inducteurs de Nrf2

Nrf2 est constitutivement actif, mais son activité est fortement augmentée par différents inducteurs chimiques ayant des propriétés électrophiles. De nombreuses substances chimiques sont connues pour induire l'activité transcriptionnelle de Nrf2. On retrouve notamment le sulforaphane, le resvératrol ou encore le ter-butyl hydroquinone. Des inducteurs biologiques ont également été caractérisés, en particulier des substances endogènes telles que le NO (Dhakshinamoorthy et al, 2004) et la 15d-PGJ_2 (Itoh et al, 2004 ; Kawamoto et al, 2000). Ces molécules sont toutes électrophiles, ce qui leur confère une réactivité chimique particulière envers des groupes thiols (-SH), présents au niveau des cystéines.

I.2.5.5. Nrf2 et inflammation

Nrf2 apparaît comme un modulateur important de l'inflammation et est activé dans les macrophages stimulés par le LPS (Lipopolysaccharide) (Ashino et al, 2008 ; Srisook et al, 2005). Cette activation fait intervenir le NO produit par les macrophages activés, et conduit à l'expression des gènes cibles de Nrf2, comme les gènes antioxydants impliqués dans la synthèse du GSH et l'hème oxygénase (HO-1). Ces enzymes antioxydantes pourraient limiter les effets collatéraux de l'inflammation liés aux espèces réactives de l'oxygène et du NO, produites au cours de l'activation des macrophages et des neutrophiles (Dhakshinamoorthy et al, 2004).

Dans ce contexte, Nrf2 constitue une cible thérapeutique anti-inflammatoire potentielle (Innamorato et al, 2008 ; Thimmulappa et al, 2007). Certains agents anti-inflammatoires comme des triterpènoïdes (Dinkova-Kostova et al, 2005), et certains sels d'or (Kataoka et al, 2001), déjà utilisés comme anti-inflammatoires, sont de puissants activateurs de Nrf2, lié à l'activation de Nrf2.

I.2.5.6. Nrf2 et cancer

La voie Keap1-Nrf2 joue un rôle paradoxal dans le cancer. Il a été montré que Nrf2 peut protéger de la survenue de cancers mais également peut participer au développement, de ceux-ci.

Le rôle anti-inflammatoire de Nrf2 a été décrit comme intervenant dans la prévention des cancers liés à l'inflammation chronique. En effet, il a été montré dans un modèle de souris $Nrf2^{-/-}$ de cancer du côlon induit par l'azoxyméthane (AOM) et le DSS, une augmentation de l'inflammation et de l'apparition des cryptes aberrantes (Osburn *et al*., 2007). Dans ce modèle, les souris ont un nombre plus élevé de polypes coliques, comparé aux souris témoins. Il a également été montré que l'oltipraz, une dithiol-thione pouvant activer Nrf2, prévenait des tumeurs gastriques murines induites par un gavage au benzo-pyrène (Ramos-Gomez *et al*., 2001). L'oltipraz est également très efficace dans la prévention de cancers induits par l'aflatoxine chez les rats (Kensler *et al*., 1987). Toutefois, une étude a montré que l'activation de Nrf2 diminuait l'efficacité des chimiothérapies anticancéreuses (Hayes et al, 2006).

II. OBJECTIFS

L'analyse des données de la littérature a permis de mettre en évidence l'implication des cellules gliales entériques (CGE), composant majeur du système nerveux entérique (SNE), dans la régulation des autres constituants de l'unité neuro-glio-épithéliale (UNGE). D'une part, il a été montré que les CGE régulent les fonctions de la barrière épithéliale intestinale (BEI). D'autre part, il a été montré que les CGE protègent les neurones d'un stress oxydant. Ces études suggèrent que les effets des CGE sont dépendants de la libération de médiateurs gliaux. Ainsi, le TGF-β1, le proEGF et le GSNO ont été identifiés pour agir spécifiquement sur le contrôle des processus de prolifération cellulaire, de réparation et de protection contre les agressions bactériennes dans les cellules épithéliales intestinales (CEI) (Neunlist *et al.*, 2007; Flamant *et al.*, 2011; Van Landeghem *et al.*, 2011). Le glutathion a été impliqué dans la neuroprotection (Abdo *et al.*, 2010). Toutefois, les médiateurs gliaux ci-dessus n'expliquent pas l'ensemble des effets des CGE sur la régulation des fonctions de la BEI et de la neuroprotection. D'autres médiateurs gliaux restent donc à identifier. Parmi ces derniers, les agonistes du récepteur nucléaire PPARγ constituent des candidats potentiels, PPARγ étant capable d'agir à la fois sur les cellules épithéliales et neuronales.

Dans ce contexte, l'objectif général de ce travail de thèse a été d'identifier un nouveau médiateur glial dérivé des ω-6, la 15-déoxy-$\Delta^{12,14}$ Prostaglandine J_2 (15d-PGJ_2), et de caractériser ses effets sur le contrôle des fonctions des CEI ainsi que sur la neuroprotection.

Ainsi, les étapes de ce travail de thèse ont été de :

1- Identifier et caractériser la production de la 15d-PGJ_2 par les CGE.

2- Mettre en évidence le rôle de la 15d-PGJ_2 gliale sur la prolifération et la différenciation des CEI et identifier la voie de signalisation impliquée dans ces effets.

3- Mettre en évidence le rôle neuroprotecteur de la 15d-PGJ_2 gliale contre un stress oxydant et identifier la voie de signalisation mise en jeu.

4- Identifier les altérations de l'expression des enzymes impliquées dans la production des prostaglandines par les CGE au cours des phases précoces des cancers colorectaux, dans un modèle murin de carcinogenèse colique.

Ces travaux seront présentés en deux parties. La première partie traitera du rôle des CGE et de la 15d-PGJ2 à la fois sur les fonctions de la BEI et la neuroprotection dans des

conditions physiologiques (Articles 1 & 2). Dans cette partie, les résultats de l'étude des voies de signalisation relatives à PPARγ d'une part et à Nrf2 d'autre part seront présentés. La deuxième partie présentera des travaux relatifs à l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse des prostaglandines et l'expression de protéines spécifiques des CGE dans un modèle murin de carcinogénèse colique. Dans cette partie, afin d'affiner nos résultats préliminaires, une nouvelle méthode d'analyse par imagerie du SNE sera présentée (Article 3) permettant d'étudier plus spécifiquement l'expression des protéines *in situ* dans les CGE et les neurones entériques. Une discussion permettra de commenter l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail. Nous concluerons sur l'impact des CGE, tout d'abord, au sein de l'UNGE, puis à l'échelle du tube digestif.

III. Partie 1 : Régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales et de la neuroprotection par les cellules gliales entériques : rôle de la 15-déoxy-$\Delta^{12,14}$-Prostaglandine J_2 (15d-PGJ_2)

III.1. Introduction

Dans l'introduction de la thèse nous avons présenté les cellules gliales entériques (CGE) comme un des constituants majeurs de l'unité neuro-glio-épithéliale (UNGE). Leur localisation anatomique à proximité des neurones mais également des cellules épithéliales intestinales (CEI) leur permet d'exercer des effets paracrines à travers des médiateurs solubles.

Dans le laboratoire, il a été démontré que les CGE sont capables de diminuer la prolifération des CEI, en partie par la sécrétion du TGF-β1 (Neunlist *et al.*, 2007). D'autres médiateurs produits par les CGE comme le glutathion réduit (GSH) et le nitrosoglutathion (GSNO) ont également été identifiés (Savidge *et al.*, 2007). Le GSNO est capable de réguler l'expression des protéines au niveau des jonctions serrées de la BEI et d'atténuer l'inflammation de cette barrière lors d'une ablation spécifique des CGE (Savidge *et al.*, 2007a). De la même manière, nous avons observé que les CGE réduisent, *in vitro*, les lésions de la BEI et la réponse inflammatoire induite par *Shigella flexneri* (Figures 1 et 2 ; Annexe 2). Cet effet protecteur est reproduit par le GSNO, *in vitro,* et dans un modèle de shigellose chez le lapin (Figures 5 et 9 ; Annexe 2) (Flamant *et al.*, 2011). Il a été également montré que le GSH produit par les CGE protège en partie les neurones d'un stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène ou la dopamine (Abdo *et al.*, 2010).

Par ailleurs, nous avons récemment démontré que l'EGF (Epidermal Growth Factor) est secrété par les CGE sous une forme précurseur (proEGF). *In vitro*, les CGE favorisent la restitution et la motilité des CEI après une lésion mécanique de la monocouche épithéliale (Figures 2 et 3 ; Annexe 3). Cet effet est reproduit par le milieu de culture conditionné de CGE et nécessite une maturation protéolytique du proEGF sécrété (Figure 7 ; Annexe 3). De plus, dans un modèle de souris transgénique, l'ablation spécifique de la glie entérique ralentit le processus de réparation de la muqueuse après que des lésions aient été induites, soit par le diclofenac, soit par le sulfate de dextran (DSS) (Figure 1 ; Annexe 3) (Van Landeghem *et al.*, 2011).

Une étude élargie portant sur le transcriptome des CEI après co-culture avec des CGE (Annexe 1) (Van Landeghem *et al.*, 2009), nous a permis de montrer que ces cellules sont

capables de modifier l'expression de gènes impliqués dans la régulation de fonctions aussi différentes que la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, l'adhésion cellulaire, l'apoptose ou encore la motilité cellulaire au sein des CEI (Tableaux 6 à 10 ; Annexe 1). Parmi les gènes impliqués dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des CEI, l'expression du gène PPARγ et celle de certains gènes indirectement contrôlés par ce récepteur nucléaire (comme la E-cadhérine) sont augmentées dans les CEI cultivées en présence de CGE. La 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-Prostaglandine J_2 (15d-PGJ_2), un dérivé des acides gras oméga-6 polyinsaturés, est l'un des agonistes naturels le plus connu de PPARγ (Scher & Pillinger, 2005) et pourrait être impliquée dans les réponses observées au niveau des CEI en présence de CGE.

Dans ce contexte, nous avons d'abord cherché à mettre en évidence au niveau des CGE, l'équipement enzymatique nécessaire à la production de la 15d-PGJ_2. La prostaglandine D synthase de forme lipocaline (L-PGDS) a été identifiée, par immunohistochimie, dans des lignées de CGE, dans les CGE de culture primaire de SNE, dans les CGE du plexus sous-muqueux et dans les CGE subépithéliales (Figure 1 ; Article 1) (Bach-Ngohou *et al.*, 2010). De même, nous avons montré que les ARNm de la L-PGDS sont exprimés dans les lignées de CGE, dans la culture primaire de SNE et dans des biopsies coliques humaines (Figure 2 A-C ; Article 1). En revanche, les ARNm de la prostaglandine D synthase de forme hématopoïétique (H-PGDS) ne sont pas détectés dans les CGE. De plus, des analyses par spectrométrie de masse ont permis d'identifier la 15d-PGJ_2 dans le milieu conditionné de culture de CGE (Figure 3 ; Article 1) à des concentrations de l'ordre de 20 nM (Données non publiés).

La mise en évidence de la capacité des CGE à synthétiser et sécréter la 15d-PGJ_2 nous a conduit ensuite à explorer son rôle, d'une part sur la prolifération et la différenciation des CEI (Partie I - Article 1) et d'autre part, sur la protection des neurones dans le cas d'un stress oxydant (Partie I - Article 2). Nous avons également cherché à identifier les voies de signalisation qui seraient impliquées dans les réponses obtenues, en particulier celles des facteurs de transcription PPARγ et Nrf2 (Kim & Surh, 2006).

La réalisation de ces deux projets sur les CEI et sur les neurones entériques nous a conduits d'une part, à développer et utiliser des modèles de culture cellulaire adaptés et

d'autre part, à générer des CGE génétiquement invalidées par ARN interférence ciblés sur l'enzyme L-PGDS responsable de la synthèse de la 15d-PGJ_2.

III.2. Méthodes expérimentales utilisées

III.2.1. Modèles cellulaires

Dans ces études, différentes lignées de CGE ont été utilisées. Deux lignées ont été caractérisées précédemment (Ruhl *et al.*, 2001b). La lignée de CGE non transformée NT, issue de plexus myentériques de jéjunum de rats adultes et la lignée transformée CRL2690 (ATCC) dérivée des cellules NT. Nous avons aussi utilisé une troisième lignée de CGE obtenue au laboratoire, JUG2, isolée à partir d'une culture primaire d'intestins d'embryons de rats. Les effets des CGE (NT, CRL2690 et JUG2) ont été analysés en utilisant des modèles de co-culture sur filtres Transwell®.

Pour les études sur les interactions CGE/CEI, différentes lignées de CEI (Caco-2, HT-29, T84) ou de fibroblastes humains (CCD18-Co) ont été ensemencées sur des filtres Transwell® et mises en culture en présence de CGE. Des conditions de culture identiques, mais en l'absence de CGE, ont été utilisées par étudier directement les effets de la 15d-PGJ_2 et/ou de différentes substances pharmacologiques comme le GW9662, un antagoniste irréversible de PPARγ (Figure 31).

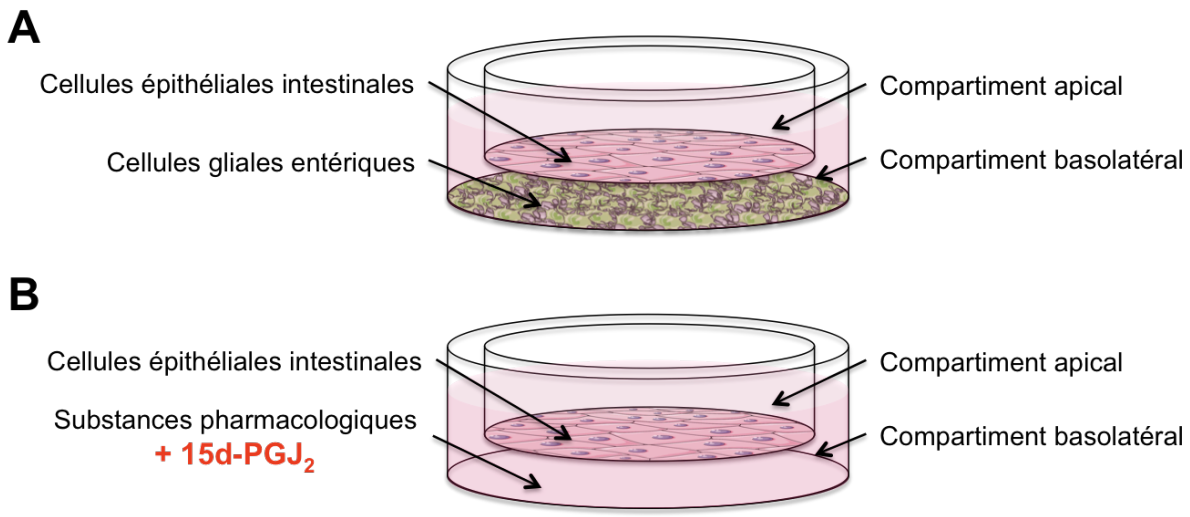


Figure 31 : Modèles de culture utilisés pour l'étude des interactions entre les cellules gliales entériques et les cellules épithéliales intestinales

(A) Les cellules gliales entériques (CGE) sont cultivées au fond des plaques de culture. Les cellules épithéliales intestinales (CEI), préalablement cultivées sur filtre Transwell®, sont ensuite mises en co-culture au-dessus des CGE. (B) Les CEI sont cultivées sur filtre Transwell®. Les substances pharmacologiques telles que la 15d-PGJ_2 ou *le GW9662, sont ajoutées en dessous du filtre.*

Après culture, l'expression transcriptionnelle et protéique des gènes d'intérêt dans les CEI a été analysée par RT-qPCR et Western blot. La prolifération des CEI a été mesurée à partir du nombre de cellules, quantifié par cytométrie en flux.

Pour les études sur les interactions CGE/neurones, les CGE sont directement ensemencées sur les filtres et co-cultivées avec des cellules de neuroblastome humain (SH-SY5Y). Les effets directs de la 15d-PGJ_2, d'agoniste (rosiglitazone) ou d'antagoniste (GW9662) de PPARγ ont été testés sur les cellules SH-SY5Y en l'absence de CGE (Figure 32).

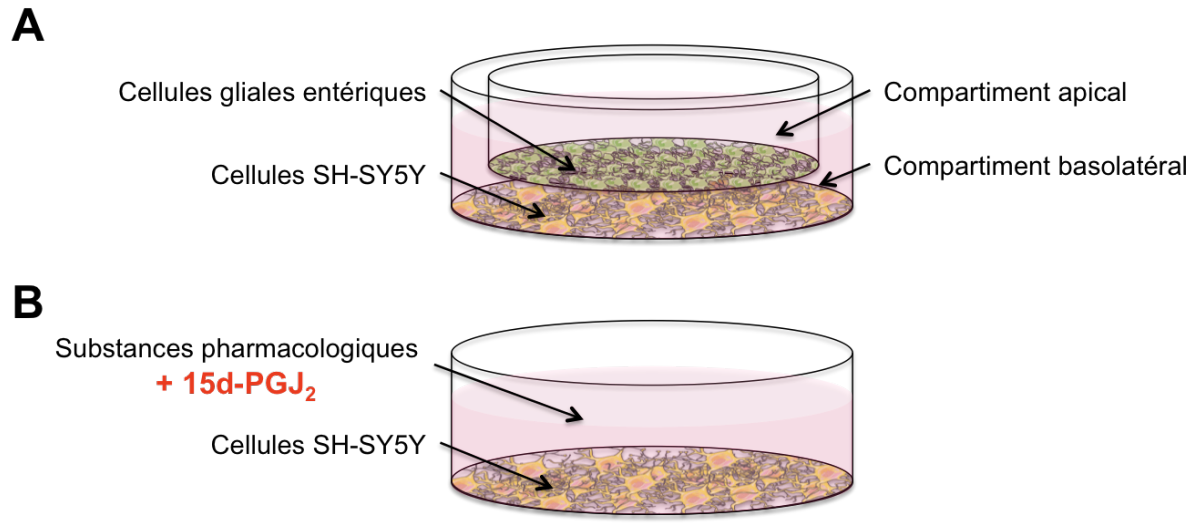


Figure 32 : Modèles de culture utilisés pour l'étude des interactions entre les cellules gliales entériques et les neurones

(A) Les cellules SH-SY5Y sont cultivées au fond des plaques de culture. Les cellules gliales entériques, préalablement cultivées sur filtre Transwell®, sont ensuite mises en co-culture au-dessus des neurones. (B) Les substances pharmacologiques telles que la 15d-PGJ_2, rosiglitazone ou le GW9662, sont ajoutées dans le milieu de culture des cellules SH-SY5Y.

Pour étudier les effets de la 15d-PGJ_2 sur les neurones entériques, nous avons utilisé un modèle de culture primaire de système nerveux entérique développé et caractérisé dans notre laboratoire (Chevalier *et al.*, 2008). Ce modèle a déjà été utilisé pour mettre en

évidence les effets neuroprotecteurs des CGE dans des situations de stress oxydant (Abdo et al, 2010). Les effets neuroprotecteurs de la 15d-PGJ_2 sur les cellules SH-SY5Y et les neurones entériques ont été analysés dans le cas d'un stress oxydant généré par le peroxyde d'hydrogène ou H_2O_2 (Figure 33).

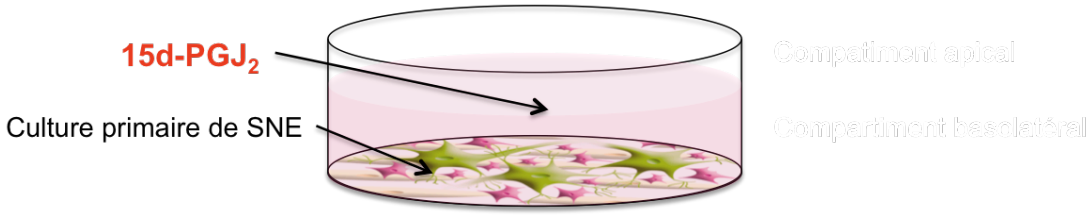


Figure 33 : Modèle de culture primaire de système nerveux entérique utilisé pour l'étude des effets de la 15d-PGJ_2 sur les neurones entériques
Les cellules sont cultivées au fond des plaques de culture et la 15d-PGJ_2 est ajoutée dans le milieu de culture.

La mort cellulaire est mesurée soit à partir de la perméabilité cellulaire (7-amino actinomycine D) quantifiée par cytométrie de flux pour les cellules SH-SY5Y, soit à partir de la libération de l'énolase spécifique des neurones (Neuronal Specific Enolase ou NSE) pour les neurones entériques dans les cultures primaires de SNE. L'analyse de l'expression transcriptionnelle et protéique de certains gènes a été effectuée par RT-qPCR et Western blot à partir des extraits de cellules SH-SH5Y ou par immunofluorescence *in situ* pour les neurones entériques.

III.2.2. CGE génétiquement modifiées

Afin de mettre en évidence l'implication de la 15d-PGJ_2 produite par les CGE dans les effets observés, nous avons utilisé une approche génétique d'invalidation de la L-PGDS par ARN interférence (shRNA). Les lignées de CGE ont été traitées pour permettre la production intracellulaire de shRNA dirigés contre la L-PGDS, par un plasmide d'expression (pLKO 1.0) véhiculé, soit par un lentivirus, soit par des liposomes cationiques (Figure 34). Dans les deux cas, les CGE ont été traitées par la puromycine afin d'obtenir des CGE exprimant de façon stable les shRNA. L'invalidation de l'expression de la L-PGDS dans les CGE a été vérifiée par PCR (Figure 5A ; Article 1) et par Western-blot (Figure 5 B, Article 1 ; Figure 2 D, Article 2). Nous avons ainsi sélectionné deux constructions, la première induisant une réduction significative de l'expression de la protéine (CGE shPGDS) et la

seconde sans effet sur l'expression de la L-PGDS ayant servi de contrôle négatif (CGE shMOCK).

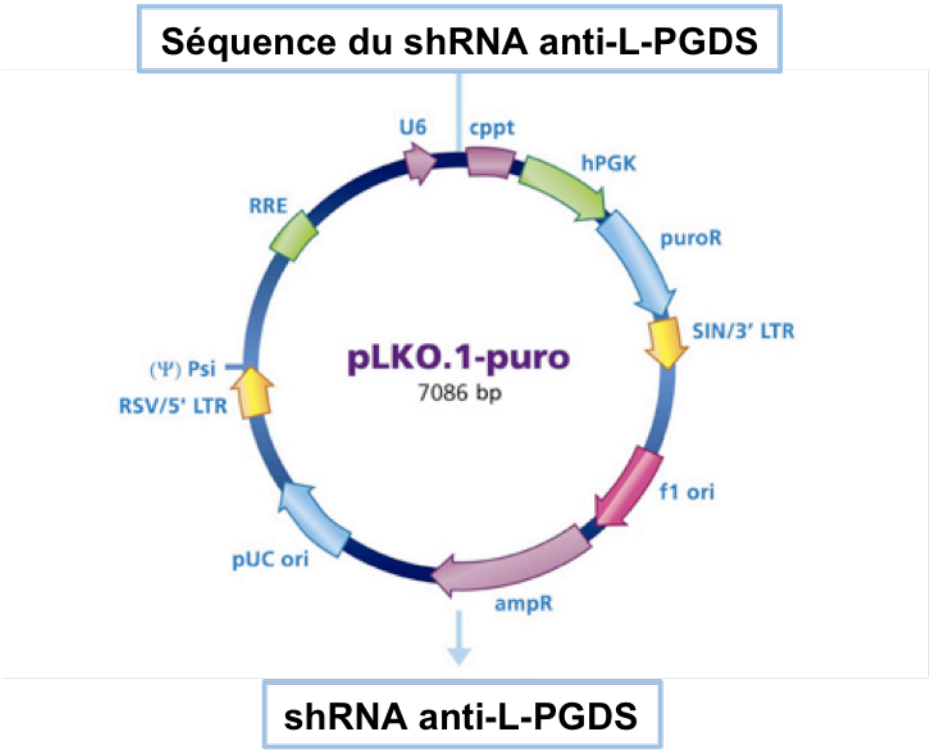


Figure 34: Carte du plasmide d'expression pLKO 1.0 codant pour un shRNA dirigé contre la prostaglandine D synthase lipocaline

La séquence du shRNA dirigé contre la prostaglandine D synthase lipocaline est sous le contrôle du promoteur U6. Le gène de résistance à la puromycine (puroR) est sous le contrôle du promoteur eucaryote de la phosphoglycerate kinase humaine (hPGK).

III.3. Article 1 : La glie entérique module la prolifération et la différentiation des cellules épithéliales intestinales par la 15d-PGJ_2.

Article 1: Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J_2.

Kalyane Bach-Ngohou, **Maxime M Mahé***, Philippe Aubert, Hind Abdo, Sébastien Boni, Arnaud Bourreille, Marc G. Denis, Bernard Lardeux, Michel Neunlist, Damien Masson*

*** Premiers co-auteurs**

La BEI est composée d'une monocouche de CEI polarisées, en perpétuel renouvellement et maintenues adhérentes les unes aux autres par des jonctions serrées. Notre équipe et d'autres ont montré que le microenvironnement cellulaire de la BEI et particulièrement le SNE, pouvait réguler les fonctions de la BEI, telles que la prolifération des CEI et la perméabilité de la BEI (Neunlist et al., 2003; Toumi et al., 2003). Récemment, nous avons mis en évidence un gène d'intérêt dans les CEI, régulé par les CGE : PPARγ (Annexe 1) (Van Landeghem *et al.*, 2009). Il a été montré que PPARγ était impliqué dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des CEI (Kitamura *et al.*, 1999). Cet effet pourrait expliquer en partie les effets inhibiteurs des CGE observés dans des études précédentes, sur la prolifération des CEI (Neunlist *et al.*, 2007). Par conséquent, nous nous sommes intéressés à l'étude de ce gène dans les CEI et plus particulièrement aux médiateurs solubles d'origine gliale pouvant l'activer. Dans la littérature, plusieurs agonistes de PPARγ ont été décrits. Cependant, il existe une classe de ligands naturels de PPARγ dont la 15d-PGJ_2 est le représentant principal.

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer si la 15d-PGJ_2, le principal ligand naturel du récepteur nucléaire PPARγ, pouvait être produit par les CGE et participer à la régulation de la prolifération et de la différenciation des CEI.

Comme décrit précédemment, nous avons montré que les CGE expriment l'enzyme L-PGDS, nécessaire à la production de la 15d-PGJ_2. De plus, nous avons identifié la 15d-PGJ_2 dans le milieu de culture des CGE (Figures 1-3 ; Article 1).

Nous avons démontré qu'après 6 jours de co-culture, les CGE inhibent la prolifération cellulaire des CEI avec une diminution significative du nombre de CEI sans modification de leur survie. Le milieu conditionné de culture de CGE reproduit ces effets avec une diminution du nombre de CEI de 60% comparé aux cellules témoins (Figure 4 ; Article 1). Ainsi, nous avons confirmé que les CGE régulent la prolifération des CEI et que cet effet est dépendant d'un médiateur soluble secrété par les CGE.

Dans un second temps, nous avons voulu démontrer que l'effet antiprolifératif des CGE était lié à la production de 15d-PGJ_2. Nous avons donc utilisé des lignées de CGE invalidées génétiquement pour la L-PGDS : une lignée exprimant un shRNA fonctionnel

(CGE shPGDS) et une lignée exprimant un shRNA non fonctionnel (CGE shMOCK). La co-culture pendant 6 jours des CEI avec les CGE shPGDS entraîne une perte des effets antiprolifératifs. En revanche, le nombre de CEI diminue significativement après la co-culture avec les CGE shMOCK. (Figure 5 C ; Article 1). De plus, le traitement avec 5 µM de 15d-PGJ_2 reproduit l'effet antiprolifératif des CGE et du milieu conditionné de CGE, avec une diminution significative de 30% par rapport aux cellules non traitées (Figure 6 D ; Article 1). Ces résultats démontrent l'effet antiprolifératif de la 15d-PGJ_2 gliale sur les CEI.

Afin de déterminer si la voie PPARγ est impliquée dans les effets antiprolifératifs des CGE sur les CEI, nous avons incubé les CEI en présence d'un antagoniste spécifique de PPARγ, le GW9662. Le traitement de ces cellules par le milieu conditionné de CGE, en présence de GW9662, inhibe l'effet antiprolifératif des CGE. De même, nous observons une perte de l'effet antiprolifératif de la 15d-PGJ_2 sur les CEI, lors de l'ajout du GW9662 (Figure 6 D ; Article 1). Nous observons également une augmentation de la translocation de PPARγ dans le noyau des CEI lors de la co-culture avec les CGE et le milieu conditionné des CGE (Figure 6 B-C ; Article 1). Ces résultats démontrent que les effets des CGE sur la prolifération des CEI sont étroitement associés à la voie PPARγ.

Par ailleurs, PPARγ peut moduler la différenciation cellulaire en régulant de nombreux gènes cibles comme le gène de la E-cadhérine (Gupta *et al.*, 2001). Dans une dernière partie, nous avons identifié l'implication des CGE dans la modulation de la différenciation des CEI. Le milieu conditionné des CGE induit une augmentation de l'expression de l'ARNm des marqueurs de différenciation cellulaire dans les CEI, comme la E-cadhérine (+ 98%) ou la phosphatase alcaline intestinale (+ 110%). Il en est de même pour l'expression de PPARγ qui augmente significativement de 55%. De plus, en utilisant l'antagoniste de PPARγ, nous avons vérifié que les effets des CGE ne sont plus reproduits (Figure 7 A-C ; Article 1). Par conséquent, les CGE modulent la différenciation des CEI *via* la voie PPARγ.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme de régulation des CEI par les CGE. Ce mécanisme, PPARγ dépendant, participe à la régulation de la prolifération des CEI et favorise la différenciation de ces cellules (Figure 35).

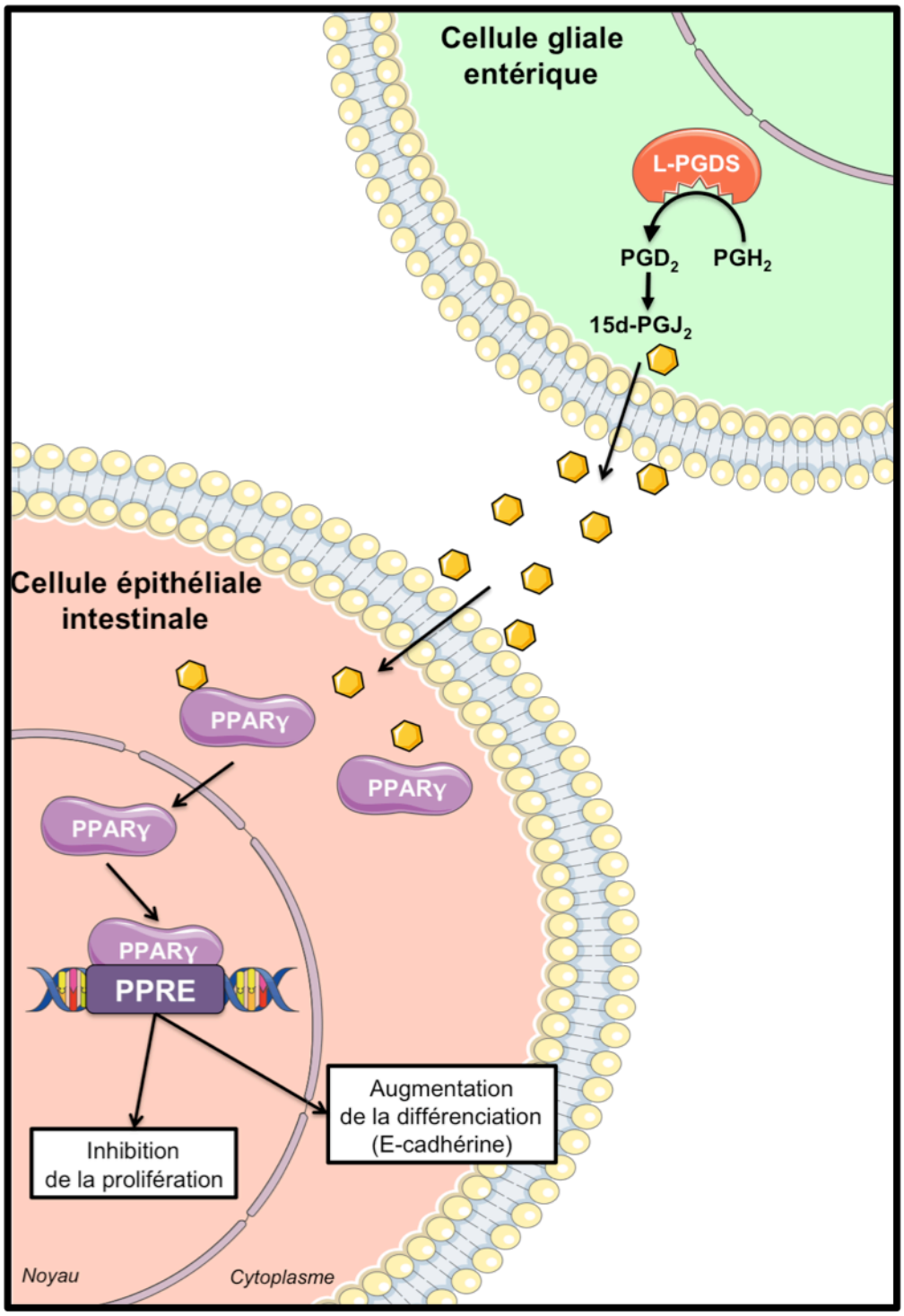


Figure 35 : Schéma récapitulatif de la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales par la 15d-PGJ_2 gliale

Les cellules gliales entériques produisent et sécrètent la 15d-PGJ_2. La 15d-PGJ_2 active dans la cellule épithéliale intestinale (CEI) PPARγ et induit sa translocation nucléaire. PPARγ activé se fixe sur les éléments de réponse aux PPARs (PPRE) pour induire l'expression de gènes cibles de PPARγ et ainsi inhiber la prolifération des CEI et augmenter leur différenciation.

Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J2

Kalyane Bach-Ngohou[1,2,3,4], Maxime M. Mahé[1,2,3], Philippe Aubert[1,2,3], Hind Abdo[1,2,3], Sébastien Boni[2,3,5], Arnaud Bourreille[1,2,3], Marc G. Denis[1,2,3,4], Bernard Lardeux[1,2,3], Michel Neunlist[1,2,3] and Damien Masson[1,2,3,4]

[1] *INSERM, U913, Nantes, F-44093, France*
[2] *Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44093, France*
[3] *CHU Nantes, Hôtel Dieu, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, F-44093, France*
[4] *CHU Nantes, Hôtel Dieu, Laboratoire de Biochimie, Nantes, F-44093, France*
[5] *INSERM, U948, Nantes, F-44093, France*

The enteric nervous system (ENS) and its major component, enteric glial cells (EGCs), have recently been identified as a major regulator of intestinal epithelial barrier functions. Indeed, EGCs inhibit intestinal epithelial cell (IEC) proliferation and increase barrier resistance and IEC adhesion via the release of EGC-derived soluble factors. Interestingly, EGC regulation of intestinal epithelial barrier functions is reminiscent of previously reported peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ)-dependent functional effects. In this context, the present study aimed at identifying whether EGC could synthesize and release the main PPARγ ligand, 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J2 (15dPGJ2), and regulate IEC functions such as proliferation and differentiation via a PPARγ dependent pathway. First, we demonstrated that the lipocalin but not the haematopoetic form for prostaglandin D synthase (PGDS), the enzyme responsible of 15dPGJ2 synthesis, was expressed in EGCs of the human submucosal plexus and of the subepithelium, as well as in rat primary culture of ENS and EGC lines. Next, 15dPGJ2 was identified in EGC supernatants of various EGC lines. 15dPGJ2 reproduced EGC inhibitory effects upon IEC proliferation, and inhibition of lipocalin PGDS expression by shRNA abrogated these effects. Furthermore, EGCs induced nuclear translocation of PPARγ in IEC, and both EGC and 15dPGJ2 effects upon IEC proliferation were prevented by the PPARγ antagonist GW9662. Finally, EGC induced differentiation-related gene expression in IEC through a PPARγ-dependent pathway. Our results identified 15dPGJ2 as a novel glial-derived mediator involved in the control of IEC proliferation/differentiation through activation of PPARγ. They also suggest that alterations of glial PGDS expression may modify intestinal epithelial barrier functions and be involved in the development of pathologies such as cancer or inflammatory bowel diseases.

(Received 9 February 2010; accepted after revision 17 May 2010; first published online 17 May 2010)
Corresponding author K. Bach-Ngohou: INSERM U913 and Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, 1, place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes Cedex 01, France. Email: kbach@chu-nantes.fr

Abbreviations 15dPGJ2, 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J2; EGC, enteric glial cell; EGC CM, enteric glial cell conditioned medium; ENS, enteric nervous system; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GSNO, *S*-nitrosoglutathione; H-PGDS, haematopoietic-PGDS; L-PGDS, lipocalin-prostaglandin D synthase; PGDS, prostaglandin D synthase; PPARγ, peroxisome proliferator-activated receptor γ; TGFβ1, transforming growth factor β1.

Introduction

The intestinal epithelial barrier is a highly dynamic and specialized system. It is continuously renewed by processes involving cell proliferation, differentiation and migration from the stem cell compartment, and the extrusion of terminally differentiated cells into the intestinal lumen. As these cells emerge from the crypts and migrate along the crypt–villus axis, they cease to proliferate and acquire differentiated functions (Sancho *et al.* 2003; Nakamura *et al.* 2007). This balance between proliferation and

K. Bach-Ngohou and M. M. Mahé contributed equally to this work.

© 2010 The Authors. Journal compilation © 2010 The Physiological Society
DOI: 10.1113/jphysiol.2010.188409

Downloaded from J Physiol (jp.physoc.org) at Bibliothèque Universitaire de Nantes on August 10, 2010

The Journal of Physiology

differentiation is controlled by key signalling pathways within intestinal epithelial cells (IECs). It is also modulated by direct or indirect interactions between IECs themselves or with cellular and/or molecular constituents of their microenvironment. Besides canonical pathways such as Wnt/βcat or Notch, recent data have shown that peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) play a key role in controlling IEC functions (Nakamura *et al.* 2007; Su *et al.* 2007). PPARγ is a nuclear receptor highly expressed in the gut and in particular in the colon (Lefebvre *et al.* 1999). For instance, PPARγ activation inhibits IEC proliferation and promotes cell differentiation (Sarraf *et al.* 1998; Kitamura *et al.* 1999; Wachtershauser *et al.* 2000; Kato *et al.* 2004).

Although the cellular sources of PPARγ natural ligands need currently to be better defined, PPARγ ligands, such as 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J2 (15dPGJ2), can be provided by nutritional factors or can be synthesized by endogenous sources (Bull *et al.* 2003). In particular, 15dPGJ2 is derived from prostaglandin D2, which is produced from prostaglandin H2 by prostaglandin D synthase (PGDS).

Among the constituents of the intestinal epithelial barrier microenvironment, the enteric nervous system (ENS), and in particular enteric glial cells (EGCs), is involved in the regulation of intestinal epithelial barrier functions (Cabarrocas *et al.* 2003; Neunlist *et al.* 2008). EGCs form a dense network of cells in close proximity to IECs, allowing paracrine interactions with IECs. Recent anatomical and functional evidence has pointed out their major role in intestinal epithelial barrier control (Savidge *et al.* 2007). In particular, EGCs increase barrier resistance (Neunlist *et al.* 2007), inhibit IEC proliferation (Neunlist *et al.* 2007) and increase IEC adhesion (Van Landeghem *et al.* 2009). These studies have identified various glial mediators involved such as TGFβ1 and *S*-nitrosoglutathione (GSNO) (Neunlist *et al.* 2007; Savidge *et al.* 2007). Although some of the EGC effects on IECs are reminiscent of PPARγ activation, it remains currently unknown whether EGCs can synthesize PPARγ ligands such as 15dPGJ2. Whether these effects on IEC functions are mediated through PPARγ also remains to be elucidated.

In this context, our study aimed at demonstrating that EGCs could be a source of 15dPGJ2 and that EGCs regulate IEC proliferation and differentiation through PPARγ-dependent pathway.

Methods

Human tissues

Tissue specimens were obtained from patients who underwent surgery for colonic adenocarcinoma or in human mucosal biopsies of patients who had colonoscopy. For biopsy studies, patients gave their informed consent. Specimens were taken at a distance from the tumour in macroscopically and histologically normal areas and immediately processed in the Pathology Department. According to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Human Tissues, these specimens were considered as 'residual tissues', not relevant to pathological diagnosis. Tissue samples were subsequently fixed in 4% paraformaldehyde for 3 h at room temperature. Following several washes in phosphate-buffered saline (PBS), the tissue was pinned and whole mounts of mucosal and submucosal plexus were obtained by microdissection under a SZ3060 microscope (Olympus, Rungis, France), as previously described (Neunlist *et al.* 2007).

Primary culture of enteric nervous system

Primary culture of rat ENS was performed as previously described (Chevalier *et al.* 2008). Experiments were complied with Journal policies and UK regulations on animal experimentation as described by Drummond (2009). Pregnant Sprague–Dawley rats were purchased (CERJ, Le Genest St Isle, France) and manipulated in compliance with the French institutional guidelines. These procedures were approved by the local institutional animal research committee (Agreement E. 44011; Inserm, Nantes, France). Every effort was made to minimize animal suffering and the number of animal used. Rats were killed by an overdose of CO_2 followed by severing the carotid arteries. Intestinal cells obtained after dissection and dissociation were counted and then seeded at a density of 2.4×10^5 cells cm^{-2} on 24-well plates (Corning, Avon, France) previously coated with a 0.5% gelatin solution (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Primary culture was maintained for 14 days with half of the medium (Dubelcco's modified Eagle's medium–F_{12} 1:1 containing 1% of N-2 supplement (Life Technologies, Cergy Pontoise, France)) replaced every day.

Enteric glial cells

Non-transformed or transformed EGCs were obtained as previously described (Ruhl *et al.* 2001). JUG2 was obtained from ENS primary culture derived from rat embryonic intestine (Chevalier *et al.* 2008). After 13 days of culture, primary cultures were trypsinized and seeded in serum-containing medium after differential centrifugation. Following 7 days of culture, isolated areas of cells that resembled morphological glial cells were trypsinized using a cloning cylinder and seeded in a culture flask in serum-containing medium. After 1 month, the cells were immunoreactive for glial but not for neuronal or myofibroblast markers. ECGs

© 2010 The Authors. Journal compilation © 2010 The Physiological Society

Downloaded from J Physiol (jp.physoc.org) at Bibliothèque Universitaire de Nantes on August 10, 2010

were cultured in Dubelcco's modified Eagle's medium (4.5 g l^{-1} glucose; Life Technologies) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Biowest, Nuaillé, France), 50 IU ml^{-1} penicillin and 50 μg ml^{-1} streptomycin (Life Technologies). EGCs were seeded at a density of 50,000 cells cm^{-2} in 12-well plates (Corning). Cells were grown to confluence (for 3 days). To assess the role of EGC conditioned medium (EGC CM), upon IEC proliferation, EGCs were first cultured for 24 h or 48 h after they reached confluency. Then, EGC culture medium was collected, centrifuged at 1000 *g* for 10 min and used immediately. For immunohistochimistry, rat EGCs and primary cultures of rat ENS were first fixed in 4% paraformaldehyde. Then, immunofluorescence staining was performed as described below.

Lentiviral vectors production and transduction of EGCs

The plasmid vectors TRC1-pLKO.1-puro were purchased from Sigma (Mission shRNA library). Plasmid clones expressing a shRNA targeting the lipocalin-prostaglandin D synthase (L-PGDS) mRNA (pLKO.1-puro-sh913) and a non-functional L-PGDS shRNA vector used as a negative control (pLKO.1-puro-sh917), were used to transfect 293T cells. Two other plasmid clones were kindly provided by Dr Patrick Salmon (Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland). The psPax2 packaging plasmid vector expresses the complete sets of structural and accessory viral proteins with the exception of env and vpu, and is devoid of the packaging sequence ψ The plasmid pMD2-G expresses the vesicular stomatitis virus G envelope protein allowing efficient pseudotyping of lentiviral particles and broad cell tropism. Lentiviral vectors particles were generated upon cotransfection of 293T cells with 30 μg transfer vector (TRC1-pLKO.1-puro), and 22.5 μg psPax2 and 15 μg pMD2G, using the transient calcium phosphate method as described previously (Naldini *et al.* 1996). Briefly, 6×10^6 293T cells per 150 cm^2 tissue culture dish (Costar, Brumath, France) were seeded 24 h prior to transfection. Viral supernatants were harvested 48 h post-transfection, cleared by low-speed centrifugation and filtrated using a 45 μm filter (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France). The vector was concentrated by centrifugation at 47,900 *g* for 3 h at 4°C and the viral pellet resuspended in 250 μl of cold advanced alpha-Dubelcco's modified Eagle's medium and stored at −80°C until use.

Cell transductions were carried out on 5000 EGCs cultured with 200 μl fetal calf serum free culture medium and seeded 24 h prior to transduction. The lentivirus was diluted at a concentration of 1/100 (from the prepared stock solution). After overnight incubation at 37°C, culture medium was replaced by fresh EGC medium complemented with 10% fetal calf serum. EGC lines were then grown in medium supplemented with 2 μg ml^{-1} puromycin (Sigma). Upon selection, resistant EGCs were expanded and tested for L-PGDS expression to select the best clones.

Coculture model and treatment of intestinal epithelial cells with EGC CM

Caco-2 epithelial cells were seeded on Transwell filters at a density of 70,000 cells cm^{-2} and EGCs were seeded in the wells of 12-well plates. For coculture experiments, IECs on Transwell filters were placed on the top of wells containing EGCs. In other set of experiments, culture medium with or without 15dPGJ2 5 μM (Sigma), EGC CM with or without the potent and irreversible PPARγ inhibitor GW9662 10 μM (Sigma) (Gupta *et al.* 2001) were added to IECs cultured on Transwell filters. Additional experiments were performed with other IEC lines, i.e. T84 and IEC6, cultured as previously described (Neunlist *et al.* 2007). For transcriptional studies, these experimental conditions were maintained for 24 h. For cell growth studies, these conditions were maintained for 6 days. Half of the culture medium was changed daily.

15-Deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J2 extraction and measurement

Measurement of 15dPGJ2 in EGC CM was performed as previously described (Thevenon *et al.* 2001). Appropriate amounts of internal standard 15dPGJ2-d4 were added to samples before prostaglandin extraction with ethyl acetate. Resulting extracts were dried and treated with 2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl bromide to convert 15dPGJ2 into its derivative. Derivative was then quantified by gas chromatography associated with mass spectrometry with the negative ion chemical ionization mode on the single ion monitoring basis (m/Z = M-181). This was carried out with an Agilent Technologies gas chromatograph (model 6890) interfaced with a quadrupole mass spectrometer (model 5973). The chromatograph was equipped with an HP-1MS fused-silica capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 mm film sickness) at 57°C. Helium and methane were used as carrier and reagent gases, respectively.

Cell counting

For cell growth studies, IECs were harvested with 1% trypsin-EDTA (Life Technologies) and homogenized. Cells were counted in a blinded fashion using Malassez slides (VWR International, Strasbourg, France) and fluorescence activated cell sorting (BD FACS, BD Bioscience, Erembodegem, Belgium). Cell death was estimated using trypan blue assay and

© 2010 The Authors. Journal compilation © 2010 The Physiological Society

Downloaded from J Physiol (jp.physoc.org) at Bibliothèque Universitaire de Nantes on August 10, 2010

7-aminoactinomycin D (BD Biosciences) incorporation using FACS analysis.

Immunofluorescence staining

For immunofluorescence staining, all antibodies were diluted in PBS with 1 mg ml^{-1} sodium azide, 4% horse serum and 1% Triton X-100. Whole mounts of human submucosa and mucosa were incubated for 24 h with PBS sodium azide horse serum and Triton X-100 followed by incubation with rabbit polyclonal anti-PGDS (1:500; Cayman, Spi-Bio, Montigny-le-Bretonneux, France; raised against human PGDS) overnight at 4°C. After extensive rinsing in PBS, whole mounts were incubated with donkey anti-rabbit IgG conjugated with carboxy-methyl-indocyanine (1:500; Beckman Coulter, Roissy, France) or Alexa Fluor 488 (1:400; Molecular Probes, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) for 3 h at room temperature. To show the specificity of the PGDS staining, the antibody was first pre-incubated with the PGDS blocking peptide (w/w, Cayman) for 1 h at room temperature. Next, EGC were incubated with the antibody-blocking peptide solution overnight at 4°C and then stained with the secondary antibody as described below. After PGDS staining, the whole mount was incubated with goat polyclonal anti-S100β (1:100; Santa-Cruz, Tebu-bio, Le Perray en Yveline, France) overnight at 4°C followed by donkey anti-goat IgG conjugated with Alexa Fluor 488 (1:400; Molecular Probes) or carboxy-methyl-indocyanine (1:500; Beckman Coulter) for 3h at room temperature. After PGDS staining, primary culture was incubated with mouse monoclonal anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:100) overnight at 4°C followed by donkey anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 488 fluorescent dye (1:500; Molecular Probes). Following washes, stained samples were observed and acquired with a microscope IX 50 (Olympus) or with the Axiovert 200M microscope coupled to Apotome (Zeiss, Göttingen, Germany).

Real-time RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from Caco-2 cells, EGC cells or human mucosal biopsies using the Qiamp total RNA kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and cDNA was synthetized using standard procedures as previously described (Neunlist *et al.* 2007) and real-time PCR was performed. Primers were designed from the sequence of the human or the rat cDNAs using the Universal ProbeLibrary Assay design Center (https://roche-applied-science.com/sis/rtpcr/url). The sequences of these primers are listed in Table 1. PCR amplifications were performed using the LC480 SYBR Green I master mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol and run on a Rotogene 3000 instrument (Corbett Research, Courtaboeuf, France). Expression of the S6 and GAPDH genes was analysed in parallel as an internal control. Each RT-qPCR reaction for L-PGDS mRNA was directly loaded onto non-denaturing 2% agarose gels, stained with SYBR safe (Invitrogen), and visualized under UV trans-illumination. Specificity of the primers was determined by sequencing the amplification products.

Western blot

EGCs were harvested in RIPA buffer (Millipore) containing 2 mM sodium orthovanadate and proteases inhibitors (Roche, Meylan, France). Equal amounts of lysate were separated using NuPage Novex Bis Tris MiniGels (Invitrogen) before electrophoretic transfer using the iBlot Dry Blotting System (Invitrogen). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline (100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5) containing 5% non-fat dry milk. Membranes were incubated overnight at 4°C with rabbit anti-L-PGDS primary antibodies (1:1000, Cayman). Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin (Amersham, Saclay, France; diluted 1:5000) and visualized by enhanced chemiluminescence detection (ECLplus, Amersham).

PPARγ nuclear translocation assays

To examine PPARγ nuclear translocation in IECs, indirect immunofluorescence staining was performed, using antibodies directed against human PPARγ (Calbiochem, Darmstadt, Germany). Following coculture or treatment of IECs, filters were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min. Immunofluorescence staining was then performed as described above using rabbit polyclonal anti-PPARγ antibody (1:1000) for 1 h. After extensive washing with PBS, filters were incubated with goat anti-rabbit antibodies conjugated with carboxy-methyl-indocyanine (1:500; Beckman Coulter) and 4′,6′-diamidino-2-phenylindole (1 mg l^{-1} in phosphate buffer; Merck, Fontenay-sous-Bois, France) for 30 min. Filters were examined with an IX50 microscope (Olympus) as described above.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Experimental data were compared using a non-parametric Mann–Whitney test or Kruskall–Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test. A P value < 0.05 was considered to be significant.

© 2010 The Authors. Journal compilation © 2010 The Physiological Society

Downloaded from J Physiol (jp.physoc.org) at Bibliothèque Universitaire de Nantes on August 10, 2010

Table 1. Primers for real time RT-PCR analysis

Primer sequences (5′-3′)	Size of the amplicon (bp)	Annealing temperature (°C)	Acquisition temperature (°C)
hPPARγ (NM_138712)			
Fw: 5′-TTGCTGTCATTATTCTCAGTGGA-3′	124	63	82
Rev: 5′-GAGGACTCAGGGTGGTTCAG-3′			
hALPI (NM_001631)			
Fw: 5′-TTTGGTGGCTACACCTTGC-3′	92	63	85
Rev: 5′-CCGTACAGGATGGACGTGT-3′			
hGAPDH (NM_002046)			
Fw: 5′-CTGACTTCAACAGCGACACC-3′	109	63	80
Rev: 5′-TAGCCAAATTCGTTGTCATACC-3′			
hRPS6 (NM_001010)			
Fw: 5′-CCAAGCTTATTCAGCGTCTTGTTACTCC-3′	146	60	86
Rev: 5′-CCCTCGAGTCCTTCATTCTCTTGGC-3′			
rL-PGDS (NM_013015)			
Fw: 5′-GGATTTCCACAGACCCCAGC-3′	130	60	84
Rev: 5′-GCTCTTTCTTCTCCCGGAACC-3′			
hL-PGDS (NM_000954)			
Fw: 5′-AGAAGAAGGCGGCGTTGTCC-3′	195	60	84
Rev: 5′-CCACCACTGACACGGAGTAGG-3′			
rH-PGDS (NM_031644)			
Fw: 5′-CACAGAATAGAACAAGCTGACTGG-3′	133	62	84
Rev: 5′-CTGTGTTTTTGGTCAAATATCTTGC-3′			
hH-PGDS (NM_014485)			
Fw: 5′-CACAGAATAGAACAAGCTGACTGG-3′	133	62	84
Rev: 5′-CTGTGTTTTTGGTCAAATATCTTGC-3′			
rRPS6 (NM_017160)			
Fw: 5′-CCAAGCTTATTCAGCGTCTTGTTACTCC-3′	146	60	86
Rev: 5′-CCCTCGAGTCCTTCATTCTCTTGGC-3′			

Results

EGCs express L-prostaglandin D synthase

We first examined whether EGCs express PGDS, the main enzyme responsible for 15dPGJ2 synthesis. By immunostaining, we found that PGDS was expressed in rat EGC lines (Fig. 1*A*) and in EGCs of rat ENS primary culture (Fig. 1*B*). The specificity of the PGDS staining was validated using a PGDS blocking peptide (Fig. 1*A*). Furthermore, PGDS was expressed in EGCs of colonic human submucosal plexus (Fig. 1*C*) as well as in some subepithelial EGCs closely surrounding colonic crypts (Fig. 1*D*).

As two forms of PDGS have been reported, the lipocalin form of PGDS (L-PGDS) and the haematopoietic form (H-PGDS), we performed transcriptomic studies to characterize their respective expression in EGCs. Using RT-PCR, we found that L-PGDS was expressed in rat EGC lines (Fig. 2*A*), in primary culture of rat ENS (Fig. 2*B*) and in colonic biopsies of healthy subjects (Fig. 2*C*). In contrast, H-PGDS was not expressed in EGC lines but was present in Caco-2 (data not shown). Interestingly, we found a highly and significantly positive correlation between L-PGDS mRNA and S100β mRNA expression in human colonic biopsies ($n = 11$, $r = 0.90$; $P = 0.01$; Fig. 2*D*). No mRNA expression of the L-PGDS form was detected in the other cell lines used in this study (Caco-2 and CCD 18Co; data not shown).

EGCs are a source of 15dPGJ2, natural PPARγ agonist

To determine if EGCs can produce PPARγ natural agonists, EGC CM was analysed using gas chromatography associated with mass spectrometry. We were able to identify 15dPGJ2 in the supernatant of transformed (Fig. 3) and non-transformed EGCs (data not shown).

EGCs inhibit IEC proliferation via the release of 15dPGJ2

After 6 days, EGCs or EGC CM significantly inhibited Caco-2 cell number by 60% and 40% as compared to control, respectively (Fig. 4). To determine whether inhibition of IEC proliferation by EGCs was mediated by glial secretion of 15dPGJ2, we inhibited L-PGDS in EGC by shRNA. L-PGDS mRNA (Fig. 5*A*) and protein (Fig. 5*B*) expression were significantly decreased in EGC transduced with L-PGDS antisense shRNA (EGC

© 2010 The Authors. Journal compilation © 2010 The Physiological Society

Downloaded from J Physiol (jp.physoc.org) at Bibliothèque Universitaire de Nantes on August 10, 2010

shPGDS) as compared to cells treated with a non functional-shRNA (EGC Mock). The antiproliferative effects of EGCs were abolished in EGC shPGDS as compared to EGC or EGC Mock (Fig. 5*C*). Finally, we showed that 15dPGJ2 (5 μM) reduced Caco-2 cell number by 30% (Fig. 6).

EGC and 15dPGJ2 effect in IEC involve PPARγ-dependent pathways

In order to determine whether EGCs can activate PPARγ in Caco-2 cells, we studied PPARγ nuclear translocation in these cells following coculture with EGCs. While PPARγ localisation was cytoplasmic in control condition (Fig. 6*A*), a nuclear localisation was observed after a 24 h coculture both with EGCs (Fig. 6*B*) and EGC CM (Fig. 6*C*). This effect was similar to that obtained when Caco-2 cells were cultured in the presence of rosiglitazone, a synthetic PPARγ agonist (data not shown). Finally, GW9662 (10 μM), a PPARγ antagonist, significantly inhibited the anti-proliferative effects of both EGC CM and 15dPGJ2 on IECs (Fig. 6*D*).

In addition, the anti-proliferative effects of EGCs and EGC CM were observed in T84 and IEC6 (changes in IEC number for T84 and IEC6 as compared to control: EGC 61%; EGC CM 78% ($n = 2$) and EGC 36%; EGC CM 59% ($n = 3$), respectively). In both IEC lines, GW9662 (10 μM) also inhibited the anti-proliferative effect of EGC CM (changes in IEC number for T84 and IEC6 as compared to control: EGC CM 78%; EGC CM+GW9662 90% ($n = 2$) and EGC CM 59%; EGC CM+GW9662 83% ($n = 3$), respectively).

EGCs induce differentiation-related genes expression in IECs through the PPARγ pathway

To determine whether EGC-induced changes in cell number were associated with IEC differentiation, we examined the effects of EGCs on mRNA expression in Caco-2 cells of differentiation-related genes such as PPARγ, E-cadherin and intestinal alkaline phosphatase (hALPI).

EGC CM significantly upregulated PPARγ, E-cadherin and hALPI mRNA expression in Caco-2 cells after 24h

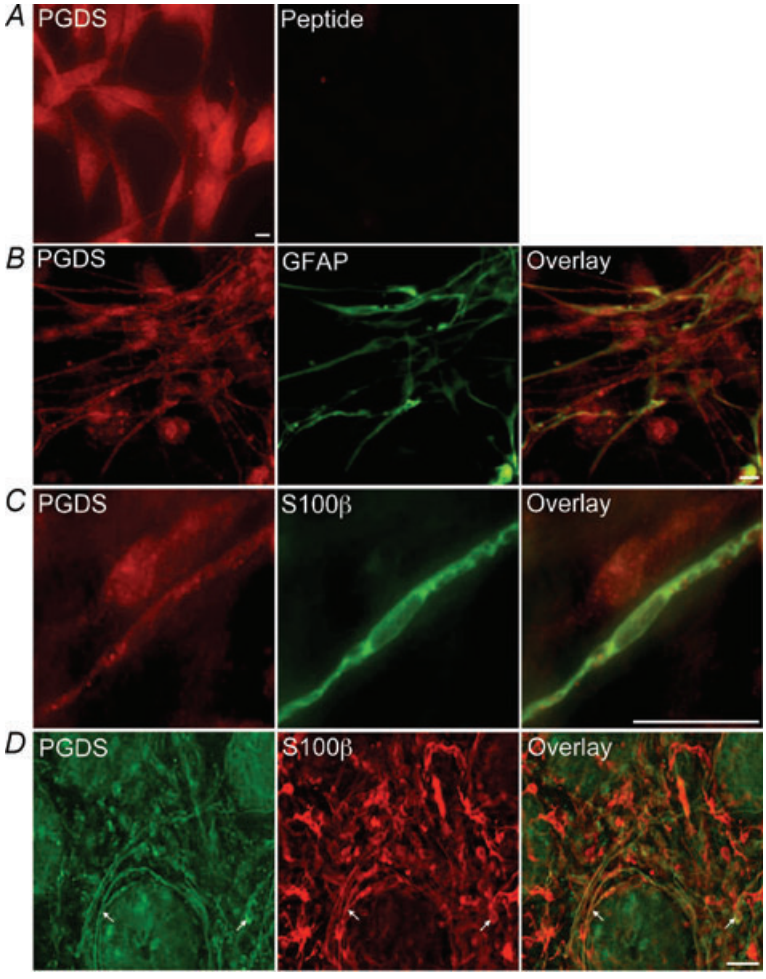


Figure 1. Enteric glial cells express prostaglandin D synthase
Immunofluorescence staining of prostaglandin D synthase (PGDS) in rat enteric glial cell lines without and with blocking peptides (*A*), in primary culture of rat enteric nervous system (ENS) (*B*), in human submucosal plexus (*C*) and in human subepithelial layer (*D*). In primary culture of rat ENS (*B*), glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactive cells were colocalized with PGDS. In human submucosal plexus (*C*) and subepithelial layer (*D*), some S100β-immunoreactive cells were colocalized with PGDS (white arrows). Each picture is representative of five experiments. Scales bars are 5 μm (*A*–*C*) and 100 μm (*D*).

© 2010 The Authors. Journal compilation © 2010 The Physiological Society

Downloaded from J Physiol (jp.physoc.org) at Bibliothèque Universitaire de Nantes on August 10, 2010

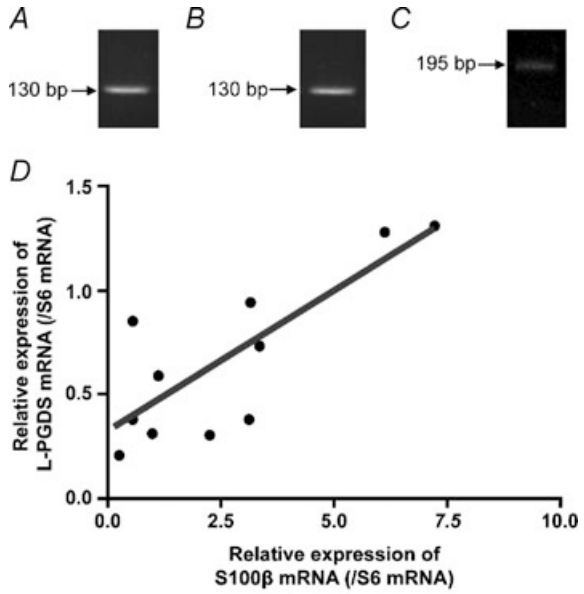


Figure 2. Transcriptional expression of lipocalin-prostaglandin D synthase in enteric glial cells
RT-PCR analysis of lipocalin-prostaglandin D synthase (L-PGDS) mRNA expression showed a 130 bp band in rat enteric glial cell lines (*A*) and in rat primary culture of enteric nervous system (*B*). In human colonic biopsies, a 195 bp band was detected (*C*). Quantitative PCR analysis of human colonic biopsies revealed a positive correlation between L-PGDS and S100β mRNA expression (*D*) ($n = 11$; $r^2 = 0.63$; $P = 0.01$; linear regression).

of culture. Interestingly, GW9662 treatment completely abrogated these effects (Fig. 7).

Discussion

A major finding of this study was the identification of EGC as a cellular source of the natural PPARγ ligand, 15dPGJ2. We further demonstrated that 15dPGJ2 mediated in part the anti-proliferative effects of EGC via PPARγ activation in IECs.

15dPGJ2 produced by EGCs was synthesized by L-PGDS but not H-PGDS. These two enzymes are encoded by two different genes (Urade & Eguchi, 2002). H-PGDS is a glutathione-requiring enzyme also named 'spleen' type (Christ-Hazelhof & Nugteren, 1979; Urade *et al.* 1987) and has been described in spleen, thymus, bone marrow, intestine, skin and stomach (Ujihara *et al.* 1988; Urade *et al.* 1989, 1990). L-PGDS is a glutathione-independent enzyme, also named 'brain' type, identified in the brain (Urade *et al.* 1985). The expression of L-PGDS but not H-PGDS in EGCs is reminiscent of what has been observed in glial cells of the central nervous system. Indeed, L-PGDS but not H-PGDS has been reported in the central nervous system in oligodendrocytes (Beuckmann *et al.* 2000) and in astrocytes in culture (Giacomelli *et al.* 1996). In contrast, in dorsal root ganglia, satellite cells and Schwann cells only

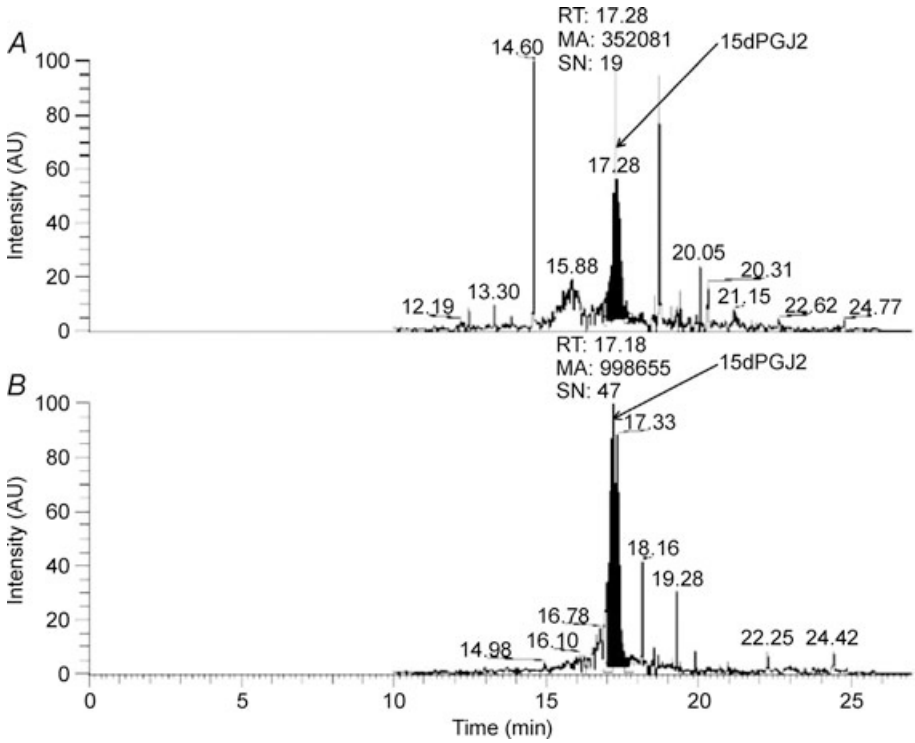


Figure 3. Enteric glial cells secrete 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J2
Gas chromatography associated with mass spectrometry analysis showed the presence of 15dPGJ2 in transformed enteric glial cell conditioned medium (representative pattern of three experiments) (*A*). A control pattern was generated with Dubelcco's modified Eagle medium supplemented with 15dPGJ2 (*B*).

© 2010 The Authors. Journal compilation © 2010 The Physiological Society

Downloaded from J Physiol (jp.physoc.org) at Bibliothèque Universitaire de Nantes on August 10, 2010

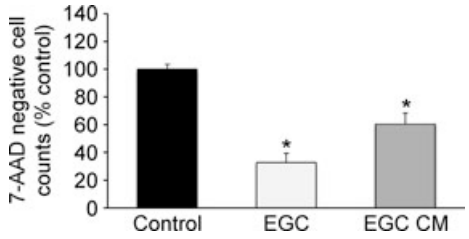


Figure 4. Enteric glial cells inhibit Caco-2 cell proliferation
Fluorescence activated cell sorting analysis of 7-aminoactinomycin D (7-AAD) negative Caco-2 cells showed that enteric glial cells (EGCs) or EGC conditioned medium (EGC CM) induced a significant decrease in Caco-2 cell number after 6 days of culture as compared to untreated (Control) Caco-2 monolayer.

express H-PGDS while L-PGDS expression is restricted to a subclass of neurons (Vesin *et al.* 1995*a*,*b*). These differences in PGDS type expression in dorsal root ganglia and in EGCs could be due to their different developmental origin or different glial cell subtypes (Dulac & Le Douarin, 1991). Indeed, our data also suggest that all EGCs do not express L-PGDS. Interestingly, in the colon besides EGCs, other cell types of the submucosa probably also express L-PGDS, as suggested in Fig. 1*C*. In particular, we observed L-PGDS expression in enteric neurons (data not shown), but its functional role remains to be identified.

Besides EGCs, other cell types of the gut produce 15dPGJ2, in particular by H-PGDS. Indeed, H-PGDS is the most representative form of PGDS in the gut and is expressed in IECs, mast cells and fibroblasts (Park *et al.* 2007; Hokari *et al.* 2009). This is consistent with our results showing the absence of L-PGDS mRNA expression in IECs and fibroblasts. However, expression of L-PGDS can be induced in these cells, for instance following infection with *H. pilory* (Hokari *et al.* 2009).

Since EGCs are major cellular constituents of the intestinal epithelial barrier microenvironment, we next determined the impact of EGC-derived 15dPGJ2 on IEC functions. EGCs densely innervate the intestinal epithelial barrier, surrounding intestinal crypts, and are located at a distance of less than 1 μm from the basolateral side of IECs (Mestres *et al.* 1992; Neunlist *et al.* 2007). Consistently, our study showing that subepithelial EGCs express L-PGDS set the anatomical basis for a paracrine action of EGC derived 15dPGJ2 on IECs. EGCs are known to inhibit cell proliferation and reduce paracellular permeability via

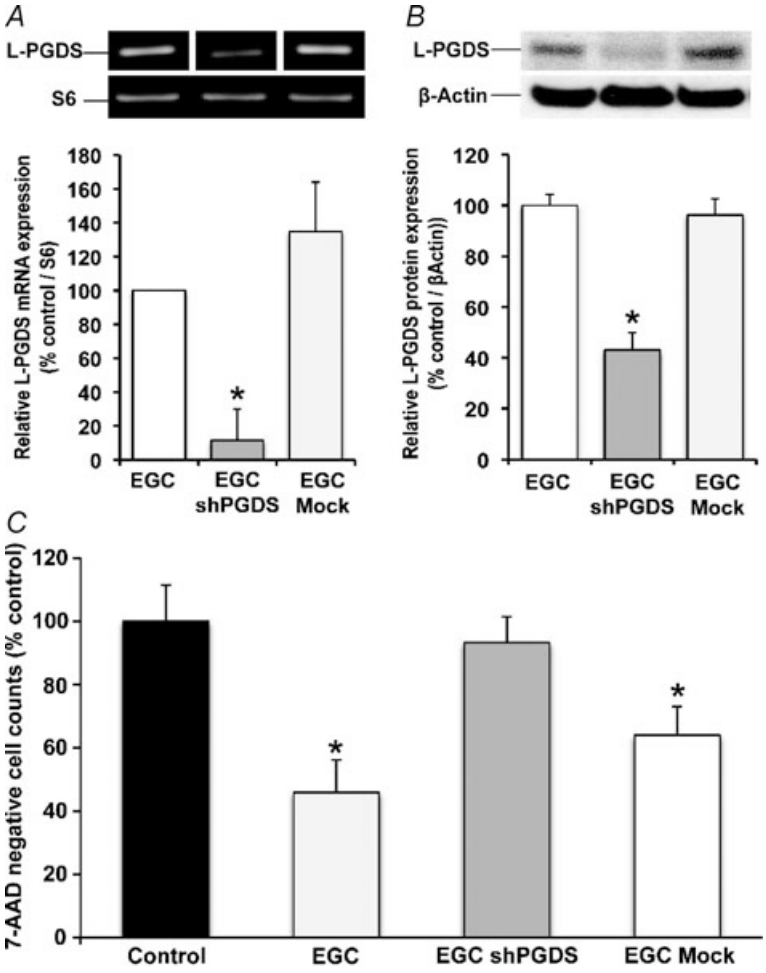


Figure 5. Transduction of EGC with L-prostaglandin D synthase shRNA abrogate their anti-proliferative effects
RT-qPCR analysis showed that lipocalin-prostaglandin D synthase (L-PGDS) mRNA expression was significantly decreased in L-PGDS shRNA transduced enteric glial cells (EGC shPGDS) as compared to mock-transduced EGCs (EGC Mock) and non-transduced EGCs (EGC) ($n = 5$, Kruskall–Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test; $P < 0.05$) (*A*). Western blot analysis showed that L-PGDS protein expression was significantly decreased in L-PGDS shRNA transduced enteric glial cells (EGC shPGDS) as compared to mock-transduced EGCs (EGC Mock) and non-transduced EGCs (EGC) ($n = 7$, Kruskall–Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test; $P < 0.05$) (*B*). Fluorescence activated cell sorting analysis of 7-aminoactinomycin D (7-AAD) negative Caco-2 cells showed that coculture of Caco-2 cells with EGCs or EGC Mock but not EGC shPGDS induced a significant decrease in Caco-2 cell number as compared to control. Values are expressed as means ± S.E.M. ($n = 4$; Kruskall–Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test; $P < 0.05$) (*C*).

© 2010 The Authors. Journal compilation © 2010 The Physiological Society

Downloaded from J Physiol (jp.physoc.org) at Bibliothèque Universitaire de Nantes on August 10, 2010

secretion of soluble factors such as TGFβ1 and GSNO, respectively (Neunlist *et al.* 2007; Savidge *et al.* 2007). These mediators were only partly responsible for the effects observed suggesting that other mediators were involved. In this context, we showed that EGC-derived 15dPGJ2 significantly reduced intestinal cell proliferation. In contrast, 15dPGJ2 had no effect upon paracellular permeability on differentiated Caco-2 monolayer (data

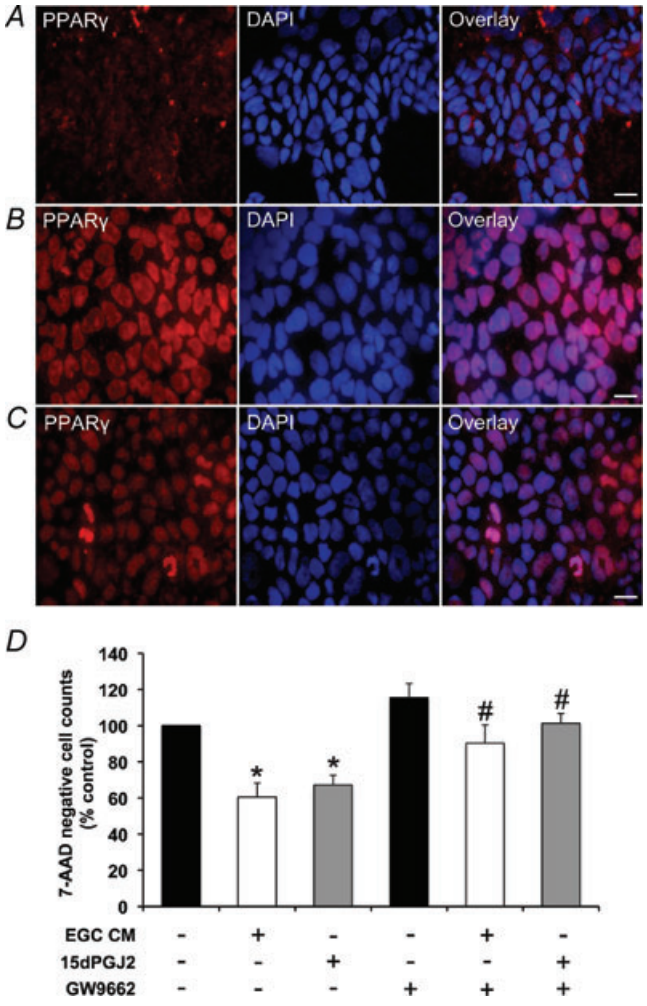


Figure 6. Effect of enteric glial cells on peroxisome proliferator-activated receptor γ translocation in Caco-2 cells
Immunofluorescence staining of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) in Caco-2 cells showed that it was uniformly distributed in the cytoplasm of cells cultured alone (*A*). In contrast, following coculture with enteric glial cells (*B*) or treatment with enteric glial cell conditioned medium (EGC CM) (*C*), PPARγ was mainly localized in the nucleus, identified by 4′,6′-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. Data are representative of 3 independent experiments. Scale bars: 10 μm. *D*, fluorescence activated cell sorting analysis of 7-aminoactinomycin D (7-AAD) negative Caco-2 cells showed that EGC CM ($n = 6$) or 15dPGJ2 (5 μM; $n = 3$) induced a significant decrease in Caco-2 cell number as compared to control. PPARγ antagonist (GW9662, 10 μM) alone did not modify the cell number as compared to control. In the presence of GW9662, EGC CM ($n = 6$) or 15dPGJ2 (5 μM; $n = 3$) did not decrease Caco-2 cell number as compared to control. Values are expressed as means ± S.E.M. from 6 independents experiments (Kruskall–Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test; $P < 0.05$ * as compared to non treated Caco-2; # as compared to Caco-2 treated with EGC CM or 15dPGJ2).

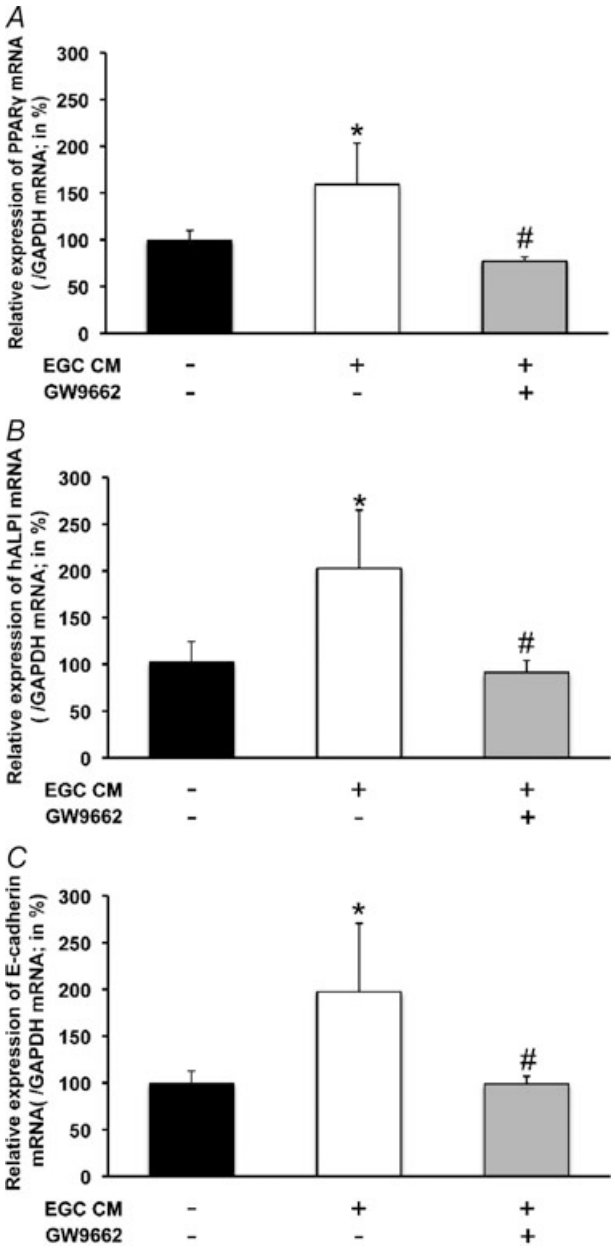


Figure 7. Enteric glial cells induce mRNA expression of differentiation marker genes
RT-qPCR analysis showed that mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) (*A*), intestinal alkaline phosphatase (hALPI) (*B*) and E-cadherin (*C*) was increased in Caco-2 cells cultured with enteric glial cell conditioned medium (EGC CM) as compared to Caco-2 cultured alone ($n = 7$). This effect was completely abrogated following culture with EGC CM in presence of GW9662 ($n = 3$). Values are expressed as means ± S.E.M. (Kruskall–Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test; $P < 0.05$ * as compared to non treated Caco-2; # as compared to Caco-2 treated with EGC CM).

© 2010 The Authors. Journal compilation © 2010 The Physiological Society

Downloaded from J Physiol (jp.physoc.org) at Bibliothèque Universitaire de Nantes on August 10, 2010

not shown), consistent with a recent report showing that under basal condition 15dPGJ2 does not modify paracellular permeability (Ponferrada *et al.* 2007).

Another important finding of this study is the demonstration that EGC effects upon IEC proliferation and differentiation are mediated in part through activation of PPARγ. EGCs induce a nuclear translocation of PPARγ in IECs and their functional effects are inhibited by a specific PPARγ antagonist. It is well known that, *in vitro*, treatment of IECs with PPARγ ligands induces cell-cycle blockade resulting in inhibition of cell proliferation and stimulation of cell differentiation (Kitamura *et al.* 1999; Gupta *et al.* 2001). Consistently, we have shown that EGCs induce a cell cycle blockade at G0/G1 in Caco-2 cells (Neunlist *et al.* 2008). In IECs, the cellular target of PPARγ, following activation by EGCs, remains unknown but could involve, for instance, Krüppel-like factor 4 (KLF4). Indeed, PPARγ activation modulates cell cycle regulators such as cyclin D1 or p21WAF1/Cip1, through the regulation of KLF4 (Koeffler, 2003; Rageul *et al.* 2009). KLF4 also plays major roles in IEC differentiation and maturation (Dang *et al.* 2000; Chen *et al.* 2003). In addition, EGC CM induced upregulation of mRNA expression of differentiation-related genes in IECs, i.e. hALPI (Hinnebusch *et al.* 2004), E-cadherin (Laprise *et al.* 2002) and PPARγ (Kato *et al.* 2004). These results are consistent with a recent transcriptomic study showing that EGCs up-regulated similar differentiation-related genes (Van Landeghem *et al.* 2009). Altogether these results suggest that EGCs promote IEC differentiation. Furthermore, these effects of EGCs were probably mediated by activation of PPARγ, as they were blocked by GW9662. The effects of EGCs on E-cadherin mRNA expression are in contrast with a previous study showing that EGCs did not modify E-cadherin protein expression (Savidge *et al.* 2007). This discrepancy could be explained in part by the experimental condition used. Savidge *et al.* (2007) characterized the impact of EGC in a nearly confluent IEC monolayer, probably constituted of differentiated cells. In contrast, in our study, IECs are in a proliferating state and could thus probably be more able to respond to differentiating signals induced by EGCs. Such a hypothesis is further supported by our results demonstrating that the modulation by EGCs of specific genes in IECs is dependent on their state of differentiation (data not shown).

In conclusion, these data add novel insights into the mechanisms by which EGCs are involved in the control of IEC functions. In particular, we demonstrate that EGCs secrete 15dPGJ2, which inhibits IEC proliferation and upregulates differentiation-related genes via activation of PPARγ. Furthermore, this study can be pursued to determine whether EGCs could also synthesize and release other natural PPARγ ligands which remain to be identified. This study provides new understanding for the role of EGCs in the modulation of IEC functions and has putative implications for early nutritional or pharmacological interventions in pathologies where the EGC network is altered, such as inflammatory bowel diseases or colorectal cancerous states.

References

Beuckmann CT, Lazarus M, Gerashenko D, Mizoguchi A, Nomura S, Mohri I, Uesugi A, Kaneko T, Mizuno N, Hayaishi O & Urade Y (2000). Cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in the central nervous sytem of the adult rat. *J Comp Neurol* **428**, 62–78.

Bull AW, Steffensen KR, Leers J & Rafter JJ (2003). Activation of PPARγ in colon tumor cell lines by oxidized metabolites of linoleic acid, endogenous ligands for PPAR γ. *Carcinogenesis* **24**, 1717–1722.

Cabarrocas J, Savidge TC & Liblau RS (2003). Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* **41**, 81–93.

Chen X, Whitney EM, Gao SY & Yang VW (2003). Transcriptional profiling of Kruppel-like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation. *J Mol Biol* **326**, 665–677.

Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, Thinard R, Naveilhan P, Vanden Berghe P & Neunlist M (2008). Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol* **586**, 1963–1975.

Christ-Hazelhof E & Nugteren DH (1979). Purification and characterisation of prostaglandin endoperoxide D-isomerase, a cytoplasmic, glutathione-requiring enzyme. *Biochim Biophys Acta* **572**, 43–51.

Dang DT, Pevsner J & Yang VW (2000). The biology of the mammalian Kruppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 1103–1121.

Drummond GB (2009). Reporting ethical matters in *The Journal of Physiology*: standards and advice. *J Physiol* **587**, 713–719.

Dulac C & Le Douarin NM (1991). Phenotypic plasticity of Schwann cells and enteric glial cells in response to the microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6358–6362.

Giacomelli S, Leone MG, Grima J, Silvestrini B & Cheng CY (1996). Astrocytes synthesize and secrete prostaglandin D synthetase in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1310**, 269–276.

Gupta RA, Brockman JA, Sarraf P, Willson TM & DuBois RN (2001). Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells. *J Biol Chem* **276**, 29681–29687.

Hinnebusch BF, Siddique A, Henderson JW, Malo MS, Zhang W, Athaide CP, Abedrapo MA, Chen X, Yang VW & Hodin RA (2004). Enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase is a target gene of the gut-enriched Kruppel-like factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G23–30.

Hokari R, Nagata N, Kurihara C, Watanabe C, Komoto S, Okada Y, Kawaguchi A, Nagao S, Hibi T, Nagata K, Urade Y & Miura S (2009). Increased expression and cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in *Helicobacter pylori*-induced gastritis. *J Pathol* **219**, 417–426.

© 2010 The Authors. Journal compilation © 2010 The Physiological Society

Downloaded from J Physiol (jp.physoc.org) at Bibliothèque Universitaire de Nantes on August 10, 2010

Kato M, Kusumi T, Tsuchida S, Tanaka M, Sasaki M & Kudo H (2004). Induction of differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor γ expression in colon cancer cell lines by troglitazone. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**, 73–79.

Kitamura S, Miyazaki Y, Shinomura Y, Kondo S, Kanayama S & Matsuzawa Y (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor γ induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Jpn J Cancer Res* **90**, 75–80.

Koeffler HP (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor γ and cancers. *Clin Cancer Res* **9**, 1–9.

Laprise P, Chailler P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ & Rivard N (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* **277**, 8226–8234.

Lefebvre M, Paulweber B, Fajas L, Woods J, McCrary C, Colombel JF, Najib J, Fruchart JC, Datz C, Vidal H, Desreumaux P & Auwerx J (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor γ is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J Endocrinol* **162**, 331–340.

Mestres P, Diener M & Rummel W (1992). Electron microscopy of the mucosal plexus of the rat colon. *Acta Anat (Basel)* **143**, 275–282.

Nakamura T, Tsuchiya K & Watanabe M (2007). Crosstalk between Wnt and Notch signalling in intestinal epithelial cell fate decision. *J Gastroenterol* **42**, 705–710.

Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM & Trono D (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263–267.

Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Ruhl A, Lardeux B, Savidge T, Paris F & Galmiche JP (2007). Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-β1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G231–241.

Neunlist M, Van Landeghem L, Bourreille A & Savidge T (2008). Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* **263**, 577–583.

Park JM, Kanaoka Y, Eguchi N, Aritake K, Grujic S, Materi AM, Buslon VS, Tippin BL, Kwong AM, Salido E, French SW, Urade Y & Lin HJ (2007). Hematopoietic prostaglandin D synthase suppresses intestinal adenomas in ApcMin/+ mice. *Cancer Res* **67**, 881–889.

Ponferrada A, Caso JR, Alou L, Colon A, Sevillano D, Moro MA, Lizasoain I, Menchen P, Gomez-Lus ML, Lorenzo P, Cos E, Leza JC & Menchen L (2007). The role of PPARγ on restoration of colonic homeostasis after experimental stress-induced inflammation and dysfunction. *Gastroenterology* **132**, 1791–1803.

Rageul J, Mottier S, Jarry A, Shah Y, Theoleyre S, Masson D, Gonzalez FJ, Laboisse CL & Denis MG (2009). KLF4-dependent, PPARγ-induced expression of GPA33 in colon cancer cell lines. *Int J Cancer* **125**, 2802–2809.

Ruhl A, Trotter J & Stremmel W (2001). Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglial cell lines from the myenteric plexus of adult rat. *Neurogastroenterol Motil* **13**, 95–106.

Sancho E, Batlle E & Clevers H (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 763–770.

Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C & Spiegelman BM (1998). Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARγ. *Nat Med* **4**, 1046–1052.

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

Su W, Bush CR, Necela BM, Calcagno SR, Murray NR, Fields AP & Thompson EA (2007). Differential expression, distribution, and function of PPAR-γ in the proximal and distal colon. *Physiol Genomics* **30**, 342–353.

Thevenon C, Guichardant M & Lagarde M (2001). Gas chromatographic-mass spectrometric measurement of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J_2, the peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, in urine. *Clin Chem* **47**, 768–770.

Ujihara M, Horiguchi Y, Ikai K & Urade Y (1988). Characterization and distribution of prostaglandin D synthetase in rat skin. *J Invest Dermatol* **90**, 448–451.

Urade Y & Eguchi N (2002). Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68–69**, 375–382.

Urade Y, Fujimoto N & Hayaishi O (1985). Purification and characterization of rat brain prostaglandin D synthetase. *J Biol Chem* **260**, 12410–12415.

Urade Y, Fujimoto N, Ujihara M & Hayaishi O (1987). Biochemical and immunological characterization of rat spleen prostaglandin D synthetase. *J Biol Chem* **262**, 3820–3825.

Urade Y, Ujihara M, Horiguchi Y, Igarashi M, Nagata A, Ikai K & Hayaishi O (1990). Mast cells contain spleen-type prostaglandin D synthetase. *J Biol Chem* **265**, 371–375.

Urade Y, Ujihara M, Horiguchi Y, Ikai K & Hayaishi O (1989). The major source of endogenous prostaglandin D2 production is likely antigen-presenting cells. Localization of glutathione-requiring prostaglandin D synthetase in histiocytes, dendritic, and Kupffer cells in various rat tissues. *J Immunol* **143**, 2982–2989.

Van Landeghem L, Mahe MM, Teusan R, Leger J, Guisle I, Houlgatte R & Neunlist M (2009). Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: impact on intestinal epithelial barrier functions. *BMC Genomics* **10**, 507.

Vesin MF, Billotte C & Droz B (1995*a*). Biosynthesis of prostaglandin D2 by motoneurons and dorsal horn microneurons: a biochemical and high resolution immunocytochemical study in chick spinal cord. *Neuroscience* **69**, 967–975.

Vesin MF, Urade Y, Hayaishi O & Droz B (1995*b*). Neuronal and glial prostaglandin D synthase isozymes in chick dorsal root ganglia: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *J Neurosci* **15**, 470–476.

© 2010 The Authors. Journal compilation © 2010 The Physiological Society

Downloaded from J Physiol (jp.physoc.org) at Bibliothèque Universitaire de Nantes on August 10, 2010

Wachtershauser A, Loitsch SM & Stein J (2000). PPAR-γ is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 380–385.

Author contributions

K.B.-N. and M.M.M. designed the study and carried out and experiments. P.A. and H.A. performed experiments. S.B. carried out lentiviral vectors production and performed EGC transduction. M.G.D., B.L. and A.B. contributed to the studies and gave their expertise in writing the paper. M.N., K.B.-N. and D.M. supervised the project and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors are grateful to Mr M. Guichardant (INSA, Lyon, France) for the gas chromatography associated with mass spectrometry measurement of 15dPGJ2 and to Mr P. Hulin and Mrs M. Clément (Cellular imaging platform PiCell, IFR26, Nantes, France) for mucosal pictures. Maxime M. Mahé is supported by a grant from Nantes Métropole. This work was supported by a grant from INCa Appel d'Offre Libre 2007.

© 2010 The Authors. Journal compilation © 2010 The Physiological Society

Downloaded from J Physiol (jp.physoc.org) at Bibliothèque Universitaire de Nantes on August 10, 2010

III.4. Article 2 : La 15d-PGJ_2 est impliquée dans la neuroprotection par les cellules gliales entériques contre un stress oxydant *via* une voie Nrf2 dépendante.

Article 2: The omega-6 derivative 15d-PGJ_2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress via a Nrf2-dependent pathway.

*Hind Abdo, **Maxime M Mahé**, Pascal Derkinderen, Kalyane Bach-Ngohou, Michel Neunlist and Bernard Lardeux*

L'étude précédente a permis d'identifier la 15d-PGJ_2 comme étant un nouveau facteur glial impliqué dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Dans la littérature, plusieurs études montré que la 15d-PGJ_2 présentait des effets neuroprotecteurs dans le SNC face à différents types de stress, comme le stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le stress nitrosylant ou le stress induit par le glutamate (Aoun *et al.*, 2003b; Lim *et al.*, 2004). La 15d-PGJ_2 permet également de prévenir la mort neuronale induite dans un modèle d'ischémie/reperfusion (Lin *et al.*, 2006).

L'objectif de cet article a donc été de caractériser les effets neuroprotecteurs de la 15d-PGJ_2 produite par les CGE, particulièrement sur les neurones entériques.

Des effets neuroprotecteurs de la 15d-PGJ_2 contre un stress oxydant (H_2O_2) ont été observés sur les cultures primaires de SNE après un prétraitement de 72h avec des doses de 1 à 3 µM sans effet toxique en absence de H_2O_2 (Figure 1 A ; Article 2). Parallèlement, nous avons démontré que le prétraitement des cellules SH-SY5Y, pendant 24h, avec des doses croissantes de 15d-PGJ_2 entraîne une diminution de la mort cellulaire induite par l'H_2O_2. Cet effet est dose-dépendant, avec un effet neuroprotecteur maximal de 70% observé à 5 µM (Figure 1 C ; Article 2).

Comme pour l'étude précédente, afin de mettre en évidence l'implication de la 15d-PGJ_2 dans les effets protecteurs des CGE, nous avons utilisé une approche génétique par ARN interférence, basée sur l'inhibition de la synthèse de la 15d-PGJ_2. Une co-culture préalable de 96h avec les CGE protège les cellules SH-SY5Y d'un stress oxydant avec une diminution très significative du taux de cellules mortes comparé à celui observé avec les cellules SH-SY5Y cultivées seules (Figure 1E ; Article 2). Après la co-culture pendant 96 heures des cellules SH-SY5Y avec des CGE shPGDS, l'analyse de la mort cellulaire montre que les effets protecteurs des CGE lors d'un stress oxydant sont significativement réduits. En revanche, la co-culture avec les CGE shMOCK n'entraîne pas de modification des effets neuroprotecteurs des CGE. L'inhibition partielle des effets neuroprotecteurs confirme que la 15d-PGJ_2 d'origine gliale est en partie impliquée dans les effets des CGE (Figure 1 E ; Article 2).

La prostaglandine 15d-PGJ_2 est impliquée dans différentes voies de signalisation (Straus & Glass, 2001). La voie la plus connue est celle permettant l'activation du récepteur nucléaire PPARγ. Ses effets physiologiques peuvent également impliquer d'autres voies comme la voie Nrf2 qui est activée par la 15d-PGJ_2 (Kansanen *et al.*, 2009) ou la voie NF-kB qui est inhibée par la 15d-PGJ_2 (Straus *et al.*, 2000).

Dans l'article précédent, nous avons montré que les effets de la 15d-PGJ_2 dans les CEI sont en partie médiés par la voie PPARγ. De la même manière, nous avons voulu déterminer si la voie PPARγ était responsable des effets neuroprotecteurs observés en utilisant une approche pharmacologique. Les cellules SH-SY5Y ont ainsi été incubées en présence de rosiglitazone, un agoniste de PPARγ. L'analyse de la mort cellulaire montre que la rosiglitazone ne reproduit pas les effets neuroprotecteurs de la 15d-PGJ_2 (Figure 2 A ; Article 2). De plus, le prétraitement des cellules SH-SY5Y par le GW9662, un antagoniste spécifique de PPARγ, n'inhibe pas les effets protecteurs de la 15d-PGJ_2 contre un stress oxydant induit par l'H_2O_2. (Figure 2 B ; Article 2). L'absence d'effet sur la neuroprotection lors de l'utilisation d'un agoniste ou d'un antagoniste de PPARγ suggère que les effets neuroprotecteurs de la 15d-PGJ_2 sont indépendants de la voie PPARγ.

La 15d-PGJ_2 peut agir au travers d'autres voies de signalisation comme la voie Nrf2 (Straus & Glass, 2001). Il a été montré que le facteur de transcription Nrf2 régule la protection cellulaire contre le stress oxydant par l'activation de gènes antioxydants tels que la glutamate cystéine ligase (sous-unité catalytique, GCLc), impliquée dans la production de glutathion (Kobayashi et al, 2006). Nous avons recherché l'implication de la voie Nrf2 dans les effets neuroprotecteurs de la 15d-PGJ_2.

La co-culture de cellules SH-SY5Y avec des CGE pendant 96 heures induit une augmentation significative de l'expression protéique de Nrf2 dans les cellules SH-SY5Y (Figure 3 A ; Article 2). De plus, nous avons observé que le traitement par la 15d-PGJ_2 induit la localisation nucléaire de Nrf2 associée à une augmentation de l'expression de la protéine dans ces cellules (Figure 3 B-C ; Article 2). Nous avons montré que l'expression des ARNm de la GCLc, cible de Nrf2, augmente après 4 heures de traitement par la 15d-PGJ_2 à 5 µM (Figure 4 D ; Article 2). De même, l'expression des ARNm de NQO1 (NADPH Quinone Oxydoréductase 1), une autre cible de Nrf2, est augmentée après 4 heures de traitement par la

15d-PGJ_2 à des concentrations allant de 2,5 à 5 µM (Figure S1 A-B ; Article 2). Enfin, un traitement des cellules SH-SY5Y par la 15d-PGJ_2 aux mêmes concentrations induit une augmentation significative de la concentration intracellulaire de glutathion (Figure 3 E ; Article 2). Ces résultats suggèrent que les effets neuroprotecteurs de la 15d-PGJ_2 sont probablement associés à une activation de la voie Nrf2.

Dans une dernière partie, nous avons étudié l'implication de la voie Nrf2 dans les cultures primaires de SNE traitées par 3 µM de 15d-PGJ_2. Ce traitement induit une augmentation de l'expression de Nrf2 dans les neurones entériques observée au bout de 2 heures (Figure 4 A-B ; Article 2) et celle de la GCLc au bout de 24 heures (Figure 4 C-D ; Article 2). Enfin, l'utilisation du monochlorobimane (molécule fluorescente formant des complexes avec le glutathion intracellulaire) a permis de montrer une augmentation intracellulaire du glutathion dans les neurones entériques traités par la 15d-PGJ_2 (Figure 4 E ; Article 2). Ces résultats montrent que la voie Nrf2 et l'activation de gènes anti-oxydants sont également impliqués dans les neurones entériques en réponse à un traitement par la 15d-PGJ_2.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme de neuroprotection par les CGE. Ce mécanisme, complémentaire de celui décrit par Abdo *et al* (2010), agirait en augmentant les capacités de défense des neurones contre un stress oxydant (Figure 36).

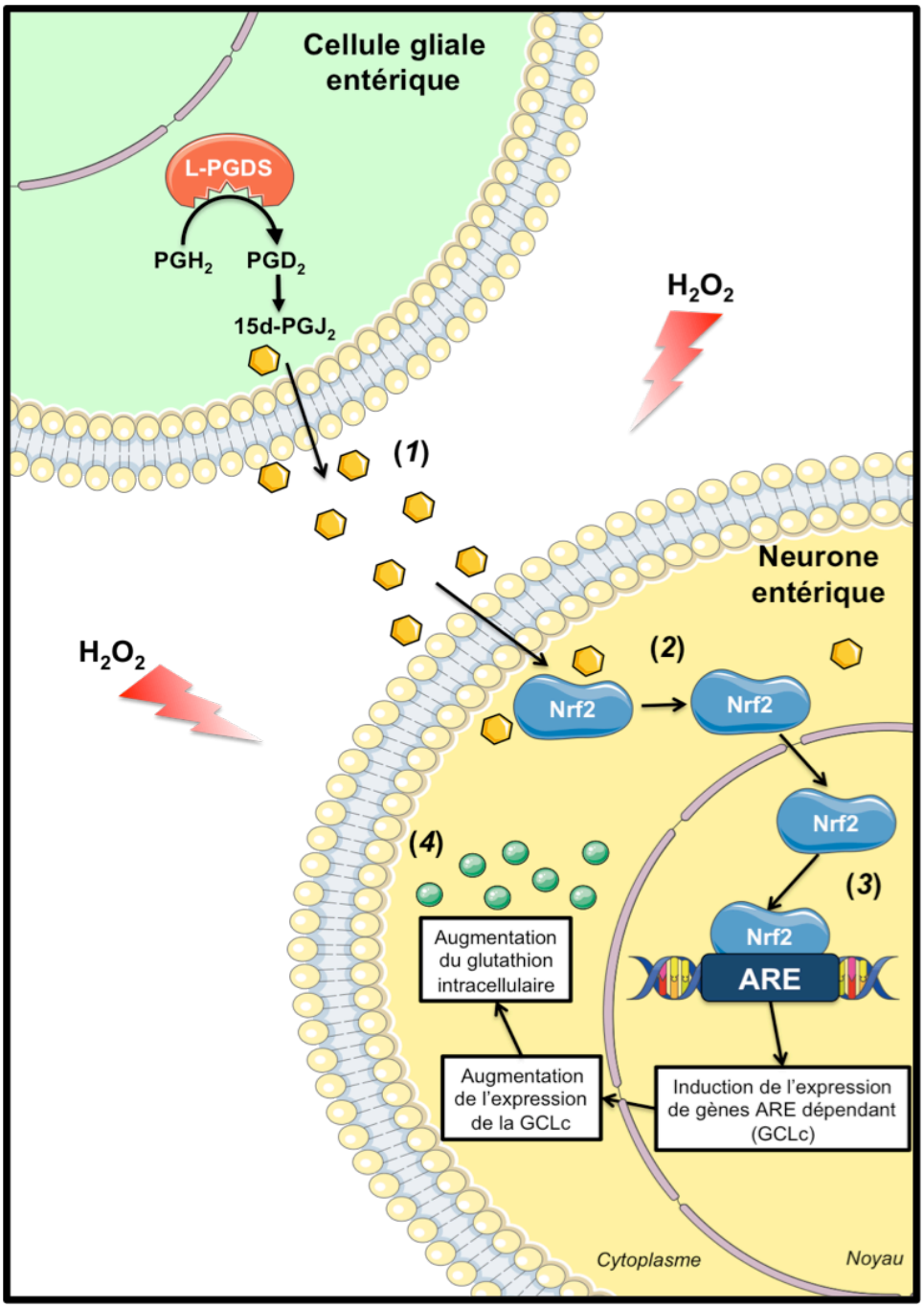


Figure 36 : Schéma récapitulatif de la régulation de la neuroprotection par la 15d-PGJ$_2$ gliale

Les cellules gliales entériques (CGE) produisent et sécrètent la 15d-PGJ$_2$ (1). La 15d-PGJ$_2$ traverse les membranes des neurones pour activer Nrf2 et induire sa translocation nucléaire (2). Nrf2 activé se fixe sur les éléments de réponse des gènes antioxydants (ARE) pour induire l'expression de gènes antioxydants tels que la glutamate cystéine ligase (GCLc) (3). L'augmentation de l'expression de la GCLc engendre une augmentation de la production intracellulaire de glutathion, permettant ainsi la protection des neurones contre un stress oxydant (4).

The omega-6 derivative 15d-PGJ2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress

Hind Abdo[1,2,3], Maxime Mahé[1,2,3], Pascal Derkinderen[1,2,4], Kalyane Bach-Ngohou[1,2,3], Michel Neunlist[1,2,3] and Bernard Lardeux[1,2,3].

1) INSERM, U913, Nantes, F-44000 France
2) Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44000 France
3) CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, F-44000 France
4) CHU Nantes, Service de Neurologie, Nantes, F-44000 France

Corresponding author :

Bernard Lardeux, PhD INSERM U913 1, place Alexis Ricordeau 44093 Nantes. Tel: 0033(0)240087522 Fax: 0033(0)240087506; E-mail: bernard.lardeux@univ-nantes.fr

Abstract

Increasing evidence suggests that enteric glial cells (EGC) are critical for enteric neuron survival and functions. In particular, EGC exert direct neuroprotective effects mediated in part by the release of glutathione. However, other glial factors such as those identified to regulate intestinal epithelial barrier and in particular the ω-6 derivative 15d-$\Delta^{12,14}$ prostaglandin J2 (15d-PGJ2) could also be involved in EGC-mediated neuroprotection. Therefore, our study aimed to assess the putative role of EGC-derived 15d-PGJ2 in their neuroprotective effects. We first showed that pretreatment of primary cultures of enteric nervous system (ENS) or human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) with 15d-PGJ2 dose dependently prevented hydrogen peroxide neurotoxicity. Furthermore, neuroprotective effects of EGC were significantly inhibited following genetic invalidation in EGC of the key enzyme involved in15d-PGJ2 synthesis, i.e. L-PGDS. We next showed that 15d-PGJ2 effects were not blocked by PPARγ inhibitor (GW9662) but were associated with an increase of Nrf2 expression in SH-SY5Y cells and enteric neurons. Finally, 15d-PGJ2 induced a significant increase in glutamate cysteine ligase (GCL) expression and intracellular glutathione in SH cells and enteric neurons. In conclusion, we identified 15d-PGJ2 as a novel glial-derived molecule with neuroprotective effect in the ENS. This study further supports the concept that omega-6 derivatives like 15d-PGJ2 might be used in preventive and/or therapeutic strategies for the treatment of enteric neuropathies

Introduction

The enteric nervous system (ENS) is an integrative neuronal network located within the gastrointestinal tract involved in the regulation of gastrointestinal functions such as motility and secretion (Schemann & Neunlist, 2004; Furness, 2006). The ENS is composed of neurons and enteric glial cells (EGC). In general, EGC largely outnumber neurons (Hoff *et al.*, 2008) and are likely to represent the ENS counterpart of central nervous system (CNS) astrocytes as they resemble astrocytes both morphologically and immunohistochemically (Jessen & Mirsky, 1980; Gabella, 1981; Ferri *et al.*, 1982).

Emerging evidence suggest a central role for EGC in the control of enteric neuronal functions. EGC control neuronal phenotype (Aube et al, 2006), neuronal survival (Abdo et al, 2010) and are suggested to be involved in neurogenesis (Laranjeira et al, 2011). Transgenic models in which EGC are altered, display changes in enteric neurochemical phenotype (Aube *et al.*, 2006) or enteric neuronal loss (Bush *et al.*, 1998). More recently, a neuroprotective effect of EGC has been demonstrated (Abdo *et al.*, 2010). Using co-culture experiments of EGC with primary cultures of rat ENS or human neuroblastoma cells, we have shown that EGC prevent hydrogen peroxide or dopamine neurotoxicity. These neuroprotective effects are partially but not completely mediated by glutathione (GSH), suggesting that other glial factors are involved.

We have recently identified EGC as a source of 15d-PGJ2, a lipid mediator that exerts anti-proliferative and pro-differentiation effects on intestinal epithelial cells (Bach-Ngohou et al ., 2010). 15d-PGJ2 is a derivative of omega-6 polyunsaturated fatty acids and produces from the non-enzymatic dehydration of PGD2, which is synthesized from prostaglandin H2 by prostaglandin D synthase (PGDS) (Straus & Glass, 2001). Identified initially as an endogenous ligand for peroxisome proliferator-activated

receptor-γ (PPARγ), 15d-PGJ2 can also activate other signalling pathways, among which is the Nrf-2 pathway. Once activated, the Nrf2 transcription factor increase the expression of anti-oxidant genes such as NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), heme oxygenase 1 (HO1) or glutamate cysteine ligase (GCL) (Jaiswal, 2004; Kansanen *et al.*, 2009). Recently, 15d-PGJ2 has been shown to exert protective effects during ischemia and NMDA-induced excitotoxicity (Lin et al, 2006; Ou et al, 2006, Zhao et al, 2006). Whether 15d-PGJ2 is involved in EGC-mediated protection on enteric neurons has not been studied yet. Therefore, we aimed to characterize the putative neuroprotective role of EGC-derived 15d-PGJ2 in enteric neurons and to identify the signaling pathways involved.

Methods

Cell culture models

Enteric glial cells (EGC)

Non-transformed EGC (NT) were obtained from Dr A. Rühl and prepared as previously described (Ruhl *et al.*, 2001). EGC (ROG) were obtained from adult rat myenteric plexus in our laboratory. Briefly, longitudinal muscle/ myenteric plexus (LMMP) layers from adult rat small intestine were treated for enzymatic and mechanical dissociation in GentleMACS tubes C (MiltenyiBiotec, Paris, France). Individual ganglia were selected and cultured in 0.5% gelatin-coated plates. After two weeks of culture, up to 95% of cells expressed typical markers of EGC such as Sox10, GFAP and S100β. EGC were cultured in DMEM medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum (FBS, BioWest, Nuaillé, France), 1% (v/v) glutamine (Invitrogen), 50 µg/mL Streptomycin (Invitrogen) and 50 U/mL Penicillin (Invitrogen).

PGD2 synthase deficient enteric glial cell lines

EGC were transfected with pLKO.1-puro shPTGDS vector plasmids coding for the shRNA against Prostaglandin D2 synthase (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Cell transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Medium was renewed after 24 h and cells were treated with puromycin (10 µg/mL, Invitrogen) until stable expression of transgene. Efficient shRNA sequence was (shPTGDS): CCGGCCAGTG TGAGACCAAGATCATCTCGAGATGATCTTGGTCTCACCTGGTTTTT. An

unefficient shRNA construction was used as a negative control (shMOCK): CCGGG CCCAACTTTCAACAAGACAACTCGAGTTGTCTTGTTGAAAGTTGGGCTTTTT.

Neuroblastoma cell line

Neuroblastoma SH-SY5Y cells were purchased from ATCC and maintained in SH-SY5Y medium: DMEM/F12 (Invitrogen) supplemented with 15% (v/v) FBS, 1% (v/v) glutamine, 1% (v/v) non-essential amino acids (Invitrogen), 50 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin.

Co-culture experiments

EGC, shPTGDS EGC or shMOCK EGC were seeded onto Transwell porous filters (Corning, Avon, France) at a density of 0,16 $x10^5$ cells/cm^2. After 24 h, EGC filters were placed in presence of SH-SY5Y (0,16 $x10^5$ cells/cm^2) seeded into the bottom of 12-well plates and cultured for 96 h. EGC and culture medium were removed prior incubation of SH cells for 24h with fresh SH-SY5Y medium containing 200 µM H_2O_2.

Primary cultures of ENS

Primary cultures of ENS were prepared from intestines of E15 rat embryos and used after 13 days of culture as previously described (Chevalier et al, 2008; Abdo et al, 2010). Primary cultures of ENS were treated with varying concentrations of 15d-PGJ2 (1, 2 and 3 µM) for 24, 48 and 72 h. Thereafter, cultures were incubated with fresh medium for 24 h with or without 200 µM H_2O_2.

Assessment of cell viability

Flow cytometry analysis of 7-AAD permeable cells

Both floating and attached SH-SY5Y cells were collected. Attached SH-SY5Y cells were dissociated following treatment with trypsin-EDTA. Cell suspension was then centrifuged for 5 min at 550x*g* and resuspended in 500 µL phosphate buffered saline (PBS). Membrane permeability was evaluated using 7-amino-actinomycin D (50 ng/µl, 7-AAD) as DNA fluorescent marker. SH-SY5Y cell suspensions (200 µl) were incubated with 5 µl 7-AAD for 10 min before flow cytometry using BD FACSArray (Le Pont de Claix, France). Results were expressed as percentage of total cells.

Detection of Neuron Specific Enolase (NSE)

NSE released in the culture medium was quantified by immunoradiometric assay (Prolifigen® NSE IRMA, Diasorin; Stillwater, USA) according to the manufacturer's protocol. Results are expressed in ng/mL.

Immunohistochemical analysis

SH-SY5Y cells and primary cultures of ENS were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde at room temperature for 1 h. Cells then washed in PBS and permeabilized for 30 min in PBS/NaN3 containing 0.5% (v/v) Triton X-100 (Sigma) and 4% (v/v) horse serum before incubation overnight at 4°C with mouse anti-β-tubulin III (1:1000, Sigma), mouse anti-Hu C/D (1:200, Molecular Probes, Invitrogen), rabbit anti-Nrf-2 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or goat anti-Glutamate Cysteine Ligase catalytic subunit GCLc (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Cells were then washed in PBS and incubated for 30 min with following secondary antibodies coupled to fluorophores (donkey anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat IgG conjugated to carboxymethylindocyanine (1:500; Jackson Laboratories, purchased from Immunotech, Marseille, France), anti-mouse IgG conjugated to FluoProbes 488 (1:200; Interchim,

Montluçon, France)) or with DAPI (1 mg/L in PBS; Merck, Fontenay-sous-Bois, France) for 10 min.

Images were acquired with a digital camera (model DP71, Olympus, France) coupled to a fluorescence microscope (Olympus IX 50) and analyzed with the Cell B software (Soft Imaging System, Olympus).

In primary cultures of ENS, we have quantified Nrf-2 and GCLc *in situ* expression using ImageJ software based analysis (http://rsb.info.nih.gov/ij/). Mean fluorescence density of Nrf-2 corresponding to each enteric neuron (Hu-positive cell) was determined from two independent experiments for control ENS cultures (19 to 49 enteric neurons per picture, 9 pictures, 305 enteric neurons analyzed) and for 2 h 15d-PGJ2-treated ENS cultures (21 to 39 enteric neurons per picture, 10 pictures, 292 enteric neurons analyzed). Mean fluorescence density of GCLc corresponding to each enteric neuron (Hu-positive cell) was determined for control ENS cultures (24 to 37 enteric neurons per picture, 3 pictures, 97 enteric neurons analyzed) and for 24 h 15d-PGJ2-treated ENS cultures (17 to 27 enteric neurons per picture, 3 pictures, 69 enteric neurons analyzed). Mean fluorescence density was corrected by measuring background for each picture.

Western blot

EGC transfected or not with shRNA PTGDS plasmids were harvested with RIPA (Millipore, Molsheim, France) containing a cocktail of protease inhibitors (Complete, Roche, Meylan, France). Following a short centrifugation, insoluble material was removed and discarded. Equal amounts of lysate (soluble fraction) were separated using the Invitrogen NuPage Novex Bis Tris MiniGels™ before electrophoretic transfer with the iBlot™ Dry Blotting System also from Invitrogen. Membranes were blocked for 1 h

at room temperature in Tris-buffered saline (TBS) (100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5) with 5% non-fat dry milk. Membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies. Rabbit anti-PGDS Lipocalin type (1:1000, Cayman, Interchim, Montluçon, France), rabbit anti-Nrf-2 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) and mouse anti-β-actin antibodies (1:5000; Sigma) were used in this study. Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Amersham, Les Ulis, France; 1:5000) and visualized by enhanced chemiluminescent detection (ECL plus, Amersham). The relevant immunoreactive bands were quantified with laser-scanning densitometry and analyzed with NIH Image J software. The value of PGDS and Nrf2 immunoreactivity were normalized to the amount of β-actin immunoreactivity in the same sample.

RT- Quantitative PCR

Total RNA extraction from cells was performed with RNA nucleospin kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) according to the manufacturer's instructions. For reverse transcription, two micrograms of purified total RNA was denaturated and subsequently processed for reverse transcription using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. PCR amplifications were performed using the Absolute Blue SYBR green fluorescein kit (ABgene, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol and run on MyiQ thermocycler (Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

The following primers were used:

S6. # NM_001010

Forward Primer: 5'-CCAAGCTTATTCAGCGTCTTGTTACTCC-3'

Reverse Primer: 5'-CCCTCGAGTCCTTCATTCTCTTGGC-3'

GCLc # NM_001498

Forward Primer: 5'-AGGTGACATTCCAAGCCTGC-3'

Reverse Primer: 5'- CCCCAGCGACAATCAATGTC-3'

NQO1 # NM_000903

Forward Primer: 5'-CATGAACGAGGCTGCTGCAGC-3'

Reverse Primer: 5'- CCAGCCTTTCAGAATGGCAGG-3'

Relative quantitation of gene expression was determined by using standard curve method and endogenous control ribosomal protein S6 mRNA. The ratio GCLc/S6 or NQO1/S6 were compared to control experimental conditions.

Intracellular Glutathione assessment

In SH-SY5Y cells, total glutathione (reduced and oxidized forms) was measured in a microtiter plate assay using glutathione assay kit (Sigma). The content of glutathione was normalized to the protein content quantified by the Bio-Rad protein assay.

In primary cultures of ENS, glutathione was identified *in situ* using monochlorobimane (MCB, Sigma) (Chatterjee et al, 1999). Following treatment, MCB (60 µmol/L) was directly added to the medium and incubated for 20 min at 37°C before fixation with 4% PFA and standard immunostaining procedures.

Reagents

15d-PGJ2, hydrogen peroxide, 7-amino actinomycin D (7-AAD), rosiglitazone, and GW9662 were all purchased from Sigma.

Statistics

Data are expressed as means ± SEM. Results were analyzed by t-test or one-way

ANOVA followed by Tukey's post-hoc test or two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoctest. Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) was used for statistical analysis.

Results

EGC-derived 15d-PGJ2 has neuroprotective effects

We first studied whether 15d-PGJ2 exerts neuroprotective effects in the ENS. Pre-incubation of primary cultures of ENS with 15d-PGJ2 significantly and dose-dependently reduced the NSE release induced by H_2O_2 (Figure 1A). Furthermore, 15d-PGJ2 prevented H_2O_2-induced morphological alterations of the enteric neuronal network (Figure 1B). In order to assess a direct neuroprotective effect of 15d-PGJ2, SH-SY5Y cells were pre-treated with 15d-PGJ2 before challenging them with H_2O_2. Under these conditions, 15d-PGJ2 dose-dependently reduced the proportion of 7-AAD positive SH-SY5Y cells induced by H_2O_2 as compared to controls (SH-SY5Y cells not pre-treated with 15d-PGJ2) (Figure 1C).

As previously described in transformed EGC (Bach-Ngohou et al, 2010), non-transformed EGC (NT or ROG) also express PGDS, the key enzyme in the production of 15d-PGJ2 (Figure 1D). Expression of PGDS was silenced in EGC using small hairpin RNA (shRNA). PGDS protein level was significantly decreased in EGC shPTGDS shRNA but and was not modified in EGC shMOCK (Figure 1D). We tested the effects of PGDS invalidation of EGC in co-cultures with SH-SY5Y cells. The protective effects of EGC upon SH-SY5Y cells were significantly reduced when cells were co-cultured in the presence of EGC transfected with PTGDS shRNA but not with EGC transfected with mock shRNA (Figure 1E).

15d-PGJ2 neuroprotective effects are independent of PPARγ pathway

We next aimed at identifying signalling pathways in SH-SY5Y cells involved in the 15d-PGJ2-neuroprotective effects. We first focused on the PPARγ pathway, as 15d-PGJ2 is a natural ligand of PPARγ receptors (Scher & Pillinger, 2005). We showed that treatment of SH-SY5Y cells with the PPARγ agonist rosiglitazone did not modify the proportion of 7-AAD positive SH-SY5Y cells induced by H_2O_2 as compared to control (Figure 2A). Consistently, treatment of SH-SY5Y with a PPARγ inhibitor (GW9662) did not modify the neuroprotective effects of 15d-PGJ2 (Figure 2B).

15d-PGJ2 neuroprotective effects are associated to the activation Nrf-2 pathway

Among other signalling pathways putatively involved in EGC neuroprotective effects and known to be modulated by 15d-PGJ2 is the Nrf-2 pathway (Kansanen *et al.*, 2009).

We first demonstrated that Nrf-2 protein expression is significantly increased in SH-SY5Y cells co-cultured with EGC but not with SH-SY5Y cells as compared to control (SH-SY5Y cells cultured alone) (Figure 3A). Moreover, treatment of SH-SY5Y cells with 15d-PGJ2 induced a significant increase in Nrf2 protein expression (Figures 3B-C).

We next determined whether 15d-PGJ2 also modulates the expression of anti-oxidant genes regulated by Nrf-2 such as GCLc (catalytic subunit of GCL), the key enzyme in glutathione biosynthesis. We showed that 15d-PGJ2 time-dependently increased the expression of GCLc mRNA in SH-SY5Y cells (Figure 3D). We also demonstrated that 15d-PGJ2 dose-dependently increased intracellular glutathione levels in SH-SY5Y cells (Figure 3E). Moreover, 15d-PGJ2 increased in a concentration- and time-dependent fashion NQO1 mRNA expression (Figure S1).

15d-PGJ2 neuroprotective effects in primary cultures of ENS are associated with Nrf2 pathway and glutathione synthesis

In a final part of this study, we determined whether 15d-PGJ2 activates similar pathway in the ENS. Treatment of ENS primary culture with 15d-PGJ2 induced a significant increase in both Nrf-2 (Figures 4A-B) and GCLc (Figure 4C-D) expressions in enteric neurons (identified by their immuoreactivity for Hu). Using monochlorobimane (MCB) to measure *in situ* intracellular glutathione, we showed that treatment with 15d-PGJ2 induced an increase of MCB intensity in enteric neurons as compared to control (Figure 4E).

Discussion

In this study, we identified EGC-derived 15d-PGJ2 as a novel glial mediator with major neuroprotective effects upon enteric neurons. We further showed that 15d-PGJ2 effects were associated with the activation of Nrf2 pathway leading to an increase in neuronal intracellular production of glutathione. Therefore, the use of ω6-derivatives like 15d-PGJ2 might be a novel preventive and therapeutic strategy for the treatment of enteric neuropathies.

A major finding of our study is the demonstration of the neuroprotective effects of 15d-PGJ2 in the ENS. Indeed, 15d-PGJ2 prevented H_2O_2-induced neuronal cell death in primary cultures of ENS in a dose-dependent manner. Previous studies have already demonstrated a protective role for 15d-PGJ2 against oxidative stress but these results were mainly observed in undifferentiated neurons or neuroblastoma cells (Aoun *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008). Interestingly, 15d-PGJ2 can also protect rat cortical neurons *in vitro* and *in vivo* from NMDA-induced excitotoxicity (Zhao *et al.*, 2006). Similarly, 15d-PGJ2 can limit acute brain damage induced by experimental ischemia in rat, probably due to its neuroprotective effects (Lin *et al.*, 2006; Ou *et al.*, 2006). Protective effects of 15d-PGJ2 observed in neurons also extend to other cell types such as endothelial cells (Levonen *et al.*, 2001; Hosoya *et al.*, 2005) or epithelial cells (Garg & Chang, 2004; Poncin *et al.*, 2008) during various stress conditions.

Another finding was that co-culture with EGC and 15d-PGJ2 increased the expression of transcription factor Nrf2 in enteric neurons and in SH-SY5Y cells. The increase of Nrf2 protein expression could be due to in Nrf2 protein stability. Indeed,

15d-PGJ2 can dissociate Keap1 (cytosolic Nrf2 inhibitor) and Nrf2 proteins preventing Nrf2 ubiquitinylation and subsequent degradation by the proteasome (Nguyen *et al.*, 2004; Kansanen *et al.*, 2009). In contrast, our study suggests that 15d-PGJ2 neuroprotection does not involve PPARγ dependent pathway, as its effect is not blocked by the specific antagonist GW9662 nor reproduced by the PPARγ agonist rosiglitazone. This is in agreement with other studies suggesting that the protective effect of 15d-PGJ2 are independent of PPARγ pathway (Aoun *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2004) but, in these studies, pathways responsible for neuroprotection remained unidentified.

Our study also showed that the increase of Nrf2 expression in enteric neurons and SH-SY5Y cells was associated with an increase of one of its target gene GCL. This is consistent with known binding of Nrf2 to Antioxidant Response Element (ARE) and the ARE-mediated regulation of anti-oxidant enzyme gene expression such as NQO1, HO1 or GCL (Jaiswal, 2004; Kansanen *et al.*, 2009). Furthermore, 15d-PGJ2 enhanced GCL gene expression was associated with an increase of intracellular concentrations of glutathione in enteric neurons and SH-SY5Y cells. Similarly, activation of Nrf2 leads to an increase of glutathione in neurons of mouse brain (Escartin et al, 2011), in astrocytes (Shih *et al.*, 2003), PC12 cells (Lim *et al.*, 2004) or even endothelial cells (Levonen *et al.*, 2001).

This increase of glutathione induced by 15d-PGJ2 could be responsible for enhanced neuroprotection against oxidative stress. However, other factors released by EGC like GDNF (Steinkamp *et al.*, 2003; von Boyen et al, 2006) could also increase glutathione synthesis in enteric neurons. Indeed, GDNF protects PD cybrids from H_2O_2-induced neuronal death by enhancing intracellular GSH (Onyango *et al.*, 2005). In addition, GDNF treatment can also enhance GSH level in rat striatum (Chao & Lee, 1999).

This study also further highlights the central role of GSH in EGC-mediated neuroprotective effects (Figure 6). Indeed, we previously showed that EGC can directly synthesize and release glutathione. The constitutive release of GSH by EGC might be responsible for neuroprotective effect in the extracellular microenvironment of neurons. Concomitantly, in this study, we showed that EGC via the secretion of factors such as 15d-PGJ2 can also enhance neuronal concentration of glutathione further improving neuroprotection by acting in part in the intracellular environment of neurons.

In conclusion, this study reinforces the central role of EGC in ENS neuroprotection and in maintenance of gut homeostasis (Neunlist et al, 2007; Savidge et al, 2007; Abdo et al, 2010; Flamant et al, 2011; Van Landeghem et al, 2011). In particular, via production of the omega-6 derivative 15d-PGJ2, EGC can act on both enteric neurons (by Nrf2 pathway) and intestinal epithelial cells (via PPARγ pathway; Bach-Ngohou *et al.*, 2010). Interestingly, recent studies have shown that omega-3 fatty acid derivatives can also modulate ENS phenotype (de Quelen *et al.*, 2011), further identifying lipid molecules as novel modulators of ENS and gut functions.

Author contributions

H.A carried out, experiments and wrote the manuscript. M.M.M. carried out experiments. P.D., K.B and M.N. contributed to the studies and gave their expertise in writing the paper. B.L. designed the study, supervised the project and wrote the manuscript.

Acknowledgements

H.A. was supported by a grant from Inserm Pays de la Loire and SanTDige Foundation. M.M.M. is supported by a grant from Nantes-Métropole. B.L. is funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

References

Abdo H, Derkinderen P, Gomes P, Chevalier J, Aubert P, Masson D, Galmiche JP, Vanden Berghe P, Neunlist M & Lardeux B (2010). Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J* 24, 1082-1094.

Aoun P, Watson DG & Simpkins JW (2003). Neuroprotective effects of PPARgamma agonists against oxidative insults in HT-22 cells. *Eur J Pharmacol* 472, 65-71.

Aube AC, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F, Liblau R, Galmiche JP & Neunlist M (2006). Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 55, 630-637.

Bach-Ngohou K, Mahe MM, Aubert P, Abdo H, Boni S, Bourreille A, Denis MG, Lardeux B, Neunlist M & Masson D (2010). Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J Physiol* 588, 2533-2544.

Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH & Sofroniew MV (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93, 189-201.

Chao CC & Lee EHY (1999). Neuroprotective mechanism of glial cell line derived neurotrophic factor on dopamine neurons: role of antioxidation. *Neuropharmacology* 38, 913-916.

de Quelen F, Chevalier J, Rolli-Derkinderen M, Mourot J, Neunlist M & Boudry G (2011). n-3 polyunsaturated fatty acids in the maternal diet modify the postnatal development of nervous regulation of intestinal permeability in piglets. *J Physiol* 589, 4341-4352.

Escartin C, Won SJ, Malgorn C, Auregan G, Berman AE, Chen P-C, Déglon N, Johnson JA, Suh SW & Swanson RA (2011). Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 facilitates neuronal glutathione synthesis by upregulating neuronal excitatory amino acid transporter 3 expression. *J Neurosci* 31, 7392-7401.

Ferri GL, Probert L, Cocchia D, Michetti F, Marangos PJ & Polak JM (1982). Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature* 297, 409-410.

Flamant M, Aubert P, Rolli-Derkinderen M, Bourreille A, Neunlist MR, Mahe MM, Meurette G, Marteyn B, Savidge T, Galmiche JP, Sansonetti PJ & Neunlist M (2011). Enteric glia protect against Shigella flexneri invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut* 60, 473-484.

Furness HB (2006). *The Enteric Nervous System*. Blackwell Publishing.

Gabella G (1981). Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience* 6, 425-436.

Garg TK & Chang JY (2004). 15-deoxy-delta 12, 14-Prostaglandin J2 prevents reactive oxygen species generation and mitochondrial membrane depolarization induced by oxidative stress. *BMC Pharmacol* 4, 6.

Hoff S, Zeller F, von Weyhern CW, Wegner M, Schemann M, Michel K & Ruhl A (2008). Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J Comp Neurol* 509, 356-371.

Hosoya T, Maruyama A, Kang MI, Kawatani Y, Shibata T, Uchida K, Warabi E, Noguchi N, Itoh K & Yamamoto M (2005). Differential responses of the Nrf2-Keap1 system to laminar and oscillatory shear stresses in endothelial cells. *J Biol Chem* 280, 27244-27250.

Jaiswal AK (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 36, 1199-1207.

Jessen KR & Mirsky R (1980). Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 286, 736-737.

Kansanen E, Kivela AM & Levonen AL (2009). Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Free Radic Biol Med* 47, 1310-1317.

Kim JW, Li MH, Jang JH, Na HK, Song NY, Lee C, Johnson JA & Surh YJ (2008). 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) rescues PC12 cells from H2O2-induced apoptosis through Nrf2-mediated upregulation of heme oxygenase-1: potential roles of Akt and ERK1/2. *Biochem Pharmacol* 76, 1577-1589.

Laranjeira C, Sandgren K, Kessaris N, Richardson W, Potocnik A, Vanden Berghe P & Pachnis V (2011). Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J Clin Invest* 121, 3412-3424.

Levonen AL, Dickinson DA, Moellering DR, Mulcahy RT, Forman HJ & Darley-Usmar VM (2001). Biphasic effects of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) on glutathione induction and apoptosis in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1846-1851.

Lim SY, Jang JH, Na HK, Lu SC, Rahman I & Surh YJ (2004). 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J(2) protects against nitrosative PC12 cell death through up-regulation of intracellular glutathione synthesis. *J Biol Chem* 279, 46263-46270.

Lin TN, Cheung WM, Wu JS, Chen JJ, Lin H, Liou JY, Shyue SK & Wu KK (2006). 15d-prostaglandin J2 protects brain from ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 481-487.

Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Ruhl A, Lardeux B, Savidge T, Paris F & Galmiche JP (2007). Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G231-241.

Nguyen T, Yang CS & Pickett CB (2004). The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic Biol Med* 37, 433-441.

Onyango IG, Tuttle JB & Bennett JP, Jr (2005). Brain-derived growth factor and glial cell line-derived growth factor use distinct intracellular signaling pathways to protect PD cybrids from H2O2-induced neuronal death. *Neurobiol Dis* 20, 141-154.

Ou Z, Zhao X, Labiche LA, Strong R, Grotta JC, Herrmann O & Aronowski J (2006). Neuronal expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) and 15d-prostaglandin J2--mediated protection of brain after experimental cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 1096, 196-203.

Poncin S, Gerard AC, Boucquey M, Senou M, Calderon PB, Knoops B, Lengele B, Many MC & Colin IM (2008). Oxidative stress in the thyroid gland: from harmlessness to hazard depending on the iodine content. *Endocrinology* 149, 424-433.

Ruhl A, Franzke S, Collins SM & Stremmel W (2001). Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G1163-1171.

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

Schemann M & Neunlist M (2004). The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1, 55-59.

Scher JU & Pillinger MH (2005). 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol* 114, 100-109.

Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA & Murphy TH (2003). Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci* 23, 3394-3406.

Steinkamp M, Geerling I, Seufferlein T, von Boyen G, Egger B, Grossmann J, Ludwig L, Adler G & Reinshagen M (2003). Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 124, 1748-1757.

Straus DS & Glass CK (2001). Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* 21, 185-210.

Van Landeghem L, Chevalier J, Mahe MM, 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, G976-987.

von Boyen GBT, Steinkamp M, Geerling I, Reinshagen M, Schäfer KH, Adler G & Kirsch J (2006). Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 12, 346-354.

Zhao X, Ou Z, Grotta JC, Waxham N & Aronowski J (2006). Peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) activation protects neurons from NMDA excitotoxicity. *Brain Res* 1073-1074, 460-469.

Figure legends

<u>Figure 1:</u> ***EGC-derived 15d-PGJ2 exerts neuroprotection against oxidative stress-induced cell death***

A. Primary cultures of ENS were treated or not with H_2O_2 (200 µM; 24 h; filled and empty bars respectively) with or without (control) previous treatments with 15d-PGJ2 **(**1, 2 or 3 µM; 72 h). Neuron specific enolase (NSE) released in the medium was determined by immunoradiometric assay. Values are the mean ± SEM of from six to eleven independent experiments (#$p<0.05$ as compared to cultures without H_2O_2 ; *$p<0.05$ as compared to primary cultures treated with H_2O_2 without 15d-PGJ2 pretreatment; two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test).

B. Primary cultures of ENS were treated or not with H_2O_2 (200 µM, 24 h) with or without previous treatment with 15d-PGJ2 (3 µM; 72 h). Immunostaining was performed with anti-β-tubulin III antibodies. Pictures are representative of 4 independent experiments. Scale bar: 100 µm.

C. SH-SY5Y cells were treated or not with H_2O_2 (200 µM; 24 h; filled and empty bars respectively) with or without (control) previous treatments with different concentrations of 15d-PGJ2 (0.1, 1 or 5 µM; 24 h). Neuronal cell death was analyzed by measuring the cell permeability to 7-amino-actinomycin D (% 7-AAD^+ cells) by flow cytometry. Values are the mean ± SEM from four independent experiments (#$p<0.05$ as compared to conditions without H_2O_2; *$p<0.05$ as compared to conditions treated with

H_2O_2 without 15d-PGJ2 pretreatment; two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test).

D. EGC were transfected with shRNA PTGDS (EGC shPTGDS) or with shRNA PTGDS non efficient construction (EGC shMOCK). Insert: different non-transformed EGC (NT; ROG) express L-PGDS. Immunoblot analysis using antibodies against PGDS or β−Actin were carried out from EGC extracts. Quantitative analysis was performed by measuring band densities with ImageJ. Values are the mean ± SEM from four independent experiments (*$p<0.05$ as compared to EGC or EGC shMOCK; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

E. SH-SY5Y cells were treated or not with H_2O_2 (200 µM; 24 h; filled and empty bars respectively) after 96 h co-cultures with EGC, EGC shPTGDS or EGC shMOCK.. Neuronal cell death was analyzed by measuring the cell permeability to 7-amino-actinomycin D (% 7-AAD^+ cells) by flow cytometry. Values are the mean ± SEM from five independent experiments (#$p<0.05$ as compared to control without H_2O_2, *$p<0.05$ as compared to H_2O_2 treated SH-SY5Y cells alone; †$p<0.05$ as compared to SH-SY5Y cells co-cultured with EGC or EGC shMOCK; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

<u>Figure 2:</u> 15d-PGJ2 neuroprotective effects are independent of PPARγ pathway

A. SH-SY5Y cells were treated or not with H_2O_2 for (200 µM; 24 h; filled and empty bars respectively) after previous treatment with rosiglitazone (5 µM; 24 h). Neuronal cell death was analyzed by measuring the cell permeability to 7-amino-actinomycin D (% 7-AAD^+ cells) by flow cytometry. Values are the mean ± SEM from six independent

experiments (#p<0.05 as compared to untreated SH-SY5Y cells (control, empty bar); one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

B. SH-SY5Y cells were treated or not with H_2O_2 (200 µM; 24 h; filled and empty bars respectively) after treatment with 15d-PGJ2 (5 µM; 24 h) preceded or not by 24 h pre-treatment with GW9662 (10 µM). Neuronal cell death was analyzed by measuring the cell permeability to 7-amino-actinomycin D (% 7-AAD^+ cells) by flow cytometry. Values are the mean ± SEM from four independent experiments (#p<0.05 as compared to untreated conditions without H_2O_2 (empty bar); *p<0.05 as compared to untreated conditions with H_2O_2 (filled bar); one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

Figure 3: ***15d-PGJ2 neuroprotective effects are associated to the activation of Nrf-2 pathway***

A. SH-SY5Y cells were cultured alone or co-cultured with EGC or SH-SY5Y cells during 96 h. Immunoblot analysis using antibodies against Nrf-2 or β–Actin was performed from SH-SY5Y extracts and was quantified by measuring band densities with ImageJ. Values are the mean ± SEM from seven independent experiments (*p<0.05 as compared to control; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

B. SH-SY5Y cells were treated or not (control) with 15d-PGJ2 (5 µM; 5 h). Protein extracts were analyzed for quantification with immunoblots using anti-Nrf-2 and anti-β-actin antibodies. Quantitative analysis was performed by measuring band densities with ImageJ . Values are the mean ± SEM of seven independent experiments (*p<0.05 as compared to control; t-test).

C. SH-SY5Y cells were treated or not (control) with 15d-PGJ2 (5 µM; 5 h) Immunocytochemistry with anti-Nrf-2 antibodies and DAPI labeling were performed and pictures are representative of three independent experiments. Scale bar: 100 µm.

D. SH-SY5Y cells were treated or not (control) with 15d-PGJ2 (5 µM) during different time periods (1, 2, 4, 6 and 24 h). Quantification of GCLc mRNA was performed by RT-qPCR as described in Methods. Values are the mean ± SEM of four independent experiments (*$p<0.05$ as compared to control; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

E. SH-SY5Y cells were treated with varying concentrations of 15d-PGJ2 (1, 2.5 or 5 µM) for 24 h. Quantification of total glutathione was measured usingenzymatic glutathione assay. Values are the mean ± SEM of four independent experiments (* $p<0.05$ as compared to control; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

Figure 4: ***15d-PGJ2 neuroprotective effects on primary cultures of ENS are associated with Nrf-2 pathway and glutathione synthesis***

A. Primary cultures of ENS were treated or not (control) with 15d-PGJ2 (3 µM, 2h) and analyzed by immunostaining with anti-Nrf-2 or anti-Hu antibodies. Arrows represent examples of co-expression of Hu and Nrf-2 proteins. Scale bar: 100 µm.

B. Quantitative analysis of Nrf-2 protein expression in enteric neurons. Mean fluorescence density of Nrf-2 corresponding to each enteric neuron (Hu-positive cell) was determined from ImageJ software analysis of control ENS cultures (9 pictures, 19 to 49 enteric neurons per picture, two independent experiments, 305 enteric neurons analyzed) and after 2 h of 15d-PGJ2-treatment (10 pictures, 21 to 39 enteric neurons per picture, two independent experiments, 292 enteric neurons analyzed). Mean fluorescence density was corrected by measuring background for each picture. Each symbol represents the mean value of fluorescence density in enteric neurons per analyzed picture (*$p<0.001$ as compared to control; t-test).

C. Primary cultures of ENS were treated or not (control) with 15d-PGJ2 (3 µM; 24 h) and analyzed by immunostaining with anti-GCLc or anti-Hu antibodies. Arrows represent examples of co-expression of Hu and GCLc proteins. Scale bar: 100 µm.

D. Quantitative analysis of GCLc protein expression in enteric neurons. Mean fluorescence density of GCLc corresponding to each enteric neuron (Hu-positive cell) was determined from ImageJ software analysis of control ENS cultures (3 pictures, 24 to 37 enteric neurons per picture, 97 enteric neurons analyzed) and after 2 h of 15d-PGJ2-treatment (3 pictures, 17 to 27 enteric neurons per picture, 69 enteric neurons analyzed). Mean fluorescence density was corrected by measuring background for each picture. Each symbol represents the mean value per analyzed picture of fluorescence density in enteric neurons (*$p<0.01$ as compared to control; t-test).

E. Primary cultures of ENS were treated or not (control) with 15d-PGJ2 (3 µM; 24 h). Following treatment, monochlorobimane (MCB, 60 µM) was directly added to the medium and incubated for 20 min at 37°C before fixation and standard immunostaining procedures with anti-Hu antibodies. Treatment of primary cultures of ENS with 3 µM 15d-PGJ2 for 24 h induced an increase of total glutathione conjugated to monochlorobimane (MCB) in enteric neurons (Hu-positive cells) as compared to untreated cultures (Control). Arrows represent examples of co-expression of Hu and conjugated MCB. Scale bar: 100 µm.

Figure 5: ***GSH-mediated neuroprotection by enteric glial cells (EGC)***

Schematic representation of the modulation of GSH-dependent neuroprotection by EGC in the ENS. **(A) Extracellular GSH:** EGC can exert neuroprotective effects by their synthesis and release of GSH which can regulate anti-oxydant response in the extracellular environment of the neurons (Abdo et al (2010). **(B) Intracellular GSH:** EGC can also enhance GSH within neurons. This effect is mediated in part by the synthesis and the release of 15d-PGJ2 which increases Nrf2 and GCLc expression and ultimately enhances intracellular GSH level in enteric neurons. Altogether, EGC appear as a central direct and indirect regulator of GSH in ENS

Figure 1

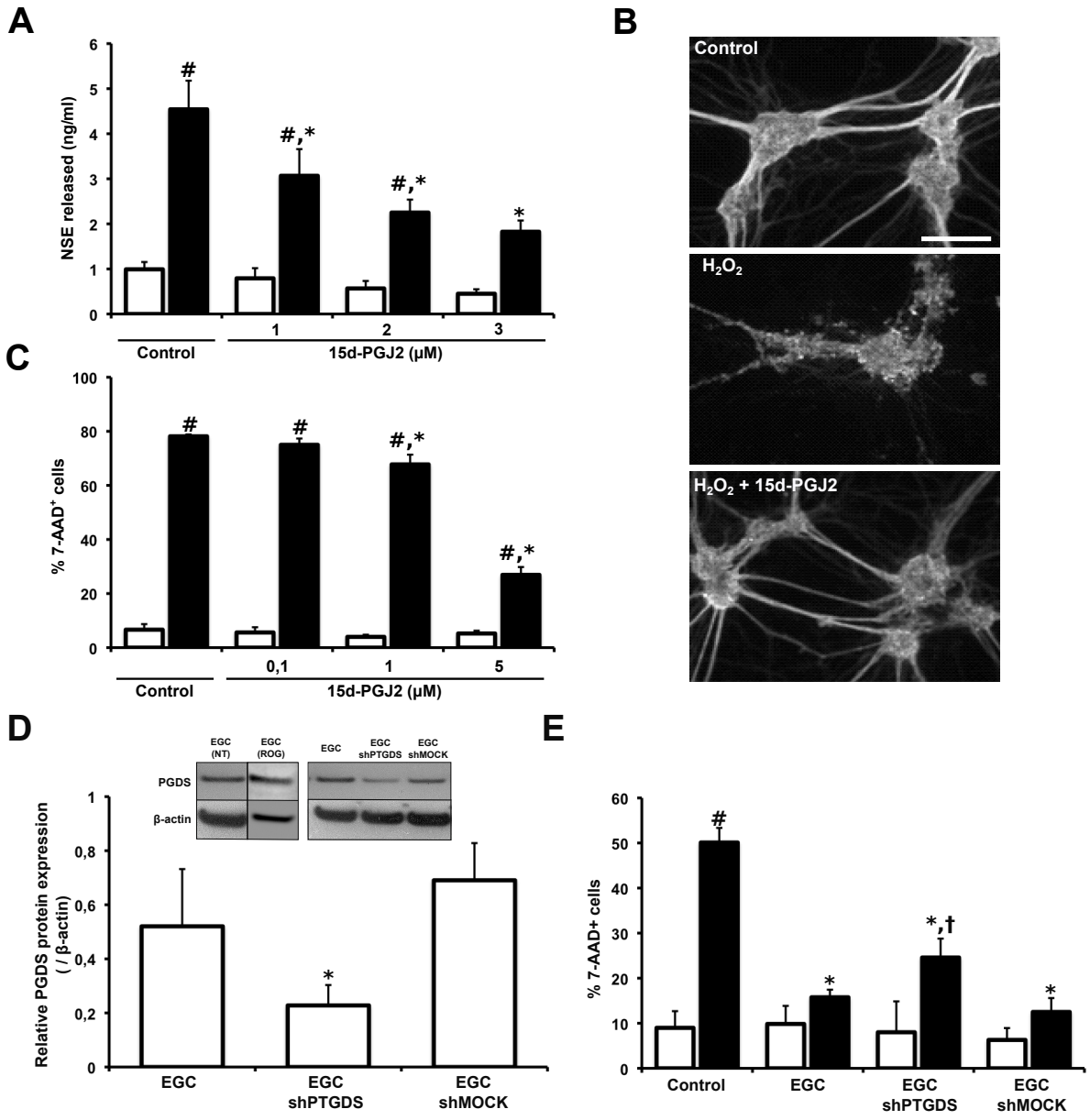

A
NSE released (ng/ml)
Control
15d-PGJ2 (μM)
B
Control
H2O2
H2O2 + 15d-PGJ2
C
% 7-AAD+ cells
Control
15d-PGJ2 (μM)
D
EGC (NT)
EGC (ROG)
EGC
EGC shPTGDS
EGC shMOCK
PGDS
β-actin
Relative PGDS protein expression (/ β-actin)
EGC
EGC shPTGDS
EGC shMOCK
E
% 7-AAD+ cells
Control
EGC
EGC shPTGDS
EGC shMOCK

Figure 2

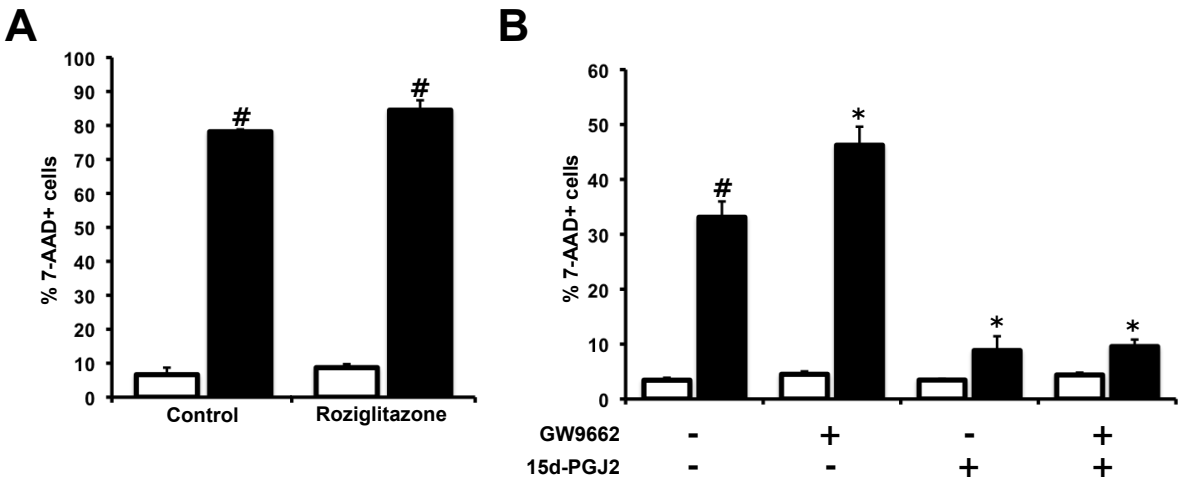

A
% 7-AAD+ cells
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
#
#
Control
Roziglitazone
B
% 7-AAD+ cells
60
50
40
30
20
10
0
#
*
*
*
GW9662 - + - +
15d-PGJ2 - - + +

Figure 3

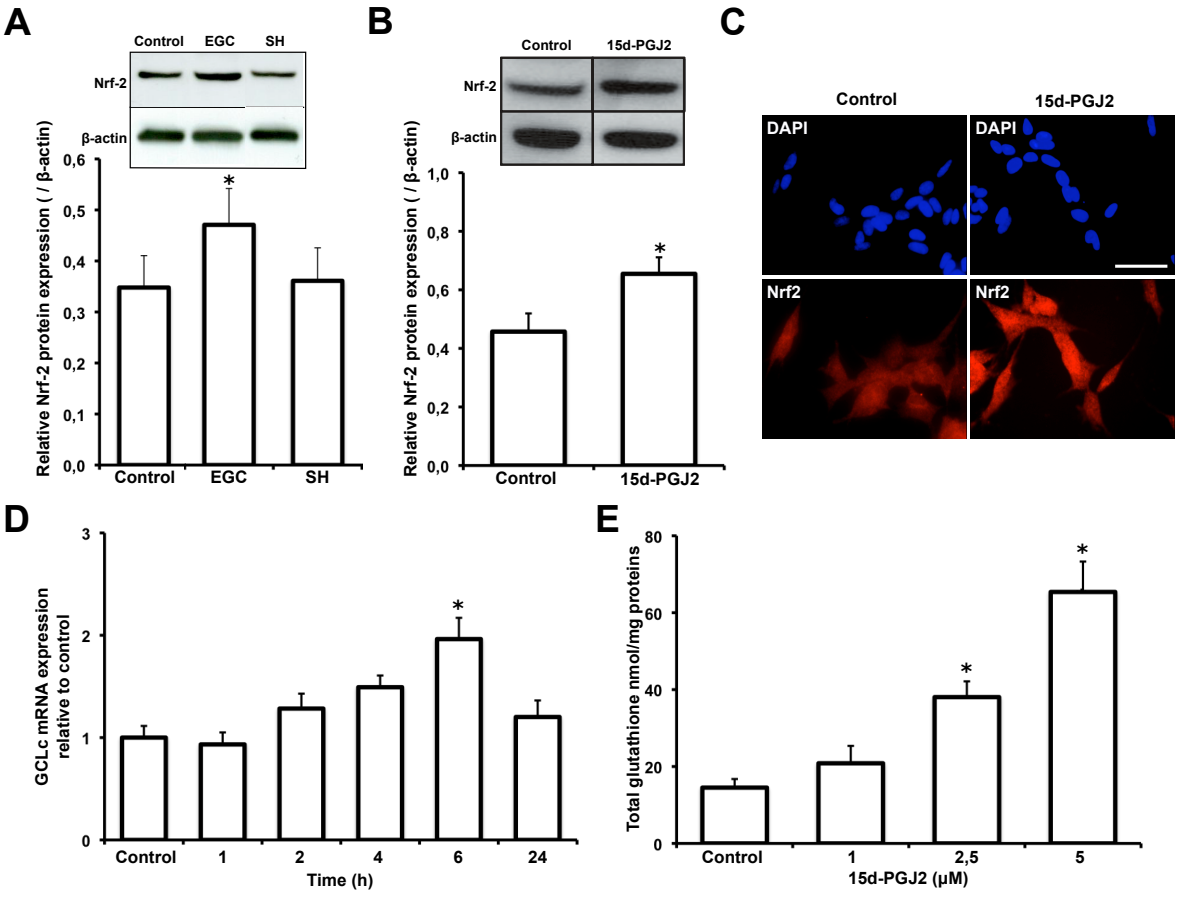

A
Control
EGC
SH
Nrf-2
β-actin
Relative Nrf-2 protein expression (/ β-actin)
0,0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
*
Control
EGC
SH
B
Control
15d-PGJ2
Nrf-2
β-actin
Relative Nrf-2 protein expression (/ β-actin)
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
*
Control
15d-PGJ2
C
Control
15d-PGJ2
DAPI
DAPI
Nrf2
Nrf2
D
GCLc mRNA expression relative to control
0
1
2
3
*
Control
1
2
4
6
24
Time (h)
E
Total glutathione nmol/mg proteins
0
20
40
60
80
*
*
Control
1
2,5
5
15d-PGJ2 (μM)

Figure 4

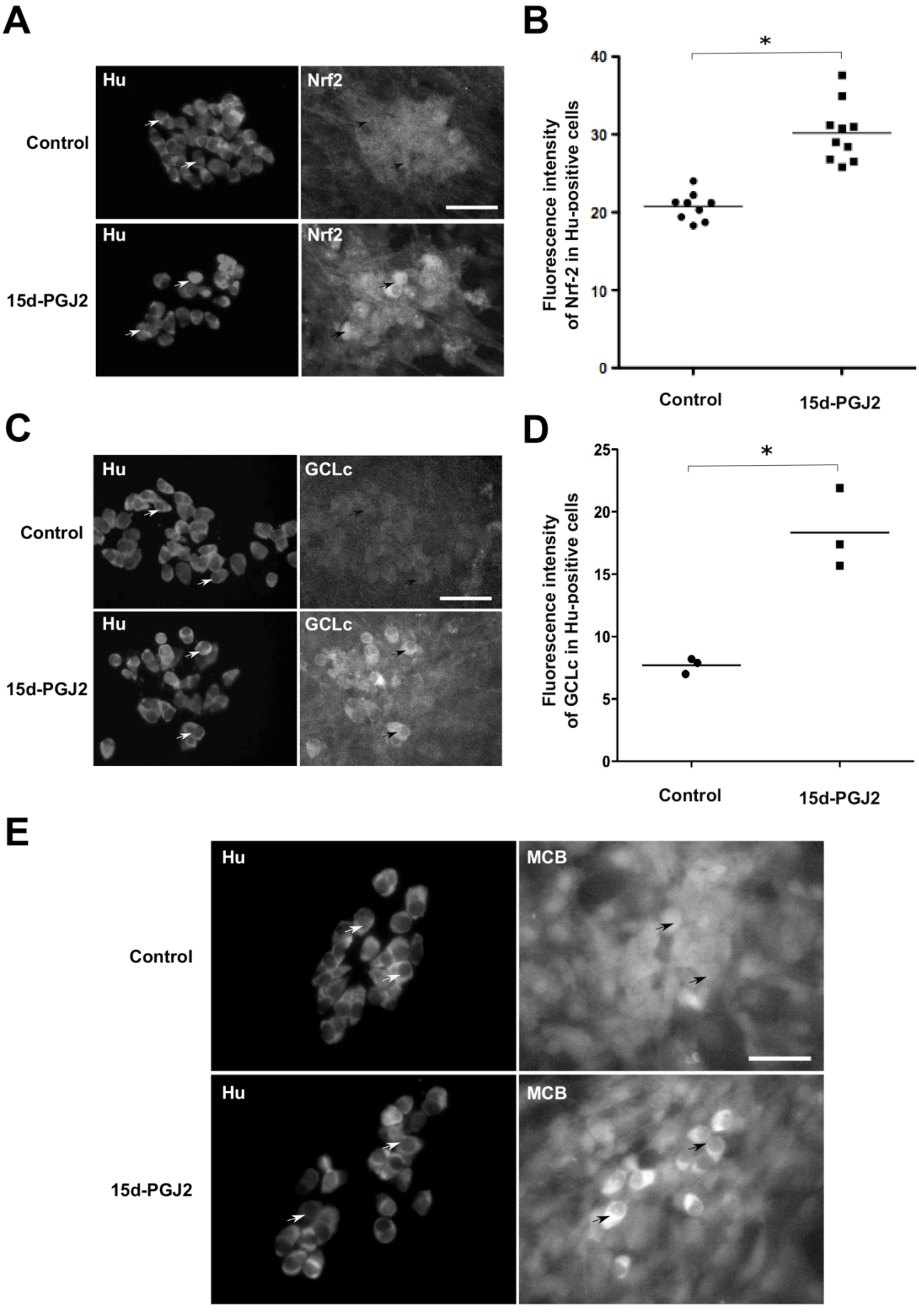
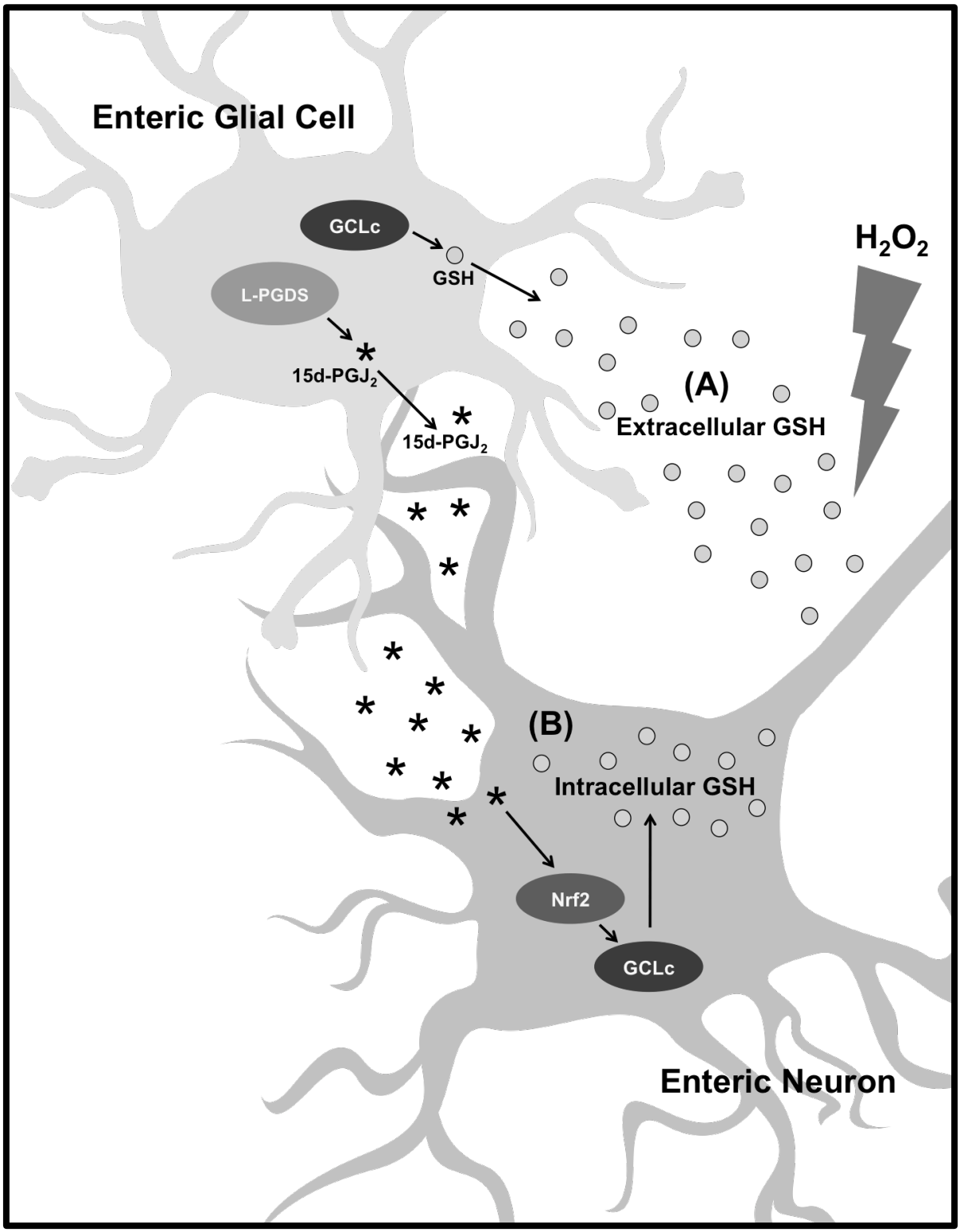
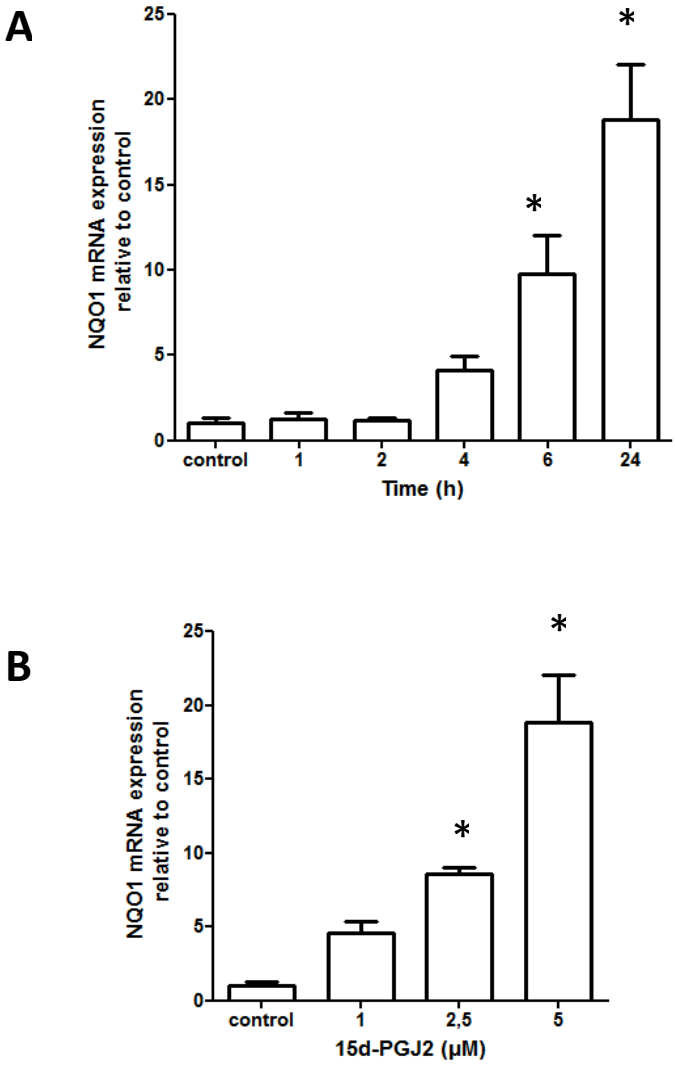

A
Hu
Nrf2
Control
Hu
Nrf2
15d-PGJ2
B
*
Fluorescence intensity of Nrf-2 in Hu-positive cells
40
30
20
10
0
Control
15d-PGJ2
C
Hu
GCLc
Control
Hu
GCLc
15d-PGJ2
D
*
Fluorescence intensity of GCLc in Hu-positive cells
25
20
15
10
5
0
Control
15d-PGJ2
E
Hu
MCB
Control
Hu
MCB
15d-PGJ2

Figure 5


Enteric Glial Cell
GCLc
GSH
L-PGDS
15d-PGJ2
15d-PGJ2
H2O2
(A)
Extracellular GSH
(B)
Intracellular GSH
Nrf2
GCLc
Enteric Neuron

<u>Figure S1</u>: 15d-PGJ2 treatment induces the expression of NAD(P)H-quinone oxidoreducase 1 (NQO)1 mRNA expression in SH-SY5Y cells.

A-Time-course of NQO1 mRNA expression in SH-SY5Y cells treated with 15d-PGJ2 (5 µM). **B**-Dose dependent response of NQO1 mRNA expression in SH-SY5Y cells treated with varying concentrations of 15d-PGJ2 (1, 2.5 or 5 µM; 24 h). Quantification of NQO1 mRNA was performed by RT-qPCR as described in Methods. Values are the mean ± SEM of four independent experiments (*p<0.05 as compared to control; one-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test).



III.5. Conclusion

Dans cette partie des résultats, nous avons mis en évidence la capacité des CGE à produire et sécréter un nouveau facteur glial : la 15d-PGJ_2. Ce médiateur glial agit sur la BEI en inhibant la prolifération et en favorisant la différenciation cellulaire des CEI à travers l'activation de la voie PPARγ (Article 1). Ce médiateur protège également les neurones d'un stress oxydant à travers l'activation de la voie Nrf2 (Article 2). La mise en évidence du rôle de ce médiateur glial à la fois sur les CEI et sur les neurones (Figure 37) renforce le rôle prépondérant des CGE au sein de l'unité neuro-glio-épithéliale (UNGE).

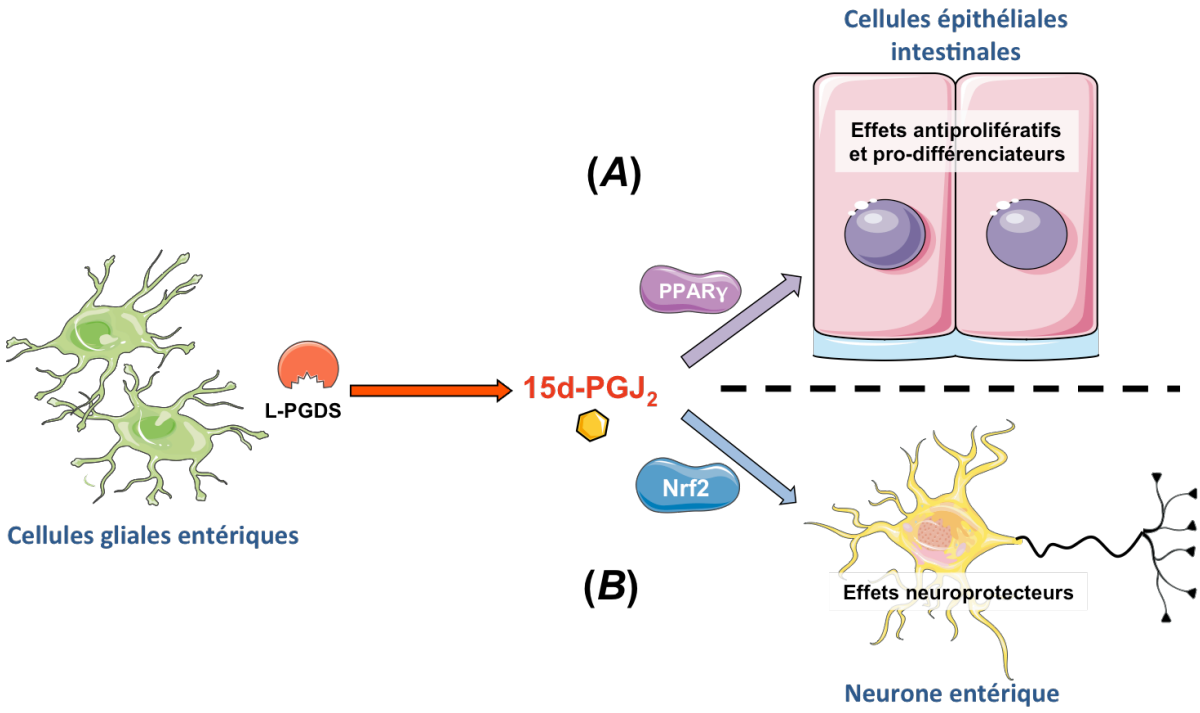


Figure 37 : Effets de la 15d-PGJ_2 gliale sur les cellules épithéliales intestinales et les neurones
(A) La 15d-PGJ_2 active PPARγ dans les cellules épithéliales intestinales régulant ainsi la prolifération et la différenciation cellulaire. (B) La 15d-PGJ_2 active Nrf2 dans les neurones pour favoriser la neuroprotection contre un stress oxydant.

Nous avons caractérisé le rôle des CGE à travers la production de 15d-PGJ_2 dans un contexte physiologique. Il a été suggéré que des atteintes des CGE pourraient être associées à des pathologies digestives (Savidge *et al.*, 2007b). Notre laboratoire a notamment décrit des modifications du réseau glial dans les cancers colorectaux (Neunlist *et al.*, 2007). Le rôle connu du SNE, et des CGE en particulier, sur la régulation de la prolifération des CEI, nous

a conduit à émettre l'hypothèse que des altérations fonctionnelles au niveau des CGE pourraient être impliquées dans le développement de certaines pathologies digestives, comme les cancers colorectaux. Ces aspects seront abordés dans la deuxième partie des résultats, en se focalisant sur la 15d-PGJ_2 et les voies de synthèse (L-PGDS) d'origine gliale, plus particulièrement au cours de l'évolution des stades pré-cancéreux.

IV. Partie 2 : Organisation du réseau glial entérique et implications des enzymes de synthèse des prostaglandines dans l'apparition des lésions pré-cancéreuses dans un modèle murin de carcinogénèse colique.

IV.1. Introduction

Les résultats, décrits dans la partie précédente, montrent le rôle clef des CGE dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des CEI ainsi que dans la protection des neurones entériques, mettant en avant l'importance physiologique des CGE au sein de l'UNGE. Des altérations du SNE, et des CGE en particulier, pourraient aussi contribuer de manière importante aux processus physiopathologiques survenant au cours de pathologies digestives. En effet, de nombreuses pathologies digestives sont caractérisées par des altérations de la BEI incluant des augmentations de la perméabilité paracellulaire ou transcellulaire (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou MICI, syndrome de l'intestin irritable), des altérations des processus de prolifération dans les cancers colorectaux et/ou aussi des processus de réparation de la BEI dans les MICI (Mankertz & Schulzke, 2007; Laukoetter *et al.*, 2008; Piche *et al.*, 2009). Des études menées au laboratoire, ont permis de mettre en évidence une modification du réseau glial dans les cancers colorectaux. Ainsi, l'expression transcriptionnelle et protéique du marqueur glial S100-β est diminuée en berge des zones tumorales macroscopiquement saines (Neunlist *et al.*, 2007). Bien que des modifications du réseau glial aient déjà été observées dans plusieurs pathologies gastro-intestinales (Savidge *et al.*, 2007b), aucune étude n'a précisément abordé les altérations éventuelles de ce réseau au cours de la carcinogenèse colique. Par ailleurs, il a été montré que les prostaglandines (PGs) jouaient un rôle important dans l'initiation et l'apparition du processus de carcinogenèse colique (Konturek *et al.*, 2005).

L'objectif de cette étude était de déterminer si le réseau neuro-glial et l'expression des enzymes responsables de la production des PGs pouvaient être modifiés au cours des différents états dysplasiques précédents la survenue du cancer colorectal.

IV.2. Approches expérimentales utilisées

IV.2.1. Modèle animal

Nous avons utilisé un modèle de souris traitées par l'azoxyméthane (AOM) et le sulfate de dextran (DSS). Des souris BALB/c mâles âgées de 8 à 12 semaines (Janvier, Genest St Isle, France) ont été utilisées. Les souris ont reçu une injection intra-péritonéale

(Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) d'AOM 12 mg/Kg dissout dans une solution saline. Cinq jours après, le DSS à 2% a été administré par voie orale (eau de boisson) sur 5 jours en 3 fois, à J0, J20 et J41 (Figure 38). A chaque nouvelle administration de DSS, des souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Les côlons ont été prélevés dans une solution de KREBS à 4°C. A chaque étape, 4 souris témoins, non traitées et 6 souris traitées ont été sacrifiées.

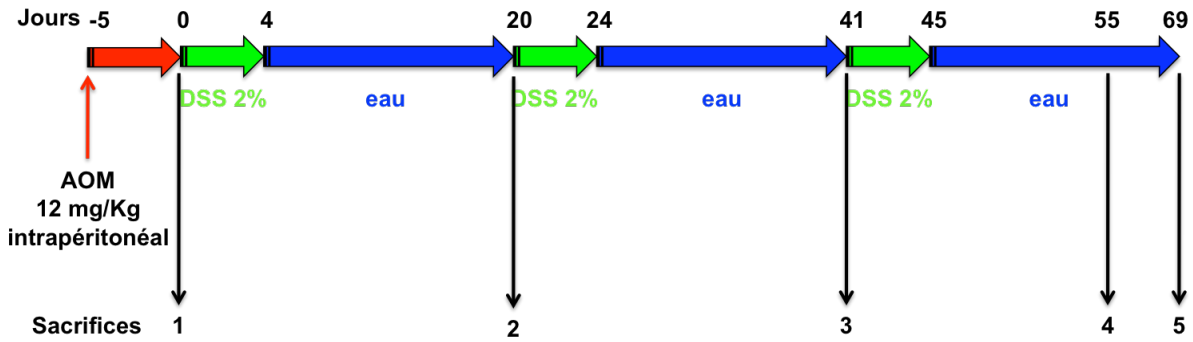


Figure 38 : Protocole de traitement par l'azoxyméthane (AOM) et le sulfate de dextran (DSS) des souris BALB/c

Trois cycles de DSS à 2% ont été réalisés à des intervalles de 2 semaines. Des groupes de souris ont été sacrifiées au début de chaque cycle DSS (jour 0, 20ème et 41ème jours) puis 55 et 69 jours après le début du traitement par le DSS, afin de déterminer l'apparition des lésions précancéreuses.

IV.2.2. Collection des tissus coliques

Pendant toute la durée de la dissection, la solution de KREBS a été renouvelée régulièrement. Les côlons ont été ouverts le long de l'axe mésentérique, étirés et fixés sur une boîte contenant du Sylgard™, puis coupés dans le sens de la longueur. La première moitié, dédiée à l'analyse histologique, a été fixée dans du PBS avec 4% de paraformaldéhyde pendant 3 heures à température ambiante, puis rincée et conservée à 4°C dans du PBS contenant 1% d'azide de sodium. La seconde moitié a été immédiatement conservée à -80°C pour l'analyse des ARNm et des protéines.

IV.2.3. Analyses histologiques des tissus coliques

Chaque tissu fixé a été analysé macroscopiquement sous une loupe binoculaire afin de déterminer la présence de polypes et de lésions cancéreuses. Après l'analyse macroscopique des lésions coliques, les fragments fixés ont été envoyé au laboratoire d'anatomo-pathologie

où ils ont été inclus en bloc de paraffine et coupés en sections de 5 µm. Un marquage Hématoxyline-Eosine-Safran (HES) a permis l'analyse microscopique et la caractérisation des lésions pré-cancéreuses de type dysplasique. Chaque fragment a ainsi été annoté comme étant « sain », en « dysplasie de bas grade », en « dysplasie de haut grade » ou « adénocarcinome ».

IV.2.4. Analyses de l'expression des ARNm et des protéines dans les tissus coliques

L'extraction des ARNm et des protéines, à partir des fragments conservés à -80°C, a été réalisée simultanément avec un kit d'extraction ARN-Protéines selon les instructions du fabricant (Macherey-Nagel, Illkirch, France). Les ADNc ont été synthétisés par Reverse Transcription et une PCR semi-quantitative en temps réel a été réalisée comme décrit précédemment (Bach-Ngohou *et al.*, 2010). Les amorces ont été choisies à partir des séquences des ADNc de souris en utilisant Primer 3.0. L'expression du gène de la β-actine a été utilisée comme contrôle interne.

L'expression protéique des marqueurs gliaux et des enzymes impliquées dans la synthèse des PGs, a été analysée par Western-blot. Les protéines extraites ont été dénaturées pendant 10 minutes à 95°C dans du PSB contenant du TCEP (Macherey-Nagel). Avant électrophorèse, les lysats protéiques ont été déposés en quantité équivalente (40 µg/puit) dans des gels d'acrylamide Bis-Tris 4-12% (NuPage Novex, Invitrogen, Courtaboeuf, France) et transférés sur membranes de nitrocellulose comme décrit précédemment (Bach-Ngohou *et al.*, 2010). Les membranes ont été incubées une nuit à +4°C avec les anticorps primaires dirigés respectivement contre les protéines GFAP (1 :1000 ; Dako, France), S100-β (1 :500 ; Swant, Suisse), L-PGDS (1 :1000 ; Cayman, Estonie), mPGES-1 (1 :500 ; Santa-Cruz, USA) et la β-actine (1 :10000 ; Sigma-Aldrich). Les anticorps primaires ont été détectés avec un anticorps secondaire conjugué à l'enzyme HRP (Horse Radish Peroxidase) (1 5000 ; Amersham, France). Les protéines marquées ont été visualisées par chimiluminescence (ECLplus, Amersham) et quantifiées à partir du logiciel ImageJ. La protéine β-actine a été utilisée comme protéine de référence.

IV.2.5. Analyses statistiques

Les données sont représentées par la moyenne ± SD. Un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis a été réalisé pour chaque expérience. Les résultats ont été considérés comme significatifs pour une valeur du $p<0,05$.

IV.3. Résultats : Organisation du réseau glial entérique et implications des enzymes de synthèse des prostaglandines dans l'apparition des lésions pré-cancéreuses dans un modèle murin de carcinogénèse colique.

Des lésions dysplasiques, successivement de bas grade puis de haut grade, et des carcinomes intramuqueux sont apparus progressivement au cours des cycles de traitement par le DSS (Figure 39 et Tableau V). Les tumeurs observées sont principalement localisées dans la deuxième moitié distale du côlon.

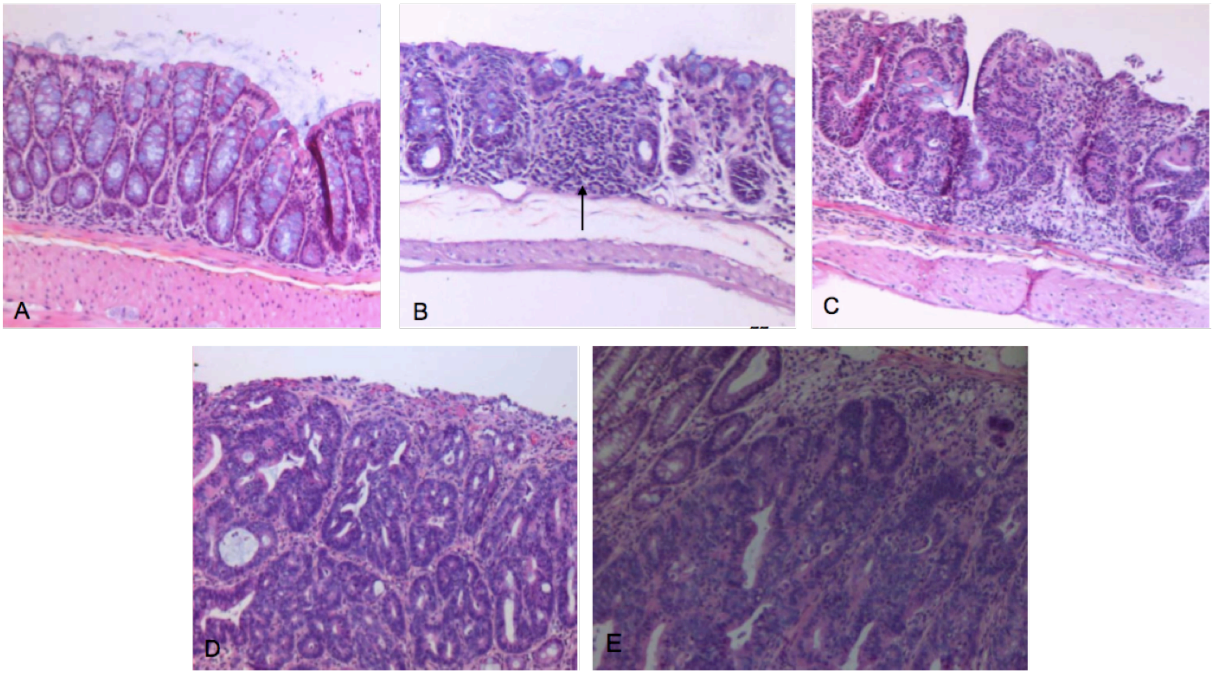


Figure 39 : Analyse microscopique de la muqueuse colique au cours des états précancéreux

Visualisation de la muqueuse colique par coloration Eosine-Hématoxiline (A) Normale. (B) Nodules lymphoïdes indiquant la présence d'une zone inflammée. (C) Adénome tubulaire en dysplasie de bas-grade. (D) Adénome tubulaire en dysplasie de haut-grade. (E) Adénocarcinome colique.

Jours	Nombre de souris avec			
	Aucune lésion	Dysplasie de bas grade	Dysplasie de haut grade	Adénocarcinome
0	5	0	0	0
20	3	4	0	0
41	0	6	7	1
55	1	3	3	3
69	1	2	3	1

Tableau V : Lésions histologiques au cours du traitement par l'AOM-DSS

Analyses des stades précancéreux apparaissant au cours du traitement par l'AOM-DSS. Les jours correspondent aux sacrifices des souris. Chaque lésion a été caractérisée après une analyse histologique puis microscopique, effectuée au laboratoire d'anatomo-pathologie du CHU de Nantes.

L'expression protéique des marqueurs gliaux GFAP et S100-β était significativement augmentée dans les adénomes tubuleux en dysplasie de haut grade (DHG) par rapport aux contrôles et aux zones ne présentant pas de lésion (Sain) (Figures 40 et 41). A l'inverse, l'expression protéique de ces marqueurs gliaux était significativement diminuée au sein des adénocarcinomes (ADK). Ces résultats montrent qu'il existe des altérations au moins qualitatives du réseau glial.

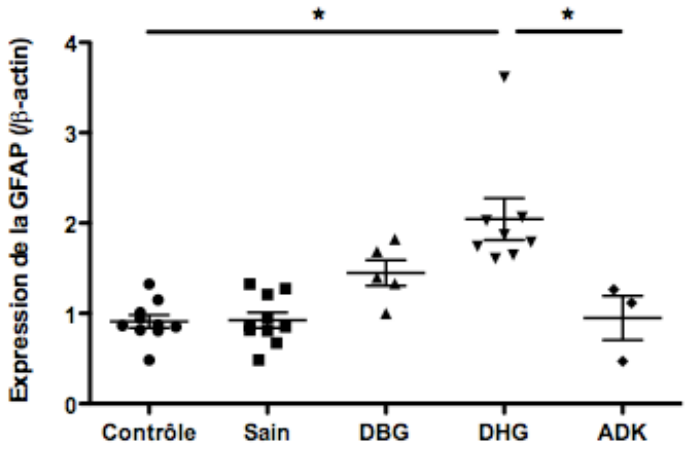


Figure 40 : Expression de la GFAP dans les lésions précancéreuses coliques

*La protéine GFAP a été quantifiée par Western blot au sein de différentes lésions précancéreuses, identifiées microscopiquement par un examen anatomopathologique (DBG : dysplasie de bas grade ; DHG : dysplasie de haut-grade ; ADK : adénocarcinome). La GFAP augmente significativement dans les lésions dysplasiques et diminue significativement dans les adénocarcinomes (Test de Kruskal-Wallis ; *p<0,05).*

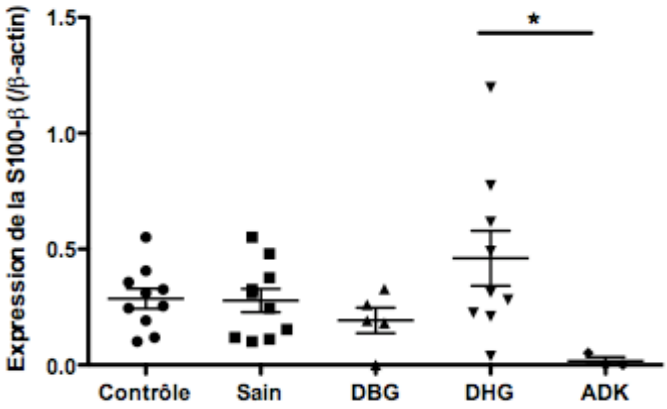


Figure 41 : Expression de la S100-β dans les lésions précancéreuses coliques

*La protéine S100-β analysée par Western-blot augmente dans les lésions dysplasiques de haut-grade et diminue fortement dans les adénocarcinomes (DBG : dysplasie de bas grade ; DHG : dysplasie de haut-grade ; ADK : adénocarcinome) (Test de Kruskal-Wallis ; *p<0,05).*

Parallèlement à l'augmentation des marqueurs gliaux, nous avons étudié l'expression de la mPGES-1 et de la L-PGDS, enzymes inductibles responsables de la synthèse des prostaglandines pro- ou anti-inflammatoires, respectivement, la PGE_2 ainsi que la PGD_2 et son dérivé la 15d-PGJ_2 (Scher & Pillinger, 2005; Park *et al.*, 2006). En effet, i*n vivo*, l'étude simultanée de l'expression de ces deux enzymes est importante pour apprécier l'impact des prostaglandines dans les situations physiopathologiques. Nous avons observé que l'expression protéique de mPGES-1, impliquée dans la production de la PGE_2, est diminuée dans les DHG et les ADK (Figure 42). Par contre, l'expression de la L-PGDS (ARNm et protéine), responsable de la production de 15d-PGJ_2 est augmentée dans les HGD et les ADK (Figure 43).

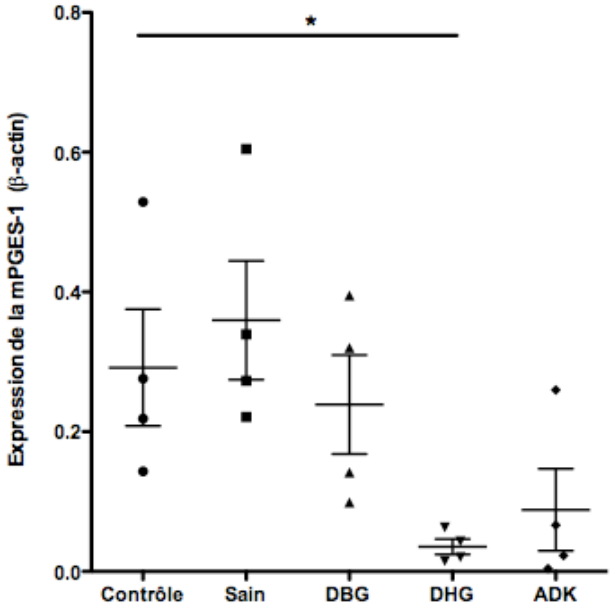


Figure 42 : Expression de la mPGES-1 dans les lésions précancéreuses coliques

*La protéine mPGES-1 a été quantifiée par Western blot au sein de différentes lésions précancéreuses identifiées microscopiquement par un examen anatomopathologique (DBG : dysplasie de bas grade ; DHG : dysplasie de haut-grade ; ADK : adénocarcinome) (Test de Kruskal-Wallis ; *p<0,05).*

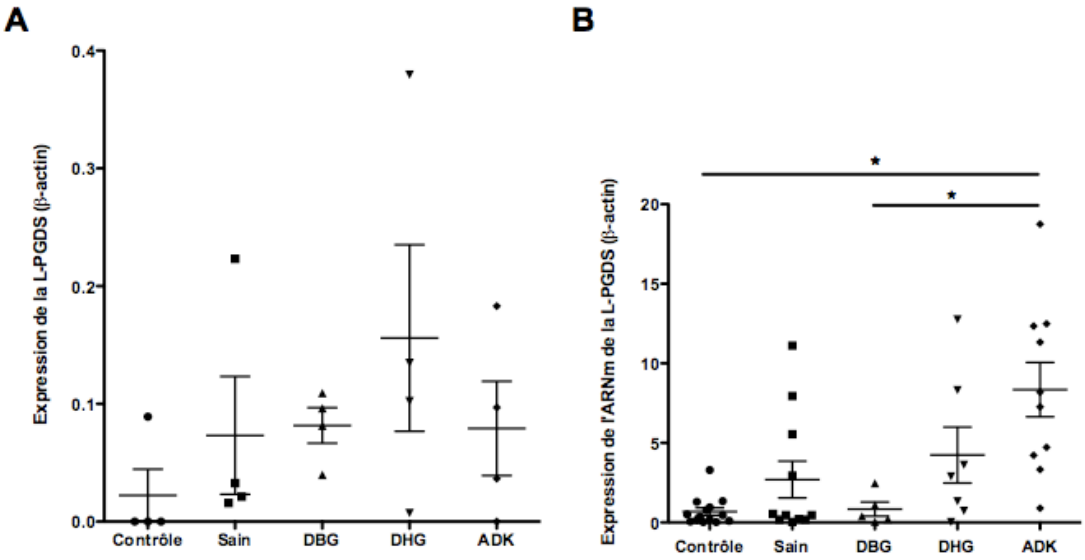


Figure 43 : Expression de la L-PGDS dans les lésions précancéreuses coliques

*(A) Etude de l'expression de la protéine L-PGDS par Western-blot. La protéine L-PGDS a été quantifiée au sein de différentes lésions précancéreuses, identifiées microscopiquement par un examen anatomopathologique (DBG : dysplasie de bas grade ; DHG : dysplasie de haut-grade ; ADK : adénocarcinome). La L-PGDS augmente dans les lésions dysplasiques et diminue dans les adénocarcinomes. (B) Etude de l'expression des ARNm de la L-PGDS par RT-qPCR. Les ARNm de la L-PGDS augmentent dans les dysplasies de haut-grade et également dans les adénocarcinomes (Test de Kruskal-Wallis ; *p<0,05).*

Nos résultats suggèrent que l'expression de marqueurs gliaux (GFAP et S100-β) d'une part et l'expression de la L-PGDS ainsi que celle de la mPGES-1 d'autre part sont modifiées au cours de la carcinogenèse colique. L'origine gliale ou non de la L-PGDS et de la mPGES-1 n'a pas pu être mise en évidence à ce stade. Afin d'affiner ces résultats et d'analyser les altérations potentielles directement au niveau des CGE, il était important de pouvoir compléter cette analyse globale par une analyse plus spécifique directement au niveau du tissu. Afin de localiser les enzymes de synthèse des PGs dans les différents types cellulaires (i.e. CGE et neurones) et les différentes lésions, nous avons choisi d'utiliser des marquages par immunofluorescence. Cependant, nous ne disposons pas d'une méthode efficace nous permettant de marquer le SNE dans son intégralité et sur un tissu pathologique.

Nous avons donc développé une méthode d'analyse du réseau neuro-glial. Ce travail a consisté à optimiser les méthodes d'analyse actuelles du SNE. Afin de valider cette nouvelle méthode, nous avons ainsi caractérisé dans un contexte physiologique, d'une part, le réseau neuronal et d'autre part le réseau glial du SNE dans le côlon de souris. Nous avons ensuite utilisé cette méthode afin d'étudier le SNE dans un modèle de colite induite par le DSS chez la souris. Cette méthode nous a permis de développer un outil d'analyse du SNE simple et transposable à l'étude du SNE dans les pathologies digestives (Article 3).

IV.4. Article 3 : Méthode d'analyse simultanée et sans dissection, des plexus myentériques et sous-muqueux par microscopie à fluorescence et confocale.

Article 3: A simple, muscular layer microdissection-free method for simultaneous wild field or confocal analysis of submucosal and myenteric plexi.

Maxime M Mahé, *Philippe Hulin, Damien Masson, Michel Neunlist, Kalyane Bach-Ngohou*.

L'analyse du SNE dans les différentes espèces animales a été rendue possible par l'utilisation de techniques de microdissection permettant d'isoler les plexus myentériques et sous-muqueux au moyen de dissections successives de la muqueuse et des muscles circulaires ou longitudinaux. Cette microdissection associée à un immunomarquage du SNE, a permis de mieux caractériser le SNE. La préparation de « whole-mount » du plexus myentérique (PM) ou du plexus sous-muqueux (PSM) a permis l'analyse des marqueurs gliaux et neuronaux dans chacun de ces plexus et ainsi de déterminer l'organisation structurale et fonctionnelle du SNE. Bien que cette technique offre de nombreux avantages, elle passe néanmoins par la séparation physique des deux plexus. De plus, dans les petits modèles animaux comme la souris, le tissu est fragile, ce qui rend la microdissection difficile à mettre en œuvre. Afin de maintenir l'intégrité du réseau du SNE, il serait préférable de réaliser un immunomarquage du SNE sur le tissu entier. Cependant, les méthodes de perméabilisation classique ne sont pas suffisantes pour permettre la pénétration des anticorps dans l'intégralité du tissu et ainsi permettre une analyse des marqueurs du SNE.

L'objectif de ce travail a été de développer une nouvelle méthode de perméabilisation permettant la caractérisation simultanée du PM et du PSM, chez la souris, après un simple retrait de la muqueuse colique.

Dans un premier temps, nous avons mis au point un protocole de perméabilisation permettant la pénétration des anticorps dans l'ensemble du tissu, sans muqueuse. Les protocoles de perméabilisation classiquement utilisés (Triton X100 1% ; 3h) ne permettent pas de visualiser les neurones et les CGE. Seul un faible marquage avec l'anticorps pan-neuronal PGP9.5 est observé (Figura 1 A ; Article 3). Le protocole de perméabilisation développé (Triton X100 1%, Saponine 0,05% ; 5h) permet la visualisation des neurones entériques (HuC/D, PGP9.5) et des CGE (Sox-10) (Figure 1 B ; Article 3), aussi bien dans le PM que dans le PSM (Figure 1 C-D ; Article 3).

Nous avons ensuite validé notre technique de marquage en déterminant la faisabilité d'un comptage neuro-glial par microscopie à fluorescence, sur le tissu colique de souris. Dans les régions ganglionnaires, la densité neuronale (i.e. nombre de neurones/mm^2) est significativement plus élevée dans le PM que dans le PSM (1862±79 contre 1355±216 ; n=4 ; p=0,03). La densité gliale (i.e. nombre de CGE/mm^2) est également significativement plus élevée dans le PM que dans le PSM (1867±198 contre 525±173 ; n=4 ; p=0,03) (Figure 2 C-

D ; Article 3). De la même manière, l'index glial (i.e. rapport CGE /neurones) est plus élevé dans le PM que dans le PSM (1,0±0,1 contre 0,4±0,2 ; n=4 ; p=0,03) (Figure 2 E ; Article 3).

Cette technique de marquage du SNE est utilisable chez les souris, aussi bien en condition physiologique que pathologique. En effet, nous l'avons appliqué à un modèle de colite induite par le DSS (Figure 3 A-B ; Article 3). Nous avons observé une augmentation significative de la densité neuronale dans le PM chez les souris traitées (2206±150) par rapport aux souris témoins (1862±79). Une telle augmentation n'a pas été observée dans le PSM (Figure 3 C ; Article 3). Nous n'avons pas observé de changement, ni de la densité gliale, ni de l'index glial dans le PSM et le PM (Figure 3 D-E ; Article 3).

De façon plus simple et plus rapide que les techniques classiques, cette méthode permet la caractérisation du réseau neuro-glial et l'identification des populations cellulaires du SNE en conditions saines et pathologiques. Elle permettrait aussi d'identifier des modifications du SNE dans des modèles de pathologies digestives, comme celui de la colite induite par le DSS chez la souris.

A simple, muscular layer microdissection-free method for simultaneous wild field or confocal analysis of submucosal and myenteric plexi.

Maxime M Mahé[1,2,3], Philippe Hulin[2,4], Damien Masson[1,2,3,5], Michel Neunlist[1,2,3], Kalyane Bach-Ngohou[1,2,3,5].

Authors affiliations :

[1] Inserm, U913, Nantes, France

[2] University of Nantes, Nantes, France

[3] CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France

[4] PiCell Cellular Imaging Facilities, IFR26, Nantes, France

[5] Laboratoire de Biochimie, CHU Hôtel-Dieu, Nantes, France

Keywords : Enteric nervous system, myenteric plexus, submucosal plexus, mouse colon, confocal microscopy, immunofluorescence

Corresponding author :

Kalyane Bach-Ngohou

Inserm U913

1, Place Alexis Ricordeau

44093 Nantes, France

Phone : +33(0)240084005

Email : kalyane.bach@chu-nantes.fr

ABSTRACT:

Background Neurochemical coding or neuroglial network analysis in submucosal (SMP) or myenteric (MP) plexi of enteric nervous system (ENS) is currently done using successive microdissection of mucosa and submucosa on whole-mount preparation, followed by immunolabelling. Although this method is the gold standard one, it remains fastidious and hard to use in small animal models whose gastro-intestinal tissues are fragile. We present here a simple approach that allows easy imaging, characterization and simultaneous analysis of whole ENS in small animal models. **Methods** Experiments were done in C57Bl/6 mice fixed tissues. After a simple mucosal removing, entire residual tissue was permeabilized and blocked with phosphate saline buffer containing triton-X, saponin and donkey serum. ENS was then stained with antibodies against PGP9.5, HuC/D and Sox-10. Imaging was further done using wide-field or confocal microscopy that allows optical sectioning of MP and SMP simultaneously. **Key results** We obtained imaging of submucosal and myenteric ganglia. MP ganglia were larger and contained more neurons and glial cells than SMP. Glia index (glia/neuron ratio) was higher in MP than SMP, ranging, respectively from 0.9 to 1.1 and 0.2 to 0.6. 2D imaging allows quantitative assessment of neuronal and glial cells in MP or SMP. **Conclusion and inferences** This method is ideally suited for simultaneous analysis of neuronal and glial cells in the entire ENS, their phenotypes or spatial relationships and will thus benefit the investigation of disease models after experimental assays on small animals.

INTRODUCTION:

Enteric nervous system (ENS) constitutes a large network of interconnected plexus layers located all along the wall of gastrointestinal (GI) tract (Furness *et al.*, 1987). ENS is composed of ganglia (i.e. neuronal and glial cells) and interganglionic nerve strands (i.e. neuronal cells processes, glial cell bodies and processes) (Gabella, 1981; Sang *et al.*, 1997). Description of ENS organization has become possible through the development of labeling and microdissection techniques where intestinal wall is separated into different layers and exposed to staining, allowing characterization of nerve plexus (Wedel *et al*., 1999). Longitudinal muscle layer with attached myenteric ganglia is micro-dissected from the mucosal layer to obtain whole-mount preparations of myenteric (MP) or submucosal plexus (SMP). These preparations have been shown to be the most suitable approach for the concomitant investigation of glial and neuronal markers expression in each plexus. This technique have been extensively employed to disclose structural and functional organization of ENS in mammals such as guinea pig (Furness *et al*., 1987; Brookes & Costa, 1990; Brookes *et al*., 1991; Song *et al*., 1991; Neunlist *et al*., 2001), mouse (Sang *et al*., 1997), rat (Browning & Lees, 1994; Bercik *et al*., 2000), opossum (Konomi *et al*., 2002) and human (Wedel *et al*., 1999). However, in spite of the advantages its offered, application of this technique remains difficult regarding to the preservation of nerve plexus integrity during microdissection procedure, especially in small animal models. To maintain ENS integrity following mechanical separation of tissue from mucosa, whole-mount preparations of entire ENS would thus be better. Nevertheless, using classical permeabilisation methods (refce), it involves difficulties in applying staining, attributed to an insufficient penetration of reagents in the GI wall. To address this problem, a separation of the nerve plexus layer is necessary but prevents from a concomitant analysis of both MP and SMP.

Here, we developed a novel permeabilisation method allowing simultaneous characterization of MP and SMP in mouse whole full thickness whole-mount, without mucosa. To our knowledge, this is the first method permitting analysis of both MP and SMP without the usual micro-dissection procedure of the longitudinal muscle layer**.** We examined ENS using triple fluorescence labelling of neuronal and glial markers in different part of the mouse GI tract. We also used our method in a model of DSS-induced colitis in mice.

MATERIAL AND METHODS:

Animals and tissue collection

Experiments were carried out in compliance with the French Institutional guidelines. Procedures were approved by local institutional animal research committee (Agreement C.44015; UTE, Nantes, France). Eight C57Bl/6 male mice (20 weeks old) (Janvier Laboratories, Le Genest-St-Isle, France) were killed by cervical dislocation. Stomach, ileum, proximal and distal colon were quickly removed from each mouse and rinsed in cold KREBS solution. Concerning four mice, colitis was induced using 2% dextran sodium sulphate (DSS) (MP Biomedicals) administered in drinking water for 7 days. Animal behaviour and body weights were assessed during experiments.

Full thickness whole-mount obtention from tissues

During all dissection procedure, KREBS was regularly changed with fresh cold one. Tissues were opened along the mesenteric axis, stretched and pinned flat under a stereomicroscope with mucosa oriented on the top of the dish. Tissue was then fixed in phosphate buffered saline (PBS) with 4% paraformaldehyde for 3h at room temperature, and rinsed three times for 10 min with PBS and kept at 4°C in PBS with 1% sodium azide (PBS/NaN_3). Before immunofluorescence labelling, mucosa of full thickness whole mount (FTWM) was peeled off by micro-dissection.

Tissue permeabilisation and immunofluorescence labeling

Preliminary experiments, based on a study performed in central nervous system (Matsubayashi *et al*., 2009), identified the combination describes in table I as the one allowing the best staining quality as compared to following combinations of detergents: Triton X-100 (TX) 2% alone, TX 1%/saponin 0.1%, TX 1%/saponin 0.01% or digitonin 100μg/ml.

	Step	Solution	Antibody	Incubation time (hours)
1	Permeabilisation	PBS/NaN_3 containing 1% Triton X-100 *(Sigma, St-Quentin Fallavier, France)*, 0.05% saponin	-	5

		(Quijilla bark, Sigma) and 10% donkey serum *(Millipore corporation, Billerica, MA)*		
2	Blockage	PBS and 2% donkey serum	-	3
3	I^{re} antibody staining	PBS and 2% donkey serum	goat anti-Sox10 *(1:200; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA)*	12
4	II^{re} antibody staining	PBS and 2% donkey serum	donkey anti-goat Alexa Fluor 647 conjugated IgG *(Invitrogen)*	3
5	I^{re} antibody staining	PBS and 2% donkey serum	mouse anti-HuC/D-Cy3 *(1:200 ; 400 mg/ml)*	12
6	I^{re} antibody staining	PBS and 2% donkey serum	rabbit anti-PGP9.5 *(1:2000; Ultraclone, Wellow, United Kingdom)*	12
7	II^{re} antibody staining	PBS and 2% donkey serum	anti-rabbit Alexa Fluor 488 conjugated IgG (Invitrogen)	3

Table I: Tissue permeabilisation and immunofluorescence labeling procedure

All incubations occurred at room temperature and were followed by three PBS rinses. After final washes, tissue was laid flat on a microscope slide and mounted in resinous fluorescence mounting medium (Gold prolong medium, Invitrogen).

Imaging and acquisition settings

For wide-field imaging, specimens were viewed under a Zeiss Axiovert 200M fluorescence microscope equipped with a x20 Plan-Apochromat objective (N.A. 0,75) and x63 Plan-Apochromat-Dic objective (N.A. 1,40). Samples were excited with a halide vapour lamp HXP120C (Zeiss). Confocal imaging was performed with a Nikon A1R confocal microscope equipped with x20 Plan-Apochromat. VC DIC N2 (N.A. 0.75) (Nikon, Champigny sur Marne, France). Samples were excited with an Ar/Ne laser at 488 nm (20 mW) and 642.5 nm (10 mW) (Melles-Griot, Voisins le Bretonneux, France) and with a solid

laser Sapphire at 561 nm (50 mW) (Coherent, Seoul, Korea). Specimens were acquired with a z-axis optical increment of 1 μm.

Image processing

Stacks were reconstructed using Image J Software v1.42q (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). For 3D reconstruction, Amira 4.1.2 ResolveRT (Mercury, Chelmsford, MA) was used in order to generate voxel-based reconstruction and isosurfacic rendering in according with grey level Gaussian distribution.

Quantitative analysis

From random areas, at least 10 optical fields were photomicrographed at x20 magnification. Analysis was performed as previously described (Hoff *et al*., 2008). Briefly, ganglionic area was determined by PGP9.5 positive staining and HuC/D positive neurons. Glial cells were identified by Sox-10 positive nuclei and neurons, identified by HuC/D positive nuclei.

Statistics

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.00® (Graphpad software, San Diego, California, USA). Data are expressed as mean ± SEM. We used Mann-Withney test for non-parametric data. A $p<0.05$ value was considered as statistically significant.

RESULTS:

Immunohistochemical staining of mice full thickness whole-mounts

First, we developed a novel staining protocol to perform immunohistochemical analysis of ENS on full-thickness whole mounts (FTWM), with only the mucosa removed. Indeed, using standard permeabilisation protocol (only TX 1%), only weak PGP9.5 labeling and no HuC/D or Sox-10-immunoreactive (IR) structure could be detected (Figure 1A). In contrast, following permeabilisation with saponin 0.05% and TX 1%, strong staining of structures could be detected using anti-PGP9.5, HuC/D and Sox-10 antibodies in both myenteric and submucosal plexus (Figure 1 B-D). This method allowed simultaneous staining of different plexus in gastric, ileal and colonic segments (data not shown).

Quantitative analysis of submucosal and myenteric plexus in distal colon

We next determined whether a precise neuro-glial count could be achieved on FTWM using standard fluorescence microscopy. Following staining of colonic FTWM, ganglionic structures containing HuC/D-IR and Sox-10-IR cells could be clearly identified in both MP and SMP (Figure 2 A-B). In ganglionic area, both neuronal and glial density were significantly higher in MP than in SMP. Consistently, glial index was higher in MP than in SMP (Figure 2 C-E). Similarly, in total tissue, both neuronal and glial cells per mm^2 of tissue were higher in MP than in SMP (485±99 vs 32±8; n=4 p = 0.03 and 560±159 vs 13±4; n= 4 p = 0.03, respectively). We also performed similar counts using confocal microscopy. No significative difference between parameters evaluated was observed (data not shown).

Application to a DSS-induced colitis model

Staining of distal colonic FTWM of DSS treated mice showed a significant increase in neuronal density of ganglionic area in MP but not in SMP as compared to control. No change in glial density or glial index was observed neither in SMP nor MP (Figure 3 C-E). In total tissue, both neuronal and glial cells per mm^2 of tissue were higher in MP than in SMP (510±71 vs 20±11; n=4 p = 0.03 and 491±113 vs 12±6; n= 4 p = 0.03, respectively). DSS treatment did not change values of ganglionic area (data not shown).

DISCUSSION AND PERSPECTIVES:

Immunohistochemical staining of mice full thickness whole-mounts

A major advance of our study is the development of a novel permeabilisation method allowing simultaneous immunohistochemical phenotype of SMP and MP on FTWM without mucosa. This method presents the advantage over conventional ones to 1) minimize dissection time (as only the mucosa is removed) and 2) perform comparative study between both plexus at the same site. Addition of saponin to standard TX permeabilisation solution drastically enhanced immunohistochemical staining of ENS. This increased efficiency could be due to complementarity action of these detergents. Indeed, while TX solubilizes lipid molecules indiscriminately (Schuck *et al*., 2003), saponin is cholesterol specific (Matsubayashi *et al*., 2009). Although a similar effect of saponin was observed in the CNS, digitonin (another cholesterol specific detergent) allowed a better staining than saponin in CNS (Matsubayashi *et al*., 2009) but not in ENS (data not shown). Although increasing TX concentration would enhance membrane disruption and facilitate antibody penetration, it can also induce a loss of cytoplasmic components, thereby preventing IHC detection of key protein in neuronal or glial cells (Schuck *et al*., 2003). Using standard fluorescence microscopy, this method can be used in different regions of mice GI tract (data not shown). However, tissue thickness of whole mount observed in large animals or in human would require the use of confocal microscopy or other technique using optical clearing agents to perform similar analysis (Liu *et al*., 2011).

Quantitative analysis on distal colonic full thickness whole-mounts

We evaluated neuronal and glial density in mice colon. To the best of our knowledge, no study has performed a precise count of neurons and glial cells in mice. In the small intestine of mice, Gabella found, using an histochemical method, a neuronal density of 106 neurons/mm2 (Gabella, 1987). The larger neuronal density we found could result in part from differences in tissues size (stretch during fixation procedure), pan-neuronal markers used or age. However, in our study, myenteric neuronal densities per ganglionic area was similar as compared to the one in guinea pig (Hoff *et al*., 2008). In contrast to the latter study, we found a larger neuronal density in MP than in SMP. We also found that glial cell density was larger in MP than in SMP in mice, as was observed in guinea pigs or humans (Hoff *et al*., 2008). In contrast, glial index was smaller in mice than in guinea pigs or humans. This is consistent

with previous data showing increasing density of glial cells with increasing animal weight (Hoff *et al*., 2008).

Analysis of full thickness whole-mounts in mice DSS-induced colitis

Number of myenteric neurons was signigficantly increased in DSS mice as compared to control. To the best of our knowledge, no data has characterized impact of DSS induced colitis on ENS phenotype. In TNBS model, a major loss of myenteric neurons was observed in the colon (Lin *et al*., 2005; Linden *et al*., 2005), These different results might be related to differences in severity and sites of inflammation or inflammatory agents used (TNBS or DSS). In particular, while models of Linden (Linden *et al*., 2005) presented severe signs of inflammation, we used a low concentration of DSS as compared to other studies. Consistently with our results, myenteric neurogenesis has recently been reported following gut injury with BAC (Laranjeira *et al*., 2011).

In summary, this procedure performed on full thickness whole mounts is a useful tool to characterize ENS in physiological or physiopathological conditions.

ACKNOWLEDGMENTS :

MMM is supported by a grant from Nantes Metropole. This work was supported by a grant from INCa Appel d'Offre Libre 2007 to MN.

DISCLOSURES :

MMM, PH, DM, MN and KBN have no conflict of interest.

REFERENCES :

1. Furness JB, Costa M, Rokaeus A, McDonald TJ, Brooks B. Galanin-immunoreactive neurons in the guinea-pig small intestine: their projections and relationships to other enteric neurons. *Cell Tissue Res* 1987; **250**: 607-615.
2. Wedel T, Roblick U, Gleiss J, *et al.* Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus. *Ann Anat* 1999; **181**: 327-337.
3. Brookes SJ, Costa M. Identification of enteric motor neurones which innervate the circular muscle of the guinea pig small intestine. *Neurosci Lett* 1990; **118**: 227-230.
4. Brookes SJ, Steele PA, Costa M. Calretinin immunoreactivity in cholinergic motor neurones, interneurones and vasomotor neurones in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1991; **263**: 471-481.
5. Song ZM, Brookes SJ, Costa M. Identification of myenteric neurons which project to the mucosa of the guinea-pig small intestine. *Neurosci Lett* 1991; **129**: 294-298.
6. Neunlist M, Michel K, Reiche D, Dobreva G, Huber K, Schemann M. Glycine activates myenteric neurones in adult guinea-pigs. *J Physiol* 2001; **536**: 727-739.
7. Sang Q, Williamson S, Young HM. Projections of chemically identified myenteric neurons of the small and large intestine of the mouse. *J Anat* 1997; **190 (Pt 2)**: 209-222.
8. Bercik P, Bouley L, Dutoit P, Blum AL, Kucera P. Quantitative analysis of intestinal motor patterns: spatiotemporal organization of nonneural pacemaker sites in the rat ileum. *Gastroenterology* 2000; **119**: 386-394.
9. Browning KN, Lees GM. Reappraisal of the innervation of rat intestine by vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y-immunoreactive neurons. *Neuroscience* 1994; **62**: 1257-1266.
10. Konomi H, Meedeniya AC, Simula ME, Toouli J, Saccone GT. Characterization of circular muscle motor neurons of the duodenum and distal colon in the Australian brush-tailed possum. *J Comp Neurol* 2002; **443**: 15-26.
11. Matsubayashi Y, Iwai L, Toda T, Lu QR, Kawasaki H. Immunostaining for oligodendrocyte-specific galactosphingolipids in fixed brain sections using the cholesterol-selective detergent digitonin. *J Neurosci Methods* 2009; **178**: 87-98.
12. Hoff S, Zeller F, von Weyhern CW, *et al.* Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J Comp Neurol* 2008; **509**: 356-371.

13. Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A, Simons K. Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 5795-5800.

14. Liu YA, Chen Y, Chiang AS, Peng SJ, Pasricha PJ, Tang SC. Optical clearing improves the imaging depth and signal-to-noise ratio for digital analysis and three-dimensional projection of the human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2011; **23**: e446-457.

15. Gabella G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience* 1987; **22**: 737-752.

16. Lin A, Lourenssen S, Stanzel RD, Blennerhassett MG. Selective loss of NGF-sensitive neurons following experimental colitis. *Exp Neurol* 2005; **191**: 337-343.

17. Linden DR, Couvrette JM, Ciolino A*, et al.* Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterol Motil* 2005; **17**: 751-760.

18. Laranjeira C, Sandgren K, Kessaris N*, et al.* Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J Clin Invest* 2011; **121**: 3412-3424.

LEGENDS:

Figure 1: Immunohistochemical staining of mice full thickness whole-mounts

Immunohistochemical staining of enteric nervous system (ENS) in mice distal colonic tissues. Full thickness whole-mount staining (FTWM) for the pan-neuronal marker PGP9.5, the neuronal marker HuC/D and the glial specific marker Sox-10. **(A-B)** Respectively, after standard permeabilisation with Triton X 1% (TX) and after permeabilisation with TX 1% and saponin 0,05% (Magnification x20, scale bar : 50μm). **(C-D)** Respectively, myenteric plexus (MP) and submucosal plexus (SMP) were visualized in confocal microscopy (Magnification x63, scale bar : 50μm). **(E)** 3D rendering of FTWM showed the complete integrity of both SMP and MP.

Figure 2: Immunohistochemical analysis of submucosal and myenteric plexus on distal colonic full thickness whole-mounts

(A-B) Full thickness whole-mount staining (FTWM) for the pan-neuronal marker PGP9.5, the neuronal marker HuC/D and the glial specific marker Sox-10 respectively in myenteric plexus (MP) and submucosal plexus (SMP). Neurons and glial cells were counted and expressed per mm^2 of ganglionic area. **(C)** The neuronal density was given in neurons/mm^2 ganglionic area. **(C)** The glial density was given in glial cells/mm^2 ganglionic area. (**E)** Glia index corresponded to the number of glial cells per neurons.

Figure 3: Immunohistochemical analysis of submucosal and myenteric plexus on distal colonic full thickness whole-mounts in DSS-induced colitis mice

(A-B) Full thickness whole-mount staining (FTWM) for the pan-neuronal marker PGP9.5, the neuronal marker HuC/D and the glial specific marker Sox-10 respectively in myenteric plexus (MP) and submucosal plexus (SMP). Both SMP and MP counts were compared to control mice. Neurons and glial cells were counted and expressed per mm^2 of ganglionic area. (C) The neuronal density was given in neurons/mm^2 ganglionic area. (C) The glial density was given in glial cells/mm^2 ganglionic area. (E) Glia index corresponded to the number of glial cells per neurons.

Figure 1 :

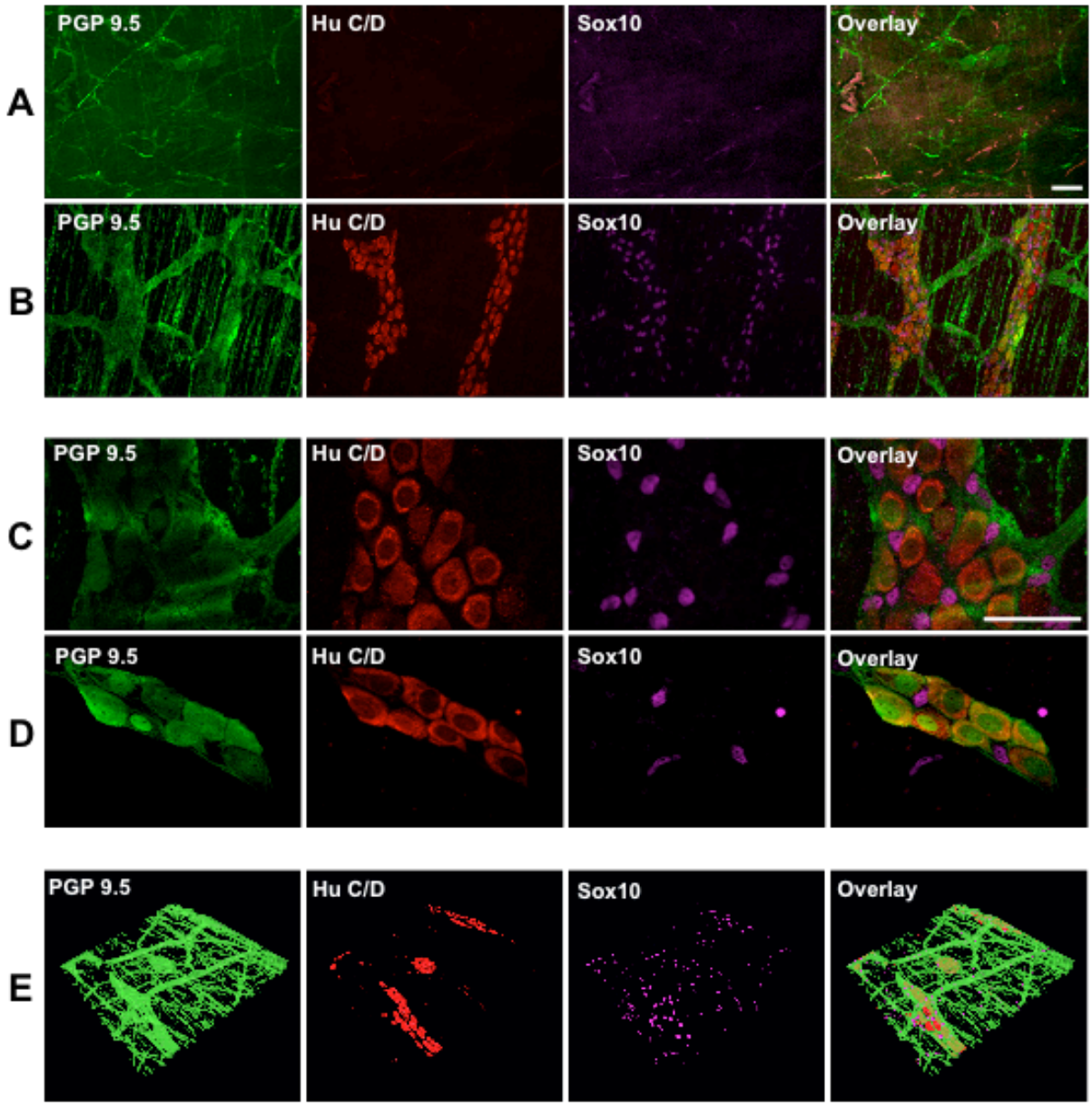

A
PGP 9.5
Hu C/D
Sox10
Overlay
B
PGP 9.5
Hu C/D
Sox10
Overlay
C
PGP 9.5
Hu C/D
Sox10
Overlay
D
PGP 9.5
Hu C/D
Sox10
Overlay
E
PGP 9.5
Hu C/D
Sox10
Overlay

Figure 2:

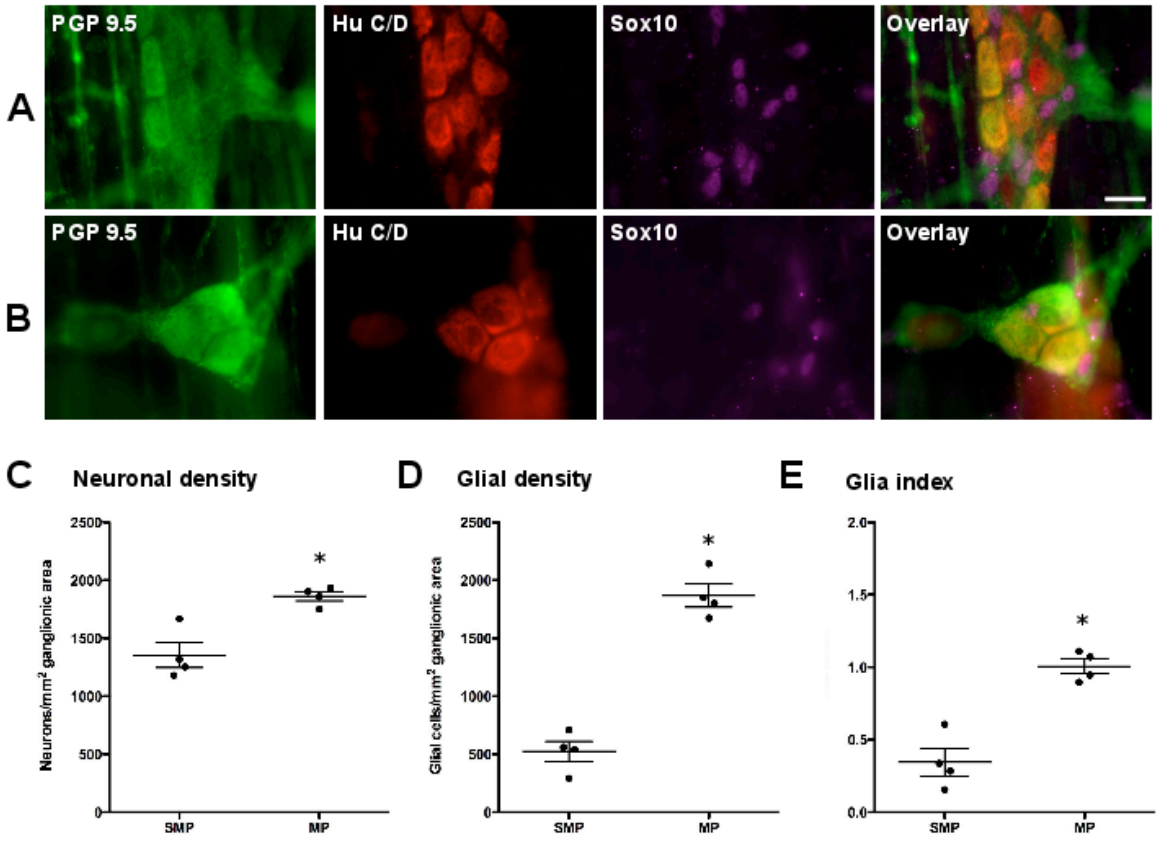
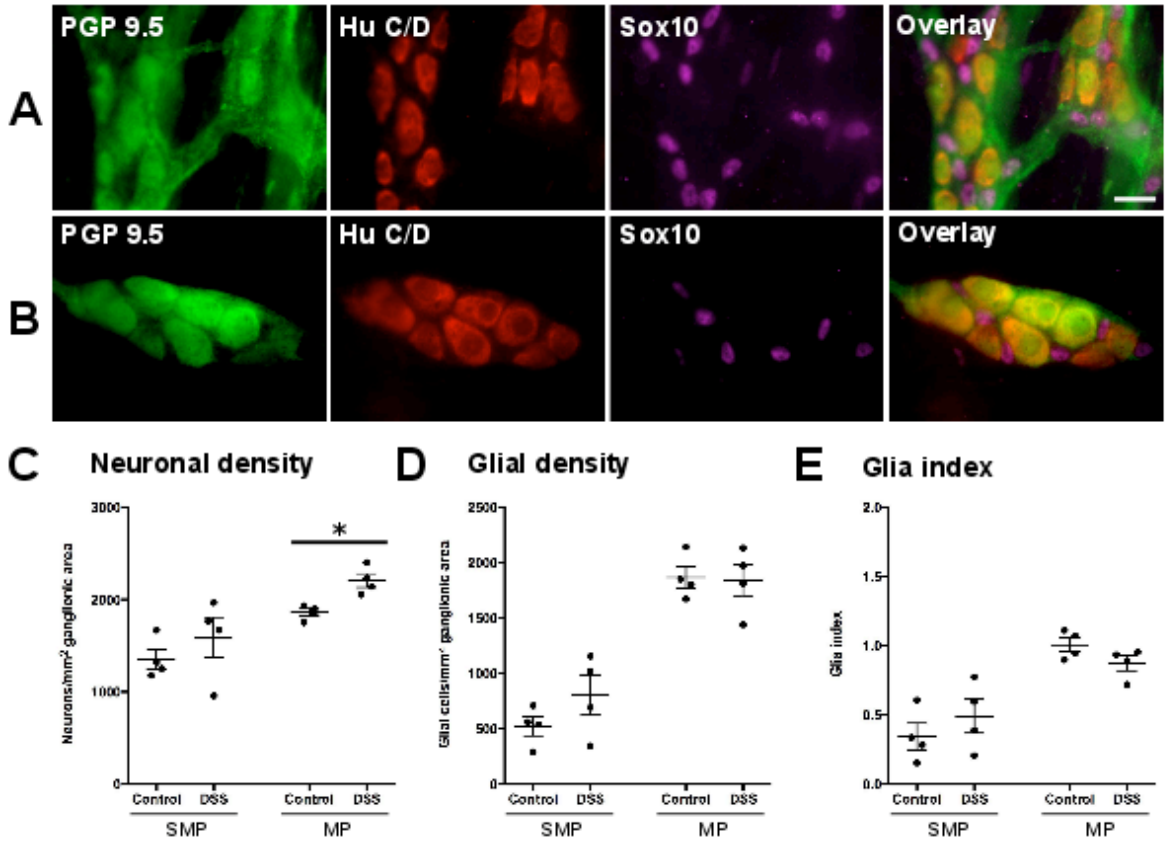

A
PGP 9.5
Hu C/D
Sox10
Overlay
B
PGP 9.5
Hu C/D
Sox10
Overlay
C
Neuronal density
Neurons/mm² ganglionic area
2500
2000
1500
1000
500
0
SMP
MP
*
D
Glial density
Glial cells/mm² ganglionic area
2500
2000
1500
1000
500
0
SMP
MP
*
E
Glia index
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
SMP
MP
*

Figure 3:


A
PGP 9.5
Hu C/D
Sox10
Overlay
B
PGP 9.5
Hu C/D
Sox10
Overlay
C
Neuronal density
Neurons/mm² ganglionic area
3000
2000
1000
0
*
Control
DSS
Control
DSS
SMP
MP
D
Glial density
Glial cells/mm² ganglionic area
2500
2000
1500
1000
500
0
Control
DSS
Control
DSS
SMP
MP
E
Glia index
Glia index
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Control
DSS
Control
DSS
SMP
MP

IV.5. Conclusion

Ces résultats préliminaires montrent que l'expression des marqueurs gliaux S100-β et GFAP, aussi que celle des enzymes responsables de la synthèse des PGs, mPGES-1 et L-PGDS, est modifiée au cours des états précancéreux précédents l'apparition d'un adénocarcinome. Néanmoins, au stade de ce travail, il n'est pas possible de savoir si il y a une réelle atteinte du réseau glial et si les modifications d'expression de la L-PGDS et/ou de la mPGES-1 sont dues aux cellules du SNE (Figure 44). La méthode d'analyse *in situ* développée dans ce travail devrait nous permettre de réaliser une telle étude non seulement dans le cadre de la carcinogénèse colique mais également dans d'autres situations physiopathologiques.

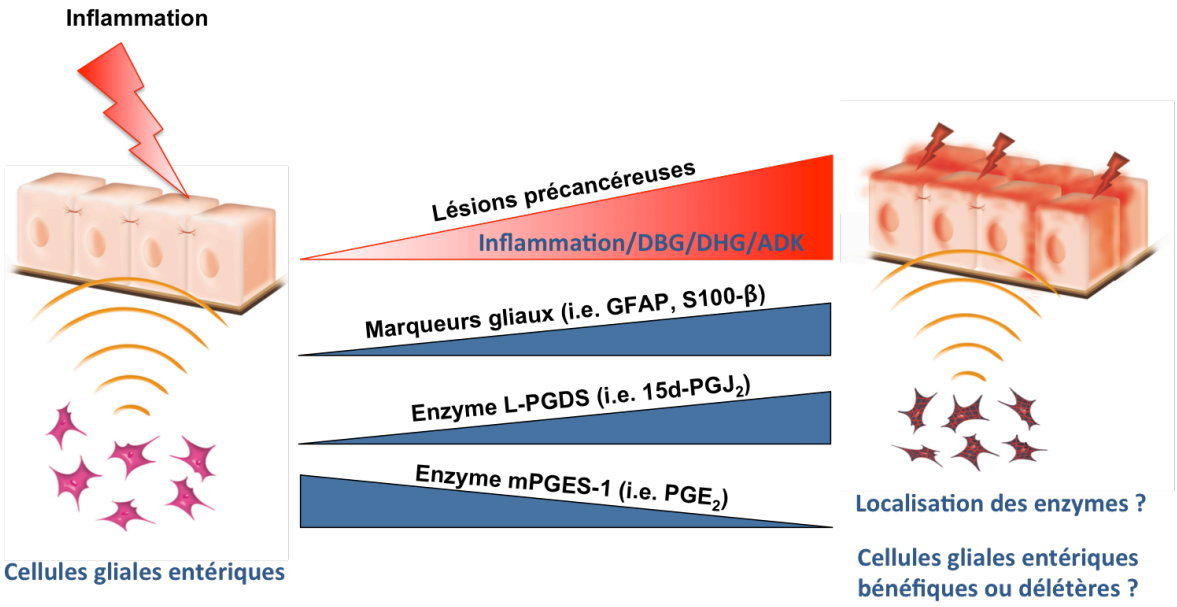


Figure 44 : Effets potentiels des cellules gliales entériques sur les cellules épithéliales intestinales en condition pathologique

(DBG : dysplasie de bas grade ; DHG : dysplasie de haut-grade ; ADK : adénocarcinome)

V. DISCUSSION

Nous avons identifié les cellules gliales entériques (CGE) comme une source cellulaire d'un ligand naturel du récepteur PPARγ : la 15-déoxy-$\Delta^{12,14}$-Prostaglandine J_2 (15d-PGJ_2). Nous avons montré que la 15d-PGJ_2 d'origine gliale, 1) participe aux effets anti-prolifératifs et pro-différenciateurs des CGE sur les cellules épithéliales intestinales (CEI) à travers l'activation de PPARγ (Partie I – Article 1) et 2) possède des effets neuroprotecteurs associés à l'activation de Nrf2 et la production de glutathion dans les neurones entériques (Partir I – Article 2).

V.1. Expression de la prostaglandine D synthase de type lipocaline dans les cellules gliales entériques :

La 15d-PGJ_2 produite par les CGE est issue de la PGD_2 synthétisée par la prostaglandine D synthase de type lipocaline (L-PGDS) et non par la prostaglandine D synthase hématopoïétique (H-PGDS). L'expression de la L-PGDS a été décrite dans les cellules gliales du système nerveux central (SNC), notamment dans les oligodendrocytes (Beuckmann *et al.*, 2000) et les astrocytes en culture (Giacomelli *et al.*, 1996). En revanche, la forme hématopoïétique de la PGDS est retrouvée dans les ganglions rachidiens, dans les cellules satellites et les cellules de Schwann. Cette forme est également retrouvée dans le tube digestif, exprimée par les entérocytes. L'expression de la L-PGDS est quant à elle, limitée à une sous-classe de neurones (Vesin *et al.*, 1995a; Vesin *et al.*, 1995b). Ces différences d'expression des PGDS dans les CGE et les ganglions rachidiens, peuvent être expliquées par leur origine embryonnaire (Krispin *et al.*, 2010). De façon cohérente avec cette hypothèse, les neurones entériques, dont l'origine embryonnaire est la même que celle des CGE, expriment également la L-PGDS (données non publiées).

Les données de la littérature montre que la L-PGDS est produite et sécrétée dans le liquide céphalo-rachidien par les astrocytes du SNC (Giacomelli *et al.*, 1996). En plus de sa fonction de transporteur de petites molécules lipophiles (Urade *et al.*, 1995), il a été démontré que la L-PGDS conserve une activité enzymatique en dehors de la cellule (Urade & Hayaishi, 2000a). Des résultats préliminaires, obtenus au laboratoire, nous ont permis de montrer que les CGE sécrètent aussi la L-PGDS (Figure 45). Cependant, son activité enzymatique dans le milieu de culture de CGE n'est pas connue. Il serait donc intéressant de réaliser un test d'activité enzymatique de la L-PGDS sécrétée afin de savoir si elle conserve son activité

enzymatique en dehors de la cellule et ainsi savoir si, *in vivo*, elle serait capable de produire de la PGD_2 et/ou son dérivé, la 15d-PGJ_2 à proximité de ses cibles. Néanmoins, il existe deux étapes limitantes dans la production de la 15d-PGJ_2. La première concerne le substrat de l'enzyme : la prostaglandine H_2 (PGH_2). En effet, ce substrat, issu de la catalyse de l'acide arachidonique (AA) par les cyclooxygénases (COX) est très instable et doit être rapidement transformé spontanément en d'autres prostaglandines (PGs), notamment en prostaglandine E_2 (PGE_2) (Yu et al, 2011). Les enzymes des PGs sont donc couplées aux COX afin de faciliter la conversion de la PGH_2 en dérivés des PGs (Murakami et al, 2011). Il est donc peu probable que la PGH_2 puisse être sécrétée sous une forme stable par les CGE. Ces études suggèrent que l'utilisation de la PGH_2 dans une conversion enzymatique extracellulaire reste discutable. La seconde étape limitante est la conversion de la PGD_2 en 15d-PGJ_2. Cette étape requiert la déshydratation de la PGD_2 en prostaglandine J_2 (PGJ_2) suivie d'une seconde déshydratation de la PGJ_2 en 15d-PGJ_2. Ces transformations sont modifiées par la présence de sérum et notamment d'albumine dans le milieu (Scher & Pillinger, 2005).

La 15d-PGJ_2 active des voies de signalisation dans les CEI et les neurones. Cependant, nous n'avons pas déterminé comment la 15d-PGJ_2 peut entrer dans la cellule cible. Le mécanisme de diffusion des PGs a été vérifié sur des œufs de Xénopes (Schuster, 2002). En dépit d'une faible efficacité de diffusion, il a été supposé que les PGs diffusent au travers de la membrane plasmique grâce à leur charge ionique. Le transporteur des PG (PGT) est une protéine exprimée à la surface de la plupart des cellules (Schuster, 2002). C'est une pompe échangeuse d'anions, qui est présumée fonctionner en échangeant une molécule de PG sous sa forme anionique contre une molécule de lactate (Banu *et al.*, 2003). Le transporteur de l'anion organique multi-spécifique (MOAT) est également un transporteur de PGs répertorié (Schuster, 2002). Ces deux transporteurs pourraient participer au passage de la 15d-PGJ_2 dans la cellule cible (Figure 45). Cependant, des récepteurs aux PGs couplés aux protéines G ont été identifiés. La 15d-PGJ_2 est capable de se fixer aux récepteurs 1 et 2 de la PGD_2 (DP1 et DP2) et activer des voies de signalisation dans la cellule cible (Scher & Pillinger, 2005) (Figure 45). L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes connus de ces deux transporteurs permettrait d'établir leurs rôles dans les CEI.

Des études préliminaires réalisées au laboratoire ont permis d'identifier d'autres médiateurs lipidiques d'origine gliale : l'acide 15(S)-hydroxyeicosatétraènoïque (15-HETE) et l'acide 13(S)-hydroxyoctadécadiènoïque (13-HODE). Ces dérivés hydroxylés sont issus de

la catalyse des acides gras polyinsaturés (AGPI) par les lipoxygénases (LOX) et sont également des ligands endogènes de PPARγ (Bull *et al.*, 2003; Altmann *et al.*, 2007). Nous avons mis en évidence la présence de la 15-LOX dans les CGE (Figure 45). Des études ont démontré, *in vitro* et *in vivo*, que ces ligands ont des effets antiprolifératifs sur des cellules tumorales coliques. En revanche, leur effet sur la différenciation des cellules épithéliales n'a pas été décrit (Chen *et al.*, 2003; Nixon *et al.*, 2004).

Les résultats rapportés dans l'article 1, montrent que la 15d-PGJ_2 reproduit en partie l'effet anti-prolifératif des CGE sur les CEI. Il est probable que cet effet des CGE sur les CEI résulte de la combinaison de plusieurs médiateurs gliaux associant la 15d-PGJ_2 mais aussi la 15-HETE et la 13-HODE, voire d'autres médiateurs restant à identifier.

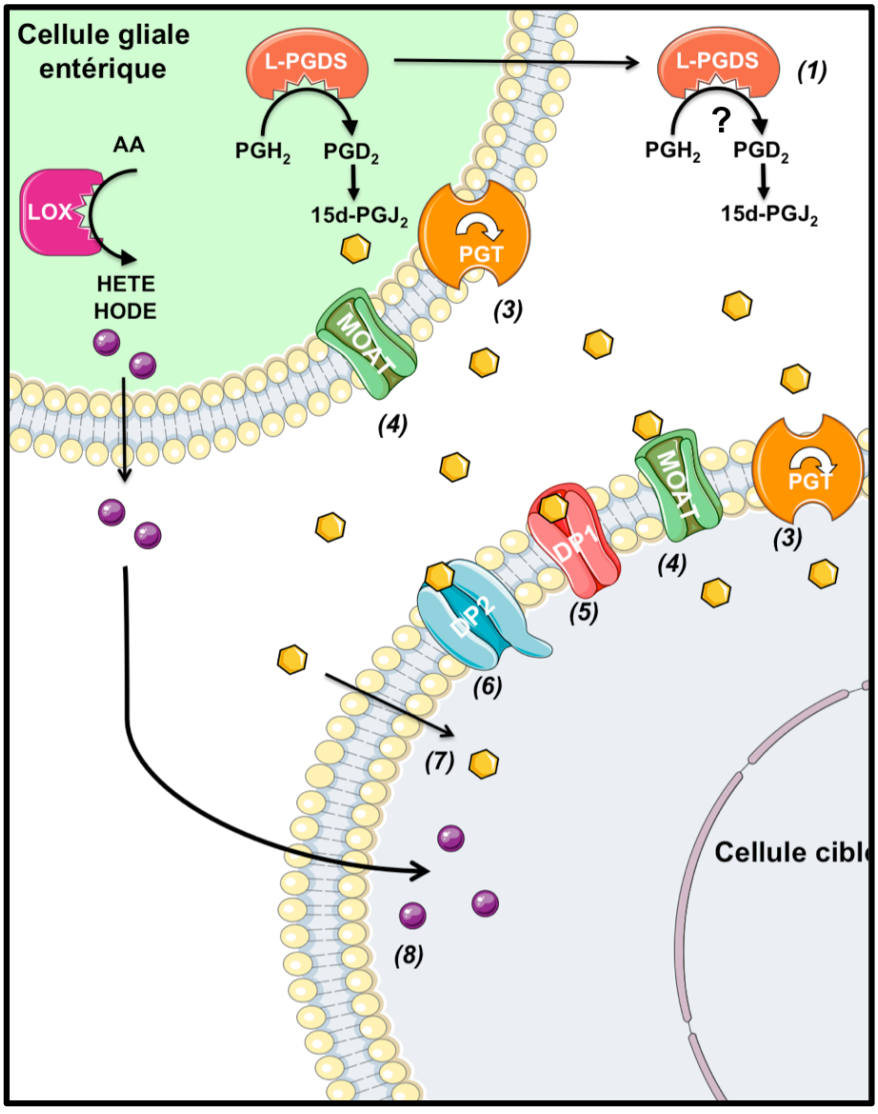


Figure 45 : Synthèse des dérivés lipidiques d'origine gliale et possibilités de transport de la 15d-PGJ_2

La 15d-PGJ_2 est synthétisée dans les CGE par la L-PGDS. Cependant, la synthèse de la 15d-PGJ_2 au niveau extracellulaire n'est pas à exclure dans la mesure où la L-PGDS est aussi secrétée (1). Le transport de la 15d-PGJ_2 dans le milieu extracellulaire ou au travers des cellules peut être assuré par des transporteurs spécifiques tels que le transporteur des prostaglandines PGT ou le transporteur MOAT (3-4). La 15d-PGJ_2 peut également se fixer sur les récepteurs DP1 et DP2 (5-6). La 15d-PGJ_2 est lipophile et peut diffuser au travers des membranes cellulaires (7). Les CGE ont aussi la capacité de secréter d'autres médiateurs lipidiques comme les dérivés hydroxylés tels que la 13-HODE ou la 15-HETE (8).

V.2. Effets des cellules gliales entériques et de la 15d-PGJ_2 sur les cellules épithéliales intestinales :

Les effets de la 15d-PGJ2 d'origine gliale sur la prolifération et la différenciation des CEI sont associés à l'activation de la voie PPARγ. Les CGE induisent une translocation nucléaire de PPARγ dans les CEI et leurs effets fonctionnels sont inhibés par un antagoniste spécifique de PPARγ, le GW9662. Il a été démontré, *in vitro*, que le traitement des CEI par des ligands de PPARγ génère un blocage du cycle cellulaire induisant ainsi une inhibition de la prolifération cellulaire et une activation de la différenciation cellulaire dans les CEI (Kitamura *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2001; Fujisawa *et al.*, 2008). Notre équipe a précédemment montré que les CGE induisaient un blocage en phase G0/G1 du cycle cellulaire dans les cellules Caco-2 (Neunlist *et al.*, 2008). Enfin, plusieurs études ont démontré que l'activation de PPARγ diminuait l'expression de la cycline D1, des kinases dépendantes des cyclines 1, 2 et 4, de Ki-67 ainsi que de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Berger & Moller, 2002; Matthiessen *et al.*, 2005; Ondrey, 2009). L'activation de PPARγ entraîne par ailleurs une augmentation de l'expression de régulateurs du cycle cellulaire tels que des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines comme $p21^{Waf1}$ ou $p27^{Kip1}$, probablement par l'inhibition de leur dégradation par le protéasome (Koeffler, 2003). Enfin, il a été suggéré que PPARγ induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Chen *et al.*, 2006). Dans les CEI, les cibles de PPARγ, après l'activation par les CGE, n'ont pas été identifiées. Cependant, notre étude du transcriptome des CEI co-cultivées avec les CGE, nous a permis d'identifier des gènes pro-prolifératifs et anti-prolifératifs étant régulés différentiellement et en faveur d'une inhibition de la prolifération cellulaire (Van Landeghem *et al.*, 2009).

Nous avons montré que les CGE, le milieu conditionné de culture de CGE et la 15d-PGJ_2 induisaient une augmentation de l'expression des ARNm de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire tels que la phosphatase alcaline intestinale (Hinnebusch *et al.*, 2004), la E-cadhérine (Laprise *et al.*, 2002) et PPARγ (Kato *et al.*, 2004). Ces résultats sont consistants avec notre analyse transcriptomique qui a mis en évidence l'implication potentielle des CGE dans la différenciation des CEI. En effet, les CGE induisaient une augmentation de l'expression de gènes associés à une induction de la différenciation cellulaire dont la E-cadhérine, PPARγ et FAK (Focal Adhesion Kinase) (Van Landeghem *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que les CGE induisent la différenciation cellulaire des CEI, et que ces effets dépendent de l'activation de PPARγ, cette augmentation n'étant plus retrouvée lors de l'ajout d'un antagoniste de PPARγ. Ces effets sur l'augmentation de l'expression de la E-cadhérine sont contradictoires avec une étude montrant que les CGE ne modifient pas l'expression de la protéine E-cadhérine (Savidge *et al.*, 2007a). Cette différence peut être en partie expliquée par les conditions expérimentales utilisées. Toutefois dans l'étude de Savidge, l'impact des CGE a été étudié sur une monocouche de CEI proche de la confluence et probablement composée de cellules différenciées. En revanche, dans notre étude, les CEI sont en prolifération et ceci pourrait les rendre plus sensibles aux signaux de différenciation induits par les CGE. En effet, nous avons montré que la modulation de gènes dans les CEI par les CGE est dépendante de leur état de différenciation (données non publiées).

Des travaux précédents ont permis de montrer que les CGE inhibent la prolifération cellulaire des CEI en secrétant d'autres facteurs solubles tels que le TGF-β1 (Transforming Growth Factor-beta 1). Cet effet anti-prolifératif est associé à une augmentation de la taille des CEI (partiellement induite par le TGF-β1) ainsi qu'à un blocage des CEI en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Cette inhibition de la prolifération cellulaire est probablement associée à un effet antiprolifératif direct du TGF-β1 utilisant la voie des facteurs de transcription SMADs (Small Mothers Against Decapentaplegic) (Beauchamp *et al.*, 1996; Schiller *et al.*, 2004). Par ailleurs, des effets antiprolifératifs de la protéine gliale S100-β (S100 calcium binding protein beta), ont également été mis en évidence sur des lignées de CEI (Neunlist *et al.*, 2008). Ces travaux ont permis de montrer que l'inhibition de la prolifération des CEI par les CGE est, au moins en partie, associée à ces deux médiateurs gliaux, le TGF-β1 et la protéine S100-β. D'autres résultats suggèrent également que les CGE sécrètent le proEGF ou forme précurseur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) impliqué, après maturation, dans

l'augmentation d'expression et la phosphorylation de FAK dans les CEI favorisant ainsi les processus d'étalement cellulaire des CEI et la réparation de la barrière épithéliale intestinale (BEI) (Annexe 3) (Van Landeghem *et al.*, 2011). Bien que le contrôle de l'expression et de la phosphorylation de FAK soit impliqué dans la réparation de la muqueuse, cette régulation pourrait également intervenir dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaire (Levy *et al.*, 1998; Bouchard *et al.*, 2007; Assoian & Klein, 2008).

Si la 15d-PGJ_2 diminue la prolifération cellulaire et favorise la différenciation des CEI, cette molécule pourrait aussi modifier d'autres fonctions au niveau des CEI. Toutefois, nous avons observé que celle-ci n'a aucun effet sur la perméabilité paracellulaire d'une monocouche de cellules Caco-2 différenciées (Données non publiées). Ces résultats sont consistants avec une étude montrant que la 15d-PGJ_2 ne modifie pas la perméabilité paracellulaire dans des conditions physiologiques (Ponferrada *et al.*, 2007). La 15d-PGJ_2 peut avoir d'autres effets sur les CEI. En effet, il a été montré que la 15d-PGJ_2 peut induire l'apoptose dans des lignées de CEI (Shimada *et al.*, 2002; Moriai *et al.*, 2009; Koyama *et al.*, 2010). Ces effets sont probablement dus à l'utilisation de concentrations élévées de 15d-PGJ_2 (supérieures à 10 μM) et seraient indépendants de la voie PPARγ. De manière intéressante, une étude *in vitro* a montré que la 15d-PGJ_2 est capable d'inhiber l'activation de NF-κB induite par le lipopolysaccharide (LPS) dans des CEI, en retardant la dégradation de la sous-unité IκBα (Eun *et al.*, 2006). De plus, *in vivo* chez le rat, il a été observé que la 15d-PGJ_2 prévient d'une inflammation colique et de dysfonctionnements de la BEI induits par un stress, en liaison avec la voie PPARγ (Ponferrada *et al.*, 2007). Ces résultats indiquent que la 15d-PGJ_2 présente des effets anti-inflammatoires pouvant être associés à l'activation de la voie PPARγ ou de manière indépendante en interagissant directement avec d'autres voies de signalisation (i.e. NF-κB). A travers ce médiateur, les CGE pourraient donc aussi réguler d'autres fonctions de la BEI.

Dans des modèles d'ablation spécifique des CGE, une augmentation de la perméabilité vasculaire intestinale et de la perméabilité paracellulaire a été démontré (Bush *et al.*, 1998; Cornet *et al.*, 2001; Aube *et al.*, 2006; Savidge *et al.*, 2007a). I*n vitro*, les CGE, co-cultivées avec des CEI, diminuent la perméabilité de la BEI (Neunlist *et al.*, 2008) à travers la libération d'autres médiateurs gliaux solubles. Le nitroso-glutathion (GSNO) est en partie responsable de la diminution de la perméabilité paracellulaire en régulant l'expression des

protéines des jonctions serrées telles que la protéine ZO-1 (*zonula occludens* 1) et l'occludine (Savidge *et al.*, 2007a). De manière intéressante, le GSNO a été impliqué dans la protection de la BEI contre une agression par la bactérie entéro-invasive *Shigella flexneri*, en régulant la petite GTPase cdc42 (Annexe 2) (Flamant *et al.*, 2011).

Les CGE ont la capacité de synthétiser et libérer différents médiateurs solubles à proximité des CEI (Figure 46). Ces médiateurs vont agir sur les CEI, permettant d'activer ou de réprimer différentes voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie de la BEI.

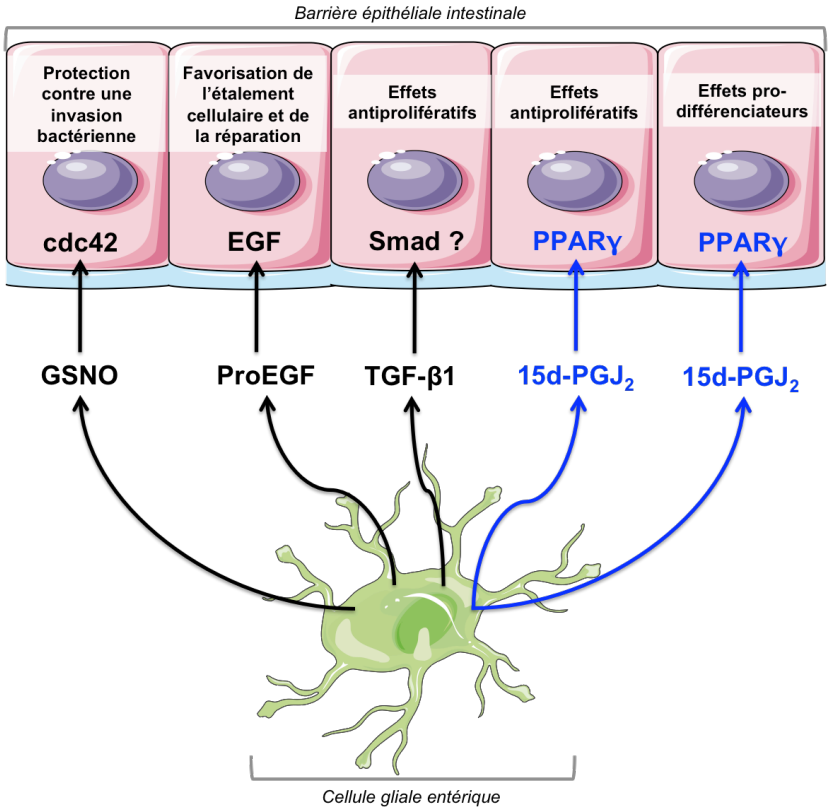


Figure 46 : Schéma récapitulatif des interactions glio-épithéliales

De manière intéressante, les CGE présentent une morphologie et des fonctions similaires à celles des astrocytes du SNC (Savidge *et al.*, 2007a). Il a été suggéré l'existence d'un paradigme entre la régulation des fonctions de la BEI par les CGE et la régulation des fonctions de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par les astrocytes (Figure 47) (Savidge *et al.*, 2007b). Au sein du SNC, la BHE est en partie régulée par les interactions entre les astrocytes et les cellules endothéliales cérébrales qui forment une unité neuro-vasculaire (Abbott *et al.*, 2006). Les processus finaux des astrocytes sont proches des cellules endothéliales de la BHE. Il a été observé, notamment *in vitro*, que les astrocytes peuvent 1)

renforcer l'intégrité physique de la BHE en augmentant l'expression des jonctions serrées (Dehouck *et al.*, 1990), 2) réguler le transport de certaines molécules en augmentant l'expression des transporteurs tels que GLUT1 (Glucose Transporter 1) (McAllister *et al.*, 2001) et 3) réguler la fonction métabolique de la BHE en induisant l'expression d'enzymes spécialisées (Abbott, 2002). Il a également été suggéré que les astrocytes sont capables de sécréter différents médiateurs comme le TGF-β1 (Garcia *et al.*, 2004) ou le GDNF (Glial-Derived Neurotrophic Factor) (Igarashi *et al.*, 1999). Dans le système nerveux périphérique (SNP), les CGE forment une unité neuro-épithéliale équivalente à celle formée par les astrocytes et la BHE. Les CGE sont à proximité des CEI et sécrètent des médiateurs solubles (i.e. TGF-β1, GDNF) (von Boyen *et al.*, 2006a; Neunlist *et al.*, 2007), également impliqués dans la régulation des fonctions de la BEI (Savidge *et al.*, 2007b).

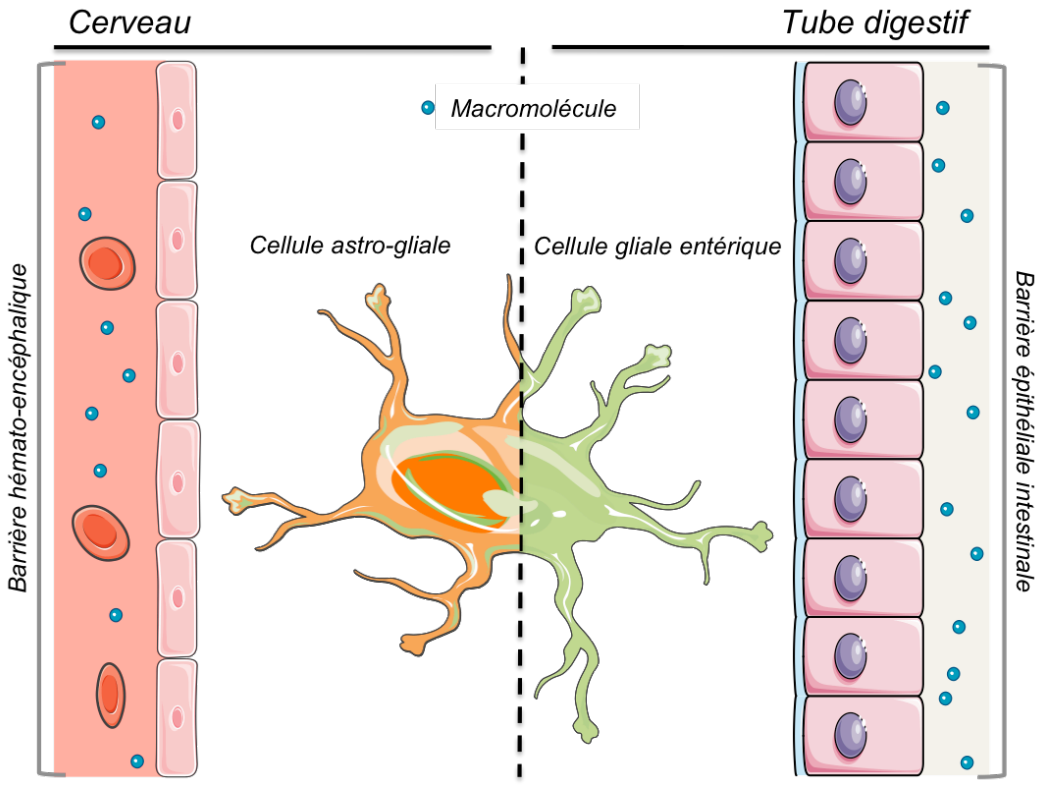


Figure 47 : Analogies entre la barrière épithéliale intestinale et la barrière hémato-encéphalique

Les cellules gliales entériques partagent des similarités avec les astrocytes du système nerveux central (SNC). Il en de même pour les interactions glio-épithéliale dans le système nerveux entérique et les interactions astrocytes-endothélium dans le SNC.

V.3. Effets des cellules gliales entériques sur les neurones entériques :

Nous avons montré que les CGE et la 15d-PGJ_2 d'origine gliale exercent des effets neuroprotecteurs en général et sur les neurones entériques en particulier. En effet, la 15d-PGJ_2 prévient de la mort neuronale induite par un stress oxydant dans des cultures de cellules de neuroblastome humain (cellules SH-SY5Y) ainsi que dans des cultures primaires de SNE.

Des études ont caractérisé le rôle protecteur de la 15d-PGJ_2 dans des neurones indifférenciés ou dans des cellules issues de neuroblastomes soumises à un stress nitrosylant ou oxydant (Aoun *et al.*, 2003a; Lim *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008). La 15d-PGJ_2 protège également les cultures de neurones corticaux de rat et le cerveau de rat *in vivo* d'un traitement par l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) (Zhao *et al.*, 2006) et dans le cerveau de rat, *in vivo*, de lésions par ischémie expérimentale (Lin *et al.*, 2006; Ou *et al.*, 2006). De manière similaire, des effets protecteurs de la 15d-PGJ_2 ont été observés dans d'autres types cellulaires, en particulier dans les cellules endothéliales (Levonen *et al.*, 2001; Hosoya *et al.*, 2005) et les cellules épithéliales (Garg & Chang, 2004; Poncin *et al.*, 2008).

Nos résultats suggèrent que les effets de la 15d-PGJ_2 sur la neuroprotection sont indépendants de la voie PPARγ. Ces données sont contradictoires avec l'effet neuroprotecteur de la 15d-PGJ_2 observé dans la lignée de neuroblastomes BE(2)-C (Lin *et al.*, 2006). Toutefois, d'autres études indiquent que l'effet neuroprotecteur de la 15d-PGJ_2 peut être indépendant de la voie PPARγ (Aoun *et al.*, 2003a; Lim *et al.*, 2004).

Dans notre étude, la co-culture avec des CGE ou de la 15d-PGJ_2 augmentent l'expression du facteur de transcription Nrf2 ou NFE2L2 (Nuclear Factor [Erythroid –derived 2]-Like 2)) dans les cultures primaires de SNE et les cellules SH-SY5Y. Cette augmentation de Nrf2 est probablement associée à l'augmentation de la stabilité de la protéine après dissociation avec la protéine inhibitrice Keap 1 (Kelch-like ECH-associated 1), prévenant ainsi son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome (Nguyen *et al.*, 2004; Kansanen *et al.*, 2009). En effet, la 15d-PGJ_2 peut se lier directement sur Keap 1 au niveau de la cystéine 273 et permettre ainsi la libération de Nrf2 et son transfert ultérieur dans le noyau pour activer la transcription de différents gènes (Hosoya *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2009).

De plus, nous avons montré que l'augmentation de la protéine Nrf2 est associée à une augmentation de l'expression des ARNm de GCLc (Glutamate-Cysteine Ligase, catalytic subunit) et NQO1 (NADPH Quinone Oxidoreductase 1) dans les cellules SH-SY5Y. De même le niveau d'expression de la protéine GCLc est augmenté dans les neurones entériques. Il est connu que le facteur de transcription Nrf2 peut se lier à l'élément de réponse antioxydant (ARE) et réguler l'expression de gènes codant pour des enzymes anti-oxydantes comme NQO1, HO1 (Heme Oxygenase 1) ou GCLc (Jaiswal, 2004; Kansanen *et al.*, 2009). L'enzyme NQO1 participe à la neuroprotection notamment en limitant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Jia *et al.*, 2008a; Jia *et al.*, 2008b; Dinkova-Kostova & Talalay, 2010). Une des conséquences importante de l'activation de la GCLc induite par la 15d-PGJ_2 est l'augmentation du niveau intracellulaire de glutathion (GSH) dans les neurones entériques et les cellules SH-SY5Y. Cette augmentation, associée à l'activation de la voie Nrf2, est en accord avec les résultats obtenus dans les astrocytes (Shih *et al.*, 2003) et dans d'autres types cellulaires (Levonen *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2004). L'activité de la GCLc est déterminante dans la mesure où la formation du dipeptide glutamate-cystéine (Glu-Cys) issue de la catalyse par la GCLc est une étape clé dans la production de GSH, la seconde étape d'addition de glycine catalysée par la glutathion synthétase étant moins limitante (Aoyama *et al.*, 2008). La disponibilité en cystéine est également un élément important pour la synthèse *de novo* de GSH, en particulier dans les neurones. En effet, une part importante de la cystéine extracellulaire est transformée en cystine (Cys-Cys) et n'est pas ou peu utilisable par les neurones. Au niveau du SNC, les astrocytes sont capables d'utiliser la cystine grâce au transporteur spécifique xCT (cystine/glutamate transporter) et ainsi assurer la synthèse de GSH. Ces mêmes cellules peuvent sécréter le GSH *via* le transporteur MRP1 (Multidrug Resistance Protein 1) (Minich *et al.*, 2006). Le GSH sécrété peut être métabolisé à proximité des astrocytes par la γGT (γGlutamylcysteine Transpeptidase) localisée au niveau de la membrane plasmique des astrocytes. Le dipeptide Cys-Gly est ensuite clivé par une aminopeptidase localisée préférentiellement au niveau de la membrane des neurones. La cystéine ainsi produite à proximité des neurones est rapidement transportée dans les neurones par un transporteur de type EAAT (Excitatory Amino-Acid Transporter) pour assurer la synthèse de GSH dans ces cellules (Shih *et al.*, 2003; Aoyama *et al.*, 2008; Lu, 2009; Escartin *et al.*, 2011).

Dans le SNC, Il est évident que le GSH joue un rôle central dans la protection des neurones par les astrocytes. Notre étude souligne également le rôle central du GSH dans la neuroprotection du SNE médié par la 15d-PGJ_2. Une première étude réalisée au laboratoire montre que les CGE sont capables de synthétiser et sécréter le GSH. Le GSH ainsi produit est en partie responsable des effets neuroprotecteurs des CGE contre le stress oxydant (Abdo *et al.*, 2010). Le modèle décrit pour les astrocytes pourrait s'appliquer aux CGE dans le SNE (Figure 48). Toutefois, les mécanismes d'action du GSH dans l'environnement extracellulaire n'ont pas été identifiés. Le métabolisme du GSH et la production potentielle de cystéine, comme pour les astrocytes, restent à montrer pour les CGE au niveau du SNE, en particulier la présence de la γGT et de l'aminopeptidase. Cependant, le GSH pourrait aussi participer à la neuroprotection sans être une source de cystéine mais en interagissant directement avec les ions superoxydes (Winterbourn & Metodiewa, 1994), le monoxyde d'azote (NO) (Clancy *et al.*, 1994) ou les radicaux hydroxylés (Bains & Shaw, 1997), constituant ainsi un moyen d'élimination de ces radicaux (Aoyama *et al.*, 2008). De plus, le GSH est un co-facteur pour plusieurs enzymes dont les glutathion peroxydases (GPx) intra- et extracellulaires. Le GSH participe à la réduction du peroxyde d'hydrogène en donnant des électrons. Le glutathion oxydé ainsi formé (GSSG) est de nouveau réduit par la glutathion réductase et réutilisé par les GPx (Dringen, 2000). Au niveau extracellulaire, un nombre limité d'enzymes utilisant le GSH comme substrat, a été décrit comme la GPx-3 (Bjornstedt *et al.*, 1994) et la sélénoprotéine P (SeP) (Takebe *et al.*, 2002). Ces enzymes sécrétées, utilisant le GSH, pourraient constituer une première barrière de protection contre le stress oxydant. Nous ne savons pas actuellement si ces enzymes sont sécrétées par les CGE en même temps que le GSH. Toutefois, des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire, montrent que les neurones entériques et non les CGE, expriment la SeP. La mise en évidence de la sécrétion de SeP par les neurones entériques pourrait constituer une nouvelle démonstration des relations neuro-gliales dans la neuroprotection médiée par le GSH. Une autre des fonctions importantes du GSH sécrété serait de complexer le NO et de former du GSNO, limitant ainsi les effets d'un stress nitrosylant dans le cas d'un excès de NO (Inoue *et al.*, 1999; Foster *et al.*, 2003). De plus, la formation de GSNO aurait des effets bénéfiques sur les CEI comme cela est décrit précédemment (Savidge *et al.*, 2007a; Flamant *et al.*, 2011). Des effets neuroprotecteurs du GSNO contre un stress oxydant, ont été décrits dans le cerveau (Singh *et al.*, 1996). Toutefois, nous n'avons pas observé de tels effets neuroprotecteurs du GSNO sur les cellules SH-SY5Y en présence de H_2O_2 (Abdo et al, 2010).

A côté du rôle neuroprotecteur du GSH sécrété par les CGE dans le milieu extracellulaire, ces cellules libèrent du 15d-PGJ_2 qui agit au niveau des neurones pour augmenter la production de GSH au niveau intracellulaire (Figure 48). D'autres facteurs d'origine gliale comme le GDNF (Steinkamp *et al.*, 2003) pourraient également induire la production de GSH dans les neurones (Chao & Lee, 1999; Onyango *et al.*, 2005).

La mise en évidence du rôle central du GSH dans la protection des neurones, en particulier des neurones entériques, contre un stress oxydant en agissant soit au niveau extra- et intracellulaire, nécessite également de préciser les mécanismes impliqués au niveau moléculaire. C'est le cas, par exemple, des protéines qui pourraient être recrutées dans le métabolisme et/ou dans l'utilisation du GSH extracellulaire. De même, au niveau des neurones, les voies de signalisation utilisées, en particulier Nrf2, par le médiateur lipidique 15d-PGJ_2 mérite d'être approfondies. Ces travaux seront à réaliser, si possible, directement dans les cultures primaires de SNE, modèle qui reproduit le mieux les interactions neuro-gliales *in vitro*. Toutefois, des difficultés devront être surmontées pour permettre de cibler efficacement et spécifiquement les différentes cellules du SNE (i.e. CGE et neurones entériques). L'utilisation de vecteurs lentiviraux avec des promoteurs glio- ou neuro-spécifiques est en cours avec des résultats prometteurs.

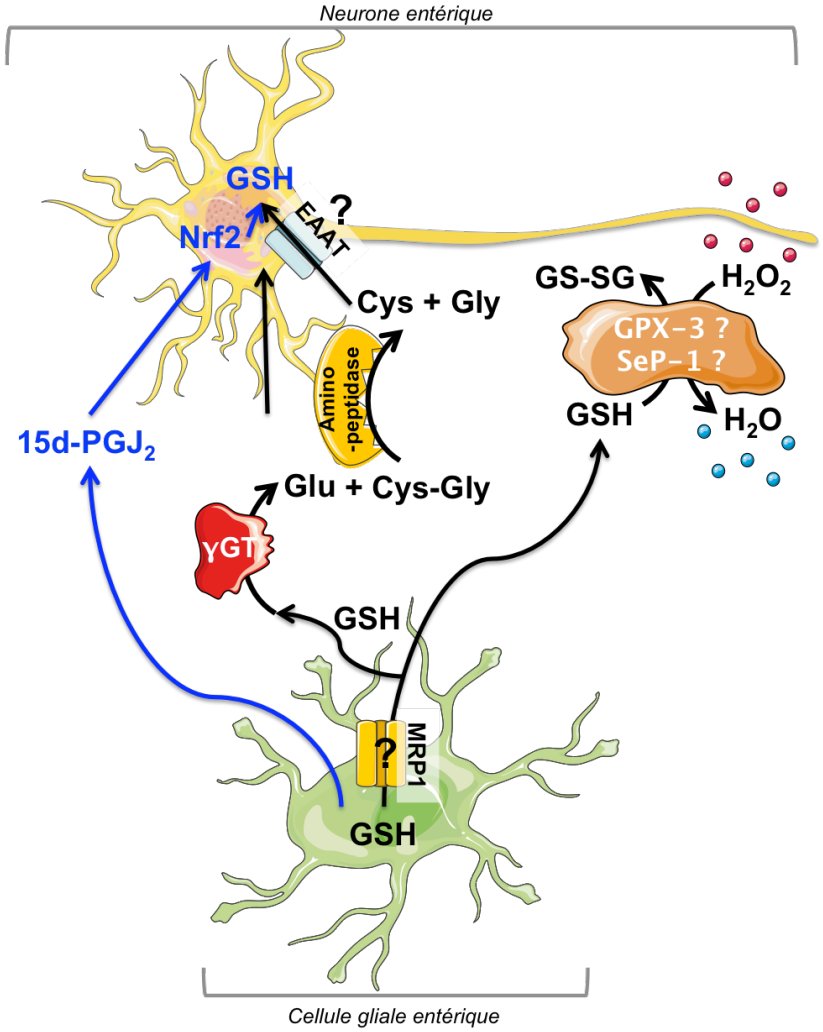


Figure 48 : Schéma récapitulatif des interactions neuro-gliales

Ce schéma est inspiré en partie, des observations obtenues dans le cadre des interactions neuro-astrocytaires du SNC. Les cellules gliales entériques synthétisent et libèrent la 15d-PGJ$_2$ et le GSH afin de protéger les neurones contre un stress oxydant. La 15d-PGJ$_2$ active la voie Nrf2 et la production intracellulaire de GSH dans les neurones. Le GSH libéré par les CGE grâce à un transporteur de type MRP-1, serait utilisé soit directement pour protéger les neurones contre un stress oxydant (H_2O_2) en association ou non avec des glutathion peroxydases (GPx-3, SeP-1), soit indirectement comme source de cystéine pour la synthèse du glutathion dans les neurones. Les différentes protéines susceptibles d'intervenir dans ces 2 voies restent à identifier.

D'autre part, le facteur de croissance neuronal (NGF), produit par les CEI, a été impliqué dans l'augmentation de la neuroprotection (Moriez *et al.*, 2009).

V.4. L'unité neuro-glio-épithéliale dans les pathologies digestives :

Comme discuté précédemment, la 15d-PGJ_2 d'origine gliale, est capable de contrôler au niveau cellulaire la prolifération et la différenciation des CEI, ainsi que la survie neuronale. Les réponses bénéfiques obtenues dans les situations physiologiques sont en faveur d'effets positifs des CGE sur les fonctions digestives. En conséquence, des altérations au niveau des CGE, comme le nombre de cellules et/ou l'expression de certains gènes gliaux, pourraient être déterminantes dans l'évolution de différentes pathologies digestives. Ces altérations au niveau des CGE pourraient être associées, soit à une perte de leur capacité protectrice, soit à l'acquisition d'un nouveau phénotype délétère pour les cellules environnantes. De telles altérations du SNE, et des CGE en particulier, ont été décrites dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Neunlist et al. 2008).

De nombreuses pathologies digestives sont caractérisées par des altérations de la BEI, incluant des augmentations de la perméabilité paracellulaire ou transcellulaire (MICI ou dans le syndrome de l'intestin irritable), en passant par des altérations des processus de prolifération dans les cancers colorectaux et/ou aussi des processus de réparation de la BEI dans les MICI (Mankertz & Schulzke, 2007; Laukoetter *et al.*, 2008; Piche *et al.*, 2009).

Le modèle murin AOM-DSS ne nécessite pas de transformation génétique des souris pour reproduire la séquence de carcinogenèse colique. Des lésions dysplasiques de bas grade, puis de haut grade, et enfin l'apparition de carcinomes intra-muqueux apparaissent au cours des cycles de traitement par le DSS. Les tumeurs observées étaient localisées dans la partie terminale du côlon, ce qui est cohérent avec le modèle utilisé, puisque le DSS est un agent induisant une colite de type rectocolite hémorragique où les lésions sont d'abord localisées au niveau du rectum avant de s'étendre de façon rétrograde au niveau du côlon.

L'étude de l'évolution de l'expression des marqueurs gliaux GFAP et S100-β en fonction des lésions observées montre qu'il existe une augmentation significative de leur expression dans les côlons porteurs d'adénomes tubuleux en dysplasie de haut grade par rapport aux côlons normaux ou aux côlons ayant des adénocarcinomes intra-muqueux. Ces résultats suggèrent l'existence d'altérations au moins qualitatives du réseau glial. Une des explications possible est que l'inflammation induite par le DSS ait eu une influence soit sur le

nombre de CGE soit sur l'expression de ces marqueurs gliaux. En effet, il a été décrit que l'expression de la GFAP par les CGE est augmentée *in vitro* lorsque celles-ci sont traitées avec des cytokines pro-inflammatoires (von Boyen *et al.*, 2006a). Nous avons également observé que l'expression des marqueurs gliaux est diminuée au sein des adénocarcinomes.

Parallèlement à l'augmentation des marqueurs gliaux dans les dysplasies, l'expression de la mPGES-1 et de la L-PGDS est également augmentée avec une induction plus précoce pour la mPGES-1. Ceci pourrait aboutir à une production en faveur de la PGE_2 par rapport à la 15d-PGJ_2 dans les états précancéreux précoces et initier le processus de carcinogenèse colique (Castellone *et al.*, 2005). L'augmentation tardive de la L-PGDS et potentiellement de la 15d-PGJ_2 serait plus en faveur d'une réduction du développement tumoral liée aux capacités anti-prolifératives de la 15d-PGJ_2 sur les CEI (résultats présentées dans la thèse) et pro-apoptotiques sur les cellules cancéreuses coliques (Shimada *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2009). Toutefois, les travaux de Hokari montrent une corrélation entre l'augmentation de l'expression de la L-PGDS et le développement de conditions inflammatoires (Hokari *et al.*, 2009; Hokari *et al.*, 2011). De plus, ces effets pourraient être associés à la PGD_2 et non à la 15d-PGJ_2, bien que les effets de la PGD_2 sur l'inflammation et la carcinogénèse colique restent très controversés (Ajuebor *et al.*, 2000; Zamuner *et al.*, 2005 ; Vong *et al.*, 2010 ; Hokari *et al.*, 2010).

Dans ce contexte pathologique, la contribution des CGE, notamment au niveau de la production des PGs et des enzymes impliquées, nécessite d'être examinée *in situ* avec beaucoup plus de précision. La mise au point d'une nouvelle méthode d'analyse devrait nous permettre d'atteindre cet objectif. La méthode proposée permet sur l'ensemble du tissu, une analyse au niveau cellulaire non seulement des différentes composantes du SNE mais aussi des cellules proches du SNE. Les résultats attendus pourraient nous aider à définir la part des CGE dans l'évolution des processus physiopathologiques associés à l'inflammation et à la carcinogénèse colique (Figure 49).

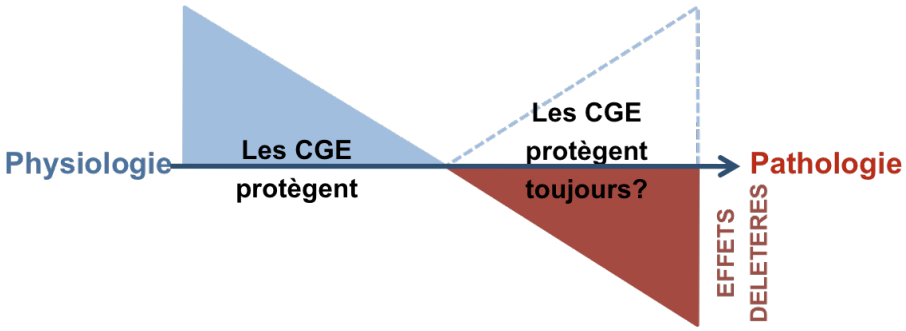


Figure 49 : Rôle des cellules gliales entériques en pathologie

Les CGE participent à la protection de la barrière épithéliale intestinale. Cependant, en situation pathologique, les cellules gliales entériques pourraient continuer malgré tout à limiter les altérations de la BEI ou au contraire participer au processus pathologique.

VI. CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

L'Unité-Neuro-Glio-Epithéliale (UNGE) est un ensemble pluri-cellulaire capable d'établir des interactions importantes pour assurer le maintien et le contrôle des fonctions digestives. Ces interactions impliquent différents facteurs produits par les cellules de l'UNGE (Figure 50) dont les effets ont été identifiés et décrits dans l'introduction de cette thèse. Un nombre important de ces facteurs solubles sont synthétisés et sécrétés par les cellules gliales entériques (CGE). Les travaux présentés dans ce mémoire permettent de proposer la 15d-PGJ_2 comme un nouveau médiateur lipidique d'origine gliale, pouvant agir à la fois sur les cellules épithéliales intestinales (CEI) et les neurones et avoir ainsi un rôle central dans l'UNGE. Il est intéressant de noter que la 15d-PGJ_2 contrôle la prolifération et la différenciation des CEI et la survie neuronale en utilisant des voies de signalisation différentes : PPARγ dans les CEI et Nrf2 dans les neurones.

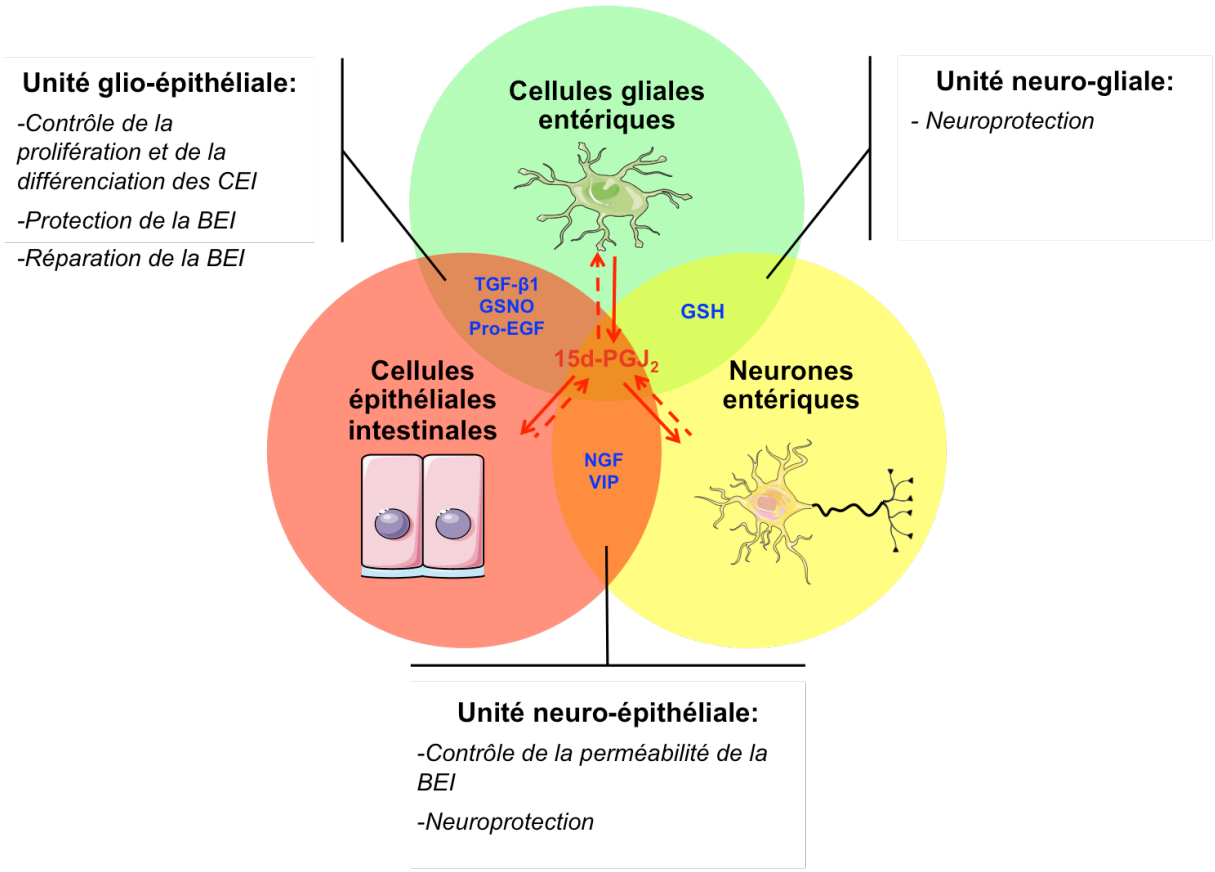


Figure 50 : 15d-PGJ_2 et l'unité neuro-glio-épithéliale (UNGE)

Les compartiments cellulaires interagissent ensemble pour former des unités bi-partites. Les différentes cellules impliquées secrètent des médiateurs qui agissent sur d'autres compartiments pour les réguler. Les médiateurs identifiés à partir de travaux issus du laboratoire sont indiqués en bleu. La 15d-PGJ_2 (en rouge) occupe une position centrale avec des voies de production ou d'action identifiées (flèches en trait plein) ou à mettre en évidence (flèches en trait pointillé).

Ce rôle central au sein de l'UNGE pourrait être élargi si on considère d'une part, que la 15d-PGJ_2 peut être produite par d'autres cellules de l'UNGE (neurones et CEI) et d'autre part que la 15d-PGJ_2 pourrait agir sur les CGE elles-mêmes. En effet, les CEI expriment la H-PGDS (Park *et al.*, 2007) et les neurones entériques expriment la L-PGDS (résultats préliminaires). Ces deux types cellulaires seraient donc susceptibles de contribuer au pool extracellulaire de 15d-PGJ_2. Concernant les effets de la 15d-PGJ_2 sur les CGE, il n'y a pas actuellement de données montrant l'existence d'une telle régulation autocrine. Toutefois, les résultats publiés montrent que la 15d-PGJ_2 peut moduler certaines fonctions astrocytaires en utilisant différentes voies de signalisation (Petrova al, 1999 ; Park et al, 2003, Zhao et al, 2004, Giri et al, 2004 ; Phulwani et al, 2006). Par ailleurs, la voie de signalisation Nrf2, associée aux effets de la 15d-PGJ_2 sur les neurones (résultats article 2 de la thèse), est une voie essentielle dans la production astrocytaire de glutathion dans le SNC (Shih et al, 2003 ; Vargas & Jonhson, 2009). Ces observations sont assez convaincantes pour rechercher les effets de la 15d-PGJ_2 sur les CGE, en particulier sur, (1) la production de facteurs gliaux, comme le GSH ou la 15d-PGJ_2 elle-même et (2) l'activation de gènes impliqués dans la synthèse de ces molécules (GCLc, L-PGDS).

Une des propriétés remarquables de la 15d-PGJ_2, probablement associée à sa structure cyclopentenone, est de pouvoir agir sur un nombre important de voies de signalisation différentes. Dans ce travail, nous avons identifié deux voies de signalisation : PPARγ et Nrf2. D'autres facteurs de transcription peuvent également être impliqués dans les réponses induites par la 15d-PGJ_2 comme NF-κB (Nuclear Factor-κB), AP-1 (Activator Protein-1), HIF (Hypoxia Inducible Factor), STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) ou p53 (Kim & Surh, 2006). Une telle diversité de voies d'activation associées à la 15d-PGJ_2 pourrait expliquer les effets de ce médiateur lipidique sur un nombre important de fonctions cellulaires comme la prolifération et/ou la différenciation cellulaire, la mort ou la survie cellulaire ou encore la production de cytokines pro- ou anti- inflammatoires (Koppal *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2003; Giri *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004; Phulwani *et al.*, 2006).

Toutefois, les interactions cellulaires ne se limitent pas à celles de l'UNGE. Le microbiote intestinal, les cellules endothéliales et immunitaires, les fibroblastes ou encore les cellules musculaires pourraient participer à la régulation de cet environnement (Figure 51).

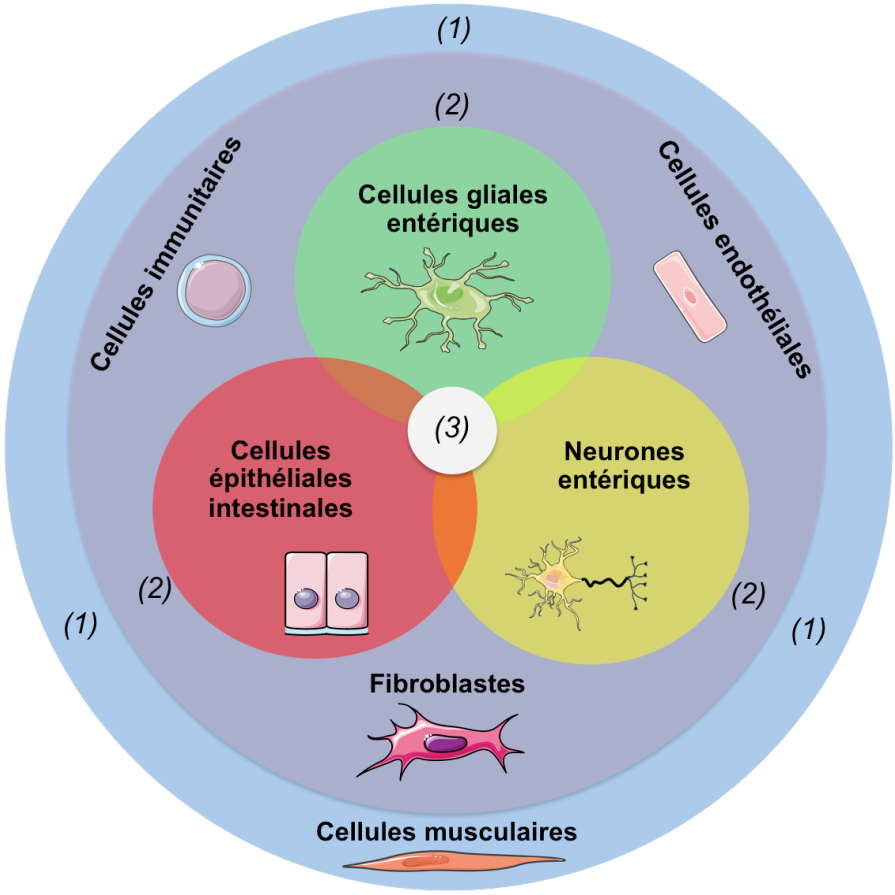


Figure 51 : L'unité neuro-glio-épithéliale et le microenvironnement intestinal

L'unité neuro-glio-épithéliale (UNGE) interagit également avec d'autres contingents cellulaires. Les cellules musculaires, présentes le long du tube digestif, sont étroitement liées aux cellules de l'UNGE (1). Les cellules environnantes telles que les cellules endothéliales et immunitaires ainsi que les fibroblastes sont à proximité de l'UNGE et pourraient participer à la régulation ou être régulées par l'UNGE (2). L'UNGE est également liée au contenu luminal et notamment au microbiote intestinal qui joue un rôle important dans la modulation des fonctions de la barrière épithéliale intestinale (3).

La 15d-PGJ_2 pourrait agir sur les autres types cellulaires du microenvironnement intestinal. Elle pourrait agir notamment sur les fonctions associées aux cellules endothéliales. Dans ce contexte, la 15d-PGJ_2 est capable de contrôler l'angiogenèse en inhibant leur prolifération cellulaire et en induisant leur apoptose (Bishop-Bailey & Hla, 1999; Dong *et al.*, 2004; Funovics *et al.*, 2006). La 15d-PGJ_2 participe également à la régulation de la réponse inflammatoire en contrôlant la production des cytokines par les cellules endothéliales

(Imaizumi *et al.*, 2003; Prasad *et al.*, 2008). Enfin, la 15d-PGJ_2 pourrait inhiber la production de cytokines par les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques ou les macrophages et ainsi limiter les processus inflammatoires associés (Surh *et al.*, 2011). A notre connaissance, le rôle de la 15d-PGJ_2 dans le contrôle des cellules musculaires n'a pas été défini mais nous ne pouvons pas exclure un rôle potentiel de cette prostaglandine sur la régulation de la motricité digestive.

La 15d-PGJ_2 joue un rôle primordial sur les fonctions du tube digestif (TD). Cependant, ce médiateur lipidique n'est probablement pas le seul impliqué dans la régulation des fonctions cellulaires du TD. En effet, les prostaglandines produites en amont de la 15d-PGJ_2, telles que la PGD_2 ou la PGE_2, interviennent très probablement dans le contrôle des fonctions neuronales et de la BEI. Comme évoqué dans les chapitres précédents, ces dernières sont impliquées aussi bien dans le contrôle des fonctions du TD que dans la physiopathologie de certaines maladies digestives. Il en est de même pour les autres médiateurs lipidiques que nous avons identifié dans le surnageant de culture des CGE : les dérivés hydroxylés, 15-HETE et 13-HODE. Des études ont démontré, *in vitro* et *in vivo*, que ces ligands ont des effets antiprolifératifs sur des cellules tumorales coliques (Chen *et al.*, 2003; Nixon *et al.*, 2004). L'ensemble de ces médiateurs lipidiques pourrait être impliqué dans le contrôle des fonctions du TD.

Aux vues des propriétés bénéfiques de la 15d-PGJ_2, la modulation de son apport ou le contrôle de sa production, pourraient constituer des stratégies thérapeutiques intéressantes pour la prise en charge de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou des neuropathies entériques. Cependant, l'apport direct de 15d-PGJ_2 par voie intra-luminale semble difficile dans la mesure où la dégradation de cette prostaglandine est rapide et le contrôle de sa bio-disponibilité compliqué. Peut-être l'utilisation d'activateurs de la L-PGDS connus tels que le chlorure de guanidine, pourrait être envisagée, permettant d'augmenter l'activité de l'enzyme sans toutefois assurer la production systématique de la 15d-PGJ_2.

D'autres stratégies thérapeutiques visant à enrichir l'alimentation par les précurseurs de la 15d-PGJ_2 pourraient être envisageables. En effet, la supplémentation d'un régime en acides gras polyinsaturés tels que les oméga-6 ou oméga-3, constituerait une source supplémentaire de précurseurs afin d'augmenter la production de 15d-PGJ_2. Il est connu qu'un régime riche en oméga-3 peut modifier la perméabilité intestinale ainsi que le codage

neurochimique du SNE (De Quelen *et al.*, 2011). Cependant, les effets bénéfiques des AGPI ω−6 et ω-3, notamment lors de colite, restent malgré tout controversés (Nieto *et al.*, 2002; Vieira de Barros *et al.*, 2011).

Nous savons que les effets de la 15d-PGJ_2 sont liés en partie à la présence de son cycle pentenone. Il existe des analogues structuraux de la 15d-PGJ_2 tel que le resvératrol, le sulphoraphane ou le ter-butylhydroquinone. Ces molécules, à travers l'activation de Nrf2, jouent un rôle anti-oxydant au même titre que celui de la 15d-PGJ_2, et ont un rôle protecteur du TD, notamment lors de colite (Shih *et al.*, 2005; Bereswill *et al.*, 2011). Ils pourraient constituer des alternatives intéressantes à l'utilisation de la 15d-PGJ_2.

Les probiotiques constituent également une approche thérapeutique par l'alimentation, et par l'utilisation, par exemple, de souches transformées capables de produire de la 15d-PGJ_2.

ANNEXES

Annexe 1 : Regulation of Intestinal Epithelial Cells transcriptome by Enteric Glial Cells: impact on Intestinal Epithelial Barrier functions

Auteurs : Laurianne Van Landeghem[1,2,3] , Maxime M Mahé[1,2,3], Jean Léger[2,4], Isabelle Guisle[2,4], Raluca Teusan[2,4], Rémi Houlgatte[2,4,5], Michel Neunlist[1,2,3*]

[1]INSERM, U913, Nantes, F-44000 France;

[2]Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44000 France;

[3]CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, F-44000 France ;

[4]INSERM, U915, Institut du Thorax, Nantes, F-44000 France ;

[5]CHU Nantes, Institut du Thorax, Nantes, F-44000 France

BMC Genomics

BioMed Central

Research article

Open Access

Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: impact on intestinal epithelial barrier functions

Laurianne Van Landeghem[1,2,3], Maxime M Mahé[1,2,3], Raluca Teusan[2,4], Jean Léger[2,4], Isabelle Guisle[2,4], Rémi Houlgatte[2,4,5] and Michel Neunlist*[1,2,3]

Address: [1]INSERM, U913, Nantes, F-44000 France, [2]Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44000 France, [3]CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, F-44000 France, [4]INSERM, U915, Institut du Thorax, Nantes, F-44000 France and [5]CHU Nantes, Institut du Thorax, Nantes, F-44000 France

Email: Laurianne Van Landeghem - laurianne.van-landeghem@univ-nantes.fr; Maxime M Mahé - maxime.mahe@univ-nantes.fr; Raluca Teusan - raluca.teusan@nantes.inserm.fr; Jean Léger - jean.leger@nantes.inserm.fr; Isabelle Guisle - isabelle.guisle@nantes.inserm.fr; Rémi Houlgatte - remi.houlgatte@nantes.inserm.fr; Michel Neunlist* - michel.neunlist@univ-nantes.fr

* Corresponding author

Published: 2 November 2009

BMC Genomics 2009, **10**:507 doi:10.1186/1471-2164-10-507

Received: 26 February 2009
Accepted: 2 November 2009

This article is available from: http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/507

© 2009 Van Landeghem et al; licensee BioMed Central Ltd.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

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

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

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

Background

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

The enteric nervous system (ENS) is also a major constituent of the cellular microenvironment of the IEB. Indeed IEB and, in particular, the proliferative compartment of the crypts are densely innervated by nerve fibres originating mainly from the submucosal plexus. Recent data have shown that, besides controlling secretory processes, activation of enteric neurons can reduce IEC proliferation and barrier permeability, in particular *via* the release of vasoactive intestinal peptide (VIP) [6-8]. Enteric neurons innervating the IEB are also closely associated with enteric glial cells (EGC), the major constituent of the ENS.

For many years, EGC have been considered as mainly passive and structural cells supporting neurons and ganglions. However, this concept has lately been revisited mainly focused on the role played by astrocytes in the central nervous system (CNS) [9-11]. Besides controlling and regulating neuronal functions, increasing evidence suggests that EGC could be major regulators of IEB functions, similar to astrocytes controlling blood brain barrier functions [10]. Supporting this concept, recent data have demonstrated that EGC can profoundly inhibit IEC proliferation, in part *via* the liberation of TGF-β1 [12]. EGC also decrease IEB paracellular permeability *via* the release of S-nitrosoglutathione (GSNO) [13]. Furthermore, *in vivo* lesions of EGC network increase IEB paracellular permeability and IEC proliferation and, at term, lead to major lethal intestinal inflammation [13-15]. However, the role of EGC in the control of other major IEC functions such as cell differentiation, cell-to-cell or cell-to-matrix adhesion, and the associated regulatory pathways remains largely unknown.

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

Results and Discussion

Enteric glial cells modulate intestinal epithelial cells transcriptome

Microarray experiments

We performed microarray analysis of EGC influence on the transcriptome of Caco-2 cells using oligonucleotide chips (Cancerochips) developed at West Genopole transcriptome core facility of Nantes. These microarrays contain around 6,864 genes and are dedicated to gene expression studies in Caco-2 cell line as well as to gene expression signature studies of multiple tumors. Caco-2 cells were cultured onto Transwell filters in the absence or presence of EGC seeded at the bottom of the wells for 8 or 24 hours. The Transwell filters did not allowed any contact between IEC and EGC, thus implicating only paracrine communication between the two cell types.

Hierarchical clustering of the whole data showed the impact of the time of culture as well as the impact of the presence of EGC on the transcriptional profiling of IEC, i.e. Caco-2 cells (Figure 1). We observed changes in IEC transcriptome over the 24 hours of culture in control condition. At 8 hours, differences in transcriptome profiling already existed in control condition as compared to t = 0. In general, the observed changes in differentially expressed genes between t = 0 and t = 8 hours in control conditions were increased in the same way of regulation when reaching t = 24 hours (Figure 1). These changes might be due to the growth and differentiation of the proliferating IEC over the 24 hours of culture. We observed no major differences in gene expression profiling between IEC cultured alone and IEC cultured in presence of EGC at 8 hours of culture. In contrast, at 24 hours, EGC presence led to consistent and major changes in IEC gene expression profiling (Figure 1).

Gene expression modulated by EGC

Using Genespring software, we aimed to identify statistically significant differences in gene expression profiling between Caco-2 cells cultured alone or in presence of EGC. After 8 h of culture, no significant difference in gene expression profiling was found between IEC cultured alone (control condition) or in presence of EGC ("glia" condition). However, after 24 hours of culture, we identified 116 genes differentially expressed between control

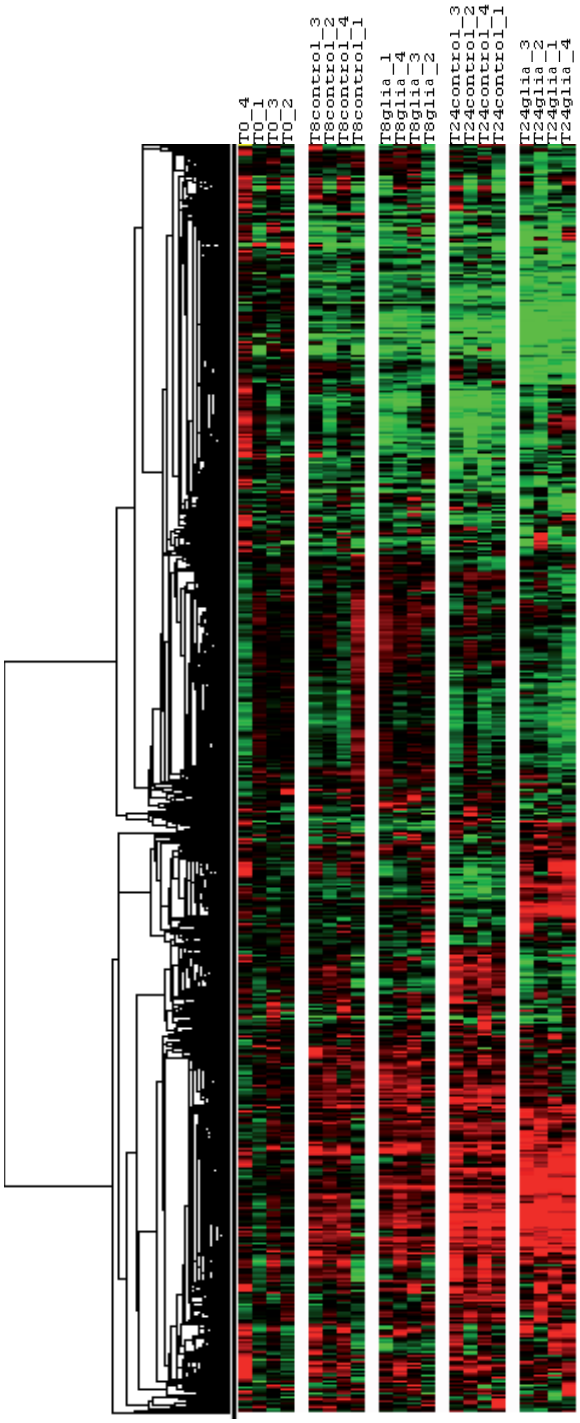


Figure 1

Hierarchical clustering of expression data. Four individual microarrays were used per condition. Hierarchical clustering was performed on genes using Gene Cluster. Each ratio was normalized to the median of the t = 0 hour-condition values of the corresponding gene. Each column represents an individual array (T0: t = 0 hour condition samples; T8control: t = 8 hours of culture without EGC; T8glia: t = 8 hours of culture in presence of EGC; T24control: t = 24 hours of culture without EGC; T24glia: t = 24 hours of culture in presence of EGC). Each line represents one individual gene. The clustering shows the impact of the time of culture on gene expression profiling in Caco-2 cells. The EGC-induced modulation of IEC transcriptome is highly visible at t = 24 hours.

and EGC conditions by using two different strategies. Benjamini and Hochberg False Discovery Rate method was used to determine 98 differentially expressed genes between control and glia conditions at t = 24 hours, and we also selected 27 genes with a two-fold change and Student's t-test p-value less than or equal to 0.05. Among the 116 differentially expressed genes, 46 genes were down-regulated and 70 were up-regulated in IEC cultured with EGC as compared to control (Table 1, 2). Quantitative PCR was also performed on various genes to validate the microarray results. In particular, results showed an EGC-induced increase of *CDH1*, *FN1*, *LAMA5*, *PPARG*, *PTK2* mRNA expression in IEC and a decrease of *E2F1*, *FGFR2*, *GPX2* and *SMAD3* mRNA expression in IEC, similar to the data obtained with microarrays (Figure 2A). We next sought to determine the specificity of EGC effects upon IEC transcriptome by characterizing the impact of fibroblasts on the expression of these genes in IEC. Under identical culture conditions, we showed that fibroblasts increased expression of *PTK2* but did not significantly modify gene expression of *CDH1*, *FN1*, *LAMA5*, *PPARG*, *E2F1*, *GPX2 and SMAD3* in IEC (Figure 2B).

Hierarchical clustering of differentially expressed genes

Hierarchical clustering was used to visualize the expression profile of the 116 genes induced or repressed by EGC after 24 hours of culture (Figure 3).

All these genes exhibit a differential expression between control and EGC conditions at t = 24 hours. Furthermore, some of them already exhibited a slight difference in expression profile between control and EGC conditions at 8 hours. These results indicate that EGC effects on genes identified as differentially expressed in IEC at 24 hours probably started as early as at 8 hours, even though the modifications were not statistically significant.

Two groups of samples exhibited a very different profile from other samples: EGC condition at t = 24 hours and controls at t = 24 hours (Figure 3). These observations confirm that 1) no major changes existed between control and EGC conditions at t = 8 hours and 2) that the 24 hour-time of culture impacted on gene expression profiling in IEC, likely reflecting differentiation of IEC over the time of culture.

EGC regulate IEC functions

Gene network interactions

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

Cell-to cell and cell-to-matrix interaction

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

First, EGC concomitantly increased the expression of *CDH-1*, which encodes E-cadherin, and decreased the expression of *CDK5R1*. E-Cadherin is the major component of the adherent junction complexes and the level of E-Cadherin in IEC is to be correlated to adhesion complexes formation between IEC [16,17]. Further evidences confirming a pro-adhesive influence of EGC on IEC is the EGC-induced down-regulation of *CDK5R1* expression. Indeed, *CDK5R1* encodes p35, a regulator of CDK-5 (cyclin-dependent kinase), which induces the degradation of E-Cadherin precursor [18]. In addition, EGC also up-regulated *IQGAP2* expression in IEC. This gene encodes for a protein member of IQGAP family that interacts with several molecules controlling cytoskeleton organization, cell adhesion and cell motility such as CDC42 and Rac [19]. Interestingly, IQGAP2 has been shown to mediate E-Cadherin-based cell-to-cell adhesion during development [20]. All these results suggest that EGC enhance cell-to-cell adhesion in IEC.

Our data also demonstrate that EGC modulate the expression of genes that are involved in cell-to-matrix interactions. First, EGC increased expression of several genes encoding proteins of the extracellular matrix such as *LAMA5*, *LAMC1* and *FN1*. *LAMA5* and *LAMC1* encode

Table 1: List of the genes up-regulated by enteric glial cells in intestinal epithelial cells.

Gene Symbol	Genbank	Description	% up-regulation (/control)	Fold difference
TXNIP	NM_006472	thioredoxin interacting protein	217,60	3,18
ANKRD1	NM_014391	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	169,22	2,69
FN1	U42593	fibronectin 1	152,16	2,52
TUBB3	NM_006086	tubulin, beta 3	149,94	2,50
MGLL	AJ270950	monoglyceride lipase	135,97	2,36
METTL7A	NM_014033	methyltransferase like 7A	132,96	2,33
PKN2	NM_006256	protein kinase N2	128,33	2,28
/	XM_166201	synonyms: KIAA0056, MGC104671; Homo sapiens KIAA0056 protein (hCAP-D3), mRNA.	115,09	2,15
EPB41L2	NM_001431	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	110,50	2,11
AASS	AJ007714	aminoadipate-semialdehyde synthase	110,15	2,10
ACTG2	NM_001615	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	102,56	2,03
B4GALT5	NM_004776	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5	102,38	2,02
SNX2	NM_003100	sorting nexin 2	102,38	2,02
VIP	NM_003381	vasoactive intestinal peptide	102,33	2,02
EIF4A2	NM_001967	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	102,14	2,02
/	NM_019027	RNA-binding protein	101,66	2,02
POLR3F	NM_006466	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide F, 39 kDa	94,46	1,94
PNRC1	NM_006813	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	93,24	1,93
NPPB	NM_002521	natriuretic peptide precursor B	83,97	1,84
/	BC017857	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4690793, with apparent retained intron.	82,20	1,82
KRT8	NM_002273	keratin 8	81,96	1,82
SAT1	NM_002970	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1	80,24	1,80
ASS1	NM_000050	argininosuccinate synthetase 1	76,73	1,77
S100A11P	NM_021039	/	75,22	1,75
SLC7A7	NM_003982	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 7	72,31	1,72
HAGH	NM_005326	hydroxyacylglutathione hydrolase	69,54	1,70
BNIP3L	AF536326	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3-like	69,19	1,69
/	AF195968	PRR5-ARHGAP8 fusion	68,01	1,68
BNIP3	NM_004052	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3	67,84	1,68
IL18	NM_001562	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	67,14	1,67
RDM1	BC038301	RAD52 motif 1	67,11	1,67
FAM107B	NM_031453	family with sequence similarity 107, member B	65,70	1,66
PLAC8	NM_016619	placenta-specific 8	63,77	1,64
SMARCA1	NM_139035	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	63,72	1,64
PLOD2	NM_000935	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	62,87	1,63
TMSB4Y	NM_004202	thymosin, beta 4, Y-linked	62,77	1,63
SCPEP1	NM_021626	serine carboxypeptidase 1	60,96	1,61
LAMA5	NM_005560	laminin, alpha 5	60,53	1,61
LAMC1	NM_002293	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	59,89	1,60
METAP1	BC030054	methionyl aminopeptidase 1	59,55	1,60
IQGAP2	NM_006633	IQ motif containing GTPase activating protein 2	58,98	1,59
C1orf43	NM_015449	chromosome 1 open reading frame 43	56,86	1,57
CASP4	NM_001225	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	55,71	1,56
BTG1	NM_001731	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	54,63	1,55
SLC2A1	K03195	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	54,34	1,54
DCTN2	NM_006400	dynactin 2 (p50)	52,68	1,53
TOP2A	NM_001067	topoisomerase (DNA) II alpha 170 kDa	52,42	1,52
KRT18	NM_000224	keratin 18	51,16	1,51
LAMC1	M55210	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	50,37	1,50

Table 1: List of the genes up-regulated by enteric glial cells in intestinal epithelial cells. *(Continued)*

PRC1	BC005140	protein regulator of cytokinesis 1	50,13	1,50
IMPDH2	NM_000884	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2	49,46	1,49
/	AF202922	LRP16 protein	48,20	1,48
PLD3	NM_012268	phospholipase D family, member 3	46,99	1,47
RNF4	NM_002938	ring finger protein 4	44,88	1,45
/	AC060225	Homo sapiens 3 BAC RP11-23J16 complete sequence.	42,10	1,42
SMARCA1	NM_003069	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	41,18	1,41
DYNLT3	NM_006520	dynein, light chain, Tctex-type 3	40,06	1,40
PPARG	NM_015869	peroxisome proliferative activated receptor, gamma	38,92	1,39
GLRX	AF069668	glutaredoxin (thioltransferase)	37,78	1,38
PTK2	NM_153831;NM_005607	PTK2 protein tyrosine kinase 2	37,72	1,38
CDH1	NM_004360	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	36,87	1,37
RNASE4	NM_002937	ribonuclease, RNase A family, 4	31,40	1,31
CTSH	NM_004390	cathepsin H	29,45	1,29
MKI67	NM_002417	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	29,28	1,29
EIF2A	NM_032025	eukaryotic translation initiation factor 2A, 65 kDa	26,54	1,27
TGFBI	BC000097	transforming growth factor, beta-induced, 68 kDa	25,95	1,26
MLLT3	NM_004529	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3	22,42	1,22
APOBEC3B	NM_004900	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	22,20	1,22
ADD3	NM_019903	adducin 3 (gamma)	20,82	1,21
FTH1	NM_002032	ferritin, heavy polypeptide 1	15,97	1,16

respectively for laminin α5 and γ1 chains which, together with laminin β1 chain, compose laminin-10 [21]. Laminin-10 has been shown to be the most adhesive substratum of laminin isoforms when studying abilities of laminin-2,-5 and -10 in modulating Caco-2 cell adhesion [22]. Furthermore, EGC up-regulated *FN1* expression, encoding the fibronectin protein. Interestingly, fibronectin has recently been shown to enhance Caco-2 cell attachment and wound healing [23]. EGC down-regulated *KLK14* expression, which encodes KLK (kallikrein) 14, an extracellular serine protease which has been shown to cleave and digest various extracellular matrix proteins such as collagen IV, laminin and fibronectin [24]. In addition, EGC up-regulated *PTK2* expression in IEC which may result in increased expression of FAK (Focal Adhesion Kinase) protein, a major regulator of focal adhesions turnover and maturation [25]. Finally, EGC induced an up-regulation of *KRT8* expression whose increased expression has recently been shown to cause enhanced adhesion of human breast tumor cells to their extracellular matrix [26].

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

Cell differentiation

EGC also regulated the expression of numerous genes involved in IEC differentiation. In particular, EGC up-regulated the expression of 6 genes enhancing differentiation and down-regulated 3 genes known to inhibit IEC differentiation (Table 7).

EGC induced an up-regulation of the expression of pro-differentiative genes or genes associated with enhanced differentiation of IEC such as *PPARG*, *LAMA5*, *PTK2*, *CDH-1*, *DCTN2* and *DYNLT3*. Indeed, PPARγ, encoding the well-described nuclear receptor superfamily member peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ) has been shown to regulate IEC differentiation and its expression has been positively correlated with level of differentiation of Caco-2 and HT29 cells [27,28]. Moreover, a diminution of laminin-a5 in a murine model resulted in a transformation from a small intestinal to a colonic mucosal architecture, suggesting that laminin-α5 has a crucial role in establishing and maintaining the architecture of the small intestine [29]. In addition, it has already been shown that the differentiation of Caco-2

Table 2: List of the genes down-regulated by enteric glial cells in intestinal epithelial cells.

Gene Symbol	Genbank	Description	% down-regulation (/control)	Fold difference
CARD12	AF376061	caspase recruitment domain family, member 12	83,43	6,04
KLK14	NM_022046	kallikrein 14	62,46	2,66
FGFR2	NM_022970	fibroblast growth factor receptor 2	57,12	2,33
BDP1	NM_018429	B double prime 1, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor IIIB	56,58	2,30
SFRP4	NM_003014	secreted frizzled-related protein 4	55,26	2,24
C6	NM_000065	complement component 6	54,78	2,21
PRKCD	NM_006254	protein kinase C, delta	54,67	2,21
/	XM_066534	Homo sapiens diacylglycerol kinase, kappa (DGKK), mRNA.	52,44	2,10
C20orf133	NM_001033086	chromosome 20 open reading frame 133	52,36	2,10
PRKCQ	NM_006257	protein kinase C, theta	50,50	2,02
CDK5R1	NM_003885	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	50,42	2,02
RPP40	NM_006638	ribonuclease P 40 kDa subunit	47,41	1,90
SLC30A1	AF323590	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	46,22	1,86
TIMM8A	NM_004085	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A (yeast)	41,07	1,70
EBNA1BP2	NM_006824	EBNA1 binding protein 2	36,39	1,57
ITGAE	NM_002208	integrin, alpha E (antigen CD103, human mucosal lymphocyte antigen 1; alpha polypeptide)	36,17	1,57
NOL1	NM_006170	nucleolar protein 1, 120 kDa	33,86	1,51
C6orf66	NM_014165	chromosome 6 open reading frame 66	33,81	1,51
NOL5A	NM_006392	nucleolar protein 5A (56 kDa with KKE/D repeat)	33,30	1,50
BAG1	U46917	BCL2-associated athanogene	32,19	1,47
/	AF123534	nucleolar protein NOP5/NOP58	32,14	1,47
ASAH1	AK025211	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1	29,98	1,43
TINAGL1	AF236150	tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	29,62	1,42
AADAC	NM_001086	arylacetamide deacetylase (esterase)	29,48	1,42
HSPA14	AF112210	heat shock 70 kDa protein 14	29,34	1,42
PSMC6	NM_002806	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6	29,31	1,41
HNRPDL	D89678	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	28,40	1,40
SAMHD1	NM_015474	SAM domain and HD domain 1	28,12	1,39
TP53RK	NM_033550	TP53 regulating kinase	26,99	1,37
MARK2	NM_004954	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2	26,41	1,36
CCR9	NM_031200	chemokine (C-C motif) receptor 9	24,74	1,33
RGL1	NM_015149	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	24,20	1,32
E2F1	NM_005225	E2F transcription factor 1	23,90	1,31
PSMC1	NM_002802	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 1	23,75	1,31
IMP3	NM_018285	IMP3, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast)	23,48	1,31
RNU3IP2	BC023662	RNA, U3 small nucleolar interacting protein 2	23,41	1,31
SMAD3	NM_005902	SMAD, mothers against DPP homolog 3 (Drosophila)	21,49	1,27
GPX2	NM_002083	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	21,27	1,27
LSP1	NM_002339	lymphocyte-specific protein 1	21,21	1,27
FGG	NM_021870	fibrinogen gamma chain	18,37	1,23
C20orf94	NM_001009608	chromosome 20 open reading frame 94	16,04	1,19
PPIL1	NM_016059	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 1	14,74	1,17
HOXB2	NM_002145	homeobox B2	13,91	1,16
APOH	NM_000042	apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)	13,17	1,15
PRSS23	NM_007173	protease, serine, 23	10,41	1,12
IARS2	NM_018060	isoleucine-tRNA synthetase 2, mitochondrial	10,02	1,11

cells was accompanied by an increase in FAK expression [30]. E-Cadherin, whose corresponding gene *CDH-1* is up-regulated by EGC, has been largely demonstrated to be involved in the establishment of a differentiated phenotype for IEC. Notably, E-Cadherin has been described to be less expressed at the bottom of the crypts where IEC are

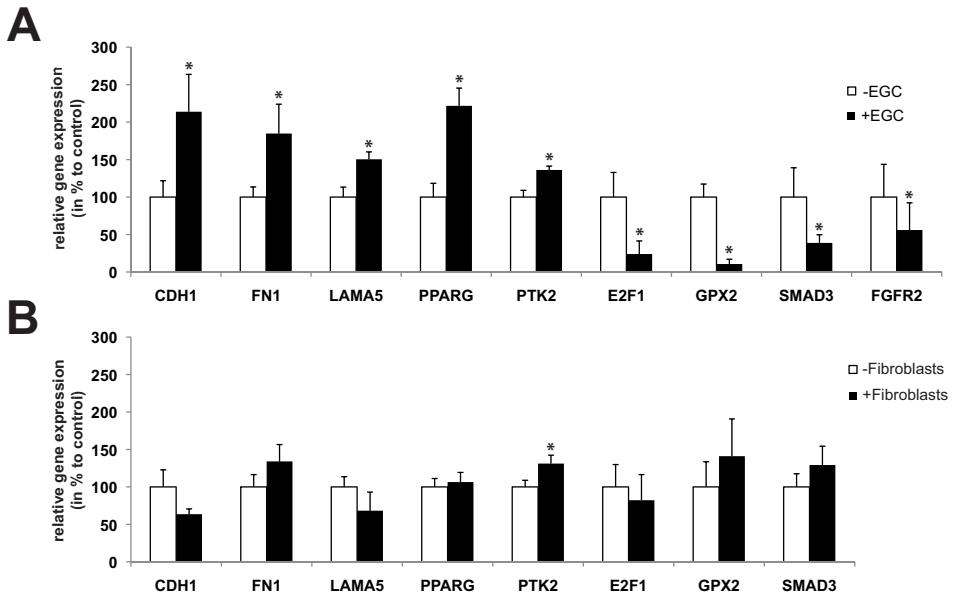


Figure 2

Enteric glial cells EGC) and fibroblasts differentially modulated intestinal epithelial cell (IEC) transcriptome. (A). Real-time quantitative PCR studies on *CDH1* (n = 5), *FN1* (n = 7), *LAMA5* (n = 6), *PPARG* (n = 5), *PTK2* (n = 5), *E2F1* (n = 7), *FGFR2* (n = 6), *GPX2* (n = 8), *SMAD3* (n = 7) gene expression in IEC cultured for 24 hours alone (- EGC) or in presence of EGC(+ EGC) confirmed that EGC significantly modulate the level of expression of genes identified by the microarrays data analysis as differentially expressed in IEC cultured in presence of EGC (*p < 0.05; Mann-Whitney test). (B). In contrast, real-time quantitative PCR studies on *CDH1* (n = 5), *FN1* (n = 5), *LAMA5* (n = 5), *PPARG* (n = 5), *PTK2* (n = 5), *E2F1* (n = 5), *GPX2* (n = 5), *SMAD3* (n = 5) gene expression in IEC cultured for 24 hours alone (- fibroblasts) or in presence of fibroblasts (+fibroblasts) showed a differential regulation of gene expression as compared to EGC effects (*p < 0.05; Mann-Whitney test).

undifferentiated [16,31,32]. The down-regulation by EGC of *CDK5R1* expression, leading to enhanced levels of E-Cadherin (see previous paragraph), might also further enhance EGC-induced cell differentiation. EGC also increased *DCTN2* and *DYNLT3* expression, two genes encoding a subunit of dynactin (p50 or dynamitin) and dynein light chain rp3, respectively. Both are involved in post-Golgi movement of vesicles towards apical surface of differentiated enterocytes [33-35], and could therefore reflect increased differentiation of IEC induced by EGC. Intriguingly, although differentiation of the Caco-2 cell line has been shown to be correlated with a down-regulation in fibronectin expression [36], EGC induced an up-regulation in *FN1* expression in IEC in our study.

EGC decreased the expression of genes that encode proteins implicated in anti-differentiative pathways such as *E2F1*, *BAG1* and *CDK5R1* (discussed above). *E2F1* is a gene encoding a protein member of the E2F family of transcription factors and has been shown to be down-regulated in confluent human IEC and differentiated enterocytes [37]. *BAG1*, encoding a Bcl-2 non-homologous associated molecule, has also been shown to present a decreasing gradient of expression from the base of the crypts to the apex of the villi, suggesting that the down-regulation of *BAG1* might reflect a differentiation state of IEC [38].

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

Cell motility

EGC regulated in IEC the expression of genes encoding proteins that are known to play a role in IEC motility (Table 8). In particular, EGC induced an increase in *FN1* expression in IEC. *FN1* has been demonstrated as a major factor in promoting cell migration of IEC and subepithelial fibroblasts, thus favoring epithelial wound healing [39,40]. Interestingly, EGC induced a down-regulation in *LSP1* expression in IEC. *LSP1* gene encodes for LSP1, a cytoplasmic actin-binding protein, whose overexpression in melanoma cells has been described to inhibit cell motility [41]. EGC-induced up-regulation of *PTK2* expression also supports a role of EGC in promoting IEC motility. Indeed, increased FAK protein level promoted epithelial restitution *via* an increased IEC migration [42,43]. Similarly, the increased PPARγ expression could

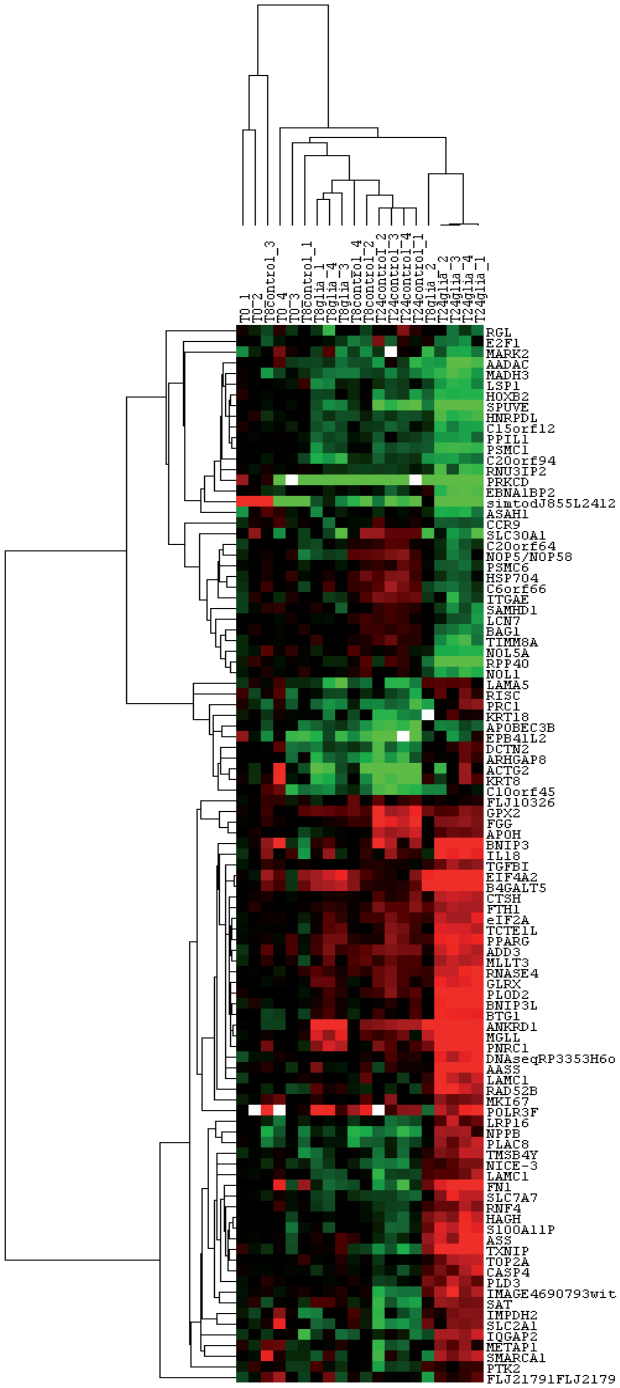


Figure 3

Hierarchical clustering of the 116 identified genes expression data. Four individual microarrays were used per condition. Hierarchical clustering was performed on conditions and on the 116 genes identified with Genespring. Each ratio was normalized to the median of the t = 0 hour-condition values of the corresponding gene. Each column represents an individual array (T0: t = 0 hour condition samples; T8control: t = 8 hours of culture without EGC; T8glia: t = 8 hours of culture in presence of EGC; T24control: t = 24 hours of culture without EGC; T24glia: t = 24 hours of culture in presence of EGC). Each line represents one individual gene. The clustering reveals clusters of genes with similar pattern of expression among the different conditions. The cluster also shows the distance between the five conditions demonstrating major changes induced by the culture with EGC at t = 24 hours.

Table 3: Lists of differentially expressed genes involved in functional networks regulated in intestinal epithelial cells by enteric glial cells.

Ingenuity© top functions	Genes list	Score
Cell-To-Cell Signaling and Interaction Cell Morphology Tissue Development	CDH1, FN1, ITGAE, KRT8, KRT18, MGLL, NPPB, PKN2, PPARG, PRKCD, PSMC1, PSMC6, PTK2, SAT, SMAD3, TGFBI, VIP	26
Cellular Growth and Proliferation Cancer Gene Expression	B4GALT5, BAG1, BNIP3 (includes EG:664), CCR9, DCTN2, EBNA1BP2, HCAP-D3, LSP1, MLLT3, PNRC1, PPIL1, PRC1, RNF4, SAT, SLC30A1, TP53RK	24
Cell Morphology Cellular Development Cardiovascular System Development and Function	AASS, ACTG2, BNIP3L, BTG1, CTSH, DYNLT3, EIF4A2, GLRX, MKI67, PLOD2, RNASE4, SLC2A1, SLC7A7, TXNIP	20
Cellular Movement Hematological System Development and Function Immune Response	APOBEC3B, ASAH1, C6, FTH1, IL18, IQGAP2, LAMA5, LAMC1, NOL5A, NOP5/NOP58, PLD3, PRKCQ, PRSS23, SCPEP1	20
Cell Death Cancer Gastrointestinal Disease	APOH, ASS, BDP1, BTG1, CARD12, CASP4, E2F1, FGFR2, FGG, NOL1, RGL1, SMARCA1, SNX2, TOP2A	20
Cell Cycle Gastrointestinal Disease Developmental Disorder	ADD3, ANKRD1, CDK5R1, EPB41L2, GPX2, HNRPDL, HOXB2, IMPDH2, MARK2, PKN2, PLAC8, POLR3F, SFRP4, TUBB3	20
RNA Post-Transcriptional Modification	IMP3	2
RNA Post-Transcriptional Modification	EIF2A	2
Protein Trafficking Cellular Compromise Auditory and Vestibular System Development and Function	TIMM8A	1
RNA Post-Transcriptional Modification RNA Damage and Repair	RPP40	1

enhance cell motility as inhibitors of PPARγ inhibit epithelial cell migration [44-46].

Cell proliferation

Expression of genes involved in cell proliferation was differentially regulated in IEC cultured in presence of EGC as compared to control (Table 9). In fact, EGC appeared to modulate the expression of anti-proliferative and pro-proliferative genes toward a dominant anti-proliferative effect (Table 9).

The expression of major anti-proliferative and pro-proliferative genes was found to be up-regulated and down-regulated, respectively, by EGC. In particular, *PPARG*, *TXNIP* and *BTG1* expressions in IEC were up-regulated by EGC. PPARγ activation has been described both *in vivo* and *in vitro* to inhibit intestinal epithelial cell proliferation [47,48] and to induce a G1 phase cell cycle arrest [27]. Furthermore, *TXNIP* encodes the thioredoxin-interacting protein, a negative regulator of thioredoxin. Thioredoxin is an important growth-promoting factor of IEC [49]. Moreover, *TXNIP* has also recently been suggested to be a tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma [50] and interestingly, *TXNIP* expression is decreased in colorectal cancer and ulcerative colitis [51]. Similarly, *BTG1* has been shown to negatively regulate cell proliferation and to present a maximal expression during G0/G1 phases of the cell cycle in fibroblasts [52]. Further reinforcing the anti-proliferative effects of EGC on IEC is the EGC-induced down-regulation of the expression of pro-proliferative genes such as *E2F1*, *FGFR2* and *PPIL1*. *E2F1* is a gene encoding a protein member of the E2F family of transcription factors that regulate cell cycle progression by modulating expression of proteins required for the G1/S transition. It has been well described that growth stimulatory signals lead to active E2F1 accumulation and S-phase

Table 4: Lists of differentially expressed genes involved in cellular and molecular functions regulated in intestinal epithelial cells by enteric glial cells.

Ingenuity© cellular and molecular functions	Genes list	Score
RNA Post-Transcriptional Modification	NOP5/NOP58, NOL5A, EBNA1BP2, RNU3IP2, IMP3	5.17
Cell Death	GPX2, SAT, PRKCD, B4GALT5, TXNIP, TOP2A, CDH1, PKN2, ASAH1, LSP1, BNIP3L, NPPB, CDK5R1, ANKRD1, VIP, CASP4, GLRX, FGFR2, KRT18, BAG1, PRKCQ, BTG1, PPARG, C6ORF66, SLC2A1, CARD12, SMAD3, FTH1, LAMA5, PTK2, IL18, MLLT3, FN1, PLAC8, KRT8, TGFBI, BNIP3, E2F1, SFRP4	4.85
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	APOH, PRKCD, SMAD3, CDH1, PKN2, LAMA5, PTK2, VIP, IL18, FN1, FGG, KRT8, KRT18, BAG1, ITGAE, LAMC1, PPARG, TGFBI, E2F1	3.92
Cellular Development	SMAD3, PRKCD, CDH1, LAMA5, VIP, PTK2, IL18, CDK5R1, FGFR2, FN1, PLAC8, PRKCQ, LAMC1, PPARG, E2F1	3.92
Cell Morphology	SMAD3, PRKCD, CDH1, LAMA5, LSP1, DCTN2, VIP, IL18, PTK2, CDK5R1, FN1, KRT8, KRT18, PPARG, TGFBI, E2F1	3.88
Cellular Assembly and Organization	APOH, PRKCD, SMAD3, TOP2A, CDH1, DCTN2, EBNA1BP2, NPPB, PTK2, CDK5R1, HCAP-D3, FN1, FGG, KRT8, KRT18, MARK2, LAMC1, PPARG, BNIP3, E2F1	3.88
Carbohydrate Metabolism	FN1, B4GALT5, NPPB, PTK2, IL18	3.11
Cellular Movement	HOXB2, CCR9, C6, B4GALT5, SMAD3, PRKCD, MGLL, CDH1, LSP1, LAMA5, DCTN2, NPPB, CDK5R1, VIP, PTK2, IL18, FN1, BAG1, ITGAE, PPARG, TGFBI	3.08
Cellular Growth and Proliferation	SAT, PRKCD, TXNIP, SMAD3, CDH1, FTH1, LAMA5, SLC30A1, EBNA1BP2, VIP, IL18, PTK2, MLLT3, FGFR2, FN1, PLAC8, BAG1, PRKCQ, BTG1, LAMC1, PPARG, BNIP3, E2F1, SFRP4	3.05
Cell Cycle	HCAP-D3, FN1, TXNIP, PRKCD, TOP2A, DCTN2, PPARG, EBNA1BP2, E2F1, VIP	2.57
Molecular Transport	FGFR2, SAT, FN1, PRKCD, MGLL, BAG1, FTH1, PPARG, NPPB, PTK2, VIP, IL18	2.45
Nucleic Acid Metabolism	SAT, BAG1, NPPB, VIP	2.45
Small Molecule Biochemistry	APOH, SAT, PRKCD, B4GALT5, MGLL, FTH1, ASAH1, NPPB, PTK2, IL18, VIP, ASS, GLRX, FGFR2, FN1, BAG1, PPARG	2.45
Cellular Function and Maintenance	CCR9, SMAD3, CDH1, SLC30A1, PTK2, IL18, CDK5R1, FN1, FGG, KRT18, ITGAE, PPARG, BNIP3	2.25
DNA Replication, Recombination, and Repair	HCAP-D3, FN1, SMAD3, PRKCD, TOP2A, FTH1, DCTN2, EBNA1BP2	2.17
Gene Expression	APOH, SMAD3, PRKCD, CDH1, PKN2, VIP, IL18, FN1, BAG1, PRKCQ, RNF4, PPARG, E2F1	2.13
Cell Signaling	ASS, FN1, PRKCD, PPARG	2.02
Amino Acid Metabolism	ASS, FTH1	1.94
Cellular Compromise	PRKCD, KRT18, TIMM8A, PPARG, E2F1	1.94
Drug Metabolism	GLRX, FTH1, NPPB, IL18, VIP	1.94
Lipid Metabolism	FGFR2, APOH, SAT, FN1, MGLL, ASAH1, PPARG, NPPB, VIP	1.94
Post-Translational Modification	PRKCD, BAG1, PRKCQ	1.94
Protein Folding	BAG1	1.94
Protein Synthesis	BAG1, IL18	1.94
Vitamin and Mineral Metabolism	FGFR2, FTH1, PPARG	1.94

entry [53,54]. *FGFR2* encodes a member of the FGF (Fibroblast Growth Factor) receptor family with high affinity for KGF (Keratinocyte Growth Factor) which is a major actor in the mesenchymal stimulation of epithelial cell proliferation [55,56]. Finally, *PPIL1*, which encodes a cyclophilin-related protein, PPIL1 (peptidyl prolyl isomerase-like protein), implicated in spliceosome activation, has recently been described to be overexpressed in colon tumors and *PPIL1* silencing led to an inhibition of colon cancer cell growth [57,58].

These global anti-proliferative effects of EGC upon IEC have to be associated with the EGC-induced modulation of genes that would tend to be pro-proliferative, although these are clearly in reduced numbers. For instance, EGC increase *MKI67* expression, which encodes the proliferation marker Ki-67. Indeed, Ki-67 is increasingly expressed during the cell cycle phases [59], excepted in G0 or in cells just escaping from G0 [60]. Its function is still unclear but knock-down for Ki-67 in cancerous cells leads to an inhibition of proliferation mainly *via* an induction of apoptosis [61,62]. Interestingly, EGC reduced the expression of *TP53RK* and *SFRP4* in IEC that encode proteins involved in anti-proliferative pathways. *TP53RK* encodes PRPK which is a short kinase that phosphorylates p53, enhancing its transcriptional activity [63] and suppressing cell cycle transition G1/S [64]. *SFRP4* encodes the protein sFRP4 (secreted frizzled-related protein), which is an inhibitor of the Wnt-signaling cascade through binding and sequestering Wnt ligand and, thus, has been shown to decrease cell proliferation in many cell lines [65-67].

Table 5: Lists of differentially expressed genes involved in signalling pathways regulated in intestinal epithelial cells by enteric glial cells.

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

Taken together, these data suggest that EGC tend to shift IEC transcriptome toward an anti-proliferative phenotype. These results could lead to the identification of specific targets responsible for the anti proliferative effects of EGC previously reported [12]. In addition, this global effect is supported further by the observation that EGC inhibit cell proliferation in part by inducing a cell cycle arrest in G0/G1 phase [11].

Cell survival

EGC differentially regulated in IEC the expression of genes involved in cell death. EGC appeared to modulate the expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic genes toward a dominant pro-apoptotic effect (Table 10).

Indeed, expressions of pro-apoptotic and anti-apoptotic genes were found to be up-regulated and down-regulated, respectively, by EGC. In particular, *BNIP3* and *CASP4* expression in IEC were up-regulated by EGC. *CASP4*, coding for the caspase-4 pro-apoptotic protein has been

Table 6: Genes controlling intestinal epithelial cells adhesion and modulated by enteric glial cells.

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

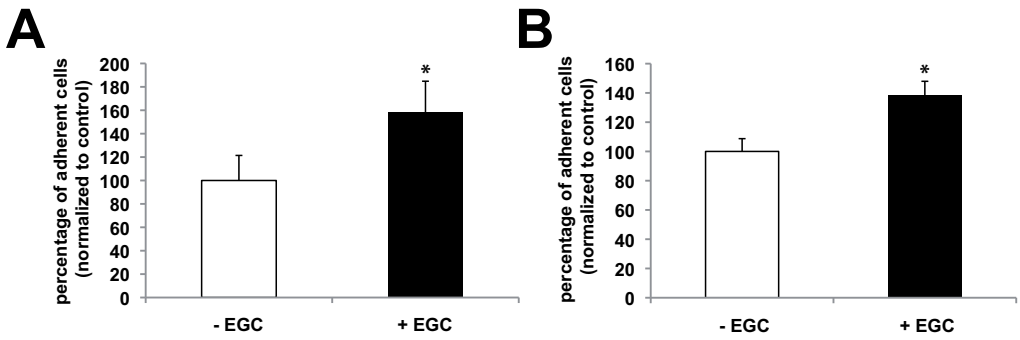


Figure 4

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

shown to induce cell death [68,69], like *BNIP3* which encodes a pro-apoptotic protein member of Bcl-2 family [70,71]. Conversely, *ASAH-1*, *GPX2* and *BAG-1* were down-regulated by EGC. *BAG-1* encodes a known anti-apoptotic protein implicated in Bcl-2 signalling pathway [72,73]. *ASAH-1* encodes acid ceramidase, an enzyme that catabolizes ceramide into sphingosine by deacylation. Overexpression of acid ceramidase in cells confers on them an increased resistance to cell death induced by various factors such as TNF (tumor necrosis factor) or anti-cancerous drugs [74,75]. Finally, *GPX2* encodes a member of the glutathione peroxidase (GPX) family and is a selenoprotein and a glutathione peroxidase. GPX2 is expressed in IEC [76] and inhibits oxidative stress-induced apoptosis in the human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 [77].

These global pro-apoptotic effects of EGC upon IEC have to be considered also in view of the EGC-mediated regulation of genes which would tend to be anti-apoptotic, although these are in reduced number. In particular, EGC up-regulated the expression of *TUBB3*, a gene encoding the class III isotype of β-tubulin. Silencing of class III β-tubulin by siRNA reverted anti-cancer agent-resistant cells to a sensitive phenotype and promoted apoptosis [78,79]. Conversely, EGC inhibited the expression of *CARD12* which encodes the CARD12 protein, a member of the CED4/Apaf-1 family and known to induce apoptosis when expressed in cells [80,81].

EGC-induced regulation of genes involved in cell death has probably no clear consequences on IEC survival. This is consistent with a previous study showing that EGC did not modify IEC survival [12].

Conclusion

The present study described the impact of EGC upon the transcriptome of proliferating Caco-2 cells in a validated non-contact co-culture model of EGC and IEC [12,13]. The results obtained confirmed the known role of EGC in the control of some IEB functions and, more interestingly, extended their role in the control of novel major IEB and IEC functions. This study further reinforced the emerging concept that EGC are an important component of the IEB environment with major protective effects. Indeed, the major pathways regulated by EGC in IEC identified with microarrays lead to enhanced cell adhesion, differentia-

Table 7: Genes controlling intestinal epithelial cells differentiation and modulated by enteric glial cells.

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

Table 8: Genes controlling intestinal epithelial cells motility and modulated by enteric glial cells.

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

tion, and motility, which could favor repair, and reduced cell proliferation.

An important result of this study is the putative identification of genes involved in the anti-proliferative effects of EGC. Indeed, EGC have been shown to have potent anti-proliferative effects upon IEC [11,12]. Interestingly, these effects were associated with an induction of a cell cycle blockade in the G0/G1 phase [11] but were not associated with significant cell death [12]. These results are globally confirmed, as there was no clear trend in the EGC-induced modulation of genes controlling cell survival in IEC but a trend toward an up-regulation of the expression of genes involved in anti-proliferative pathways.

A major finding of our study is that EGC regulated the expression of genes involved in cell adhesion and differentiation toward a global increase of IEC adhesive properties. These results can be analyzed in view of the known effects of EGC upon IEB. Indeed, *in vitro* studies have shown that EGC increase IEB resistance and decrease IEB paracellular permeability [13]. In the present study, we also demonstrated that EGC could increase global IEB adhesion, in part by increasing cell-to-matrix adhesion. These results are in agreement with *in vivo* data showing that selective lesions of EGC lead to increased paracellular permeability and major IEB breakdown associated with the development of intestinal inflammation. However, the role of the molecular actors involved in these processes such as fibronectin, laminin or cytokeratin remains to be investigated. EGC might also favor barrier integrity by increasing its resistance to inflammatory stress either by its ability to down-regulate inflammatory genes such as *CARD12* or by increasing IEC production of anti-inflammatory mediators such as VIP [82,83].

Another important finding of this study is the observation that EGC might regulate IEC metabolism. In particular, EGC up-regulated genes involved in lipid metabolism such as *AADAC*, *MGLL* or *APOH*, encoding respectively the arylacetamide deacetylase, monoglyceride lipase (MGL) and Apolipoprotein H [84-86]. Interestingly, inhibitors of MGL which is a serine hydrolase that converts 2-arachidonoylglycerol, a ligand of canabinoid receptors, to fatty acids and glycerol, increased gut transit time [87] but its impact on IEB functions remain unknown. EGC also modulated the expression of genes involved in protein metabolism such as *CTSH* that encodes cathepsin H, a lysosomal cysteine proteinase [88]. In addition, EGC increased the expression of genes involved in arginine metabolic pathway that are *SLC7A7* and *ASS*, which encode respectively for the cationic amino acid transporter y(+)LAT1 and the argininosuccinate synthetase, enzyme catalyzing the penultimate step of the arginine biosynthetic pathways. The functional impact of EGC upon IEC metabolism needs to be investigated in future studies.

Regulation of IEB functions by EGC occurs mainly *via* paracrine pathways. The majority of EGC effects upon IEB functions are reproduced by glial-derived conditioned medium. In addition, various mediators have been identified as being involved in the control of cell proliferation or paracellular permeability. Our study supports the role of mediators such as TGF-β1 as a regulator of gene pathways modulated by EGC in IEC. In fact, TGF-β1 has been shown to increase the expression of FAK [43], TGFBI [89] or VIP [90]. EGC have also been shown to produce IL-6 [91]. IL-6 has recently been identified as a key molecule involved in IEB barrier protection *via* increasing both cytokeratin 8 and cytokeratin 18 proteins expression [92], whose mRNA expression were induced by EGC in IEC in

Table 9: Genes controlling intestinal epithelial cells proliferation and modulated by enteric glial cells.

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

Table 10: Genes controlling intestinal epithelial cells survival and modulated by enteric glial cells.

Pro-apoptotic		Anti-apoptotic	
Gene Symbol	**Regulation of gene expression by EGC**	**Gene Symbol**	**Regulation of gene expression by EGC**
BNIP3	up-regulated	BAG1	down-regulated
CASP4	up-regulated	ASAH1	down-regulated
CARD12	down-regulated	GPX2	down-regulated
		TUBB3	up-regulated

our study. In this context, knowledge of genes modulated by EGC could direct future efforts aimed at identifying novel glial mediators involved in EGC control of IEB functions. Our data also further suggest that EGC differentially regulate some IEB functions as compared to fibroblasts, although comparison has only been performed on a limited set of genes and one cannot fully rule out that species differences could also be involved (fibroblasts of human origin *vs.* enteric glia of rat origin). However, these differences are consistent with the observation that while EGC have anti-proliferative effects on both human and rat IEC [12], fibroblasts increase IEC proliferation [93].

Collectively, our data support the concept that EGC play a key protective role upon IEB homeostasis by reinforcing global barrier functions. Additionally, our study reinforces data suggesting that enteric glia lesions and/or functional defects could be involved in the development of pathologies with altered barrier (such as inflammatory bowel diseases or colorectal cancer) and also be associated with increased barrier susceptibility to pathogen aggression.

Methods

Cell culture

CRL2690 (ATCC), a transformed EGC line isolated from adult rat myenteric plexus, was cultured in DMEM (4.5 g/L glucose; Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM glutamine (Gibco), 50 IU/mL penicillin and 50 μg/mL streptomycin. EGC were seeded at a concentration of 30,000 cells/mL in 6- and 12-well plates (Corning, Avon, France). EGC were cultured for an additional 24 hours after having reached confluence prior co-culture with IEC. CCD-18Co, a human colonic fibroblast cell line, was cultured in MEM Alpha Medium (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM glutamine (Gibco), 0.1 mM MEM NEAA (Gibco), 50 IU/mL penicillin and 50 μg/mL streptomycin. Fibroblasts were seeded at a concentration of 130,000 cells/mL in 12-well plates (Corning). Fibroblats were cultured in EGC medium, as described above, for an additional 24 hours after having reached confluence prior co-culture with IEC. Caco-2 cells (ATCC), isolated from a human colonic adenocarcinoma, were cultured in DMEM (4.5 g/L glucose; Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM glutamine (Gibco), 50 IU/mL penicillin and 50 μg/mL streptomycin and were seeded at a concentration of 140,000 cells/mL onto porous Transwell filters (6-well and 12-well Transwell clear, 0.40 μm porosity, Corning). Caco-2 cells were processed for experiment 1 day after their seeding. To characterize EGC impact onto IEC transcriptome and functions, IEC seeded onto filters were cultured in presence of EGC seeded at the bottom of the 6-well or 12-well plates.

Microarray experiments

Transcriptomic analysis was performed with a microarray of 6,864 genes called "Cancerochip" and available from the West Genopole transcriptome core facility of Nantes. These Cancerochips contained 6,864 probes (50-mers oligonucleotides), each specific of a single gene. These genes were selected to be preferentially and/or differentially expressed in Caco-2 cells and in various tumours. Three replicates of each probe were spotted onto Cancerochips. This allowed the measurement of the probes reproducibility within the array.

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

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

performed following the protocol of the West Genopole transcriptome core facility of Nantes. After washing, the chips were scanned (Scanexpress- Perkin Elmer).

Data analysis

After acquisition, the scanned images were analyzed using GenePix Pro v5.1 software (Axon). Raw signals were processed using the MADSCAN package http://cardioserve.nantes.inserm.fr/mad/madscan/. Spots with weak, saturated signal or badly shaped were considered as missing values. Print-tip lowess was applied to raw signals to normalize both channels (Cy3 and Cy5) of a same array. Fitting coefficients were calculated on rank invariant spots, assuming that they correspond to ubiquitous genes (genes that did not vary between samples). Sample to reference ratios (Cy3/Cy5) were further calculated, and Log transformed (Expression Logratios). Probes with more than 25% of missing values were rejected.

In order to identify differentially expressed genes, Expression Logratios were analyzed using Genespring v7.0 software (Agilent Technologies). Genes differentially expressed between Caco-2 cells cultured alone or in presence of EGC were searched with Benjamini and Hochberg False Discovery Rate method with a significance threshold of 0.05. This method includes a correction for multi-testing and has been widely used for microarray data [94]. This analysis led to the identification of 98 genes differentially expressed in IEC cultured in presence of EGC as compared to control, i.e. IEC cultured alone at t = 24 hours and none at t = 8 hours. Analysis of variance (ANOVA) using time of culture and presence/absence of ECG as parameters gave very similar results. Data visualization using hierarchical clustering and Volcano-Plot suggested that this strategy might have missed some differentially expressed genes at t = 24 hours; we thus selected an additional set of genes based on expression fold-changes. Twenty seven genes with a fold-change threshold of 2 and a t-test p-value < 0.05 without multitesting correction were found. Altogether 116 unique genes were found differentially expressed in IEC at t = 24 hours of culture in presence of EGC as compared to control.

Hierarchical clustering was performed after normalization on medians of the ratio values of the t = 0 hour-condition samples. Hierarchical clustering was performed using the Cluster software. It was applied to order either genes and samples or genes only. It creates a visualization of the grouping of genes and samples based on profile similarity, even if it does not provide robustness assessment of the classification.

Among the 116 genes identified with Genespring analysis, 17 of them did not present reliable values at t = 0 hour. Thus, these 17 genes were excluded from hierarchical clustering analyses. As a consequence, clustering analyses only involved 99 genes.

Microarray data were uploaded to GEO database http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ and are available under the access number GSE17027.

RT-quantitative PCR

Extraction of total RNA from Caco-2 cells cultured alone, in presence of EGC or fibroblasts for 24 hours was performed with RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. For reverse transcription, 1 μg of purified total RNA was denatured and subsequently processed for reverse transcription using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. PCR amplifications were performed using the Absolute Blue SYBR green fluorescein kit (ABgene) according to the manufacturer's protocol and run on MyiQ thermocycler (Biorad). The expression of the gene *S6* was analyzed in parallel as an internal control.

CDH1 [GenBank: NM_004360]

Forward primer:

5'-GACCAGGACTATGACTACTTGAACG-3'

Reverse primer:

5'-ATCTGCAAGGTGCTGGGTGAACCTT-3'

E2F1 [GenBank: NM 005225]

Forward primer:

5'-CCGCTCGAGGAGAAGTCACGCTATGA-3'

Reverse primer:

5'-CCCAAGCTTTTGGTGATGTCATAGATGC-3'

FN1 [GenBank: NM_054034]

Forward primer:

5'-GCAGGCTCAGCAAATGGTTCAG-3'

Reverse primer:

5'-AGGTAGGTCCGCTCCCACTG-3'

FGFR2 [GenBank: NM_022970]

Forward primer:

5'-GTCCTGCCAAAACAGCAAG-3'

Reverse primer:

5'-CCCCTATGCAGTAAATGGCTA-3'

GPX2 [GenBank: NM_002083]

Forward primer:

5'-gtccttggcttcccttgc-3'

Reverse primer:

5'-tgttcaggatctcctcattctg-3'

LAMA5 [GenBank: NM_005560]

Forward primer:

5'-CCCACCGAGGACCTTTACTGC-3'

Reverse primer:

5'-GGTGTGCCTTGTTGCTGTTGG-3'

PPARG [GenBank: NM_138712/NM_005037/NM_138711/NM_015869]

Forward primer:

5'-ttgctgtcattattctcagtgga-3'

Reverse primer:

5'-gaggactcagggtggttcag-3'

PTK2 [GenBank: NM_153831/NM_005607]

Forward primer:

5'- GAGATCCTGTCTCCAGTCTAC-3'

Reverse primer:

5'- TGCACCTGCTATTTTTAGTTG-3'

SMAD3 [GenBank: NM 005902]

Forward primer:

5'-CCAAGCTTAGAACGGGCAGGAGGAG-3'

Reverse primer:

5'-CACTCGAGTGGTGGCTGTGCAGGTC-3'

S6 [GenBank: NM_001010]

Forward primer:

5'-TGGCAAGATGATCCCAATGA-3'

Reverse primer:

5'-AGCTTCTTTGGGACACCTGCT-3'

Adhesion experiments

Global adhesion assay

IEC adhesion was estimated by performing a "global adhesion assay" that evaluated total IEC adhesion to their environment, i.e. adhesion to neighboring IEC and adhesion to matrix. IEC were cultivated on filters (12-well Transwell clear, 0.40 μm porosity, Corning) alone or in the presence of EGC for 24 hours. IEC were then trypsinized with 0.01% trypsin-EDTA free (Sigma) allowing gentle trypsinization for 30 minutes at 37°C. Non-adherent IEC were harvested and counted in a blind fashion using Malassez slides (VWR international). IEC remaining adhered on filters were trypsinized with 2.5% trypsin with EDTA (Gibco), harvested and counted. Results are expressed in percentage of remaining adherent IEC normalized to the total number of counted IEC (i.e., adherent IEC and non-adherent IEC). Only those series in which the percentage of IEC total adhesion in control condition was comprised between 20 and 70% were analyzed.

Cell-to-matrix adhesion assay

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

List of abbreviations

CNS: Central nervous system; **EGC**: Enteric glial cells; **ENS**: Enteric nervous system; **FAK**: Focal adhesion kinase;

IEB: Intestinal epithelial barrier; **IEC**: Intestinal epithelial cells; **PPARγ**: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; **TGF-β1**: Transforming growth factor beta-1; **VIP**: Vasoactive intestinal peptide.

Authors' contributions

LVL designed microarrays studies and functional experiments and carried out microarrays studies. She analyzed the microarrays data and wrote the manuscript. MMM designed and carried out functional experiments and performed RT-qPCR studies. JL supervised microarray studies. IG participated in microarrays hybridization. RT assisted with the bioinformatics analysis. RH contributed to the bioinformatics analysis and wrote the manuscript. MN supervised the project and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Damien MASSON for kindly giving PPARγ primers. They also thank the West Genopole transcriptome core facility for providing expertise and technical help. They thank Philippe Aubert for his technical assistance. The authors are thankful to Anne Tomasevich for her help in editing the paper. LVL was supported by a PhD grant of the MNRT and MMM by a PhD grant from Nantes Métropole. This work was supported by a grant from INCa Appel d'Offre Libre 2007 (MOPRESTAGLIA).

References

1. Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC: **Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005, **289(1):**G2-7.
2. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB: **Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts.** *Am J Physiol* 1999, **277(2 Pt 1):**C183-201.
3. Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J: **Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa.** *Physiol Rev* 2007, **87(2):**545-564.
4. Shao J, Sheng GG, Mifflin RC, Powell DW, Sheng H: **Roles of myofibroblasts in prostaglandin E2-stimulated intestinal epithelial proliferation and angiogenesis.** *Cancer Res* 2006, **66(2):**846-855.
5. Penna FJ, Peret LA, Vieira LQ, Nicoli JR: **Probiotics and mucosal barrier in children.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008, **11(5):**640-644.
6. Toumi F, Neunlist M, Cassagnau E, Parois S, Laboisse CL, Galmiche JP, Jarry A: **Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model.** *Neurogastroenterol Motil* 2003, **15(3):**239-242.
7. Xue J, Askwith C, Javed NH, Cooke HJ: **Autonomic nervous system and secretion across the intestinal mucosal surface.** *Auton Neurosci* 2007, **133(1):**55-63.
8. Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisse CL, Galmiche JP, Jarry A: **Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003, **285(5):**G1028-1036.
9. Ruhl A: **Glial cells in the gut.** *Neurogastroenterol Motil* 2005, **17(6):**777-790.
10. Savidge TC, Sofroniew MV, Neunlist M: **Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain.** *Lab Invest* 2007, **87(8):**731-736.
11. Neunlist M, Van Landeghem L, Bourreille A, Savidge T: **Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease.** *J Intern Med* 2008, **263(6):**577-583.
12. Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Ruhl A, Lardeux B, Savidge T, *et al.*: **Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, **292(1):**G231-241.
13. Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, Hurst R, Sofroniew MV: **Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione.** *Gastroenterology* 2007, **132(4):**1344-1358.
14. Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV: **Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice.** *Cell* 1998, **93(2):**189-201.
15. Aube AC, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F, Liblau R, Galmiche JP, Neunlist M: **Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption.** *Gut* 2006, **55(5):**630-637.
16. Escaffit F, Perreault N, Jean D, Francoeur C, Herring E, Rancourt C, Rivard N, Vachon PH, Pare F, Boucher MP, *et al.*: **Repressed E-cadherin expression in the lower crypt of human small intestine: a cell marker of functional relevance.** *Exp Cell Res* 2005, **302(2):**206-220.
17. Pecina-Slaus N: **Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells.** *Cancer Cell Int* 2003, **3(1):**17.
18. Lin S, Wang J, Ye Z, Ip NY, Lin SC: **CDK5 activator p35 downregulates E-cadherin precursor independently of CDK5.** *FEBS Lett* 2008, **582(8):**1197-1202.
19. Briggs MW, Sacks DB: **IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation.** *EMBO Rep* 2003, **4(6):**571-574.
20. Natale DR, Watson AJ: **Rac-1 and IQGAP are potential regulators of E-cadherin-catenin interactions during murine preimplantation development.** *Gene Expr Patterns* 2002, **2(1-2):**17-22.
21. Tzu J, Marinkovich MP: **Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins.** *Int J Biochem Cell Biol* 2008, **40(2):**199-214.
22. Turck N, Gross I, Gendry P, Stutzmann J, Freund JN, Kedinger M, Simon-Assmann P, Launay JF: **Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells.** *Exp Cell Res* 2005, **303(2):**494-503.
23. Kolachala VL, Bajaj R, Wang L, Yan Y, Ritzenthaler JD, Gewirtz AT, Roman J, Merlin D, Sitaraman SV: **Epithelial-derived fibronectin expression, signaling, and function in intestinal inflammation.** *J Biol Chem* 2007, **282(45):**32965-32973.
24. Borgono CA, Michael IP, Shaw JL, Luo LY, Ghosh MC, Soosaipillai A, Grass L, Katsaros D, Diamandis EP: **Expression and functional characterization of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14.** *J Biol Chem* 2007, **282(4):**2405-2422.
25. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD: **Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6(1):**56-68.
26. Liu F, Chen Z, Wang J, Shao X, Cui Z, Yang C, Zhu Z, Xiong D: **Overexpression of cell surface cytokeratin 8 in multidrug-resistant MCF-7/MX cells enhances cell adhesion to the extracellular matrix.** *Neoplasia* 2008, **10(11):**1275-1284.
27. Chen L, Bush CR, Necela BM, Su W, Yanagisawa M, Anastasiadis PZ, Fields AP, Thompson EA: **RS5444, a novel PPARgamma agonist, regulates aspects of the differentiated phenotype in nontransformed intestinal epithelial cells.** *Mol Cell Endocrinol* 2006, **251(1-2):**17-32.
28. Lefebvre M, Paulweber B, Fajas L, Woods J, McCrary C, Colombel JF, Najib J, Fruchart JC, Datz C, Vidal H, *et al.*: **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells.** *J Endocrinol* 1999, **162(3):**331-340.
29. Mahoney ZX, Stappenbeck TS, Miner JH: **Laminin alpha 5 influences the architecture of the mouse small intestine mucosa.** *J Cell Sci* 2008, **121(Pt 15):**2493-2502.
30. Levy P, Robin H, Kornprobst M, Capeau J, Cherqui G: **Enterocytic differentiation of the human Caco-2 cell line correlates with alterations in integrin signaling.** *J Cell Physiol* 1998, **177(4):**618-627.
31. Takeichi M: **Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator.** *Science* 1991, **251(5000):**1451-1455.
32. Laprise P, Chailler P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ, Rivard N: **Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation.** *J Biol Chem* 2002, **277(10):**8226-8234.

33. Ku NO, Zhou X, Toivola DM, Omary MB: **The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease.** *Am J Physiol* 1999, **277(6 Pt 1):**G1108-1137.
34. Fath KR, Trimbur GM, Burgess DR: **Molecular motors are differentially distributed on Golgi membranes from polarized epithelial cells.** *J Cell Biol* 1994, **126(3):**661-675.
35. Tai AW, Chuang JZ, Sung CH: **Cytoplasmic dynein regulation by subunit heterogeneity and its role in apical transport.** *J Cell Biol* 2001, **153(7):**1499-1509.
36. Vachon PH, Simoneau A, Herring-Gillam FE, Beaulieu JF: **Cellular fibronectin expression is down-regulated at the mRNA level in differentiating human intestinal epithelial cells.** *Exp Cell Res* 1995, **216(1):**30-34.
37. Deschenes C, Alvarez L, Lizotte ME, Vezina A, Rivard N: **The nucleocytoplasmic shuttling of E2F4 is involved in the regulation of human intestinal epithelial cell proliferation and differentiation.** *J Cell Physiol* 2004, **199(2):**262-273.
38. Vachon PH, Cardin E, Harnois C, Reed JC, Vezina A: **Early establishment of epithelial apoptosis in the developing human small intestine.** *Int J Dev Biol* 2000, **44(8):**891-898.
39. Leeb SN, Vogl D, Grossmann J, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, Gelbmann CM: **Autocrine fibronectin-induced migration of human colonic fibroblasts.** *Am J Gastroenterol* 2004, **99(2):**335-340.
40. Goke M, Zuk A, Podolsky DK: **Regulation and function of extracellular matrix intestinal epithelial restitution in vitro.** *Am J Physiol* 1996, **271(5 Pt 1):**G729-740.
41. Howard TH, Hartwig J, Cunningham C: **Lymphocyte-specific protein 1 expression in eukaryotic cells reproduces the morphologic and motile abnormality of NAD 47/89 neutrophils.** *Blood* 1998, **91(12):**4786-4795.
42. Hines OJ, Ryder N, Chu J, McFadden D: **Lysophosphatidic acid stimulates intestinal restitution via cytoskeletal activation and remodeling.** *J Surg Res* 2000, **92(1):**23-28.
43. Walsh MF, Ampasala DR, Hatfield J, Heide R Vander, Suer S, Rishi AK, Basson MD: **Transforming growth factor-beta stimulates intestinal epithelial focal adhesion kinase synthesis via Smad- and p38-dependent mechanisms.** *Am J Pathol* 2008, **173(2):**385-399.
44. Nakajima A, Tomimoto A, Fujita K, Sugiyama M, Takahashi H, Ikeda I, Hosono K, Endo H, Yoneda K, Iida H, *et al.*: **Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity suppresses pancreatic cancer cell motility.** *Cancer Sci* 2008, **99(10):**1892-1900.
45. Kim KR, Choi HN, Lee HJ, Baek HA, Park HS, Jang KY, Chung MJ, Moon WS: **A peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist induces vimentin cleavage and inhibits invasion in high-grade hepatocellular carcinoma.** *Oncol Rep* 2007, **18(4):**825-832.
46. Schaefer KL, Takahashi H, Morales VM, Harris G, Barton S, Osawa E, Nakajima A, Saubermann LJ: **PPARgamma inhibitors reduce tubulin protein levels by a PPARgamma, PPARdelta and proteasome-independent mechanism, resulting in cell cycle arrest, apoptosis and reduced metastasis of colorectal carcinoma cells.** *Int J Cancer* 2007, **120(3):**702-713.
47. Fujisawa T, Nakajima A, Fujisawa N, Takahashi H, Ikeda I, Tomimoto A, Yonemitsu K, Nakajima N, Kudo C, Wada K, *et al.*: **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) suppresses colonic epithelial cell turnover and colon carcinogenesis through inhibition of the beta-catenin/T cell factor (TCF) pathway.** *J Pharmacol Sci* 2008, **106(4):**627-638.
48. Matthiessen MW, Pedersen G, Albrektsen T, Adamsen S, Fleckner J, Brynskov J: **Peroxisome proliferator-activated receptor expression and activation in normal human colonic epithelial cells and tubular adenomas.** *Scand J Gastroenterol* 2005, **40(2):**198-205.
49. Takaishi S, Sawada M, Seno H, Kayahara T, Morita-Fujisawa Y, Fukuzawa H, Chiba T: **Growth promoting effect of thioredoxin on intestinal epithelial cells.** *Dig Dis Sci* 2003, **48(2):**379-385.
50. Sheth SS, Bodnar JS, Ghazalpour A, Thipphavong CK, Tsutsumi S, Tward AD, Demant P, Kodama T, Aburatani H, Lusis AJ: **Hepatocellular carcinoma in Txnip-deficient mice.** *Oncogene* 2006, **25(25):**3528-3536.
51. Takahashi Y, Masuda H, Ishii Y, Nishida Y, Kobayashi M, Asai S: **Decreased expression of thioredoxin interacting protein mRNA in inflamed colonic mucosa in patients with ulcerative colitis.** *Oncol Rep* 2007, **18(3):**531-535.
52. Rouault JP, Rimokh R, Tessa C, Paranhos G, Ffrench M, Duret L, Garoccio M, Germain D, Samarut J, Magaud JP: **BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes.** *Embo J* 1992, **11(4):**1663-1670.
53. Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR: **Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase.** *Nature* 1993, **365(6444):**349-352.
54. Mann DJ, Jones NC: **E2F-1 but not E2F-4 can overcome p16-induced G1 cell-cycle arrest.** *Curr Biol* 1996, **6(4):**474-483.
55. Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA: **Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, **86(3):**802-806.
56. Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA: **Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth.** *Science* 1989, **245(4919):**752-755.
57. Xu C, Zhang J, Huang X, Sun J, Xu Y, Tang Y, Wu J, Shi Y, Huang Q, Zhang Q: **Solution structure of human peptidyl prolyl isomerase-like protein 1 and insights into its interaction with SKIP.** *J Biol Chem* 2006, **281(23):**15900-15908.
58. Obama K, Kato T, Hasegawa S, Satoh S, Nakamura Y, Furukawa Y: **Overexpression of peptidyl-prolyl isomerase-like 1 is associated with the growth of colon cancer cells.** *Clin Cancer Res* 2006, **12(1):**70-76.
59. Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Duchrow M: **Proliferation marker pKi-67 affects the cell cycle in a self-regulated manner.** *J Cell Biochem* 2002, **87(3):**334-341.
60. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H: **Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.** *J Immunol* 1984, **133(4):**1710-1715.
61. Zheng JN, Ma TX, Cao JY, Sun XQ, Chen JC, Li W, Wen RM, Sun YF, Pei DS: **Knockdown of Ki-67 by small interfering RNA leads to inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human renal carcinoma cells.** *Life Sci* 2006, **78(7):**724-729.
62. Wang R, Luo D, Ma X, Yang W, Chen R, Liu Y, Meng L, Zhou J, Xu G, Lu YP, *et al.*: **Antisense Ki-67 cDNA transfection reverses the tumorigenicity and induces apoptosis in human breast cancer cells.** *Cancer Invest* 2008, **26(8):**830-835.
63. Abe Y, Matsumoto S, Wei S, Nezu K, Miyoshi A, Kito K, Ueda N, Shigemoto K, Hitsumoto Y, Nikawa J, *et al.*: **Cloning and characterization of a p53-related protein kinase expressed in interleukin-2-activated cytotoxic T-cells, epithelial tumor cell lines, and the testes.** *J Biol Chem* 2001, **276(47):**44003-44011.
64. Abe Y, Takeuchi T, Imai Y, Murase R, Kamei Y, Fujibuchi T, Matsumoto S, Ueda N, Ogasawara M, Shigemoto K, *et al.*: **A Small Ras-like protein Ray/Rab1c modulates the p53-regulating activity of PRPK.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **344(1):**377-385.
65. Horvath LG, Henshall SM, Kench JG, Saunders DN, Lee CS, Golovsky D, Brenner PC, O'Neill GF, Kooner R, Stricker PD, *et al.*: **Membranous expression of secreted frizzled-related protein 4 predicts for good prognosis in localized prostate cancer and inhibits PC3 cellular proliferation in vitro.** *Clin Cancer Res* 2004, **10(2):**615-625.
66. Horvath LG, Lelliott JE, Kench JG, Lee CS, Williams ED, Saunders DN, Grygiel JJ, Sutherland RL, Henshall SM: **Secreted frizzled-related protein 4 inhibits proliferation and metastatic potential in prostate cancer.** *Prostate* 2007, **67(10):**1081-1090.
67. Carmon KS, Loose DS: **Secreted frizzled-related protein 4 regulates two Wnt7a signaling pathways and inhibits proliferation in endometrial cancer cells.** *Mol Cancer Res* 2008, **6(6):**1017-1028.
68. Lin R, Sun Y, Li C, Xie C, Wang S: **Identification of differentially expressed genes in human lymphoblastoid cells exposed to irradiation and suppression of radiation-induced apoptosis with antisense oligonucleotides against caspase-4.** *Oligonucleotides* 2007, **17(3):**314-326.
69. Martin CA, Panja A: **Cytokine regulation of human intestinal primary epithelial cell susceptibility to Fas-mediated apoptosis.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002, **282(1):**G92-G104.
70. Ray R, Chen G, Velde C Vande, Cizeau J, Park JH, Reed JC, Gietz RD, Greenberg AH: **BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3**

(BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol Chem* 2000, **275(2):**1439-1448.
71. Crowley-Weber CL, Payne CM, Gleason-Guzman M, Watts GS, Futscher B, Waltmire CN, Crowley C, Dvorakova K, Bernstein C, Craven M, *et al.*: **Development and molecular characterization of HCT-116 cell lines resistant to the tumor promoter and multiple stress-inducer, deoxycholate.** *Carcinogenesis* 2002, **23(12):**2063-2080.
72. Tang SC: **BAG-1, an anti-apoptotic tumour marker.** *IUBMB Life* 2002, **53(2):**99-105.
73. Clemo NK, Arhel NJ, Barnes JD, Baker J, Moorghen M, Packham GK, Paraskeva C, Williams AC: **The role of the retinoblastoma protein (Rb) in the nuclear localization of BAG-1: implications for colorectal tumour cell survival.** *Biochem Soc Trans* 2005, **33(Pt 4):**676-678.
74. Saad AF, Meacham WD, Bai A, Anelli V, Elojeimy S, Mahdy AE, Turner LS, Cheng J, Bielawska A, Bielawski J, *et al.*: **The functional effects of acid ceramidase overexpression in prostate cancer progression and resistance to chemotherapy.** *Cancer Biol Ther* 2007, **6(9):**1455-1460.
75. Strelow A, Bernardo K, Adam-Klages S, Linke T, Sandhoff K, Kronke M, Adam D: **Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor-induced cell death.** *J Exp Med* 2000, **192(5):**601-612.
76. Florian S, Wingler K, Schmehl K, Jacobasch G, Kreuzer OJ, Meyerhof W, Brigelius-Flohe R: **Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue.** *Free Radic Res* 2001, **35(6):**655-663.
77. Yan W, Chen X: **GPX2, a direct target of p63, inhibits oxidative stress-induced apoptosis in a p53-dependent manner.** *J Biol Chem* 2006, **281(12):**7856-7862.
78. Mhaidat NM, Thorne RF, de Bock CE, Zhang XD, Hersey P: **Melanoma cell sensitivity to Docetaxel-induced apoptosis is determined by class III beta-tubulin levels.** *FEBS Lett* 2008, **582(2):**267-272.
79. Kavallaris M, Burkhart CA, Horwitz SB: **Antisense oligonucleotides to class III beta-tubulin sensitize drug-resistant cells to Taxol.** *Br J Cancer* 1999, **80(7):**1020-1025.
80. Geddes BJ, Wang L, Huang WJ, Lavellee M, Manji GA, Brown M, Jurman M, Cao J, Morgenstern J, Merriam S, *et al.*: **Human CARD12 is a novel CED4/Apaf-1 family member that induces apoptosis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **284(1):**77-82.
81. Lu C, Wang A, Wang L, Dorsch M, Ocain TD, Xu Y: **Nucleotide binding to CARD12 and its role in CARD12-mediated caspase-1 activation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **331(4):**1114-1119.
82. Gonzalez-Rey E, Delgado M: **Role of vasoactive intestinal peptide in inflammation and autoimmunity.** *Curr Opin Investig Drugs* 2005, **6(11):**1116-1123.
83. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM: **Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf.** *Nature* 2004, **430(6996):**213-218.
84. Trickett JI, Patel DD, Knight BL, Saggerson ED, Gibbons GF, Pease RJ: **Characterization of the rodent genes for arylacetamide deacetylase, a putative microsomal lipase, and evidence for transcriptional regulation.** *J Biol Chem* 2001, **276(43):**39522-39532.
85. Nakaya Y, Schaefer EJ, Brewer HB Jr: **Activation of human post heparin lipoprotein lipase by apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I).** *Biochem Biophys Res Commun* 1980, **95(3):**1168-1172.
86. Ho SY, Delgado L, Storch J: **Monoacylglycerol metabolism in human intestinal Caco-2 cells: evidence for metabolic compartmentation and hydrolysis.** *J Biol Chem* 2002, **277(3):**1816-1823.
87. Duncan M, Thomas AD, Cluny NL, Patel A, Patel KD, Lutz B, Piomelli D, Alexander SP, Sharkey KA: **Distribution and function of monoacylglycerol lipase in the gastrointestinal tract.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008, **295(6):**G1255-1265.
88. Bohley P, Seglen PO: **Proteases and proteolysis in the lysosome.** *Experientia* 1992, **48(2):**151-157.
89. Thapa N, Lee BH, Kim IS: **TGFBIp/betaig-h3 protein: a versatile matrix molecule induced by TGF-beta.** *Int J Biochem Cell Biol* 2007, **39(12):**2183-2194.
90. Pitts RL, Wang S, Jones EA, Symes AJ: **Transforming growth factor-beta and ciliary neurotrophic factor synergistically induce vasoactive intestinal peptide gene expression through the cooperation of Smad, STAT, and AP-1 sites.** *J Biol Chem* 2001, **276(23):**19966-19973.
91. Ruhl A, Franzke S, Collins SM, Stremmel W: **Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001, **280(6):**G1163-1171.
92. Wang L, Srinivasan S, Theiss AL, Merlin D, Sitaraman SV: **Interleukin-6 induces keratin expression in intestinal epithelial cells: potential role of keratin-8 in interleukin-6-induced barrier function alterations.** *J Biol Chem* 2007, **282(11):**8219-8227.
93. Goke M, Kanai M, Podolsky DK: **Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor.** *Am J Physiol* 1998, **274(5 Pt 1):**G809-818.
94. Efron B, Tibshirani R: **Empirical bayes methods and false discovery rates for microarrays.** *Genet Epidemiol* 2002, **23(1):**70-86.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

BioMedcentral

Annexe 2: Enteric glia protect against Shigella flexneri invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione

Auteurs : Mathurin Flamant[1,2,3] , Philippe Aubert[1,2,3], Malvyne Rolli-Derkinderen[4], Arnaud Bourreille[1,2,3], Margarida Ribeiro Neunlist[1,2,3], Maxime M Mahé[1,2,3], Guillaume Meurette[2,3], Benoit Marteyn[5], Tor Savidge[6], Jean Paul Galmiche[1,2,3], Philippe J Sansonetti[5], Michel Neunlist[1,2,3]

[1]INSERM, U913, Nantes, F-44000 France;

[2]CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France ;

[3]Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France;

[4]INSERM, U915, Institut du Thorax, Nantes, France ;

[5]Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire & Unité INSERM 786, Institut Pasteur, Paris, France ;

[6]University Texas Medical Branch (UTMB), Department of Gastroenterology, Galveston, Texas, USA

Downloaded from gut.bmj.com on June 22, 2011 - Published by group.bmj.com

Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for *S*-nitrosoglutathione

Mathurin Flamant,[1,2,3] Philippe Aubert,[1,2,3] Malvyne Rolli-Derkinderen,[4] Arnaud Bourreille,[1,2,3] Margarida Ribeiro Neunlist,[1,2,3] Maxime M Mahé,[1,2,3] Guillaume Meurette,[1,2] Benoit Marteyn,[5] Tor Savidge,[6] Jean Paul Galmiche,[1,2,3] Philippe J Sansonetti,[5] Michel Neunlist[1,2,3]

See Commentary, p 429

► An additional material is published online only. To view this file please visit the journal online (http://gut.bmj.com).

[1]INSERM, UMR 913, Nantes, France
[2]CHU Nantes, Hôtel Dieu, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France
[3]Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France
[4]INSERM, UMR 915, Nantes, France
[5]Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire & Unité INSERM 786, Institut Pasteur, Paris, France
[6]University Texas Medical Branch (UTMB), Department of Gastroenterology, Galveston, Texas, USA

Correspondence to
Dr Michel Neunlist, INSERM U913, Place Alexis Ricordeau, 44035 Nantes Cedex, France; michel.neunlist@univ-nantes.fr

Revised 21 October 2010
Accepted 25 October 2010
Published Online First 7 December 2010

ABSTRACT

Background Enteric glial cells (EGCs) are important regulators of intestinal epithelial barrier (IEB) functions. EGC-derived *S*-nitrosoglutathione (GSNO) has been shown to regulate IEB permeability. Whether EGCs and GSNO protect the IEB during infectious insult by pathogens such as *Shigella flexneri* is not known.

Methods *S flexneri* effects were characterised using in vitro coculture models of Caco-2 cells and EGCs (or GSNO), ex vivo human colonic mucosa, and in vivo ligated rabbit intestinal loops. The effect of EGCs on *S flexneri*-induced changes in the invasion area and the inflammatory response were analysed by combining immunohistochemical, ELISA and PCR methods. Expression of small G-proteins was analysed by western blot. Expression of ZO-1 and localisation of bacteria were analysed by fluorescence microscopy.

Results EGCs significantly reduced barrier lesions and inflammatory response induced by *S flexneri* in Caco-2 monolayers. The EGC-mediated effects were reproduced by GSNO, but not by reduced glutathione, and pharmacological inhibition of pathways involved in GSNO synthesis reduced EGC protecting effects. Furthermore, expression of Cdc42 and phospho-PAK in Caco-2 monolayers was significantly reduced in the presence of EGCs or GSNO. In addition, changes in ZO-1 expression and distribution induced by *S flexneri* were prevented by EGCs and GSNO. Finally, GSNO reduced *S flexneri*-induced lesions of the IEB in human mucosal colonic explants and in a rabbit model of shigellosis.

Conclusion These results highlight a major protective function of EGCs and GSNO in the IEB against *S flexneri* attack. Consequently, this study lays the scientific basis for using GSNO to reduce barrier susceptibility to infectious or inflammatory challenge.

Significance of this study

What is already known about this subject?
- Association between intestinal epithelial barrier (IEB) dysfunction and infectious or inflammatory diseases.
- Regulation of IEB functions (paracellular permeability, intestinal epithelial cell proliferation) by enteric glial cells (EGCs).
- Involvement of *S*-nitrosoglutathione (GSNO) in the control of paracellular permeability by EGCs.

What are the new findings?
- Demonstration of a specific protective role of EGCs during bacterial invasion.
- Identification of GSNO as a major glial mediator involved in IEB protection.
- Modulation of key proteins involved in *S flexneri* invasion by EGCs and GSNO.
- Ex vivo and in vivo validation in human and rabbit intestine, respectively.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?
- As GSNO is already used in clinical trials (cystic fibrosis, prevention of cerebral ischaemia, treatment of pulmonary hypertension), this study could lay the scientific basis for its use in the treatment/prevention of gastrointestinal disorders associated with IEB dysfunction, in particular during infectious diseases.

INTRODUCTION

Emerging concepts suggest that defects in intestinal epithelial barrier (IEB) function, combined or not with altered immune function, are involved in the development of various digestive and non-digestive diseases.[1] In particular, the reduced ability of the IEB to resist pathogenic attack or to be repaired after attack has been associated with increased risk of developing infectious or inflammatory bowel diseases.[2] Therefore, approaches aimed at reinforcing IEB integrity could be of therapeutic interest, in both the prevention and treatment of these pathologies. Indeed, in a recent study, pharmacological reduction of intestinal permeability by blockage of tight junctions has been shown to attenuate intestinal inflammation in IL10−/− mice.[3] Similarly, enhancement of IEB tight junction expression and resistance with vasoactive intestinal peptide[4] reduced IEB lesions induced by pathogens such as *Citrobacter rodentium*.[5]

Various cellular or environmental components of the IEB have been shown to reinforce barrier functions. In particular, the enteric nervous system has recently been identified as a novel and major regulator of IEB functions. The enteric nervous system is an integrative neuronal network located along the gut and is composed of two major cell types, enteric neurons and enteric glial cells (EGCs).

Downloaded from gut.bmj.com on June 22, 2011 - Published by group.bmj.com

EGCs outnumber enteric neurons by a factor of 4–10^6 and share common markers and properties with astrocytes of the central nervous system, which are known to regulate the blood–brain barrier. Recent studies have shown that EGCs can directly regulate various IEB functions. Indeed, EGCs inhibit intestinal epithelial cell (IEC) proliferation and reduce IEB permeability via the liberation of glial-derived transforming growth factor β1 and *S*-nitrosoglutathione (GSNO), respectively.[7 8] Interestingly, EGC lesions in animal models lead to disruption of IEB integrity followed by the development of jejunoileitis.[9 10] Moreover, glial disruption induces changes in the neurochemical coding of enteric neurons, which may partly be responsible for intestinal motility and permeability dysfunction.[11] However, whether EGCs can directly protect the IEB during pathophysiological stress and the nature of the glial-derived factors involved remain unknown.

Shigella flexneri is a major enteroinvasive pathogen that is responsible for bacillary dysentery, which accounts for over 100 million deaths world wide.[12] The physiopathological mechanisms have been identified using in vivo animal models and in vitro approaches. Shigellosis leads to destruction of the intestinal epithelium and a major intestinal inflammatory response.[13 14] More recently, using an ex vivo model of human colonic mucosa, we have shown that S *flexneri* induces major IEB lesions characterised by epithelial desquamation as early as 3 hours after infection, independently of the recruitment of the immune system.[15] Treatment of shigellosis includes an effective antibiotic, rehydration therapy and appropriate feeding during and after the episode of shigellosis. Prevention strategies have also been developed such as vaccination against the more important circulating strains and simple hand washing.[16] Whether strategies aimed at increasing barrier resistance to prevent the development of shigellosis would be effective is not known.

Therefore, our study aimed to determine the effect of EGCs and glial-derived GSNO on IEB resistance to attack by a clinically relevant pathogen, ie *S flexneri*. GSNO is the nitrosylated form of reduced glutathione (GSH), which has been shown to be produced by EGCs.[8 17] Nitrosylation of GSH is catalysed by caeruloplasmin, which therefore contributes to an antioxidant cytoprotective action.[18] Combining coculture models of EGCs and Caco-2 cells with in vivo and ex vivo approaches, we showed that EGCs and EGC-conditioned medium (EGC-CM) prevented the IEB lesions and inflammatory response induced by *S flexneri*. Finally, we identified glial-derived GSNO as a key mediator of these protective effects.

METHODS

Strains of *S flexneri*

Two strains of *S flexneri* (Institut Pasteur, Paris, France) were used in the study: (1) the wild-type *S flexneri* 5a M90T (INV+), which harbours a virulence plasmid encoding its invasive phenotype; (2) the plasmid-cured mutant non-invasive strain BS176 (INV−). The two strains were stored at 4°C on Petri dishes containing 30 ml Bacto Agar (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) supplemented with 0.01% of Congo red (Merck, Darmstadt, Germany). Sixteen hours before experiments, one colony of INV+ or INV− strain was suspended in 10 ml Bacto Agar broth and cultured overnight at 37°C. Bacteria were then adjusted to 10^9 colony forming units (CFU)/ml by absorbance measurement at 600 nm with a Varioscan microplate reader (Thermo, Courtaboeuf, France). The culture media were centrifuged (10 min/2500 rpm), resuspended in Bacto Agar broth (10 ml), diluted 1:10 in the same medium (10 ml), and then cultured for 2 h before their use in the exponential phase of growth for experiments. Bacteria were centrifuged (10 min/2500 rpm) and resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (without antibiotics).

Culturability of *S flexneri*

S flexneri was cultured in the presence of GSNO (50 μM) or EGC-CM (1:2 dilution) for 30 min, 1 h, 2 h or 3 h. Appropriate dilutions (from 10^{-4} to 10^{-6}) of *S flexneri* were performed, and CFU were quantified by spread plate counts on Bacto Agar (from 30 to 300 colonies per plate). Plates were incubated for 24 h at 37°C. The assessment of culturability was systematically based on the results of three independent samples.

Rabbit intestinal loop infection with *S flexneri*

Six New Zealand White rabbits, weighing 2.5–3.0 kg (Charles River Laboratories, St Aubin les Elbert, France), were used in this study. Animals were fasted for 24 h before being infected, and all manipulations were performed under general anaesthesia after intravenous injection of 6% sodium pentobarbital (0.5 ml/kg). After a laparotomy, ligated ileal loops (5 cm long) were made; ligations were carefully performed to preserve the afferent and efferent mesenteric musculature. In each loop, 0.5 ml of a bacterial suspension containing 10^9 bacteria was injected. The abdominal cavity was then closed, and the animals were killed 8 h later. Intraperitoneal injection of GSNO (6 mM final concentration in 50 mM Hepes, pH 7.4, 10 ml) was performed through a catheter. The initial dose was injected 30 min after ligation, and then 2 h, 4 h and 6 h after infection. Control animals were injected under similar conditions with saline solution (0.9% NaCl). In each rabbit, seven loops were ligated, five for *S flexneri* (INV+) injection and two for Hepes injection. After fixation in paraformaldehyde, tissues were washed in phosphate-buffered saline (PBS), dehydrated and embedded in paraffin. Sequential sections of mucosa (5 μm) were cut. Infected and control tissues were observed by classic microscopy after H&E staining. Each section was observed under an Olympus IX 50 microscope. Pictures were acquired with a black and white video camera (Mod4910, Cohu Inc; SL Microtest, Jena, Germany) connected to a Macintosh computer through a frame-grabber card (Scion Image; SL Microtest). Four parameters were analysed as previously described.[19]

a. Length/width ratio (L/W) of the villus reflecting villous atrophy: 40 villi were analysed on each section, their length and width were recorded, and the ratio calculated. As seven loops were performed for each rabbit, the mean value was therefore computed on a total of 200 villi for infected INV+ loops and 80 villi for control loops.
b. Ratio between thickness of the submucosa and thickness of the submucosa + length of the villus and crypt (SM/SM+L), reflecting the intensity of submucosal oedema. The mean of 40 ratios for each section was therefore calculated.
c. Percentage of villi with ulceration.
d. Number of polymorphonuclear leucocytes (PMNLs) invading the tissue. On each of the 40 intestinal villi examined on each section, PMNLs were counted at two levels as previously described: in the crypt area and in the villus area. Again, the mean was calculated from a total of 200 villi for infected loops and 80 for control loops.

Organotypic culture model

Tissue specimens were obtained from patients who underwent surgery for colonic adenocarcinoma, according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Human Tissues. None of these patients received chemotherapy or non-steroidal

Downloaded from gut.bmj.com on June 22, 2011 - Published by group.bmj.com

anti-inflammatory drugs before surgery. Specimens were taken at a distance from the tumour in macroscopically and histologically normal areas and immediately processed in the pathology department. According to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Human Tissues, these specimens were considered to be 'residual tissue', not relevant to pathological diagnosis. All specimens were collected before August 2007. At that time, the specimens considered as 'residual tissue' did not require patient consent. Tissue samples were placed in oxygenated sterile Krebs solution containing 117 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM $MgCl_2$,$6H_2O$, 1.2 mM NaH_2PO_4, 25 mM $NaHCO_3$, 2.5 mM $CaCl_2$,$2H_2O$ and 11 mM $C_6H_{12}O_6$ (glucose), and then rapidly transported to the laboratory for experiments. Colonic fragments were pinned down with the mucosa in a sterile Sylgard-coated dish containing oxygenated sterile Krebs solution maintained at 4°C and changed every 10 min. Muscle layers were removed under a dissection microscope (Olympus, Rungis, France). After dissection of the muscle layers, the tissue was turned over and pinned flat with the mucosa up. Equal-sized fragments (1 cm×1 cm) of both the mucosa and submucosa were washed four times with sterile Krebs solution, weighed, and then pinned in a Sylgard-coated sterile dish. The specimens were then maintained in short-term organ culture for 30 min in DMEM (supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 2 mM glutamine) alone or supplemented with EGC-CM (1:2 dilution) or GSNO (50 μM). The invasive strain of INV+ (adjusted to 10^9 CFU/ml by absorbance measurement at 600 nm with a Varioscan microplate reader) or no bacteria (control tissues) was added to the medium for 3 h. The culture medium was removed after 3 h of infection and stored at −80°C. After fixation in paraformaldehyde (4%, 3 h at room temperature), tissues were washed in PBS, dehydrated, and embedded in paraffin. Sequential sections of mucosa (5 μm) were cut. Infected and control tissues were observed by classic microscopy after H&E staining. Stained tissue sections were observed with an Olympus IX 50 microscope (20× objective). Pictures were acquired with a black and white video camera as described above. Two parameters were analysed as previously described[15]: (*a*) the length of epithelial desquamation compared with the length of intact epithelium (%); (*b*) the height of the surface epithelium. The mean value was therefore computed on a total of 10 fields examined per experiment and per condition.

Cell lines

Caco-2 human adenocarcinoma cells (EATCC, Port Down, UK) were cultured in DMEM (4.5 g/l glucose) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml penicillin and 50 μg/ml streptomycin at 37°C and 5% CO_2. All cell reagents were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Cells were seeded on to a porous filter (0.40 μm porosity, 1.1 cm diameter; Corning, Marne-la-Vallée, France) at a density of 2×10^5 cells/filter and grown to confluence (14 days). Porous filters were used for coculture experiments in 12-well plates (Corning, Avon, France). Culture medium was changed every 48 h.

Non-transformed and transformed EGCs were generated as previously described.[20] EGC cultures were isolated and purified from enzymatically dissociated preparations of rat longitudinal muscle/myenteric plexi. EGCs were cultured in DMEM (4.5 g/l glucose) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml penicillin and 50 μg/ml streptomycin at 37°C and 5% CO_2. EGCs were seeded at a density of 1.5×10^5 cells in the bottom of 12-well plates (Corning) and grown to confluence (4 days) at 37°C and 5% CO_2. For some experiments, EGC-CM was collected, centrifuged and stored at −80°C until used as a conditioned medium.

Human fibroblasts cells (CCD-18Co) were cultured in minimal essential medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acid, 50 IU/ml penicillin and 50 μg/ml streptomycin at 37°C and 5% CO_2. CCD-18Co cells were seeded at a density of 2×10^5 cells in the bottom of 12-well plates (Corning) and grown to confluence (7 days) at 37°C and 5% CO_2.

Coculture and infection

Monolayers of Caco-2 cells were cultured in the presence of cells seeded in the bottom of 12-well plates or with other components added to the culture medium in the bottom of the 12-well plates. All components of the coculture model were cultured with the culture medium for epithelial cells. After 90 min of infection of Caco-2 cells with *S flexneri*, gentamicin (50 μg/ml) was added to the apical side of the filters for 30 min to kill extracellular bacteria, allowing the study of invasive bacteria exclusively. Filters were then washed three times with DMEM, and Caco-2 cells were subsequently cocultured for 16 h.

Experiments were performed under different conditions: Caco-2 cells cultured alone or in the presence of EGCs, CCD-18Co cells (seeded at the bottom), EGC-CM (1:2 dilution), GSNO (10, 50, 100 μM; WPI, Aston Stevenage, UK) or GSH (10, 50, 100 μM; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). To inhibit endogenous nitric oxide synthetase activity, EGCs were incubated for 1 h before the experiment with N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 50 μM; Interchim, Montluçon, France). To reduce the GSNO secreted by EGCs, EGC-CM was incubated with dithiothreitol (DTT; 0.1 mM; Invitrogen) for 1 h before the experiment.Caco-2 cells and EGCs were cocultured 1 day before infection by *S flexneri* (INV+, INV−).

Intestinal epithelial monolayer permeability was evaluated by measuring transepithelial resistance (TER) using an EVOM resistance metre (WPI). The resistance was calculated by subtracting the electrical resistance of a blank insert from the measured value.

Morphological and immunohistochemical analysis

At the end of the experiment, filters of Caco-2 cells were fixed for 30 min in PBS containing 4% paraformaldehyde (Sigma) at room temperature. The filters were washed three times in PBS and permeabilised for 30 min in PBS/NaN_3 with 0.5% Triton X-100 (Sigma) and 4% horse serum (Sigma). Permeabilised Caco-2 cells were then exposed to a primary rabbit antibody anti-*S flexneri* (Flexner 5; 1:2000 dilution; from P Sansonetti, Institut Pasteur, Paris, France), mouse anti-ZO-1 (1:500 dilution; Clinisciences, Montrouge, France) or Alexa Fluor phalloidin fluorescein isothiocyanate (FITC; 1:200 dilution; Invitrogen) for 90 min at room temperature and washed three times with PBS. Caco-2 cells were thereafter incubated for 30 min with a secondary anti-rabbit antibody conjugated with CY3 (1:500 dilution; Becton Dickinson) and an anti-mouse antibody conjugated with CY5 (1:200 dilution; Becton Dickinson). Caco-2 cell monolayers were observed with an Olympus IX 50 fluorescence microscope (4× objective). Pictures were acquired with a black and white video camera as described above. Two parameters were analysed: (*a*) areas of immunostained sites of infection at 4, 8 and 16 h after invasion; (*b*) numbers of invasion foci at 8 and 16 h after invasion. The mean value was therefore computed on a total of 11 fields examined per experiment and per condition representing about 20% of the total area of the filter. ZO-1 expression and distribution as well as localisation of

Downloaded from gut.bmj.com on June 22, 2011 - Published by group.bmj.com

INV+ were analysed with a confocal-like microscope Axiovert 200M coupled to an ApoTome (Zeiss, Gottingen, Germany).

Epithelial cytokine production

Apical and basolateral supernatants of cell cultures and organotypic culture were collected, and interleukin (IL)-8 (Becton Dickinson) protein concentration was determined using a commercially available ELISA kit according to the manufacturer's instructions. Each sample was assessed in duplicate. For determination of intracellular IL-8 concentration, the intracellular proteins were extracted using RIPA lysis buffer (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France) containing a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Meylan, France) and measured by ELISA.

Real-time quantitative reverse transcriptase PCR

Total RNA was extracted from cells using RLT (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (5 μg), $pd(N)_6$ random hexamers (1 μl; 265 ng/μl; GE Healthcare, Orsay, France) dNTPs (1 μl; 10 mM; Gibco, Cergy-Pontoise, France), first-strand buffer 5X (5 μl; Gibco), DDT (1 μl; 0.1 M, Gibco) and RNasin (0.5 μl; 40 U/μl; Promega, Charbonnieres, France) were used to synthesise single-stranded cDNA using the Superscript II Reverse Transcriptase (0.5 μl; 200 U/μl; Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, in a total volume of 25 μl. Incubation was performed at 42°C for 60 min. Amplification conditions for the IL-8 and S6 templates were optimised for the RotorGene 2000 instrument (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). PCRs were performed with 2 μl cDNA, 0.1 μl of a solution of SYBR Green I diluted 1:100 (Sigma), 1 μl (10 μM) of each primer, 1 μl (10 mM) dNTPs, and 0.4 μl Titanium Taq DNA polymerase kit (Ozyme), according to the manufacturer's instructions. Cycling conditions were as follows: 5 min at 95°C; amplification for 35 cycles with denaturation for 5 s at 95°C; annealing 15 s at 60°C for S6, 63°C for IL-8, and extension, 20 s at 72°C. Primers were chosen on separate exons to amplify cDNA but not genomic DNA. The following primers were used: S6 forward, 5′-CCAAGCTTATT CAGCGTCTTGTTACTCC-3′; reverse, 5′-CCCTCGAGTCCTT CATTCTCTTGGC-3′ (PCR product 130 bp); IL-8 forward, 5′-CTCTTGGCAGCCTTCCTGATT-3′; reverse, 5′-TATGCACT GACATCTAAGTTCTT-3′ (PCR product 264 bp). An external standard curve was generated with serial dilutions of control cDNA, by plotting the relative amounts of these dilutions against the corresponding C_t (threshold cycle) values. The amount of IL-8 and S6 was calculated from these standard curves using the RotorGene software (Ozyme). Samples were tested in triplicate, and the mean values were used for quantification using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method as previously described.[21]

Western blot analysis

After treatment, cells were harvested and homogenised in NETF lysis buffer containing 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaF, 1% Nonidet P-40, 2 mM orthovanadate, protease inhibitor cocktail (Sigma), and serine–threonine phosphatase inhibitor cocktail (Sigma). Nuclei and unlysed cells were removed by centrifugation at 10 000 *g* for 10 min at 4°C. Proteins were resolved by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes that were incubated with specific antibodies. Signals from immunoreactive bands were detected by ECLplus (General Electric) and quantified using QuantityOne (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Equal loading was checked by reprobing the membrane with monoclonal β-actin antibody (Sigma). Rabbit anti-phospho-PAK1/2 (phospho-PAK1(Ser199/204)/PAK2 (Ser 192/197), anti-PAK1, anti-Cdc42, anti RhoA, anti-MYPT and anti-Rac1 were purchased from TEBU Bio (Le Perray en Yvelines, France).

Statistical analysis

Each set of experiments (cell culture and tissue culture) was repeated at least three times. Data are expressed as mean±SEM. A paired t test, a Mann–Whitney U test, or a one-way or repeated major analysis of variance followed by Bonferroni t test were performed to compare different populations. Differences were considered significant at $p<0.05$.

RESULTS

Enteric glia directly protect Caco-2 monolayers during infectious stress

To determine the ability of EGCs to protect the IEB during infection by *S flexneri*, we used a validated coculture model of confluent Caco-2 cells grown on Transwell filters and EGCs.[4 8]

Enteric glia reduce intestinal barrier invasion by *S flexneri*

Incubation of Caco-2 monolayer with the invasive strain of *S flexneri* (INV+) induced a time-dependent increase in the surface area of the monolayer infected with INV+ (figure 1A,C,E). In addition, the number of infection foci increased in a time-dependent fashion (figure 1F). The non-invasive strain of *S flexneri* (INV−) did not infect Caco-2 monolayers (data not shown).

Coculture of Caco-2 monolayer with EGCs 24 h before and during infection with INV+ significantly reduced both the infected surface area and the number of infection foci compared with the control (ie, Caco-2 cells cultured alone infected with INV+) (figure 1B,D–F). Furthermore, preincubation alone of Caco-2 monolayer with EGCs before infection also significantly reduced the lesions induced by INV+ (figure 2A). In contrast, coculture of Caco-2 cells with EGCs only after infection with INV+ did not modify the extent of the lesions in the Caco-2 monolayer compared with the control (data not shown). Culture of Caco-2 monolayer with EGC-CM also significantly reduced monolayer lesions induced by INV+ (figure 2A).

To address the cell-specific effects of EGCs, we evaluated the protective effects of the human fibroblast cell line (CCD-18Co), as fibroblasts are another major cell component of the mucosa. After coculture of Caco-2 monolayer with CCD-18Co, infection by INV+ induced similar lesions to those observed in the control (figure 2B).

Enteric glia inhibit alterations in intestinal barrier resistance induced by INV+

Infection of Caco-2 monolayer with INV+ induced a significant time-dependent decrease in TER as early as 8 h after infection (figure 3A). In contrast, coculture of Caco-2 cells with EGCs did not modify TER during the first 8 h after infection. However, at 16 h after infection, there was a significant decrease in TER, which was, however, larger than that observed in the control (figure 3A). Interestingly, TER of the Caco-2 monolayer cocultured with EGCs was significantly larger than that of Caco-2 cells cultured alone, in both the absence and presence of INV+. In addition, INV− did not modify Caco-2 monolayer TER measured in the presence or absence of EGCs (data not shown).

Enteric glia inhibit the inflammatory response induced by INV+

Infection of Caco-2 monolayer with INV+ induced a time-dependent increase in IL-8 concentration compared with that

Downloaded from gut.bmj.com on June 22, 2011 - Published by group.bmj.com

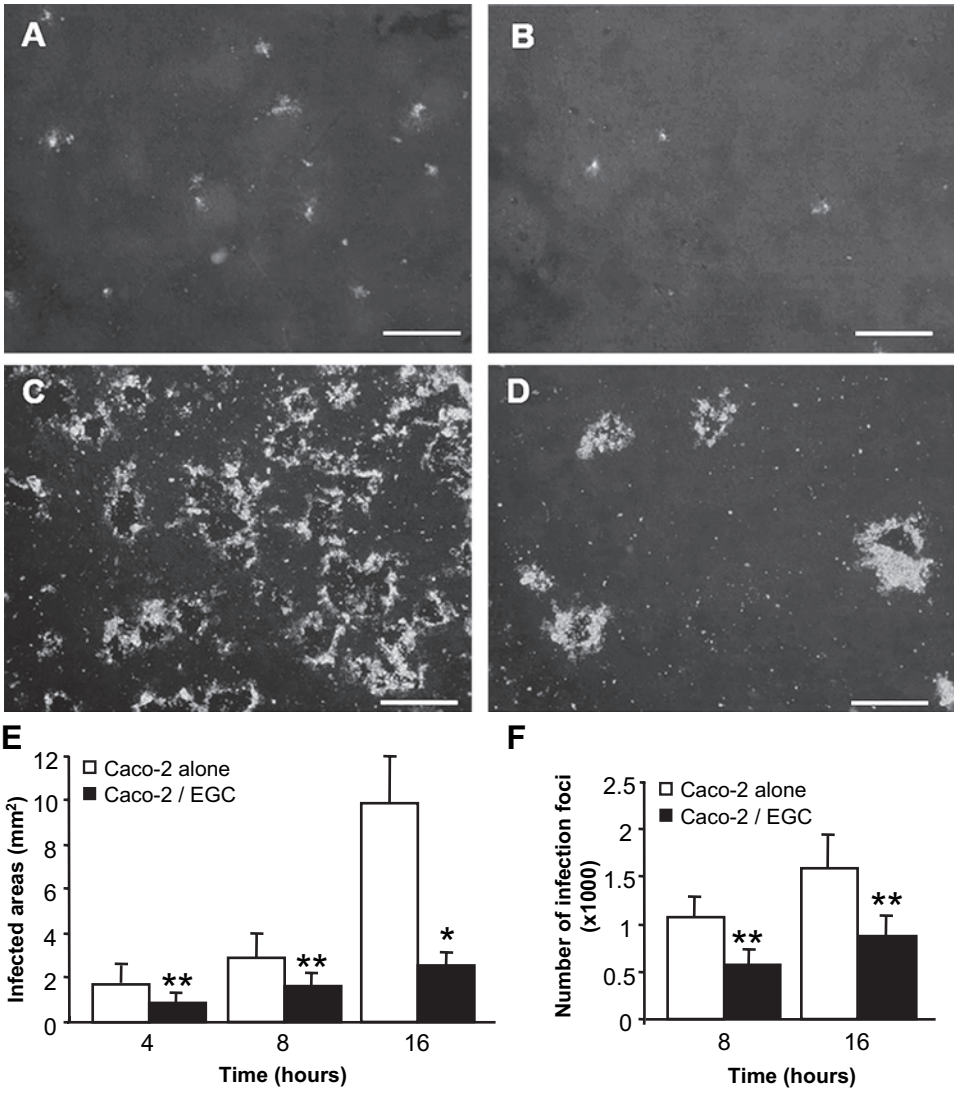


Figure 1 Intestinal epithelial barrier protection by enteric glia during attack by *S flexneri*. (A—D) Immunostaining of Caco-2 monolayer with an anti-Shigella antibody cultured without (A,C) or with (B,D) enteric glial cells (EGCs) 8 h (A,B) and 16 h (C,D) after infection with *S flexneri*. In the presence of EGCs, the infection area and number of foci are reduced compared with the controls. Scale bar: 250 μm. (E) Quantitative analysis of invasion areas by *S flexneri* in Caco-2 monolayer cultured alone and in the presence of EGCs (n=8, *p<0.05; **p<0.01). (F) Quantitative analysis of number of infection foci by *S flexneri* in Caco-2 cells cultured alone and in the presence of EGCs (n=8, **p<0.01).

measured in non-infected monolayers (figure 3B). This increase was significant as early as 4 h after infection. In addition, IL-8 concentrations were significantly higher in the basolateral than the apical compartment (figure 3B). Interestingly, 16 h after infection, IL-8 concentration correlated linearly with the total surface area of the infected monolayer infected with INV+ ($r=0.96$, $p<0.05$, $n=5$).

At all times measured, coculture of Caco-2 monolayer with EGCs significantly reduced INV+-induced IL-8 secretion on both the apical and basolateral side compared with the control (figure 3B). Interestingly, in Caco-2 cells, the ratio of intracellular stored IL-8 to the total secreted and stored IL-8 was significantly increased after culture with EGCs compared with the control (figure 3C).

Finally, at 4 h after infection, INV+ induced a significant increase in IL-8/S6 mRNA expression in Caco-2 cells compared with non-infected Caco-2 cells (figure 3D). In addition, IL-8/S6 mRNA expression level was significantly reduced in INV +-infected Caco-2 monolayer cultured with EGCs compared with the control (figure 3D).

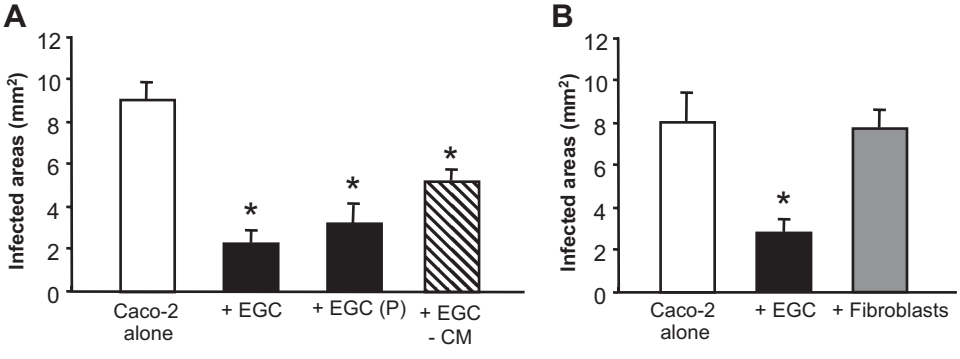


Figure 2 Intestinal epithelial barrier (IEB) protection by enteric glia but not fibroblasts during attack by *S flexneri*. (A) Preincubation of Caco-2 monolayer with enteric glial cells (EGCs) 24 h before infection (EGC(P)) was sufficient to protect IEB lesions induced by *S flexneri* (n=4, *p<0.05). In addition, EGC-conditioned medium (EGC-CM) prevented the Caco-2 monolayer invasion by *S flexneri* (n=4, *p<0.05). (B) A coculture model with fibroblasts did not reproduce the protective effects of EGCs in Caco-2 cells (n=4).

Downloaded from gut.bmj.com on June 22, 2011 - Published by group.bmj.com

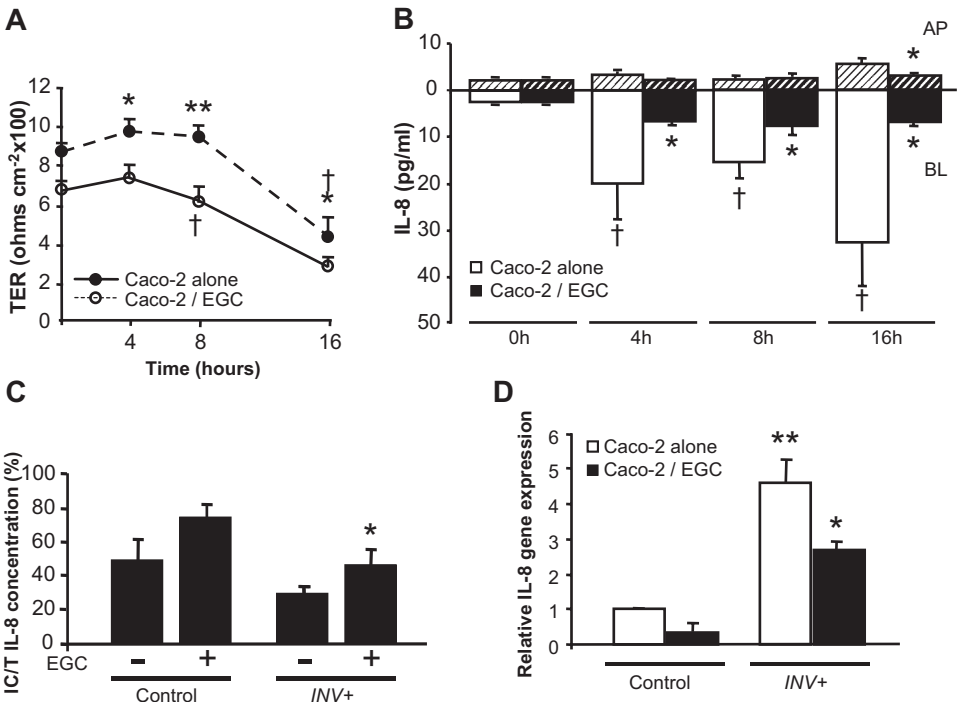


Figure 3 Modulation of intestinal epithelial barrier resistance and inflammatory response by enteric glial cells (EGCs) during attack by *S flexneri*. (A) Transepithelial resistance (TER) of Caco-2 cells after infection by *S flexneri* showed a significant decrease as early as 8 h after infection in Caco-2 cells alone but only at 16 h in the presence of EGCs (n=8, †p<0.05 compared with initial time of infection). In addition, TER was significantly increased in the presence of EGCs compared with Caco-2 cells alone (n=8, *p<0.05; **p<0.01). (B) Infection by *S flexneri* induced polarised interleukin (IL)-8 secretion at the basolateral (BL) side compared with the apical (AP) side. Secretion of IL-8 was decreased in the presence of EGCs compared with the control (n=8, *p<0.05, †p<0.05 compared with initial time of infection). (C) Ratio of intracellular/total (IC/T) IL-8 concentration in the Caco-2 monolayer. In the presence of EGCs, an increase in (IC/T) IL-8 ratio was observed (n=5, *p<0.05). (D) Relative IL-8 gene expression showing an increase in IL-8 mRNA after *S flexneri* infection compared with the control (n=5, †p<0.05). Coculture conditions led to a decrease in IL-8/S6 mRNA expression, which was induced compared with Caco-2 cells alone (n=5, *p<0.05).

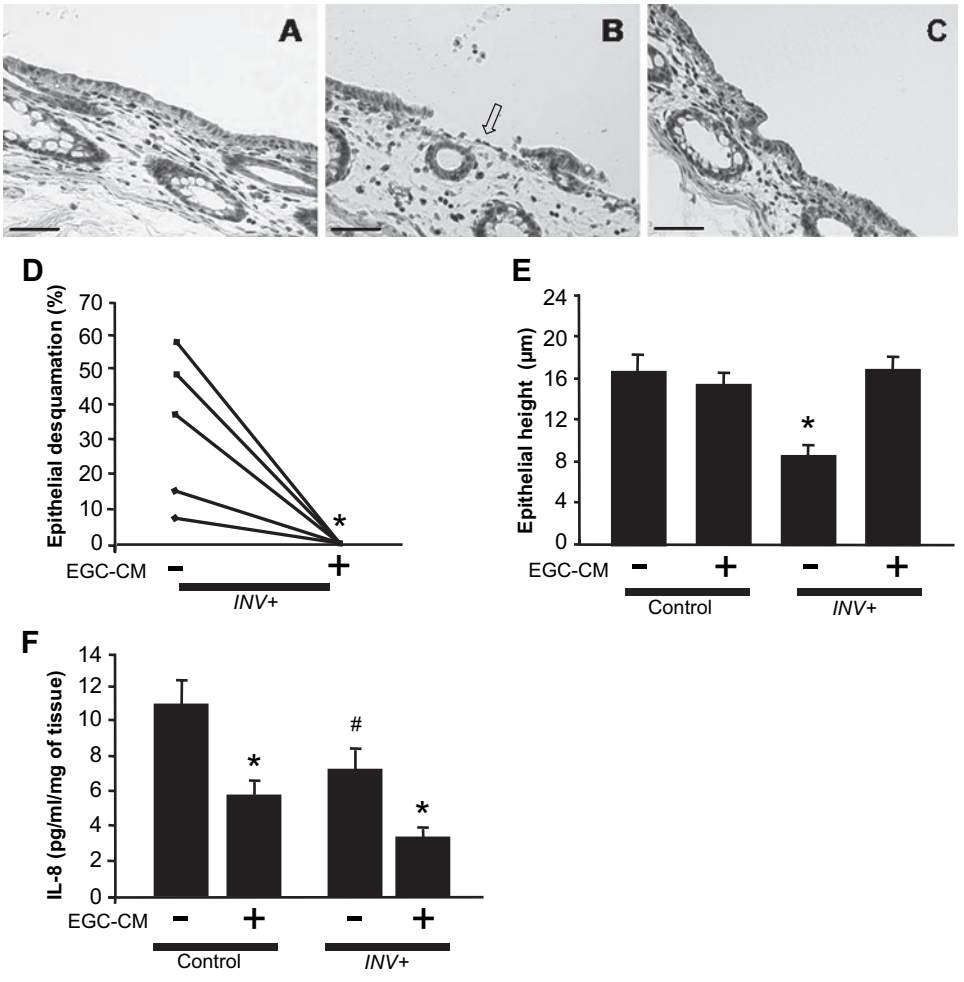


Figure 4 Modulation by enteric glial cell conditioned medium (EGC-CM) of *S flexneri* effects on barrier morphology and inflammatory response in human colonic explants. (A) No surface epithelium desquamation was observed in control non-infected colonic tissues cultured for 3 h. (B) Infection of the colonic specimen for 3 h with *S flexneri* induced significant desquamation of the surface epithelium (arrow). (C) In the presence of EGC-CM, no desquamation was observed. Scale bars: 50 µm. (D) Quantitative analysis of epithelial desquamation revealed that EGC-CM prevented the desquamation of the surface epithelium induced by *S flexneri* (INV+) (n=5, *p<0.05). (E) *S flexneri* (INV+) induced a significant decrease in surface epithelial height compared with non-infected tissues. EGC-CM prevented *S flexneri*-induced decrease in epithelial height (n=5, *p<0.05). (F) EGC-CM induced a significant decrease in interleukin (IL)-8 secretion compared with the control in both control and infected tissues (n=5, *p<0.05, #p<0.05 compared with the control condition without EGC-CM).

Downloaded from gut.bmj.com on June 22, 2011 - Published by group.bmj.com

EGC-CM protects human colonic mucosa during infectious stress

To further validate the protective effects of EGCs during IEB infection by INV+, we used explants of human colonic mucosa as previously described.[15]

In the absence of infection, no epithelial damage was observed at the end of the 3 h of culture (figure 4A). Infection of human colonic mucosa explants by INV+ for 3 h induced significant desquamation of the surface epithelium (figure 4B,D). In contrast, in the presence of EGC-CM, no desquamation of surface epithelium was induced by INV+ (figure 4C,D). Moreover, infection of colonic explants by INV+ induced a significant decrease in epithelium height compared with the control, which was also prevented by EGC-CM (figure 4E). In addition, EGC-CM significantly reduced IL-8 concentration in infected colonic explants compared with the control (figure 4F). Interestingly, EGC-CM also reduced IL-8 concentration in non-infected colonic explants compared with the control (figure 4F).

Glial-derived GNSO mediates the protective effects of enteric glia during infectious insult

A recent study has identified GSNO as an enteric glial mediator involved in the EGC-induced increase in IEB resistance.[8] We therefore sought to determine whether GSNO could be involved in the EGC-mediated protection of the IEB.

GSNO reduces barrier lesions and inflammatory response induced by INV+

Incubation of Caco-2 monolayer with GSNO induced a bell-shaped dose-dependent reduction in the surface area of the monolayer infected with INV+ compared with the control (figure 5A). Maximum protective effect was obtained at 50 μM GSNO. Interestingly, GSH (10, 50 and 100 μM) did not protect INV+-induced lesions in Caco-2 monolayer (figure 5A). Preincubation alone of Caco-2 monolayer with GSNO for 24 h before infection was sufficient to prevent IEB lesions induced by INV+ (figure 5B). In addition, treatment of Caco-2 monolayer with GSNO significantly reduced the INV+-induced increase in polarised IL-8 secretion compared with the control (figure 5C).

To demonstrate that EGCs protect IEB via the production of GSNO, we inhibited its synthesis directly in EGCs using pharmacological approaches as previously described.[8] Blocking nitric oxide synthetase activity in EGCs, which is involved in GSNO synthesis from GSH, using L-NAME (50 μM), significantly inhibited the protective effects of EGCs (figure 6A). Pretreatment of EGC-CM with DTT (0.1 mM) also significantly prevented the protective effects of EGCs (figure 6B).

EGCs and GSNO do not affect *S flexneri* viability

We next determined whether EGCs or GSNO could modulate bacterial viability. Therefore, INV+ bacteria were cultured with EGC-CM for 3 h, and their culturability was quantified by spread plate counts. No difference in counts between INV+ cultured in the presence or absence of EGC-CM was observed. Similarly, no significant difference in counts was observed after incubation of INV+ in the presence or absence of GSNO (online supplementary files A and B). Furthermore, after pretreatment of INV+ with GSNO, INV+ tended to induce a larger infection area in Caco-2 monolayer than in the control (non-treated INV+) (online supplementary file C).

Effect of EGCs and GSNO on intestinal barrier and entry of *S flexneri*

Microscopy studies with an ApoTome revealed that INV+ bacteria were mainly localised within Caco-2 cells under control

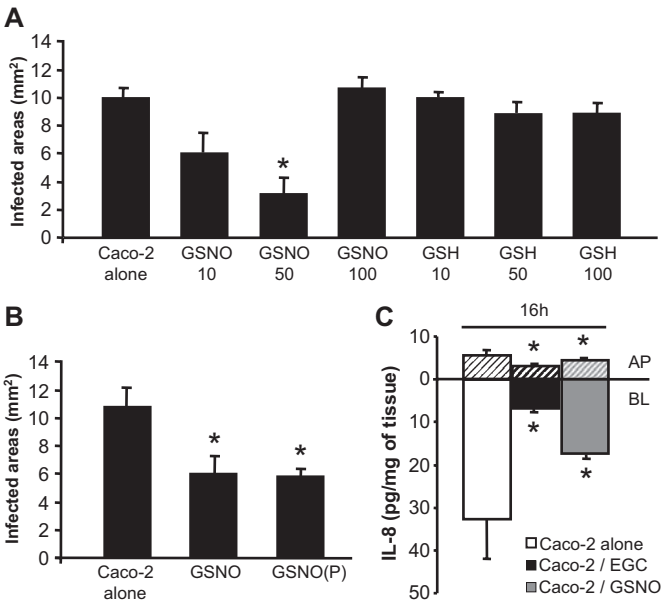


Figure 5 Intestinal epithelial barrier (IEB) protection by glial-derived *S*-nitrosoglutathione (GSNO) during attack by *S flexneri*. (A) GSNO but not reduced glutathione (GSH) induced a bell-shaped dose dependent reduction in the surface area of the monolayer infected with *S flexneri* (n=4, *p<0.05). (B) Preincubation of IEB before infection with GSNO (GSNO(P)) reproduced the protective effects of GSNO (n=4, *p<0.05). (C) GSNO and enteric glial cells (EGCs) significantly reduced polarised interleukin (IL)-8 secretion by IEB, at both the apical (AP) and basolateral (BL) side, induced by *S flexneri* (n=6, *p<0.05).

conditions (figure 7A). In contrast, after treatment with EGCs (figure 7B) or GSNO (figure 7C), INV+ was also observed within Caco-2 cells, but also frequently over the Caco-2 monolayer. Furthermore, INV+ induced a major reduction in the pericellular staining of ZO-1 in control Caco-2 monolayer (figure 7D) compared with the Caco-2 monolayer cocultured with EGCs (figure 7E) or GSNO (figure 7F). In addition, EGCs and GSNO prevented the irregular pericellular staining patterns of ZO-1 induced by INV+ in control Caco-2 monolayer (Figure 7D–F).

EGCs and GSNO reduce Cdc42 and phospho-PAK expression in epithelial cells

As Rho proteins are known to play a key role in bacterial invasion,[22 23] we evaluated the effect of EGCs or GSNO on RhoA or Cdc42 and Rac1 expression as well as their target

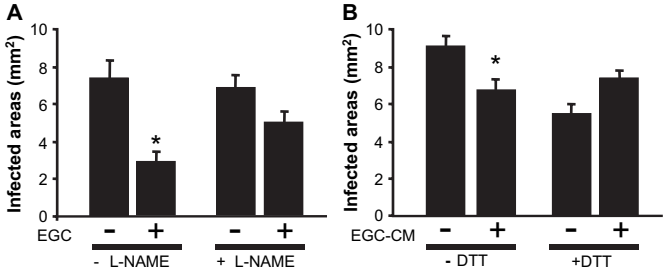


Figure 6 Intestinal epithelial barrier (IEB) protection by glial-derived *S*-nitrosoglutathione (GSNO) during attack by *S flexneri*. (A) The protective effect of enteric glial cells (EGCs) on the infected area of the IEB was abolished in the presence of N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; n=5, *p<0.05). (B) The protective effect of EGCs on the infected area of the IEB was abolished after treatment of EGC-conditioned medium (EGC-CM) with dithiothreitol (DTT; n=5, *p<0.05).

Downloaded from gut.bmj.com on June 22, 2011 - Published by group.bmj.com

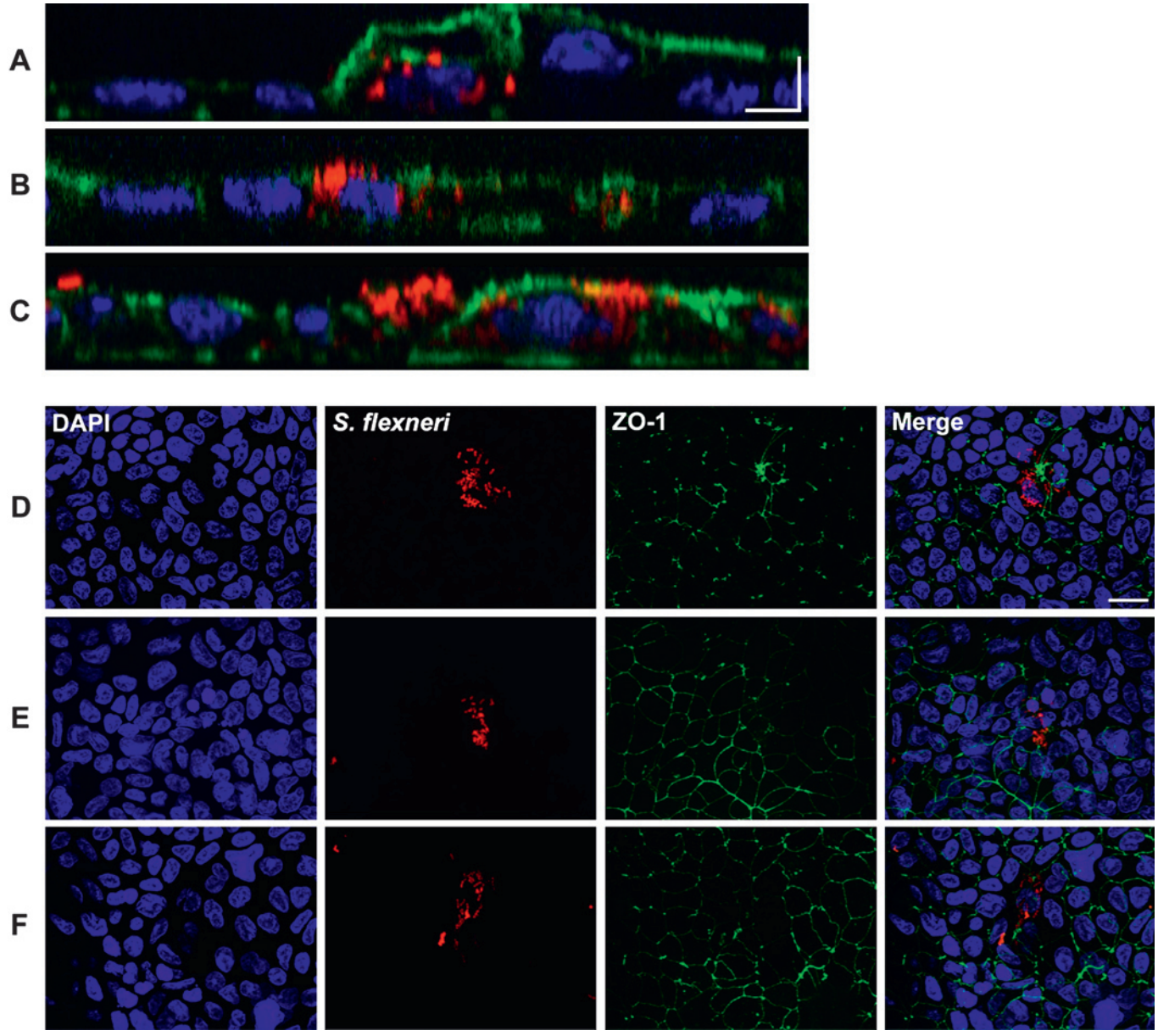


Figure 7 Photomicrographs (along the z-axis) of Caco-2 monolayers infected with *S flexneri* (identified with anti-*S flexneri* antibody (red)) and stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue) and phalloidin/fluorescein isothiocyanate (green). (A) In Caco-2 cells cultured alone, *S flexneri* was localised within the Caco-2 cells. (B,C) In Caco-2 cells cultured with enteric glial cells (EGCs) (B) and *S*-nitrosoglutathione (GSNO) (C), *S flexneri* was localised within the Caco-2 cells and on the surface of Caco-2 monolayers. Scale bars: 10 μm. (D–F) Photomicrographs of Caco-2 monolayers infected with *S flexneri* (red) and stained with DAPI (blue) and ZO-1 antibody (green). After Caco-2 monolayer infection with *S flexneri*, ZO-1 pericellular staining was significantly reduced and disorganised (D) compared with the Caco-2 areas infected with *S flexneri* after coculture with EGCs (E) or GSNO (F) Scale bar: 20 μm.

(MYPT or PAK phosphorylation, respectively). MYPT phosphorylation and RhoA expression were not modulated by GSNO or EGCs in Caco-2 monolayers (data not shown). In contrast, Cdc42 expression was rapidly and significantly reduced in Caco-2 cells after coculture with EGCs or GSNO (50 μM) (figure 8A,B). In parallel, whereas PAK expression remained stable, expression of phospho-PAK was significantly decreased by EGCs and GSNO (figure 8A,C).

GSNO reduces lesions induced by INV+ in human colonic mucosa explants

GSNO (50 μM) significantly reduced the epithelial desquamation induced by INV+ compared with the control (INV +-infected human colonic explants) (figure 9B–D). Similarly to EGC-CM, epithelial height was not as reduced in the presence of GSNO compared with the control (figure 9E). GSNO did not reduce IL-8 secretion in explants infected with INV+ compared with the control (figure 9F). However, in non-infected colonic explants, GSNO significantly reduced IL-8 secretion (figure 9F).

In vivo effect of GSNO in infected rabbit ligated intestinal loops

We finally sought to identify whether GSNO would have protective effects in vivo in a validated animal model, ie, shigellosis induced in rabbit.[19]

In non-infected loops, ileal villus and crypt architecture were normal (figure 10A). GSNO did not modify mucosal architecture in non-infected loops (figure 10D–F). After infection by INV+,

Downloaded from gut.bmj.com on June 22, 2011 - Published by group.bmj.com

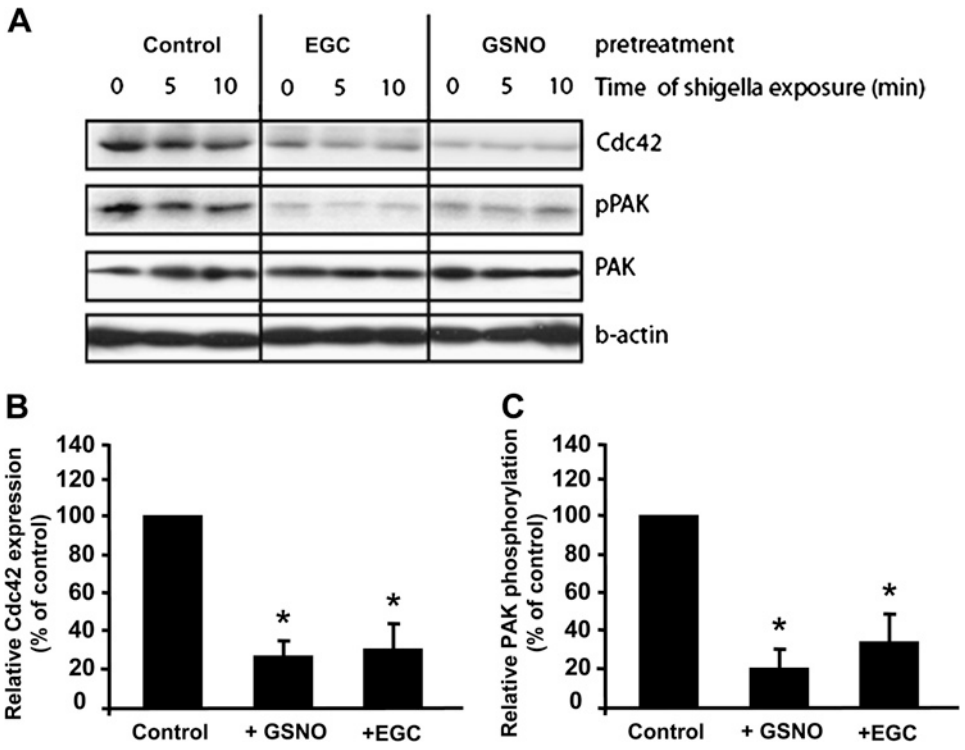


Figure 8 (A,B) Enteric glial cells (EGCs) and *S*-nitrosoglutathione (GSNO; 50μM) inhibit Cdc42 phospho-PAK expression in Caco-2 monolayers. Pretreatment of Caco-2 monolayers for 24 h with EGCs or GSNO induced a significant reduction of Cdc42 expression compared with the control (Caco-2 monolayers cultured alone). (A,C) Consistently, the ratio phospho-PAK/PAK expression was significantly reduced after 24 h coculture with EGCs or GSNO compared with the control. Infection of Caco-2 monolayers by *S flexneri* did not modify the expression of these proteins within the first 10 min after infection independently of the experimental conditions in the epithelial cells (n=3, *p<0.01, pretreated versus control).

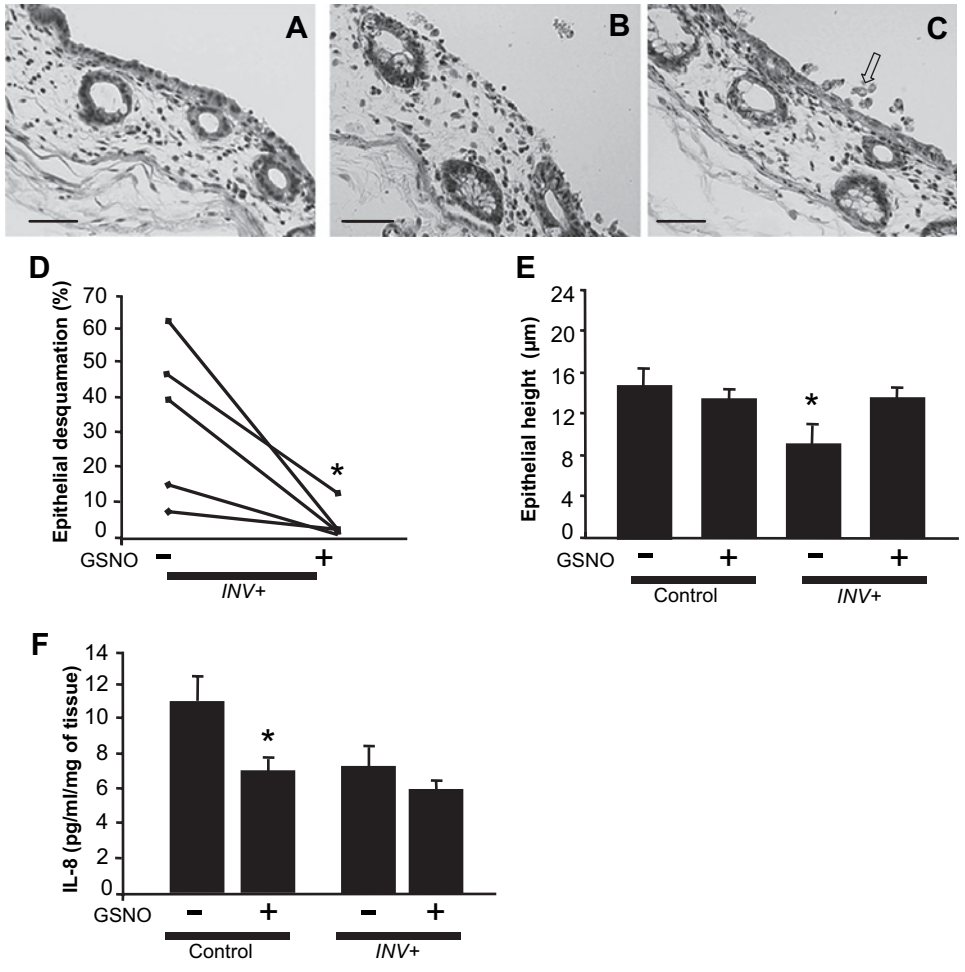


Figure 9 Modulation by *S*-nitrosoglutathione (GSNO) of *S flexneri* effects on barrier morphology and inflammatory response in human colonic explants. (A) No surface epithelium desquamation was observed in control non-infected tissues cultured for 3 h. (B) Infection of the colonic specimen for 3 h with *S flexneri* induced significant desquamation of the surface epithelium. (C) In specimens infected for 3 h with GSNO, moderate desquamation was observed (arrow). Scale bars: 50 μm. (D) Quantitative analysis of epithelial desquamation revealed that GSNO induced a significant decrease in desquamation of the surface epithelium induced by *S flexneri* (INV+) (n=5, *p<0.05). (E) *S flexneri* induced a significant decrease in surface epithelial height compared with the non-infected tissues. GSNO prevented the *S flexneri*-induced decrease in epithelial height (n=5, *p<0.05). (F) GSNO induced a significant decrease in interleukin (IL)-8 secretion compared with the control in non-infected tissue, but not in tissue infected by INV+ (n=5, *p<0.05).

Downloaded from gut.bmj.com on June 22, 2011 - Published by group.bmj.com

major mucosal damage was observed characterised by a decrease in villus height, an increase in villus diameter and, in some cases, complete destruction of the villus (figure 10B,D–F). In addition, INV+-infected animals also exhibited major PMNL infiltrates in the villus and crypts as well as oedema in the submucosa (figure 10G). Intraperitoneal administration of GSNO significantly reduced the intestinal lesions induced by INV+ (figure 10C–F). In particular, the decrease in villus length to width ratio induced by INV+ was significantly reduced (figure 10D). Similarly, GSNO reduced the percentage of ulcerated villi induced by INV+ (figure 10E). Furthermore, the increase in the submucosa/(submucosa+length of villi and crypt) ratio induced by INV+ was prevented by GSNO (figure 10F). Surprisingly, GSNO treatment increased the PMNL infiltrate induced by INV+ in both the crypts and the villus compartment (figure 10G).

DISCUSSION

In this study, combining ex vivo experiments with human colonic explants and an in vitro coculture model of EGCs and IECs, we first demonstrated that EGCs reduced the IEB lesions and inflammation induced by *S flexneri*. Second, using these models and in vivo models of shigellosis, we identified GSNO as a key glial-derived mediator of these effects.

Previous studies have provided anatomical evidence of a functional role for EGCs in the control of the IEB. Indeed, electron microscopy and immunohistochemical studies revealed a dense network of enteric glia associated with enteric nerve fibres, in close proximity with IECs in both rats and humans.[7 24] From a functional point of view, EGCs have been shown to directly increase IEB resistance and inhibit intestinal epithelial cell proliferation.[7 8] Conversely, glia ablation leads to an increase in cell proliferation and paracellular permeability.[7 8] The present study expands on previous experiments and demonstrates that EGCs exert major protective effects against IEB attack by enteric pathogens. These protective effects were also shown to be cell specific, as fibroblasts did not prevent *S flexneri*-induced IEB lesions.

The protective effects of EGCs on the IEB may be due to the ability of EGCs to prevent the recruitment or degradation by *S flexneri* of key molecular factors necessary for bacterial invasion. EGC protective effects are probably due in part to its ability to inhibit *Shigella* invasion. Indeed, we showed that, after infection, a larger proportion of bacteria were present on the surface of Caco-2 monolayer after treatment with EGCs or GSNO compared with the control, suggesting greater difficulty of INV+ to invade Caco-2 cells. This is further supported at the molecular level by the fact that EGCs decreased Cdc42, a key protein required for *S flexneri* invasion. Indeed, Shibata *et al* have shown that invasion of *S flexneri* was prevented in Cdc42-deficient cells.[25] In addition, the increased expression of ZO-1 induced by EGCs and GSNO in control conditions[8] and during *S flexneri* infection (our study) may also be involved in their protective effects. Indeed, disruption of ZO-1 and other tight junction proteins[26] after *S flexneri* attack could favour bacterial accessibility to the basolateral side of Caco-2 cells and enhance invasion of the monolayer. Besides this mechanism, EGCs have also been shown to increase expression of F-actin.[8] This increased expression of actin polymerisation induced by EGCs may prevent the

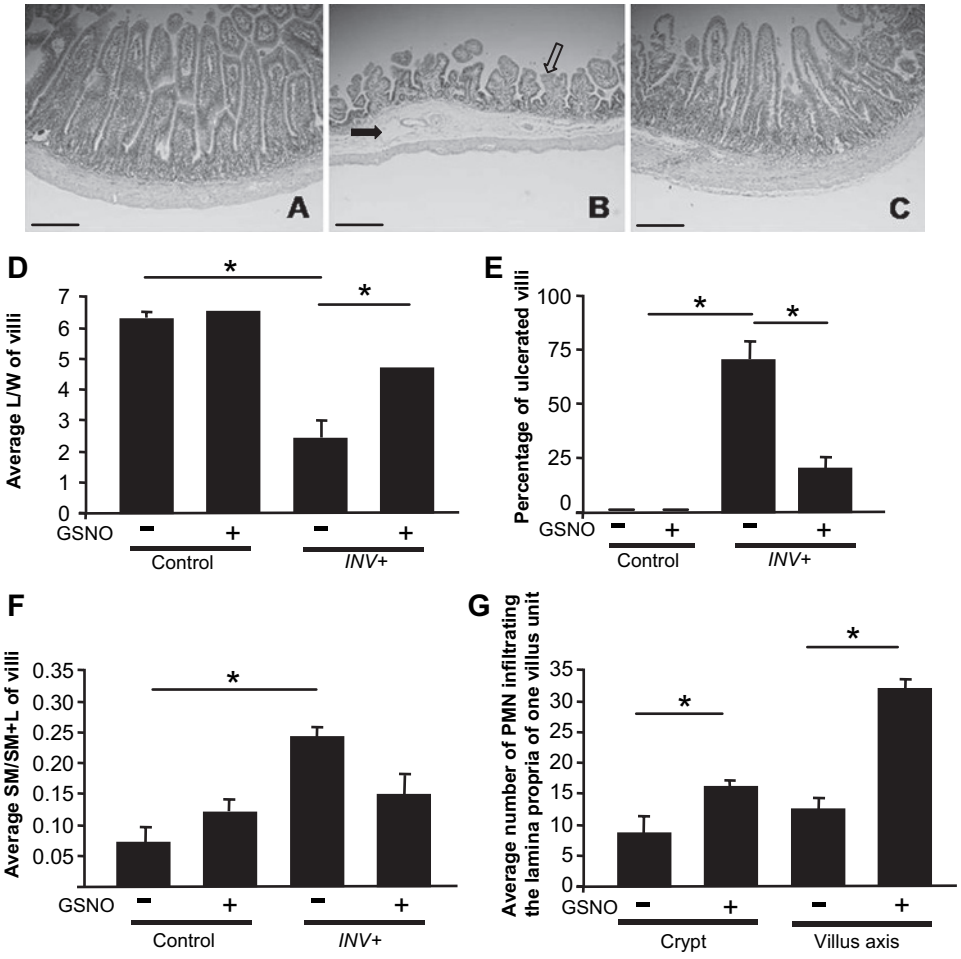


Figure 10 *S*-nitrosoglutathione (GSNO) prevents *S flexneri*-induced barrier lesions in ileal loops in vivo. (A) Normal intestinal mucosa architecture was observed in control loops. (B) Infected intestinal loops showed massive mucosal lesions characterised by oedema (filled arrow), villous atrophy and ulceration (empty arrow). (C) GSNO treatment prevented *S flexneri*-induced lesions. Scale bars: 50 μm. (D) *S flexneri* (INV+) induced a significant reduction in the villus length/width (L/W) ratio. In the presence of GSNO, the L/W ratio was increased compared with the infected non-treated loops (n=6 non-infected loops and 15 infected loops, three rabbits) (*p<0.05). (E) GSNO significantly reduced the percentage of ulcerated villi induced by *S flexneri* (n=6 non-infected loops and 15 infected loops, three rabbits) (*p<0.05). (F) *S flexneri* induced a significant increase in the ratio of submucosa/(submucosa +length of villi and crypt) (SM/SM+L) compared with the non-infected tissues. GSNO prevented the increase in SM/SM +L induced by *S flexneri* (n=6 non-infected loops and 15 infected loops, three rabbits) (*p<0.05). (G) In *S flexneri*-infected loops, GSNO induced a significant increase in polymorphonuclear leucocytes (PMN) in both the crypt and villus axis (n=15 infected loops, three rabbits, *p<0.05).

Downloaded from gut.bmj.com on June 22, 2011 - Published by group.bmj.com

recruitment of actin by *S flexneri* that is necessary for both its entry into and intracellular motility within IECs.[27]

Our data also suggest that EGCs may reduce IEB lesions via their anti-inflammatory effects, as inflammation has been shown to favour *S flexneri* invasion and spread across the IEB.[28] EGC-mediated inhibition of IL-8 secretion is probably not solely due to reduced monolayer infection. Indeed, for a given area of infected IEB, IL-8 concentration was reduced when IEB was cultured in the presence of EGCs compared with the control. Further reinforcing a direct anti-inflammatory effect of EGCs is the observation that, in non-infected explants of human colonic mucosa, EGC-CM significantly reduced IL-8 concentration compared with the control. Finally, we also demonstrated that the protective effects of EGCs were not associated with an effect on *S flexneri* survival, as (1) culturability of *S flexneri* incubated with EGC-CM (or GSNO) was not modified compared with non-treated bacteria and (2) GSNO tended to increase INV+ invasiveness.

A major finding of this study was the identification of GSNO as a glial-derived mediator involved in the protective effects of EGC. A recent study has identified GSNO as a soluble EGC-derived factor, which increased barrier resistance and reduced paracellular permeability.[8] Consistently, GSNO has been shown to prevent increased paracellular permeability of IEB induced by skin burn.[29] We here extend the role of GSNO to barrier protective effects during bacterial challenge. Indeed, GSNO promoted protection against IEB lesions induced by *S flexneri* in both human explants and an in vivo model of shigellosis. This effect was probably mainly due to its barrier reinforcing properties compared with its anti-inflammatory properties. Indeed, firstly, just pretreatment of Caco-2 with GSNO was sufficient to reduce *S flexneri*-induced IEB lesions. Secondly, in vivo, there was an increased number of PMNLs in the mucosa of GSNO-infected rabbits, suggesting that PMNL recruitment was not prevented by GSNO but that GSNO may have prevented leakage of PMNLs into the lumen through its maintenance of IEB integrity. Surprisingly, GSNO did not modify IL-8 secretion in *S flexneri*-infected human explants. This may be the result of a combined effect of GSNO (1) maintaining the integrity of IEB, the epithelial cells of which are a major source of IL-8,[30] and (2) exerting an anti-inflammatory effect.

GSNO effects are probably not mediated by glutathione alone as reduced glutathione did not prevent *S flexneri*-induced IEB lesions. Several studies have shown that GSNO effects may be mediated by its ability to act as an NO donor.[31] NO has been shown to have a protective effect on the IEB at low concentrations, but a damaging effect at higher ones.[32] Consistently, our data showed that, whereas at 50 μM GSNO had protective effects, at 100 μM it lost its protective effects. Surprisingly, GSNO was only protective when added to the basolateral side of the IEB. This suggests that the ability of GSNO to act as a simple NO donor is probably not involved in its effects, as NO is known to diffuse extremely easily through cell membranes.[33] However, GSNO has been shown to transnitrosylate redox-sensitive protein thiols.[31] Although currently speculative, transnitrosylation by GSNO of key proteins involved in *S flexneri*-mediated effects on IEB—for example, actin and small GTPase—may explain its protective effects. For instance, S-nitrosylation of actin has been shown to prevent its polymerisation in neutrophils[34] and could, if similar phenomena occur in IECs, interfere with *Shigella* entry. Indeed, GSNO-induced actin nitrosylation in IECs would inhibit the invasive process of *S flexneri* by interfering with its ability to recruit actin filaments. An anti-inflammatory effect of GSNO has been demonstrated in our study, which is consistent with data from the literature. Indeed, S-nitrosylated agents such as GSNO have been shown to inhibit synthesis of cytokines such as IL-1β,[35] IL-12p40 subunit,[36] IL-6, IL-8 and MAP[37] and to induce expression of the anti-inflammatory mediators, IRAK-M[38] and SOCS-1.[39] In addition, GSNO effects have been shown to be mediated via attenuation of NF-κB p50-p65 activity by S-nitrosylation of a conserved Cys residue at the NF-κB interface[40] or by S-nitrosylation of the inhibitory-κB (I-κB) kinase, which phosphorylates and promotes the degradation of the NF-κB inhibitory protein I-κB.[41]

Our study lays the basis for further extending the therapeutic potential of GSNO in the treatment of bacterial enteric infection. Beneficial roles for GSNO have been demonstrated in various diseases[41] affecting different organs such as brain,[42] heart[43] and lung.[44] However, to date, no study has demonstrated its potential in gastrointestinal disease except one by Savidge *et al*, showing restoration of colonic permeability in biopsy specimens from patients with Crohn's disease.[8]

In conclusion, our study further highlights a major protective function of EGCs on IEB during an infectious insult. In addition, it lays the scientific basis for the therapeutic use of GSNO to reduce barrier susceptibility to infectious or inflammatory challenge.

Acknowledgements We are grateful to Mr P Hulin and Mrs M Clément (Cellular Imaging Platform PiCell, IFR26, Nantes, France) for the confocal pictures.

Funding MF was supported by a master fellowship from Sanofi-Aventis and was the recipient of an IRMAD Astra-Zeneca grant. Part of this work was also supported by a grant from INCA 'Appel à projets libres 2007'. TS was supported by Eli Broad Foundation and National Institutes of Health (1R21DK078032). M R-D. is funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Competing interests None.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

1. **Hollander D.** Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. *Curr Gastroenterol Rep* 1999;**1**:410—16.
2. **Balfour Sartor R.** Bacteria in Crohn's disease: mechanisms of inflammation and therapeutic implications. *J Clin Gastroenterol* 2007;**41**(Suppl 1):S37—43.
3. **Arrieta MC,** Madsen K, Doyle J, *et al*. Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. *Gut* 2009;**58**:41—8.
4. **Neunlist M,** Toumi F, Oreschkova T, *et al*. Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;**285**:G1028—36.
5. **Conlin VS,** Wu X, Nguyen C, *et al*. Vasoactive intestinal peptide ameliorates intestinal barrier disruption associated with Citrobacter rodentium-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;**297**:G735—50.
6. **Hoff S,** Zeller F, von Weyhern CW, *et al*. Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J Comp Neurol* 2008;**509**:356—71.
7. **Neunlist M,** Aubert P, Bonnaud S, *et al*. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;**292**:G231—41.
8. **Savidge TC,** Newman P, Pothoulakis C, *et al*. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 2007;**132**:1344—58.
9. **Bush TG,** Savidge TC, Freeman TC, *et al*. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 1998;**93**:189—201.
10. **Cornet A,** Savidge TC, Cabarrocas J, *et al*. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells. A possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:13306—11.
11. **Aubé AC,** Cabarrocas J, Bauer J, *et al*. Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 2006;**55**:630—7.
12. **Sansonetti PJ.** Shigellosis: an old disease in new clothes? *PLoS Med* 2006;**3**:e354.
13. **Sansonetti PJ,** Tran Van Nhieu G, Egile C. Rupture of the intestinal epithelial barrier and mucosal invasion by *Shigella flexneri*. *Clin Infect Dis* 1999;**28**:466—75.
14. **Philpott DJ,** Yamaoka S, Israel A, *et al*. Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol* 2000;**165**:903—14.

Downloaded from gut.bmj.com on June 22, 2011 - Published by group.bmj.com

15. **Coron E,** Flamant M, Aubert P, *et al*. Characterisation of early mucosal and neuronal lesions following *Shigella flexneri* infection in human colon. *PLoS One* 2009;**4**:e4713.
16. **Phalipon A,** Mulard LA, Sansonetti PJ. Vaccination against shigellosis: is the path that is difficult or is it the difficult that is the path? *Microbes Infect* 2008;**10**:1057—62.
17. **Abdo H,** Derkinderen P, Gomes P, *et al*. Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J* 2010;**24**:1082—94.
18. **Inoue K,** Akaike T, Miyamoto Y, *et al*. Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism in vivo. *J Biol Chem* 1999;**274**:27069—75.
19. **Sansonetti PJ,** Arondel J, Cavaillon JM, *et al*. Role of interleukin-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis. *J Clin Invest* 1995;**96**:884—92.
20. **Ruhl A,** Trotter J, Stremmel W. Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglial cell lines from the myenteric plexus of adult rat. *Neurogastroenterol Motil* 2001;**13**:95—106.
21. **Livak KJ,** Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;**25**:402—8.
22. **Bulgin RR,** Arbeloa A, Chung JC, *et al*. EspT triggers formation of lamellipodia and membranes ruffles through activation of Rac-1 and Cdc42. *Cell Microbiol* 2009;**11**:217—29.
23. **Demali KA,** Jue AL, Burridge K. IpaA targets beta1 integrins and rho to promote actin cytoskeleton rearrangements necessary for Shigella entry. *J Biol Chem* 2006;**281**:39534—41.
24. **Mestres P,** Diener M, Rummel W. Electron microscopy of the mucosal plexus of the rat colon. *Acta Anat (Basel)* 1992;**143**:275—82.
25. **Shibata T,** Takeshima F, Chen F, *et al*. Cdc42 facilitates invasion but not the actin-based motility of Shigella. *Curr Biol* 2002;**12**:341—5.
26. **Sakaguchi T,** Kohler H, Gu X, *et al*. *Shigella flexneri* regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 2002;**4**:367—81.
27. **Tran Van Nhieu G,** Bourdet-Sicard R, Dumenil G, *et al*. Bacterial signals and cell responses during Shigella entry into epithelial cells. *Cell Microbiol* 2000;**2**:187—93.
28. **Sansonetti PJ,** Arondel J, Huerre M, *et al*. Interleukin-8 controls bacterial transepithelial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis. *Infect Immun* 1999;**67**:1471—80.
29. **Costantini TW,** Bansal V, Krzyzaniak MJ, *et al*. Vagal nerve stimulation protects against burn-induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. *Am J Physiol Gastrointestinal Liver Physiol* Published Online First: 2010 August 12. doi:10.1152/ajpgi.00156.2010.
30. **Branka JE,** Vallette G, Jarry A, *et al*. Early functional effects of Clostridium difficile toxin A on human colonocytes. *Gastroenterology* 1997;**112**:1887—94.
31. **Gaston BM,** Carver J, Doctor A, *et al*. S-nitrosylation signaling in cell biology. *Mol Interv* 2003;**3**:253—63.
32. **Natal C,** Modol T, Oses-Prieto JA, *et al*. Specific protein nitration in nitric oxide-induced apoptosis of human monocytes. *Apoptosis* 2008;**13**:1356—67.
33. **Arzumanian V,** Stankevicius E, Laukeviciene A, *et al*. [Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells] (In Lithuanian). *Medicina (Kaunas)* 2003;**39**:535—41.
34. **Thom SR,** Bhopale VM, Mancini DJ, *et al*. Actin S-nitrosylation inhibits neutrophil beta2 integrin function. *J Biol Chem* 2008;**283**:10822—34.
35. **Schroeder RA,** Cai C, Kuo PC. Endotoxin-mediated nitric oxide synthesis inhibits IL-1beta gene transcription in ANA-1 murine macrophages. *Am J Physiol* 1999;**277**:C523—30.
36. **Xiong H,** Zhu C, Li F, *et al*. Inhibition of interleukin-12 p40 transcription and NF-kappaB activation by nitric oxide in murine macrophages and dendritic cells. *J Biol Chem* 2004;**279**:10776—83.
37. **Into T,** Inomata M, Nakashima M, *et al*. Regulation of MyD88-dependent signaling events by S nitrosylation retards toll-like receptor signal transduction and initiation of acute-phase immune responses. *Mol Cell Biol* 2008;**28**:1338—47.
38. **del Fresno C,** Gomez-Garcia L, Caveda L, *et al*. Nitric oxide activates the expression of IRAK-M via the release of TNF-alpha in human monocytes. *Nitric Oxide* 2004;**10**:213—20.
39. **Gonzalez-Leon MC,** Soares-Schanoski A, del Fresno C, *et al*. Nitric oxide induces SOCS-1 expression in human monocytes in a TNF-alpha-dependent manner. *J Endotoxin Res* 2006;**12**:296—306.
40. **Marshall HE,** Stamler JS. Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. *Biochemistry* 2001;**40**:1688—93.
41. **Foster MW,** Hess DT, Stamler JS. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med* 2009;**15**:391—404.
42. **Prasad R,** Giri S, Nath N, *et al*. GSNO attenuates EAE disease by S-nitrosylation-mediated modulation of endothelial-monocyte interactions. *Glia* 2007;**55**:65—77.
43. **Rassaf T,** Poll LW, Brouzos P, *et al*. Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans. *Eur Heart J* 2006;**27**:1699—705.
44. **Snyder AH,** McPherson ME, Hunt JF, *et al*. Acute effects of aerosolized S-nitrosoglutathione in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;**165**:922—6.

BMJ open
accessible medical research

SUBMIT NOW

The BMJ Group is delighted to announce the launch of **BMJ Open**, a new and exciting open access online journal of medical research.

BMJ Open publishes the full range of research articles from protocols and phase I trials to meta analyses.

Accessible to everyone

- Fully open transparent peer review
- Open access means maximum exposure for all articles
- Article-level metrics showing use and impact
- Rate and comment on articles

For more details visit
bmjopen.bmj.com

BMJ Journals

Downloaded from gut.bmj.com on June 22, 2011 - Published by group.bmj.com

Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for *S*-nitrosoglutathione

Mathurin Flamant, Philippe Aubert, Malvyne Rolli-Derkinderen, et al.

Gut 2011 60: 473-484 originally published online December 7, 2010
doi: 10.1136/gut.2010.229237

Updated information and services can be found at:
http://gut.bmj.com/content/60/4/473.full.html

These include:

Data Supplement *"online appendix"*
http://gut.bmj.com/content/suppl/2011/04/13/gut.2010.229237.DC1.html

References This article cites 43 articles, 18 of which can be accessed free at:
http://gut.bmj.com/content/60/4/473.full.html#ref-list-1

Article cited in:
http://gut.bmj.com/content/60/4/473.full.html#related-urls

Email alerting service Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Notes

To request permissions go to:
http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions

To order reprints go to:
http://journals.bmj.com/cgi/reprintform

To subscribe to BMJ go to:
http://group.bmj.com/subscribe/

Annexe 3: Enteric glia promotes intestinal mucosal healing via activation of Focal Adhesion Kinase and release of proEGF.

Auteurs : Laurianne Van Landeghem[1,2,3], Julien Chevalier[1,2,3], Maxime M Mahé[1,2,3], Thilo Wedel[4], Petri Urvil[5], Pascal Derkinderen[1,2,3], Tor Savidge[5], Michel Neunlist[1,2,3]

[1]INSERM U913, Nantes, France

[2]Université de Nantes- Faculté de Médecine, Nantes, France

[3]CHU Nantes- Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France

[4]Institute of Anatomy, University of Kiel, Kiel; Germany

[5]University of Texas Medical Branch, Department of Gastroenterology & Hepatology, Galveston, USA

Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF

Laurianne Van Landeghem, Julien Chevalier, Maxime M. Mahé, Thilo Wedel, Petri Urvil, Pascal Derkinderen, Tor Savidge and Michel Neunlist

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 300:G976-G987, 2011. First published 24 February 2011; doi:10.1152/ajpgi.00427.2010

You might find this additional info useful...

Supplemental material for this article can be found at:
http://ajpgi.physiology.org/content/suppl/2011/03/05/ajpgi.00427.2010.DC1.html

This article cites 42 articles, 15 of which can be accessed free at:
http://ajpgi.physiology.org/content/300/6/G976.full.html#ref-list-1

Updated information and services including high resolution figures, can be found at:
http://ajpgi.physiology.org/content/300/6/G976.full.html

Additional material and information about ***AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology*** can be found at:
http://www.the-aps.org/publications/ajpgi

This infomation is current as of October 6, 2011.

AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology publishes original articles pertaining to all aspects of research involving normal or abnormal function of the gastrointestinal tract, hepatobiliary system, and pancreas. It is published 12 times a year (monthly) by the American Physiological Society, 9650 Rockville Pike, Bethesda MD 20814-3991. Copyright © 2011 by the American Physiological Society. ISSN: 0193-1857, ESSN: 1522-1547. Visit our website at http://www.the-aps.org/.

Downloaded from ajpgi.physiology.org on October 6, 2011

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 300: G976–G987, 2011.
First published February 24, 2011; doi:10.1152/ajpgi.00427.2010.

Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF

Laurianne Van Landeghem,[1,2,3] Julien Chevalier,[1,2,3] Maxime M. Mahé,[1,2,3] Thilo Wedel,[4] Petri Urvil,[5] Pascal Derkinderen,[1,2,3] Tor Savidge,[5] and Michel Neunlist[1,2,3]

[1]*INSERM U913, Nantes;* [2]*Université de Nantes-Faculté de Médecine, Nantes;* [3] *Nantes University Hospital-Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France;* [4]*Institute of Anatomy, University of Kiel, Kiel, Germany; and* [5]*University of Texas Medical Branch, Department of Gastroenterology and Hepatology, Galveston, Texas*

Submitted 23 September 2010; accepted in final form 23 February 2011

Van Landeghem L, Chevalier J, Mahé MM, Wedel T, Urvil P, Derkinderen P, Savidge T, Neunlist M. 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, 2011. First published February 24, 2011; doi:10.1152/ajpgi.00427.2010.—Wound healing of the gastrointestinal mucosa is essential for the maintenance of gut homeostasis and integrity. Enteric glial cells play a major role in regulating intestinal barrier function, but their role in mucosal barrier repair remains unknown. The impact of conditional ablation of enteric glia on dextran sodium sulfate (DSS)-induced mucosal damage and on healing of diclofenac-induced mucosal ulcerations was evaluated in vivo in GFAP-HSVtk transgenic mice. A mechanically induced model of intestinal wound healing was developed to study glial-induced epithelial restitution. Glial-epithelial signaling mechanisms were analyzed by using pharmacological inhibitors, neutralizing antibodies, and genetically engineered intestinal epithelial cells. Enteric glial cells were shown to be abundant in the gut mucosa, where they associate closely with intestinal epithelial cells as a distinct cell population from myofibroblasts. Conditional ablation of enteric glia worsened mucosal damage after DSS treatment and significantly delayed mucosal wound healing following diclofenac-induced small intestinal enteropathy in transgenic mice. Enteric glial cells enhanced epithelial restitution and cell spreading in vitro. These enhanced repair processes were reproduced by use of glial-conditioned media, and soluble proEGF was identified as a secreted glial mediator leading to consecutive activation of epidermal growth factor receptor and focal adhesion kinase signaling pathways in intestinal epithelial cells. Our study shows that enteric glia represent a functionally important cellular component of the intestinal epithelial barrier microenvironment and that the disruption of this cellular network attenuates the mucosal healing process.

enteric glial cells; FAK; enteric nervous system; epithelial restitution; intestinal epithelial barrier

CHRONIC OR ACUTE INTESTINAL inflammatory processes often lead to the destruction of the intestinal epithelial barrier (IEB) (38). Resolution of intestinal inflammation is dependent on repair processes that restore normal intestinal architecture. Chronic inflammatory diseases present failure in mucosal repair processes, leading, for instance, to chronic ulceration and to increased risk of associated colonic dysplasia. Furthermore, mucosal healing has been proposed recently as a treatment goal in inflammatory bowel diseases (12).

Address for reprint requests and other correspondence: M. Neunlist, INSERM U913, CHU Hôtel Dieu, 1, place Alexis Ricordeau, 44035 Nantes, France (e-mail: michel.neunlist@univ-nantes.fr).

Wound healing or mucosal healing is a cellular mechanism that preserves the structural and functional integrity of the IEB. Wound repair of the intestinal mucosa involves three processes including epithelial restitution, cell proliferation, and differentiation (30). Although these processes overlap in vivo (30), the most rapid cellular event following tissue injury is epithelial restitution, which restores mucosal continuity via cell migration and spreading on the underlying matrix (22).

Focal adhesion kinase (FAK) is a nonreceptor protein tyrosine kinase that regulates several different pathways controlling cell motility, proliferation, and survival. One mode of FAK regulation is its autophosphorylation on tyrosine 397 following integrin clustering. FAK phosphorylation on tyrosine 397 promotes Src binding, resulting in conformational activation of the FAK-Src signaling complex. The FAK-Src signaling complex then recruits or phosphorylates several regulatory proteins involved in cell adhesion, motility, growth, and survival (19).

The cellular microenvironment of the intestinal mucosa can influence epithelial restitution of the IEB. For instance, neutrophils or intestinal subepithelial myofibroblasts can promote wound repair (4, 24). Another major cellular component of the IEB microenvironment is the enteric nervous system (ENS). The ENS is composed of enteric neurons and glial cells (EGC) organized into an integrative neuronal network localized along the entire gastrointestinal (GI) tract. Although its role in the control of GI motility is well known, emerging data suggest that the ENS can also be a major regulator of IEB functions. In particular, enteric neurons can directly inhibit intestinal epithelial cell (IEC) proliferation via the release of vasoactive intestinal peptide (VIP) (33). Moreover, VIPergic neuronal pathways have been shown to reduce IEB paracellular permeability (21) and to protect the IEB from *Citrobacter rodentium* infection (9).

Besides neurons, special consideration has been recently given to EGC in the control of IEB functions. EGC, which outnumber enteric neurons by a factor of 4 to 10, share common markers and properties with astrocytes of the central nervous system (CNS) (26, 29), which are known to promote blood-brain barrier functions (1). In vivo ablation of EGC in transgenic (Tg) mice leads to dramatic IEB alterations (7, 10) associated with increased IEB permeability that precedes intestinal inflammation (3, 28). Furthermore, EGC inhibit IEC proliferation via the release of TGF-β1 (20) and decrease IEB permeability and mucosal inflammation via the secretion of *S*-nitrosoglutathione (GSNO) (28). Nevertheless, whether EGC also control epithelial restitution remains unknown.

0193-1857/11 Copyright © 2011 the American Physiological Society

Downloaded from ajpgi.physiology.org on October 6, 2011

In this study, we demonstrate that conditional ablation of EGC worsens mucosal damage after dextran sulfate sodium (DSS) treatment and delays mucosal healing following diclofenac-induced small intestinal enteropathy in GFAP-HSVtk mice. In vitro, we show using a noncontact coculture model system that EGC promote wound healing by increasing epithelial restitution and cell spreading following mechanical injury to IEC monolayers. This response is mediated, in part, by glial-secreted proEGF and activation of FAK-dependent pathways in IEC.

METHODS

Immunohistochemistry, Immunofluorescence, and Electron Microscopy in Human Mucosa

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

For whole mount immunohistochemistry, specimens were pinned flat on wax-based Petri dishes before fixation with PBS-buffered 4% paraformaldehyde (pH 7.4) at 4°C overnight. After treatment with PBS-0.05% thimerosal overnight and 0.1% $NaCNBH_3$ for 30 min, mucosal whole mounts were dissected under stereomicroscopic control. The tissue was preincubated with 10% normal goat serum diluted in PBS-0.5% Triton X-100 for 1 h followed by incubation for 48 h with polyclonal rabbit anti-S-100β (1:400, Dako). After extensive rinsings in PBS, whole mounts were incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:200; Jackson ImmunoResearch) for 2 h, rinsed in PBS, and incubated with the avidin-biotin complex (Vectastain ABC Elite kit, Vector) conjugated with horseradish peroxidase according to the instructions of the supplier. Peroxidase activity was detected with the chromogen 4-chloro-1-naphthol. Whole mounts were rinsed in PBS, placed on slides, covered with Aquatex (Merck), and examined with an Axiophot microscope.

For immunofluorescence studies, after fixation with PBS-buffered 4% paraformaldehyde (pH 7.4) at 4°C overnight, paraffin-embedded sections or dissected mucosal whole mounts were preincubated with 10% normal goat serum diluted in PBS-0.5% Triton X-100 for 30 min followed by incubation for 24 h with the following primary antibodies: polyclonal rabbit anti-S-100β (1:400, Dako), monoclonal mouse anti-smooth muscle-α actin (1:500, Dako). Alexa Fluor 488 (goat anti-rabbit, 1:250, Invitrogen) and Alexa Fluor 546 (goat anti-mouse, 1:250, Invitrogen) were used as secondary antibodies. 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Roche) was used as nuclear counterstaining agent. Sections and slide-mounted whole mounts were analyzed by a fluorescence microscope (Axiovert 200M, Zeiss) equipped with an adequate filter system.

For transmission electron microscopy, small mucosal samples (~5 mm border length) were fixed in 0.1 M cacodylate buffer containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde at pH 7.4 for 24 h. The specimens were postfixed in 1% OsO_4 and stained en bloc with 2% uranylacetate. After dehydration in graded alcohols, the specimens were embedded in Araldite. Semithin sections were stained with methylene blue and azure II to visualize the regions of interest. Ultrathin sections were cut and stained with lead citrate and examined with a transmission electron microscope (Phillips, EM 109) linked to a digital camera and imaging system (analySIS, Soft Imaging System, Munster, Germany).

Conditional Ablation of EGC in Tg Mice

Twelve-week-old GFAP-HSVtk Tg mice were used to conditionally ablate EGC as described previously (28). All procedures were performed with Institutional Animal Care and Use Committee approval and in accordance with the National Institutes of Health guidelines for use of live animals.

DSS Studies

GFAP-HSVtk T_g and nontransgenic (NTg) littermates received 5% DSS in the drinking water ad libitum for 7 days and tissues were collected on *day 8*. All animals received subcutaneously ganciclovir (GCV) (Hoffman-LaRoche, Nutley, NJ) at a rate of 100 $mg \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$ via miniosmotic pumps (Alzet, Durect, Cupertino, CA) during the 7 days of DSS treatment. The method used for mucosal damage quantification was as previously described (32), and the scoring was done blindly by two observers.

DCF-Induced Small Intestinal Enteropathy Studies

All animals received subcutaneously GCV at a rate of 100 $mg \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$ using miniosmotic pumps. On *day 6* of GCV treatment, GFAP-HSVtk and NTg littermates received an intraperitoneal injection of 60 mg/kg diclofenac sodium salt DCF (Sigma-Aldrich) as previously described (25), and small intestinal tissues were collected after 18 and 48 h. The method used for mucosal damage quantification was as previously described (25), and the scoring was done blindly by two observers.

Cell Cultures and Reagents

JUG2 cell line was obtained from ENS primary culture derived from rat embryonic intestine (8). After 13 days of culture, primary cultures were trypsinized and seeded in serum-containing media after differential centrifugation. Following 7 days of culture, isolated areas of morphological glial cells-like were trypsinized using cloning cylinder and seeded in culture flask in serum-containing media. After 1 mo, the cells were assessed for glial, neuronal, and myofibroblast markers by immunohistochemistry. They were immunoreactive for GFAP, Sox10, and S-100β, all glial markers, but not for Tuj-III, PGP9.5, neuronal markers, and α-smooth muscle actin, a myofibroblast marker. Purity of the JUG2 cell line was estimated of 96 ± 3% ($n = 3$) according to the ratio of number of Sox10-positive cells per number of DAPI-positive cells.

EGC lines and Caco-2 cells (ATCC) were cultured in DMEM (4.5 g/l glucose; Invitrogen) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated FBS (Abcys), 2 mM glutamine (Invitrogen), 50 IU/ml penicillin (Invitrogen), and 50 μg/ml streptomycin (Invitrogen). CCD18Co cells (normal human colon fibroblasts; ATCC) were cultured in MEM (Invitrogen) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM nonessential amino acid (Invitrogen), 50 IU/ml penicillin, and 50 μg/ml streptomycin.

EGC lines CRL2690 (ATCC) and JUG2 were seeded at 50,000 cells/ml and maintained in culture for 4 days at which time EGC-conditioned medium (CM) was prepared from EGC supernatants. For wound healing experiments, Caco-2 cells were seeded onto six-well Transwell filters (0.40 μm porosity, Corning) at 286,000 cells/ml and cultured for 15 days after reaching confluence. For cell spreading, Caco-2 cells were seeded onto 12-well filters at 140,000 cells/ml and processed for experiments 1 day after their seeding. Caco-2 cells were cocultured in the presence of EGC or CCD18Co myofibroblasts seeded on the bottom of 6- or 12-well plates or in the presence of either EGC-CM, PP2 (Calbiochem), GM6001 (Millipore), PD153035 (Calbiochem), EGFR blocking antibody (Calbiochem), EGF blocking antibody (R&D Systems), hEGF (Sigma), rEGF (R&D Systems), or hproEGF (R&D Systems).

Wound Healing Experiments

Caco-2 monolayers were wounded by using a tip attached to a 0.5- to 10-μl pipette. Each wound was photographed at 0 and 24 h by using a microscope (Axiovert 200M; Zeiss; objective lens: A-plan ×5/0.12) and the damaged surface area was quantified with DP-Soft software

Downloaded from ajpgi.physiology.org on October 6, 2011

(Olympus). Epithelial restitution was calculated as the percentage of remaining wounded zone area as follows: 100 − [100 × (initial wounded zone surface − final wounded zone surface)/initial wounded zone surface]. The monolayers were cultured with or without EGC, EGC-CM (in presence or absence of pharmacological agents), and CCD18Co 24 h prior to wounding and maintained an additional 24 h in culture. Transepithelial electrical resistance (TER) of monolayers was measured with an EVOM resistance meter (World Precision Instruments). Filter-grown cells were fixed and processed for immunocytochemistry to detect zonula occludens-1 (ZO-1), used here to determine the surface area of IEC located on the first five consecutive circumferential cell layers encompassing the wound. All measurements were performed in a blinded fashion.

Cell Spreading Experiments

After 24 h of coculture, IEC were fixed and processed for immunocytochemistry to detect ZO-1 as previously described (20). Monolayers were viewed with a fluorescence microscope (BX 51; Olympus) connected to a video camera (DP50, Olympus). Cell surface area was measured with DP-Soft software (Olympus). An average of 321 ± 13 IEC surface areas were analyzed for each experimental condition.

Plasmid Transfection

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

Lentiviral shRNA PTK2 Infection of Caco-2 Cells

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

Human Colonic Biopsy Specimens

Histologically normal mucosal biopsies were taken during colonoscopy for cancer screening from 16 healthy patients (aged 34–85 yr). Patients gave their informed consent to participate in the study, and all procedures were performed with institutional approval.

Real-Time Quantitative PCR Studies

Extraction of total RNA was performed with RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol, and 1 μg of purified total RNA was processed for reverse transcription using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. FAK mRNA expression study in Caco-2 cells after 24 h of culture in presence of EGC or EGC-CM was carried out on a Rotor-Gene thermocycler (Ozyme). PCR amplifications were performed by use of Platinum *Taq* polymerase kit (Invitrogen) combined with the use of SYBR green (Sigma). FAK mRNA expression study in ileojejunal fragments of Tg mice was achieved by using a MyiQ thermocycler (Bio-Rad). PCR amplifications were performed by use of the ABsolute Blue SYBR green fluorescein kit (ABgene).

Western Blot Studies

Caco-2 cells, cultured for 24 h with or without EGC, or EGC were lysed either with RIPA (Millipore) completed with proteases inhibitor tablets (Complete, Roche) or processed for Triton X fractionation. For Triton X fractionation, cells were lysed with Triton lysis buffer (1% Triton X-100, 0.3 M sucrose, 25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgCl_2$) containing proteases inhibitor (Complete, Roche), serine/threonine phosphatases inhibitors (Sigma) and 2 mM $NaVO_4$. After agitation, insoluble material was removed by centrifugation and supernatant was defined as the Triton X-soluble fraction. The pellet was extracted with a SDS lysis buffer (20 mM Tris·HCl, 2.5 mM EDTA, 1% SDS, 0.5 μg/ml DNase I) completed with protease/phosphatase inhibitors and $NaVO_4$. Triton X-insoluble fraction was obtained after agitation and removal of insoluble material by centrifugation. Samples were processed for electrophoresis using NuPAGE MES SDS buffer kit (Invitrogen) and separated on 4–12% Bis-Tris gels (NuPAGE, Invitrogen). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes. After blocking, blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBS with 5% nonfat dry milk for FAK (clone 4.47, 1:1,000, Upstate), FAKc20 (1:200, Santa Cruz), cyclophilin-A (1:5,000, Abcys), RPS6 (1:1,000; Bethyl), and rEGF (16 μg/ml, R&D Systems) or in TBS with 4% BSA and 0.1% Tween20 for FAK phosphospecific antibody (phosphorylated Y397-FAK) (1:1,000; Biosource). Immunoblots were probed with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) and visualized by chemiluminescence (ECL Plus, Amersham). Quantitative analysis was performed by measuring band densities with ImageJ.

Time-Lapse Videos

Time-lapse videos were taken by using a microscope (Leica DMI6000; Leica Microsystems) at 37°C with 5% CO_2 in the culture medium described above. Images were taken with a camera (Coolsnap HQ2; Photometrics) and Metamorph software (Molecular Devices). The images stacks were compiled by use of Metamorph.

Statistics

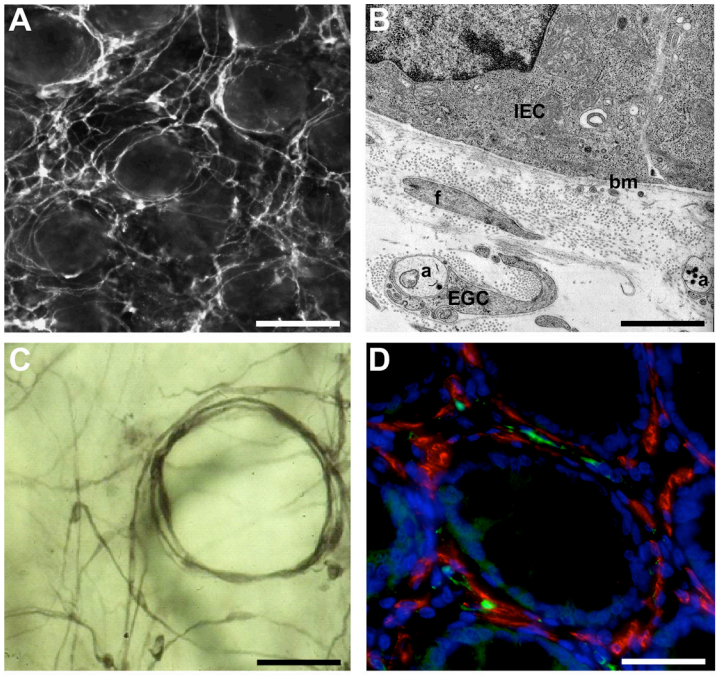
Data were expressed as means ± SE. Paired or unpaired *t*-test, Mann-Whitney test, or two-way ANOVA was performed to compare different groups. Pearson's correlation coefficient was measured to test for interdependence between variables. Differences were considered as significant for a P value of less than 0.05.

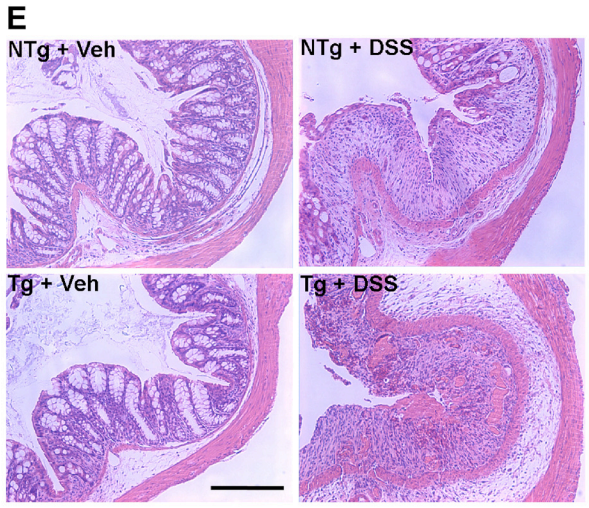
RESULTS

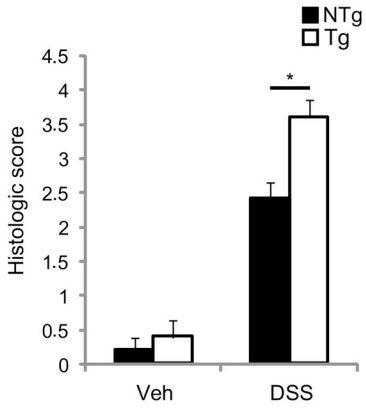
Enteric Glial Cells Are a Major Cellular Constituent of the Intestinal Epithelial Barrier Microenvironment

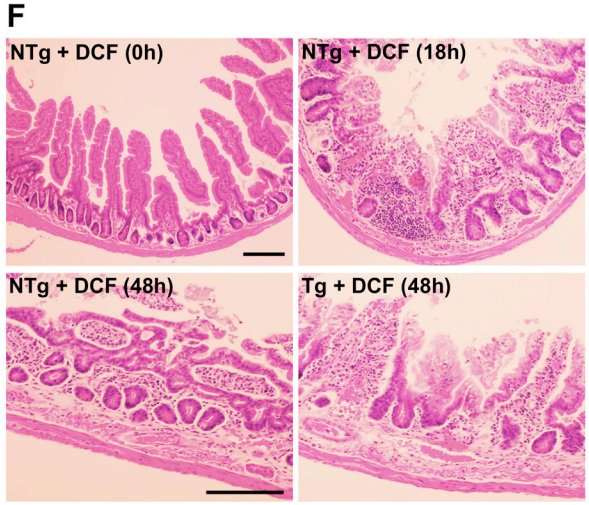
Immunohistochemical staining for glial S-100β-immunoreactivity in healthy human colonic mucosa revealed a dense network of EGC in close proximity to epithelial cells of the colonic crypts (Fig. 1, *A* and *C*) and extended all the way up to the surface mucosa. This observation was consistent with the presence of GFAP-positive EGC and their processes throughout the lamina propria, tightly surrounding intestinal crypts previously described in Ref. 7. The positioning of these EGC was reminiscent of pericryptal myofibroblasts. However, S-100β-immu-

Downloaded from ajpgi.physiology.org on October 6, 2011









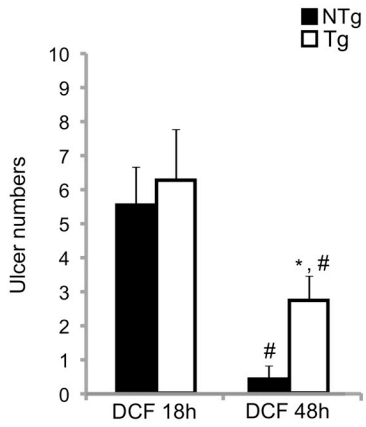


Fig. 1. Enteric glial cells (EGC) are a major cellular component of the intestinal epithelial barrier (IEB) microenvironment. *A*: S-100β-immunoreactive EGC form a dense cellular network surrounding the intestinal crypts (human colonic mucosa; ×100; scale bar 100 μm). *B*: electron microscopy highlights the close proximity (≅ 1 μm) between EGC ensheathing axons (a) and intestinal epithelial cells (IEC), the basal membrane (bm), as well as myofibroblasts (f) (human colonic mucosa; ×20,000; scale bar 1 μm). *C*: S-100β-immunoreactive EGC are also present in the periglandular region of the human colonic crypts (×200; scale bar 50 μm). *D*: immunofluorescence labeling of human colonic mucosa using antibodies directed against S-100β (green) and α-smooth muscle actin (red) shows an absence of colocalization of these two markers. Nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue) (×200; scale bar 50 μm). *E*, *left*: colonic mucosal damage induced by 7 days of dextran sulfate sodium (DSS) treatment was increased in transgenic (Tg) mice compared with their nontransgenic (NTg) littermates (hematoxylin and eosin-stained colonic specimens; scale bar 200 μm; Veh, vehicle). *Right*: histological scoring confirms the increase in the severity of the DSS-induced colitis in Tg mice (open bars) compared with NTg mice (solid bars) ($n = 5$; $P = 0.032$; Mann-Whitney rank sum test). *F*, *left*: histopathological characterization of the effects of EGC ablation on diclofenac sodium salt (DCF)-induced ulceration. Mucosal damage in the 3rd quartile of the small intestine in Tg was similar compared with their NTg littermates 18 h after DCF treatment. In contrast, 48 h after DCF treatment, mucosal damage was significantly lower in NTg mice compared with their Tg littermates (scale bars: 200 μm). *Right*: whole-mount scoring of ulcer numbers in the 3rd quartile was significantly lower in NTg (solid bars) compared with Tg (open bars) 48 h after DCF treatment ($n = 4–8$; 2-way ANOVA; $^*P < 0.05$ compared with Tg 48 h; $\#P < 0.05$ compared with their respective control at 18 h).

Downloaded from ajpgi.physiology.org on October 6, 2011

noreactive EGC did not coexpress α-smooth muscle actin, which labeled pericryptal myofibroblasts (Fig. 1*D*). Ultrastructural analysis confirmed the presence of EGC processes within close proximity of the intestinal epithelial basement membrane (Fig. 1*B*).

Conditional Ablation of Enteric Glia Worsens Mucosal Damage and Impairs Healing in Two In Vivo Models of Mucosal Injury

To characterize in vivo the role of EGC in intestinal mucosal healing, we used two distinct models of mucosal injury, i.e., DSS-induced mucosal damage and DCF-induced enteropathy.

EGC deletion increases the severity of DSS-induced mucosal lesions. DSS was administered orally to GFAP-HSVtk Tg mice, which were simultaneously treated with GCV as previously described in Refs. 7 and 28. GCV treatment led to the ablation of GFAP-positive EGC, in particular, those tightly surrounding intestinal crypts as shown in (7). Seven days of GCV treatment in Tg mice receiving vehicle control was not associated with any mucosal or inflammatory lesions of the colon (Fig. 1*E*). However, coadministration of DSS to Tg animals resulted in significantly larger areas of mucosal damage and inflammatory infiltrates compared with NTg mice receiving DSS and GCV (Fig. 1*E*). Mucosal damage was characterized by areas of epithelial ulceration and crypt damage with infiltrating polymorphonucleocytes and the highest histological damage score was recorded following EGC ablation (3.6 ± 0.25 vs. 2.4 ± 0.25, for Tg and NTg mice receiving DSS and GCV, respectively; $n = 5$; $P = 0.032$) (Fig. 1*E*).

Loss of EGC delays the healing of DCF-induced mucosal lesions. DCF was administered to induce NSAID enteropathy in NTg mice and in GFAP-HSVtk Tg littermates in which EGC were simultaneously ablated by GCV (7, 28). Control NTg mice also received subcutaneous GCV. As has been previously described (25), severe DCF-induced small intestinal enteropathy was evident in the small intestine of mice after 18 h of drug administration (Fig. 1*F*). No significant differences were evident in the total number or in the distribution of small intestinal lesions detected in Tg vs. NTg mice receiving DCF at 18 h. Moreover, pathology was most prominent in the jejunum-ileum (3rd quartile), which is also the region where EGC are most significantly ablated by GCV (7). No pathology was evident in NTg or Tg mice receiving GCV only. In DCF-treated NTg mice, the enteropathy had largely resolved within 48 h (Fig. 1*F*), as previously described (25). In contrast, in Tg animals, a significant enteropathy was still apparent after this time, indicating that mucosal healing in response to DCF was compromised following EGC ablation (Fig. 1*F*).

Enteric Glia Promote Epithelial Restitution by Increasing Intestinal Epithelial Cell Spreading

To study the direct effects of EGC on intestinal epithelial wound healing, we next used a coculture model of EGC and IEC.

EGC increase intestinal epithelial wound healing in vitro. At 24 h following mechanically induced injury, wounded areas were significantly reduced when the IEC monolayers were cultured with EGC compared with controls (IEC monolayers cultured alone) (19.2 ± 1.1 vs. 31.7 ± 1.8%, respectively; $n = 7$; $P = 0.003$) (Fig. 2, *A* and *B* and Supplemental Video S1; the online version of this article contains supplemental data). In addition, the increase in TER was significantly greater when IEC were cultured with EGC compared with controls (257.6 ± 41.3 vs. 100.0 ± 20.3%, respectively; $n = 7$; $P = 0.007$) (Fig. 2*C*). Similar results were obtained with another nontransformed EGC line (JUG2) (Fig. 2, *B* and *C*) and with another IEC line (T84) (unpublished data). Moreover, the EGC-induced increase in epithelial restitution and resistance recovery were reproduced by EGC-CM (Fig. 2, *B* and *C*). These results indicate that EGC enhance epithelial wound repair via the secretion of one or more soluble factors. To validate our experimental restitution model, we also demonstrated a similar increase in epithelial restitution in IEC monolayers cocultured with the human colonic fibroblast cell line, CCD18Co (Fig. 2*B*).

EGC promote epithelial restitution by increasing IEC spreading. We next sought to determine whether EGC effects on epithelial restitution were associated with an increase in IEC spreading. Under control conditions, a significant increase in IEC spreading was recorded in the first three circumferential cell layers surrounding the wounded zone compared with the fifth cell layer (Fig. 3*A*). EGC significantly increased IEC surface areas of the first three circumferential cell layers compared with controls (Fig. 3*A*). Similarly, EGC-CM induced a significant increase in IEC surface areas of the first two circumferential cell layers compared with controls (Fig. 3*A*). By contrast, CCD18Co induced a significant increase in IEC surface areas of the first circumferential cell layer only (Fig. 3*A*).

To confirm that EGC promoted IEC spreading, EGC effects on IEC spreading were studied by using Caco-2 cells seeded at low density. After 24 h of incubation, EGC significantly increased Caco-2 cell spreading compared with controls (220.9 ± 9.2 vs. 100.0 ± 2.2%, respectively; $n = 4$; $P \leq 0.001$) (Fig. 3, *B* and *C* and Supplemental Video S2). This result was also reproduced by primary JUG2 EGC and by EGC-CM (Fig. 3*C*). By contrast, when IEC were cocultured with CCD18Co, no increase in cell spreading was observed (Fig. 3*C*).

Enteric Glia Promote Epithelial Wound Healing Via Activation of FAK-Dependent Signaling Pathways

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

EGC promote epithelial wound repair by increasing FAK activity in IEC. Firstly, we demonstrated that EGC induced a significant increase in Y397-FAK phosphorylation in Triton X-soluble and -insoluble IEC lysate fractions (Fig. 4*A*). We then tested the effects of FAK inhibition on both EGC-induced epithelial restitution and IEC spreading using PP2, a pharmacological inhibitor of Src-mediated activation of FAK. When combined with EGC-CM, PP2 inhibited EGC-CM effects on epithelial restitution compared with controls (31.6 ± 16.1 vs. 100.0 ± 11.4%, respectively; $n = 6$; $P = 0.006$). The effects of EGC-CM on IEC spreading were also significantly inhibited by PP2 (Fig. 4*B*). To confirm these findings, we transfected Caco-2 cells with a dominant-negative construct of FAK, FRNK, fused to GFP. Compared with mock-transfected controls, EGC-induced cell spreading was significantly reduced in

Downloaded from ajpgi.physiology.org on October 6, 2011

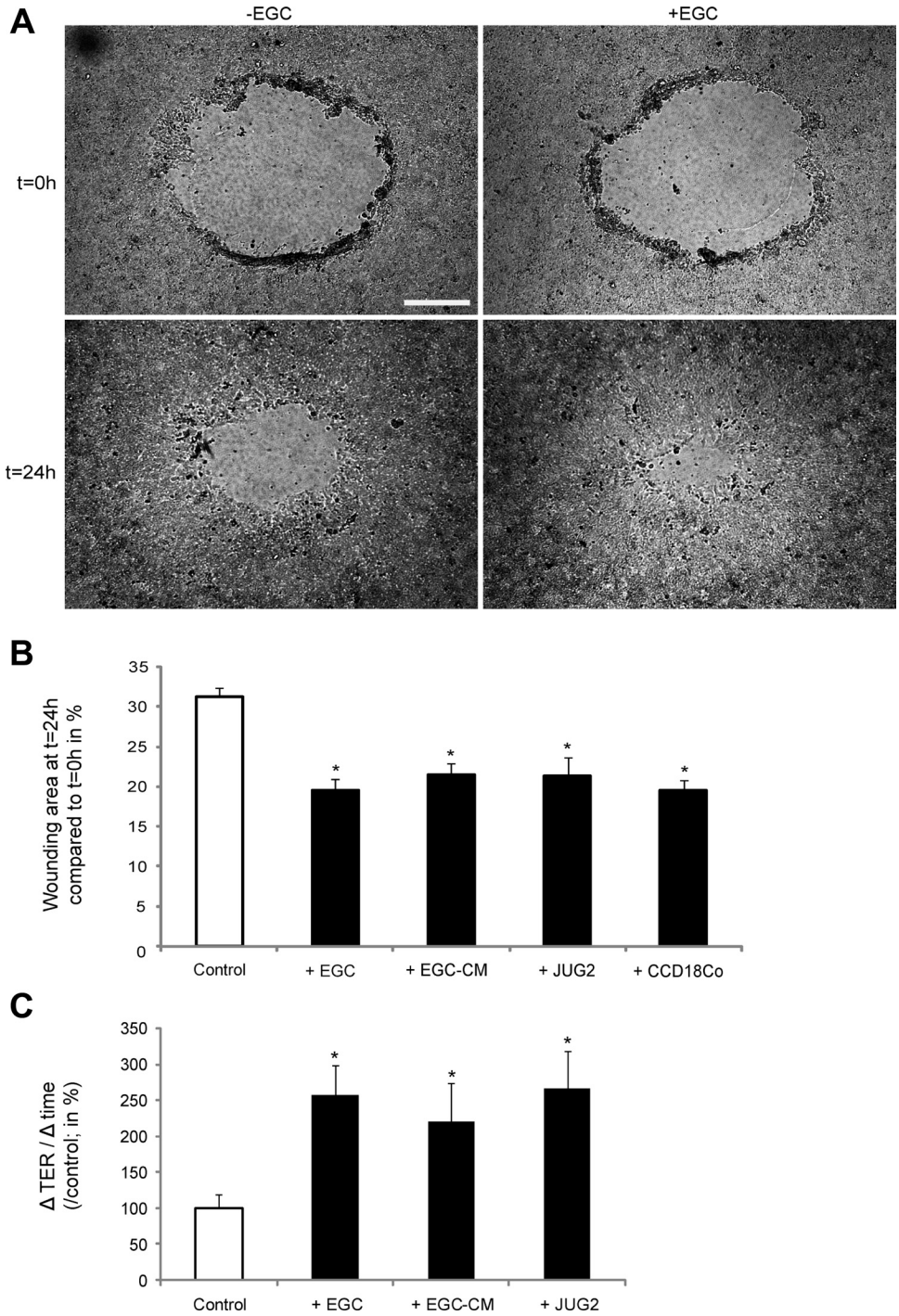


Fig. 2. EGC promote intestinal epithelial wound healing. *A*: wound surface areas of IEC monolayers were significantly reduced after coculture with EGC compared with controls (scale bar 200 μm). *B*: EGC or EGC-conditioned medium (EGC-CM) significantly reduced wounded surface areas compared with controls ($n = 10$; $P < 0.001$; *t*-test and $n = 11$; $P = 0.002$; paired *t*-test, respectively). A nontransformed EGC line (JUG2) also increased epithelial restitution ($n = 3$; $P < 0.05$; *t*-test) as well as the human colonic fibroblast cell line CCD18Co ($n = 6$; $P < 0.001$; *t*-test). *C*: EGC and EGC-CM as well as JUG2 induced a significant increase in transepithelial electrical resistance (TER) recovery. Data are presented as a percentage after normalization to controls ($n = 7$; $P = 0.003$; *t*-test, $n = 6$; $P = 0.014$; paired *t*-test and $n = 3$; $P < 0.05$; *t*-test, respectively). *Significantly different.

FRNK/GFP-positive cells (64.1 ± 7.5 vs. 94.2 ± 9.2%, respectively; $n = 5$; $P = 0.035$) (Fig. 4*C*).

EGC Control Epithelial Restitution via the Regulation of FAK Expression

EGC increase IEC spreading by increasing FAK expression in vitro. We next aimed at determining whether EGC-mediated wound healing was associated with regulated FAK expression. Firstly, EGC significantly increased FAK protein levels in Triton X-soluble and -insoluble IEC lysate fractions compared with controls (Fig. 5*A*). This increase in FAK protein levels was most likely due to elevated FAK mRNA expression as a result of EGC coculture or EGC-CM (Fig. 5*B*). Next, the involvement of FAK in the EGC effects on IEC spreading was evaluated in Caco-2 cells transfected with FAK shRNA lentiviral constructs. Silencing of FAK expression markedly reduced EGC-CM-mediated induction of IEC spreading compared with nonspecific target shRNA transfected controls (74.0 ± 4.5 vs. 94.7 ± 4.8%, respectively; $n = 4$; $P = 0.013$) (Fig. 5*C*).

EGC control FAK expression in vivo. To further validate the EGC-mediated control of FAK expression, we studied FAK

Downloaded from ajpgi.physiology.org on October 6, 2011

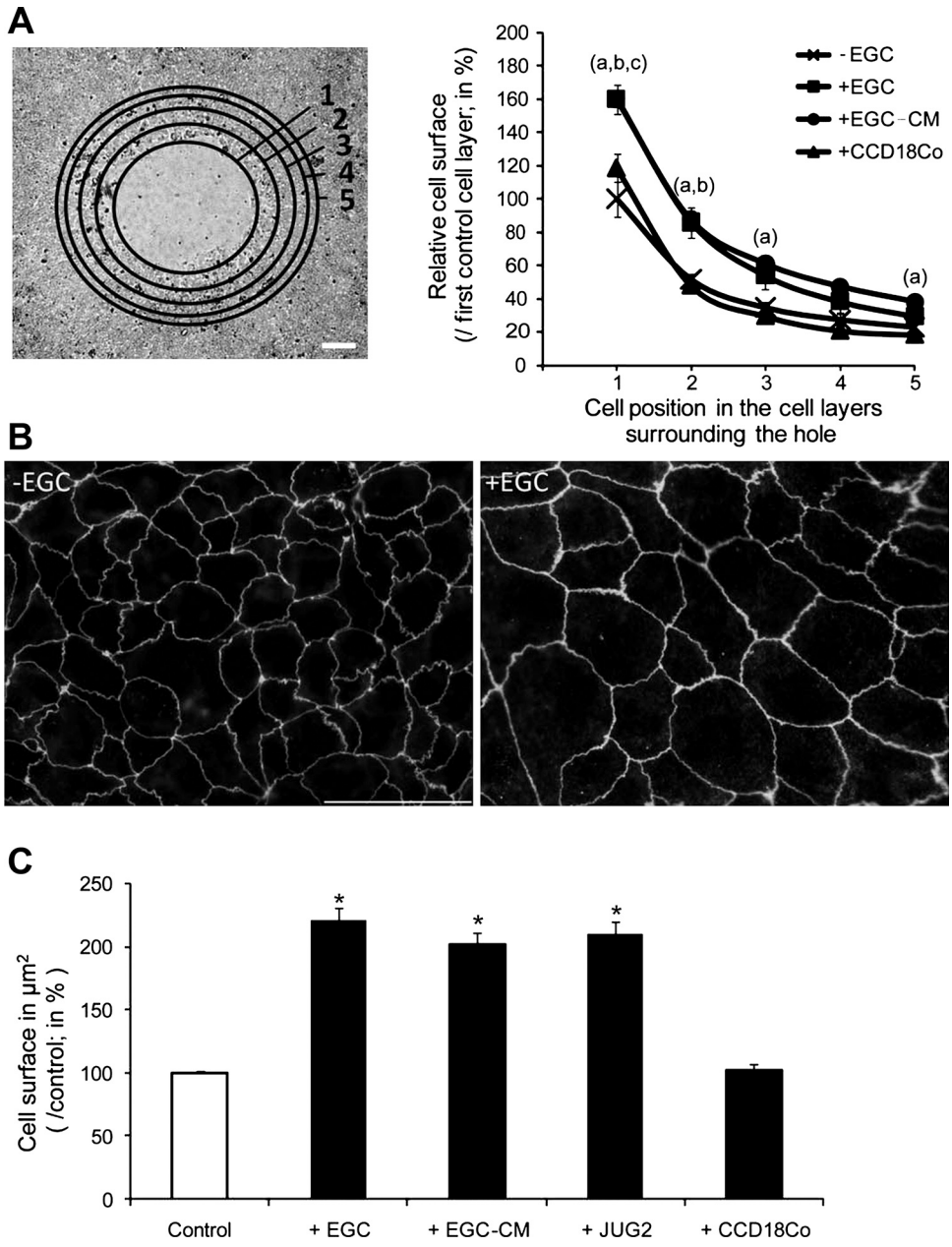


Fig. 3. EGC increase IEC spreading. *A*, *left*: the cell surface areas of the first 5 circumferential cell layers surrounding the wounded areas were evaluated following staining for zonula occludens-1 (ZO-1) (scale bar 200 μm). *Right*: EGC and EGC-CM induced a significant increase in IEC spreading in the first 3 and 2 cell layers respectively compared with controls (a and b, respectively; $n = 6$; $P < 0.05$; *t*-test). By contrast, CCD18Co induced a significant increase in IEC spreading only in the first cell layer compared with controls (c; $n = 3$; $P < 0.05$; *t*-test). *B*: photomicrograph of Caco-2 cells stained with ZO-1 antibody revealed a significant increase in cell surface area induced by EGC (+EGC) compared with controls (−EGC) (scale bar 50 μm). *C*: quantitative analysis of IEC surface areas showed a significant increase in cell surface area induced by EGC and EGC-CM compared with controls ($n = 4$; $P < 0.001$; *t*-test and $n = 3$; $P = 0.009$; paired *t*-test, respectively). The nontransformed EGC line JUG2 induced a significant increase in IEC cell surface area ($n = 4$; $P < 0.05$; *t*-test). The human colonic fibroblast cell line CCD18Co had no effect on IEC spreading. *Significantly different.

mRNA expression in intestinal segments following EGC-ablation in GFAP-HSVtk Tg mice. A significant decrease in FAK mRNA abundance was evident in Tg mice receiving GCV compared with their NTg littermates [70.9 ± 5.0 ($n = 7$) vs. 100.0 ± 10.6% ($n = 5$), respectively; $P = 0.021$] (Fig. 5*D*). Moreover, a significant positive correlation between S-100β and FAK mRNA abundance was evident in human colonic biopsies (Fig. 5*E*).

Enteric Glia Promote Wound Healing via Secretion of proEGF and Activation of EGFR-Dependent Pathways in IEC

Blocking of EGFR activation inhibits EGC-CM effects on epithelial restitution. To examine whether EGFR activation is involved in IEC response to EGC, we added an EGFR blocking antibody to EGC-CM. Neutralizing EGFR antibody significantly inhibited the EGC-CM-mediated effects on epithelial restitution (Fig. 6*A*). Similar results were obtained when adding an inhibitor of the EGFR tyrosine kinase activity (PD153035) to EGC-CM (Fig. 6*A*). Addition of the EGFR blocking antibody to EGC-CM also led to an inhibition of the EGC-CM-induced increase of IEC spreading (Fig. 6*B*). Furthermore, the addition of an EGF blocking antibody to EGC-CM led to inhibition of EGC-CM effects on IEC spreading (Fig. 7*A*). Interestingly, the addition of an inhibitor of metallo-matrix proteinases (MMPs) (GM6001) to EGC-CM significantly inhibited EGC-CM-induced cell spreading (Fig. 7*A*), suggesting the presence of EGF precursor forms in EGC-CM. Consistent with this observation, treatment of IEC with proEGF led to a significant increase in epithelial restitution and IEC spreading (Fig. 7, *B* and *C*). This proEGF-mediated induction of IEC spreading was significantly reduced by GM6001 (33.1 ± 1.8%; $n = 4$; $P < 0.001$). Human

Downloaded from ajpgi.physiology.org on October 6, 2011

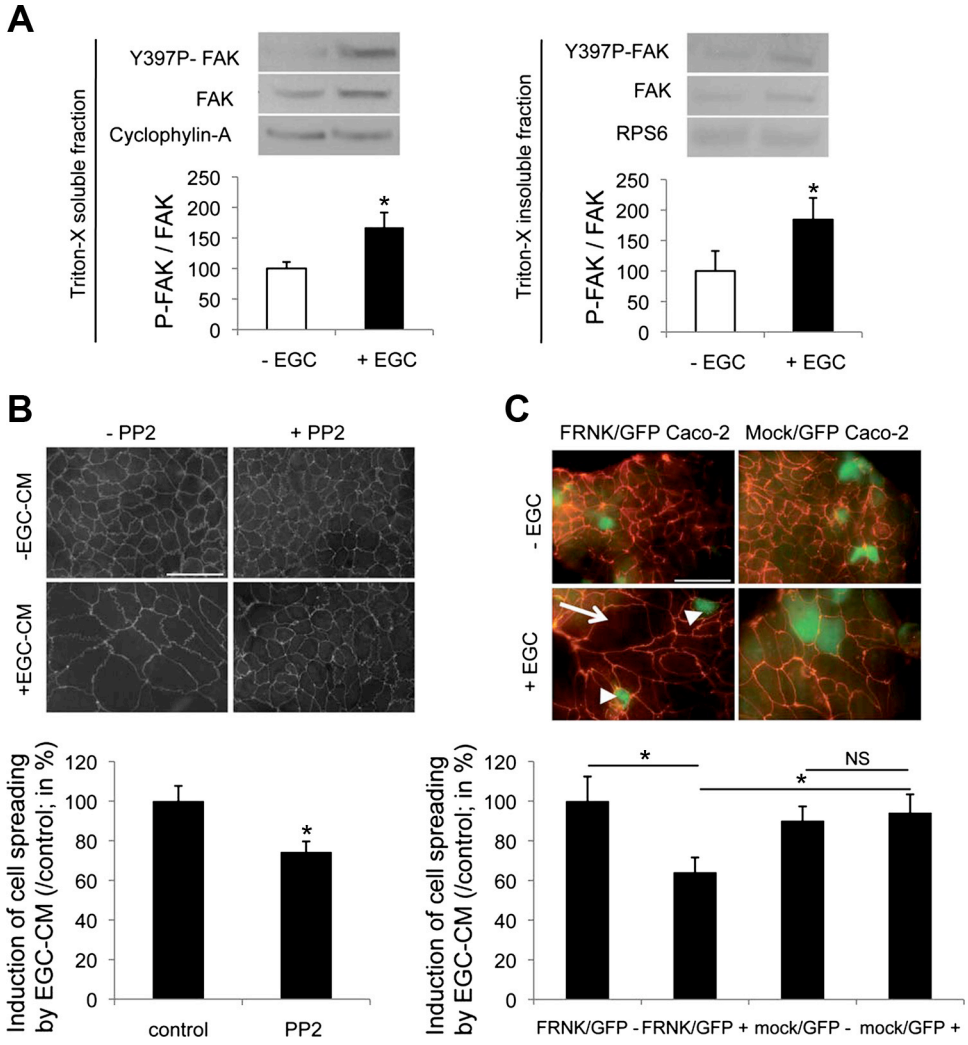


Fig. 4. EGC increase epithelial restitution via induction of FAK-dependent pathways. *A*: EGC induced a significant increase in FAK autophosphorylation (*Y397P-FAK*) in Triton X-soluble (*left*) and Triton X-insoluble (*right*) fractions of IEC compared with IEC cultured alone ($n = 4$; $P < 0.05$, Mann-Whitney test). *B*: in the presence of PP2, the effects of EGC-CM on cell spreading were significantly reduced ($n = 4$; $P = 0.008$; paired *t*-test). *C*: transfection of IEC with FRNK-GFP (FRNK/GFP Caco-2) inhibited EGC effects on IEC spreading, whereas IEC transfection with mock-GFP plasmid (mock/GFP Caco-2) had no effect. Induction of IEC spreading by EGC (arrow) was significantly reduced in FRNK-GFP-transfected cells (arrowheads) compared with mock-GFP-positive cells ($n = 5$; $P = 0.007$; *t*-test; scale bar 50 μm). *Significantly different; NS, not significant.

and rat EGF also induced a significant increase in epithelial restitution (Fig. 7*B*), as well as a significant increase in IEC spreading (Fig. 7*C*).

Enteric glial cells secrete proEGF. Finally, we investigated the source of EGFR activation in EGC-CM by testing whether proEGF was synthesized and secreted by EGC. EGF mRNA was expressed in EGC (Fig. 7*D*), and proEGF, but not the 6-kDa form of EGF, was detected in EGC-CM by immunoblotting (Fig. 7*E*).

DISCUSSION

The present study reports major findings concerning the role of EGC in the control of IEB functions. In vivo, conditional ablation of the EGC population in adult Tg mice led to increased mucosal damage after DSS treatment and impaired mucosal healing following DCF-induced small intestinal enteropathy, indicating that EGC play an active protective role toward IEB under pathological conditions. This barrier protecting role was also demonstrated in vitro where EGC promoted epithelial repair in response to injury by increasing IEC spreading. EGC-induced epithelial wound healing involved the regulation of FAK expression and activity in IEC. Furthermore, proEGF was identified as a major soluble glial mediator responsible for the EGC-induced increase of epithelial wound repair.

This study further strengthens the concept that the IEB is regulated by its immediate cellular neighbors, which include myofibroblasts, immune and neuroglial cells, and the microbiota. Here we demonstrate that EGC is a novel and pivotal cellular regulator of the IEB in response to mucosal injury. The DSS-injury studies show that specific EGC dysfunction exacerbates colitis-induced mucosal damage, highlighting two putative roles for EGC in the maintenance of the IEB homeostasis: a protective (anti-inflammatory) role and a repair process-inducing role. The inflammatory response that is evident in this model is clearly associated with the enhanced DSS-induced injury as no inflammation is manifest in Tg animals receiving vehicle control alone for a similar duration. This is in agreement with an earlier study where conditional ablation of EGC preceded inflammation that was only evident after 9 days of GCV treatment (28). Recent findings demonstrate that EGC can exert protective effects on IEB functions in inflammatory conditions via the release of mediators such as GSNO (28, 35). To further validate our hypothesis that EGC also favor IEB functions by promoting mucosal healing, we used a short-term mucosal injury model using DCF to induce focal injuries in the

Downloaded from ajpgi.physiology.org on October 6, 2011

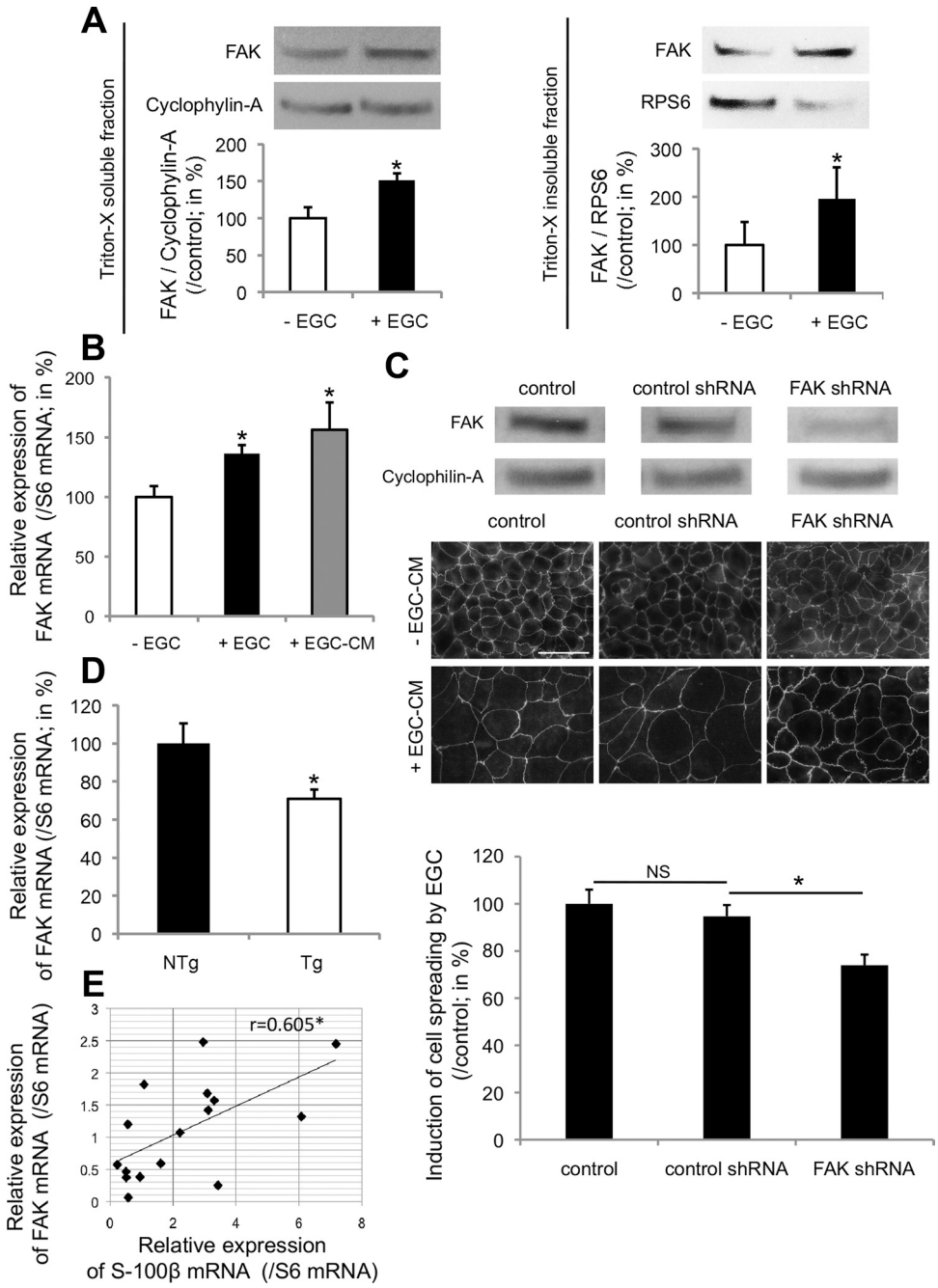


Fig. 5. EGC promote epithelial restitution via the regulation of FAK expression. *A*: EGC induced a significant increase in FAK expression in Triton X-soluble (*left*) and Triton X-insoluble (*right*) fractions of IEC compared with controls ($n = 4$; $P < 0.05$, Mann-Whitney test). *B*: real-time quantitative PCR analysis reported a significant increase in FAK mRNA expression in IEC cultured with EGC or EGC-CM ($n = 5$; $P = 0.006$, *t*-test and $n = 5$; $P = 0.008$, paired *t*-test, respectively). *C*, *top*: transfection of IEC with FAK short hairpin RNA (shRNA) significantly decreased FAK protein expression compared with IEC transfected with nonspecific target control shRNA or noninfected IEC (control). *Middle* and *bottom*: transfection of IEC with FAK shRNA significantly inhibited EGC-CM effects on IEC spreading compared with control shRNA ($n = 4$; $P = 0.013$; paired *t*-test; scale bar 50 μm). *D*: real-time quantitative PCR analysis showed that in vivo ablation of EGC reduced the expression of FAK mRNA expression in intestinal fragments from Tg mice (Tg) compared with controls (NTg) ($n = 7$; $P = 0.021$; *t*-test). *E*: real-time quantitative PCR analysis of human colonic mucosal biopsies revealed a significant positive correlation between FAK and S-100β mRNA expression ($n = 16$; Pearson's correlation coefficient: 0.605; $P = 0.013$). *Significantly different.

small intestinal mucosa followed by rapid healing, involving cell restitution. The DCF-enteropathy studies demonstrated that EGC dysfunction significantly delayed mucosal healing, further strengthening the repair-promoting role of EGC in the maintenance of IEB homeostasis. The time course of DCF-induced enteropathy and the subsequent wound healing observed in our model were similar to a previous report (25). Moreover, disease induction was not adversely affected in Tg mice receiving GCV since the number of DCF-induced ulcers was identical at 18 h compared with control littermates. However, the number of ulcers recorded at 48 h was significantly higher in Tg mice, strongly indicating that EGC ablation is associated with aberrant mucosal repair. Furthermore, given that IL-1β mRNA levels were identical at 48 h in the two conditions (data not shown), changes in wound healing are probably not due to differences in inflammatory response between Tg and NTg mice. This is also consistent with an absence of inflammation observed in Tg mice after 8 days of GCV treatment (28). Finally, it is highly unlikely that the delayed mucosal healing observed in the EGC-knockout animals is due to an impaired proliferative response since we have shown that EGC negatively regulate IEC proliferation (20). These findings strongly suggest that, in vivo, EGC favor mucosal healing processes and could enhance restitution (18, 22).

We then focused on characterizing the putative direct role of EGC as an inducer of IEB wound healing. EGC-induced epithelial restitution was clearly associated with elevated IEC

Downloaded from ajpgi.physiology.org on October 6, 2011

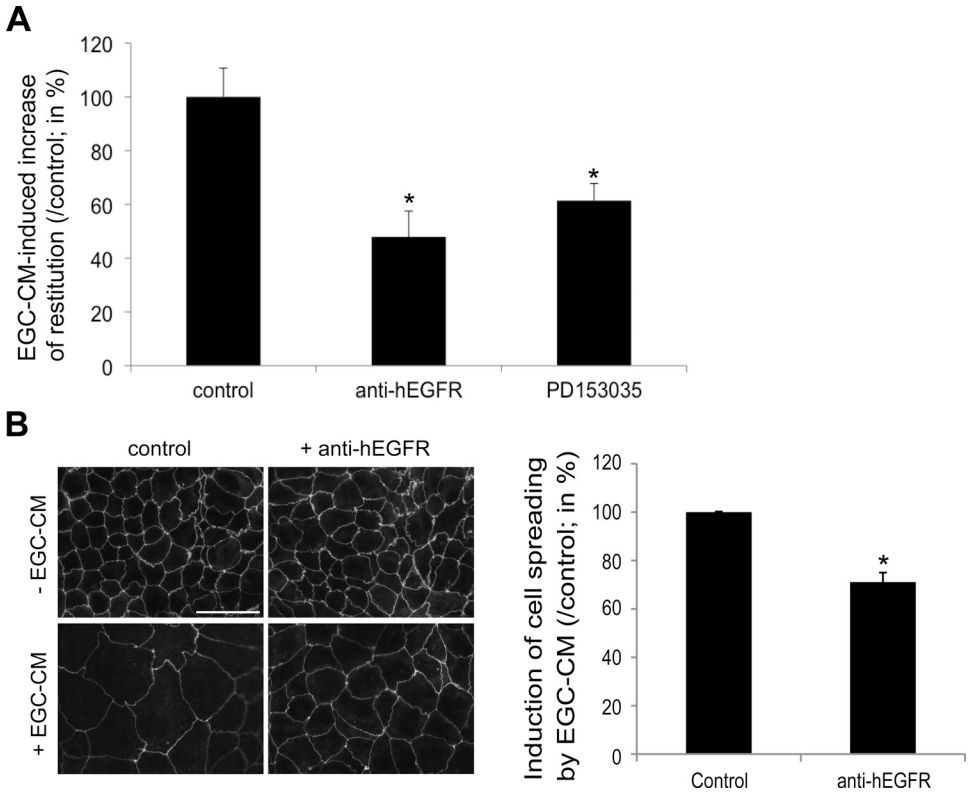


Fig. 6. EGC promote intestinal epithelial wound healing via EGFR-dependent pathways. *A*: addition of an EGFR neutralizing antibody (anti-hEGFR, 2 μg/ml) significantly blocked the increase in epithelial restitution induced by EGC-CM ($n = 3$; $P = 0.007$; paired *t*-test). Similarly, PD153035 (1 μM), a specific inhibitor of EGFR kinase, significantly reduced the EGC-CM-induced epithelial restitution ($n = 6$; $P = 0.035$; paired *t*-test). *B*: EGC-mediated increase in IEC spreading was significantly decreased by the addition of anti-hEGFR (2 μg/ml) ($n = 4$; $P = 0.009$; paired *t*-test; scale bar 50 μm). *Significantly different.

spreading, which was independent of cellular hypertrophy. Cellular hypertrophy is characterized by an increase in the total cellular RNA and protein content, whereas the DNA content remains unchanged. We have previously reported that RNA-to-DNA and protein-to-DNA ratios were not altered in Caco-2 cells in coculture with EGC (20). In addition, epithelial wound healing mediated by enhanced cell spreading appears to be an EGC-specific mechanism, since in our model myofibroblasts promoted epithelial restitution but not IEC spreading. EGC-induced wound repair does not involve an increase in IEC proliferation since EGC did not modify the number of IEC after 24 h of coculture (20). In addition, these results further emphasize the role of cell spreading as a cellular mechanism involved in early stages of wound repair, prior to initiation of cell proliferation and differentiation (18, 22).

A major finding of our study was the observation that EGC promote IEB restitution and cell spreading via FAK-dependent pathways. Modulation of FAK expression by EGC was also demonstrated in vivo as we showed that *1*) there was a positive correlation between S-100β and FAK mRNA abundance in human colonic biopsies, and *2*) EGC ablation induced a decrease in FAK mRNA abundance in GFAP-HSVtk Tg mice. However, these in vivo results are only indirect evidence and we cannot rule out that variations in FAK mRNA abundance might also result in part from altered gene expression in nonepithelial cells. The modulation of IEB restitution by EGC via FAK-dependent pathways is in agreement with studies showing that increased FAK expression in IEC is associated with enhanced epithelial restitution (14). Moreover, increased FAK expression is detected near the border of human gastric and colonic ulcers (37). In our study, EGC also increased restitution via FAK activity-dependent pathways. This result is consistent with previous reports showing that inhibition of Src-induced activation of FAK in IEC or following transfection of IEC with FRNK lead to reduced cellular motility (27, 41). The dual control of EGC on both FAK expression and phosphorylation may allow acute and chronic regulation of IEC functions. In addition to an involvement in wound healing, EGC-regulated FAK phosphorylation and expression may influence IEC anoikis, survival, and differentiation (5, 17, 42).

Another finding of our study is the identification of proEGF as a glial mediator, which is partly involved in the EGC-mediated epithelial restitution. Besides proEGF, other mediators liberated by EGC could also participate in restitution. Indeed, among known mediators secreted by EGC, TGF-β1 has clearly been demonstrated to enhance intestinal epithelial wound healing (11), and GSNO, another glial mediator, has been shown to induced wound healing in skin (2). However, the characterization of their effects in the gut merits further investigation. Nevertheless, proEGF played probably a major role in epithelial restitution induced by EGC as EGF and EGFR blocking antibodies, and an EGFR kinase inhibitor inhibited EGC-induced epithelial restitution. In support of this finding, exogenous proEGF partly reproduced EGC effects, and this growth factor was detected in EGC-CM. Although EGC have been shown to secrete various factors (20, 28), this is the first demonstration of glial proEGF secretion. Other reports have suggested that astrocytes in the CNS express and release EGF (13, 36). Although the mature 6-kDa form of EGF has been measured in the gut (15), proEGF has never been reported. In general, proEGF is intracellularly processed into mature EGF and released via exocrine secretions (16). However, in tissues such as kidney, mammary, and lacrimal glands,

Downloaded from ajpgi.physiology.org on October 6, 2011

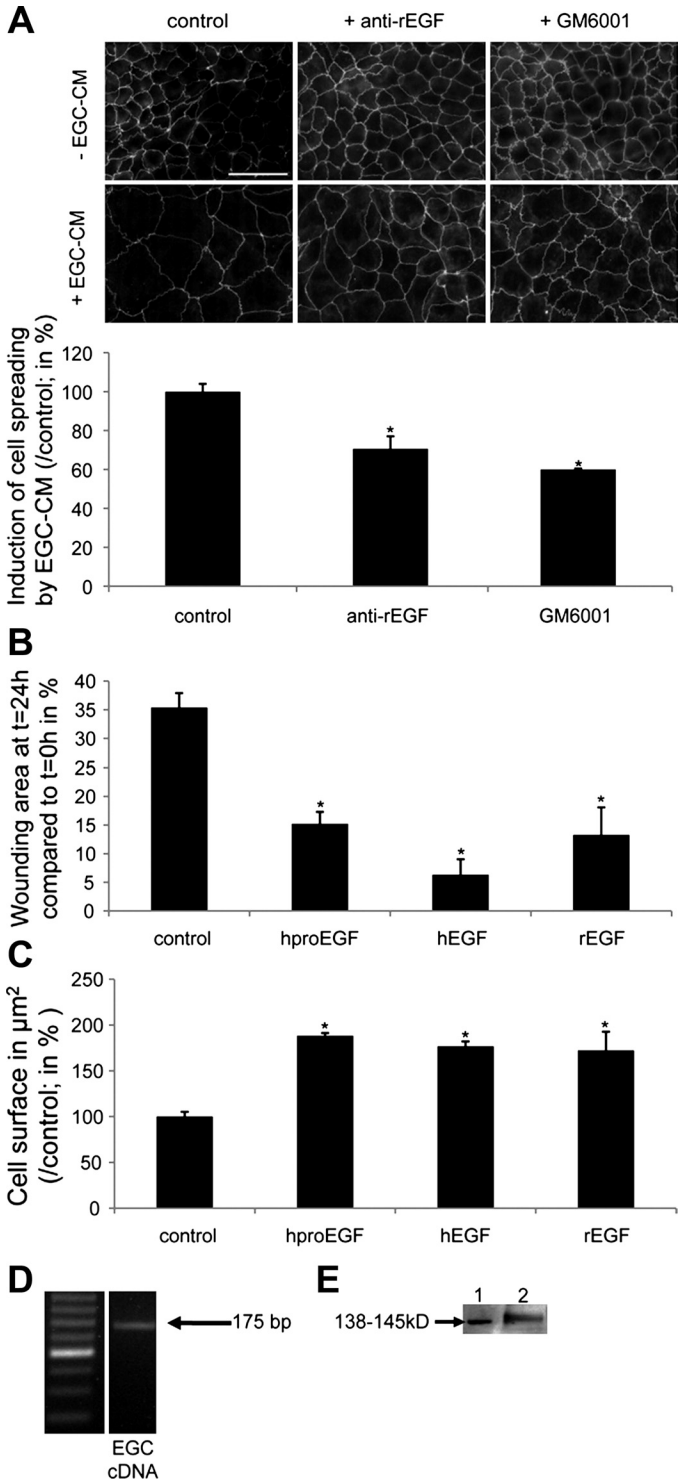


Fig. 7. EGC secrete proEGF, and EGF neutralizing antibody and metallo-matrix proteinase (MMP) inhibitor decrease the EGC-CM-induced IEC spreading. *A*: EGF neutralizing antibody (16 μg/ml) and the MMP inhibitor GM6001 (10 μM) reduced the EGC-CM-induced IEC spreading ($n = 3$; $P = 0.011$; paired *t*-test and $n = 3$; $P = 0.038$; paired *t*-test, respectively; scale bar 50 μm). *B*: human proEGF (100 ng/ml), human EGF (1 ng/ml), and rat EGF (20 ng/ml) increased epithelial restitution ($n = 3$; $P = 0.001$, $P = 0.01$ and $P = 0.008$; *t*-test; respectively). *C*: human proEGF (100 ng/ml), human EGF (1 ng/ml), and rat EGF (20 ng/ml) significantly increased IEC spreading ($n = 4$; $P < 0.001$, $P = 0.029$ and $P < 0.001$; *t*-test, respectively). *D*: PCR studies demonstrating EGF mRNA accumulation in EGC. *E*: Western blot experiments showing immunoreactive proEGF in EGC-CM (*lane 1*: recombinant human proEGF: 138–145 kDa; *lane 2*: EGC-CM). *Significantly different.

unprocessed proEGF is present in the cell membrane and exposed at the cell surface (16). Recent data have shown that in the kidney proEGF could be shed in a soluble form (16). In this study, we were able to detect proEGF but not the mature 6-kDa form of EGF in EGC lysates or EGC-CM. This suggests that EGC may not release mature EGF, or that it is released at levels below the detection levels of our assay. Whether proEGF itself or its mature forms are responsible for the increase in epithelial restitution induced by EGC is currently not fully determined in our study. However, proEGF can directly activate EGFR (6). The effects of proEGF could also be mediated by cleaved forms of proEGF resulting from its enzymatic processing as it has been previously shown in rat kidney (16). Such extracellular maturation of proEGF could occur *1*) at the level of IEC surface via membrane-bound proteases or MMPs, or *2*) in the extracellular medium via soluble proteases or MMPs secreted either by EGC or IEC. These hypotheses are reinforced in our study as an MMPs inhibitor significantly reduced EGC-CM- and proEGF-induced IEC spreading.

The EGC-induced epithelial restitution was mediated by EGFR-dependent pathways, probably resulting from EGFR activation by proEGF or its matured form as blocking antibodies to EGFR prevented the effects of EGC-CM. These results are in agreement with a major role for EGFR in intestinal epithelial wound repair processes. Indeed, activation of EGFR by its ligands leads to increased IEB wound repair and IEC spreading (23, 31, 40).

Finally, the glial secretion of proEGF, which in our study exhibited a lower wound healing ability compared with EGF at a given concentration, could have pathophysiological relevance. Indeed, when major wound healing processes are necessary, the availability of a pool of factors that can actively repair the barrier is of interest. In particular, during inflammatory or infectious insults of IEB, the EGC-derived pool of proEGF could be activated by concomitant release of MMPs or proteases, which would process proEGF into mature EGF and therefore enhance wound repair.

In summary, this study further reinforces the role of EGC as a major cellular regulator of IEB function and gut integrity. In addition, we identify proEGF as a glial mediator involved in these effects. Defects in EGC such as those recently reported in Crohn's disease (10, 34) or in necrotizing enterocolitis (39) may therefore contribute to the pathophysiology by inhibiting mucosal healing.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Hervé Enslen for advice and for providing the FRNK-GFP construct, the IFR26 Imaging Facility PiCell, and especially Philippe Hulin for precious help in the video time lapse acquiring and montage. They also thank Philippe Aubert and Samuel Ardois for invaluable technical help.

GRANTS

L. Van Landeghem was supported by a grant French Ministry of Education Research and Technology. M. M. Mahé is supported by a grant from Nantes Metropole. T. Savidge was funded by a grant from the Eli Broad Medical Foundation and from National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases 1R21DK078032. T. Wedel was supported by a grant from the German Research Foundation (DFG WE 2366/4-2). This work was supported by a grant from INCa Appel d'Offre Libre 2007 (MOPRESTAGLIA) to M. Neunlist. M. Neunlist and P. Derkinderen are recipient of a Contrat d'Interface Inserm.

Downloaded from ajpgi.physiology.org on October 6, 2011

DISCLOSURES

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

REFERENCES

1. **Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E.** Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7: 41–53, 2006.
2. **Amadeu TP, Seabra AB, de Oliveira MG, Costa AM.** S-nitrosoglutathione-containing hydrogel accelerates rat cutaneous wound repair. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 21: 629–637, 2007.
3. **Aube AC, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F, Liblau R, Galmiche JP, Neunlist M.** Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 55: 630–637, 2006.
4. **Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J.** Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev* 87: 545–564, 2007.
5. **Bouchard V, Demers MJ, Thibodeau S, Laquerre V, Fujita N, Tsuruo T, Beaulieu JF, Gauthier R, Vezina A, Villeneuve L, Vachon PH.** Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways. *J Cell Physiol* 212: 717–728, 2007.
6. **Breyer JA, Cohen S.** The epidermal growth factor precursor isolated from murine kidney membranes. Chemical characterization and biological properties. *J Biol Chem* 265: 16564–16570, 1990.
7. **Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV.** Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93: 189–201, 1998.
8. **Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, Thinard R, Naveilhan P, Vanden Berghe P, Neunlist M.** Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol* 586: 1963–1975, 2008.
9. **Conlin VS, Wu X, Nguyen C, Dai C, Vallance BA, Buchan AM, Boyer L, Jacobson K.** Vasoactive intestinal peptide ameliorates intestinal barrier disruption associated with *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297: G735–G750, 2009.
10. **Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassmann H, Desreumaux P, Liblau RS.** Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13306–13311, 2001.
11. **Dignass AU, Tsunekawa S, Podolsky DK.** Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration. *Gastroenterology* 106: 1254–1262, 1994.
12. **Froslie KF, Jahnsen J, Moum BA, Vatn MH.** Mucosal healing in inflammatory bowel disease: results from a Norwegian population-based cohort. *Gastroenterology* 133: 412–422, 2007.
13. **Gomes FC, Maia CG, de Menezes JR, Neto VM.** Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation. *Glia* 25: 247–255, 1999.
14. **Hines OJ, Ryder N, Chu J, McFadden D.** Lysophosphatidic acid stimulates intestinal restitution via cytoskeletal activation and remodeling. *J Surg Res* 92: 23–28, 2000.
15. **Kasselberg AG, Orth DN, Gray ME, Stahlman MT.** Immunocytochemical localization of human epidermal growth factor/urogastrone in several human tissues. *J Histochem Cytochem* 33: 315–322, 1985.
16. **Le Gall SM, Meneton P, Mauduit P, Dreux C.** The sequential cleavage of membrane anchored pro-EGF requires a membrane serine protease other than kallikrein in rat kidney. *Regul Pept* 122: 119–129, 2004.
17. **Levy P, Robin H, Kornprobst M, Capeau J, Cherqui G.** Enterocytic differentiation of the human Caco-2 cell line correlates with alterations in integrin signaling. *J Cell Physiol* 177: 618–627, 1998.
18. **Mammen JM, Matthews JB.** Mucosal repair in the gastrointestinal tract. *Crit Care Med* 31: S532–S537, 2003.
19. **Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD.** Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 56–68, 2005.
20. **Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Ruhl A, Lardeux B, Savidge T, Paris F, Galmiche JP.** Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-β_1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G231–G241, 2007.
21. **Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisse CL, Galmiche JP, Jarry A.** Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G1028–G1036, 2003.
22. **Okamoto R, Watanabe M.** Cellular and molecular mechanisms of the epithelial repair in IBD. *Dig Dis Sci* 50, *Suppl* 1: S34–S38, 2005.
23. **Polk DB.** Epidermal growth factor receptor-stimulated intestinal epithelial cell migration requires phospholipase C activity. *Gastroenterology* 114: 493–502, 1998.
24. **Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC.** Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G2–G7, 2005.
25. **Ramirez-Alcantara V, Loguidice A, Boelsterli UA.** Protection from diclofenac-induced small intestinal injury by the JNK inhibitor SP600125 in a mouse model of NSAID-associated enteropathy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297: G990–G998, 2009.
26. **Ruhl A, Nasser Y, Sharkey KA.** Enteric glia. *Neurogastroenterol Motil* 16, *Suppl* 1: 44–49, 2004.
27. **Sanders MA, Basson MD.** Collagen IV regulates Caco-2 migration and ERK activation via $\alpha_1\beta_1$- and $\alpha_2\beta_1$-integrin-dependent Src kinase activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G547–G557, 2004.
28. **Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, Hurst R, Sofroniew MV.** Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 132: 1344–1358, 2007.
29. **Savidge TC, Sofroniew MV, Neunlist M.** Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. *Lab Invest* 87: 731–736, 2007.
30. **Sturm A, Dignass AU.** Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14: 348–353, 2008.
31. **Tetreault MP, Chailler P, Beaulieu JF, Rivard N, Menard D.** Specific signaling cascades involved in cell spreading during healing of microwounded gastric epithelial monolayers. *J Cell Biochem* 105: 1240–1209, 2008.
32. **Tillinger W, McCole DF, Keely SJ, Bertelsen LS, Wolf PL, Junger WG, Barrett KE.** Hypertonic saline reduces neutrophil-epithelial interactions in vitro and gut tissue damage in a mouse model of colitis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1839–R1845, 2008.
33. **Toumi F, Neunlist M, Cassagnau E, Parois S, Laboisse CL, Galmiche JP, Jarry A.** Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol Motil* 15: 239–242, 2003.
34. **Villanacci V, Bassotti G, Nascimbeni R, Antonelli E, Cadei M, Fisogni S, Salerni B, Geboes K.** Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterol Motil* 20: 1009–1016, 2008.
35. **Von Boyen GB, Steinkamp M, Geerling I, Reinshagen M, Schafer KH, Adler G, Kirsch J.** Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 12: 346–354, 2006.
36. **Wagner B, Natarajan A, Grunaug S, Kroismayr R, Wagner EF, Sibilia M.** Neuronal survival depends on EGFR signaling in cortical but not midbrain astrocytes. *EMBO J* 25: 752–762, 2006.
37. **Walsh MF, Ampasala DR, Hatfield J, Vander Heide R, Suer S, Rishi AK, Basson MD.** Transforming growth factor-beta stimulates intestinal epithelial focal adhesion kinase synthesis via Smad- and p38-dependent mechanisms. *Am J Pathol* 173: 385–399, 2008.
38. **Watson AJ, Duckworth CA, Guan Y, Montrose MH.** Mechanisms of epithelial cell shedding in the mammalian intestine and maintenance of barrier function. *Ann NY Acad Sci* 1165: 135–142, 2009.
39. **Wedel T, Krammer HJ, Kuhnel W, Sigge W.** Alterations of the enteric nervous system in neonatal necrotizing enterocolitis revealed by whole-mount immunohistochemistry. *Pediatr Pathol Lab Med* 18: 57–70, 1998.
40. **Wilson AJ, Gibson PR.** Role of epidermal growth factor receptor in basal and stimulated colonic epithelial cell migration in vitro. *Exp Cell Res* 250: 187–196, 1999.
41. **Yu CF, Sanders MA, Basson MD.** Human Caco-2 motility redistributes FAK and paxillin and activates p38 MAPK in a matrix-dependent manner. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278: G952–G966, 2000.
42. **Zhang HM, Keledjian KM, Rao JN, Zou T, Liu L, Marasa BS, Wang SR, Ru L, Strauch ED, Wang JY.** Induced focal adhesion kinase expression suppresses apoptosis by activating NF-κB signaling in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C1310–C1320, 2006.

Downloaded from ajpgi.physiology.org on October 6, 2011

Annexe 4: Tableau récapitulatif des principaux médiateurs impliqués dans les communications neuro-glio-épithéliales.

Médiateurs	Sources	Cibles	Fonctions
Ach	Neurones	CEI	↗ Perméabilité paracellulaire ; ↗ Perméabilité transcellulaire
ATP	CGE	CGE Neurones	Propagations des ondes calciques Participation à la neurotransmission
GDNF	CGE	Neurone	Neurotrophique
GSH	CGE	Neurones	Antioxydant ; Neuroprotection
GSNO	CGE	CEI	Protection des CEI contre une agression bactérienne Source de NO
IL-6	CGE	Neurones CEI	Pro-inflammatoire Pro-inflammatoire
L-Arginine	CGE	Neuroner	Précurseur du NO neuronal
Neurotrophine-3	CGE	Neuroner	Neurotrophique
NGF	CEI, CGE	Neurones	Neuroprotecteur ; Neurotrophique
proEGF	CGE	CEI	Favorise la réparation épithéliale
S100-β	CGE	CEI	Inhibe la prolifération cellulaire
TGF-β1	CGE	CEI	Inhibe la prolifération cellulaire
VIP	Neurones	CEI	↘ Perméabilité paracellulaire ; Régulation de la sécrétion des ions

BIBLIOGRAPHIE

Abbott NJ. (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of anatomy* **200,** 629-638.

Abbott NJ, Ronnback L & Hansson E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7,** 41-53.

Abdo H, Derkinderen P, Gomes P, Chevalier J, Aubert P, Masson D, Galmiche JP, Vanden Berghe P, Neunlist M & Lardeux B. (2010). Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *Faseb J* **24,** 1082-1094.

Ajuebor MN, Singh A & Wallace JL. (2000). Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279,** G238-244.

Alarcon de la Lastra C, Sanchez-Fidalgo S, Villegas I & Motilva V. (2004). New pharmacological perspectives and therapeutic potential of PPAR-gamma agonists. *Current pharmaceutical design* **10,** 3505-3524.

Allen A, Hutton DA & Pearson JP. (1998). The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. *Int J Biochem Cell Biol* **30,** 797-801.

Altmann R, Hausmann M, Spottl T, Gruber M, Bull AW, Menzel K, Vogl D, Herfarth H, Scholmerich J, Falk W & Rogler G. (2007). 13-Oxo-ODE is an endogenous ligand for PPARgamma in human colonic epithelial cells. *Biochemical pharmacology* **74,** 612-622.

Andreu P, Peignon G, Slomianny C, Taketo MM, Colnot S, Robine S, Lamarque D, Laurent-Puig P, Perret C & Romagnolo B. (2008). A genetic study of the role of the Wnt/beta-catenin signalling in Paneth cell differentiation. *Dev Biol* **324,** 288-296.

Angenstein F, Buchner K & Staak S. (1999). Age-dependent differences in glutamate-induced phosphorylation systems in rat hippocampal slices. *Hippocampus* **9,** 173-185.

Anitha M, Chandrasekharan B, Salgado JR, Grouzmann E, Mwangi S, Sitaraman SV & Srinivasan S. (2006a). Glial-derived neurotrophic factor modulates enteric neuronal survival and proliferation through neuropeptide Y. *Gastroenterology* **131,** 1164-1178.

Anitha M, Gondha C, Sutliff R, Parsadanian A, Mwangi S, Sitaraman SV & Srinivasan S. (2006b). GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. *J Clin Invest* **116,** 344-356.

Anlauf M, Schafer MK, Eiden L & Weihe E. (2003). Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *The Journal of comparative neurology* **459,** 90-111.

Aoun P, Simpkins JW & Agarwal N. (2003a). Role of PPAR-gamma ligands in neuroprotection against glutamate-induced cytotoxicity in retinal ganglion cells. *Investigative ophthalmology & visual science* **44,** 2999-3004.

Aoun P, Watson DG & Simpkins JW. (2003b). Neuroprotective effects of PPARgamma agonists against oxidative insults in HT-22 cells. *Eur J Pharmacol* **472,** 65-71.

Aoyama K, Watabe M & Nakaki T. (2008). Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci* **108,** 227-238.

Assoian RK & Klein EA. (2008). Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends Cell Biol* **18,** 347-352.

Aube AC, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F, Liblau R, Galmiche JP & Neunlist M. (2006). Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* **55,** 630-637.

Auerbach L. (1864). Fernere vorlaufi ge Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. *Arch Pathol Anat Physiol* **,** 457-460.

Bach-Ngohou K, Mahe MM, Aubert P, Abdo H, Boni S, Bourreille A, Denis MG, Lardeux B, Neunlist M & Masson D. (2010). Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *The Journal of physiology* **588,** 2533-2544.

Baeker R, Haebel S, Schlatterer K & Schlatterer B. (2002). Lipocalin-type prostaglandin D synthase in milk: a new biomarker for bovine mastitis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **67,** 75-88.

Bains JS & Shaw CA. (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Brain Res Rev* **25,** 335-358.

Balsinde J, Balboa MA, Insel PA & Dennis EA. (1999). Regulation and inhibition of phospholipase A2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39,** 175-189.

Balsinde J, Winstead MV & Dennis EA. (2002). Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett* **531,** 2-6.

Banu SK, Arosh JA, Chapdelaine P & Fortier MA. (2003). Molecular cloning and spatio-temporal expression of the prostaglandin transporter: a basis for the action of prostaglandins in the bovine reproductive system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100,** 11747-11752.

Bar KJ, Facer P, Williams NS, Tam PK & Anand P. (1997). Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* **112,** 1381-1385.

Barker N, van de Wetering M & Clevers H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev* **22,** 1856-1864.

Barlow A, de Graaff E & Pachnis V. (2003). Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. *Neuron* **40,** 905-916.

Bassotti G, Battaglia E, Bellone G, Dughera L, Fisogni S, Zambelli C, Morelli A, Mioli P, Emanuelli G & Villanacci V. (2005). Interstitial cells of Cajal, enteric nerves, and glial cells in colonic diverticular disease. *Journal of clinical pathology* **58,** 973-977.

Bassotti G, Villanacci V, Maurer CA, Fisogni S, Di Fabio F, Cadei M, Morelli A, Panagiotis T, Cathomas G & Salerni B. (2006). The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation. *Gut* **55,** 41-46.

Baumgarten HG, Holstein AF & Owman C. (1970). Auerbach's plexus of mammals and man: electron microscopic identification of three different types of neuronal processes in myenteric ganglia of the large intestine from rhesus monkeys, guinea-pigs and man. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **106,** 376-397.

Bayliss WM & Starling EH. (1899). The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol* **24,** 99-143.

Beauchamp RD, Sheng HM, Shao JY, Thompson EA & Ko TC. (1996). Intestinal cell cycle regulations. Interactions of cyclin D1, Cdk4, and p21Cip1. *Ann Surg* **223,** 620-627; discussion 627-628.

Beck DW, Vinters HV, Hart MN & Cancilla PA. (1984). Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier. *J Neuropathol Exp Neurol* **43,** 219-224.

Bercik P, Bouley L, Dutoit P, Blum AL & Kucera P. (2000). Quantitative analysis of intestinal motor patterns: spatiotemporal organization of nonneural pacemaker sites in the rat ileum. *Gastroenterology* **119,** 386-394.

Bereswill S, Munoz M, Fischer A, Plickert R, Haag LM, Otto B, Kuhl AA, Loddenkemper C, Gobel UB & Heimesaat MM. (2011). Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. *PLoS One* **5,** e15099.

Berger J & Moller DE. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* **53,** 409-435.

Bertrand PP, Kunze WA, Bornstein JC, Furness JB & Smith ML. (1997). Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am J Physiol* **273,** G422-435.

Beuckmann CT, Aoyagi M, Okazaki I, Hiroike T, Toh H, Hayaishi O & Urade Y. (1999a). Binding of biliverdin, bilirubin, and thyroid hormones to lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochemistry* **38,** 8006-8013.

Beuckmann CT, Urade Y & Hayaishi O. (1999b). Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) binds non-substrate lipophilic ligands. *Adv Exp Med Biol* **469,** 55-60.

Beuckmann CT, Lazarus M, Gerashchenko D, Mizoguchi A, Nomura S, Mohri I, Uesugi A, Kaneko T, Mizuno N, Hayaishi O & Urade Y. (2000). Cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in the central nervous system of the adult rat. *The Journal of comparative neurology* **428,** 62-78.

Bishop-Bailey D & Hla T. (1999). Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2. *J Biol Chem* **274,** 17042-17048.

Bjarnason I, Hayllar J, MacPherson AJ & Russell AS. (1993). Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology* **104,** 1832-1847.

Bjerknes M & Cheng H. (2001). Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98,** 12497-12502.

Bjornstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B & Holmgren A. (1994). The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem* **269,** 29382-29384.

Blaugrund E, Pham TD, Tennyson VM, Lo L, Sommer L, Anderson DJ & Gershon MD. (1996). Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence. *Development* **122,** 309-320.

Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL & Odle J. (2007). Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev* **87,** 545-564.

Boie Y, Sawyer N, Slipetz DM, Metters KM & Abramovitz M. (1995). Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *J Biol Chem* **270,** 18910-18916.

Bonventre JV. (1992). Phospholipase A2 and signal transduction. *J Am Soc Nephrol* **3,** 128-150.

Bornstein JC, Furness JB, Smith TK & Trussell DC. (1991). Synaptic responses evoked by mechanical stimulation of the mucosa in morphologically characterized myenteric neurons of the guinea-pig ileum. *J Neurosci* **11,** 505-518.

Botting RM. (2000). Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? *Clin Infect Dis* **31 Suppl 5,** S202-210.

Bouchard V, Demers MJ, Thibodeau S, Laquerre V, Fujita N, Tsuruo T, Beaulieu JF, Gauthier R, Vezina A, Villeneuve L & Vachon PH. (2007). Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways. *J Cell Physiol* **212,** 717-728.

Boulet L, Ouellet M, Bateman KP, Ethier D, Percival MD, Riendeau D, Mancini JA & Methot N. (2004). Deletion of microsomal prostaglandin E2 (PGE2) synthase-1

reduces inducible and basal PGE2 production and alters the gastric prostanoid profile. *J Biol Chem* **279,** 23229-23237.

Braun N, Sevigny J, Robson SC, Hammer K, Hanani M & Zimmermann H. (2004). Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system. *Glia* **45,** 124-132.

Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA & Breyer MD. (2001). Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41,** 661-690.

Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave KA, Birchmeier C & Wegner M. (2001). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* **15,** 66-78.

Brookes SJ & Costa M. (1990). Identification of enteric motor neurones which innervate the circular muscle of the guinea pig small intestine. *Neurosci Lett* **118,** 227-230.

Brookes SJ, Steele PA & Costa M. (1991). Calretinin immunoreactivity in cholinergic motor neurones, interneurones and vasomotor neurones in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* **263,** 471-481.

Browning KN & Lees GM. (1994). Reappraisal of the innervation of rat intestine by vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y-immunoreactive neurons. *Neuroscience* **62,** 1257-1266.

Bull AW, Steffensen KR, Leers J & Rafter JJ. (2003). Activation of PPAR gamma in colon tumor cell lines by oxidized metabolites of linoleic acid, endogenous ligands for PPAR gamma. *Carcinogenesis* **24,** 1717-1722.

Bullen TF, Forrest S, Campbell F, Dodson AR, Hershman MJ, Pritchard DM, Turner JR, Montrose MH & Watson AJ. (2006). Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. *Lab Invest* **86,** 1052-1063.

Burke JE & Dennis EA. (2009). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* **50 Suppl,** S237-242.

Burns AJ & Le Douarin NM. (2001). Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. *The Anatomical record* **262,** 16-28.

Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH & Sofroniew MV. (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* **93,** 189-201.

Cameron HL & Perdue MH. (2007). Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterol Motil* **19,** 47-56.

Carlson NG, Wieggel WA, Chen J, Bacchi A, Rogers SW & Gahring LC. (1999). Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart

neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J Immunol* **163,** 3963-3968.

Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM & Gutkind JS. (2005). Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* **310,** 1504-1510.

Chalazonitis A, Rothman TP, Chen J, Vinson EN, MacLennan AJ & Gershon MD. (1998). Promotion of the development of enteric neurons and glia by neuropoietic cytokines: interactions with neurotrophin-3. *Dev Biol* **198,** 343-365.

Chamberlin W, Graham DY, Hulten K, El-Zimaity HM, Schwartz MR, Naser S, Shafran I & El-Zaatari FA. (2001). Review article: Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **15,** 337-346.

Chan JY, Cheung MC, Moi P, Chan K & Kan YW. (1995). Chromosomal localization of the human NF-E2 family of bZIP transcription factors by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* **95,** 265-269.

Chao CC & Lee EH. (1999). Neuroprotective mechanism of glial cell line-derived neurotrophic factor on dopamine neurons: role of antioxidation. *Neuropharmacology* **38,** 913-916.

Chaturvedi LS, Marsh HM, Shang X, Zheng Y & Basson MD. (2007). Repetitive deformation activates focal adhesion kinase and ERK mitogenic signals in human Caco-2 intestinal epithelial cells through Src and Rac1. *J Biol Chem* **282,** 14-28.

Chen GG, Xu H, Lee JF, Subramaniam M, Leung KL, Wang SH, Chan UP & Spelsberg TC. (2003). 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid arrests growth of colorectal cancer cells via a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Int J Cancer* **107,** 837-843.

Chen L, Bush CR, Necela BM, Su W, Yanagisawa M, Anastasiadis PZ, Fields AP & Thompson EA. (2006). RS5444, a novel PPARgamma agonist, regulates aspects of the differentiated phenotype in nontransformed intestinal epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol* **251,** 17-32.

Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, Thinard R, Naveilhan P, Vanden Berghe P & Neunlist M. (2008). Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *The Journal of physiology* **586,** 1963-1975.

Cho HY, Jedlicka AE, Reddy SP, Kensler TW, Yamamoto M, Zhang LY & Kleeberger SR. (2002). Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **26,** 175-182.

Chowdhury AA, Hossain MS, Rahman MS, Nishimura K, Jisaka M, Nagaya T, Shono F & Yokota K. (2011). Sustained expression of lipocalin-type prostaglandin D synthase in the antisense direction positively regulates adipogenesis in cloned cultured preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **411,** 287-292.

Cimini A & Ceru MP. (2008). Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the regulation of neural stem cells proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev* **4,** 293-303.

Clancy RM, Levartovsky D, Leszczynska-Piziak J, Yegudin J & Abramson SB. (1994). Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91,** 3680-3684.

Cook RD & Burnstock G. (1976). The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. II. Non-neuronal elements. *J Neurocytol* **5,** 195-206.

Cooke HJ, Sidhu M & Wang YZ. (1997). 5-HT activates neural reflexes regulating secretion in the guinea-pig colon. *Neurogastroenterol Motil* **9,** 181-186.

Cooke HJ. (2000). Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. *Ann N Y Acad Sci* **915,** 77-80.

Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassmann H, Desreumaux P & Liblau RS. (2001). Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98,** 13306-13311.

Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E & Kandiah CJ. (1996). Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* **75,** 949-967.

Costa M, Brookes SJ & Hennig GW. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* **47 Suppl 4,** iv15-19; discussion iv26.

Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW & Diehl JA. (2004). The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol* **24,** 8477-8486.

Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Patel NS, Di Paola R, Genovese T, Chatterjee PK, Di Rosa M, Caputi AP & Thiemermann C. (2003). Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut. *Br J Pharmacol* **140,** 366-376.

da Silveira AB, Freitas MA, de Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, Furness JB, Correa-Oliveira R & Reis D. (2009). Glial fibrillary acidic protein and S-100 colocalization in the enteroglial cells in dilated and nondilated portions of colon from chagasic patients. *Human pathology* **40,** 244-251.

Dajani EZ, Shahwan TG & Dajani NE. (2003). Prostaglandins and brain-gut axis. *J Physiol Pharmacol* **54 Suppl 4,** 155-164.

De Quelen F, Chevalier J, Rolli-Derkinderen M, Mourot J, Neunlist M & Boudry G. (2011). n-3 polyunsaturated fatty acids in the maternal diet modify the postnatal development of nervous regulation of intestinal permeability in piglets. *The Journal of physiology* **589,** 4341-4352.

Dehouck MP, Meresse S, Delorme P, Fruchart JC & Cecchelli R. (1990). An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *Journal of neurochemistry* **54,** 1798-1801.

Dhandapani KM & Brann DW. (2003). Transforming growth factor-beta: a neuroprotective factor in cerebral ischemia. *Cell Biochem Biophys* **39,** 13-22.

Diamandis EP, Arnett WP, Foussias G, Pappas H, Ghandi S, Melegos DN, Mullen B, Yu H, Srigley J & Jarvi K. (1999). Seminal plasma biochemical markers and their association with semen analysis findings. *Urology* **53,** 596-603.

Dignass AU, Becker A, Spiegler S & Goebell H. (1998). Adenine nucleotides modulate epithelial wound healing in vitro. *Eur J Clin Invest* **28,** 554-561.

Dinkova-Kostova AT & Talalay P. (2010). NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch Biochem Biophys* **501,** 116-123.

Dong YG, Chen DD, He JG & Guan YY. (2004). Effects of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 on cell proliferation and apoptosis in ECV304 endothelial cells. *Acta Pharmacol Sin* **25,** 47-53.

Dringen R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology* **62,** 649-671.

Dubuquoy L, Bourdon C, Peuchmaur M, Leibowitz MD, Nutten S, Colombel JF, Auwerx J & Desreumaux P. (2000). [Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: a new target for the treatment of inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol Clin Biol* **24,** 719-724.

Dubuquoy L, Rousseaux C, Thuru X, Peyrin-Biroulet L, Romano O, Chavatte P, Chamaillard M & Desreumaux P. (2006). PPARgamma as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut* **55,** 1341-1349.

Eguchi N, Minami T, Shirafuji N, Kanaoka Y, Tanaka T, Nagata A, Yoshida N, Urade Y, Ito S & Hayaishi O. (1999). Lack of tactile pain (allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96,** 726-730.

Eguchi Y, Eguchi N, Oda H, Seiki K, Kijima Y, Matsu-ura Y, Urade Y & Hayaishi O. (1997). Expression of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in human heart and its accumulation in the coronary circulation of angina patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94,** 14689-14694.

Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T, Harada T & Yamamoto M. (2001). High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity

associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci* **59,** 169-177.

Escartin C, Won SJ, Malgorn C, Auregan G, Berman AE, Chen PC, Deglon N, Johnson JA, Suh SW & Swanson RA. (2011). Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 facilitates neuronal glutathione synthesis by upregulating neuronal excitatory amino acid transporter 3 expression. *J Neurosci* **31,** 7392-7401.

Eun CS, Han DS, Lee SH, Paik CH, Chung YW, Lee J & Hahm JS. (2006). Attenuation of colonic inflammation by PPARgamma in intestinal epithelial cells: effect on Toll-like receptor pathway. *Dig Dis Sci* **51,** 693-697.

Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H & Auwerx J. (1997). The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* **272,** 18779-18789.

Ferri GL, Probert L, Cocchia D, Michetti F, Marangos PJ & Polak JM. (1982). Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature* **297,** 409-410.

Fevr T, Robine S, Louvard D & Huelsken J. (2007). Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol* **27,** 7551-7559.

Flamant M, Aubert P, Rolli-Derkinderen M, Bourreille A, Neunlist MR, Mahe MM, Meurette G, Marteyn B, Savidge T, Galmiche JP, Sansonetti PJ & Neunlist M. (2011). Enteric glia protect against Shigella flexneri invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut* **60,** 473-484.

Fletcher EL, Clark MJ & Furness JB. (2002). Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus. *Cell Tissue Res* **308,** 339-346.

Foster MW, McMahon TJ & Stamler JS. (2003). S-nitrosylation in health and disease. *Trends in molecular medicine* **9,** 160-168.

Fujisawa T, Nakajima A, Fujisawa N, Takahashi H, Ikeda I, Tomimoto A, Yonemitsu K, Nakajima N, Kudo C, Wada K, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T, Nakagama H & Blumberg RS. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) suppresses colonic epithelial cell turnover and colon carcinogenesis through inhibition of the beta-catenin/T cell factor (TCF) pathway. *J Pharmacol Sci* **106,** 627-638.

Fujitani Y, Kanaoka Y, Aritake K, Uodome N, Okazaki-Hatake K & Urade Y. (2002). Pronounced eosinophilic lung inflammation and Th2 cytokine release in human lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice. *J Immunol* **168,** 443-449.

Funovics P, Brostjan C, Nigisch A, Fila A, Grochot A, Mleczko K, Was H, Weigel G, Dulak J & Jozkowicz A. (2006). Effects of 15d-PGJ(2) on VEGF-induced angiogenic

activities and expression of VEGF receptors in endothelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **79,** 230-244.

Furness JB, Costa M, Rokaeus A, McDonald TJ & Brooks B. (1987). Galanin-immunoreactive neurons in the guinea-pig small intestine: their projections and relationships to other enteric neurons. *Cell Tissue Res* **250,** 607-615.

Furness JB, Kunze WA, Bertrand PP, Clerc N & Bornstein JC. (1998). Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog Neurobiol* **54,** 1-18.

Furness JB. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the autonomic nervous system* **81,** 87-96.

Furness JB, Clerc N & Kunze WA. (2000a). Memory in the enteric nervous system. *Gut* **47 Suppl 4,** iv60-62; discussion iv76.

Furness JB, Clerc N, Lomax AE, Bornstein JC & Kunze WA. (2000b). Shapes and projections of tertiary plexus neurons of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* **300,** 383-387.

Gabella G. (1971). Glial cells in the myenteric plexus. *Z Naturforsch B* **26,** 244-245.

Gabella G. (1981). Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience* **6,** 425-436.

Gabella G & Trigg P. (1984). Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. *J Neurocytol* **13,** 49-71.

Gabella G. (1987). The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience* **22,** 737-752.

Gabella G. (1990). On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. *J Auton Nerv Syst* **30 Suppl,** S59-66.

Galligan JJ, LePard KJ, Schneider DA & Zhou X. (2000). Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* **81,** 97-103.

Garavito RM & DeWitt DL. (1999). The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* **1441,** 278-287.

Garcia CM, Darland DC, Massingham LJ & D'Amore PA. (2004). Endothelial cell-astrocyte interactions and TGF beta are required for induction of blood-neural barrier properties. *Brain Res Dev Brain Res* **152,** 25-38.

Garg TK & Chang JY. (2004). 15-deoxy-delta 12, 14-Prostaglandin J2 prevents reactive oxygen species generation and mitochondrial membrane depolarization induced by oxidative stress. *BMC Pharmacol* **4,** 6.

Geboes K, Rutgeerts P, Ectors N, Mebis J, Penninckx F, Vantrappen G & Desmet VJ. (1992). Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. *Gastroenterology* **103,** 439-447.

Gershon MD & Rothman TP. (1991). Enteric glia. *Glia* **4,** 195-204.

Gershon MD. (1997). Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system. *Current opinion in neurobiology* **7,** 101-109.

Giacomelli S, Leone MG, Grima J, Silvestrini B & Cheng CY. (1996). Astrocytes synthesize and secrete prostaglandin D synthetase in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1310,** 269-276.

Giri S, Rattan R, Singh AK & Singh I. (2004). The 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 inhibits the inflammatory response in primary rat astrocytes via down-regulating multiple steps in phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-NF-kappaB-p300 pathway independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol* **173,** 5196-5208.

Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Colombo R & Dalle-Donne I. (2004). S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *Journal of cellular and molecular medicine* **8,** 201-212.

Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G & Nimer SD. (1995). Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr* **4,** 281-299.

Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C & Kaidi A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* **30,** 377-386.

Grunewald S, Huyben K, de Jong JG, Smeitink JA, Rubio E, Boers GH, Conradt HS, Wendel U & Wevers RA. (1999). beta-Trace protein in human cerebrospinal fluid: a diagnostic marker for N-glycosylation defects in brain. *Biochim Biophys Acta* **1455,** 54-60.

Guan Y, Zhang Y, Davis L & Breyer MD. (1997). Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in urinary tract of rabbits and humans. *Am J Physiol* **273,** F1013-1022.

Gupta RA, Brockman JA, Sarraf P, Willson TM & DuBois RN. (2001). Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells. *J Biol Chem* **276,** 29681-29687.

Gupta RA & Dubois RN. (2002). Controversy: PPARgamma as a target for treatment of colorectal cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283,** G266-269.

Hallgren A, Flemstrom G & Nylander O. (1998). Interaction between neurokinin A, VIP, prostanoids, and enteric nerves in regulation of duodenal function. *Am J Physiol* **275,** G95-103.

Han F, Takeda K, Ishikawa K, Ono M, Date F, Yokoyama S, Furuyama K, Shinozawa Y, Urade Y & Shibahara S. (2009). Induction of lipocalin-type prostaglandin D synthase in mouse heart under hypoxemia. *Biochem Biophys Res Commun* **385,** 449-453.

Hanani M, Zamir O & Baluk P. (1989). Glial cells in the guinea pig myenteric plexus are dye coupled. *Brain research* **497,** 245-249.

Hanani M, Francke M, Hartig 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.

Hansen MB & Skadhauge E. (1997). Signal transduction pathways for serotonin as an intestinal secretagogue. *Comp Biochem Physiol A Physiol* **118,** 283-290.

Hardin JA, Kimm MH, Wirasinghe M & Gall DG. (1999). Macromolecular transport across the rabbit proximal and distal colon. *Gut* **44,** 218-225.

Hassel B, Paulsen RE, Johnsen A & Fonnum F. (1992). Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain research* **576,** 120-124.

Hayden UL & Carey HV. (2000). Neural control of intestinal ion transport and paracellular permeability is altered by nutritional status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278,** R1589-1594.

Heanue TA & Pachnis V. (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci* **8,** 466-479.

Hinnebusch BF, Siddique A, Henderson JW, Malo MS, Zhang W, Athaide CP, Abedrapo MA, Chen X, Yang VW & Hodin RA. (2004). Enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase is a target gene of the gut-enriched Kruppel-like factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286,** G23-30.

Hirabayashi T & Shimizu T. (2000). Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2). *Biochim Biophys Acta* **1488,** 124-138.

Hoehner JC, Wester T, Pahlman S & Olsen L. (1996). Localization of neurotrophins and their high-affinity receptors during human enteric nervous system development. *Gastroenterology* **110,** 756-767.

Hoff S, Zeller F, von Weyhern CW, Wegner M, Schemann M, Michel K & Ruhl A. (2008). Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J Comp Neurol* **509,** 356-371.

Hokari R, Nagata N, Kurihara C, Watanabe C, Komoto S, Okada Y, Kawaguchi A, Nagao S, Hibi T, Nagata K, Urade Y & Miura S. (2009). Increased expression and cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in Helicobacter pylori-induced gastritis. *J Pathol* **219,** 417-426.

Hokari R, Kurihara C, Nagata N, Aritake K, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Nakamura M, Kawaguchi A, Nagao S, Urade Y & Miura S. (2011). Increased expression of lipocalin-type-prostaglandin D synthase in ulcerative colitis and exacerbating role in murine colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300,** G401-408.

Hosoya T, Maruyama A, Kang MI, Kawatani Y, Shibata T, Uchida K, Warabi E, Noguchi N, Itoh K & Yamamoto M. (2005). Differential responses of the Nrf2-Keap1 system to laminar and oscillatory shear stresses in endothelial cells. *J Biol Chem* **280,** 27244-27250.

Igarashi Y, Utsumi H, Chiba H, Yamada-Sasamori Y, Tobioka H, Kamimura Y, Furuuchi K, Kokai Y, Nakagawa T, Mori M & Sawada N. (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* **261,** 108-112.

Imaizumi T, Kumagai M, Hatakeyama M, Tamo W, Yamashita K, Tanji K, Yoshida H & Satoh K. (2003). 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits the expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **71,** 293-299.

Inoue K, Akaike T, Miyamoto Y, Okamoto T, Sawa T, Otagiri M, Suzuki S, Yoshimura T & Maeda H. (1999). Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism in vivo. *J Biol Chem* **274,** 27069-27075.

Inui T, Ohkubo T, Urade Y & Hayaishi O. (1999). Enhancement of lipocalin-type prostaglandin D synthase enzyme activity by guanidine hydrochloride. *Biochem Biophys Res Commun* **266,** 641-646.

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD & Yamamoto M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* **13,** 76-86.

Itoh K, Mochizuki M, Ishii Y, Ishii T, Shibata T, Kawamoto Y, Kelly V, Sekizawa K, Uchida K & Yamamoto M. (2004). Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin j(2). *Mol Cell Biol* **24,** 36-45.

Jaiswal AK. (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* **36,** 1199-1207.

Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R & Samuelsson B. (1999). Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96,** 7220-7225.

Jania LA, Chandrasekharan S, Backlund MG, Foley NA, Snouwaert J, Wang IM, Clark P, Audoly LP & Koller BH. (2009). Microsomal prostaglandin E synthase-2 is not essential for in vivo prostaglandin E2 biosynthesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **88,** 73-81.

Janzer RC & Raff MC. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* **325,** 253-257.

Jessen KR & Mirsky R. (1980). Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* **286,** 736-737.

Jessen KR & Mirsky R. (1983). Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J Neurosci* **3,** 2206-2218.

Jessen KR & Mirsky R. (1985). Glial fibrillary acidic polypeptides in peripheral glia. Molecular weight, heterogeneity and distribution. *J Neuroimmunol* **8,** 377-393.

Jia Z, Hallur S, Zhu H, Li Y & Misra HP. (2008a). Potent upregulation of glutathione and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 by alpha-lipoic acid in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: protection against neurotoxicant-elicited cytotoxicity. *Neurochem Res* **33,** 790-800.

Jia Z, Zhu H, Misra BR, Li Y & Misra HP. (2008b). Dopamine as a potent inducer of cellular glutathione and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in PC12 neuronal cells: a potential adaptive mechanism for dopaminergic neuroprotection. *Neurochem Res* **33,** 2197-2205.

Jiang Y, Liu MT & Gershon MD. (2003). Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Developmental biology* **258,** 364-384.

Kabashima K, Saji T, Murata T, Nagamachi M, Matsuoka T, Segi E, Tsuboi K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Miyachi Y, Ichikawa A & Narumiya S. (2002). The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J Clin Invest* **109,** 883-893.

Kalinina EV, Chernov NN & Saprin AN. (2008). Involvement of thio-, peroxi-, and glutaredoxins in cellular redox-dependent processes. *Biochemistry (Mosc)* **73,** 1493-1510.

Kanaoka Y, Ago H, Inagaki E, Nanayama T, Miyano M, Kikuno R, Fujii Y, Eguchi N, Toh H, Urade Y & Hayaishi O. (1997). Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell* **90,** 1085-1095.

Kanaoka Y & Urade Y. (2003). Hematopoietic prostaglandin D synthase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **69,** 163-167.

Kang MI, Kobayashi A, Wakabayashi N, Kim SG & Yamamoto M. (2004). Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101,** 2046-2051.

Kansanen E, Kivela AM & Levonen AL. (2009). Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Free Radic Biol Med* **47,** 1310-1317.

Kato M, Kusumi T, Tsuchida S, Tanaka M, Sasaki M & Kudo H. (2004). Induction of differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in colon cancer cell lines by troglitazone. *J Cancer Res Clin Oncol* **130,** 73-79.

Kelsh RN. (2006). Sorting out Sox10 functions in neural crest development. *Bioessays* **28,** 788-798.

Kensler TW, Egner PA, Dolan PM, Groopman JD & Roebuck BD. (1987). Mechanism of protection against aflatoxin tumorigenicity in rats fed 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione (oltipraz) and related 1,2-dithiol-3-thiones and 1,2-dithiol-3-ones. *Cancer Res* **47,** 4271-4277.

Kikawa Y, Narumiya S, Fukushima M, Wakatsuka H & Hayaishi O. (1984). 9-Deoxy-delta 9, delta 12-13,14-dihydroprostaglandin D2, a metabolite of prostaglandin D2 formed in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81,** 1317-1321.

Kim EH & Surh YJ. (2006). 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors. *Biochem Pharmacol* **72,** 1516-1528.

Kim MS, Kim MK, Kim KS, Chung JH, Kim SJ, Kim JH, Kim JR, Lee J, Yu BP & Chung HY. (2008). Cytotoxicity of 1,2-diacetylbenzene in human neuroblastoma SHSY5Y cells is mediated by oxidative stress. *Toxicology* **243,** 216-223.

Kimball BC & Mulholland MW. (1996). Enteric glia exhibit P2U receptors that increase cytosolic calcium by a phospholipase C-dependent mechanism. *Journal of neurochemistry* **66,** 604-612.

Kitamura S, Miyazaki Y, Shinomura Y, Kondo S, Kanayama S & Matsuzawa Y. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Jpn J Cancer Res* **90,** 75-80.

Kobayashi M, Li L, Iwamoto N, Nakajima-Takagi Y, Kaneko H, Nakayama Y, Eguchi M, Wada Y, Kumagai Y & Yamamoto M. (2009). The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol Cell Biol* **29,** 493-502.

Kobayashi T, Nakatani Y, Tanioka T, Tsujimoto M, Nakajo S, Nakaya K, Murakami M & Kudo I. (2004). Regulation of cytosolic prostaglandin E synthase by phosphorylation. *Biochem J* **381,** 59-69.

Koeffler HP. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin Cancer Res* **9,** 1-9.

Konomi H, Meedeniya AC, Simula ME, Toouli J & Saccone GT. (2002). Characterization of circular muscle motor neurons of the duodenum and distal colon in the Australian brush-tailed possum. *J Comp Neurol* **443,** 15-26.

Konturek PC, Kania J, Burnat G, Hahn EG & Konturek SJ. (2005). Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* **56 Suppl 5,** 57-73.

Koppal T, Petrova TV & Van Eldik LJ. (2000). Cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) acts as a general inhibitor of inflammatory responses in activated BV-2 microglial cells. *Brain research* **867,** 115-121.

Koyama M, Izutani Y, Goda AE, Matsui TA, Horinaka M, Tomosugi M, Fujiwara J, Nakamura Y, Wakada M, Yogosawa S, Sowa Y & Sakai T. (2010). Histone deacetylase inhibitors and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 synergistically induce apoptosis. *Clin Cancer Res* **16,** 2320-2332.

Krispin S, Nitzan E, Kassem Y & Kalcheim C. (2010). Evidence for a dynamic spatiotemporal fate map and early fate restrictions of premigratory avian neural crest. *Development (Cambridge, England)* **137,** 585-595.

Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, Chu P, Lee M, Yuan J, Nusse R & Kuo CJ. (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101,** 266-271.

Kumasaka T, Aritake K, Ago H, Irikura D, Tsurumura T, Yamamoto M, Miyano M, Urade Y & Hayaishi O. (2009). Structural basis of the catalytic mechanism operating in open-closed conformers of lipocalin type prostaglandin D synthase. *J Biol Chem* **284,** 22344-22352.

Kunze WA, Bertrand PP, Furness JB & Bornstein JC. (1997). Influence of the mucosa on the excitability of myenteric neurons. *Neuroscience* **76,** 619-634.

Kunze WA & Furness JB. (1999). The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* **61,** 117-142.

Kunze WA, Clerc N, Furness JB & Gola M. (2000). The soma and neurites of primary afferent neurons in the guinea-pig intestine respond differentially to deformation. *J Physiol* **526 Pt 2,** 375-385.

Lacy ER. (1988). Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. *J Clin Gastroenterol* **10 Suppl 1,** S72-77.

Laprise P, Chailler P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ & Rivard N. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* **277,** 8226-8234.

Laranjeira C, Sandgren K, Kessaris N, Richardson W, Potocnik A, Vanden Berghe P & Pachnis V. (2011). Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J Clin Invest* **121,** 3412-3424.

Laukoetter MG, Nava P & Nusrat A. (2008). Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **14,** 401-407.

Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW & Johnson JA. (2003). Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *The Journal of biological chemistry* **278,** 12029-12038.

Lefebvre M, Paulweber B, Fajas L, Woods J, McCrary C, Colombel JF, Najib J, Fruchart JC, Datz C, Vidal H, Desreumaux P & Auwerx J. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J Endocrinol* **162,** 331-340.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM & Kliewer SA. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* **270,** 12953-12956.

Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM & Kliewer SA. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* **272,** 3406-3410.

Levonen AL, Dickinson DA, Moellering DR, Mulcahy RT, Forman HJ & Darley-Usmar VM. (2001). Biphasic effects of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) on glutathione induction and apoptosis in human endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **21,** 1846-1851.

Levonen AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, Morrow JD & Darley-Usmar VM. (2004). Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* **378,** 373-382.

Levy P, Robin H, Kornprobst M, Capeau J & Cherqui G. (1998). Enterocytic differentiation of the human Caco-2 cell line correlates with alterations in integrin signaling. *J Cell Physiol* **177,** 618-627.

Lim SY, Jang JH, Na HK, Lu SC, Rahman I & Surh YJ. (2004). 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J(2) protects against nitrosative PC12 cell death through up-regulation of intracellular glutathione synthesis. *The Journal of biological chemistry* **279,** 46263-46270.

Lin A, Lourenssen S, Stanzel RD & Blennerhassett MG. (2005). Selective loss of NGF-sensitive neurons following experimental colitis. *Exp Neurol* **191,** 337-343.

Lin TN, Cheung WM, Wu JS, Chen JJ, Lin H, Chen JJ, Liou JY, Shyue SK & Wu KK. (2006). 15d-prostaglandin J2 protects brain from ischemia-reperfusion injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26,** 481-487.

Linden DR, Couvrette JM, Ciolino A, McQuoid C, Blaszyk H, Sharkey KA & Mawe GM. (2005). Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterol Motil* **17,** 751-760.

Liu YA, Chen Y, Chiang AS, Peng SJ, Pasricha PJ & Tang SC. (2011). Optical clearing improves the imaging depth and signal-to-noise ratio for digital analysis and three-dimensional projection of the human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **23,** e446-457.

Lomax AE, Sharkey KA, Bertrand PP, Low AM, Bornstein JC & Furness JB. (1999). Correlation of morphology, electrophysiology and chemistry of neurons in the myenteric plexus of the guinea-pig distal colon. *J Auton Nerv Syst* **76,** 45-61.

Lomax AE & Furness JB. (2000). Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell and tissue research* **302,** 59-72.

Lovgren AK, Kovarova M & Koller BH. (2007). cPGES/p23 is required for glucocorticoid receptor function and embryonic growth but not prostaglandin E2 synthesis. *Mol Cell Biol* **27,** 4416-4430.

Lu SC. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* **30,** 42-59.

Maka M, Stolt CC & Wegner M. (2005). Identification of Sox8 as a modifier gene in a mouse model of Hirschsprung disease reveals underlying molecular defect. *Dev Biol* **277,** 155-169.

Mammen JM & Matthews JB. (2003). Mucosal repair in the gastrointestinal tract. *Crit Care Med* **31,** S532-537.

Mancini JA, Blood K, Guay J, Gordon R, Claveau D, Chan CC & Riendeau D. (2001). Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin e synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J Biol Chem* **276,** 4469-4475.

Mankertz J & Schulzke JD. (2007). Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol* **23,** 379-383.

Manya H, Sato Y, Eguchi N, Seiki K, Oda H, Nakajima H, Urade Y & Endo T. (2000). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human lipocalin-type prostaglandin D synthase purified from urine and amniotic fluid, and recombinantly expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biochem* **127,** 1001-1011.

Marchionni MA, Goodearl AD, Chen MS, Bermingham-McDonogh O, Kirk C, Hendricks M, Danehy F, Misumi D, Sudhalter J, Kobayashi K & et al. (1993). Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* **362,** 312-318.

Marshman E, Booth C & Potten CS. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* **24,** 91-98.

Marx N, Duez H, Fruchart JC & Staels B. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res* **94,** 1168-1178.

Mase M, Yamada K, Iwata A, Matsumoto T, Seiki K, Oda H & Urade Y. (1999). Acute and transient increase of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) level in cerebrospinal fluid of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosci Lett* **270,** 188-190.

Matsubayashi Y, Iwai L, Toda T, Lu QR & Kawasaki H. (2009). Immunostaining for oligodendrocyte-specific galactosphingolipids in fixed brain sections using the cholesterol-selective detergent digitonin. *J Neurosci Methods* **178,** 87-98.

Matsushita N, Aritake K, Takada A, Hizue M, Hayashi K, Mitsui K, Hayashi M, Hirotsu I, Kimura Y, Tani T & Nakajima H. (1998a). Pharmacological studies on the novel antiallergic drug HQL-79: II. Elucidation of mechanisms for antiallergic and antiasthmatic effects. *Jpn J Pharmacol* **78,** 11-22.

Matsushita N, Hizue M, Aritake K, Hayashi K, Takada A, Mitsui K, Hayashi M, Hirotsu I, Kimura Y, Tani T & Nakajima H. (1998b). Pharmacological studies on the novel antiallergic drug HQL-79: I. Antiallergic and antiasthmatic effects in various experimental models. *Jpn J Pharmacol* **78,** 1-10.

Matthiessen MW, Pedersen G, Albrektsen T, Adamsen S, Fleckner J & Brynskov J. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor expression and activation in normal human colonic epithelial cells and tubular adenomas. *Scand J Gastroenterol* **40,** 198-205.

Maudlej N & Hanani M. (1992). Modulation of dye coupling among glial cells in the myenteric and submucosal plexuses of the guinea pig. *Brain research* **578,** 94-98.

McAllister MS, Krizanac-Bengez L, Macchia F, Naftalin RJ, Pedley KC, Mayberg MR, Marroni M, Leaman S, Stanness KA & Janigro D. (2001). Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study. *Brain research* **904,** 20-30.

McConalogue K & Furness JB. (1994). Gastrointestinal neurotransmitters. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **8,** 51-76.

McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Chanas SA, Henderson CJ, McLellan LI, Wolf CR, Cavin C & Hayes JD. (2001). The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res* **61,** 3299-3307.

McMahon M, Itoh K, Yamamoto M & Hayes JD. (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *The Journal of biological chemistry* **278,** 21592-21600.

Medema JP & Vermeulen L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* **474,** 318-326.

Meissner G. (1857). Über die Nerven der Darmwand. . *Z Ration Med N F* **,** 364-366.

Menard D & Pothier P. (1987). Differential distribution of digestive enzymes in isolated epithelial cells from developing human fetal small intestine and colon. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **6,** 509-516.

Minich T, Riemer J, Schulz JB, Wielinga P, Wijnholds J & Dringen R. (2006). The multidrug resistance protein 1 (Mrp1), but not Mrp5, mediates export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes. *Journal of neurochemistry* **97,** 373-384.

Modlin IM, Kidd M & Farhadi J. (2000). Bayliss and Starling and the nascence of endocrinology. *Regulatory peptides* **93,** 109-123.

Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A & Kan YW. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91,** 9926-9930.

Monneret G, Li H, Vasilescu J, Rokach J & Powell WS. (2002). 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandins D2 and J2 are potent activators of human eosinophils. *J Immunol* **168,** 3563-3569.

Monneret G, Cossette C, Gravel S, Rokach J & Powell WS. (2003). 15R-methyl-prostaglandin D2 is a potent and selective CRTH2/DP2 receptor agonist in human eosinophils. *J Pharmacol Exp Ther* **304,** 349-355.

Moriai M, Tsuji N, Kobayashi D, Kuribayashi K & Watanabe N. (2009). Down-regulation of hTERT expression plays an important role in 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol* **34,** 1363-1372.

Moriez R, Abdo H, Chaumette T, Faure M, Lardeux B & Neunlist M. (2009). Neuroplasticity and neuroprotection in enteric neurons: role of epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **382,** 577-582.

Morteau O, Morham SG, Sellon R, Dieleman LA, Langenbach R, Smithies O & Sartor RB. (2000). Impaired mucosal defense to acute colonic injury in mice lacking cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* **105,** 469-478.

Motohashi H, O'Connor T, Katsuoka F, Engel JD & Yamamoto M. (2002). Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* **294,** 1-12.

Munoz U, de Las Cuevas N, Bartolome F, Hermida OG, Bermejo F & Martin-Requero A. (2005). The cyclopentenone 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 inhibits G1/S transition and retinoblastoma protein phosphorylation in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Exp Neurol* **195,** 508-517.

Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S & Kudo I. (2000). Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **275,** 32783-32792.

Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Ohmiya Y, Watanabe K & Kudo I. (2003). Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem* **278,** 37937-37947.

Murphy GJ & Holder JC. (2000). PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci* **21,** 469-474.

Myers KA, Lambe KG, Aldridge TC, Macdonald N & Tugwood JD. (1997). Amino acid residues in both the DNA-binding and ligand-binding domains influence transcriptional activity of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* **239,** 522-526.

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.

Nakatani Y, Hokonohara Y, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y & Kudo I. (2007). Knockout mice lacking cPGES/p23, a constitutively expressed PGE2 synthetic enzyme, are peri-natally lethal. *Biochem Biophys Res Commun* **362,** 387-392.

Narumiya S & Fukushima M. (1986). Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. I. Active transport and intracellular accumulation of cyclopentenone prostaglandins, a reaction leading to growth inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* **239,** 500-505.

Nasser Y, Fernandez E, Keenan CM, Ho W, Oland LD, Tibbles LA, Schemann M, MacNaughton WK, Ruhl A & Sharkey KA. (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.

Neunlist M, Michel K, Reiche D, Dobreva G, Huber K & Schemann M. (2001). Glycine activates myenteric neurones in adult guinea-pigs. *J Physiol* **536,** 727-739.

Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisse CL, Galmiche JP & Jarry A. (2003). Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285,** G1028-1036.

Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Ruhl A, Lardeux B, Savidge T, Paris F & Galmiche JP. (2007). Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292,** G231-241.

Neunlist M, Van Landeghem L, Bourreille A & Savidge T. (2008). Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *Journal of internal medicine* **263,** 577-583.

Newgreen D & Young HM. (2002). Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 1. *Pediatr Dev Pathol* **5,** 224-247.

Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, Yang CS & Pickett CB. (2003). Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *The Journal of biological chemistry* **278,** 4536-4541.

Nguyen T, Yang CS & Pickett CB. (2004). The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic Biol Med* **37,** 433-441.

Nieto N, Torres MI, Rios A & Gil A. (2002). Dietary polyunsaturated fatty acids improve histological and biochemical alterations in rats with experimental ulcerative colitis. *J Nutr* **132,** 11-19.

Nixon JB, Kim KS, Lamb PW, Bottone FG & Eling TE. (2004). 15-Lipoxygenase-1 has anti-tumorigenic effects in colorectal cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **70,** 7-15.

Olsson C & Holmgren S. (2001). The control of gut motility. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **128,** 481-503.

Ondrey F. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma pathway targeting in carcinogenesis: implications for chemoprevention. *Clin Cancer Res* **15,** 2-8.

Onyango IG, Tuttle JB & Bennett JP, Jr. (2005). Brain-derived growth factor and glial cell line-derived growth factor use distinct intracellular signaling pathways to protect PD cybrids from H2O2-induced neuronal death. *Neurobiol Dis* **20,** 141-154.

Osburn WO, Karim B, Dolan PM, Liu G, Yamamoto M, Huso DL & Kensler TW. (2007). Increased colonic inflammatory injury and formation of aberrant crypt foci in Nrf2-deficient mice upon dextran sulfate treatment. *Int J Cancer* **121,** 1883-1891.

Ou Z, Zhao X, Labiche LA, Strong R, Grotta JC, Herrmann O & Aronowski J. (2006). Neuronal expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) and 15d-prostaglandin J2--mediated protection of brain after experimental cerebral ischemia in rat. *Brain research* **1096,** 196-203.

Park EJ, Park SY, Joe EH & Jou I. (2003). 15d-PGJ2 and rosiglitazone suppress Janus kinase-STAT inflammatory signaling through induction of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and SOCS3 in glia. *J Biol Chem* **278,** 14747-14752.

Park JM, Kanaoka Y, Eguchi N, Aritake K, Grujic S, Materi AM, Buslon VS, Tippin BL, Kwong AM, Salido E, French SW, Urade Y & Lin HJ. (2007). Hematopoietic prostaglandin D synthase suppresses intestinal adenomas in ApcMin/+ mice. *Cancer Res* **67,** 881-889.

Park JY, Pillinger MH & Abramson SB. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clinical immunology (Orlando, Fla* **119,** 229-240.

Patsos G & Corfield A. (2009). Management of the human mucosal defensive barrier: evidence for glycan legislation. *Biol Chem* **390,** 581-590.

Pei L, Zhang Y, Chu X, Zhang J, Wang R, Liu M, Zhu X & Yu W. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes neuroprotection by modulating cyclin D1 expression after focal cerebral ischemia. *Can J Physiol Pharmacol* **88,** 716-723.

Pettipher R & Hansel TT. (2008). Antagonists of the prostaglandin D2 receptor CRTH2. *Drug News Perspect* **21,** 317-322.

Phulwani NK, Feinstein DL, Gavrilyuk V, Akar C & Kielian T. (2006). 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) and ciglitazone modulate Staphylococcus aureus-dependent astrocyte activation primarily through a PPAR-gamma-independent pathway. *Journal of neurochemistry* **99,** 1389-1402.

Piche T, Barbara G, Aubert P, Bruley des Varannes S, Dainese R, Nano JL, Cremon C, Stanghellini V, De Giorgio R, Galmiche JP & Neunlist M. (2009). Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* **58,** 196-201.

Pinto D, Gregorieff A, Begthel H & Clevers H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* **17,** 1709-1713.

Pinto D & Clevers H. (2005). Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res* **306,** 357-363.

Pinzar E, Kanaoka Y, Inui T, Eguchi N, Urade Y & Hayaishi O. (2000). Prostaglandin D synthase gene is involved in the regulation of non-rapid eye movement sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97,** 4903-4907.

Podolsky DK. (1999). Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am J Physiol* **277,** G495-499.

Pompolo S & Furness JB. (1993). Origins of synaptic inputs to calretinin immunoreactive neurons in the guinea-pig small intestine. *J Neurocytol* **22,** 531-546.

Pompolo S & Furness JB. (1998). Quantitative analysis of inputs to somatostatin-immunoreactive descending interneurons in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* **294,** 219-226.

Poncin S, Gerard AC, Boucquey M, Senou M, Calderon PB, Knoops B, Lengele B, Many MC & Colin IM. (2008). Oxidative stress in the thyroid gland: from harmlessness to hazard depending on the iodine content. *Endocrinology* **149,** 424-433.

Ponferrada A, Caso JR, Alou L, Colon A, Sevillano D, Moro MA, Lizasoain I, Menchen P, Gomez-Lus ML, Lorenzo P, Cos E, Leza JC & Menchen L. (2007). The role of PPARgamma on restoration of colonic homeostasis after experimental stress-induced inflammation and dysfunction. *Gastroenterology* **132,** 1791-1803.

Potten CS. (1997). Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am J Physiol* **273,** G253-257.

Potten CS. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353,** 821-830.

Prasad R, Giri S, Singh AK & Singh I. (2008). 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 attenuates endothelial-monocyte interaction: implication for inflammatory diseases. *J Inflamm (Lond)* **5,** 14.

Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P & Kensler TW. (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98,** 3410-3415.

Reiche D, Pfannkuche H, Michel K & Schemann M. (1998). Structural and functional organization of the enteric nervous system in the stomach. *Dtw* **105,** 461-465.

Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, Bordi C & Solcia E. (2004). The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Ann N Y Acad Sci* **1014,** 1-12.

Ruhl A, Franzke S, Collins SM & Stremmel W. (2001a). Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280,** G1163-1171.

Ruhl A, Trotter J & Stremmel W. (2001b). Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglial cell lines from the myenteric plexus of adult rat. *Neurogastroenterol Motil* **13,** 95-106.

Ruhl A. (2005). Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil* **17,** 777-790.

Ruhl A, Hoppe S, Frey I, Daniel H & Schemann M. (2005). Functional expression of the peptide transporter PEPT2 in the mammalian enteric nervous system. *J Comp Neurol* **490,** 1-11.

Sancho E, Batlle E & Clevers H. (2004). Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20,** 695-723.

Sang Q, Williamson S & Young HM. (1997). Projections of chemically identified myenteric neurons of the small and large intestine of the mouse. *J Anat* **190 (Pt 2),** 209-222.

Sangiorgi E & Capecchi MR. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* **40,** 915-920.

Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, Batlle E, Simon-Assmann P, Clevers H, Nathke IS, Clarke AR & Winton DJ. (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* **18,** 1385-1390.

Sarosi GA, Jr., Kimball BC, Barnhart DC, Zhang W & Mulholland MW. (1998). Tachykinin neuropeptide-evoked intracellular calcium transients in cultured guinea pig myenteric neurons. *Peptides* **19,** 75-84.

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

Savidge TC, Sofroniew MV & Neunlist M. (2007b). Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. *Lab Invest* **87,** 731-736.

Scabadasch A. (1930). Intramurale Nervengeflechte des Darmrohrs. *Z Zellforsch***,** 320–385.

Schemann M, Schaaf C & Mader M. (1995). Neurochemical coding of enteric neurons in the guinea pig stomach. *The Journal of comparative neurology* **353,** 161-178.

Scher JU & Pillinger MH. (2005). 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol* **114,** 100-109.

Schiller M, Javelaud D & Mauviel A. (2004). TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* **35,** 83-92.

Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A & Simons K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100,** 5795-5800.

Schuster VL. (2002). Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69,** 633-647.

Sechi LA, Ruehl A, Ahmed N, Usai D, Paccagnini D, Felis GE & Zanetti S. (2007). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infects and multiplies in enteric glial cells. *World J Gastroenterol* **13,** 5731-5735.

Selgrad M, De Giorgio R, Fini L, Cogliandro RF, Williams S, Stanghellini V, Barbara G, Tonini M, Corinaldesi R, Genta RM, Domiati-Saad R, Meyer R, Goel A, Boland CR & Ricciardiello L. (2009). JC virus infects the enteric glia of patients with chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction. *Gut* **58,** 25-32.

Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ & Lazar MA. (1998). Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature* **396,** 377-380.

Sharkey KA, Parr EJ & Keenan CM. (1999). Immediate-early gene expression in the inferior mesenteric ganglion and colonic myenteric plexus of the guinea pig. *J Neurosci* **19,** 2755-2764.

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

Sheibanie AF, Yen JH, Khayrullina T, Emig F, Zhang M, Tuma R & Ganea D. (2007). The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23-->IL-17 axis. *J Immunol* **178,** 8138-8147.

Sher T, Yi HF, McBride OW & Gonzalez FJ. (1993). cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* **32,** 5598-5604.

Shibata T, Kondo M, Osawa T, Shibata N, Kobayashi M & Uchida K. (2002). 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J Biol Chem* **277,** 10459-10466.

Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA & Murphy TH. (2003). Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci* **23,** 3394-3406.

Shih AY, Li P & Murphy TH. (2005). A small-molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo. *J Neurosci* **25,** 10321-10335.

Shimada T, Kojima K, Yoshiura K, Hiraishi H & Terano A. (2002). Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut* **50,** 658-664.

Shin SW, Seo CY, Han H, Han JY, Jeong JS, Kwak JY & Park JI. (2009). 15d-PGJ2 induces apoptosis by reactive oxygen species-mediated inactivation of Akt in leukemia and colorectal cancer cells and shows in vivo antitumor activity. *Clin Cancer Res* **15,** 5414-5425.

Singh RJ, Hogg N, Joseph J & Kalyanaraman B. (1996). Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J Biol Chem* **271,** 18596-18603.

Smith WL, DeWitt DL & Garavito RM. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* **69,** 145-182.

Song ZM, Brookes SJ & Costa M. (1991). Identification of myenteric neurons which project to the mucosa of the guinea-pig small intestine. *Neurosci Lett* **129,** 294-298.

Spiegelman BM. (1998). PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* **47,** 507-514.

Steinkamp M, Geerling I, Seufferlein T, von Boyen G, Egger B, Grossmann J, Ludwig L, Adler G & Reinshagen M. (2003). Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* **124,** 1748-1757.

Stohr P, Jr. (1952). [Synopsis of research results on the microscopic innervation of the gastrointestinal tract.]. *Ergeb Anat Entwicklungsgesch* **34,** 250-401.

Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G & Glass CK. (2000). 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97,** 4844-4849.

Straus DS & Glass CK. (2001). Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* **21,** 185-210.

Sturm A & Dignass AU. (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **14,** 348-353.

Surh YJ, Na HK, Park JM, Lee HN, Kim W, Yoon IS & Kim DD. (2011). 15-Deoxy-Delta(1)(2),(1)-prostaglandin J, an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. *Biochemical pharmacology* **82,** 1335-1351.

Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, Nagasawa S & Takahashi K. (2002). A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J Biol Chem* **277,** 41254-41258.

Tanabe T & Tohnai N. (2002). Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69,** 95-114.

Tanaka K, Ogawa K, Sugamura K, Nakamura M, Takano S & Nagata K. (2000). Cutting edge: differential production of prostaglandin D2 by human helper T cell subsets. *J Immunol* **164,** 2277-2280.

Tanaka T, Urade Y, Kimura H, Eguchi N, Nishikawa A & Hayaishi O. (1997). Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is a newly recognized type of retinoid transporter. *J Biol Chem* **272,** 15789-15795.

Tanikawa N, Ohmiya Y, Ohkubo H, Hashimoto K, Kangawa K, Kojima M, Ito S & Watanabe K. (2002). Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun* **291,** 884-889.

Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M & Kudo I. (2000). Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem* **275,** 32775-32782.

Taupin D & Podolsky DK. (2003). Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4,** 721-732.

Tetsu O & McCormick F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398,** 422-426.

Thompson JS, Nguyen BL & Harty RF. (1993). Somatostatin analogue inhibits intestinal regeneration. *Arch Surg* **128,** 385-389.

Thomson AM, Meyer DJ & Hayes JD. (1998). Sequence, catalytic properties and expression of chicken glutathione-dependent prostaglandin D2 synthase, a novel class Sigma glutathione S-transferase. *Biochem J* **333 (Pt 2),** 317-325.

Thoren S & Jakobsson PJ. (2000). Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. *Eur J Biochem* **267,** 6428-6434.

Timmermans JP, Scheuermann DW, Stach W, Adriaensen D & De Groodt-Lasseel MH. (1992). Functional morphology of the enteric nervous system with special reference to large mammals. *Eur J Morphol* **30,** 113-122.

Toh H, Kubodera H, Nakajima N, Sekiya T, Eguchi N, Tanaka T, Urade Y & Hayaishi O. (1996). Glutathione-independent prostaglandin D synthase as a lead molecule for designing new functional proteins. *Protein Eng* **9,** 1067-1082.

Toumi F, Neunlist M, Cassagnau E, Parois S, Laboisse CL, Galmiche JP & Jarry A. (2003). Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol Motil* **15,** 239-242.

Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL & Green S. (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J* **11,** 433-439.

Urade Y. (1985). [Prostaglandin D synthetase and brain]. *Seikagaku* **57,** 1624-1629.

Urade Y, Ujihara M, Horiguchi Y, Igarashi M, Nagata A, Ikai K & Hayaishi O. (1990). Mast cells contain spleen-type prostaglandin D synthetase. *J Biol Chem* **265,** 371-375.

Urade Y, Tanaka T, Eguchi N, Kikuchi M, Kimura H, Toh H & Hayaishi O. (1995). Structural and functional significance of cysteine residues of glutathione-independent prostaglandin D synthase. Identification of Cys65 as an essential thiol. *J Biol Chem* **270,** 1422-1428.

Urade Y & Hayaishi O. (2000a). Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim Biophys Acta* **1482,** 259-271.

Urade Y & Hayaishi O. (2000b). Prostaglandin D synthase: structure and function. *Vitam Horm* **58,** 89-120.

Urade Y & Eguchi N. (2002). Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69,** 375-382.

Ushikubi F, Sugimoto Y, Ichikawa A & Narumiya S. (2000). Roles of prostanoids revealed from studies using mice lacking specific prostanoid receptors. *Jpn J Pharmacol* **83,** 279-285.

Vachon PH, Cardin E, Harnois C, Reed JC & Vezina A. (2000). Early establishment of epithelial apoptosis in the developing human small intestine. *Int J Dev Biol* **44,** 891-898.

Vachon PH. (2006). [Cell survival: differences and differentiation]. *Med Sci (Paris)* **22,** 423-429.

van der Flier LG & Clevers H. (2008). Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu Rev Physiol*.

Van Landeghem L, Mahe MM, Teusan R, Leger J, Guisle I, Houlgatte R & Neunlist M. (2009). Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: impact on intestinal epithelial barrier functions. *BMC Genomics* **10,** 507.

Van Landeghem L, Chevalier J, Mahe MM, 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,** G976-987.

Vanderwinden JM, Timmermans JP & Schiffmann SN. (2003). Glial cells, but not interstitial cells, express P2X7, an ionotropic purinergic receptor, in rat gastrointestinal musculature. *Cell Tissue Res* **312,** 149-154.

Vesin MF, Billotte C & Droz B. (1995a). Biosynthesis of prostaglandin D2 by motoneurons and dorsal horn microneurons: a biochemical and high resolution immunocytochemical study in chick spinal cord. *Neuroscience* **69,** 967-975.

Vesin MF, Urade Y, Hayaishi O & Droz B. (1995b). Neuronal and glial prostaglandin D synthase isozymes in chick dorsal root ganglia: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *J Neurosci* **15,** 470-476.

Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF & Flier JS. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* **99,** 2416-2422.

Vieira de Barros K, Gomes de Abreu G, Xavier RA, Real Martinez CA, Ribeiro ML, Gambero A, de Oliveira Carvalho P & Silveira VL. (2011). Effects of a high fat or a balanced omega 3/omega 6 diet on cytokines levels and DNA damage in experimental colitis. *Nutrition* **27,** 221-226.

von Boyen GB, Steinkamp M, Geerling I, Reinshagen M, Schafer KH, Adler G & Kirsch J. (2006a). Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **12,** 346-354.

von Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, Schafer KH, Adler G & Kirsch J. (2006b). Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines. *J Neuroendocrinol* **18,** 820-825.

Vong L, Ferraz JG, Panaccione R, Beck PL & Wallace JL. (2010). A pro-resolution mediator, prostaglandin D(2), is specifically up-regulated in individuals in long-term remission from ulcerative colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107,** 12023-12027.

Wada K & Kamisaki Y. (2003). [Role of PPARgamma in the development of the central nervous system]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* **122,** 301-308.

Wallace AS & Burns AJ. (2005). Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell and tissue research* **319,** 367-382.

Wang D & Dubois RN. (2006). Prostaglandins and cancer. *Gut* **55,** 115-122.

Wedel T, Krammer HJ, Kuhnel W & Sigge W. (1998). Alterations of the enteric nervous system in neonatal necrotizing enterocolitis revealed by whole-mount immunohistochemistry. *Pediatr Pathol Lab Med* **18,** 57-70.

Wedel T, Roblick U, Gleiss J, Schiedeck T, Bruch HP, Kühnel W & Krammer HJ. (1999). Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus. *Ann Anat* **181,** 327-337.

Wehkamp J & Stange EF. (2006). Paneth cells and the innate immune response. *Curr Opin Gastroenterol* **22,** 644-650.

Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD & Henke BR. (2000). The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* **43,** 527-550.

Winterbourn CC & Metodiewa D. (1994). The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys* **314,** 284-290.

Wolf M, Schrodl F, Neuhuber W & Brehmer A. (2007). Calcitonin gene-related peptide: a marker for putative primary afferent neurons in the pig small intestinal myenteric plexus? *Anat Rec (Hoboken)* **290,** 1273-1279.

Wood JD, Alpers DH & Andrews PL. (1999). Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* **45 Suppl 2,** II6-II16.

Yamagata K, Matsumura K, Inoue W, Shiraki T, Suzuki K, Yasuda S, Sugiura H, Cao C, Watanabe Y & Kobayashi S. (2001). Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J Neurosci* **21,** 2669-2677.

Yoh K, Itoh K, Enomoto A, Hirayama A, Yamaguchi N, Kobayashi M, Morito N, Koyama A, Yamamoto M & Takahashi S. (2001). Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis. *Kidney Int* **60,** 1343-1353.

Young HM, Bergner AJ & Muller T. (2003). Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J Comp Neurol* **456,** 1-11.

Yu X, Shao XG, Sun H, Li YN, Yang J, Deng YC & Huang YG. (2008). Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma exerts neuroprotection by inhibiting oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain research* **1200,** 146-158.

Yuan J, Takahashi A, Masumori N, Uchida K, Hisasue S, Kitamura H, Itoh N & Tsukamoto T. (2005). Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma have potent antitumor effect against human renal cell carcinoma. *Urology* **65,** 594-599.

Zamuner SR, Warrier N, Buret AG, MacNaughton WK & Wallace JL. (2003). Cyclooxygenase 2 mediates post-inflammatory colonic secretory and barrier dysfunction. *Gut* **52,** 1714-1720.

Zamuner SR, Bak AW, Devchand PR & Wallace JL. (2005). Predisposition to colorectal cancer in rats with resolved colitis: role of cyclooxygenase-2-derived prostaglandin d2. *Am J Pathol* **167,** 1293-1300.

Zhang DD, Lo SC, Cross JV, Templeton DJ & Hannink M. (2004). Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol* **24,** 10941-10953.

Zhang W, Segura BJ, Lin TR, Hu Y & Mulholland MW. (2003). Intercellular calcium waves in cultured enteric glia from neonatal guinea pig. *Glia* **42,** 252-262.

Zhao ML, Brosnan CF & Lee SC. (2004). 15-deoxy-delta (12,14)-PGJ2 inhibits astrocyte IL-1 signaling: inhibition of NF-kappaB and MAP kinase pathways and suppression of cytokine and chemokine expression. *Journal of neuroimmunology* **153,** 132-142.

Zhao X, Ou Z, Grotta JC, Waxham N & Aronowski J. (2006). Peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) activation protects neurons from NMDA excitotoxicity. *Brain research* **1073-1074,** 460-469.

Zhu F, Wang P, Kontrogianni-Konstantopoulos A & Konstantopoulos K. (2010). Prostaglandin (PG)D(2) and 15-deoxy-Delta(12,14)-PGJ(2), but not PGE(2), mediate shear-induced chondrocyte apoptosis via protein kinase A-dependent regulation of polo-like kinases. *Cell Death Differ* **17,** 1325-1334.

Zhu Y, Alvares K, Huang Q, Rao MS & Reddy JK. (1993). Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *J Biol Chem* **268,** 26817-26820.

LES CELLULES GLIALES ENTERIQUES : SOURCE DE 15d-PGJ$_2$ IMPLIQUEE DANS LE CONTROLE DES FONCTIONS DE LA BARRIERE EPITHELIALE INTESTINALE ET DANS LA SURVIE NEURONALE.

Des études récentes suggèrent que les cellules gliales entériques (CGE) ont un rôle essentiel dans les fonctions de la barrière épithéliale intestinale (BEI) et dans la survie neuronale, les effets des CGE étant souvent associés à la libération de facteurs gliaux.

Dans ce contexte, ce travail de thèse a d'abord permis d'identifier la 15-déoxy-$\Delta^{12,14}$ prostaglandine J_2 (15d-PGJ_2), un dérivé de l'acide arachidonique, comme nouveau facteur synthétisé et sécrété par les CGE. Les résultats obtenus montrent que les CGE et la 15d-PGJ_2 inhibent la prolifération des cellules épithéliales intestinales (CEI) et augmentent leur différenciation en utilisant une voie de signalisation dépendante de PPARγ. Nos résultats montrent également un effet neuroprotecteur des CGE et de la 15d-PGJ_2 sur les neurones entériques dans des situations de stress oxydant avec une activation de la synthèse du glutathion dans les neurones, associée à une voie de signalisation dépendante de Nrf2. Enfin, dans une étude *in vivo* de carcinogénèse colique chez la souris, des altérations de marqueurs gliaux et des enzymes impliquées dans la synthèse des prostaglandines ont été mis en évidence. Une approche globale *in situ* du système nerveux entérique mise au point dans ce travail devrait permettre de compléter ces études physiopathologiques.

La mise en évidence des effets pléïotropiques de ce nouveau médiateur lipidique d'origine gliale, la 15d-PGJ_2, souligne l'importance des CGE au sein de l'unité neuro-glio-épithéliale et dans le contrôle des fonctions digestives.

Mots clés: cellule gliale entérique, 15d-PGJ_2, cellule épithéliale intestinale, PPARγ neuroprotection, Nrf2

ENTERIC GLIAL CELLS : SOURCE OF 15d-PGJ$_2$ INVOLVED IN THE CONTROL OF INTESTINAL BARRIER FUNCTIONS AND IN THE NEURONAL SURVIVAL

Increasing evidences suggest that enteric glial cells (EGC) are critical for intestinal epithelial barrier (IEB) functions and enteric neurons survival. EGC effects are currently associated to the release of glial-derived factors.

In this context, this work leads to the identification of 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$ prostaglandin J_2 (15d-PGJ_2), an ω-6 fatty acid derivative, as a new mediator synthetized and secreted by EGC. Results show that both EGC and 15d-PGJ_2 inhibit intestinal epithelial cells (IEC) proliferation and promote IEC differenciation through a PPARγ dependant pathway. In addition, our results show a neuroprotective effect of EGC and 15d-PGJ_2 on enteric neurons, against an oxidative stress, with the activation of glutathione synthesis, associated to the Nrf2 pathway. Finally, *in vivo* murine colorectal carcinogenesis was associated with an alteration of glial markers and prostaglandin enzyme expression. An *in situ* analysis of enteric nervous system, using a method developed in this work, might complete these pathophysiological studies.

The pleiotropic effects revealing of this new glial-derived lipidic mediator, the 15d-PGJ_2, arise the crucial role of EGC in the neuro-glio-epithelial unit and in digestive function control.

Keywords: enteric glial cell, 15d-PGJ_2, intestinal epithelial cell, PPARγ, neuroprotection, Nrf2