

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Neurosciences - neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Benjamin DUCAROUGE

Thèse dirigée par **Muriel JACQUIER-SARLIN**

préparée au sein du **Laboratoire Stress et interactions neurodigestives (Grenoble Institut des Neurosciences)**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Régulation des systèmes d'adhérence cellulaire par le CRF2:

Un effecteur du Stress dans le tube digestif

Thèse soutenue publiquement le **13 mars 2012**,
devant le jury composé de :

Mme Vassilia THEODOROU

PU, INRA de Toulouse, rapporteur

Mme Sophie THENET

MCU, EPHE de Paris, rapporteur

Mr Stéfan NONCHEV

PU, Université de Grenoble, Président

Mr Patrick MEHLEN

DR1, CNRS au Centre Léon Bérard de Lyon, examinateur

Mr Bruno BONAZ

PU – PH, CHU de Grenoble, examinateur

Mme Muriel JACQUIER-SARLIN

MCU, Université de Grenoble, directrice de thèse



Résumé

Le stress est impliqué dans le développement et l'exacerbation de diverses pathologies notamment au niveau intestinal. Les effets du stress dépendent de l'expression de neuromédiateurs spécifiques, le Corticotropin-Releasing Factor (CRF), les Urocortines et de leurs récepteurs (CRF1 et CRF2). Notre étude porte sur la régulation et la fonction du CRF2 au niveau des entérocytes et des cellules tumorales coliques humaines. *In vivo*, nous avons montré que le stress et l'inflammation conduisent à l'augmentation de l'expression du CRF2 dans les colonocytes chez le rat. Dans les tumeurs, l'expression du CRF2 augmente avec le grade tumoral. *In vitro*, dans les cellules HT-29, l'activation du CRF2 induit une altération des jonctions adhérentes et des adhérences focales par la voie Src/ERK/FAK. Ces mécanismes sont responsables de la régulation de la perméabilité épithéliale et de l'augmentation de la migration des cellules tumorales. Ces travaux contribuent à la compréhension des mécanismes impliquant le stress dans le développement des pathologies intestinales.

Abstract

Stress is involved in the initiation and the exacerbation of several diseases especially in the intestine. Stress effects depends on the expression of specific neuromediators like Corticotropin-Releasing Factor (CRF), Urocortins and there receptors (CRF1 and CRF2). Our study is about regulation and function of the CRF2, a stress receptor expressed in human enterocytes and colorectal cancer cells. *In vivo*, we showed that stress and inflammation are responsible for the increased expression of the CRF2 in colon epithelial cells of rats. In tumors, the CRF2 expression is increased with the tumor. *In vitro*, in HT-29 cells, the CRF2 activation leads to the alteration of adherens junctions and focal adhesions by a Src/ERK/FAK pathway. These mechanisms are responsible for the regulation of epithelial cell permeability and the increased migration of tumor cells. This work contributes to the understanding of the pathways involved in the regulation of intestinal diseases by stress.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « Stress et Interactions Neuro-digestives » dirigée par le Pr Bruno Bonaz. Je le remercie de m'avoir accordé sa confiance en m'accueillant au sein du laboratoire et de m'avoir donné toute l'autonomie dont j'ai bénéficié durant ma thèse.

Je remercie tout particulièrement Muriel Jacquier-Sarlin, tant pour l'encadrement et le suivi de mes travaux que pour son amitié et sa confiance. Il y a déjà plus de huit ans, un premier stage de laboratoire fut l'occasion d'une rencontre humaine - rencontre qui a duré jusqu'à aujourd'hui et qui j'espère durera encore longtemps. Merci à elle pour l'éveil à la recherche scientifique qu'elle a su susciter en moi et entretenir au fil du temps. Son soutien à la paillasse comme dans l'amitié a en effet grandement contribué à mon envie de continuer dans la recherche.

Je remercie les autres membres du Jury: le Pr Stéfan Nonchev, la Pr Vassilia Théodorou, la Dr Sophie Thenet et le Pr Patrick Mehlen, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Un grand merci à l'ensemble des membres de l'équipe « Stress et Interactions Neuro-digestives » qui se sont intéressés et qui ont participé à ce projet. Au sein de notre groupe de recherche, je remercie les titulaires comme les stagiaires, qui ont tous contribué, de près comme de loin, à l'avancée de mon travail : Michèle, Nadine, Brigitte, Monica, Fred, Sonia, Valérie, Marjo, Houssam et Yvan.

Mes pensées et remerciements vont également à mes collègues complices du GIN, sans qui ce parcours n'aurait pas été le même : Sab et Seb pour leur sympathie, nos discussions et nos séances de jogging (ne tombez pas dans les mauvais 75%). Carole pour sa bonne humeur, son franc-parler et son soutien à la paillasse. Le noyau dur des étudiants : Guillaume (the « black sheep ») ; Mathieu (« la doucette qui quand elle veut, elle peut ! ») et Audrey. Et sans oublier bien sûr les « nouveaux » : Fanny, Marine, "Gustave", "Her Krauss"... et tous les autres.

Je pense également – et tout spécialement – à mes amis thésards qui ne sont pas au GIN: Nathalie (la linguiste) et Fla (le geek), amis de longues dates et pour longtemps encore.

Je remercie également ma famille et mes amis, qui m'ont toujours soutenu au quotidien dans mes projets, que ce soit dans les moments difficiles comme dans les moments agréables. Surtout, merci Maman pour ta relecture impliquée.

Enfin, je tiens à adresser un merci tout particulier à Cécile, avec qui j'ai le bonheur de vivre chaque jour une journée différente. Je la remercie pour sa tendresse, son soutien quotidien, sa compréhension et sa patience (notamment pour attendre de partir en vacances).

SOMMAIRE

FIGURES & TABLES.....	4
ABREVIATIONS	6
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	8
Généralités sur le tube digestif.....	9
Organisation	9
Structure	11
L'épithélium intestinal.....	13
Structure et organisation.....	13
Ontogenèse de l'épithélium intestinal	13
Organisation de l'épithélium	14
Voies de signalisation régulant la fonction épithéliale	14
Types cellulaires.....	17
Cellules souches	17
Cellules absorbantes	17
Cellules sécrétrices de mucus (goblet).....	18
Cellules entéro-endocrines	19
Cellules de Paneth	19
Autres types cellulaires.....	20
Modèles d'étude des cellules épithéliales en culture.....	20
La barrière épithéliale intestinale.....	23
Morphologie cellulaire	23
Le cytosquelette.....	23
Les Rho GTPases	24
Adhérence intercellulaire	26
Les desmosomes.....	26
Jonctions adhérentes (Zonula adherens).....	27
Dynamique membranaire de la E-cadhérine (Endocytose et recyclage)	29
Assemblage des jonctions adhérentes et différenciation entérocytaire.....	31
Jonctions serrées (Zonula occludens)	34
Adhérence cellule-matrice.....	35
La matrice extra-cellulaire.....	35
Les récepteurs d'adhérence à la MEC : Les intégrines	37
L'adhérence cellule-MEC dans un contexte pathologique.....	39
La transition épithélio-mésenchymateuse.....	41
Régulation des systèmes d'adhérence	41
Implications physiologiques et pathologiques.....	41
Régulation de la E-cadhérine à la membrane	42
Fonction des caténines pendant la TEM.....	44
Migration et invasion cellulaire.....	47
Le déplacement cellulaire	47
Les métalloprotéases matricielles	49
TEM et prolifération cellulaire.....	51
Les pathologies digestives.....	53
Les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin	53
Généralités sur les MICI.....	53
L'inflammation.....	54
Ethiopathologie.....	57

Thérapeutique	58
Modèles animaux d'inflammation digestive.....	59
Les cancers colorectaux.....	61
Origine des cancers colorectaux	61
Développement tumoral colorectal.....	62
Cancers et inflammation.....	64
Implication du système CRFergique dans le stress, l'inflammation et le cancer.....	65
Le stress.....	65
Le système CRFergique	67
Les composants du système CRFergique	67
La signalisation du système CRFergique.....	69
Distribution du système CRFergique dans la muqueuse intestinale.....	70
Expression du système CRFergique dans l'intestin grêle	71
Expression du système CRFergique dans le côlon	72
Régulation du système CRFergique par le stress et l'inflammation	75
Régulation par le stress.....	75
Régulation par l'inflammation	77
Rôle du système CRFergique dans la régulation de l'épithélium	79
Régulation dans le cadre du stress	80
Régulation dans le cadre de l'inflammation.....	84
Implication du système CRFergique dans le cancer.....	88
Expression dans les cancers.....	88
Effet du système CRFergique sur la croissance tumorale.....	90
Implication du système CRFergique dans la progression tumorale.....	91
OBJECTIFS DE LA THESE.....	94
MATERIELS ET METHODES.....	95
RESULTATS ET DISCUSSION.....	102
Régulation du système CRFergique épithélial intestinal par le stress et l'inflammation	103
Introduction	103
Résultats	104
Discussion	110
Implication du système CRFergique dans la progression tumorale des CCR	118
Introduction	118
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	154
Conclusion.....	155
Perspectives.....	156
Régulation de la sécrétion des neuromédiateurs du stress	156
Fonctions associées à la distribution différentielle du CRF1 et du CRF2	157
Caractérisation des jonctions cellules-MEC lors de la migration	158
Autophagie ou transcytose.....	159
Interaction entre le système CRFergique et la stimulation du nerf Vague à visée anti-inflammatoire.....	160
Système CRFergique et lien entre l'inflammation et le cancer	161
BIBLIOGRAPHIE.....	162
ANNEXES.....	201
Etude du rôle de la p120ctn dans le cycle cellulaire et la duplication des centrosomes.....	202
Etude de la maturation des jonctions adhérentes durant la différenciation entérocytaire.....	207

**Travail de systèse sur l'implication du système CRFergique intestinal dans la physiopathologie du stress,
de l'inflammation et des cancers colorectaux 216**

FIGURES & TABLES

Introduction

- Figure 1: **Anatomie du tube digestif humain**
- Figure 2: **La paroi intestinale**
- Figure 3: **Morphogenèse de l'épithélium intestinal**
- Figure 4: **Renouvellement de l'épithélium intestinal**
- Figure 5: **Voies de signalisation régulant la fonction épithéliale**
- Figure 6: **Signalisation de la voie canonique Wnt/ β -caténine**
- Figure 7: **Voie de signalisation Notch/Delta**
- Figure 8: **Types cellulaires épithéliaux**
- Figure 9: **Modèles d'étude des cellules épithéliales en culture**
- Figure 10: **Le cytosquelette**
- Figure 11: **Les Rho GTPases**
- Figure 12: **RhoA, Rac, Cdc42 et organisation du cytosquelette d'actine**
- Figure 13: **Les jonctions inter-cellulaires**
- Figure 14: **Les jonctions adhérentes des cellules épithéliales**
- Figure 15: **Endocytose de la E-cadhérine**
- Figure 16: **Recyclage de la E-cadhérine**
- Figure 17: **Maturation des jonctions adhérentes**
- Figure 18: **Les jonctions serrées**
- Figure 19: **Matrice extra-cellulaire (MEC) des épithélia**
- Figure 20: **Topographie de la MEC sur l'axe crypto-villositaire**
- Figure 21: **Les intégrines**
- Figure 22: **Hémidesmosomes et complexes focaux**
- Figure 23: **Topographie des intégrines sur l'axe crypto-villositaire**
- Figure 24: **La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)**
- Figure 25: **Désassemblage des jonctions adhérentes**
- Figure 26: **Régulation de la E-cadhérine**
- Figure 27: **Migration cellulaire**
- Figure 28: **Rho GTPase et migration**
- Figure 29: **Systèmes d'adhérence cellule-matrice**
- Figure 30: **Les matrices métallo-protéinases (MMP)**
- Figure 31: **Le cycle cellulaire**
- Figure 32: **Altérations de la barrière intestinale**
- Figure 33: **Progression des cancers colorectaux**
- Figure 34: **Stress et interactions neuro-digestives**
- Figure 35: **Le système CRFergique**
- Figure 36: **La signalisation du système CRFergique**
- Figure 37: **Distribution du système CRFergique dans l'intestin grêle**
- Figure 38: **Distribution du système CRFergique dans le côlon**
- Figure 39: **Le système CRFergique intestinal**
- Figure 40: **Rôle du système CRFergique dans la régulation de l'épithélium**
- Figure 41: **Régulation du système CRFergique par le stress et l'inflammation**
- Figure 42: **Implication du système CRFergique dans le cancer**

Matériel et méthodes:

Table 1: Anticorps et réactifs

Résultats partie 1:

- Figure 43: **Régulation du système CRFergique dans le colon par un stress aigu de contention**
- Figure 44: **Expression du CRF2 dans les cellules épithéliales et régulation par un stress aigu**
- Figure 45: **Le stress « environnemental » et l'inflammation au DSS chroniques régulent l'expression du CRF2 dans les cellules épithéliales intestinales**
- Figure 46: **Le stress et l'inflammation altèrent l'expression de la E-cadhérine dans les cellules épithéliales du colon**
- Figure 47: **Expression et localisation du CRF2-GFP dans les cellules HT-29 différenciées (J10)**
- Figure 48: **Le CRF2 augmente la perméabilité épithéliale para-cellulaire dans les cellules HT-29**
- Figure 49: **Le CRF2 altère la localisation des jonctions adhérentes dans les cellules HT-29 CRF2-GFP**
- Figure 50: **Le CRF2 augmenterait la perméabilité trans-épithéliale dans les cellules HT-29**
- Figure 51: **Effet de l'Ucn3 sur l'activité phosphatase alcaline au cours de la différenciation entérocytaire**

Résultats supplémentaires partie 2:

- Figure 52: **Expression des protéines des jonctions adhérentes dans les lignées d'adénocarcinomes coliques**
- Figure 53: **Régulation des jonctions inter-cellulaires**
- Figure 54: **Réorganisation de l'actine**
- Figure 55: **Expression et régulation de l'Ucn3 par les médiateurs du stress**

Conclusion/perspectives:

- Figure 56: **Effets du CRF2 sur l'inflammation et les CCR**
- Figure 57: **Répartition et rôle des récepteurs au CRF dans l'inflammation et les CCR**

ABBREVIATIONS

5-HT	Sérotonine	FFA	Free fatty acids
A/NA	Adrénaline/ NorAdrénaline	FI	Filaments intermédiaires
ACh	Acétylcholine	FPO	Fecal pellet output
ACTH	Hormone corticotrope	GAP	GTPase activating protein
ADAM	Disintegrin and metaloprotease	GC	Glucocorticoïdes
AMPC	Adénosine mono-phosphate cyclique	GDI	Guanine nucleotide dissociation inhibitor
AOM	Azoxyméthane	GDP	Guanosin di-phosphate
APC	Anaphase-promoting complex	GEF	Guanidine nucleotide exchange factor
ARP	Actin related protein	GR	Glucocorticoïd receptor
BB	Bordure en brosse	GRE	Glucocorticoïd response element
BMP	Bone morphogenic protein	GSK	Glycogen synthase kinase
Cath	Cathécolamines	GTP	Guanosin tri-phosphate
CBC	Crypt base columnar	HAV	His-Ala-Val
CBD	Cterm binding domain	HGF	Hepathocyte growth factor
CCK	Cholécystokinine	Hh	Hedgehog
CCR	Cancer colorectal	HIEC	Human intestinal epithelial cell
Cdk	Cyclin-dependant kinase	HNF	Hepatocyte nuclear factor
Ch	Chromosome	HNPCC	Hereditary non polyposis
CIMP	CpG island methylator phenotype	HPA	Hypothalamo pituitary adrenal
Col	Collagène	ICAM	Inter-cellular adhesion molecule
COX	Cyclo-oxygénase	IEC	Intestinal epithelial cell
CRE	cAMP response element	Ig	Immunoglobulunine
CRF	Corticotropin releasing factor	IGF	Insulin-like growth factor
CRF1	Corticotropin releasing factor receptor 1	Ihh	Indian hedgehog
CRF2	Corticotropin releasing factor receptor 2	IL	Interleukines
CRF-BP	Corticotropin releasing factor-binding protein	ILK	Integrin linked kinase
Cterm	C terminal	INF	Interféron
ctn	Caténine	JAK	Janus kinase
DCC	Delated in colorectal cancer	JAM	Junction adhesion molecule
DPP	Dipeptidylpeptidase	JMD	Juxta-membrane domain
DSS	Dextran sulfate sodium	KGF	Keratinocyte growth factor
E	Jour embryonnaire	KO	Knockout
EC	Extra-cellular	LB	Lymphocyte B
EGF	Epithelial growth factor	Ln	Laminine
ERK	Extra-cellular related kinase	LPH	Lactase phlorizine hydrolase
FAK	Focal adhesion kinase	LPS	Lipopolysaccharide
FAP	Familial adenomatous polyposis	LRC	Label retaining cells
FCA	Focus crypte abbérante	LT	Lymphocyte T
		MAPK	Mitogen activated kinase
		MC	Maladie de Crohn

MCP	Monocyte chemoattractant protein	PYY	PP like peptide
MD	Maternal deprivation	RCH	Rectocolite hémorragique
MEC	Matrice extra-cellulaire	RCPR	Récepteur couple aux protéins G
MF	Microfilaments	RL	Radeaux lipidiques
MICI	Maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin	ROCK	Rho associated protein kinase
MLC	Myosin light chain	RTK	Récepteur tyrosine kinase
MLCK	Myosin light chain kinase	sE	Semaine embryonnaire
MMP	Matrix metaloprotease	Shh	Sonic hedgehod
MMR	Missmatch repair	SI	Sucrase isomaltase
MR	Mineralocorticoïd receptor	SII	Syndrome de l'intestin irritable
MT	Microtubules	SNA	Système nerveux autonome
MTOC	Microtubule organization center	SNC	Système nerveux central
MTX	Methotrexate	SNE	Système nerveux entérique
NE	Norépinéphrine	SP	Substance P
NFκB	Nuclear factor κB	STAT	Signal transducer and activator of transcription
NGF	Nerve growth factor	TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
NICD	Notch intra-cellular domain	TGF	Tumor growth factor
NK	Natural killer	Th	T helper
NLS	Nuclear localisation site	TLR	Toll-like receptor
Nterm	N terminal	TNBS	Trinitrobenzène sulfonique
NTS	Noyau du tractus solitaire	TNF	Tumor necrosis factor
PA	Phosphatase alcaline	Ucn	Urocortine
PAMP	Pathogen-associated molecule pattern	VEGF	Vascular epithelial growth factor
PG	Prostaglandine	VIP	Vaso intestinal peptide
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase	WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
PIP3	Phosphatidylinositol tri-phosphate	WASP	Water avoidance stress
PK	Proteine kinase	WAVE	WASP-family verprolin-homologous protein
PMA	Phorbol myristate acetate	Wnt	Wingless type
POZ-ZF	Pox virus and zinc finger-zinc finger	ZO	Zonula occludens
Ptc	Patched		
PTEN	Phosphatase and TENSin homolog		

Synthèse bibliographique

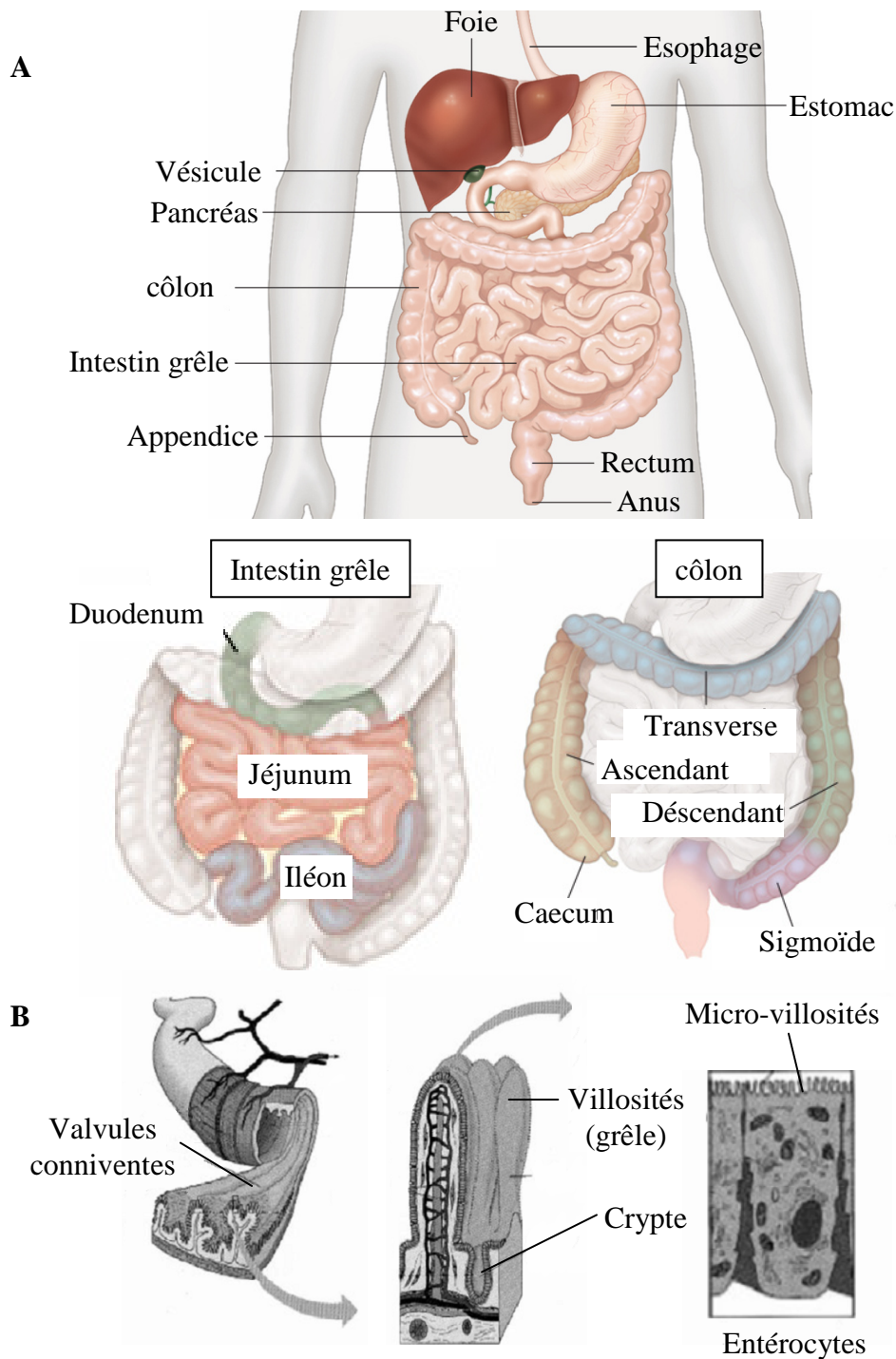


Figure 1: Anatomie du tube digestif humain.

A/ L'intestin est divisé en deux parties, l'intestin grêle et le côlon. Au niveau du grêle on retrouve successivement le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le côlon est également divisé en plusieurs segments, le caecum, puis les côlons ascendant, transverse, descendant et sigmoïde. **B/** Les différents niveaux de repliement de l'intestin offrent une surface d'échange optimale. Au niveau de l'intestin grêle on trouve des cryptes et des villosités alors que le côlon est constitué que de cryptes. (d'après Encyclopedia Britannica ; Marieb 1999).

Généralités sur le tube digestif

Organisation

Le rôle principal du tube digestif est de digérer, d'extraire les nutriments contenus dans le bol alimentaire et d'éliminer ou transformer les produits non assimilables. Ces processus débutent dans la bouche et se déroulent tout au long de la progression du contenu dans la lumière digestive jusqu'à l'anus. Comme la peau, la présence d'un épithélium permet également au tube digestif d'établir une barrière entre le milieu extérieur (lumière digestive) et le milieu intérieur. Ces défenses sont renforcées par un système immunitaire local capable de combler les défaillances de la barrière.

Chez les vertébrés, le tube digestif est un organe qui s'établit précocement durant l'embryogenèse. Il est issu de l'assemblage de structures endodermiques à l'origine de l'épithélium et mésodermiques formant les parties musculaires lisses, séreuses et le tissu conjonctif. Le tube digestif est constitué de segments distincts (Figure 1A), assurant chacun des fonctions communes ou complémentaires. Débouchant de l'estomac, l'intestin grêle est long d'environ 3m sur une section de 4cm chez l'homme. Il est subdivisé en trois parties : Le duodénum ($\approx 15\text{cm}$), le jéjunum ($\approx 150\text{cm}$) et l'iléon ($\approx 150\text{cm}$). L'extrémité de l'iléon abouche dans le côlon au niveau du caecum en passant par la valvule iléo-caecale (valvule de Bauhin), destinée à limiter le reflux du contenu colique dans l'intestin grêle. D'une longueur d'environ 1,5m, le côlon est situé dans la partie distale du tube digestif et se compose de quatre segments, les côlons : ascendant (côlon gauche), transverse, descendant (côlon droit) et sigmoïde. Il débouche enfin sur le rectum et l'anus. Chez le rat, le caecum est beaucoup plus développé et constitue un réservoir bactérien pour la flore intestinale. L'anatomie du côlon y est également plus simple. Il mesure 15 à 20 cm de long, il est constitué de trois segments à savoir le colon proximal, le colon transverse et le colon distal. Les divergences anatomiques observées peuvent s'expliquer en partie par la différence de régime alimentaire entre l'homme et le rongeur.

La fonction principale de l'intestin est d'absorber l'eau et les nutriments contenus dans notre alimentation pour les rendre disponibles au reste de l'organisme. La surface d'absorption offerte par l'intestin grêle est optimisée par la présence de valvules conniventes

Généralités sur le tube digestif

(valvules de Kerkring), qui forment des replis au niveau du jéjunum (Figure 1B). Le tapissage de la muqueuse par les villosités dont la taille augmente en région distale et la présence de micro-villosités sur les entérocytes élèvent cette surface d'échange à 200m² pour l'ensemble de l'intestin, soit environ la surface d'un terrain de tennis. La quasi-totalité des nutriments et des électrolytes est absorbée au niveau de l'intestin grêle et le côlon a pour fonction essentielle de déshydrater les selles en absorbant 80% de l'eau résiduelle. Une flore commensale est présente tout le long du tube digestif mais sa diversité et sa densité est plus importante au niveau du côlon. Elle se met en place peu de temps après la naissance suite à l'exposition de l'intestin aux aliments alors que le système immunitaire est réduit. Suivant l'histoire et le mode de vie des individus, la flore intestinale évolue différemment pour devenir caractéristique de chacun. Chez l'Homme adulte, elle représente 10¹⁴ bactéries réparties selon 500 à 1000 espèces différentes dont *Escherichia Coli*, bacilles lactiques, entérocoques,... (Walter and Ley, 2010). On observe aussi minoritairement clostridies, champignons et levures diverses qui se développent principalement après une antibiothérapie. Dans une relation symbiotique, ces micro-organismes se nourrissent de composés non assimilables par leur hôte tels que les polysaccharides d'origine végétale (la cellulose et l'amidon), et restituent des composés non synthétisables par l'hôte comme le butyrate ou la vitamine K. La flore joue également un rôle protecteur en diminuant le développement de germes pathogènes. Son installation au niveau de la niche intestinale empêche les nouvelles espèces arrivantes de s'établir via le "quorum sensing" (Walters and Sperandio, 2006). Ce système de communication fait intervenir la libération de médiateurs solubles permettant aux différentes populations de bactéries de contrôler leur croissance, celle des autres espèces et la physiologie de leur hôte, dans le but de survivre et gérer leur accès aux nutriments. Sa composition est affectée dans les pathologies inflammatoires intestinales et le diabète, où les modifications occasionnées participent au développement de ces pathologies. Certains avancent l'hypothèse que la composition de la flore pourrait être à l'origine de ces maladies (Rescigno, 2008). De nombreuses équipes de recherche, laboratoires pharmaceutiques et industries agroalimentaires, s'intéressent aujourd'hui à la flore comme cible thérapeutique des maladies inflammatoires intestinales ou des cancers digestifs, à travers le développement de probiotiques (bifidus actif, ultra levure (*Saccharomyces boulardii*),...) (Eutamene et al., 2007; Grimoud et al., 2010). Les molécules sécrétées par les bactéries ou levures ainsi implantées ont un effet bénéfique sur l'homéostasie de la muqueuse et sa cicatrisation en contrôlant les autres populations microbiennes, la libération de cytokines anti-inflammatoires via l'épithélium ou l'expression de gènes impliqués dans la restitution épithéliale. *Saccharomyces*

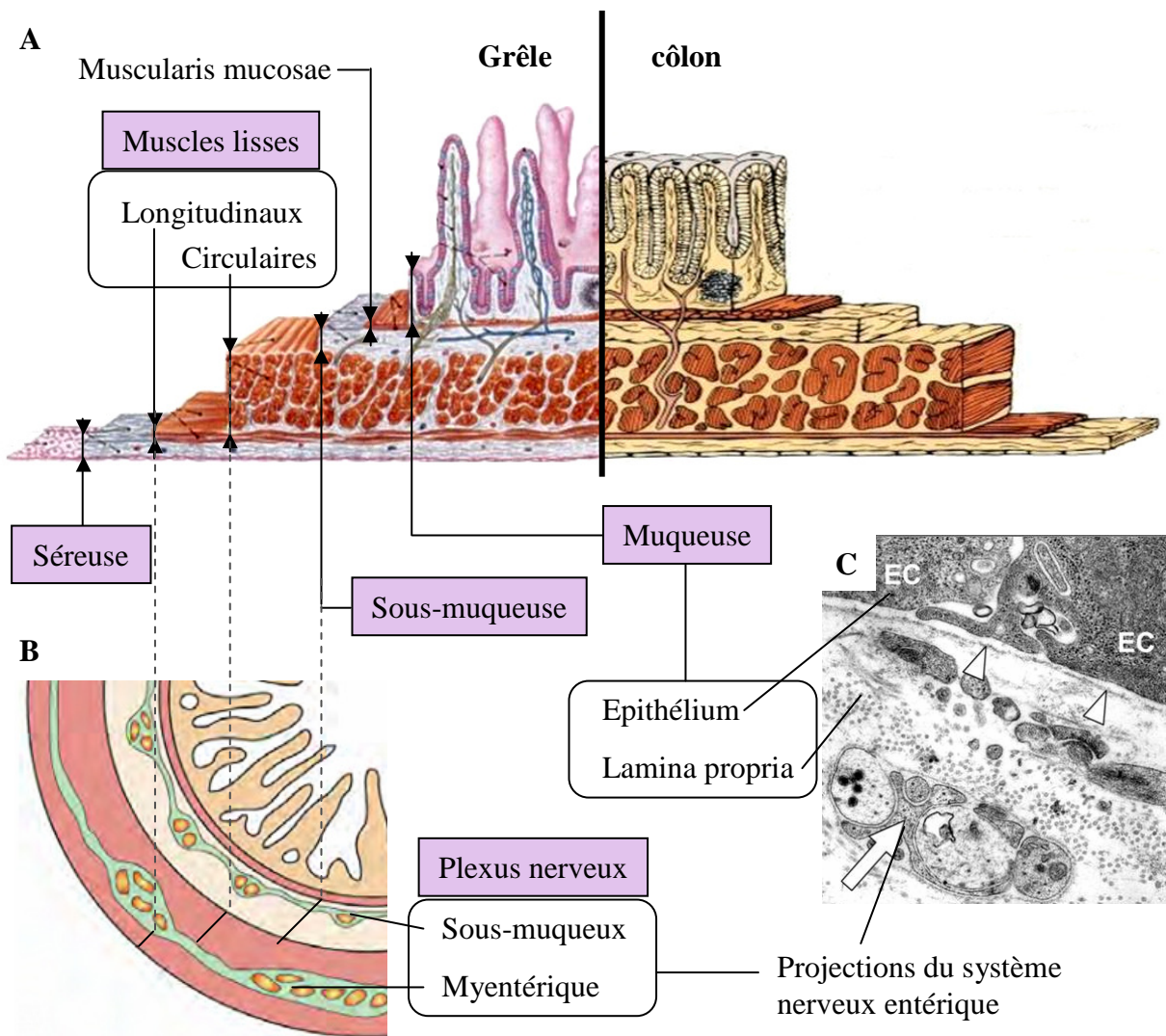


Figure 2: La paroi intestinale.

A/ La paroi intestinale est composée de couches successives (tuniques), retrouvées au niveau du grêle et du côlon. **B/** Le système nerveux entérique parcourt l'ensemble du tube digestif et régule sa physiologie. Il est organisé en plexus nerveux myentériques et sous-muqueux. **C/** Le système nerveux entérique émet des projections dans l'ensemble de la paroi intestinale, y compris à proximité de l'épithélium intestinal. EC: Cellules épithéliales, Flèche: cellules gliales entériques, tête de flèche : lame basale de l'épithélium intestinal (Neunlist et al., 2007).

boulardii induit par exemple la réduction de l'adhésion de la *Clostridium difficile* toxin A (Pothoulakis et al., 1993), la réduction de la production d'interleukine 8 (IL8) (Sougioultzis et al., 2006) (cytokine pro-inflammatoire) et la restitution épithéliale via l'activation des intégrines $\alpha 2\beta 1$ (Canonici et al., 2011).

Structure

La paroi intestinale est formée par l'assemblage de feuillets successifs dont la disposition est conservée sur l'axe proximo-distal (Figure 2A). Sur la face extérieure du tube digestif, la séreuse ou péritoine enveloppe et distribue les entrées et sorties des systèmes nerveux, sanguin et lymphatique, en provenance du mésentère. Des fibres musculaires lisses traversent l'ensemble du tube digestif avec un feuillet longitudinal externe et un feuillet transversal interne. Elles sont douées d'une activité péristaltique autonome et permettent d'assurer le transit du bol alimentaire de la bouche vers l'anus. La sous-muqueuse est constituée de tissus conjonctifs abritant vaisseaux sanguins, glandes lymphoïdes et une partie du système nerveux entérique. La muscularis mucosae sépare la sous-muqueuse et la muqueuse. Formée de muscles lisses, ses contractions favorisent la mise en contact du contenu de la lumière intestinale avec l'épithélium. La muqueuse est constituée de la lamina propria et de l'épithélium intestinal. La lamina propria ou chorion est un tissu conjonctif dans lequel évoluent les cellules immunitaires sentinelles telles que les mastocytes et les macrophages, dont le nombre augmente fortement dans les zones inflammatoires. Elle prévient ainsi le passage des bactéries de la lumière intestinale à travers la paroi digestive.

Le tube digestif possède son propre système nerveux, le système nerveux entérique (SNE) (ou système nerveux intrinsèque). Il fonctionne de manière autonome et son activité basale ne dépend pas directement du système nerveux central (SNC), même s'il est sous son influence. Le SNE s'établit à partir des cellules de la crête neurale qui colonisent l'ensemble du tube digestif et poursuit sa maturation après la naissance (Le Douarin and Teillet, 1973). Une altération de ces voies de migration dans les parties distales du côlon conduit au développement d'hypermotilités, ou de maladie de Hirschsprung (Feichter et al., 2009). Ces pathologies touchent un individu sur 5000 et occasionnent des troubles de la motricité du côlon. Le SNE contient 10^8 neurones chez l'homme adulte, qui en association avec des cellules gliales, s'organisent sous la forme de plexus établis selon un réseau complexe dans la paroi digestive (Furness and Costa, 1980) (Figure 2B). On distingue deux types de plexus : les

Généralités sur le tube digestif

plexus nerveux myentériques (ou d'Auerbach), situés entre les fibres musculaires lisses longitudinales et transversales (Auerbach, 1864), et les plexus nerveux sous-muqueux, organisés au sein de la sous-muqueuse. Les plexus nerveux myentériques sont impliqués dans le contrôle de la motricité digestive et du réflexe sécrétomoteur (See et al., 1990). Des cellules "pace maker" (cellules de Cajal) génèrent des complexes moteurs migrants qui permettent de coordonner le péristaltisme des muscles lisses. Chez l'individu en période interdigestive, cette activité électrique est déclenchée à partir de l'estomac et se propage à travers l'intestin grêle (Soffer, 2000). Cette activité motrice dirigée vers les parties distales permet de faciliter la vidange gastrique, d'éviter le reflux caeco-iléal et prévient également la stagnation du contenu de la lumière intestinale propice à la prolifération bactérienne, pourvoyeuse d'inflammation. Les plexus nerveux sous-muqueux constituent des réseaux différents dont certains se logent à proximité des couches musculaires lisses (plexus de Meissner) et d'autres plus proche de la muqueuse (plexus de Schabadasch) (Meissner, 1857 ; Schabadasch, 1930). Ils innervent la muqueuse intestinale avec leurs neurites qui contiennent des varicosités (pas de structures synaptiques) destinées au stockage et à la libération des neurotransmetteurs et de neuromédiateurs à proximité des vaisseaux sanguins, des cellules immunitaires et de l'épithélium.

Cette innervation locale permet au SNE de contrôler la physiologie de l'épithélium et l'inflammation locale par la libération de vaso-intestinal peptide (VIP), substance P (SP), Acétylcholine (ACh), etc... (Anlauf et al., 2003; McConalogue and Furness, 1994; See et al., 1990) (Figure 2C). La sécrétion de VIP par le SNE favorise la mise en place de la barrière épithéliale intestinale en régulant l'expression de la protéine zonula occludens 1 (ZO1) impliquée dans les jonctions intercellulaires des entérocytes (Neunlist et al., 2003). Dans un cadre pathologique, il joue également un rôle protecteur et réduit les altérations de la barrière épithéliale dépendantes des souches entéropathogéniques de *Escherichia coli*, en diminuant l'activation de la myosin light chain kinase (MLCK) (Conlin et al., 2009). En contrôlant la libération d'ACh des fibres cholinergiques du SNE sous-muqueux, la SP contribue à la régulation des cellules souches et des progéniteurs de l'épithélium par les récepteurs muscariniques M3 et M5 (Lundgren et al., 2011). La SP permet également de réguler la migration des cellules épithéliales (Turner et al., 2007). A l'inverse, suite à un stress psychologique, il a été montré que la SP peut jouer un rôle délétère sur la barrière épithéliale intestinale via l'activation des cellules immunitaires de la muqueuse (Zheng et al., 2009).

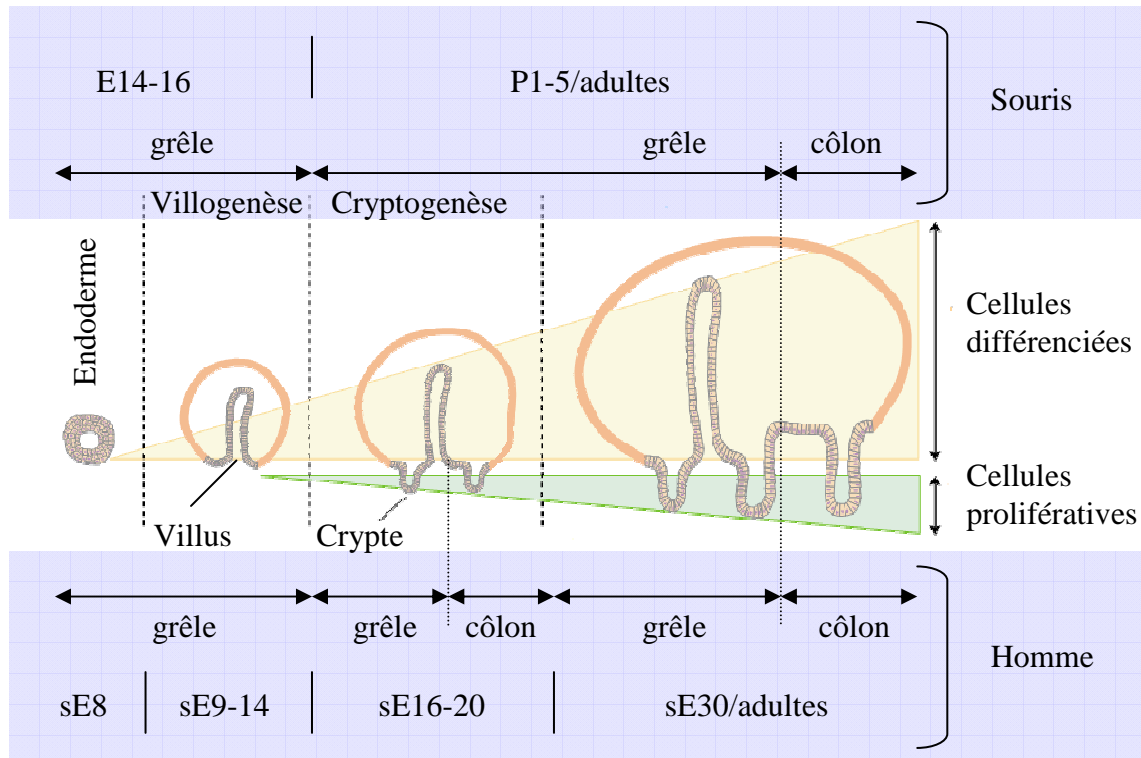


Figure 3: Morphogénèse de l'épithélium intestinal.

L'endoderme est à l'origine de la formation de l'épithélium intestinal. Pluristatifié, il devient monostatifié et forme des villosités par extrusion des cellules mésenchymateuses sous-jacentes (villogenèse). Chez le rongeur, la villogenèse n'a lieu qu'au niveau de l'intestin grêle et non au niveau du côlon. Les zone inter-villositaires s'invaginent ensuite dans la lamina propria pour former des cryptes contenant les cellules prolifératives (cryptogenèse). Chez l'homme, l'épithélium du côlon se développe comme le grêle jusqu'à sE20 et forme également des villosités. Pour finir, les villosités régressent au niveau du côlon au profit des cryptes. L'épithélium obtient sa morphologie adulte à sE30 chez l'homme et P5 chez la souris. Il contient des cellules prolifératives dans la partie basse des cryptes et des cellules différenciées au niveau de la partie supérieure dans le côlon et dans les villosités au niveau du grêle. (d'après Teller, I., 2001)

L'épithélium intestinal

Structure et organisation

Ontogenèse de l'épithélium intestinal

L'acquisition de la forme définitive de l'épithélium intestinal fait intervenir des processus, conservés chez les mammifères (de Santa Barbara et al., 2003; Spence et al., 2011a). Cependant, leur mise en place au cours du développement gestationnel et post-natal reste différente du point de vue temporel entre le rongeur et l'Homme (Figure 3). Au début de la morphogénèse du tube digestif, l'épithélium est pluri-stratifié. Les cellules qui le constituent prolifèrent activement et ne présentent pas de caractère différencié. Lors des premiers stades de ce développement, la réorganisation du mésenchyme sous-jacent fait apparaître des protrusions en direction de la lumière. Durant cette villogenèse, l'épithélium devient monocouche, les cellules villositaires acquièrent un phénotype différencié tandis que les cellules situées dans la région inter-villositaire restent prolifératives. Chez l'Homme, la villogenèse commence dès la semaine embryonnaire 8 (sE8) au niveau du duodénum et va se propager suivant l'axe proximo-distal (Moxey and Trier, 1979). Ainsi, on peut observer des villosités à sE9 dans le duodénum, sE12-13 dans les derniers segments de l'intestin grêle et sE16 au niveau du côlon. A ce stade, le côlon et le grêle sont identiques et sont constitués de tous les types différenciés de cellules épithéliales à l'exception des cellules de Paneth qui apparaissent plus tard dans le développement (Simon-Assmann and Kedinger, 1993). La cryptogenèse se produit ensuite par invagination de ces zones prolifératives. A sE16, débute l'invagination des cryptes suivant un sens de progression proximo-distal. Enfin, entre sE20 et sE25, les villosités présentes au niveau du côlon vont progressivement régresser suivant l'axe disto-proximal. Chez le rongeur, ces processus débutent beaucoup plus tard et s'achèvent au moment du sevrage de l'animal. La villogenèse intervient à partir du jour embryonnaire 15 (E15) suivie d'une cryptogenèse qui s'établit dans les 15 premiers jours post-natals P1-15 (Calvert and Pothier, 1990). Ces différences dans l'ontogenèse de l'épithélium intestinal peuvent de manière équivalente à la macro-anatomie digestive, provenir d'une divergence phylogénique dépendante du régime alimentaire des rongeurs comparé à celui des humains. En plus de ces divergences structurelles, du point de vue fonctionnel, l'expression des enzymes digestives des entérocytes présente également un profil de régulation différent au cours du développement suivant les espèces (Galand, 1989; Krasinski et al., 1994).

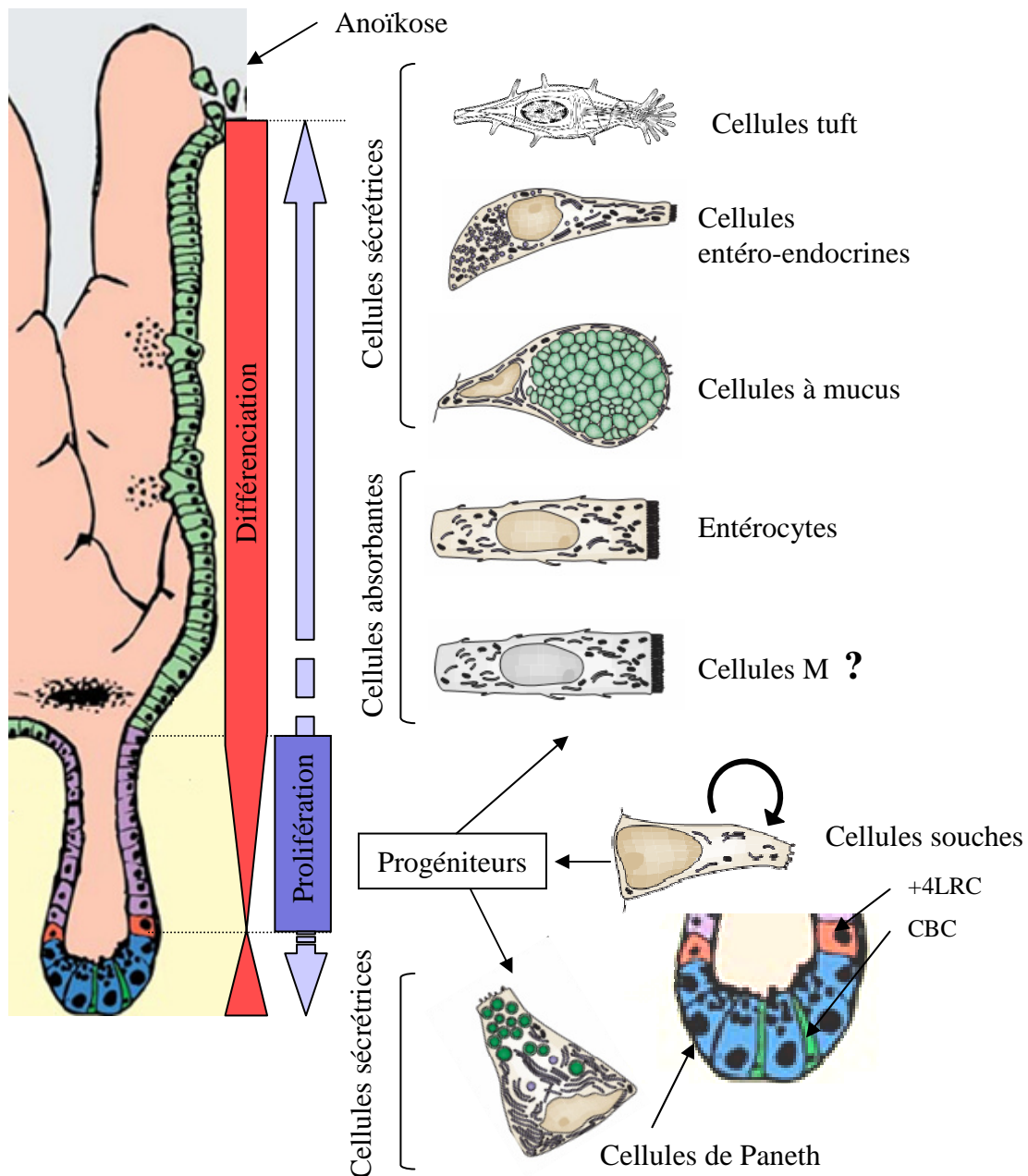


Figure 4: Renouveau de l'épithélium intestinal.

L'épithélium intestinal est en constant renouvellement. Il contient des cellules souches dans la partie basse des cryptes (CBC et +4LRC). En se divisant elles donnent naissance à des cellules progénitrices qui prolifèrent puis se différencient vers des lignages sécréteurs ou absorbants. Les cellules de Paneth migrent vers la base de la crypte tandis que les autres se dirigent vers l'extrémité de la villosité où elles seront exfoliées. (d'après Sancho, E., 2004 ; Crosnier, C., 2006 ; Höfer, D., 1999)

Organisation de l'épithélium

Au niveau de l'intestin mature, l'épithélium s'organise selon des structures élémentaires répétées (Figure 4). Dans l'intestin grêle, ces unités fonctionnelles sont constituées de cryptes invaginés dans la lamina propria et de villosités situées dans leur prolongement. Au niveau du côlon, seules des cryptes plus profondes sont retrouvées. L'épithélium intestinal est en constant remodelage, le taux de renouvellement étant compris entre 3 et 5 jours. Ce processus régénératif est retrouvé dans des conditions normales, lors de blessures, d'inflammation, ou d'irradiations (subléthales). Il est assuré par la prolifération de cellules souches intestinales et de leurs progéniteurs situés dans la partie inférieure des cryptes. Les villosités du grêle et la partie supérieure des cryptes du côlon contiennent des cellules différenciées qui assurent les fonctions digestives et protectrices vis-à-vis des agents pathogènes pouvant coloniser la lumière intestinale. Les cellules composant l'épithélium intestinal se déclinent suivant deux grands lignages : une lignée absorbante à l'origine des entérocytes et des cellules M, et une lignée sécrétrice à l'origine des cellules sécrétrices de mucus, entéro-endocrines ou cellules de Paneth. Au cours de la différenciation, les cellules migrent en cohorte le long de l'axe cryptovillositaire avant de mourir par anoïkose et être exfoliées à l'extrémité des villosités dans l'intestin grêle. Des processus identiques sont retrouvés au niveau du côlon dans la partie supérieure des cryptes (Bullen et al., 2006; Creamer et al., 1961; Potten and Loeffler, 1990). Lors de leur différenciation, seules les cellules de Paneth migrent en direction de la crypte où elles seront éliminées par phagocytose via les macrophages de la lamina propria. L'homéostasie épithéliale intestinale est ainsi maintenue grâce à l'établissement de compartiments fonctionnels distincts où les cellules prolifèrent, se différencient et meurent par anoïkose. Ce système fait intervenir chaque jour le renouvellement d'environ 10^{11} cellules dans l'intestin grêle humain et 2×10^8 chez la souris (Potten, 1998). L'altération des équilibres entre ces différents compartiments participe à la physiopathologie des maladies inflammatoires digestives et au développement tumoral.

Voies de signalisation régulant la fonction épithéliale

Le confinement du compartiment prolifératif et l'orientation de la différenciation sont déterminés par la nature des signaux extra-cellulaires issus de la communication cellule-matrice et cellule-cellule mettant en jeu des protéines membranaires ou des molécules

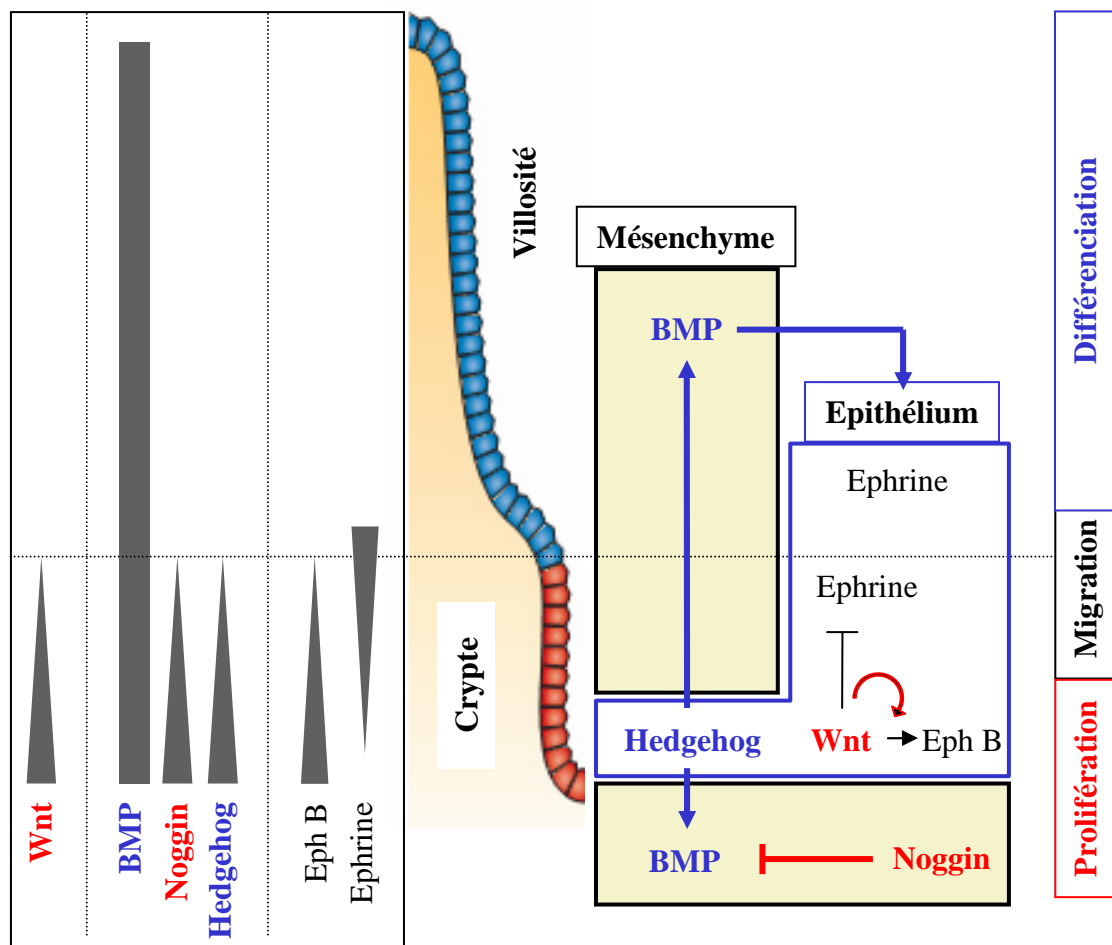


Figure 5: Voies de signalisation régulant la fonction épithéliale.

Le maintien de l'homéostasie épithéliale intestinale nécessite l'activation différentielle de voies de signalisation, impliquées dans des interactions entre le mésenchyme et les cellules épithéliales. Ainsi, la production de Hedgehog par les cellules épithéliales active la production de Bone Morphogenic Protein (BMP) dans le mésenchyme, jouant en retour sur la différenciation entérocytaire. La voie Wingless type (Wnt) est active dans la partie inférieure de la crypte tandis que les BMP sont actifs à la sortie des cryptes jusqu'à l'extrémité des villosités. Ils assurent respectivement le maintien de la prolifération et la différenciation par arrêt du cycle cellulaire. Wnt augmente l'expression des Eph B et réprime celle des Ephrines induisant des gradients opposés d'expression de ce système ligand récepteur impliqué dans la migration des entérocytes vers les villosités. (d'après Crosnier, C., 2006 ; Scoville, D.H., 2008).

L'épithélium intestinal

diffusibles. Ainsi, de nombreux réseaux d'interactions sont mis en place, faisant intervenir des voies de signalisations telles que Hedgehog (Hh), Bone Morphogenic Protein (BMP), Wntless type (Wnt), Ephrine ou encore Notch. Ces voies contrôlent l'expression de gènes spécifiques comme des régulateurs du cycle cellulaire ou des facteurs de transcription, respectivement impliqués dans la prolifération et la différenciation vers les divers types cellulaires épithéliaux (Figure 5).

La signalisation Hedgehog de la muqueuse intestinale implique les ligands Sonic hedgehog (Shh) et Indian hedgehog (Ihh) qui sont produits et sécrétés par l'épithélium inter-villositaire (Madison et al., 2005). Ces molécules diffusibles agissent au niveau des récepteurs Patched1/2 (Ptc) exprimés par les cellules mésenchymateuses sous-jacentes. L'altération de ces voies conduit à une augmentation de la prolifération dans les zones inter-villositaires pluristratifiées et hypertrophiées, associée à une perte de la différenciation épithéliale et une régression des villosités (Madison et al., 2005; van Dop et al., 2009). En réponse aux Hh, les cellules mésenchymateuses produisent des BMP2/4 impliqués dans l'activation du récepteur BMPRII puis des facteurs de transcription Smad1, 5 et 8 au niveau des cellules épithéliales (Howe et al., 2001; Howe et al., 1998). A la base des cryptes, ces mêmes cellules expriment de manière concomitante un antagoniste des BMP: noggin. Les signaux BMP sont ainsi confinés à la partie villositaire de l'épithélium, où ils participent à la régulation des inhibiteurs du cycle cellulaire qui permettent aux cellules épithéliales de s'engager dans une voie de différenciation (Kosinski et al., 2007). L'altération de ces voies de signalisation induit une augmentation de la prolifération dans les cryptes, ainsi qu'une prolifération ectopique au niveau des villosités. Ces phénomènes sont responsables du développement tumoral observé dans la physiopathologie des patients atteints de « juvenil polyposis syndrome » (Haramis et al., 2004).

La voie Wnt constitue un élément primordial dans le maintien de la prolifération au niveau de la crypte (Pinto and Clevers, 2005). A leur base, l'activation autocrine des récepteurs Frizzled 5, 6 et 7 épithéliaux par les Wnt 3, 6 et 9B, conduit à l'inhibition de la dégradation de la β caténine par le protéasome via le complexe APC/Axine/GSK3 (Figure 6) (Senda et al., 2007). Son accumulation au niveau du cytoplasme lui permet par la suite de transloquer au niveau du noyau où, en association avec le facteur de transcription TCF4/LEF, elle régule l'expression de gènes notamment impliqués dans le cycle cellulaire comme la Cycline D1 et p21 (van de Wetering et al., 2002). Elle réprime également le gène codant pour

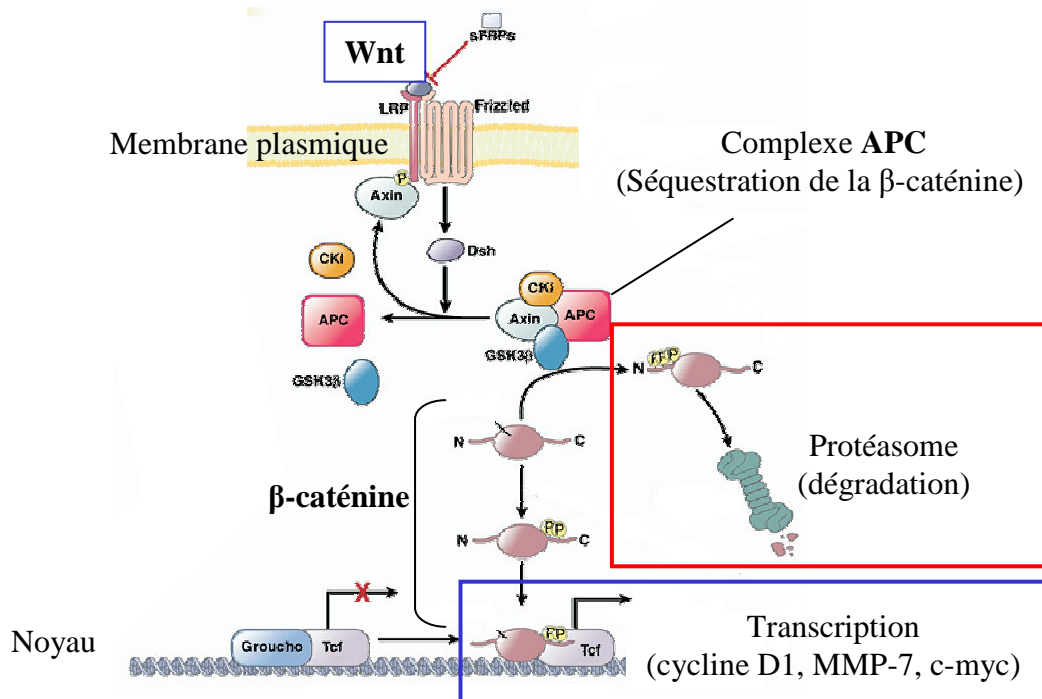


Figure 6: Signalisation de la voie canonique Wnt/β-caténine.

Les Wnt sont des molécules diffusibles qui activent les récepteurs Frizzled exprimés à la membrane plasmique. Quand la voie Wnt est inactive, le complexe APC séquestre la β-caténine cytoplasmique et conduit à sa dégradation au niveau du protéasome. Lorsque les récepteurs sont activés, le complexe APC est dissocié et la β-caténine s'associe avec le facteur de transcription TCF/LEF dans le noyau, où ils régulent l'activité de gènes. Selon les résidus concernés, la phosphorylation de la β-caténine permet son adressage vers le protéasome ou vers le noyau (d'après Scoville, D.H., 2008).

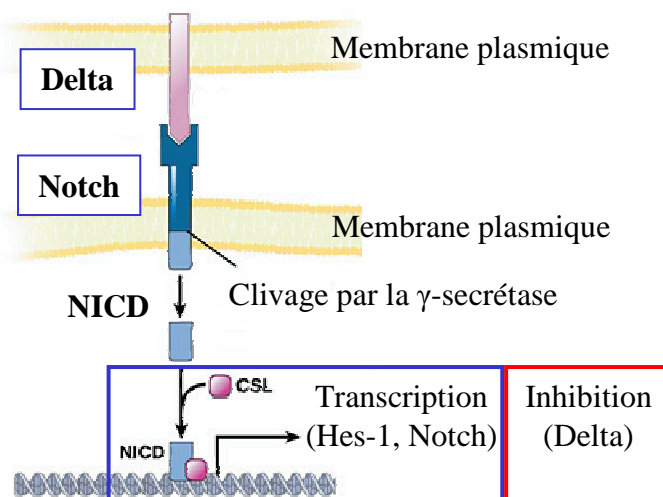


Figure 7: Voie de signalisation Notch/Delta.

Notch est activé par les récepteurs Delta exprimés par les cellules voisines. La γ-sécrétase coupe alors Notch et libère le domaine intracellulaire de Notch (NICD) qui régule l'activité de gènes tels que Hes-1 et inhibe la transcription de Delta (d'après Scoville, D.H., 2008).

L'épithélium intestinal

l'Ephrine-B1 dont la protéine active les récepteurs EphB3/4 responsables de la compartimentation et la migration suivant les zones cryptiques et villositaires. La délétion des récepteurs EphB3/4 conduit à un intercalement des zones prolifératives et différenciées (Batlle et al., 2002). L'expression de ces récepteurs est également perdue dans les stades avancés des cancers colorectaux, favorisant le développement métastatique. D'autres études ont montré que TCF4 est également impliqué dans la différenciation des cellules de Paneth (van Es et al., 2005a). Leur migration vers le fond de la crypte lors de leur différenciation les expose aux molécules Wnt et induit l'activation de TCF4.

La voie Notch/Delta participe au maintien de la population de cellules souches et à la détermination entre les lignages absorbant et sécréteur (Zecchini et al., 2005). Contrairement aux facteurs diffusibles précédemment décrits, Notch est un récepteur membranaire (Figure 7). Son activation par un ligand Delta ou Jagged également exprimés dans la membrane plasmique d'une cellule voisine entraîne un clivage par la métalloprotéase ADAM10 puis par la γ -sécrétase (Sander and Powell, 2004). Ainsi, un fragment intracellulaire appelé NICD (notch intra-cellular domain) est libéré dans le cytoplasme avant de transloquer au niveau du noyau où il régule la transcription de ses gènes cibles. NICD réprime la transcription du facteur de transcription Hath1 (également appelé Atoh1 ou Math1 chez la souris) important dans la détermination du lignage sécrétoire. Hath1 réprimait Hes1 fortement impliqué dans la différenciation entérocytaire (Fre et al., 2005). L'activation de Notch dans une cellule réprime l'expression de Delta/Jagged et augmente celle de Notch. Réciproquement, les cellules qui expriment Delta/Jagged répriment Notch. Ces mécanismes contribuent ainsi à renforcer la détermination des différentes populations de cellules épithéliales selon les lignages absorbant ou sécréteur. L'altération de cette voie de signalisation par l'utilisation d'inhibiteurs de la γ -sécrétase ou dans les souris math^{-/-} conduit à la régression des cryptes par une diminution de la prolifération et à l'augmentation du lignage sécréteur (van Es et al., 2005b). Ainsi, la voie de signalisation Notch constitue un interrupteur déterminant la différenciation vers le lignage absorbant ou sécréteur.

Ces nombreuses voies de signalisation interfèrent les unes les autres pour assurer le maintien de l'organisation et le bon fonctionnement de l'épithélium intestinal. Leur altération conduit soit à un phénotype létal avec la perte des cellules différenciées, soit au développement tumoral par l'augmentation de la prolifération et la formation de structures métaplasiques.

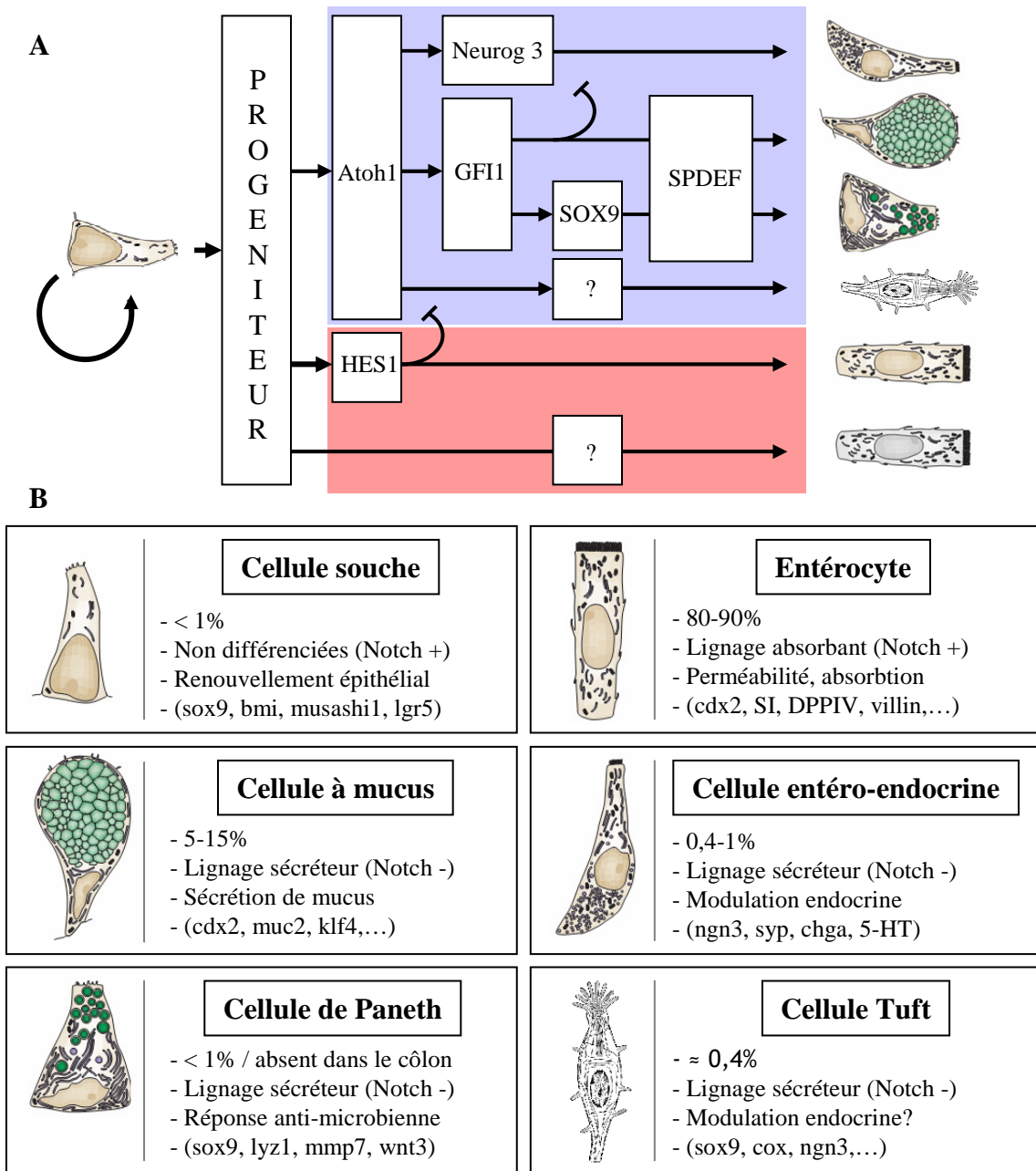


Figure 8: Types cellulaires épithéliaux.

A/ Facteurs impliqués dans le lignage des principaux types cellulaires entrant dans la composition de l'épithélium intestinal. **B/** Ces cellules se caractérisent par leur représentation, lignage, fonction et expression de gènes spécifiques. (d'après Scoville, D.H., 2008 ; Gerbe, F., 2011).

Types cellulaires

Cellules souches

Cette population de cellules est nichée dans le fond des cryptes dans l'intestin grêle et dans le côlon (Figure 4 et 8). Leur division asymétrique donne naissance à deux cellules filles, l'une identique à la cellule mère et l'autre à l'origine de cellules progénitrices qui prolifèrent rapidement sur environ six cycles (Wong et al., 2010). Leur caractère multipotent leur permet ensuite de se différencier vers les différents types cellulaires présents au niveau de l'épithélium. Il existe encore à ce jour quelques débats quant à la localisation exacte des cellules souches intestinales et des marqueurs permettant de les identifier. En effet, au niveau des cryptes de l'intestin grêle elles ont été décrites en position 4 en partant du fond de la crypte, nommées +4LRC, ou intercalées entre les cellules de Paneth, nommées les « crypt base columnar » (CBC). Leur identification sur un critère de prolifération les confond avec les progéniteurs qui se divisent plus vite, sont positifs aux marquages de KI67 et fixent les intercalants de l'ADN (BrdU). On peut donc difficilement distinguer ces deux populations jusqu'à la position 20 des cryptes. D'autre part, l'absence d'expression de marqueurs de différenciation ne permet pas non plus de les distinguer sur ce critère. Néanmoins, par homologies avec les cellules souches d'autres organes, des marqueurs plus spécifiques émergent tels que Bmi1 (Sangiorgi and Capecchi, 2008), Lgr5 (Barker et al., 2007), ou Musashi (Potten et al., 2003), même s'ils ne sont pas exprimés de la même manière au niveau des +4LRC et des CBC (Montgomery and Breault, 2008). Suite à une irradiation, certaines cellules permettent la régénération des cryptes intestinales. Deux populations de cellules souches plus ou moins sensibles aux doses d'irradiation sont à l'origine de ce processus régénératif, suggérant que les +4LRC et les CBC peuvent coexister (Scoville et al., 2008).

Cellules absorbantes

Les cellules absorbantes sont également appelées entérocytes au niveau de l'intestin grêle ou cœlonocytes au niveau du côlon et représentent 80 à 90% de la population de l'épithélium intestinal (Figure 4 et 8). Sous l'effet des diverses voies de signalisation précédemment décrites, la régulation de facteurs de transcription spécifiques tels que GATA-4, HNF1- α (Hépatocyte nuclear factor), Cdx2 ou HNF4 α entraîne l'expression des gènes impliqués dans

L'épithélium intestinal

la différenciation entérocytaire (Benoit et al., 2010b; Quaroni and Isselbacher, 1985; Stegmann et al., 2006; Traber, 1998). Ils sont responsables de l'acquisition de marqueurs structuraux avec des molécules de jonction et le cytosquelette et fonctionnels par l'expression d'enzymes et transporteurs spécifiques. La mise en place de jonctions intercellulaires fortement cohésives (jonctions adhérentes, serrées et desmosomes) leur donne une forme cylindrique polarisée, avec le noyau au pôle basal, de nombreux organites et une membrane plasmique hautement spécialisée au pôle apicale. Ce scellement des contacts intercellulaires permet d'établir une compartimentation de la membrane plasmique dont la composition des lipides et des protéines est différente au pôle baso-latéral et au pôle apical. A leur apex, ces cellules sont hérissées de microvillosités appelées bordure en brosse (BB) dont la taille diminue selon l'axe proximo-distal et qui participent à l'augmentation de la surface d'échange avec la lumière digestive. Leur structure est assurée par un cytosquelette d'actine échaffaudé et stabilisé par des molécules de villine. Les BB sont également riches en glycoprotéines. On y retrouve ainsi des enzymes digestives telles que la sucrase isomaltase (SI), la lactase phlorizine hydrolase (LPH), la dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) ou la phosphatase alcaline (PA) qui parachèvent la dégradation des nutriments, et des transporteurs permettant l'absorption des sucres au niveau du cytoplasme, les SGLT1 (glucose et galactose) ou les GLUT5 (fructose) (Ferraris, 2001). Avec l'expression d'autres transporteurs comme GLUT2 au pôle baso-latéral, cette organisation permet le transport actif de nombreux composés à travers la barrière épithéliale : sucres, acides aminées, électrolytes, eau, vitamines et sels minéraux.

Cellules sécrétrices de mucus (goblet)

Elles représentent 5% de l'épithélium intestinal au niveau du grêle et leur proportion augmente en région distale pour atteindre un maximum de 15% au niveau du côlon (Figure 4 et 8). Ces cellules sont des glandes exocrines unicellulaires qui produisent et sécrètent un mucus tapissant la face luminale de l'épithélium intestinal (Kim and Ho, 2010). Il est aisé de les distinguer dans l'épithélium grâce à leur morphologie ou par les groupements acides des composés de leurs vésicules avec le bleu Alcian. En effet, le volume représenté par les vésicules de sécrétion donne aux cellules une forme évasée au pôle apical, à l'origine de leur autre nom : cellules caliciformes. Ce mucus est constitué de glycoprotéines, principalement les mucines qui sont transmembranaires ou sécrétées. Elles possèdent un cœur protéique servant à leur assemblage les unes aux autres par liaisons covalentes et une partie glucidique

L'épithélium intestinal

hydrophile, essentiellement constituée de galactose, de fucose, de N-acétylgalactosamine, de N-acétylglucosamine et d'acide sialique. Cette composition permet de faciliter le transit du bol alimentaire, de limiter l'adhérence bactérienne aux cellules épithéliales et de les protéger de l'agression des enzymes biliaires et gastriques. Il s'agit du premier rempart de la barrière épithéliale intestinale vis-à-vis des agressions extérieures. L'altération de ces cellules ou la diminution de la production de mucus peut être responsable d'un développement inflammatoire.

Cellules entéro-endocrines

Ces cellules ne représentent que 0,4 à 1% des cellules épithéliales intestinales et sont plus nombreuses dans l'intestin grêle que dans le côlon (Figure 4 et 8). Elles sont plus petites que les autres cellules épithéliales, de forme allongée, enchâssées entre les entérocytes et réparties sur l'axe crypto-villositaire. Il existe 10 types de cellules entéro-endocrines différents plus ou moins restreints à certaines sections du tube digestif. Ils se caractérisent par la nature de leur contenu vésiculaire : cholécystokinine (CCK), sécrétine, gastric inhibitory polypeptide, motiline, neurotensine, sérotonine 5-HT, PP-like peptide PYY, somatostatine,... (Cristina et al., 1978). Sous l'effet de certains stimuli, ces neuromédiateurs sont libérés au niveau de la lamina propria où ils agissent sur les populations cellulaires locales mais également à distance sur d'autres organes par diffusion dans le sang. Les cellules 5-HT (ou entérochromaffines) constituent le sous-type le plus représenté des cellules entéro-endocrines, notamment impliqué dans le réflexe sécréto-moteur, en relation avec le SNE.

Cellules de Paneth

Ces cellules se différencient en redescendant à la base des cryptes dans l'intestin grêle et ne sont pas retrouvées au niveau du côlon (Garabedian et al., 1997) (Figure 4 et 8). De type séreux zymogénique, elles adoptent une morphologie haute avec des vésicules de sécrétion au pôle apical. Le contenu de ces vésicules peut varier d'une cellule à l'autre mais reste néanmoins riche en α -défencines, lysozymes et chromogranine A. Comme les neutrophiles, elles assurent un rôle anti-bactérien et participent à la réponse immunitaire innée. Ces cellules ont une durée de vie de 30 jours environ et sont régulièrement éliminées par les macrophages de la lamina propria (Troughton and Trier, 1969).

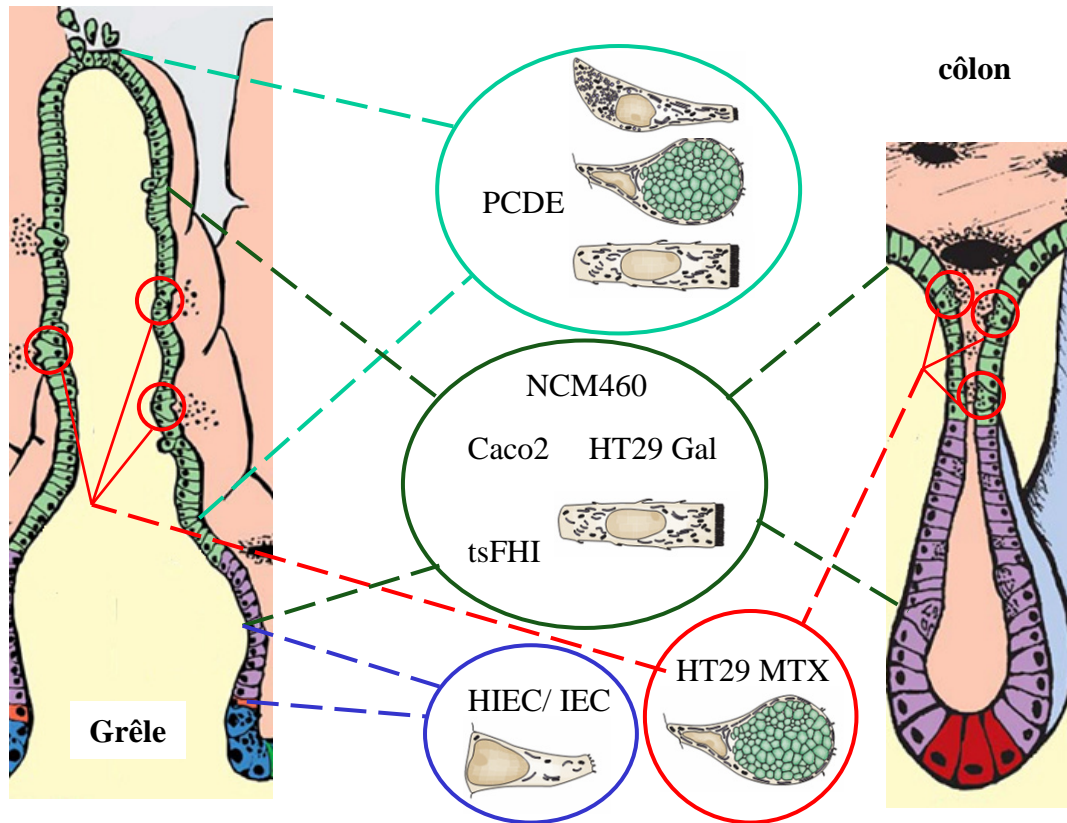


Figure 9: Modèles d'étude des cellules épithéliales en culture.

Diverses lignées cellulaires ou cultures primaires sont représentatives les différentes parties de l'épithélium intestinal au niveau de l'intestin grêle et du côlon. Ces modèles permettent d'étudier les processus de prolifération des cellules souches et de leur progéniteurs (IEC, HIEC) et de différenciation à différents stades (NCM460, PCDE, HT-29, Caco2, tsFHI, HT-29 MTX). (d'après Scoville, D.H., 2008 ; Crosnier, C., 2006).

Autres types cellulaires

Au niveau de l'intestin grêle, il existe des structures spécialisées dans la réponse immunitaire appelées plaques de Peyer. Celles-ci sont composées de cellules M et de lymphocytes T (LT) organisés sous forme de follicules lymphoïdes. L'origine des cellules M n'est pas clairement définie, cependant certaines hypothèses proposent qu'il s'agisse d'entérocytes dédifférenciés impliqués dans le transport (par la voie trans-cellulaire) et la présentation de l'antigène du contenu de la lumière vers les follicules. Des LT sont également retrouvés dans l'épithélium du côlon où, enchâssés entre les entérocytes, ils participent à la réponse inflammatoire locale (Tlaskalova-Hogenova et al., 1995). Récemment, un quatrième type cellulaire issu du lignage sécrétoire a été caractérisé (Gerbe et al., 2011). Ces cellules appelées cellules Tuft avaient déjà été décrites dans plusieurs organes comprenant le tube digestif (Jarvi and Keyrilainen, 1956; Rhodin and Dalhamn, 1956), de par leur morphologie particulière présentant une bordure en brosse très développée (Sato, 2007) (Figure 4 et 8). Ces cellules sont également réparties dans l'intestin grêle et dans le côlon où elles représentent environ 0,4% de la population épithéliale. Leur fonction n'est encore pas connue ; on sait cependant qu'elles expriment les enzymes impliquées dans la biosynthèse des prostanoïdes et des β -endorphines, suggérant un rôle dans l'inflammation, la motricité et la douleur digestive (Gerbe et al., 2011).

Modèles d'étude des cellules épithéliales en culture

L'utilisation de différentes lignées cellulaires permet de reproduire en culture l'ensemble des cellules trouvées sur l'axe crypto-villositaire (Figure 9). En ce qui concerne les cellules souches, leur faible nombre au prorata de l'ensemble des cellules épithéliales les rend difficiles à isoler. L'expression de marqueurs spécifiques n'exclut pas de les confondre avec des progéniteurs dont la prolifération également plus élevée participe à diluer leur proportion en culture. Par ailleurs, le maintien du caractère "souche" de ces cellules est fortement dépendant de leur localisation. Les facteurs trophiques, la communication avec les cellules environnantes et le support matriciel définissent la niche de ces cellules et conditionnent leur état. Sorties de ce contexte, il reste discutable de considérer encore ces cellules comme "souches". Plusieurs lignées de cellules non transformées ont été établies à partir d'intestin grêle de rat P14. Nommées intestinal epithelial cells (IEC) IEC-6, -17, -18, elles proviendraient du milieu des cryptes (Quaroni et al., 1979). Elles peuvent exprimer des marqueurs de différenciation entérocytaire en fonction de la matrice sur laquelle elles

L'épithélium intestinal

adhérent (Quaroni et al., 1979), des facteurs de croissance présents dans le milieu (Kurokawa et al., 1987) ou lorsqu'elles sont greffées dans la capsule rénale de rats adultes (où elles profitent de signaux trophiques) (Kedinger et al., 1986). Les IEC-17 ont par ailleurs tendance à acquérir un statut différencié au fur et à mesure des passages en culture, probablement en raison du nombre de divisions limité de ces progéniteurs (Sambuy and De Angelis, 1986). Une approche similaire a été menée chez l'Homme avec des cellules issues de l'iléon d'embryon sE17-19, permettant d'isoler des cellules de la crypte : les HIEC qui expriment des marqueurs spécifiques de cellules souches comme Bmi1, Musashi1. Ces cellules continuent d'être caractérisées au laboratoire de Jean-François Beaulieu (Sherbrooke, Qc, Canada) (Benoit et al., 2010b; Perreault and Jean-Francois, 1996).

Des cellules provenant de tumeurs épithéliales intestinales ont longtemps été sélectionnées pour établir des lignées aux caractéristiques particulières et constituer un répertoire de modèles d'études des processus physiologiques ou pathologiques impliquant l'épithélium intestinal ou les cancers colorectaux. Certaines lignées semblent adopter un phénotype d'entérocytes différenciés dans certaines conditions de culture, comme les Caco2, HT-29 ou T84 (Chantret et al., 1988; Saaf et al., 2007). Ces lignées constituent des modèles d'étude *in vitro* qui permettent de caractériser les mécanismes impliqués dans la mise en place de la barrière épithéliale et ceux conduisant à son altération lors de processus pathologiques. Les Caco2 se différencient spontanément vers un phénotype entérocytaire à partir de la confluence des cellules en culture. Elles ont été sous-clonées notamment suivant les deux lignées les plus utilisées: les Caco2/TC7 et les Caco2/15. Cette démarche a été réalisée dans le but d'isoler des populations plus homogènes avec un meilleur potentiel de différenciation entérocytaire. Elles vont alors exprimer des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de marqueurs structuraux, jonctionnels et enzymatiques équivalents à ceux des entérocytes en cours de différenciation. L'expression exogène de ces mêmes facteurs de transcription permet par ailleurs d'induire la différenciation des cellules issues de la crypte comme les IEC et les HIEC (Benoit et al., 2010b; Escaffit et al., 2006). Pour se différencier en "entérocytes-like", les cellules HT-29 nécessitent des modifications de leur milieu de culture, consistant en une substitution du glucose par du galactose (Zweibaum et al., 1985) ou par l'ajout de butyrate. La comparaison des profils protéomiques des cellules HT-29 et Caco2 différenciées à des cellules épithéliales purifiées a pu mettre en évidence des divergences phénotypiques entre ces lignées. Les HT-29 pourraient ainsi être assimilées à des "côlonocytes-like" (cellules absorbantes correspondant aux entérocytes du côlon) et les Caco2 plutôt à des entérocytes"-

L'épithélium intestinal

like" (Lenaerts et al., 2007). Le méthotrexate (MTX) est utilisé dans les traitements de chimiothérapie. Les cellules HT-29 résistantes à ce traitement se différencient vers un lignage sécréteur de mucus (HT-29-MTX) (Lesuffleur et al., 1990). La combinaison Caco2/TC7 avec les HT-29-MTX associe cellules absorbantes et sécrétrices de mucus dans un système de co-culture plus représentatif de l'épithélium intestinal (Pontier et al., 2001; Walter et al., 1996). De nombreuses autres lignées cellulaires issues d'adénocarcinome colique telles que DLD, SW, COLO, Lovo, HCT, ect... ont également été établies, mais leur utilisation concerne plutôt la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement et la progression tumorale. Ce large panel est composé de cellules aux caractéristiques différentes en terme de localisation (Caecum, côlons droit, transverse, gauche, rectum ou métastases), grade tumoral, résistance aux traitements (5FU, MTX,...) ou capacité d'invasion et de migration. Par exemple, plusieurs d'entre elles perdent leur capacité à établir des contacts et acquièrent des capacités de migration et d'invasion, comme les SW620 ou les HCT8-R.

Par ailleurs, des méthodes de purification des cellules épithéliales intestinales permettent d'obtenir une fraction épithéliale relativement pure par des méthodes enzymatiques ou par la chélation des cations divalents impliqués dans les jonctions cellule-cellule et cellule-matrice, mais leur maintien en culture reste cependant difficile. L'utilisation d'une méthode sans chélateur ni protéolyse avec la MatriSpenseTM (BD Bioscience) permet d'établir des cultures primaires de cellules épithéliales intestinales différenciées non transformées (PCDE) à partir de tissus fœtaux humains (Perreault and Beaulieu, 1998) ou de rat (Fukamachi, 1992). Avec la lignée cellulaire NCM460, elles constituent les principaux modèles d'étude *in vitro* de la barrière épithéliale dont les cellules ne sont pas transformées. Récemment, Spence et collaborateurs ont mis au point une méthode de culture permettant de générer des organoïdes représentatifs de l'organisation de l'épithélium de l'iléon, à partir de cellules souches multipotentes humaines. Dans ce modèle, l'utilisation séquentielle de facteurs de transcription sur un support d'adhérence en matrigel permet l'acquisition d'une structure épithéliale apparentée à celle de l'iléon et la présence de cellules issues des lignages absorbant et sécréteur (Spence et al., 2011b).

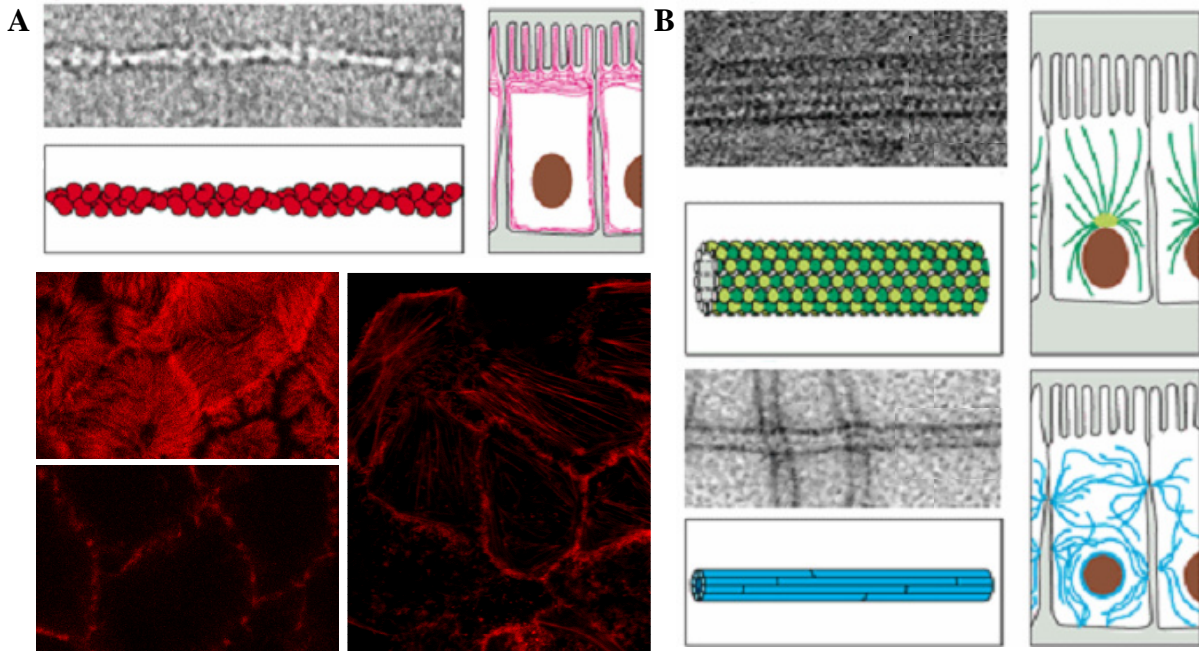


Figure 10: Le cytosquelette.

A/ Electromicrographe d'un microfilament d'actine et son organisation dans la cellule épithéliale (haut) (Moléculaire biology of the cell, Albert's fourth edition). Marquage phalloïdine-TRITC dans les cellules Caco-2 différenciées en microscopie confocale, au niveau des microvillosités apicales et dans le plan baso-latéral (bas/gauche) (donées du laboratoire). Fibres de stress formées au pôle basal dans les cellules HT29 (bas/droite) (donées du laboratoire). **B/** Electromicrographie et organisation des microtubules (haut) et des filaments intermédiaires (bas) (Moléculaire biology of the cell, Albert's fourth edition).

La barrière épithéliale intestinale

Les complexes d'adhérence jouent un rôle important au cours du développement et chez l'adulte. Lors du développement embryonnaire, l'expression d'isoformes différentes de molécules d'adhérence permet la migration, la reconnaissance et le regroupement coordonné de cellules appariées pour former les diverses structures embryonnaires puis les organes. L'interférence avec ces mécanismes a un effet dévastateur sur le développement du fœtus, induisant de nombreuses malformations souvent létales. Après la naissance, la défense de l'organisme vis-à-vis du milieu extérieur nécessite la mise en place de barrières étanches notamment au niveau de la peau et du tube digestif. Ce rôle est assuré par la présence des épithélia qui établissent des jonctions intercellulaires très cohésives et adhèrent à la matrice extra-cellulaire. Les fréquentes agressions quotidiennes subies par ces épithélia nécessitent un renouvellement constant et des systèmes de réparation réactifs. Pour répondre à ces contraintes, les cellules épithéliales sont capables de moduler leurs jonctions en induisant leur maturation lors de la différenciation ou à l'inverse en les perdant pour pouvoir migrer et recoloniser les parties altérées de l'épithélium. Ces modifications morphologiques sont associées à un remodelage du cytosquelette, en particulier de l'actine qui joue un rôle important dans l'établissement des contacts intercellulaires, le maintien de la polarité cellulaire et la résistance mécanique de l'épithélium.

Morphologie cellulaire

Le cytosquelette

Le cytosquelette est composé de différentes structures organisées par la polymérisation de protéines élémentaires. On distingue trois types de structures : les filaments intermédiaires (FI), les microtubules (MT) et les microfilaments d'actine (MF). Elles sont impliquées dans le transport des protéines et des organelles de la cellule (MT et MF) et le maintien de la morphologie cellulaire (FI et MF). Les FI peuvent être polymérisés à partir de protéines différentes selon les types cellulaires. Ils participent à des fonctions de transport, au soutien et à l'ancrage de la position des organites dans le cytoplasme mais également à la morphologie cellulaire par leur association aux complexes d'adhérence cellules-cellules (desmosomes) et cellules-matrice extracellulaire (hémi-desmosome). La dynamique de ces FI est importante pour la flexibilité à la cellule. Les cellules épithéliales expriment plutôt des kératines plus

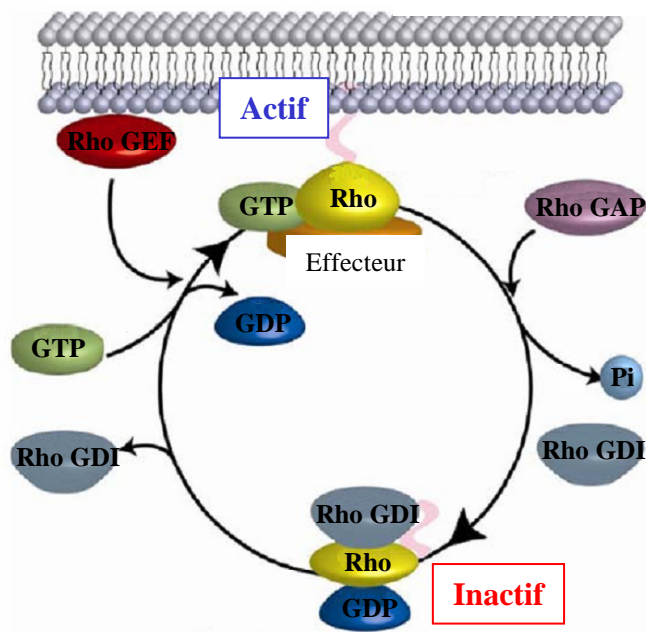


Figure 11: Les Rho GTPases.

A/ Les Rho GTPases sont activées par les Rho GEF qui les lient au GTP. Les Rho GAP hydrolysent ce GTP et conduisent à l'inactivation de la Rho GTPase en rendant sa fixation possible aux Rho GDI. (d'après Fukata, 2001).

rigides et impliquées dans la polarité cellulaire tandis que les fibroblastes expriment de la vimentine qui est plus flexible. Dans un même type cellulaire, la nature des FI peut également varier au cours de la différenciation et de la dédifférenciation lors de la transition épithélio-mésenchymateuse, comme retrouvé dans les cellules entérocytaires en culture. Les MT sont des structures plus dynamiques que les FI, nucléés à partir de centre organisateur des microtubules tel que le centrosome situé près du noyau. Lors de la mitose ce centrosome se duplique et joue un rôle prépondérant dans la ségrégation des chromosomes. Des défauts de sa duplication survenant après la division cellulaire peuvent occasionner l'apparition de centrosomes surnuméraires. Ceux-ci entraînent lors des prochaines mitoses une instabilité chromosomique qui participe au processus de l'initiation et de la progression tumorale. Des moteurs moléculaires tels que dynéines, kinésines permettent d'adresser les protéines en cours de trafic au niveau de leurs compartiments cibles, en utilisant les MT comme support. Les MF sont des structures assemblées au niveau de centres organisateurs WASP et WAVE et subissent des cycles permanents de polymérisation/dépolymérisation. Cette dynamique est exploitée lors des processus de migration où la polymérisation de l'actine permet la formation de protrusions membranaires. D'autres protéines peuvent s'associer au cytosquelette d'actine pour le stabiliser et contrôler sa morphologie. Au niveau des entérocytes différenciés, la villine stabilise les MF au pôle apical pour former les micro-villosités de la bordure en brosse (Moosker, 1983) (Figure 10). La myosine permet le trafic de vésicules sur les MF en prolongement du réseau de MT. Certaines autres formes de myosine participent également à la formation de fibres contractiles (ou fibres de stress) au niveau des contacts intercellulaires et au niveau des adhérences cellule-MEC. Une perte de l'adhérence suivie de l'anoïkose des cellules est obtenue en induisant la dépolymérisation ou en figeant le cytosquelette d'actine avec des drogues telles que la cytochalasine ou la phalloïdine.

Les Rho GTPases

La dynamique de polymérisation et de dépolymérisation constitue un aspect important de la fonction du cytosquelette d'actine. Ces cycles sont organisés par des protéines « architectes », les Rho GTPases, qui recrutent et organisent des centres de nucléation contenant des effecteurs spécifiques. Les Rho GTPases sont des protéines monomériques de 20-30kDa, de la famille Ras, capables de lier du guanosine tri-phosphate (GTP) ou du guanosine di-phosphate (GDP), conditionnant respectivement leur états activés ou non (Figure 11) (Jaffe and Hall, 2005). Cette activation est régulée par l'échange d'une molécule de GDP

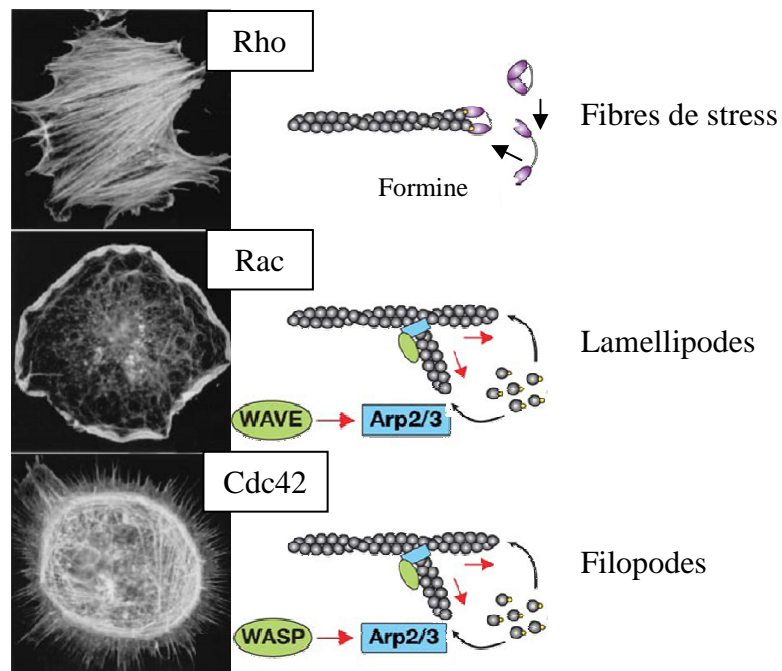


Figure 12: Rho A, Rac, Cdc 42 et organisation du cytosquelette d'actine. Parmi les Rho GTPases les plus étudiées, Rho A induit la formation de fibres de stress en recrutant des Formines, Rac de lamellipodes en recrutant WAVE-ARP2/3 et Cdc-42 de filopodes en recrutant WAS-ARP2/3 . (Hall, A., 1998 ; Jaffe, AB. 2005).

contre une molécule de GTP et vice versa suivant la présence de protéines activatrices telles que les « guanine nucleotide exchange factors » (Rho GEF), ou inhibitrices comme les « GTPase activating proteins » (Rho GAP) qui favorisent l'hydrolyse du GTP par les Rho GTPases. Une dernière forme de protéines régulatrices, les « guanine nucleotide dissociation inhibitors » (Rho GDI) séquestrent les Rho GTPases liées au GDP et les maintiennent dans une conformation inactive. Les Rho GTPases subissent des modifications post-traductionnelles de type géranylation ou farnésylation qui leur permettent de s'associer à la membrane plasmique, à proximité des récepteurs membranaires.

Les Rho GTPases subissent une régulation spacio-temporelle. Lorsqu'un récepteur est activé, il induit l'activation des Rho GTPases via les Rho GEF et la polymérisation locale du cytosquelette d'actine selon une architecture dépendante de la nature des Rho GTPases (Hall, 1998). Ainsi, différentes Rho GTPases peuvent être activées simultanément ou séquentiellement dans la cellule. De la même manière, une même Rho GTPase peut être active en un point et inactive à un autre endroit. Ces particularités sont à la base des mécanismes de régulation impliqués dans la migration cellulaire et l'assemblage/désassemblage des jonctions intercellulaires.

Chez les mammifères, vingt-deux protéines de la famille des Rho GTPase ont été répertoriées ; les plus étudiées restent RhoA, Rac et Cdc42 (Figure 12) (Aspenstrom, 1999). Une fois RhoA activé, il recrute les formines qui sont impliquées dans la nucléation de l'actine et la stabilisation des MF. Cette coopération donne lieu à la polymérisation rapide de fibres parallèles non ramifiées, tenues les unes aux autres par des molécules de myosine. Ces fibres sont attachées soit aux jonctions adhérentes des cellules épithéliales par l'intermédiaire d'interactions avec la Formine-1 et l' α -ctn, soit aux adhérences focales (Kobielak et al., 2004). Rac recrute les complexes de nucléation de l'actine Arp2/3 (Actine related protein) via l'activation de WAVE (WASP-family Verprolin-homologous protein) qui sont responsables d'une organisation ramifiée et dynamique du cytosquelette d'actine impliquée dans la formation des lamellipodes (Le Clainche and Carlier, 2008). En recrutant Arp2/3 sous le contrôle des protéines WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein), Cdc42 permet de former des fibres fasciculées dont la polymérisation induit la formation de protrusions membranaires constituant les filopodes ou les épines dendritiques dans les neurones (Mattila and Lappalainen, 2008). Certaines protéines associées aux fibres de stress comme les formines sont d'ailleurs retrouvées dans les filopodes où elles participent à la stabilisation des structures

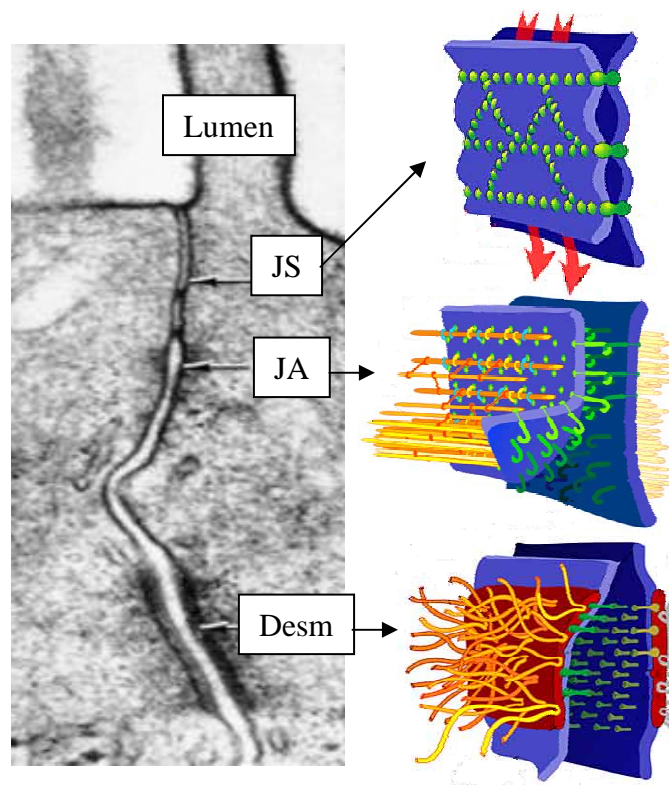


Figure 13: Les jonctions inter-cellulaires.

Les jonctions inter-cellulaires sont formées par différents complexes d'adhérence. Du pôle apical au pôle basal, on retrouve des jonctions serrées (JS), des jonctions adhérentes (JA) et des desmosomes (Desm) (d'après Perrez-Moreno, M., 2003 et wikipedia).

d'actine. Ces différentes organisations du cytosquelette influencent fortement la migration et la mise en place ou le désassemblage des jonctions intercellulaires. Dans les fibroblastes, Rho-A est impliqué dans la formation des fibres de stress et des adhérences focales, Rac dans l'organisation des lamellipodes et des adhérences focales et Cdc42 dans la formation de filopodes (Braga et al., 1997). Au niveau des cellules épithéliales, RhoA et Rac sont également essentiels à l'établissement et au maintien des jonctions adhérentes (Braga, 2000; Braga, 2002). L'augmentation ou l'inhibition de leur activité conduit à la perte des jonctions. Le recrutement et la régulation fine de ces Rho GTPases aux contacts intercellulaires nouvellement formés gèrent l'organisation du cytosquelette d'actine cortical et les tensions qu'il exerce sur les protéines d'adhérence. Ces processus sont essentiels au renforcement des contacts, à l'établissement de la polarité cellulaire et à leur maintien (Lozano et al., 2003).

Adhérence intercellulaire

Lors de la phase précoce de différenciation, les cellules épithéliales intestinales établissent des jonctions intercellulaires de différents types : desmosomes, jonctions adhérentes et jonctions serrées (Figure 13). Ces différentes structures assurent plusieurs fonctions dans l'épithélium en terme de polarité des cellules, de résistance mécanique, de communication intercellulaire, de signalisation ou de contrôle de la perméabilité épithéliale. L'assemblage et le maintien des jonctions fait intervenir des structures membranaires comme les radeaux lipidiques, impliqués dans le regroupement des molécules de jonction et de signalisation au niveau des zones de contact. Dans un cadre pathologique, ces jonctions peuvent être affectées, comme en condition de stress, d'inflammation ou lors de la progression tumorale.

Les desmosomes

Les cahérines appartiennent aux molécules d'adhérence intercellulaire. Elles sont présentes sous une trentaine de formes différentes exprimées de manière variable suivant les tissus. Dans cette super-famille, on distingue plusieurs sous-groupe dans les cadhérine classiques (de type I) (la E-cadhérine pour les cellules épithéliale, la N-cadhérine principalement dans les cellules nerveuses, la P-cadhérine placentaire et la VE-cadhérine dans l'endothélium vasculaire), les cadhérines desmosomales (desmogléine et desmocolline), les proto-cadhérines et des cadhérines atypiques (notamment la T-cadhérine dans cellules nerveuses et musculaires) (Hulpiau and van Roy, 2009).

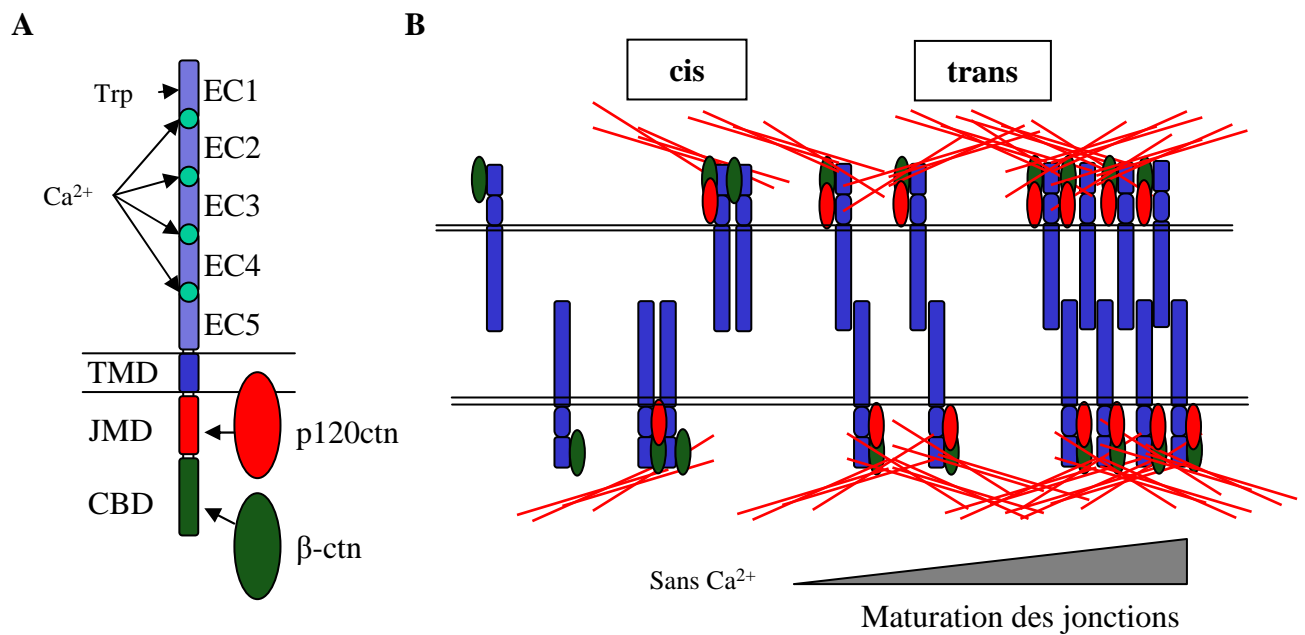


Figure 14: Les jonctions adhérentes.

A/ La E-cadhérine est constituée de 5 domaines extracellulaires EC1 à EC5 intercalés par des sites de fixation du calcium, un domaine transmembranaire TMD, un domaine juxta-membranaire JMD capable de fixer la p120ctn et un domaine C-terminal CBD capable de fixer la β ctn. **B/** Les molécules de E-cadhérine établissent des interactions en cis en absence de Ca^{2+} . La maturation des jonctions adhérentes fait intervenir le regroupement latéral des trans-dimères de E-cadhérine et leur liaison à la p120ctn et au cytosquelette d'actine.

Les desmosomes se forment au dessous des jonctions adhérentes où elles assurent un rôle adhésif entre les cellules (Thomason et al., 2010). Au niveau du cytoplasme, des protéines adaptatrices comme la γ -caténine (ou plakoglobine) et la desmoplakine assurent un lien avec les filaments intermédiaires dont le continuum entre les cellules procure à l'épithélium des propriétés résistantes et élastiques. Certaines protéines peuvent être impliquées dans différentes structures d'adhérence. Ainsi, dans les cellules épithéliales intestinales du côlon humain, la protéine JAM-C (Junction adhesion molecule) est fortement exprimée, mais il ne colocalise pas avec les protéines composant les jonctions serrées telles que ZO-1 ou JAM-A. En revanche, on le retrouve colocalisé avec la desmoplakine au niveau des desmosomes. Ceux-ci constituent le premier rempart rencontré par les leucocytes de la lamina propria exprimant les récepteurs membranaires CD11b/CD18 capables d'interagir avec JAM-C. Cette liaison joue un rôle important dans la régulation desmosomale lors de la transmigration leucocytaire (Zen et al., 2004).

Jonctions adhérentes (Zonula adherens)

Dans les cellules épithéliales, les jonctions adhérentes sont issues de l'assemblage des molécules de E-cadhérines. Ce sont des protéines à un fragment transmembranaire de 120kDa qui établissent des liaisons homophyloques dépendantes du calcium avec les cadhérines voisines via leurs domaines N terminaux (Nterm) (Figure 14A). Cette reconnaissance est permise par la présence de 5 domaines extra-cellulaires EC-1 à -5 (EC-1 en Nterm et EC-5 du côté membranaire). Ils sont séparés par des sites de fixation du calcium qui assurent un rôle structural primordial pour l'établissement et le maintien des jonctions en donnant de la rigidité à la partie extra-cellulaire (Nagar et al., 1996). Les molécules de cadhérines peuvent interagir en formant des cis dimères quand elles sont issues d'une même cellule ou en trans-dimères entre cadhérines de cellules mitoyennes (Figure 14B). A ce jour les domaines d'interaction intervenant dans la formation des dimères de cadhérines sont encore discutés. Pour les interactions en cis, certaines études proposent l'appariement des domaines EC-1, par le logement d'un résidu Tryptophane (Trp) dans une poche hydrophobe située au niveau de la séquence His-Ala-Val (HAV) de la cadhérine voisine (Blaschuk et al., 1990). D'autres proposent en revanche une interaction entre le domaine EC1 d'une cadhérine et la région liant les domaines EC2 et EC3 d'une autre molécule de cadhérine (Boggon et al., 2002). Les trans-dimères se forment par l'association des domaines EC1 des cadhérines de cellules mitoyennes

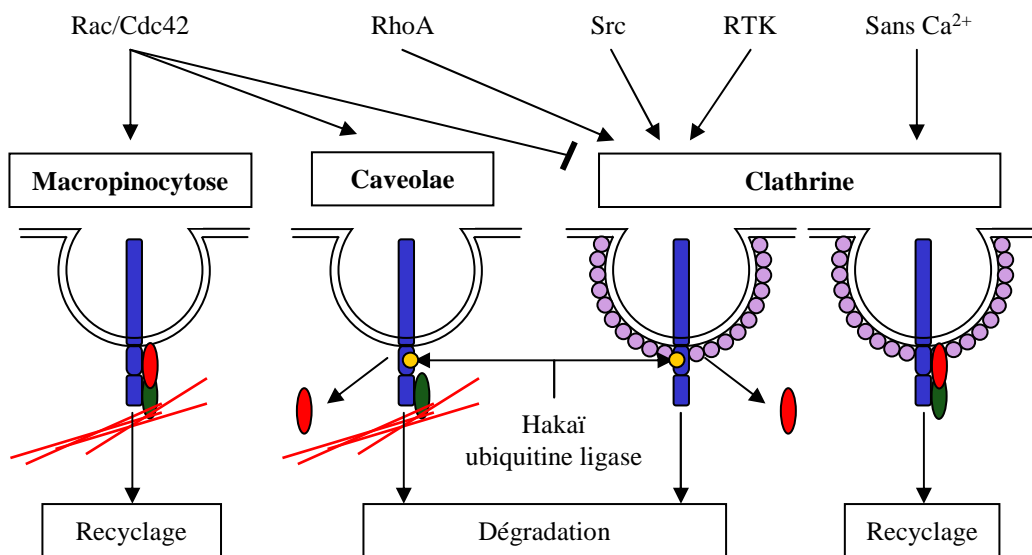


Figure 15: Endocytose de la E-cadhérine.

Des signaux extra-cellulaires ou intra-cellulaires mobilisent différents mécanismes d'endocytose permettant le recyclage ou la dégradation de la E-cadhérine. P120ctn (rouge), β ctn (vert), Cytosquelette d'actine (fibres rouges), E-cadhérine (bleu), phosphorylation (jaune) et clathrine (violet).

(Zhang et al., 2009). Le regroupement latéral des trans-dimères permet à la jonction d'acquérir une forme plus mature, responsable de contacts intercellulaires plus cohésifs (Pertz et al., 1999). Des données récentes indiquent que les cis-dimères et les trans-dimères se forment respectivement en absence ou en présence de calcium (Shapiro and Weis, 2009). Ceci suggère que la formation de cis-dimères n'est pas favorisée *in vivo*. La E-cadhérine contient deux domaines intra-cellulaires : les domaines juxtamembranaire (JMD) et C terminal (CBD) permettant l'interaction avec des protéines cytoplasmiques telles que les caténines (ctn) : α ctn, β ctn, γ ctn, p120ctn (Shapiro and Weis, 2009).

Les caténines possèdent des séquences consensus répétées Armadillo, qui sont impliquées dans des interactions protéine-protéine avec leurs différents partenaires (Hatzfeld, 1999). La β ctn est une protéine de 85 à 90kDa principalement connue pour son implication dans la voie de signalisation Wnt (précédemment citée pour son rôle dans la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales). Lors de la néosynthèse de la E-cadhérine, la β -ctn est recrutée au niveau du domaine CBD de la E-cadhérine dans le réticulum endoplasmique (Chen et al., 1999) (décrit Figure 16). Elle permet le recrutement de l' α ctn dont la fonction de lien avec le cytosquelette d'actine est assez controversée (Gates and Peifer, 2005). La formation de ce complexe stabilise les jonctions adhérentes en recrutant d'autres protéines partenaires impliquées dans sa structure ou des voies de signalisation (Perez-Moreno et al., 2003). Elle participe également à l'assemblage d'une ceinture d'actine au niveau des contacts intercellulaires. La γ ctn de 80kDa partage une fonction similaire avec la β ctn et participe également à l'assemblage des desmosomes. La protéine p120ctn, initialement décrite comme un substrat de la kinase Src, est issue de la transcription d'un gène comportant quatre promoteurs distincts dont les ARNm peuvent subir 3 types d'épissage différents (Aho et al., 2002). Ces variations donnent respectivement les formes 1 à 4 et A à C dont l'expression est dépendante du type cellulaire. Ainsi, les formes 1A sont plutôt exprimées dans les fibroblastes et les formes 3A dans les cellules épithéliales où elles s'associent au domaine JMD des cadhérines. Les complexes p120ctn/E-cadhérine peuvent se former au niveau de l'appareil de Golgi. Cependant cette association se fait principalement à la membrane plasmique car la déplétion de p120ctn n'affecte pas l'adressage de la E-cadhérine vers le Golgi. La formation de ces complexes participe à la stabilisation de la jonction adhérente en protégeant la E-cadhérine de la dégradation dépendante de l'E3-ubiquitine ligase Hakai (Fujita et al., 2002). Elle favorise également le regroupement latéral des cis-dimères dans la membrane plasmique. L'inactivation conditionnelle du gène de la p120ctn dans un modèle de souris KO illustre bien

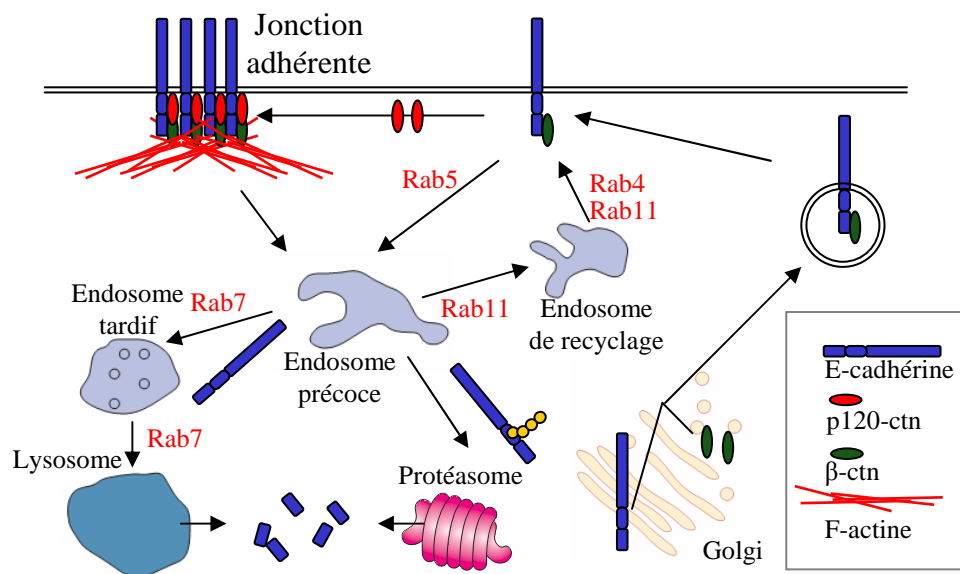


Figure 16: Recyclage de la E-cadhérine.

La E-cadhérine s'associe à la β -ctn au niveau de l'appareil de Golgi avant d'être exocytée à la membrane baso-latérale. La fixation de p120ctn et la polymérisation du cytosquelette d'actine permettent le regroupement des cadhérines dans la membrane et la maturation des jonctions adhérentes. L'expression membranaire des cadhérines est régulée par leur endocytose avant d'être recyclée à la membrane ou dégradée dans la voie endo-lysosomale et par le protéasome. Leur trafic au niveau des compartiments endosomaux est régi par des protéines Rab spécifiques.

que p120ctn est nécessaire au maintien des contacts intercellulaires. Ces souris présentent une diminution de l'expression des molécules de jonction et une augmentation de la perméabilité de barrière épithéliale intestinale (Smalley-Freed et al., 2010).

Dynamique membranaire de la E-cadhérine (Endocytose et recyclage)

Etant donné sa demi-vie à la membrane plasmique qui est d'environ 5h, la E-cadhérine est une protéine dont la localisation membranaire est régulée de manière dynamique (Shore and Nelson, 1991). Son internalisation fait intervenir des voies d'endocytose sélectives incluant des mécanismes dépendant des clathrines (Ivanov et al., 2004), des cavéolae/radeaux lipidiques (Paterson et al., 2003) et de la macropinocytose (Bryant et al., 2007) (Figure 15). Le recyclage des cadhérines s'effectue de manière basale dans les cellules et peut également cibler différents pools de molécules. Des mécanismes clathrine dépendants (Le et al., 1999), tout comme la macropinocytose sont impliqués dans le recyclage des cadhérines qui ne sont pas engagées dans les jonctions adhérentes (Paterson et al., 2003). L'activation de voies de signalisation intervient également dans le contrôle de l'endocytose de la E-cadhérine en sollicitant des mécanismes d'internalisation qui peuvent conduire à une diminution d'expression plus ou moins longue à la membrane plasmique. Ainsi, en fonction des processus cellulaires engagés, l'adressage de la E-cadhérine vers des compartiments de dégradation ou de recyclage régule sa présence à la membrane (Figure 16). Un passage par les endosomes de recyclage conduit à un retour membranaire très rapide. Ce temps est rallongé si la E-cadhérine passe par les endosomes précoces et/ou tardifs où elle peut être dégradée par les lysosomes et le protéasome (Tsukamoto and Nigam, 1999). Les protéines Rab sont de petites Rho GTPases impliquées dans l'adressage des vésicules d'endocytose vers les compartiments appropriés. Les protéines Rab5 et Rab7 ont été décrites pour conduire la E-cadhérine dans la voie endo-lysosomale où elle sera dégradée, alors que Rab4 et Rab11 sont impliqués dans son recyclage membranaire (Sonnichsen et al., 2000).

L'activation des kinases intracellulaires par diverses voies de signalisation liées à des événements pathologiques ou non peut conduire à la régulation des jonctions adhérentes (Kamei et al., 1999). L'activation de Src est responsable de la phosphorylation de la E-cadhérine sur Tyr⁷⁵³ et Tyr⁷⁵⁴ (Avizienyte et al., 2002) et du recrutement de la E3-ubiquitine ligase Hakai (Fujita et al., 2002). Celle-ci ubiquitine la queue cytoplasmique des cadhérines et prévient leur recyclage par un adressage au protéasome, responsable de leur dégradation. Des

mécanismes indépendants de l'ubiquitine sont également responsable de la dégradation de l'a E-cadhérine par la voie endo-lysosomale. Dans de nombreuses études, il a été montré que la E-cadhérine n'est plus associée à p120ctn lors de son endocytose (Ireton et al., 2002). La p120ctn, initialement décrite comme un substrat de Src peut également être phosphorylée suite à l'activation de nombreux facteurs de croissance de type récepteur tyrosine kinase (RTK) (Bryant and Stow, 2004; Mosesson et al., 2008). La stabilité de la E-cadhérine à la membrane est fortement contrôlée par les caténines. Par ailleurs, il a été suggéré que le maintien des caténines au niveau des domaines cytoplasmiques de la E-cadhérine peut favoriser son recyclage. Lorsque l'expression de p120ctn et la β ctn est affectée, dans les tumeurs (Davis et al., 2003; Ireton et al., 2002) ou artificiellement par invalidation génétique « knockout (KO) » et siARN (Smalley-Freed et al., 2010), le renouvellement membranaire de la E-cadhérine est fortement augmenté. Il a été proposé que l'association de p120ctn au domaine JMD de la E-cadhérine masque des sites de reconnaissance impliqués dans le recrutement des protéines adaptatrices nécessaires à la formation des puits de clathrine. Des mécanismes similaires sont également proposés pour la β ctn, impliquant les caténines dans un rôle stabilisateur. Le domaine CBD de la E-cadhérine qui se lie à la β ctn contient une séquence PEST impliquée dans l'adressage au protéasome. La perte d'interaction avec la β ctn peut donc également conduire à sa dégradation (Lilien and Balsamo, 2005). A l'inverse, l'implication de la β ctn dans la liaison et l'organisation du réseau d'actine fait d'elle un élément nécessaire à l'endocytose de la E-cadhérine dans la voie cavéolae et la macropinocytose.

Suivant les différentes études, les Rho GTPases ont un effet initiateur et/ou inhibiteur dans la régulation de la E-cadhérine à la membrane plasmique. Néanmoins, la majeure partie des observations effectuées dans les différents modèles cellulaires peut être conciliée par l'hypothèse que, suivant le type d'endocytose mis en place, l'activation des Rho GTPases a un effet positif ou négatif sur les jonctions adhérentes. En contrôlant l'organisation du cytosquelette d'actine, les Rho GTPases participent à la contraction du cytosquelette et au trafic vésiculaire (Ridley et al., 1992; Symons and Rusk, 2003). La voie cavéolae est par exemple mobilisée par l'activation de Rac dans les kératinocytes (Akhtar and Hotchin, 2001). Ce mode de régulation est emprunté par l'EGF (Epithelial growth factor) et conduit à la déstabilisation des jonctions adhérentes et à la transition épithélio mésenchymateuse (TEM) (Lu et al., 2003). Dans les cellules épithéliales, Rac et Cdc42 favorisent la mise en place des jonctions adhérentes en inhibant l'endocytose clathrine dépendante de la E-cadhérine (Izumi et al., 2004). Dans les myoblastes, l'activation de RhoA est également capable d'altérer les

jonctions adhérentes en induisant la dissociation de p120ctn au niveau du JMD de la M-cadhérine, partiellement via la ROCK (Rho associated protein kinase) (Charrasse et al., 2006).

Les interactions complexes entre les caténines, les Rho GTPases et l'organisation du cytosquelette, combinées aux diverses voies d'endocytose ne permettent pas d'établir de règles absolues concernant les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la E-cadhérine au niveau de la membrane plasmique. Ces mécanismes dépendent du type cellulaire et du contexte dans lequel les cellules se trouvent (maturité des jonctions) (Braga et al., 1999). Des mécanismes similaires sont également décrits pour les molécules impliquées dans les jonctions serrées (Ivanov et al., 2004).

Assemblage des jonctions adhérentes et différenciation entérocytaire

La différenciation entérocytaire et la maturation des jonctions intercellulaires sont des processus intimement liés. En effet, l'établissement de contacts intercellulaires permet l'acquisition d'un phénotype épithélial et la polarisation cellulaire. Par exemple, l'expression de la E-cadhérine dans des lignées cellulaires fibroblastiques permet la mise en place de jonctions intercellulaires (Nagafuchi et al., 1987) et l'acquisition d'un phénotype épithélial avec des compartiments membranaires spécialisés (McNeill et al., 1990). La formation des jonctions est ainsi responsable de la séparation des compartiments membranaires à la composition lipidique (Simons and Ikonen, 1997) et aux fonctions distinctes, au pôle apical et au pôle basolatéral. La nature des lipides qui composent la membrane plasmique joue un rôle important dans l'activité des protéines membranaires et dans leur adressage. Des microdomaines membranaires appelés radeaux lipidiques (RL) présentent des propriétés particulières du fait de leur composition lipidique enrichie en sphingolipides et en cholestérol (Edidin, 2001; Simons and Sampaio, 2011). Elle leur confère un caractère insoluble aux détergents non-ioniques à 4°C, comparé au reste de la membrane plasmique et permet de les purifier par gradient de densité (Edidin, 2003). Les RL contiennent également des protéines spécifiques telles que les flotillines et les cavéolines (Langhorst et al., 2005). Celles-ci sont capables de stabiliser la fusion des radeaux en s'oligomérisant. Dans certains modèles cellulaires, les domaines membranaires contenant flotillines et cavéolines ne se mélangent pas. Ces deux protéines définissent ainsi des radeaux aux fonctions distinctes (Vassilieva et al., 2009). Ces éléments suggèrent qu'il existe des RL de natures différentes, impliqués dans des fonctions distinctes. Leurs propriétés particulières leur permettent de recruter des

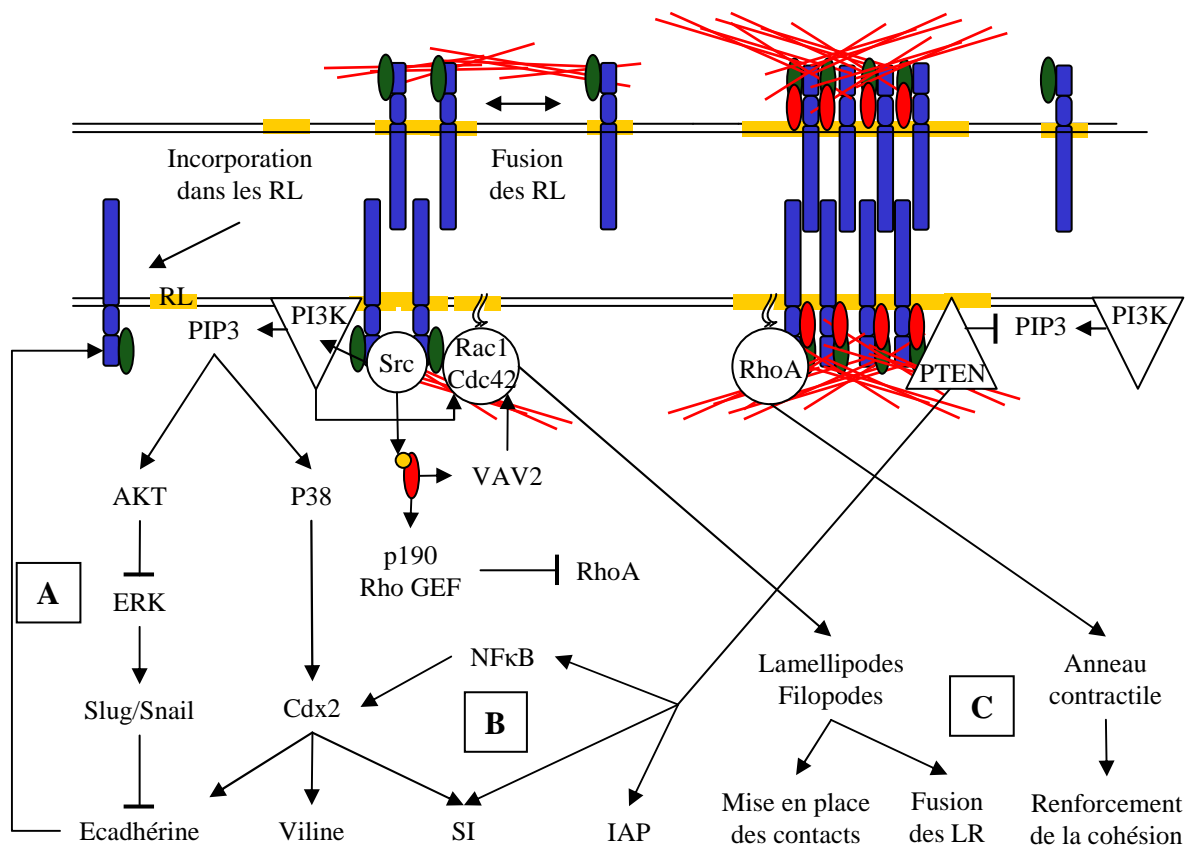


Figure 17: Maturation des jonctions adhérentes.

La maturation des jonctions adhérentes fait intervenir de nombreuses voies de signalisation impliquées dans: **A/** Les boucles d'autorégulation de la E-cadhérine, **B/** La transcription des marqueurs de différenciation, **C/** Les modifications des propriétés mécaniques par l'organisation du cytosquelette d'actine.

La barrière épithéliale intestinale

récepteurs transmembranaires comme l'EGFR, la E-cadhérine, les intégrines... et des protéines de signalisation associées à la membrane plasmique comme les Rho GTPases, la PI3K (phosphatidylinositol 3 Kinase),... en les maintenant rapprochés les uns des autres. Ces protéines pourraient entrer et sortir des RL en permanence par diffusion passive dans la membrane plasmique. Lors de l'activation d'un de ces récepteurs, la proximité avec ses effecteurs permet d'induire une voie de signalisation. L'agrégation ultérieure des RL et le regroupement de mêmes récepteurs activés pourraient permettre d'amplifier ces signaux. Les radeaux lipidiques permettent également d'établir une plateforme de stabilisation à la membrane plasmique ou de régulation de leur endocytose. Les jonctions intercellulaires matures sont localisées au niveau des RL (Chartier et al., 2011a; Nusrat et al., 2000; Resnik et al., 2011). Dans les pathologies inflammatoires digestives et les modèles animaux correspondants, on retrouve une altération de la barrière épithéliale associée à une perte d'expression des molécules d'adhérence et de la Flotilline dans les RL (Li et al., 2008). Ces éléments indiquent que les RL jouent un rôle important dans l'établissement et le maintien des jonctions intercellulaires. La mise en place des jonctions nécessite la coopération de diverses voies de signalisation impliquées dans des boucles d'autorégulation de la E-cadhérine, l'expression des marqueurs de différenciation et des modifications d'organisation du cytosquelette d'actine (Figure 17).

Les processus de mise en contact des cellules et l'initiation des jonctions intercellulaires sont dépendants de l'organisation du cytosquelette d'actine (Vasioukhin et al., 2000; Zhang et al., 2005). La E-cadhérine nouvellement synthétisée n'est pas toujours associée à la p120ctn dont la localisation cytoplasmique lui permet de réguler l'activité des Rho GTPases. Ainsi dans les phases précoces de la mise en place des jonctions adhérentes, Rac1 et Cdc42 sont activés et sont responsables de la formation de lamellipodes et de filopodes contrairement à RhoA qui reste inactif. La proximité des cellules et leur imbriquement l'une avec l'autre par la formation de protrusions, favorisent la mise en place des jonctions et le regroupement latéral des molécules de E-cadhérine (Izumi et al., 2004). L'association du cytosquelette d'actine au cis-dimères de E-cadhérine permettrait également le rapprochement et la fusion des RL, recrutant ainsi d'autres molécules de signalisation comme la PI3K ou Src. De manière intéressante, Src est présente et active au niveau des jonctions adhérentes en formation alors que cette même kinase participe au désassemblage des jonctions intercellulaires lors de la TEM. D'une part, elle participe à l'activation de la PI3K en la phosphorylant (Pang et al., 2005), d'autre part elle phosphoryle la p120ctn (Anastasiadis et al., 2000). Les résidus

phosphorylés de la p120ctn impliqués dans ces processus sont mal connus, mais pourraient induire une flexibilité nécessaire au bon agencement des molécules au sein de la jonction en retardant l'incorporation définitive de la p120ctn dans le complexe. La PI3K est localisée au niveau des contacts intercellulaires où elle interagit avec la β ctn (Espada et al., 1999). Elle phosphoryle le phosphatidylinositol qui est un lipide de la membrane plasmique pour former du PIP3 (phosphatidylinositol tri-phosphate) impliqué dans l'activation des voies AKT et P38 MAPK (Mitogen activated kinase) (Pece et al., 1999). En inhibant la voie ERK (Extracellular related kinase)/Slug-Snail, AKT, lève la répression exercée sur le gène de la E-cadhérine (Figure 17A) (Conacci-Sorrell et al., 2003; Laprise et al., 2004). Cette boucle d'autorégulation de l'expression de la E-cadhérine est affectée à différents niveaux dans de nombreux cancers et lors de la TEM. L'activation de la voie P38 MAPK induit l'expression du gène homéotique CDX2 impliqué dans la régulation des gènes de la différenciation entérocytaire comme la viline, la sucrase isomaltase mais également la E-cadhérine (Laprise et al., 2002). Dans les Caco2, la formation des jonctions adhérentes régule également l'accumulation nucléaire du facteur de transcription HNF4 α qui régule la transcription l'ApolipoprotéineA-IV impliquée dans la différenciation des entérocytes (Peignon et al., 2006) (Figure 17B).

Au fur et à mesure de la maturation des jonctions, de nouvelles molécules de signalisation sont recrutées comme la phosphatase PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) (Kotelevets et al., 2001). Cette dernière antagonise la voie PI3K en déphosphorylant le PIP3. La voie PI3K est nécessaire lors de la phase précoce d'induction de la différenciation. Son inactivation avec la wortmannine ou l'utilisation de dominants négatifs de sa sous-unité active P85 inhibent les processus de maturation des jonctions intercellulaire et de la différenciation entérocytaire (Laprise et al., 2002). Cependant, dans cette même étude effectuée dans le modèle cellulaire de Caco2/15, il a été montré qu'une fois que les jonctions sont matures, l'inhibition de la PI3K ne conduit pas à leur désassemblage. Cet effet peut s'expliquer par le fait que PTEN inhibe déjà l'activité de la PI3K dans les jonctions matures. PTEN est également impliquée dans la régulation de la PA et de la sucrase isomaltase (Wang et al., 2001) et dans l'activation du facteur de transcription NF κ B qui induit l'expression de CDX2 (Kim et al., 2002). L'activation constitutive de PTEN est responsable de l'induction de la différenciation entérocytaire dans les modèles cellulaires de différenciation entérocytaire HT-29 et Caco2 (Wang et al., 2001). L'activité phosphatase de PTEN joue peut-être un rôle dans l'inactivation de Src qui est nécessaire à l'incorporation de p120ctn dans la jonction adhérente et à la formation de trans-dimères de E-cadhérine. Une fois associée à la E-cadhérine, la

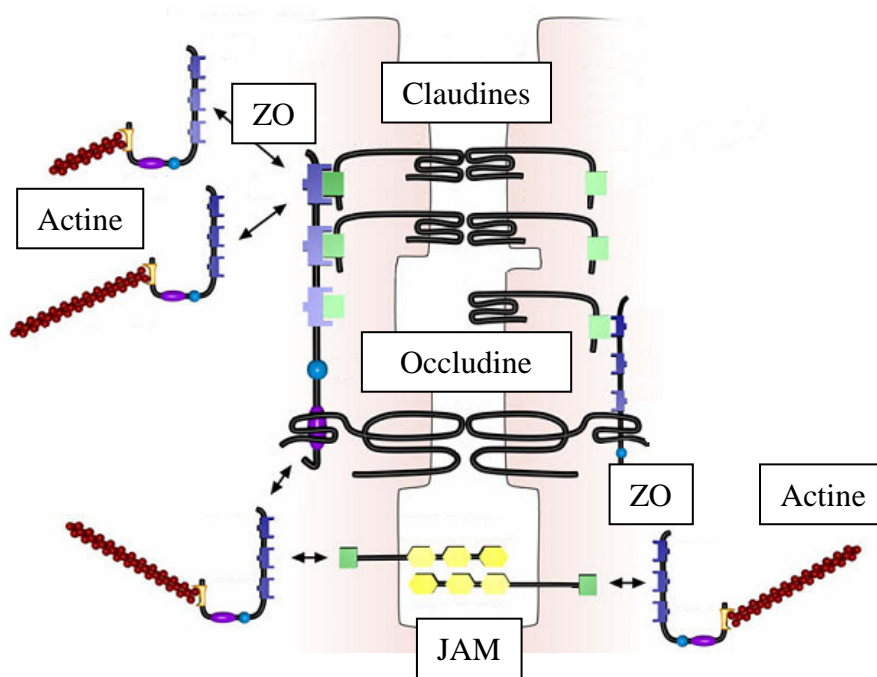


Figure 18: Les jonctions serrées.

Les jonctions serrées sont formées par l'interaction homo et hétérophylle de différentes isoformes de claudines, des Occludines et des JAM. Elles se lient ensuite au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des protéines ZO (d'après Groschwitz, K., 2009).

p120ctn serait incapable d'inactiver RhoA, ni d'activer Rac1 et Cdc42 par l'intermédiaire de VAV2. RhoA est responsable de la formation d'un anneau contractile d'actine au niveau des contacts intercellulaires qui renforce la cohésion des cellules en assurant un continuum dans le feuillet épithélial (Figure 17C).

Jonctions serrées (Zonula occludens)

Les jonctions serrées sont situées à la frontière avec le pôle apical et sont formées par des protéines transmembranaires, l'occludine, les claudines et les JAM (Figure 18) (Niessen, 2007). L'occludine est la première à avoir été identifiée dans ce complexe dont elle a donné le nom. Cette protéine à quatre fragments transmembranaires établit des liaisons homophyloques avec les occludines des cellules voisines et recrute des protéines adaptatrices au niveau de son domaine cytoplasmique, telles que les zonula occludens (ZO-1 à -3). ZO-1 stabilise la jonction à la membrane et recrute les complexes ARP2/3 responsables de la polymérisation du cytosquelette d'actine (Howarth and Stevenson, 1995). Certaines jonctions serrées ne possèdent pas d'occludines, ce qui suggère qu'elles ne sont pas nécessaires à la formation de ces jonctions. Récemment, une protéine présentant de nombreuses homologies avec l'occludine a été découverte, la tricelluline (Ikenouchi et al., 2005). Cette protéine membranaire est impliquée dans la jonction entre trois cellules et permet un renforcement de la cohésion du tapis épithélial. Il existe au moins 24 isoformes de claudines qui sont exprimées différemment suivant la nature des tissus (Elkouby-Naor and Ben-Yosef, 2010). Elles possèdent une organisation membranaire similaire à celle de l'occludine et établissent des jonctions homo- ou hétérophyloques, accolées aux occludines. Les claudines sont responsables du scellement des jonctions intercellulaires. Des changements dans l'expression des diverses isoformes ou des modifications post-traductionnelles participent aux modulations de la barrière épithéliale et au passage sélectif de composés de tailles diverses (protéines, glucides, électrolytes,...) par la voie para-cellulaire (Balkovetz, 2006). Les JAM appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Ig) et comprennent différentes isoformes. Elles établissent des jonctions homo- ou hétérophyloques de part et d'autre des complexes formés par les occludines et les claudines et s'associent aussi à la protéine adaptatrice ZO-1. Le KO de JAM-A est par exemple responsable d'une altération de la barrière épithéliale intestinale (Laukoetter et al., 2007).

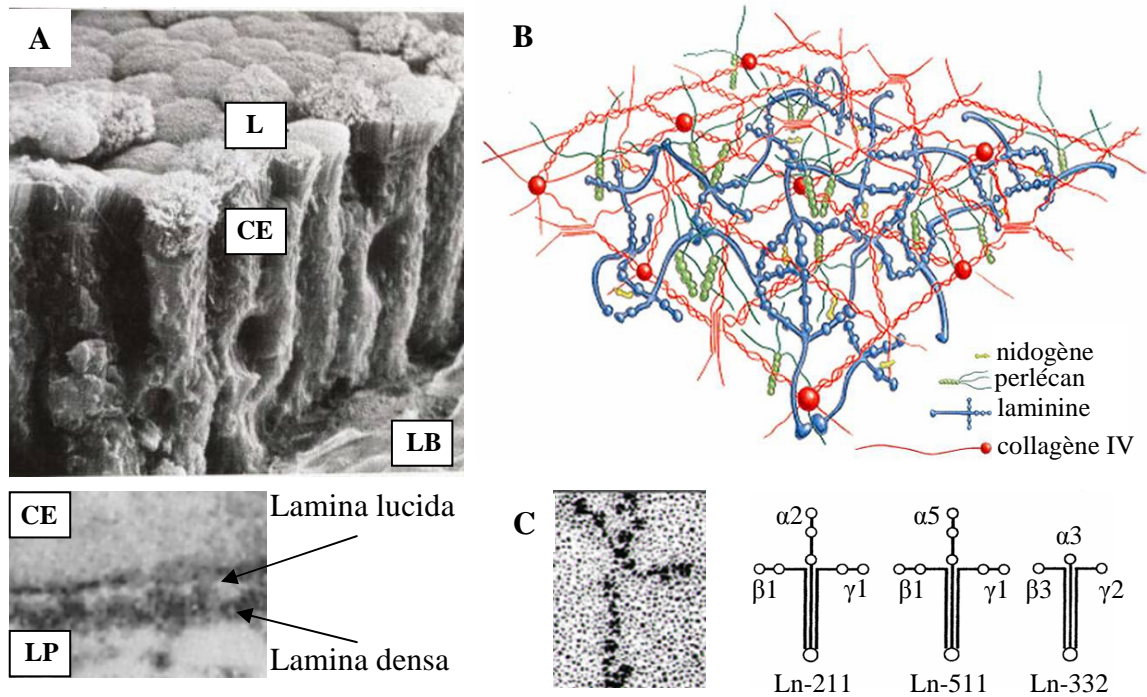


Figure 19: Matrice extra-cellulaire (MEC) des épithélia.

A/ Electromicrographies de l'épithélium intestinal en microscopie à balayage (haut) et à transmission (bas). L- lumen, CE- cellules épithéliales, LB- lame basale, LP- lamina propria. La lame basale est composée de la lamina lucida et de la lamina densa. **B/** Organisation des réseaux de protéines de la MEC au niveau de la lame basale. **C/** Electromicrographie de la laminine (gauche) et structure des différentes laminines (droite) (d'après molecular biology of the cell, Albert's fourth edition ; Laurie, G.W., 1982).

Adhérence cellule-matrice

La matrice extra-cellulaire

Les cellules épithéliales intestinales reposent sur une matrice extra-cellulaire (MEC) spécialisée appelée lame basale, qui est organisée en deux feuillets, la *lamina lucida* du côté épithélial et la *lamina densa* du côté des cellules mésenchymateuses de la lamina propria (Figure 19) (Laurie et al., 1982). Elle est composée d'une grande diversité de macromolécules provenant aussi bien de l'épithélium que du mésenchyme (Seltana et al., 2010; Teller et al., 2007). On retrouve différentes formes de collagène, de laminine, des peptidoglycanes, fibronectine, perlécan, nidogène, etc., agencés selon un réseau organisé. Ces protéines expriment des motifs tri-peptides RGD (principalement dans la fibronectine) qui sont des substrats ubiquitaires des récepteurs d'adhérence exprimés par les cellules. La MEC constitue à la fois un support d'adhérence pour les cellules épithéliales et une source de signaux. En effet, sa composition riche en peptidoglycanes lui donne la consistance d'un gel qui permet de retenir les molécules de signalisation circulantes telles que les facteurs de croissance et neuromédiateurs. Par ailleurs, l'établissement de gradients dans la composition de la MEC pourvoit des messages liés à l'adhérence de nature différente suivant le positionnement des cellules épithéliales sur l'axe crypto-villositaire. Lors des épisodes inflammatoires, de blessure ou encore de développement tumoral, le remodelage de la matrice permet également d'induire des signaux différentiels.

Les collagènes (Col) sont des glycoprotéines composées de trois sous-unités α (Ricard-Blum, 2011). La présence de séquences répétées (G-X-Y) leur donne une forme hélicoïdale permettant de les tresser les uns avec les autres selon une hélice plus ou moins longue avant d'être stabilisées par des ponts disulfures. Elles possèdent également des domaines non hélicoïdaux qui servent de plates-formes d'interaction avec les autres constituants de la MEC. La nature des collagènes et des partenaires avec lesquelles ils interagissent permet la construction d'un réseau à la géométrie et aux propriétés mécaniques variables. Une quarantaine de gènes codant pour des sous-unités α sont répertoriés. Ils entrent dans la composition de vingt-huit sous-types de Col différents, exprimés spécifiquement suivant les tissus. Au niveau de la lame basale intestinale, le Col IV ($\alpha 1, \alpha 1, \alpha 2$) est la forme la plus représentée et sert de support à l'organisation de la lamina lucida. Le Col VII ($\alpha 1, \alpha 1, \alpha 1$) est souvent retrouvé dans les épithélia pluri-stratifiés étant donné ses caractéristiques fibrillaires.

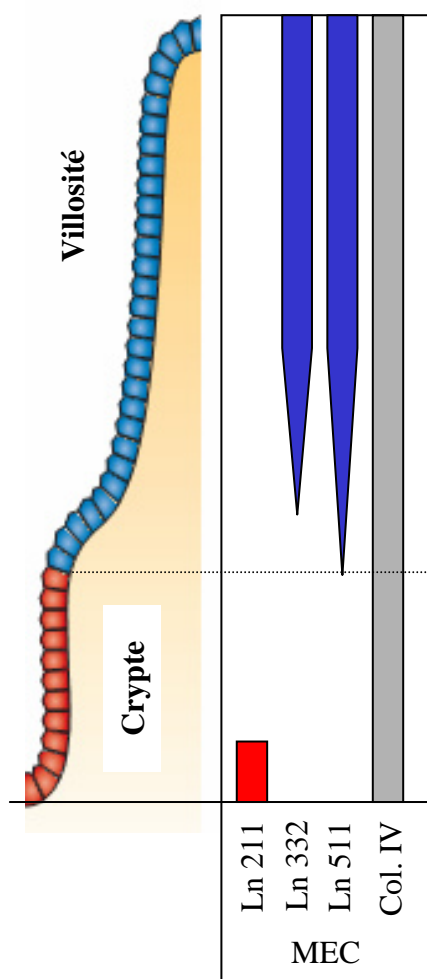


Figure 20: Topographie de la MEC sur l'axe cryptovillositaire.
 Représentation des profils d'expression des divers constituants de la matrice extracellulaire (MEC) chez l'Homme adulte (d'après Teller, IC., 2001).

Il participe néanmoins à la composition de la lame basale intestinale où il ancre la lamina densa sur le tissu conjonctif de la lamina propria.

Les laminines (Ln) sont des glycoprotéines hétéro-trimériques composées de sous-unités α , β et γ , parmi cinq α , trois β et trois γ identifiées à ce jour (Aumailley et al., 2005). Leur assemblage est stabilisé par des ponts disulfures et permettent d'obtenir quinze isoformes de Ln nommées suivant la nouvelle nomenclature Ln- $\alpha\beta\gamma$. Disposées en forme de croix, elles possèdent un domaine fibrillaire qui leur permet de se fasciculer les unes aux autres en formant le corps de la Ln. Les domaines globulaires situés à leurs extrémités établissent des connexions avec les autres constituants de la MEC et les récepteurs d'adhérence exprimés par les cellules épithéliales. Au niveau de la lame basale intestinale, les profils d'expression des Ln varient au cours de l'embryogenèse où ils jouent un rôle probable dans la cryptogenèse et la villogenèse (Teller et al., 2007). Chez l'homme et la souris adulte, on distingue l'expression de quatre formes de Ln, différemment réparties suivant l'axe crypto-villositaire (Figure 20). Les Ln-111 et Ln-211 sont exprimées uniquement à la base des cryptes de l'intestin grêle et du côlon où elles pourraient jouer un rôle dans le maintien de la niche des cellules souches intestinales. L'expression de la Ln-111 est ensuite perdue chez l'adulte. La diminution d'expression de la Ln-211 coïncide avec l'apparition croissante des Ln-332 et Ln-511 (Teller et al., 2007). Un gradient de ces isoformes existe au niveau de la zone de différenciation des cellules épithéliales à la base des villi. Or, des études ont montré que la présence de Ln-332 jouait un rôle dans la différenciation entérocytaire et l'établissement des contacts intercellulaires impliqués dans la barrière épithéliale (Basora et al., 1997; Gout et al., 2001). L'expression différentielle des Ln le long de l'axe crypto-villositaire pourrait dépendre de l'influence des divers facteurs diffusibles impliqués dans les voies de signalisation citées plus haut. Ainsi la Ln-332 est régulée par le TGF β (Tumor growth factor (BMP)), ce qui explique sa répartition dans les villi au niveau du grêle et dans la partie supérieure des cryptes au niveau du côlon (Zapatka et al., 2007).

Certains constituants de la matrice ne sont pas produits par les mêmes populations de cellules (Simon-Assmann et al., 2010; Teller et al., 2007). Par exemple, le collagène IV ($\alpha 1$, $\alpha 1$, $\alpha 2$) et les Ln-111 et Ln-211 de la lame basale intestinale ne sont synthétisés que par les cellules mésenchymateuses de la lamina propria (Teller and Beaulieu, 2001). Ainsi, la mise en place de la MEC fait intervenir la coopération des cellules épithéliales et du mésenchyme. Au cours de leur différenciation, les cellules épithéliales sont par ailleurs elles mêmes à l'origine

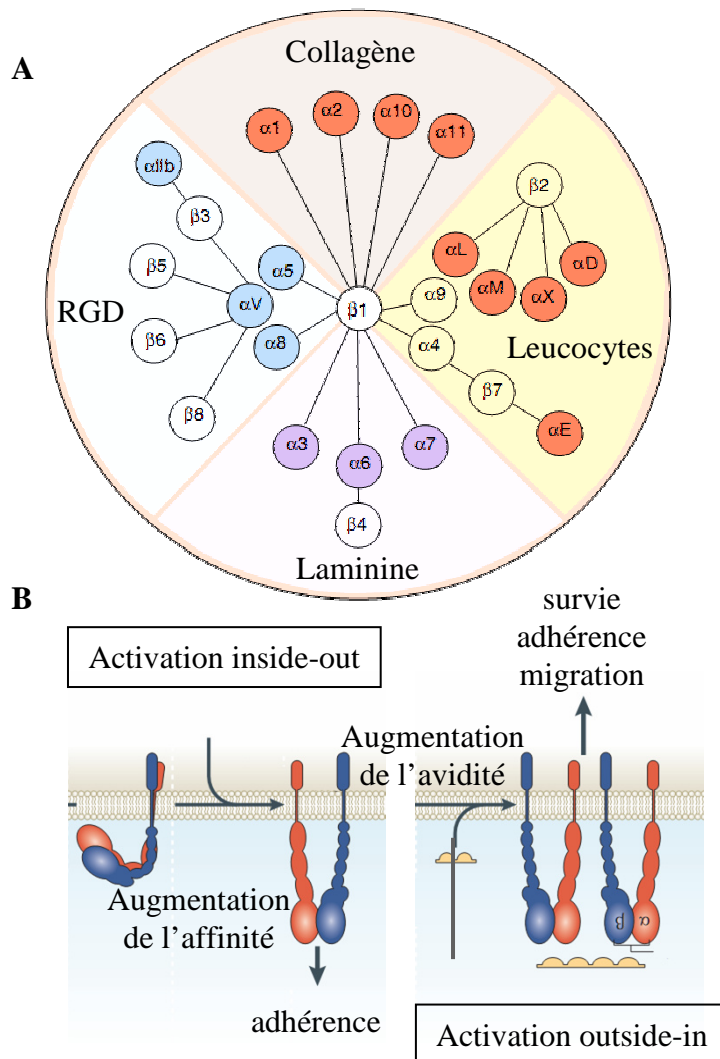


Figure 21: Les intégrines.

A/ Les sous-unités des intégrines reconnaissent des épitopes particuliers leur permettant de se fixer aux collagènes, aux laminines ou aux motifs RGD. Certaines intégrines sont exclusivement exprimées par les leucocytes. **B/** Les intégrines sont soumises à une activation « outside-in » par la MEC, et « inside-out » par des voies de signalisation intra-cellulaires. Le changement de conformation des intégrines conduit à une augmentation de leur affinité tandis que leur regroupement induit une augmentation de leur avidité. Ces activations des intégrines participent à la survie, l'adhérence et la migration des cellules. (d'après Barczyk, M., 2010 et Shattil, SJ., 2010).

de la sécrétion de ces isoformes de Ln dont l'incorporation au support d'adhérence renforce ces processus de différenciation (Gout et al., 2001; Halbleib et al., 2007; Simon-Assmann et al., 1990). La régulation des contacts intercellulaires et de la différenciation entérocytaire par l'expression de facteurs de transcription spécifiques tels que Cdx2 est contrôlée par certaines Ln (Simon-Assmann et al., 2010; Turck et al., 2006)

Les récepteurs d'adhérence à la MEC : Les intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines membranaires impliquées dans l'ancrage et la migration des cellules sur la MEC, la formation des hémidesmosomes ou encore la diapédèse lymphocytaire (Barczyk et al., 2010). Elles sont constituées de deux sous-unités, une α et une β , parmi 24 α pouvant également subir un épissage alternatif et 9 β associées de manière non covalente (Figure 21). La sous-unité α est composée d'une partie transmembranaire reliée à la partie Nterm extra-cellulaire par un pont disulfure et la sous-unité β possède un domaine intra-cytoplasmique court capable de recruter des protéines adaptatrices et des molécules impliquées dans la signalisation intra-cellulaire. Leur fonction dépend de la présence des cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} . Les couples d'intégrine $\alpha\beta$ ont une affinité variable suivant leurs ligands et une spécificité dépendante de la sous-unité α . Ainsi, certaines isoformes sont impliquées dans la reconnaissance des collagènes (les intégrines $\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha10$, $\alpha11$), des laminines (les intégrines $\alpha3$, $\alpha6$, $\alpha7$) ou des motifs RGD (les intégrines $\alpha5$, $\alpha8$, αV). D'autres isoformes sont exprimées spécifiquement par les leucocytes (αL , αM , αX , αD , αE). Les sous-unités β reconnaissent uniquement les motifs RGD et ne montrent donc aucune spécificité vis-à-vis des constituants de la MEC. Les correspondances entre intégrines et substrats sont redondantes et permettent des mécanismes de régulation variables suivant les types cellulaires. Les intégrines $\beta1$ assurent le recrutement de protéines adaptatrices comme l' α -actinine, la taline, la paxilline et la vinculine, impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine, ou des protéines de signalisation comme les kinases de la famille Src, l'intégrin linked kinase (ILK) ou la focal adhesion kinase (FAK). Cet assemblage appelé "complexe focal" (Figure 22) est amené à se renforcer par association de plusieurs complexes focaux pour former des adhérences focales, des invadosomes ou des podosomes. Les intégrines $\beta4$ ont un domaine cytoplasmique plus long (Hogervorst et al., 1990) qui est responsable du recrutement de protéines différentes impliquées dans la formation de complexes d'adhérence spécialisés avec les sous-unités $\alpha6$: les hémidesmosomes (Figure 22). Contrairement aux

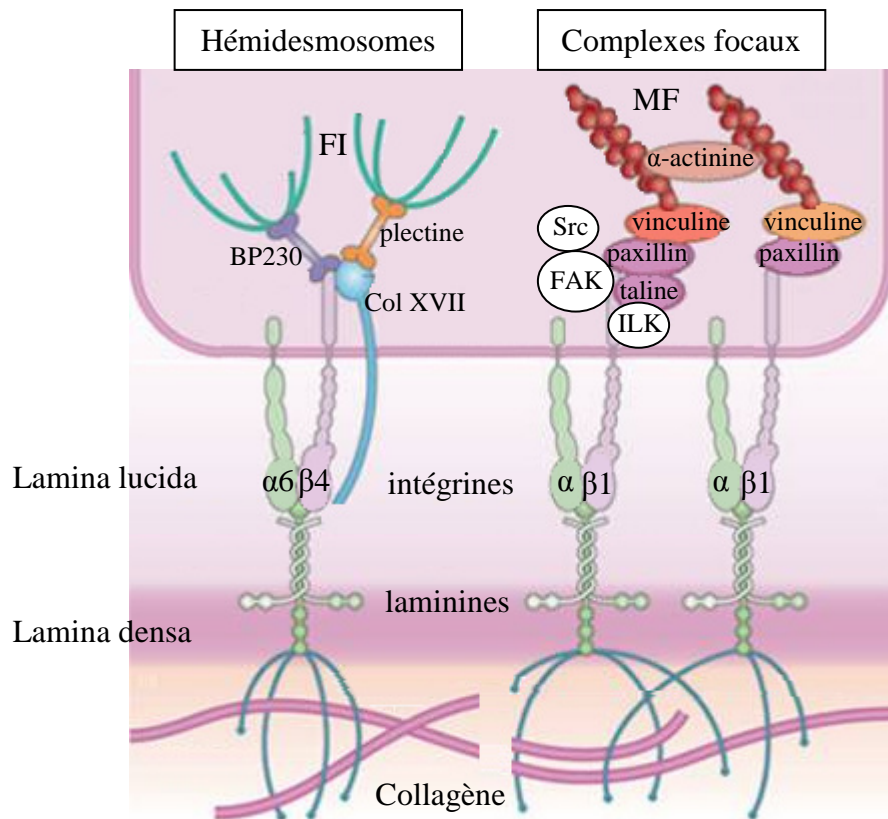


Figure 22: Hémidesmosomes et complexes focaux.
(d'après Simpson CL., 2011).

autres intégrines, $\alpha 6\beta 4$ joue principalement un rôle d'adhésion avec le recrutement de FI (Wiche et al., 1993).

Les intégrines sont à l'origine de mécanismes de signalisation bi-directionnels appelés "inside-out" et "outside-in" (Dedhar, 1999) (Figure 21B). Les intégrines exprimées à la membrane plasmique sont présentes sous des formes actives capables de fixer leurs ligands extra-cellulaires et responsables de l'induction de voies de signalisation intra-cellulaires, ou sous des formes inactives. De manière réciproque, les intégrines peuvent être activées par des voies de signalisation intra-cellulaires, ce qui conduit à une augmentation de leur affinité pour la MEC. Des études de crytalographie ont montré que les intégrines inactivées étaient présentes dans une conformation repliée qui masque les épitopes de reconnaissance de leurs ligands. Parallèlement à cette notion d'activation et d'affinité des intégrines pour leurs ligands, leur regroupement dans la membrane régule leur avidité. Cette agrégation peut dépendre à la fois de signaux intra-cellulaires et de la présence de ligands. Les complexes formés autour des intégrines assurent ainsi différentes fonctions suivant leur structure et leurs constituants.

Différents couples d'intégrines sont exprimés par les cellules épithéliales intestinales, où ils jouent un rôle dans la prolifération, la différenciation et la migration (Beaulieu, 1999) (Figure 23). Les isoformes $\beta 1$ et $\beta 4$ sont les sous-unités majoritairement exprimées dans tous les épithélia. La sous-unité $\beta 4$ s'associe avec $\alpha 6$ pour former des hémidesmosomes qui organisent le cytosquelette de kératine au niveau cytoplasmique (Jones et al., 1998). Les intégrines $\alpha 6\beta 4$ interagissent principalement avec les laminines et plus particulièrement avec la Ln-332 (Giancotti, 1996). Deux variants d'épissage alternatif ont été décrits pour la sous-unité $\beta 4$ avec une distribution différentielle sur l'axe crypto-villositaire (Basora et al., 1999). L'intégrine $\beta 4A$ qui est exprimée au niveau des cryptes perd sa capacité d'interaction avec la Ln-332. Pour la sous-unité $\alpha 6$, de manière analogue, plusieurs variants sont présents dans l'épithélium: une forme $\alpha 6A$ est restreinte à la base des cryptes tandis qu'une forme $\alpha 6B$ est exprimée au niveau des entérocytes différenciés (Dydensborg et al., 2009a). Des dimères avec $\alpha 6\beta 1$ sont également formés mais ils restent minoritaires. La sous-unité $\beta 1$ peut également dimériser avec les sous unités $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 7$ et $\alpha 8$ également réparties différenciellement selon l'axe crypto-villositaire. Leur association est impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine au niveau des adhérences focales. Chez l'homme, lors de la différenciation entérocytaire, le profil d'expression ou d'activation des intégrines passe de l'expression de $\alpha 2$ et $\alpha 8$ à la base des cryptes, à celle de $\alpha 3$ et $\alpha 7$ au niveau des villosités (Teller and Beaulieu,

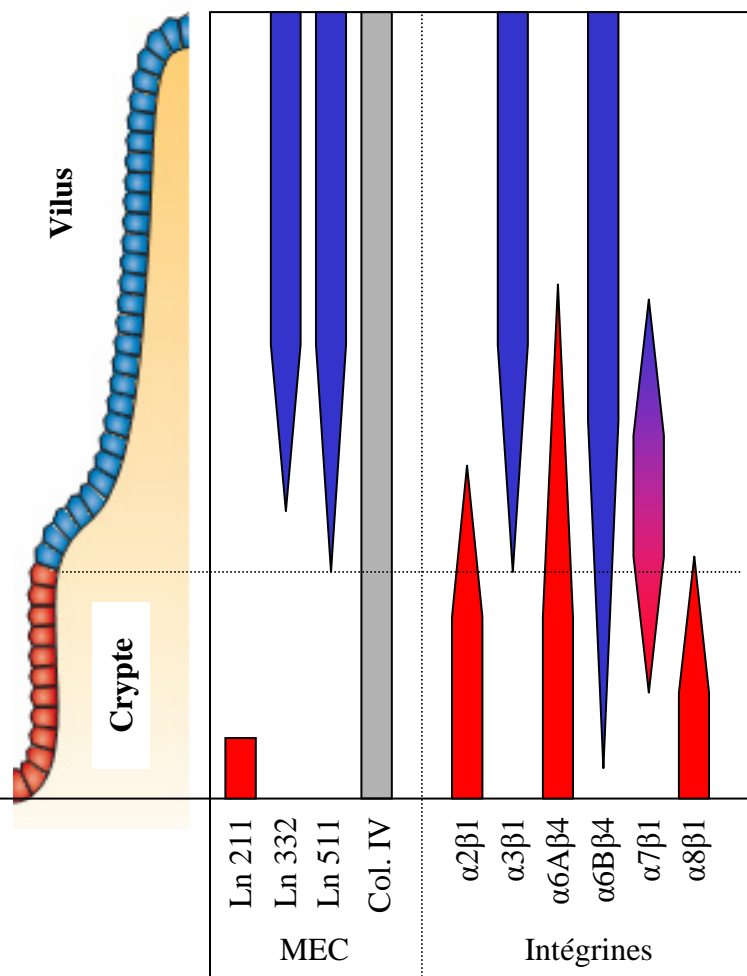


Figure 23: Topographie des intégrines sur l'axe crypto-villositaire.
 Représentation des profils d'expression des différents constituants de la matrice extracellulaire (MEC) et des intégrines le long de l'axe crypto-villositaire chez l'homme adulte (d'après Teller, IC., 2001).

2001). La sous-unité $\alpha 8$ est exprimée dans les cellules de la crypte où elle régule de manière positive la prolifération et la migration des HIEC (Benoit et al., 2009). Au cours de la différenciation dans le modèle cellulaire HT-29, l'expression de $\alpha 2$ et $\alpha 3$ est inchangée. Cependant, les modifications progressives de la composition de la MEC par déposition de Ln-332 peuvent rendre compte de différences d'activation des intégrines et de signalisation intracellulaire associées à l'adhérence cellule-MEC par des mécanismes dépendants de l'inhibition de Rho-A (Gout et al., 2001). L'interaction entre $\alpha 3$, $\alpha 6$ et la Ln-332 est également responsable, par la voie de signalisation PI3K/AKT, du renforcement des contacts intercellulaires formés par les jonctions adhérentes (Chartier et al., 2006). Des mécanismes équivalents ont été mis en évidence avec une matrice enrichie en Ln-332, Ln-211 ou en Col-IV dans les cellules Caco2, dont les effets sont diminués avec des anticorps bloquants dirigés contre les intégrines $\alpha 6$ ou $\beta 1$ (Schreider et al., 2002).

L'adhérence cellule-MEC dans un contexte pathologique

Un remodelage de la matrice extra-cellulaire est observé dans des situations pathologiques comme l'inflammation ou le cancer, où il joue un rôle dans l'adhérence et la signalisation. Dans les cas où l'épithélium est fortement endommagé, les cellules mésenchymateuses permettent de maintenir l'intégrité de la niche en sécrétant des Ln-111 et Ln-211 et de régénérer le squelette élémentaire de la lame basale avec le Col IV. D'autres substrats d'adhérence impliqués dans la cicatrisation sont produits tels que la fibronectine ou la fibrine (Seltana et al., 2010). Il arrive parfois que ces cellules soient lésées, notamment dans la maladie de Crohn (MC) qui occasionne des lésions transmuraux, mais l'épaisseur de la lamina propria permet de cicatrifier ces lacunes par migration et prolifération. La répartition des gradients des différentes formes de Ln sur l'axe crypto-villositaire de la lame basale est également affectée dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). En effet, le TNF α (Tumor necrosis factor) et l'IFN γ (Interferon) libérés lors des poussées inflammatoires induisent la sécrétion de Ln-332 et Ln-511 au niveau des cellules épithéliales de la crypte tandis qu'elles produisent peu voire pas de Ln-211 (Francoeur et al., 2004; Zboralski et al., 2010). Une surexpression des Ln-332, Ln-511 et Ln- $\alpha 1$ est également décrite dans les cellules de la bordure des carcinomes coliques (Akimoto et al., 2004; De Arcangelis et al., 2001). La déposition de ces substrats d'adhérence participe aux phénomènes de prolifération, de migration et d'invasion tumorale. La culture des Caco2/TC7 sur un substrat

de Ln-211,-332 ou-511 est responsable d'une augmentation de la prolifération cellulaire (Turck et al., 2005).

L'ensemble des modifications de la composition de la MEC dans ces situations pathologiques est à mettre en regard des modifications d'expression des intégrines. Lors de la progression tumorale, les cellules subissent une dé-différenciation. Il semblerait que l'augmentation de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses fasse intervenir des modifications d'expression des intégrines vers un profil semblable à celui des cryptes. Ces changements sont également impliqués dans l'adhérence des cellules métastatiques au niveau des organes cibles des tumeurs digestives. Dans les cancers colorectaux, l'expression de $\alpha 6$ est augmentée avec un changement d'épissage alternatif passant de B à A. L'expression de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ n'est pas impliquée dans la prolifération cellulaire mais semble en revanche jouer un rôle dans l'inhibition de la prolifération et de l'activité de c-myc, qui est affectée dans 70% des cancers colorectaux (Dydensborg et al., 2009b). La sous-unité $\alpha 2$ est également augmentée dans de nombreux cancers colorectaux ainsi que les sous-unités $\alpha 5$ et αV qui, au départ, sont peu ou pas exprimées dans le tissu sain. Elles sont fortement impliquées dans la prolifération ou l'acquisition d'un caractère métastatique. Dans les cellules normales HIEC issues de la crypte, la sous-unité $\alpha 8$ procure une sensibilité à l'anoïkose qui est perdue dans les cellules cancéreuses. L'expression d' $\alpha 8$ est perdue dans les lignées issues de cancers colorectaux et son expression exogène restaure cette capacité à mourir (Benoit et al., 2010a). Les processus d'adhérence et de signalisation étant altérés dans de nombreuses pathologies, des KO de certaines intégrines ont été faits chez la souris pour comprendre les mécanismes de ces phénomènes. Par exemple, la délétion de la sous-unité $\beta 1$ intégrine est létale durant les stades précoces de l'embryogenèse (Fassler and Meyer, 1995). Les KO conditionnels des cellules épithéliales intestinales conduisent à des défauts de différenciation entérocytaire et à une augmentation de la prolifération responsable d'hyperplasies (Jones et al., 2006). Ces conséquences ne sont pas dues à des altérations de l'adhérence mais plutôt à la diminution d'expression des Hh impliqués dans la communication entre l'épithélium et la lamina propia.

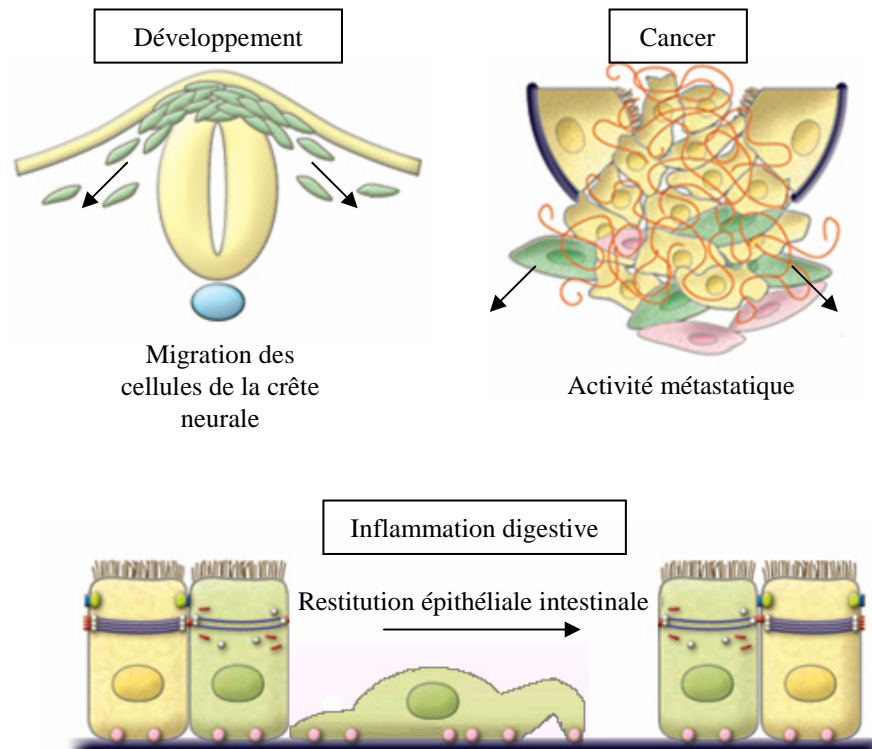


Figure 24: La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

La TEM intervient dans divers processus physiologiques et pathologiques comme le développement, le cancer et l'inflammation digestive (d'après Acloque, H., 2009).

La transition épithélio-mésenchymateuse

Régulation des systèmes d'adhérence

Implications physiologiques et pathologiques

La TEM est un processus permettant le passage d'une morphologie cellulaire de type épithélial à fibroblastique. Cette transition est orchestrée par l'expression de facteurs de transcription tels que Slug et Snail et régule les protéines d'adhérence intercellulaire, les intégrines et les constituants des filaments intermédiaires du cytosquelette. Ils répriment l'expression de gènes épithéliaux (E-cadhérine, Cytokératine,...) et activent des gènes fibroblastiques (N-cadhérine, vimentine), conduisant à la dépolarisation de la cellule et à sa dédifférenciation (Masuda et al., 2010; Turner et al., 2006). La TEM trouve un intérêt particulier lors du développement embryonnaire comme, par exemple, lors de l'échappement des cellules de la crête neurale (tissu épithélial) pour aller migrer et former des structures maxilo-faciales, les mélanocytes ou encore les cellules du SNE. Ce processus intervient également lors de situations pathologiques impliquant la restitution épithéliale après une blessure de l'épithélium ou l'activité métastatique (Figure 24) (Acloque et al., 2009). La muqueuse intestinale subit de nombreuses agressions physiques, notamment durant les phases inflammatoires qui peuvent conduire à l'apparition d'ulcères. La restitution est un processus permettant aux cellules épithéliales situées au bord de la blessure de perdre leurs contacts intercellulaires, d'être capables de migrer et de s'étaler pour recoloniser la surface lésée (Wilson and Gibson, 1997). Une fois l'épithélium entièrement recouvert, la confluence des cellules permet de reformer des contacts matures. L'ensemble de ces événements est contrôlé et/ou influencé par les nombreux facteurs diffusibles libérés aux alentours de la lésion tels que le $TNF\alpha$, l' $INF\gamma$, l' $IL1\beta$, l'EGF, les défencines, etc. (Iizuka and Konno, 2011). La prolifération intervient dans la restitution après les différentes phases de migration et d'étalement des entérocytes qui se sont dédifférenciés. Les cellules souches et progénitrices de la crypte ont également une prolifération augmentée par les facteurs trophiques libérés. Lors de la progression tumorale, l'induction d'une activité métastatique mobilise également les mécanismes de la TEM. En perdant leurs contacts avec le reste des cellules tumorales et en développant un phénotype mésenchymateux, les cellules métastatiques quittent la tumeur primaire et migrent à travers les tissus (Bates and Mercurio, 2005). Leurs nouvelles propriétés adhésives leur permettent de traverser la paroi des vaisseaux et de se disséminer dans

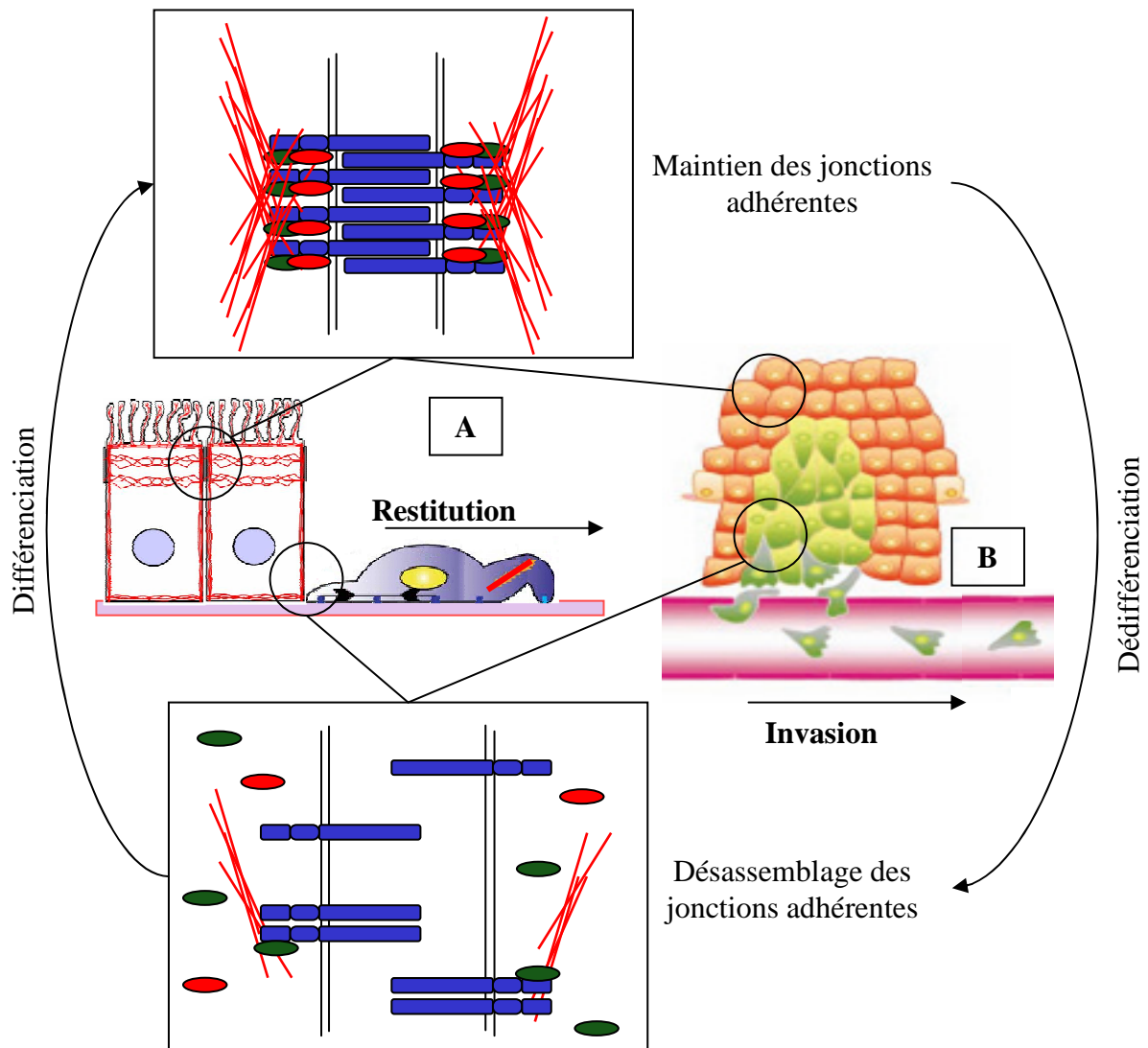


Figure 25: Désassemblage des jonctions adhérentes.

La TEM fait intervenir un désassemblage des jonctions adhérentes associé à des phénomènes de migration et d'invasion. (A) dans la restitution épithéliale et (B) dans la progression tumorale. Le processus inverse d'assemblage des jonctions adhérentes a lieu lors de la différenciation entérocytaire (d'après Donovan, 2000; Brakenbury, W.J., 2008).

l'organisme en utilisant les réseaux veineux ou lymphatiques. La nature des récepteurs d'adhérence exprimés par la cellule métastatique et particulièrement des intégrines participe à son implantation au sein d'un autre organe où elle formera un nouveau foyer tumoral.

Régulation de la E-cadhérine à la membrane

Les propriétés adhésives des jonctions adhérentes sont souvent modifiées durant l'inflammation ou la progression tumorale (van Roy and Berx, 2008) (Figure 25). La diminution de l'expression des protéines de jonction ou leur changement de localisation constitue une étape clé de la TEM. Les voies de signalisation impliquées dans le développement métastatique convergent vers la perte de fonction de la E-cadhérine, par une diminution de son expression ou la perte de sa localisation à la membrane plasmique (Figure 26). Cette perte d'expression est observée dans la majorité des cancers épithéliaux où elle corrèle avec la dédifférenciation et l'invasion tumorale. La E-cadhérine est codée par le gène *Cdh1* considéré comme suppresseur de tumeur (Thiery, 2002). Ce gène et ceux des caténines qui composent et structurent la jonction adhérente sont rarement mutés dans les cancers digestifs, hormis certains carcinomes gastriques (Dunbier and Guilford, 2001; Schrader et al., 2008). Leur activité est altérée par des régulations d'ordre épigénétique telles que des méthylations du promoteur, principalement au niveau du cancer de la prostate (Strathdee, 2002), ou des déacétylations d'histones dans certains cancers colorectaux (Koizume et al., 2002). L'activité de *Cdh1* est régulée par l'expression de facteurs de transcription tels que *Cdx2* ou *HNF-1 α* qui peuvent être absents dans les tumeurs. Cependant, des diminutions d'expression de la E-cadhérine dans les lignées cellulaires coliques sont observées malgré le maintien de régulateurs positifs impliqués dans la différenciation entérocytaire (Benoit et al., 2010b). D'autres tumeurs expriment également *Cdx2* ou *HNF-1 α* , sans maintenir pour autant des niveaux d'expression de la E-cadhérine équivalents à ceux de l'épithélium sain. Ainsi, les mécanismes de régulation génique de la E-cadhérine survenant dans les tumeurs font plutôt intervenir des répresseurs de la transcription. *Snail*, *Slug* ou *SIP1* sont capables de se fixer au promoteur de *cdh1* et d'inhiber sa transcription malgré la présence de facteurs activateurs (Batlle et al., 2000). Les mécanismes d'auto-régulation de l'expression de la E-cadhérine par les contacts intercellulaires répriment l'expression de ces facteurs de transcription et permettent de maintenir un niveau de E-cadhérine constant dans la cellule (Conacci-Sorrell et al., 2003). Ces voies de signalisation étant altérées dans de nombreux cancers, *Snail*, *Slug* et

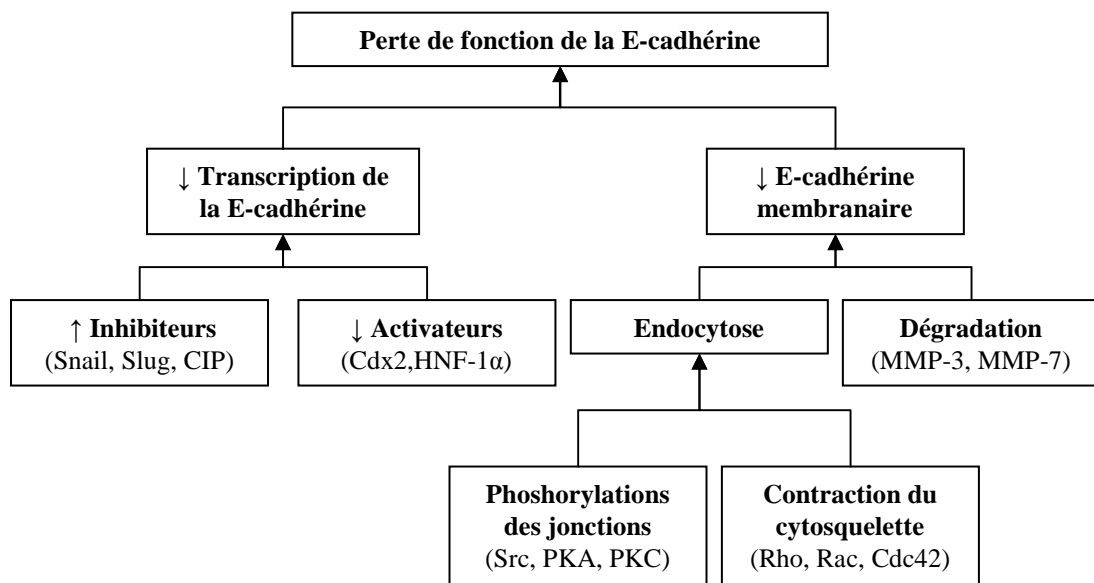


Figure 26: Régulation de la E-cadhérine.

Arbre des causes expliquant la perte des jonctions inter-cellulaires dépendante de la fonction de la E-cadhérine.

SIP1 sont néo-synthétisés et leur expression est augmentée, particulièrement lors de la TEM (Moreno-Bueno et al., 2008).

La présence à la membrane plasmique de la E-cadhérine peut être régulée par des mécanismes d'endocytose. La stabilité des jonctions adhérentes est dépendante de l'état de phosphorylation de ses composants qui modifie la force des interactions qu'ils établissent les uns avec les autres. Dans les cellules cancéreuses de nombreuses kinases sont activées de manière aberrante (Brognard and Hunter, 2011). Elles sont également activées de manière transitoire au niveau des entérocytes durant les poussées inflammatoires ou après des événements de vie stressants (Gaestel et al., 2009; Kyriakis and Avruch, 1996). Les kinases de la famille de Src sont sollicitées par l'activation de nombreux récepteurs membranaires et sont souvent impliquées dans les processus de phosphorylation des constituants de la jonction adhérente responsables de la dissociation des cellules épithéliales (Gumbiner, 2000; Huber and Weis, 2001; Piedra et al., 2003). L'activation des Rho GTPases intervient également dans ces régulations en modifiant la contraction et l'organisation du cytosquelette d'actine (Braga, 2002). Rho-A contrôle lui-même une voie de signalisation dont la cascade de phosphorylation active successivement la ROCK et la MLCK. Les MLCK permettent l'activation locale des MLC par phosphorylation. En modifiant les interactions actine-myosine, ces modifications post-traductionnelles servent de moteurs moléculaires impliqués dans l'endocytose des protéines des jonctions par les voies cavéolea ou macropinocytaires. L'activation de la MLCK est impliquée dans les régulations de la barrière épithéliale intestinale par le stress et l'inflammation (Ferrier et al., 2003; Wang et al., 2005). Les contractions du complexe d'actine-myosine jouent également un rôle dans la migration cellulaire.

Le clivage de la E-cadhérine intervient également dans la perte des contacts intercellulaires. Certaines protéases comme les métalloprotéases matricielles (MMP) ou la A disintegrin and metalloproteinase (ADAM10) sont capables de cliver la E-cadhérine. Il en résulte la libération de la partie extra-cellulaire qui rentre en compétition avec les molécules encore intactes, et une diminution de la fraction membranaire de E-cadhérine impliqué dans les jonctions adhérentes. Ainsi, dans les cancers de la glande mammaire, les MMP3 et MMP7 libérées suite au traitement avec du PMA (Phorbol myristate acétate) ou du KGF (Keratinocyte growth factor) sont responsables d'un clivage de la E-cadhérine dont le fragment extracellulaire soluble de 80kDa est promoteur de l'invasion et de la migration *in vitro* (Lochter et al., 1997; Noe et al., 2001). ADAM10 est une protéase membranaire régulée

dans l'inflammation et la progression tumorale dont l'implication dans le clivage de la E-cadhérine fait une cible thérapeutique d'intérêt (Crawford et al., 2009). La E-cadhérine peut également subir des clivages sur sa partie intra-cellulaire par la Caspase-3 (Steinhusen et al., 2001) ou par la γ -sécrétase (Georgakopoulos et al., 1999) précédemment citée pour son implication dans la voie Notch. Ces mécanismes de modification post-traductionnels de la E-cadhérine sont impliqués dans le désassemblage des jonctions adhérentes lors du processus apoptotiques (Marambaud et al., 2002). La détection des formes clivées dans le sang de patients atteints de cancers de la prostate constitue également un facteur pronostique et diagnostique (Dhanasekaran et al., 2001; Kuefer et al., 2003).

Fonction des caténines pendant la TEM

La TEM conduisant à la perte des contacts intercellulaires, les molécules cytoplasmiques initialement impliquées dans les jonctions ne sont plus séquestrées à la membrane plasmique. Certains processus de régulation peuvent conduire à leur dégradation ou les laisser libres dans le cytoplasme. Les caténines sont des protéines multi-modales capables d'interagir avec différents partenaires suivant leur localisation. Au niveau du cytoplasme la β ctn est poly-ubiquitinylée puis dégradée par le complexe APC (Anaphase promoting complex)/Axin/GSK3 β (Glycogen synthase kinase) en absence d'activité Wnt. Elle peut également transloquer au niveau du noyau où elle régule les gènes de la CyclinD1 ou la MMP7.

La protéine p120ctn comporte de nombreux sites de phosphorylation qui permettent de réguler sa localisation et son association avec divers partenaires. L'accumulation de p120ctn au niveau du cytoplasme peut participer à la progression tumorale et cette localisation corrèle avec le stade du cancer (Bellovin et al., 2005). Libérée de la E-cadhérine, la p120ctn modifie l'activité des Rho GTPases en inhibant Rho-A par son association avec p190 Rho GEF et en activant Rac et Cdc-42 via Vav2 (Anastasiadis et al., 2000; Noren et al., 2000). Ces mécanismes sont impliqués dans la régulation de la TEM. Elle lie également les microtubules et les kinésines, et pourrait ainsi jouer un rôle dans l'adressage membranaire des cadhérines (Yanagisawa et al., 2004). Ce processus impliquerait plutôt le recyclage que la néosynthèse étant donné que les complexes p120ctn/E-cadhérine se forment principalement à la membrane plasmique. La surexpression de p120ctn dans les cellules HT-29 issues d'adénocarcinome colique a permis de mettre en évidence une interaction entre p120ctn et le complexe

CyclinE/Cdk2 (Chartier et al., 2007) (article en annexe). Lors du cycle cellulaire, l'enrichissement des centrosomes en cyclineE conduit à une augmentation de leur amplification et à l'inhibition de la réplication de l'ADN. Ces évènements conduisent à l'apparition de mitoses aberrantes et à une augmentation de la polyploïdie. Ces évènements participent à l'instabilité chromosomique et sont des processus retrouvés dans l'initiation et la progression tumorale des cancers colorectaux (Rajagopalan et al., 2003). Les mécanismes impliqués dans ces mouvements de p120ctn sont encore mal connus. Cependant la phosphorylation de certains résidus pourrait participer au démasquage de séquences reconnues par les complexes d'import nucléaire (Daniel, 2007). p120ctn interagit avec le facteur de transcription Kaiso au niveau du cytoplasme ou du noyau et régule son activité (Daniel and Reynolds, 1999).

Kaiso appartient à la sous-famille des facteurs de transcription POZ-ZF (Pox virus and zinc-finger - Zinc-Finger) impliqués dans l'embryogenèse et le cancer (Daniel and Reynolds, 1999). Par l'intermédiaire de leur domaine POZ, ces facteurs de transcription peuvent s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec le co-répresseur NCoR (Yoon et al., 2003). Kaiso possède un site NLS (Nuclear Localizaion Site) permettant sa translocation au niveau du noyau où il exerce son activité de régulateur de la transcription via ses domaines ZF (Kelly et al., 2004). Il présente plusieurs sites de phosphorylation régulant ses interactions avec divers partenaires et sa localisation sub-cellulaire (Daniel, 2007) et réprime la transcription en reconnaissant des séquences consensus de l'ADN (TCCTGTnA) ou des séquences CpG méthylées (Daniel et al., 2002). Des expériences en double hybride ont mis en évidence que l'isoforme 3 de p120ctn exprimée dans les cellules épithéliales interagit avec le domaine ZF de Kaiso et lève la répression de la transcription induite par Kaiso (Daniel and Reynolds, 1999). L'affinité de ces interactions et la localisation de Kaiso sont également régulées par des mécanismes dépendants de la phosphorylation de la p120ctn (Zhang et al., 2011). Une autre séquence de Kaiso est également capable de jouer un rôle d'activateur de la transcription, notamment au niveau du gène de la Rapsyn impliqué dans la mise en place de la jonction neuro-musculaire (Rodova et al., 2004). L'implication de p120ctn dans la régulation de la fonction trans-activatrice de Kaiso et ses cibles sont cependant mal connues.

Dans divers cancers parmi lesquels on retrouve les cancers colorectaux, l'expression nucléaire de Kaiso est parfois observée dans les cellules situées à la périphérie de la tumeur, au niveau des processus invasifs et dans les métastases (Soubry et al., 2005). Dans le modèle

génétique de cancers colorectaux liés aux maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (MICI) développés chez les souris $Muc2^{-/-}$, l'expression de Kaiso est augmentée dans les tumeurs et sa localisation est principalement nucléaire (Prokhortchouk et al., 2006). A l'inverse, Kaiso est réprimé ou exprimé au niveau cytoplasmique dans les tumeurs primaires humaines ou dans les cellules non cancéreuses de l'épithélium du côlon (Soubry et al., 2005). Afin de déterminer l'implication de Kaiso dans la tumorigenèse colorectale, des souris $Kaiso^{-/-}$ et APC^{min} ont été croisées. La déficience en Kaiso ne change pas le nombre de tumeurs développées par ces animaux mais diminue leur volume et augmente la survie (Prokhortchouk et al., 2006). Au niveau de xénogreffes de cellules HT-29 ou SW48 implantées chez les souris Nude, Kaiso est exprimé dans le noyau des cellules du pourtour des tumeurs à proximité des vaisseaux sanguins durant la première phase de croissance des tumeurs (0-11 jours). Ensuite, l'expression globale diminue progressivement et se relocalise au niveau du cytoplasme (14-20 jours), puis il y a une perte d'expression de Kaiso en phase tardive (31 jours). A 6 jours, l'expression de Kaiso dans ces cellules est inversement corrélée à celle de la Carbonic anhydrase IX, un marqueur de l'hypoxie. En culture cellulaire, ces cellules présentent également un marquage nucléaire de Kaiso à faible densité, qui est perdu avec la confluence des cellules. En absence d'adhérence cellule-MEC (culture de sphéroïdes), la E-cadhérine et la p120ctn sont situés dans les jonctions intercellulaires à la membrane plasmique tandis que l'expression de Kaiso est plus faible et cytoplasmique (Soubry et al., 2005). Ces données suggèrent que l'hypoxie et les contacts intercellulaires pourraient réguler l'expression et la localisation de Kaiso au cœur de la tumeur et moins au niveau des processus invasifs. Les interactions entre les cellules tumorales et le stroma qui les entoure pourraient également participer à la régulation de la localisation de Kaiso et à sa fonction. L'analyse des cellules tumorales issues des animaux $Kaiso^{-/-} / APC^{min}$ a par ailleurs montré qu'il n'y a pas de différence dans les indices mitotiques et apoptotiques (Prokhortchouk et al., 2006). Ces données confortent la notion d'implication du micro-environnement tumoral dans la régulation de Kaiso. La localisation nucléaire de Kaiso pourrait être consécutive soit à une dédifférenciation des cellules associée à une perte des jonctions intercellulaires et/ou induite par l'activité d'oncogènes, soit à la perte de gènes suppresseurs de tumeur qui réguleraient ainsi son activité transcriptionnelle (Soubry et al., 2005). La majorité des gènes réprimés par Kaiso sont impliqués dans des processus cancéreux, comme la CyclineD1, la MMP7, Wnt11, siamois ou la MTA (Park et al., 2005). Cependant, il a été montré que Kaiso est exprimé dans de nombreuses lignées cellulaires issues CCR où il se lie aux promoteurs hyper-méthylés de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire ($p16^{INK}$) et la réparation de l'ADN (HIC1 et

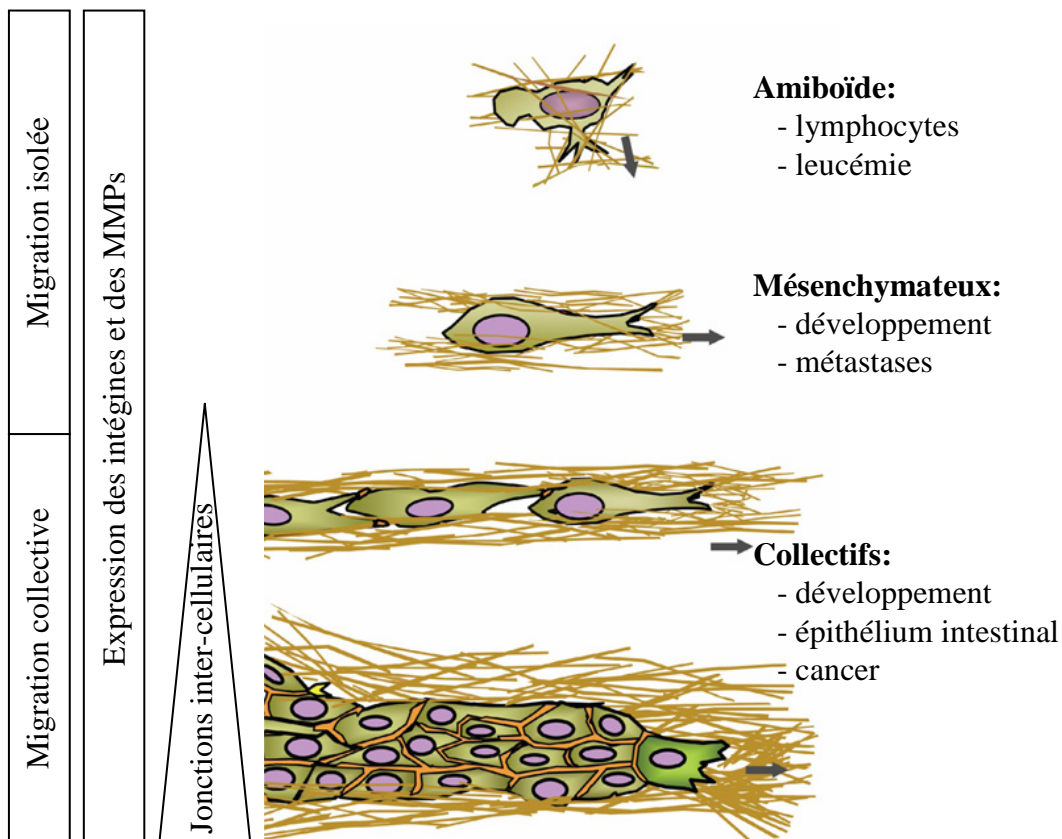


Figure 27: Migration cellulaire.

Suivant le niveau d'expression des récepteurs d'adhérence inter-cellulaire, les cellules adoptent une migration isolée ou collective (D'après Friedl, P., 2009)

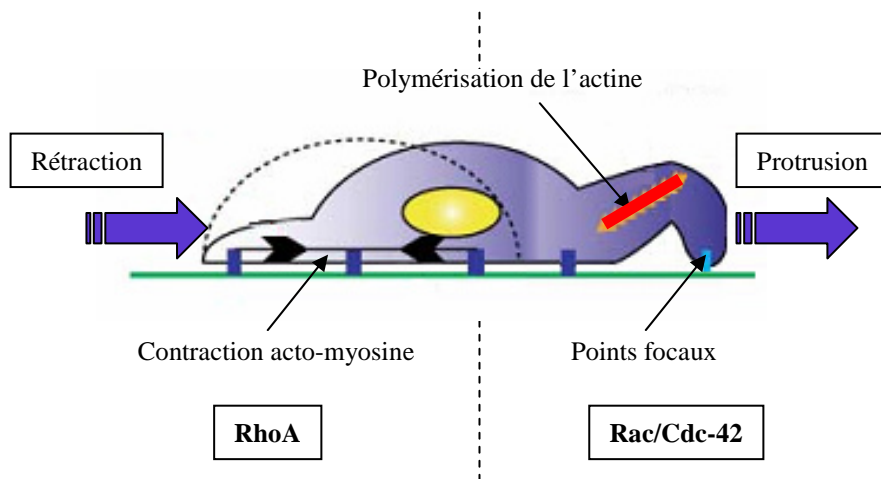


Figure 28: Rho GTPase et migration.

Lors de la migration Rac et Cdc-42 sont mobilisés sur le front avant de la cellule. Ils sont responsables de la formation de protrusions membranaires induites par la polymérisation de l'actine et la genèse de nouveaux points focaux. A l'arrière, RhoA est activé et entraîne la rétraction cellulaire par contraction des complexes d'acto-myosine (d'après Yamazaki, D., 2005).

MGMT) (Lopes et al., 2008). L'invalidation de Kaiso dans ces lignées conduit à leur réexpression, à une diminution du cycle cellulaire et à une augmentation de l'apoptose induite par des agents de chimiothérapie. Ces résultats indiquent que, malgré la méthylation des promoteurs de ces gènes, la présence de Kaiso est nécessaire au maintien de leur répression. Le rôle et la régulation de Kaiso dans les cancers colorectaux (CCR) sont encore flous. Sa localisation nucléaire sans la p120ctn pourrait être impliquée dans le phénotype malin en réprimant les répresseurs du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN. En présence ou non de la p120ctn, Kaiso pourrait également réguler positivement l'expression de gènes impliqués dans l'adhérence, la migration et l'invasion cellulaire de la même manière qu'elle régule la Rapsyn.

Migration et invasion cellulaire

Le déplacement cellulaire

La migration cellulaire est impliquée dans de nombreux processus biologiques au niveau de l'embryogenèse, de la réponse immunitaire, de la réparation tissulaire et du cancer. Elle représente la capacité d'une cellule isolée ou d'un groupe de cellule à se déplacer au sein d'un tissu et fait intervenir différentes stratégies dont les mécanismes de régulation sont complexes (Figure 27) (Friedl and Wolf, 2010). Au niveau intestinal, ces processus de migration sont impliqués dans le renouvellement de l'épithélium en permettant aux cellules de se déplacer en cohorte de la base des cryptes à l'extrémité des villosités (dans l'intestin grêle) ou à la surface de l'épithélium (dans le côlon). Ces mécanismes font intervenir des gradients de protéines de la MEC et d'expression des récepteurs d'adhérence parmi lesquels les intégrines $\alpha\beta4$ semblent jouer un rôle important (Dydenborg et al., 2009a). Dans le cadre de blessures, d'inflammation ou de cancers, la TEM permet également la migration individuelle des cellules.

Lors de la migration, les cellules utilisent leur cytosquelette d'actine comme support sur lequel elles tirent et s'appuient pour avancer dans une direction donnée (Yamazaki et al., 2005). La migration nécessite une organisation polarisée de la cellule, dans laquelle une partie avance en créant de nouveaux contacts cellule-MEC et l'autre suit en retirant ses contacts. On observe alors un désassemblage des adhérences focales par endocytose des intégrines situées à l'arrière pour les recycler dans la membrane située au niveau du front de migration en formant de nouvelles adhérences focales (Ulrich and Heisenberg, 2009). La répartition

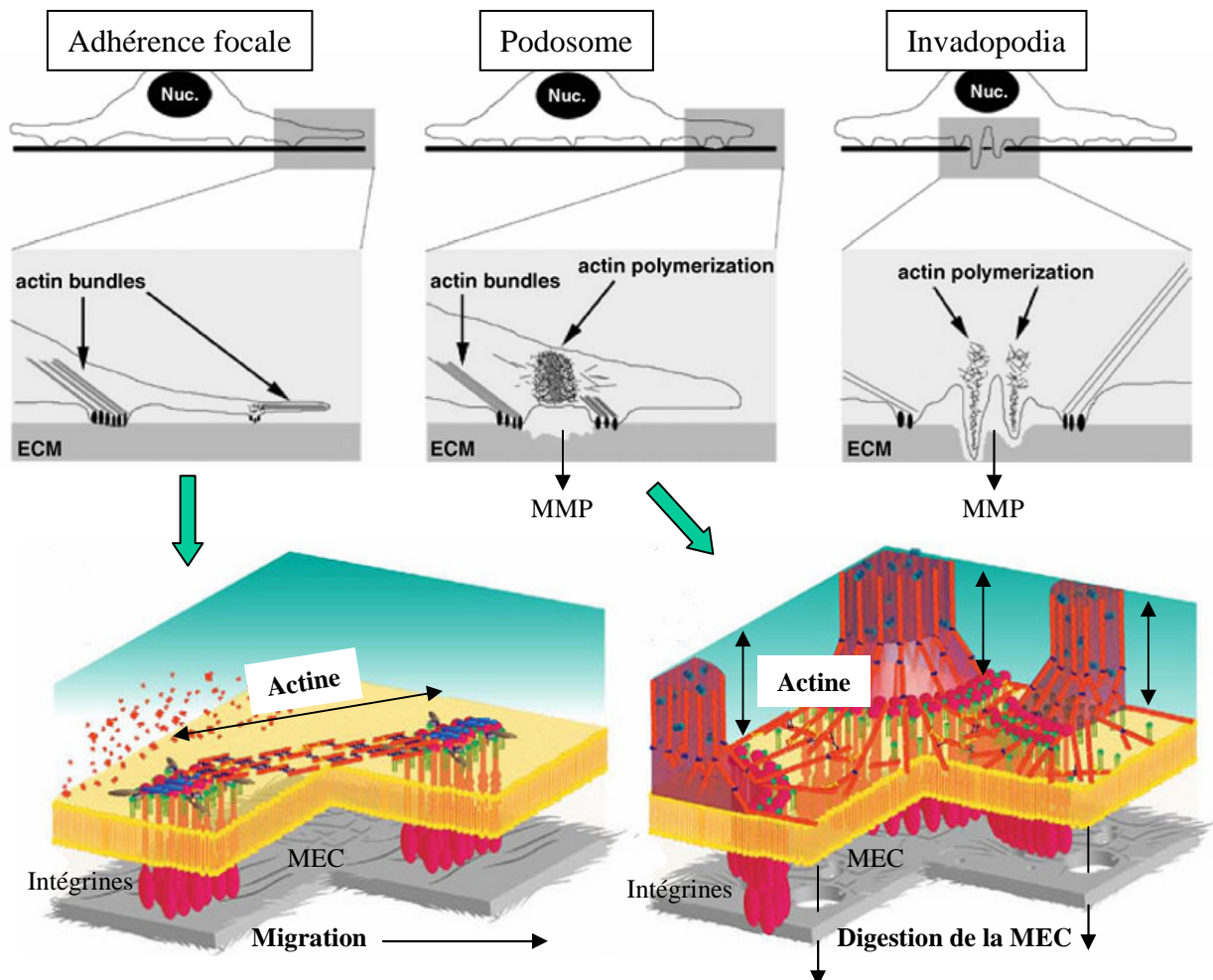


Figure 29: Systèmes d'adhérence cellule-matrice

Les contacts cellules-matrices impliquant les intégrines peuvent s'organiser selon différentes architectures: adhérences focales, podosomes ou invadopodia. Les adhérences focales présentent une organisation du cytosquelette d'actine parallèle au support d'adhérence et permettent l'étalement et la migration des cellules sur la MEC. Les podosomes et invadopodia organisent les micro-filaments d'actine de manière perpendiculaire au support d'adhérence. La production de MMP à la base des cellules leur permet ainsi de digérer la MEC. Cette dégradation est associée à des phénomènes de migration à travers la MEC dans le cas des invadopodia (d'après Gimona, M., 2006 ; Albiges-Rizo, 2009).

différentielle des Rho GTPases activées avec Rac et Cdc-42 devant et Rho-A à l'arrière permet de faire avancer la cellule (Figure 28). Les autres composants du cytosquelette participent également aux processus de migration. En effet, l'organisation des MT favorise le trafic des protéines dans la cellule en mouvement et le positionnement des organelles, qui joue un rôle dans la répartition des charges dont le déséquilibre tire la cellule en avant. La flexibilité de l'organisation des FI est également impliquée dans la migration. Ainsi, lors de la TEM la nature des constituants des FI est régulée de manière transcriptionnelle via Slug, également régulateur des protéines de jonction intercellulaires (Ivaska, 2011). Les cellules subissent ainsi une perte d'expression des kératines au profit de la vimentine (Mendez et al., 2010).

Dans un contexte tissulaire où les cellules migrent dans un même plan, tel que retrouvé lors de la restitution des cellules épithéliales intestinales sur la lame basale, le modèle de migration présenté ci-dessus semble évident. En revanche, lors de la progression tumorale colorectale, les cellules évoluent à travers la MEC de la paroi intestinale qui est organisée en trois dimensions. Pour répondre à cette configuration, l'invasion cellulaire est un processus qui fait intervenir la digestion de la MEC, associée à des processus de migration. Les mécanismes d'adhérence impliqués dans l'invasion forment des structures particulières appelées podosomes et invadopodias, entre lesquels les distinctions font encore débat (Murphy and Courtneidge, 2011). Leur constitution ressemble fortement aux adhérences focales mais ils diffèrent dans la dynamique de leur organisation, leur architecture et certains de leurs constituants comme la cortactine (Albiges-Rizo et al., 2009). Dans les adhérences focales, l'actine est polymérisée de façon parallèle au support d'adhérence. Dans le cas des podosomes et des invadopodias, l'actine est organisée de manière parallèle à la MEC (Figure 29). Ils peuvent s'organiser sous forme d'anneaux organisés autour d'un centre de nucléation de l'actine et l'augmentation de leur diamètre peut former des rosettes. Ces structures étant fortement dynamiques, leur apparition et leur agrandissement peuvent être stabilisés par l'utilisation d'inhibiteurs de phosphatases (Badowski et al., 2008). Ils jouent un rôle prépondérant dans la digestion de la MEC en concentrant la sécrétion de MMP au centre des anneaux de podosomes (Gimona and Buccione, 2006). Ce remodelage rapide et ciblé de la MEC permet notamment aux cellules métastatiques de s'échapper.

Nom de fonction	MMP	Substrats principaux	Poids moléculaire
Les collagénases			
Collagénase intersticielle	MMP 1	Col. I, II, III, VII, VIII, Xaggrégane, gélatine, serpines	52kDa
Collagénase 3	MMP 13	Col. I, II, III, IX, X, XIV, aggrégann, laminine, gélatine, fibrilline, ostéonectine	48kDa
Les gélatinases			
Gélatinase A	MMP 2	Gélatine type I et col. Type I, IV, V, VII, X, fibronectine, élastine	72kDa
Gélatinase B	MMP 9	Gélatine I et V, Col. IV et V, élastine	92kDa
Les stromélysises			
Stromélysine 1	MMP 3	Col. IV, V, IX, X, fibronectine, élastine, gélatine, laminine, aggrécan, E-cadhérine, fibrilline, ostéopontine	52kDa
Stromélysine 2	MMP 10	Col. IV, V, IX, X, fibronectine, élastine, gélatine, laminine, aggrécan, E-cadhérine, protéoglycane	47kDa
Stromélysine 3	MMP 11	Inhibiteurs des serines protéases	60kDa
Les matrilysines			
Matrilysine 1	MMP 7	Elastine, fibronectine, laminine, Col. IV, E-cadhérine, TNF- α	23kDa
Matrilysine 2	MMP 26	Gélatine	30kDa

Figure 30: Les principales métalloprotéases matricielles (MMP).

Les métalloprotéases matricielles

Le remodelage de la lame basale est assuré par des MMP dont, à ce jour, vingt-cinq isoformes ont été identifiées. Ce sont des endopeptidases membranaires ou sécrétées qui digèrent les différents composants de la MEC selon certaines spécificités (Figure 30) (Amalinei et al., 2007). Produite sous une forme inactive zymogène, leur maturation est généralement achevée dans le milieu extra-cellulaire par un clivage protéolytique via d'autres MMP ou des sérine/thréonine protéases. Comme leur nom l'indique, les MMP ont une activité dépendantes de métaux, avec la fixation d'ions Zinc au niveau de leurs site catalytique (Tallant et al., 2010). L'expression des MMP est souvent augmentée dans l'inflammation (Manicone and McGuire, 2008) et les cancers où elles jouent un rôle dans la croissance tumorale, l'angiogénèse et la migration (Zucker and Vacirca, 2004). Le clivage des constituants de la MEC permet de renouveler et/ou modifier sa composition, influençant ainsi les propriétés d'adhérence cellulaires. Il permet également la libération de fragments de dégradation qui favorisent la progression tumorale par l'activation de certains récepteurs. Le clivage du collagène IV et de la Ln-332 révèle des sites d'interaction avec les récepteurs d'adhérence qui favorisent respectivement la néo-angiogénèse via les intégrines $\alpha1\beta1$ et la migration tumorale via les intégrines $\alpha V\beta3$ (Giannelli et al., 1997; Xu et al., 2001). Certains facteurs de croissance sont encapsulés par des protéines qui masquent les sites d'interactions avec leurs récepteurs. Ces protéines sont également la cible de certaines MMP et permettent l'activation des récepteurs aux facteurs de croissance.

Au niveau de la muqueuse intestinale, les cellules épithéliales et mésenchymateuses expriment différentes MMP à l'état basal (Sengupta and MacDonald, 2007). Leur régulation participe au développement de l'inflammation et aux processus cancéreux. Chez les patients atteints de MICI et dans les modèles animaux de colites, l'expression de certaines MMP est augmentée (Makitalo et al., 2010; Meijer et al., 2007; te Velde et al., 2006; von Lampe et al., 2000). Les différents profils d'expression varient suivant le type de pathologie et les phases de l'inflammation, permettant de définir des outils de diagnostic et thérapeutique (Newell et al., 2002). La MMP7 est par exemple plus élevée dans les cas de MC que de rectocolite hémorragique (RCH) et permet de distinguer les deux maladies (Makitalo et al., 2010). Les MMP jouent parfois un rôle ambivalent dans l'inflammation étant donné qu'elles participent activement à la fois au processus inflammatoires qui sont à l'origine de l'altération des tissus, et au processus régénératifs qui les suivent. Des expériences menées *in vitro* ont mis en évidence que l'augmentation d'expression de la MMP7 dans des conditions inflammatoires,

favorise la restitution des cellules épithéliales intestinales (Hayden et al., 2011). Par ailleurs, l'expression des collagénases (MMP2 et MMP9) est augmentée dans les MICI et les modèles animaux correspondants. Bien que ces deux protéases clivent les mêmes substrats, elle semble jouer un rôle protecteur pour la MMP2 et aggravant pour la MMP9. Leur inactivation génétique dans des animaux double KO réduit le score inflammatoire dans les modèles de MC et de RCH (Garg et al., 2009).

Dans les cancers colorectaux, l'expression des MMP1, MMP2, MMP3, MMP7 et MMP9 est augmentée comparée à la muqueuse saine (Wagenaar-Miller et al., 2004; Zucker and Vacirca, 2004). Ces régulation sont souvent corrélées aux stades tumoraux invasifs et métastatique et donc au faible pronostic vital pour les patients (Masaki et al., 2001; Miyoshi et al., 2005; Surlin et al., 2011). Les cancers colorectaux développés suite à l'inflammation chronique constituent une famille particulière. En contradiction avec d'autres données, une étude a montré dans le modèle animal AOM/DSS (Azoxymethan/Dextran sulfate sodium) que l'inactivation du gène de la MMP9 conduit à l'augmentation du nombre de tumeurs intestinales et de la morbidité associée. Ces mécanismes passeraient par l'implication de la MMP9 dans la régulation des voies de signalisation Notch, Wnt et du cycle cellulaire (Garg et al., 2010). Dans cette situation l'absence d'expression de MMP9 altère de manière basale ces voies de signalisation. Notch étant dépendant d'un clivage protéolytique, son activation serait donc diminuée. Par ailleurs, les voies Notch et Wnt interagissent l'une avec l'autre, ce qui explique l'augmentation de la prolifération.

L'activité des MMP peut être régulée de différentes façons : par clivage de la partie pré-peptide, par régulation transcriptionnelle et traductionnelle, ou par la régulation de leurs inhibiteurs. L'expression génique des MMP est régulée par des mécanismes encore mal connus. L'activation des voies MAPK et PKC (Protein kinase C) par les récepteurs aux cytokines et aux facteurs de croissance, associées aux facteurs AP-1 et EST semblent constituer des mécanismes commun de régulation (Chakraborti et al., 2003). Les collagénases MMP2 et MMP9 peuvent toutes deux être régulées par les voies MAPK, cependant le temps d'activation de ERK est crucial pour leur induction. Dans les kératinocytes, l'activation soutenue de ERK par l'EGF ou l'Hepatocyte growth factor (HGF) est responsable de l'induction de MMP9. En revanche, l'insuline-like growth factor (IGF) et le KGF n'induisent qu'une activation transitoire de ERK, qui ne parvient pas à réguler la MMP9 (McCawley et al., 1999). STAT3 (Signal transducer and activator of transcription) est souvent activé de

manière aberrante dans les cancers colorectaux où elle est fortement impliquée dans la progression tumorale, associée à un faible pronostic vital (Morikawa et al., 2011). Elle peut être activée par la phosphorylation de résidus tyrosine via les kinases JAK (Janus kinase) associées au RTK ou de résidus sérine/thréonine par ERK, en aval de la signalisation MAPK. Dans les tumeurs, l'expression des MMP1, MMP3, MMP7 et MMP9 coïncide fortement avec l'activité de STAT3 (Tsareva et al., 2007). D'autres voies de signalisation peuvent également réguler l'expression des MMP et pourraient agir de manière plus sélective. Lors de la dissociation des cellules épithéliales, la libération de p120ctn au niveau du cytoplasme régule l'activité des Rho GTPases, notamment par l'activation de Rac. Or, Rho-A et Rac augmentent l'expression des MMP1, MMP2 et MMP9 et inhibent celle des inhibiteurs de MMP dans plusieurs modèles cellulaires tumoraux. A l'inverse, l'inactivation des Rho GTPases diminue l'expression de ces mêmes molécules (Lozano et al., 2003). Au niveau nucléaire, la MMP7 est régulée négativement par le facteur de transcription Kaiso. La p120ctn est capable d'interagir avec Kaiso et lève la répression qu'il exerçait sur le promoteur de la MMP7. Les voies Kaiso/p120ctn et Wnt/ β ctn agissent souvent de manière complémentaire (Daniel and Reynolds, 1999; Park et al., 2005; van Hengel et al., 1999). Ainsi, la translocation nucléaire de la β ctn lui permet d'interagir avec le facteur de transcription TCF-4/LEF et d'activer le gène de la MMP7. Les voies MAPK, les Rho GTPases et la localisation des caténines sont soumises à l'influence des contacts intercellulaires. La perte des jonctions adhérentes impliquée dans la TEM pourrait constituer un facteur suffisant pour l'induction des MMP.

TEM et prolifération cellulaire

La prolifération, en assurant aux cryptes un réservoir de cellules non-différenciées, participe au renouvellement de l'épithélium intestinal. Elle est également réactivée dans les dernières phases de la restitution pour régénérer l'épithélium après son altération et dérégulée dans les processus cancéreux. Ce cycle cellulaire de durée variable selon les tissus, s'articule autour de quatre phases successives: G1, S, G2, M. Pendant la phase G1, la cellule, sous l'influence de signaux environnementaux, s'oriente vers la division ou vers un stade quiescent, la phase G0. Le passage d'une phase à une autre est sous le contrôle de sérine/thréonine kinases, les Cyclin dependent kinase (Cdk) associées à des sous-unités régulatrices, les cyclines (Gautier et al., 1989; Gautier et al., 1988) (Figure 31). Elles s'organisent en couples Cycline/Cdk dont les isoformes diffèrent suivant les cinq phases du cycle. Durant la phase G1, les cellules expriment les complexes CyclineD/Cdk4 et

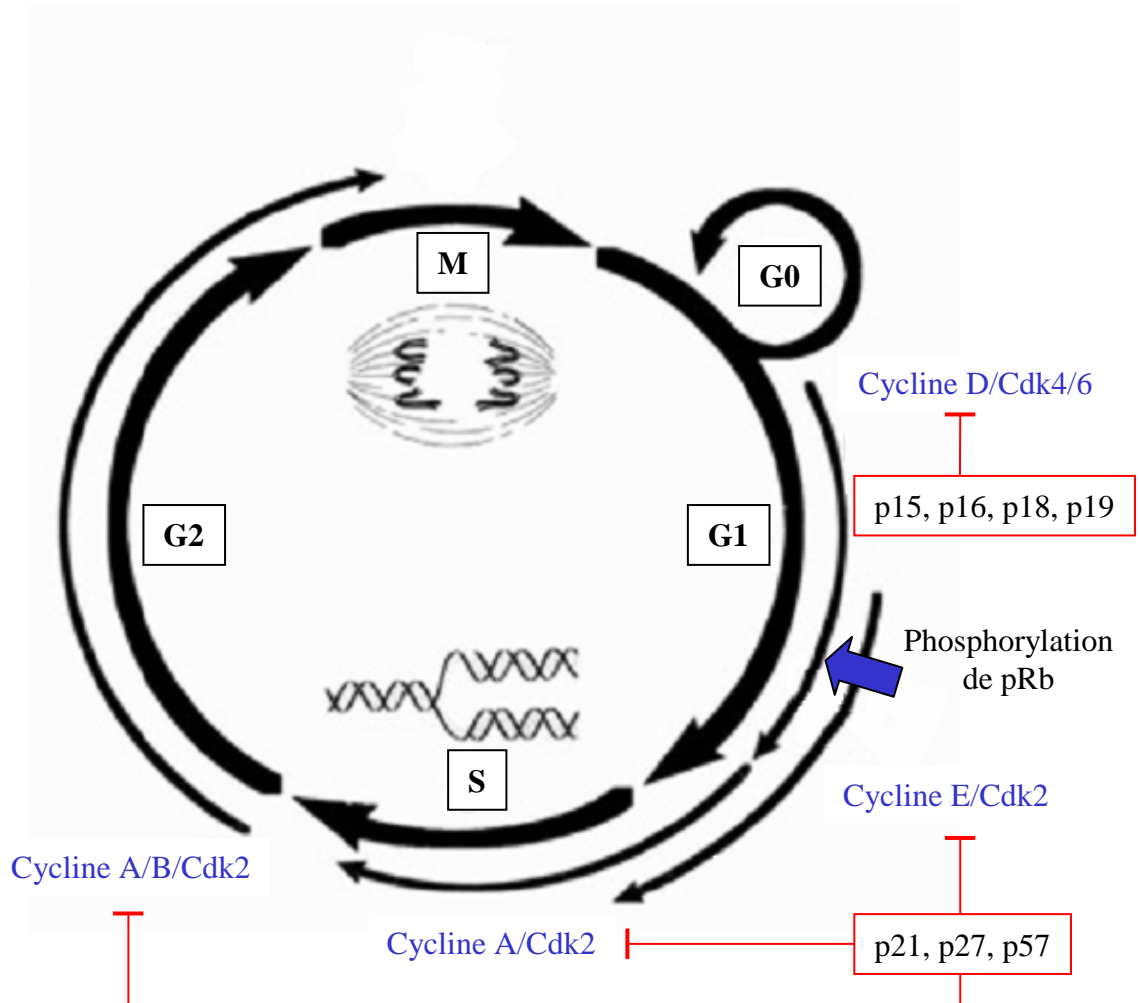


Figure 31: Le cycle cellulaire.

Régulation des complexes Cycline/Cdk par leurs inhibiteurs au cours du cycle cellulaire (d'après Donovan, 2000).

cyclineD/Cdk6. Ils régulent l'expression des gènes et l'activité des protéines impliquées dans la synthèse d'ADN et la transition G1/S en phosphorylant la pRb (protéine du rétinoblastome) qui libère alors le facteur de transcription E2F (Krude et al., 1997). L'expression du complexe CyclineE/Cdk2 assure la progression en phase S, l'initiation de la synthèse d'ADN et la duplication des centrosomes (Hinchcliffe et al., 1999). Durant la phase S, la CyclineA/Cdk2 orchestre les mécanismes de réplication de l'ADN et la réparation des éventuelles erreurs de copie. Durant cette même phase, il y a une accumulation du couple CyclineB/Cdk1 qui organise la transition G2/M et s'assure du bon déroulement de la mitose. La signalisation des complexes cycline/cdk est sous le contrôle de protéines inhibitrices (Sherr and Roberts, 1999). La famille des protéines Cip/Kip (p21, p27 et p57) inhibe l'activité de cdk2 et retarde la progression G1/S. La famille des protéines Ink (p15, P16, p18, p19) inhibe l'activité des Cdk4/6 et permet de verrouiller le cycle cellulaire pour conduire les cellules à devenir quiescentes. Les inhibiteurs du cycle cellulaire permettent également d'induire la mort des cellules dont le cycle ne suit pas son cours normal au niveau des transitions G1/S et G2/M. La phase G0 représente la sortie du cycle ; c'est la configuration dans laquelle se trouvent les cellules quiescentes qui ne prolifèrent plus et qui se différencient. Ces cellules n'expriment plus de complexes Cycline/Cdk actifs jusqu'à ce que des signaux extra-cellulaires les réintègrent éventuellement dans le cycle. Dans les lignées cellulaires Caco2/15 ou tsFHI, l'expression de p21 est impliquée dans l'arrêt de la prolifération des cellules en G1 puis P27 et P57 permettent d'induire la différenciation entérocytaire (Deschenes et al., 2001). Escaffit et collaborateurs se sont intéressés à l'étroite relation qui existe entre les jonctions intercellulaires, la différenciation et la prolifération, *in vivo* et dans des modèles *in vitro* (Escaffit et al., 2005). Au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle, les cellules souches et leurs progéniteurs situés à la base des cryptes expriment peu voire pas de E-cadhérine. Son expression est également absente dans la lignée cellulaire non différenciée HIEC. Suite à l'activation de la voie Wnt/ β ctn, ces cellules n'établissent pas de jonctions adhérentes car l'expression des molécules d'adhérence intercellulaire est réprimée (Escaffit et al., 2005). Le β ctn est moins séquestrée à la membrane plasmique et transloque au niveau du noyau où elle régule l'activité de gènes cibles avec le facteur de transcription TCF/LEF.

Dans les processus inflammatoires, la mort ou la desquamation des cellules de l'épithélium laisse des lacunes qu'il faut rapidement remplir. La restitution n'étant pas suffisante pour régénérer l'épithélium, la régulation de la prolifération des cellules souches et progénitrices rentre également en jeu dans les processus de réparation. Les voies MAPK sont

activées par de nombreuses cytokines et des facteurs de croissance, qui sont libérés lors de l'inflammation. Leur activation conduit à la régulation transcriptionnelle des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire. Ainsi, les MAPK et leurs effecteurs sont responsables de l'initiation du cycle en augmentant l'expression de la cyclineD1 (Boonyaratanakornkit et al., 2008) et en diminuant l'expression de p21 et p27 (Cubas et al., 2010). Dans les cancers, les gènes impliqués dans les voies de signalisation qui contrôlent la prolifération sont affectés et conduisent à son activation de manière aberrante. Ras (activant MAPK/ERK) est muté et/ou APC invalidé dans plus de 50% des cancers colorectaux (East et al., 2008). L'activation de voies de signalisation impliquant les kinases Src/ERK participe à la progression tumorale en modulant les jonctions intercellulaires, la migration et la prolifération (Avizienyte et al., 2002; Summy and Gallick, 2003). La perte d'expression de la E-cadhérine dans les tumeurs influence fortement les processus de prolifération. L'expression exogène de la E-cadhérine dans la lignée cellulaire SW480 diminue la prolifération (Gottardi et al., 2001). L'altération des jonctions intercellulaires contribue également à la libération des caténines initialement impliquées dans les jonctions adhérentes et permet leur translocation nucléaire (Conacci-Sorrell et al., 2003). De la même manière que pour la régulation d'expression des MMP, la translocation nucléaire de p120ctn et de β ctn régule la prolifération en contrôlant la transcription de la cyclineD1 et la répression de p21, en association avec Kaiso et TCF-4/LEF (Daniel, 2007).

Les pathologies digestives

Les maladies inflammatoire cryptogénétiques de l'intestin

Généralités sur les MICI

En temps normal, la réponse inflammatoire est bénéfique pour l'organisme, car elle défend l'individu des agressions extérieures. Dans certains cas pathologiques, cette réponse immunitaire est mal régulée et conduit à une altération chronique du tube digestif. L'appellation MICI regroupe la RCH et la MC. En France, les MICI touchent environ 200.000 personnes qui se répartissent en 80.000 RCH et 120.000 MC. La prévalence de ces pathologies s'est vue augmentée d'un facteur 10 dans les pays industrialisés durant ces 50 dernières années en raison d'une modification du mode de vie et de l'environnement (Koutroubakis et al., 1996).

Les MICI se caractérisent par une réponse inflammatoire digestive inadaptée qui se manifeste par l'apparition de poussées inflammatoires entrecoupées de phases de rémission. Le déclenchement, la durée et la sévérité des crises peuvent être variables suivant les individus et au cours de leur maladie. Les symptômes associés aux crises les plus courants sont douleurs abdominales, diarrhées, perte de poids et fièvre. Certains patients développent également des manifestations inflammatoires extra-digestives telles que des atteintes articulaires, dermatologiques et oculaires (Larsen et al., 2010). Du point de vue physiopathologique, la MC et la RCH n'impliquent pas les mêmes atteintes digestives. Dans la MC l'inflammation peut toucher l'ensemble du tube digestif (de la bouche à l'anus) avec des manifestations généralisées ou ciblées en provoquant des lésions dites transmuraux atteignant les différentes couches de la paroi digestive et pouvant être responsables de perforations, fistules, abcès. La RCH provoque des lésions superficielles restreintes au côlon et au rectum. Ces lésions plus superficielles que dans la MC atteignent la muqueuse et la sous-muqueuse et sont à l'origine des hémorragies caractéristiques de la RCH. Les populations de cellules immunitaires activées et le profil cytokinique qui leur sont associés, sont également différents : Th1/Th17 (T helper) pour la MC et Th2 dans le cas de la RCH (Sanchez-Munoz et al., 2008).

L'inflammation

La réponse inflammatoire est un processus physiologique qui permet à l'organisme de mobiliser ses défenses pour faire face à une agression. Les éléments déclencheurs de l'inflammation peuvent être de nature chimique (détergents, solvants,...), physique (ulcérations, blessures,...) ou infectieuse (bactéries, virus, parasites, champignons...) et induisent une réponse adaptée pour chacun d'entre eux. L'inflammation se déroule suivant différentes phases qui font intervenir le recrutement et l'activation de populations leucocytaires spécifiques ainsi que la production et la libération d'un profil de cytokines associé. Le système immunitaire est, dans un premier temps, capable de répondre à l'agression de manière non spécifique avec l'immunité innée, puis spécifique avec la réponse adaptative. Parmi les cellules de l'immunité innée, on retrouve des cellules dendritiques, macrophages, mastocytes et polynucléaires...

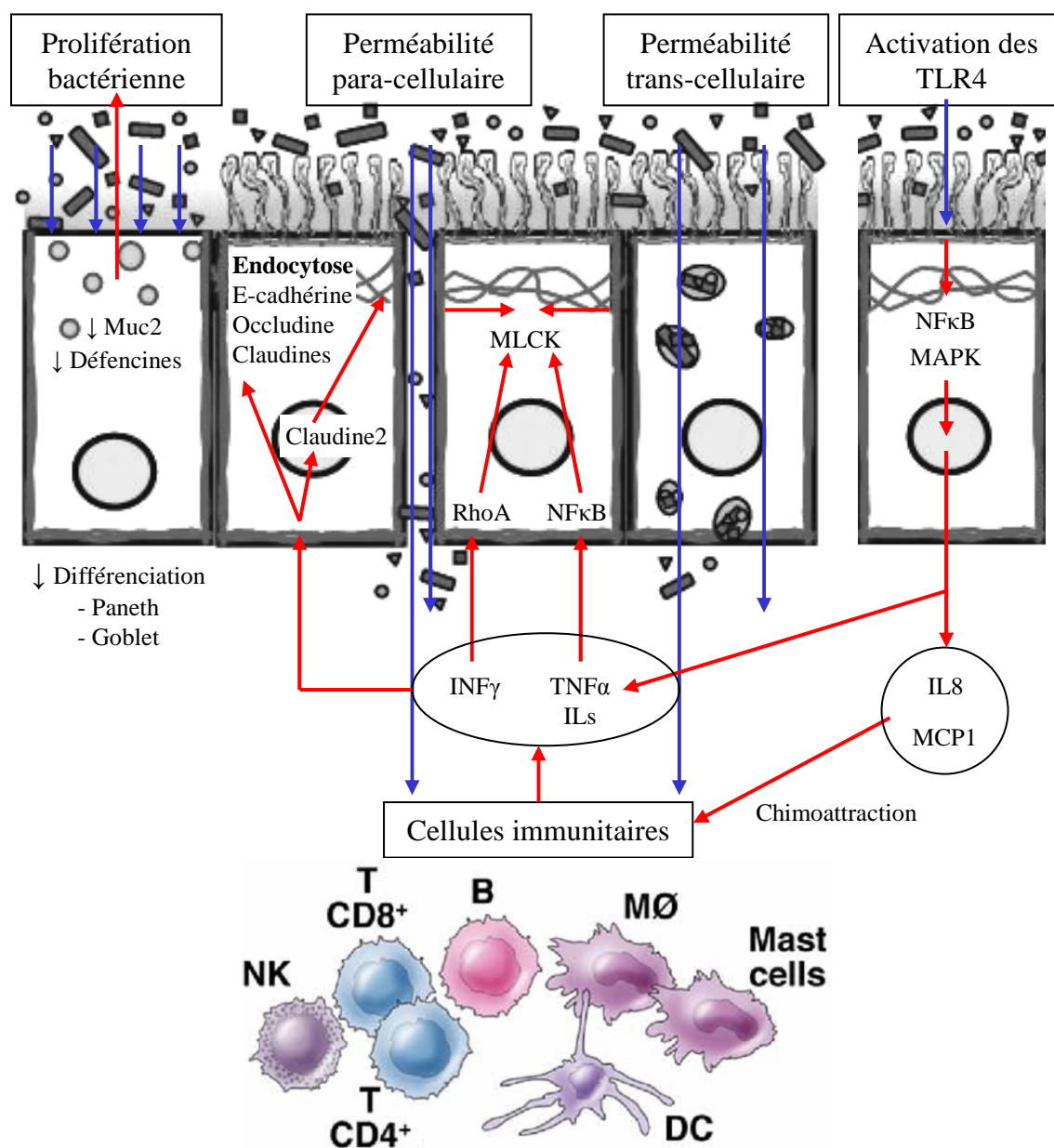


Figure 32: Altérations de la barrière intestinale.

La barrière épithéliale intestinale peut être altérée par une diminution de la sécrétion de mucus et de défensines, une augmentation de la perméabilité para-cellulaire, trans-cellulaire et une activation des récepteurs au LPS exprimés par les entérocytes. Les cellules immunitaires peuvent être activées suite à l'altération de la barrière ou à l'inverse, induire l'ouverture de la barrière par la production de cytokines. La translocation bactérienne est représentée en bleu et les voies de signalisation en rouge (d'après Terzic, J., 2010).

Les cellules dendritiques et les macrophages sont capables de phagocyter les bactéries grâce à l'expression de récepteur spécifiques comme l'intercellular cell adhesion molecule (ICAM). L'activation des Toll like receptors (TLR) (Rakoff-Nahoum et al., 2004) ou des récepteurs NOD/CARD15 participe également à la réponse anti-bactérienne des cellules de l'immunité innée et des cellules épithéliales sur l'ensemble du tube digestif (Murillo et al., 2003). Ces récepteurs sont activés par des motifs moléculaires PAMP (Pathogen-associated molecular pattern) comme le lipopolysaccharide (LPS) exprimé sur les bactéries pathogènes et conduisent à l'activation du facteur de transcription NF κ B impliqué dans la régulation de l'expression de cytokines comme le TNF α , l'IL1 ou l'IL8 (Zheng et al., 2008; Zuckerman et al., 1991) (Figure 32). Les mastocytes et les polynucléaires contiennent des granules libérant la tryptase, la trypsine, l'histamine, l'héparine ou l'éosine... quand ils sont activés. Ces divers composés sont responsables d'une augmentation du stress oxydant. L'ensemble de ces procédés a pour effet de détruire l'agresseur et de présenter les antigènes qui le composent aux lymphocytes pour déclencher la réponse adaptative. Cette immunité est dépendante de l'activité des lymphocytes et des natural killers (NK). Elle organise une réponse à médiation humorale via les lymphocytes B (LB) et cellulaire avec les LT. Les LT se répartissent en sous-populations responsables de la libération de différentes cytokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires qui régulent l'intensité de l'inflammation. Une réponse immunitaire de type Th1/Th17 induit la production de TNF α , INF γ , des IL4, IL5 et IL13, responsables de l'activation des LT effecteur (Leung et al., 2010). La réponse Th2 mobilise plutôt un profil de LB et d'éosinophiles avec la libération d'IL3 à 6 et d'IL10. Les LTreg produisent principalement des cytokines anti-inflammatoires IL10 et TGF β qui régulent la réponse Th1. Le déficit des LTreg dans les MICI est responsable de modulations de la balance d'activation Th1/Th2 au cours de l'inflammation digestive. Elle coordonne la réponse immunitaire et favorise la réparation tissulaire dans les phases tardives. Certaines de ces cytokines peuvent être produites par les cellules non-immunitaires de la paroi intestinale. Dans certaines conditions, les cellules épithéliales sont capables de sécréter des facteurs comme l'IL8 ou MCP1 (Monocyte chemoattractant protein), impliqués dans la chimioattraction des macrophages et de lymphocytes au niveau de la partie sub-épithéliale (Moss et al., 2007). Ainsi, lors de l'inflammation, les leucocytes sont attirés et leur nombre augmente dans la sous-muqueuse.

L'altération de la barrière épithéliale intestinale par une diminution de la sécrétion de mucus et de défensines et/ou une augmentation de la perméabilité trans-cellulaire et/ou para-

cellulaire, contribue également à l'augmentation de l'inflammation en permettant l'influx du contenu luminal au niveau des cellules immunitaires de la lamina propria (Figure 32). La diminution de la sécrétion de mucus par les cellules de Goblet réduit le manteau de protection de l'épithélium contre les bactéries lumineales (Kim and Ho, 2010). Dans la RCH, la densité des cellules à mucus est diminuée ainsi que l'épaisseur de la couche de mucus sur de larges plages de la surface de l'épithélium (Strugala et al., 2008). Les défensines sont libérées par les cellules de Paneth au niveau de l'intestin grêle et préviennent la prolifération bactérienne. Il a été proposé qu'une altération de la différenciation des progéniteurs de l'épithélium intestinal en cellules à mucus pourrait conduire au développement d'une MC et que la déficience en cellules de Paneth pourrait plutôt conduire au développement d'une RCH (Gersemann et al., 2011). Cependant, certaines études montrent que la diminution de la production de défensines résulterait plutôt de l'altération de l'épithélium (Ramasundara et al., 2009). Tout en participant à la physiopathologie de la MC, elle serait plus conséquence que cause. Durant la phase active de l'inflammation, la translocation bactérienne au niveau de la lamina propria fait intervenir des mécanismes de transcytose (Porrás et al., 2006). Certaines cytokines agissent directement sur les cellules épithéliales intestinales dont elles modulent la perméabilité paracellulaire en altérant les contacts intercellulaires (Capaldo and Nusrat, 2009). Le $TNF\alpha$, l' $INF\gamma$ et l' $IL1\beta$ régulent les jonctions de manière synergique en jouant sur la contraction du cytosquelette d'actine via la MLCK (Al-Sadi et al., 2011; Cenac et al., 2004; Marchiando et al., 2010). Les cytokines participent également à la régulation des différentes isoformes de claudines et augmentent le contenu des jonctions serrées en Claudine2 (Prasad et al., 2005). Cet enrichissement en Claudine2 a pour effet de diminuer la cohésion des contacts et d'augmenter le flux para-cellulaire. Dans la RCH, l'expression de la Claudine2 est augmentée et celle de la Claudine1 et de l'occludine sont diminuées (John et al., 2011). Durant l'inflammation, la composition des radeaux lipidiques est fortement modifiée. Du point de vue de leur structure, l'expression générale de la flotilline est diminuée dans les cellules épithéliales intestinales des patients atteints de MICI et affecte la stabilité de ces microdomaines membranaires. L'expression et la localisation des molécules d'adhérence intercellulaire, que ce soit au niveau des jonctions adhérentes, serrées ou des desmosomes, sont également diminuées dans les radeaux lipidiques lors de l'inflammation (Gassler et al., 2001). Par ailleurs, certains polymorphismes du gène de la E-cadhérine sont également associés au développement de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et conduisent à une localisation moins membranaire et plus cytoplasmique (Muise et al., 2009).

Ethiopathologie

Les MICI ont une étiologie multifactorielle regroupant des éléments environnementaux, génétiques ou infectieux. On dit qu'elles sont la conséquence d'une rupture de la tolérance à la flore microbienne. Du point de vue médical, c'est souvent la combinaison de plusieurs de ces facteurs qui est à l'origine du déclenchement de la maladie et qui l'entretient par la suite en renforçant la charge allostatique. Sur le plan génétique, certains polymorphismes sont identifiés comme prédisposant au développement de MICI. Leur répartition n'est pas équitable dans la population générale, ce qui a une incidence sur la prévalence de la MC ou de la RCH. Les polymorphismes à l'origine des prédispositions à développer des MICI sont plus impliqués et plus décrits dans le cadre de la MC que dans la RCH. On distingue ainsi en plus d'une agrégation familiale de ces maladies, des populations plus à risque telles que les juifs Ashkénazes. Les polymorphismes impliqués dans le développement de la MC les plus répandus et les mieux caractérisés sont ceux du gène NOD2/CARD15 (Yazdanyar and Nordestgaard, 2010). D'autres variants génétiques impliqués dans la production de mucines, des cytokines ou de l'expression de leurs récepteurs ont également été décrits (Van Limbergen et al., 2009).

Les facteurs prédisposants des MICI ne font pas seulement intervenir la composante génétique mais également le versant environnemental où de nombreux éléments liés à l'immunité sont encore impliqués (Bernstein, 2010). La flore joue un rôle très important dans l'homéostasie intestinale étant donné les interactions et l'étroite relation qu'elle établit avec le système immunitaire (Packey and Sartor, 2008). Le mode d'allaitement durant la jeune enfance et le régime alimentaire ultérieur influencent sa composition et participent à l'éducation immunitaire. Les différents aliments et le mode alimentaire peuvent ainsi jouer un rôle protecteur ou prédisposant à l'apparition des MICI. Les infections périnatales ou durant l'enfance et l'exposition à certains pathogènes (*E. Coli*, *Streptococcus*, *Listéria*), sont en revanche des facteurs uniquement prédisposants et aggravants. Les infections répétées dans l'enfance modifient la flore intestinale et pourraient ainsi favoriser l'apparition des MICI. Parmi les nombreux facteurs impliqués dans la physiopathologie des MICI, le tabagisme est un sujet bien documenté. De manière intéressante, la consommation de nicotine exerce des effets opposés suivant les MICI, en jouant un rôle protecteur chez les patients atteints de RCH et aggravant chez les malades de MC (Cosnes, 2004). Son action semble passer par une modulation du système immunitaire dont le profil d'activation est différent dans ces deux pathologies. L'étude de ces contradictions dans des modèles animaux a montré que le tabac

impliquait également le système nerveux autonome (SNA) dans ces régulations. Le tabac aggraverait la dysautonomie du système nerveux sympathique dans la MC et corrigerait une dysautonomie vagale dans la RCH.

Thérapeutique

Les traitements des MICI font intervenir différentes stratégies suivant les phases de poussées et les phases de rémission. Ils conduisent à l'utilisation de produits pharmacologiques et d'interventions chirurgicales dont les effets sont suspensifs et non curatifs. Lors des poussées, il était jusqu'à présent préconisé d'augmenter progressivement la puissance des outils thérapeutiques utilisés tant que l'inflammation n'est pas enrayée, afin de limiter leurs effets indésirables. Cette stratégie "step-up" est maintenant remise en question avec des stratégies "top-down" dans lesquelles l'objectif est de frapper fort au début avant de diminuer les traitements, ce qui améliore la récupération post-crise. Des stratégies "step-up" rapides sont également pratiquées. Ces médicaments se partagent en quatre familles : les salicylés, les corticoïdes, les immunosuppresseurs et les thérapies biologiques (anti-TNF α). Le 5-ASA, le plus utilisé des salicylés, constitue le traitement de référence de la RCH (Meier and Sturm, 2011) mais n'a que peu d'effets sur la MC. Il a un effet agoniste PPAR γ et diminue la perméabilité intestinale et agit en inhibant la production des molécules de l'inflammation impliquées dans le chimiotactisme des neutrophiles, des prostaglandines et des radicaux libres de l'oxygène tout en développant peu d'effets secondaires. Les corticoïdes sont utilisés lors des périodes de récurrence et/ou d'échappement au 5-ASA. Ils diminuent l'activité immunitaire en inhibant la synthèse des cytokines pro-inflammatoires. L'utilisation des corticoïdes est souvent de courte durée en raison de leurs effets secondaires et ne constitue en aucun cas un traitement d'entretien des MICI. Les immunosuppresseurs (notamment l'Imurel) sont surtout utilisés dans la MC et la RCH. Ils diminuent l'activité immunitaire générale et nécessitent un suivi rigoureux. L'Imurel, seul ou associé aux anti-TNF α , est employé pour le traitement des formes sévères de la maladie et comporte de nombreux effets secondaires, notamment des infections et le développement de lymphomes. L'utilisation des anticorps de synthèse anti-TNF α cible cette cytokine, qui est fortement augmentée chez les patients atteints de MC. Les traitements chirurgicaux concernent les formes réfractaires aux traitements pharmacologiques et les complications de la maladie, particulièrement dans le cadre du traitement des fistules et de sténoses retrouvées dans la MC. Les chirurgies sont les plus minimalistes possibles dans la MC mais peuvent parfois conduire à la résection totale du

côlon et du rectum chez les patients atteints de RCH. La colectomie avec anastomose iléo-rectale peut dans certains cas être curative mais nécessite un traitement de fond du rectum restant. L'anastomose iléo-anale donne lieu à des selles multiples (3 à 5 fois par jour au mieux dont au moins 1 la nuit) et peu solides ainsi qu'à un risque de pochite (inflammation au niveau de l'anastomose) qui multiplie le risque d'infertilité par trois chez la femme jeune.

D'autres approches thérapeutiques sont également utilisées ou en cours de développement. Elles peuvent être utilisées en complément du traitement habituel et pourraient peut-être un jour le remplacer. La flore intestinale est de plus en plus ciblée par le développement de probiotiques destinés à diminuer l'inflammation et à favoriser la réparation digestive en produisant des molécules anti-inflammatoires de manière locale (Grimoud et al., 2010; Pothoulakis, 2009). Ils sont notamment efficaces dans la RCH et la pochite. La prise en charge de la dimension psychologique de ces pathologies est de plus en plus acceptée (Goodhand et al., 2009; Pellissier et al., 2010). L'utilisation d'anxiolytiques, d'anti-dépresseurs ou de médecines alternatives telles que l'hypnose donne des résultats prometteurs pour les patients et pourrait aider la prise en charge des MICI en complément des traitements médicamenteux (Emami et al., 2009). Une étude clinique basée sur l'utilisation des effets anti-inflammatoires liés à la stimulation électrique du nerf vague chez les patients atteints de MICI est développée au laboratoire (Meregnani et al., 2011). Cette alternative thérapeutique pourrait éviter les effets indésirables associés aux traitements lourds et améliorer l'observance du traitement d'entretien dont l'arrêt participe souvent aux rechutes inflammatoires (30 à 50% des patients atteints de MICI arrêtent leur traitement). Sauf exception, les patients atteints de MICI ne meurent pas de leur maladie ; en revanche leur qualité de vie est fortement altérée, notamment au moment des poussées. L'inflammation chronique et/ou les traitements utilisés pour la combattre constituent des facteurs prédisposants pour d'autres pathologies, ce qui stimule la recherche et le développement de nouveaux outils thérapeutiques pour les MICI.

Modèles animaux d'inflammation digestive

Des modèles d'inflammation digestive chez l'animal ont été développés pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le déclenchement et le déroulement des poussées inflammatoires (Strober et al., 2002). L'instillation de toxines bactériennes telles que la *Clostridium difficile* toxine A au niveau de l'intestin grêle constitue un bon moyen d'étude de l'inflammation aiguë retrouvée dans les entéropathies. Des modèles

d'inflammation utilisent également des agents chimiques tels que l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS), classique modèle expérimental de MC et le DSS modèle expérimentale de RCH, dans le but de reproduire les caractéristiques anatomopathologiques des MICI. Le TNBS est un haptène dilué dans l'éthanol et administré par instillation intra-rectale chez l'animal. Sa pénétration dans les tissus, favorisée par l'effet de l'éthanol, modifie les motifs antigéniques des protéines du soi et conduit au développement d'une réponse auto-immune. Les animaux présentent des atteintes transmurales au niveau du côlon, qui sont caractéristiques de la MC. Le DSS est dissout dans l'eau de boisson des animaux et peut être utilisé pour développer un modèle d'inflammation aigüe ou chronique suivant la fréquence et le nombre de cycles de son administration (Okayasu et al., 1996). Les animaux développent une inflammation sur l'ensemble du tube digestif. Cependant, le segment colorectal présente des hémorragies et des atteintes de la muqueuse et de la sous-muqueuse, caractéristiques de la RCH. Par ailleurs, les profils immunitaires cytokiniques retrouvés dans ces deux modèles sont similaires à ceux développés chez les patients respectivement atteints de MC ou de RCH (Daniel et al., 2008; te Velde et al., 2007). Des modèles génétiques ont également été développés avec une approche de KO de gènes impliqués dans des processus anti-inflammatoires comme l'IL10 ou Muc2.

Contrairement aux modèles d'entéropathies et de colites induites précédemment décrits, ces animaux développent une inflammation digestive de manière spontanée. Avant l'âge de six semaines, les souris IL10^{-/-} présentent des anomalies de la perméabilité de la barrière épithéliale de l'iléon associées à une augmentation de l'expression du TNF α et de l'INF γ (Madsen et al., 1999). L'inflammation intestinale observée chez ces animaux est perdue lorsqu'ils sont maintenus en condition "germ free" (dépourvus de flore intestinale), en accord avec l'implication de la flore intestinale dans la physiopathologie des MICI. La sécrétion de Muc2 est diminuée dans la RCH et conduit à une augmentation de la perméabilité de l'épithélium (Strugala et al., 2008). Certains critères de la RCH sont retrouvés chez les animaux Muc2^{-/-} tels que l'expression du TNF α , les diarrhées, la perte de sang dans les selles (Van der Sluis et al., 2006). De plus, l'administration de DSS dans l'eau de boisson des animaux Muc2^{+/-} conduit à une aggravation de la colite. Ces deux modèles confortent l'implication de la flore commensale dans la régulation de la barrière intestinale. De la même manière que les patients atteints de RCH, les souris Muc2^{-/-} sont prédisposées au développement de tumeurs intestinales (Velcich et al., 2002).

Les cancers colorectaux

Origine des cancers colorectaux

Les CCR ont une fréquence élevée en France, les plaçant au 2^{ème} rang des cancers chez la femme (derrière le cancer du sein) et au 3^{ème} rang chez l'homme (derrière le cancer du poumon et de la prostate). Les facteurs de risques regroupent l'âge puisque 85% d'entre eux touchent des personnes de plus de 65 ans, des prédispositions génétiques, la sévérité et la fréquence des poussées inflammatoires chez les patients atteints de MICI ainsi que le mode de vie (Chan and Giovannucci, 2010). L'apparition des CCR est influencé par le régime alimentaire dont certains composants, comme les fruits et légumes, ont un effet protecteur et d'autres plutôt néfaste, comme les viandes rouges. D'autres facteurs environnementaux rentrent en ligne de compte dans l'impact du mode de vie avec le tabagisme, la consommation d'alcool ou le stress. Il a par ailleurs été montré que le stress augmente la mortalité chez les femmes atteintes de CCR (Kojima et al., 2005). La majorité des cancers intestinaux se développent au niveau du côlon, dont 70% environ dans le sigmoïde. L'apparition et la progression du cancer sont dépendantes de la modification du contenu génétique d'une cellule saine, conduisant à l'augmentation de sa prolifération et de sa survie. Différents niveaux d'altération de l'ADN sont impliqués dans les processus d'instabilités microsatellitaire, épigénétique, ou chromosomique (Migliore et al., 2011).

Lors de la division cellulaire et dans le cas d'exposition à des mutagènes, des erreurs surviennent dans l'ADN des cellules. Des systèmes de vérification sont alors mis en place et réparent les mésappariements et les cassures de l'ADN ; ils appartiennent à la famille des mismatch repair (MMR). Lorsque ces gènes sont eux-mêmes touchés, les réparations n'ont plus lieu et les erreurs s'accumulent, particulièrement dans des zones appelées microsatellites. Elles contiennent des séquences répétées de nucléotides, retrouvées au niveau de nombreux gènes responsables de la prolifération (APC, Ras,...), la différenciation (TGF- β , Notch,...) et la survie cellulaire (DCC, Bax,...). Dans les CCR, les MMR les plus touchés sont la MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2. 15% des tumeurs colorectales sporadiques impliquent de l'instabilité microsatellilaire. Par ailleurs, le syndrome de Lynch (ou hereditary non polyposis colorectal cancer HNPCC) prédispose à une forme héréditaire familiale de CCR qui font intervenir des mutations de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Gala and Chung, 2011). Il a une prévalence d'environ 25/100.000 et représente 3% des CCR.

L'instabilité épigénétique fait intervenir la régulation de l'expression de gènes, notamment par hyper-méthylation de certains promoteurs ou par des modifications post-traductionnelles des histones. Ces régulations peuvent conduire à la perte d'expression de gènes impliqués dans les systèmes de réparation et à l'augmentation de l'instabilité microsatellilaire (Toyota and Suzuki, 2010). Elles participent également à la régulation des gènes impliqués dans l'initiation et la progression tumorale et concernent 20 à 30% des CCR dont certains présentent un profil d'hyperméthylation particulièrement important nommé CIMP (CpG island methylator phenotype) (Toyota et al., 1999). Les promoteurs anormalement méthylés sont conservés dans les CCR et affectent principalement les gènes impliqués dans la différenciation, la prolifération, les systèmes d'adhérence, les Rho GTPases, l'apoptose ou la réparation de l'ADN (Xu et al., 2011). La présence de méthylation sur les promoteurs des gènes HIC1, MDG1 et RASSF1A impliqués dans les CCR peut être recherchée dans le sang et servir de biomarqueur dans le dépistage au stade précoce de ces cancers (Cassinotti et al., 2011).

L'instabilité chromosomique est une erreur qui conduit à la perte de tout ou partie d'un chromosome lors de la division cellulaire. Les mécanismes impliqués dans la ségrégation des chromosomes semblent importants dans la survenue de ces erreurs (Chartier et al., 2007), mais leurs causes restent mal connues. Un ou plusieurs chromosomes peuvent ainsi disparaître de la cellule et/ou ne présenter que la forme mutée de certains gènes. La présence de polymorphismes particuliers ou de mutations sur l'un ou l'autre des allèles transmis par les parents ne porte pas nécessairement à conséquence tant que les deux copies sont présentes dans la cellule. L'instabilité chromosomique concerne la majorité des CCR sporadiques, soit 80% des cas et conduit à la perte du bras long du Chromosome 5 (ch5q) qui contient le gène APC, le bras court du chromosome 17 (ch17p) qui contient p53, et le bras long du chromosome 18 (ch18q). Certaines formes héréditaires de CCR, les « familial adenomatous polyposis » (FAP), conduisent à l'apparition de multiples polypes bénins dès l'adolescence. Ces individus sont porteurs d'un allèle muté de APC et l'instabilité génomique conduit à l'élimination de l'allèle valide dans certaines cellules intestinales.

Développement tumoral colorectal

Comme décrit précédemment, l'épithélium intestinal assure son renouvellement en s'organisant selon des compartiments prolifératifs, différenciés et apoptotiques. La perte de

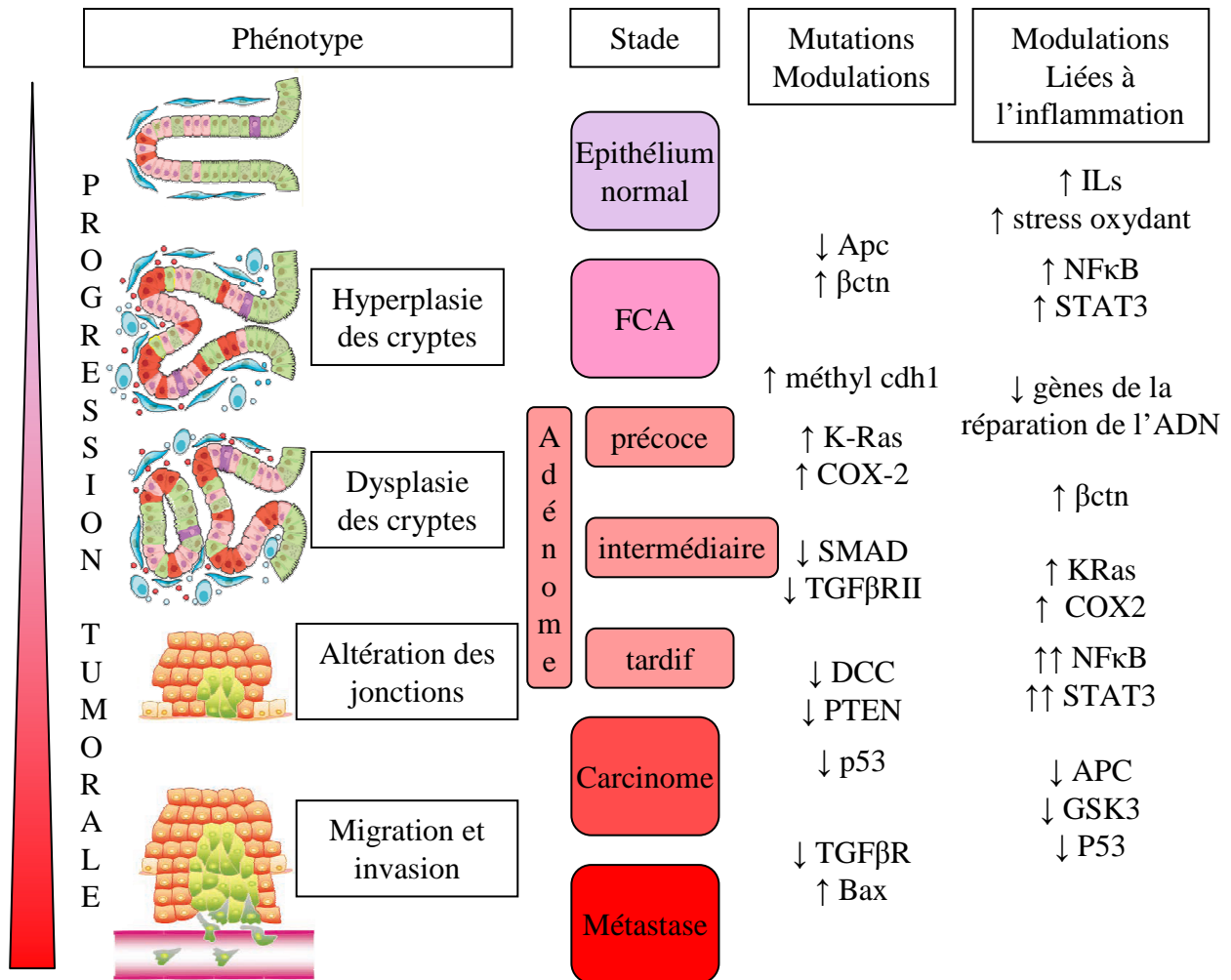


Figure 33: Progression des cancers colorectaux.

(d'après Fearon, E.R. et Vogelstein, B., 1990; Brackenbury, W.J., 2008; Moran, A., 2010; Terzic, J., 2010).

cette compartimentation conduit à un développement tumoral. Les cancers se développent souvent à partir des cellules prolifératives qui acquièrent des modifications génétiques ou épigénétiques touchant des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs (Fearon and Vogelstein, 1990). Dans le côlon, les cellules souches et progénitrices du fond de la crypte sont les plus exposées aux risques de mutations du fait de leur longévité. Les premières modifications morphologiques pré-cancéreuses se manifestent par la formation de focus de cryptes aberrantes (FCA) hyperplasiques ou dysplasiques (Gupta and Schoen, 2009). Les mutations affectant le gène Ras conduisent la plupart du temps au développement hyperplasique responsable de l'épaississement et l'élargissement des cryptes, qui évolue par la suite en néoplasie. Ce type de lésion serait à l'origine de la majorité des cancers colorectaux sporadiques. De nombreuses FCA dysplasiques sont retrouvées dans les FAP ; elles présentent des mutations de APC dans une crypte complètement désorganisée dans lesquelles des cellules prolifèrent dans la partie supérieure (Figure 33).

Le développement des FCA évolue en adénomes puis en carcinomes présents sous la forme de polypes à la morphologie variable : plats ou au pied plus ou moins long. Les adénomes sont des tumeurs encore bénignes facilement reconnaissables lors d'une endoscopie, et leur résection constitue le meilleur moyen de prévenir le développement tumoral. A ce stade, l'instabilité génomique conduit à l'élargissement du panel de mutations. Les tumeurs colorectales forment à 85% des adénocarcinomes, dans 10-15% des adénocarcinomes mucineux (constitués à plus de 50% de mucine) et le reste des cas représente des formes rares. Du point de vue histologique, leur grade est défini par le niveau de différenciation des cellules (moins elles sont différenciées, plus le grade est élevé) et du caractère invasif des limites du foyer tumoral qui peut être restreint à la muqueuse ou envahir la paroi intestinale jusqu'à la séreuse (Lanza et al., 2011). Les cellules tumorales produisent également des facteurs induisant la néo-angiogenèse, qui permet d'irriguer la tumeur et de lui apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa croissance. Le caractère invasif de certains carcinomes conduit inévitablement à la formation de métastases. Le phénomène de TEM impliquant un changement d'expression des molécules d'adhérence et la production de MMP est responsable de la perte des contacts avec la tumeur primaire, de la digestion de la matrice puis de l'invasion des cellules métastatiques. La présence locale de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques permet leur dissémination et leur implantation, principalement au niveau de la région thoracique et abdominale. Les principaux organes

touchés sont les ganglions lymphatiques, le foie et les poumons, où la formation de foyer secondaire est la principale cause de décès des patients atteints de CCR.

Cancers et inflammation

L'inflammation conduit à la dégradation des tissus situés à proximité du foyer et mobilise des systèmes de réparation impliquant la prolifération cellulaire. Lors d'une inflammation chronique, le constant renouvellement cellulaire favorise l'apparition d'erreurs de réplication de l'ADN et donc le développement de cancers (Figure 33). Ainsi, les patients atteints de MICI ont un risque accru de développer un CCR (Danese and Mantovani, 2010). Ce risque est également corrélé à la fréquence et à la sévérité des poussées inflammatoires (Rutter et al., 2004; Rutter et al., 2006). Il paraît vraisemblable que les cancers digestifs associés à l'inflammation chronique possèdent des caractères communs les distinguant des autres cancers colorectaux. Ces critères leur confèrent également une évolution à part de la pathologie, pouvant faire l'objet d'un dépistage et de traitements préventifs particuliers (Danese and Mantovani, 2010; Klampfer, 2011). Des études portées sur les modèles animaux de CCR associés à l'inflammation mettent en lien l'expression de certaines molécules avec la transition de l'état inflammatoire aux différents stades de la carcinogenèse. Ainsi, la production de Nétrine-1 est régulée par le facteur de transcription NF κ B lui-même dépendant de l'activation du TNF α . La Nétrine-1 est un ligand du récepteur deleted in colorectal cancer (DCC) qui régule la survie et l'apoptose des cellules épithéliales intestinales et dont l'expression et/ou la fonction sont affectées dans de nombreux cancers. Initialement absente dans la partie supérieure des cryptes du côlon, la Nétrine-1 permet aux cellules épithéliales d'échapper à l'apoptose et crée un environnement pro-tumoral (Paradisi et al., 2008). L'utilisation de peptides empêchant la Nétrine-1 d'agir sur ses récepteurs diminue également les processus de progression tumorale. Les mécanismes de transition entre l'inflammation et le cancer nécessitent une meilleure compréhension pour faire l'objet de cibles thérapeutiques particulières. Par ailleurs, des modèles animaux sont développés en ce sens chez le rongeur traité avec une combinaison de DSS lié au versant inflammatoire et d'AOM qui est un mutagène responsable de l'initiation de la tumorigenèse (De Robertis et al., 2011). Les tumeurs développées chez les rongeurs traités avec l'AOM/DSS présentent comme chez l'homme des mutations dans les voies de signalisation KRas, β -caténines et MMR, responsables de la prolifération et de l'instabilité microsatellitaire. En revanche, le système

APC et la protéine P53 sont rarement affectés et les tumeurs ne développent quasiment pas de métastases (Kobaek-Larsen et al., 2000).

Si l'inflammation chronique peut être à l'origine du développement des CCR, le déclenchement d'une inflammation peut également survenir dans un CCR déjà établi et solliciter certaines populations immunitaires. La spécificité du tissu tumoral et la nature des molécules qui y sont produites attirent de nombreuses cellules du système immunitaire. La tumeur est par conséquent un tissu hétérogène contenant lymphocytes, macrophages ou mastocytes (Zamarron and Chen, 2011). Ceux-ci induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires durant l'inflammation et des molécules analogues peuvent également être libérées dans des conditions de stress et jouer un rôle dans la progression tumorale (Khazaie et al., 2011). La composition de la flore intestinale est modifiée par l'inflammation ou les aliments. La relation symbiotique qu'elle exerce avec la muqueuse intestinale fait intervenir l'échange de molécules plus ou moins bénéfiques. Celles-ci peuvent également affecter la physiologie de la tumeur et participer à aggraver le cancer. En revanche de plus en plus d'études s'intéressent à l'utilisation de pro-biotiques en complément de thérapie contre le CCR dans le but de bénéficier de la sécrétion de molécules anti-cancéreuses (Daniel et al., 2008).

Implication du système CRFergique dans le stress, l'inflammation et le cancer

Le stress

Dans le langage médical, le concept de "stress" a été décrit par Hans Selye (1907-1982) (Selye, 1956). En réponse à différents événements stressants, les organismes vivants ont développé des stratégies de gestion du stress et des comportements adaptatifs dans le but de maintenir leur homéostasie. Le stress est un processus complexe qui fait intervenir les systèmes endocrinien, immunitaire et nerveux. Ces systèmes fonctionnent et communiquent ensemble en produisant de médiateurs (hormones, cytokines, neuromédiateurs) qui agissent sur des récepteurs spécifiques. Le stress extéroceptif lié aux événements psychologiques ou

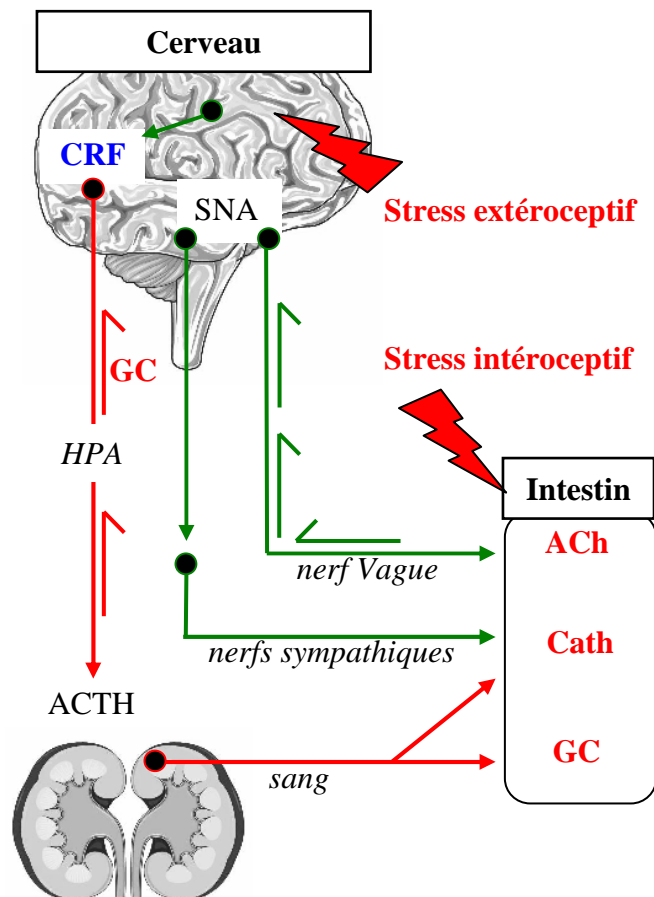


Figure 34: Stress et interactions neuro-digestives.

Les communications neurodigestives sont exercées par l'axe corticotrope (HPA) (flèches rouges) et le système nerveux autonome (SNA) qui regroupe le nerf vague et les nerfs sympathiques (flèches vertes). Les stress extéroceptifs induisent à la fois l'activation de l'axe HPA et des modulations de l'activité du SNA, qui conduisent respectivement à la libération de glucocorticoïdes (GC) et de catécholamines (Cath) dont la norépinéphrine (NE) dans le sang, et la libération dans l'intestin de l'acétylcholine (ACh) et de NE. Une rétro-contrôle des GC régule l'activation centrale de l'axe HPA en inhibant la production du CRF hypothalamique. Le cerveau perçoit également les stress intéroceptifs par l'activation des afférences vagales stimulées au niveau de l'intestin (D'après Ducarouge, B. et Jacquier-Sarlin, M., 2012, revue en annexe).

émotionnels est généré par le système nerveux central (SNC). Il est à distinguer du stress interoceptif d'origine somatique induit par des dommages physiques infectieux ou inflammatoires. Cependant, le stress interoceptif peut être perçu au niveau du SNC par l'intermédiaire du nerf Vague afférent par exemple. Le stress est également caractérisé par d'autres paramètres tels que la durée, la fréquence (aiguë ou chronique) et l'intensité. Un stress chronique ou la récurrence d'un stress aigu entraîne une sollicitation accrue des systèmes physiologiques cardio-vasculaire, immunitaire, métabolique, hormonal,... Ce phénomène d'allostase continuellement sollicité peut, avec le temps, conduire au développement de pathologies ou contribuer à leur aggravation lorsqu'un seuil de tolérance est dépassé. Ce phénomène correspond à une situation de charge allostatique (McEwen, 2006).

Des stress de différentes natures conduisent à des effets convergents en activant des voies de signalisation, des récepteurs et des ligands communs. En effet, quelle que soit son origine, le stress conduit à la modulation de l'activité du système nerveux autonome (SNA) et à l'activation de l'axe corticotrope (hypothalamo pituitary adrenal HPA) (Figure 34). La production de la neurohormone "corticotropin releasing factor" (CRF) au niveau de l'hypothalamus joue un rôle clé dans l'activation de l'axe HPA. Celle-ci induit ensuite la production de l'hormone corticotrope (ACTH) au niveau de l'hypophyse et sa libération dans le sang. Elle stimule à son tour la production et la libération dans le sang d'adrénaline/noradrénaline (A/NA) et de glucocorticoïdes (GC) au niveau des glandes médullo- et cortico-surrénales respectivement. Les GC agissent ainsi de manière systémique en inhibant notamment l'activité du système immunitaire. Ils régulent également l'activation de l'axe HPA par un rétro-contrôle négatif en inhibant la transcription du CRF hypothalamique (Chrousos, 1995; Vale et al., 1981). Le SNA est composé des fibres efférentes du système nerveux sympathique et du système nerveux parasympathique qui contrôlent et modulent les fonctions neuro-végétatives sur l'ensemble de l'organisme. Des informations principalement proprioceptives partent des tissus périphériques vers le SNC à travers les fibres afférentes du nerf Vague, principal représentant du système parasympathique dans l'intestin (Gaykema et al., 1995; Laye et al., 1995). De manière équivalente, les informations nociceptives remontent au SNC par les afférences sympathiques. Ces données sont intégrées au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS) (Sawchenko and Swanson, 1982) qui répond par l'activation de l'axe HPA, l'excitation ou l'inhibition des fibres efférentes qui agissent par la libération A/NA pour le système sympathique et d'ACh pour le parasympathique. En conditions de stress, le tonus sympathique est augmenté et conduit à la

libération de A/NA notamment responsable de l'augmentation du rythme cardiaque. Lors d'une inflammation digestive, la présence locale de cytokines inflammatoires est perçue par les neurones parasymphatiques et l'information est retransmise au SNC via les afférences vagues. En retour, le réflexe vago-vagal consiste en l'activation des fibres efférentes du Vague, qui conduit à un effet anti-inflammatoire périphérique par la libération d'ACh (Pavlov et al., 2003) passant par l'inhibition de la production de $TNF\alpha$, notamment au niveau des macrophages (Tracey, 2007). Les systèmes neurovégétatif ou corticotrope modulent des systèmes physiologiques dans les tissus périphériques comme la peau, le cœur ou le système digestif par les GC, l'ACh et l'A/NA. Cette action du SNC sur la périphérie en réponse au stress est particulièrement décrite dans le cadre des interactions neurodigestives.

Durant ces dix dernières années, l'influence des stress psychologiques et environnementaux sur la pathogénèse de l'obésité, du syndrome métabolique, du diabète de type 2, mais aussi dans le cadre de la douleur ou du syndrome de fatigue chronique a fait l'objet d'un intérêt croissant (Miller et al., 2009). De plus, de nombreuses maladies de peau comme l'eczéma ou le psoriasis sont causées ou exacerbées par les stress psychologiques (Arck et al., 2006) et se caractérisent par une perturbation de l'homéostasie de la barrière épithéliale cutanée (Elias, 2005). Le stress est reconnu pour sa participation dans le développement et/ou l'aggravation des troubles gastro-intestinaux comme les MICI ou le syndrome de l'intestin irritable (SII) (Chang et al., 2011; Hisamatsu et al., 2007; Maunder and Levenstein, 2008; Mawdsley and Rampton, 2005; Santos et al., 2008). Des études *in vitro* et *in vivo* indiquent que les altérations du système gastro-intestinal liées au stress font intervenir l'activation du système CRFergique aussi bien au niveau du SNC qu'en périphérie (Larauche et al., 2009b). L'expression des récepteurs au CRF et de leurs ligands a été décrite au niveau du tube digestif (Buckinx et al., 2011), mais les mécanismes moléculaires et cellulaires qu'ils impliquent sont mal connus et plutôt focalisés sur le SNE et ses interactions avec le système immunitaire digestif (Kiank et al., 2010). A ce jour, peu d'études se sont intéressées à la fonction des récepteurs au CRF exprimés par les cellules épithéliales intestinales.

Le système CRFergique

Les composants du système CRFergique

Chez les mammifères, la famille du CRF est composée de peptides de 38 à 41 acides aminés, le CRF et ses homologues les Urocortines (Ucn) : Ucn1, Ucn2 et Ucn3. Le CRF et

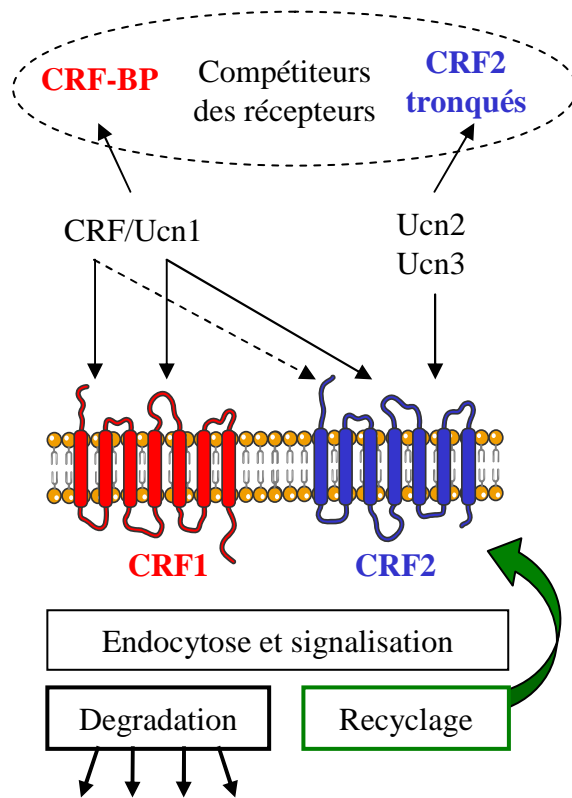


Figure 35: Le système CRFergique.

Le CRF et l'Ucn1 peuvent activer le CRF1 et le CRF2 avec une plus faible affinité pour le CRF, alors que l'Ucn2 et l'Ucn3 fixent exclusivement le CRF2. Ces interactions ligand/récepteur sont en compétition avec la CRF-BP ou des formes tronquées et solubles des récepteurs. Une fois activés, les récepteurs sont endocytés puis dégradés ou recyclés à la membrane plasmique (D'après Ducarouge, B. et Jacquier-Sarlin, M., 2012).

l'Ucn1 ont été les premiers caractérisés pour leur capacité à contrôler la sécrétion d'ACTH au niveau de l'hypophyse antérieure (Vale et al., 1981; Vaughan et al., 1995) et par conséquent pour leur rôle clef dans la régulation de l'axe HPA en condition de stress. Plus tard, l'analyse du génome par homologie de séquence avec le CRF a permis d'identifier l'Ucn2 et l'Ucn3 (Lewis et al., 2001; Reyes et al., 2001). D'autres peptides orthologues ont également été décrits, comme l'Urotensine1 chez le poisson (Lederis et al., 1982) ou la Sauvagine chez la grenouille (Montecucchi et al., 1980; Negri et al., 1983). Des analyses phylogénétiques indiquent que des peptides semblables au CRF sont fortement conservés à travers l'évolution et dérivent d'une souche commune impliquée dans la régulation d'un système neuro-endocrinien ancestral lié à l'adaptation au stress (Huising and Flik, 2005; Lovejoy and Balment, 1999; Perrin and Vale, 1999). Comme de nombreuses neurohormones, ces peptides sont synthétisés sous forme de précurseurs maturés par clivage (Furutani et al., 1983; Shibahara et al., 1983). Leur activité peut être modulée par la sécrétion de la CRF-binding protein (CRF-BP) ou des formes solubles de leurs récepteurs, qui agissent comme des compétiteurs vis-à-vis des récepteurs au CRF situés dans la membrane plasmique (Chen et al., 2005b; Huising et al., 2008; Jahn et al., 2005; Klavdieva, 1995; Potter et al., 1991) (Figure 35).

L'effet du CRF et des Ucns s'exerce à travers la reconnaissance de deux récepteurs de classe II à sept fragments trans-membranaires, dont l'activité est couplée aux protéines G : les CRF1 (Chen et al., 1993) et CRF2 (Lovenberg et al., 1995). Ces récepteurs au CRF proviennent de la transcription de deux gènes distincts, mais partagent 70% d'homologie mais diffèrent au niveau de leur domaine Nterm impliqué dans la reconnaissance de leurs ligands (Hofmann et al., 2001; Pal et al., 2010). Bien que le CRF reconnaisse les deux récepteurs, il présente une plus grande affinité pour le CRF1. L'Ucn1 active les deux récepteurs avec la même affinité tandis que l'Ucn2 et l'Ucn3 fixent le CRF2 de manière exclusive (Dautzenberg and Hauger, 2002; Grace et al., 2007) (Figure 35). Les récepteurs au CRF peuvent subir des modifications transcriptionnelles ou post-traductionnelles, telles que des épissages alternatifs et/ou la glycosylation de leur domaine Nterm (Assil and Abou-Samra, 2001). De nombreux variants d'épissage du CRF1 ont été identifiés (CRF1a à CRF1h) par leurs ARNs messagers (ARNm) mais peu de choses sont connues quant à leur expression protéique et leur fonctionnalité au sein des différents tissus. A l'exception du CRF1a, les autres isoformes ont une faible affinité pour leurs ligands ou sont incapables d'induire une signalisation intracellulaire. Ils pourraient exercer une activité régulatrice en titrant les ligands et les rendent

ainsi moins disponible pour l'activation des récepteurs fonctionnels (Dautzenberg et al., 2001; Karteris et al., 2010; Pisarchik and Slominski, 2004; Zmijewski and Slominski, 2010). Récemment, une nouvelle isoforme fonctionnelle CRF1i a été identifiée dans la lignée cellulaire BON, dont l'expression est également retrouvée au niveau de l'iléon chez le Rat (Wu et al., 2011). Pour le CRF2, il existe trois formes fonctionnelles: les CRF2a, CRF2b et CRF2c issues d'un codon start différent entre les formes a, c par rapport à b et d'un épissage alternatif entre les formes a et c, uniquement détecté chez l'Homme (Catalano et al., 2003; Hauger et al., 2003). Ces modifications induisent une différence du domaine Nterm impliqué dans l'affinité du CRF2 pour ses ligands (Liaw et al., 1997). Des formes tronquées et solubles ont également été décrites pour les CRF2, dont la fonction pourrait être de réguler l'activité du CRF2 membranaire par compétition pour les ligands (Chen et al., 2005b). Des formes de dominant négatif de CRF2b ont été décrites dans le cœur chez la Souris où elles induisent la rétention des formes fonctionnelles du récepteur au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Sztainberg et al., 2009). Dans les expériences de westernblot, il existe également une variabilité du poids moléculaire de ces récepteurs selon les tissus, les lignées cellulaires ou différentes espèces. Ces différences sont attribuées aux variants d'épissage, aux clivages des récepteurs et à leur statut de glycosylation, au regard des anticorps utilisés pour les identifier (Grigoriadis and De Souza, 1989; Spiess et al., 1998). Par ailleurs, cinq sites potentiels de glycosylation sont décrits dans la structure primaire des récepteurs au CRF (Assil and Abou-Samra, 2001) ; Or l'inflammation influence le statut de glycosylation de certains récepteurs (Groux-Degroote et al., 2008). Ces études montrent que le système CRFergique est finement régulé à la fois au niveau des ligands et au niveau de leurs récepteurs.

La signalisation du système CRFergique

La signalisation du système CRFergique a été étudiée dans de nombreuses lignées cellulaires et de nombreux tissus comprenant le SNC et les organes périphériques. Il apparaît que la fixation d'un ligand conduit à un réarrangement structural du récepteur. Cela entraîne une augmentation de l'affinité de la troisième boucle intra-cellulaire pour la sous-unité $G\alpha$ qui devient active. Les récepteurs au CRF sont principalement couplés à la sous-unité $G\alpha_s$ qui active l'adénylate cyclase et conduit à la production d'adénosine mono-phosphate cyclique (AMPC) (Chen et al., 1986). Cependant, dans certains, cas ils peuvent se lier aux sous unités $G\alpha_q$, i , o ou z et induire des voies de signalisation telles que la Phospholipase C (PLC)

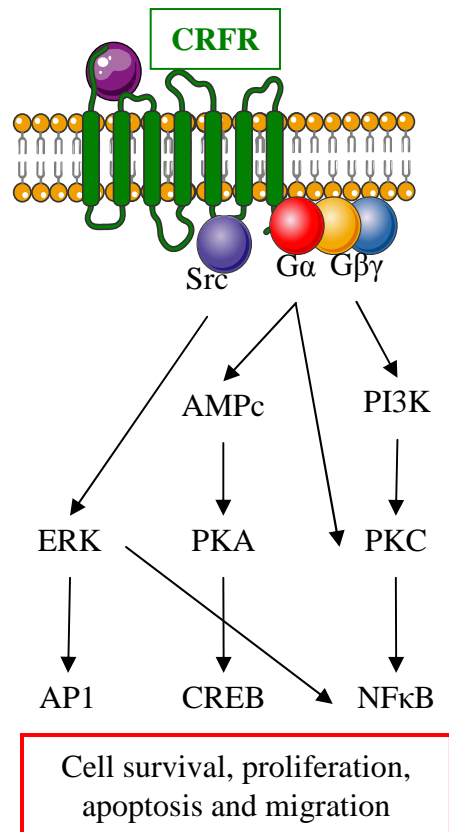


Figure 36: La signalisation du système CRFergique.

La signalisation des récepteurs au CRF est couplée aux protéines $G\alpha\beta\gamma$ et également à la kinase Src qui interagit avec les domaines intra-cellulaires des deux récepteurs. Par conséquent, de nombreuses voies de signalisation peuvent être activées et exercer un contrôle sur des processus cellulaires tels que la survie, la prolifération, l'apoptose ou la migration (D'après Ducarouge, B. et Jacquier-Sarlin, M., 2012).

(Grammatopoulos et al., 2001; Gutknecht et al., 2010; Hillhouse and Grammatopoulos, 2006; Karteris et al., 2000). Les sous unités $G\beta\gamma$ sont également capables de mobiliser des voies de signalisation intra-cellulaires telles que la voie PI3K/AKT ou l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, mais leur implication dans la signalisation de ces récepteurs est peu étudiée. Par conséquent, suivant le type de sous-unité $G\alpha$ sollicité ou le type cellulaire étudié, les récepteurs au CRF sont capables d'induire un très grand nombre de signaux intra-cellulaires tels que l'activation des protéines kinases (PK) A, B, C (PKA, PKB, PKC), les MAPK p42/p44 (ERK1/2) et p38, NOS, Fas ligand, NF κ B ou les flux de Ca^{2+} (Grammatopoulos and Chrousos, 2002) (Figure 36). Récemment, une signalisation indépendante des protéines G a été décrite pour les récepteurs au CRF avec la protéine Src. Cette kinase interagit directement avec les récepteurs au CRF lorsqu'ils sont endocytés et participe à l'activation de ERK dans la cellule (Hillhouse and Grammatopoulos, 2006; Van Kolen et al., 2010; Yuan et al., 2010b) (Figure 36).

De la même manière que les autres récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), les récepteurs au CRF sont régulés par des mécanismes de désensibilisation. Le recrutement des "G protein coupled-receptor kinase" GRK3 et CRK6 au niveau des récepteurs activés conduit à la phosphorylation de leur domaine Cterm et au recrutement de la β arrestine (Dautzenberg et al., 2001; Teli et al., 2005). Ces événements sont responsables de l'endocytose du récepteur qui par la suite peut être dégradé au niveau de la voie endo-lysosomale ou recyclé à la membrane plasmique (Figure 35). Si les CRF1 et CRF2 sont internalisés après la fixation de leurs ligands, il semblerait que leurs cinétiques de désensibilisation soient différentes suivant le modèle cellulaire utilisé et le sous-type de récepteur étudié (Markovic et al., 2008; Rasmussen et al., 2004). L'analyse de la séquence primaire protéique des récepteurs au CRF a également pu mettre en évidence de multiples sites potentiels de phosphorylation par les protéines kinases PKA ou PKC qui pourraient réguler leur fonction (Dautzenberg et al., 2001; Hauger et al., 2003). Cependant, l'utilisation de mutants pour ces sites de phosphorylation, des formes tronquées ou des inhibiteurs de PKA n'affecte pas l'endocytose des récepteurs (Rasmussen et al., 2004).

Distribution du système CRFergique dans la muqueuse intestinale

Les premières caractérisations du système CRFergique ont été réalisées dans le SNC pour son implication dans la réponse et l'adaptation au stress, mais également dans le

comportement alimentaire (Bakshi et al., 2007; Zorrilla et al., 2003) ou les troubles psychiatriques (Clark and Kaiyala, 2003; Owens and Nemeroff, 1993). Par la suite, les récepteurs au CRF et leurs ligands ont été identifiés dans les tissus périphériques tels que le tractus gastro-intestinal (Buckinx et al., 2011), la peau, les systèmes cardio-vasculaire, immunitaire ou reproductif (Boorse and Denver, 2006). De plus en plus d'études s'intéressent à l'expression et la localisation du système CRFergique au niveau du tube digestif, mais les résultats qui en émergent sont contradictoires, hétérogènes ou incomplets. Ceci peut s'expliquer par les nombreuses isoformes de ces récepteurs, les différentes espèces étudiées ou les anticorps utilisés, comme cela a été mentionné précédemment (Lakshmanan et al., 2008). Une disparité dans la représentation des différentes populations cellulaires au niveau des différentes sections du tube digestif peut également participer à l'expression de récepteurs de différentes tailles (Chang et al., 2007). En accord avec l'intérêt du laboratoire porté sur la régulation de la barrière épithéliale au niveau de l'intestin grêle et du côlon, la description de l'expression du système CRFergique sera focalisée sur les cellules épithéliales, les cellules de la lamina propria et le SNE.

Expression du système CRFergique dans l'intestin grêle

Dans l'intestin grêle au niveau de l'iléon, l'expression et la distribution des récepteurs au CRF et de leurs ligands a été peu étudié chez l'homme et le rongeur en comparaison avec le côlon. Une étude chez la souris a mis en évidence l'expression des ARNm du CRF1 et à un plus faible niveau, celle du CRF2 dans les cellules de la lamina propria et les cellules épithéliales (Wik et al., 2002). Les messagers du CRF2 ont également été trouvés dans la muqueuse à la base des villosités dans le duodénum (Perrin et al., 1995). Les deux récepteurs ont été principalement détectés dans le SNE au niveau des plexus nerveux myentériques et sous muqueux chez le cochon d'Inde et le rat (Chang et al., 2007; Liu et al., 2006; Porcher et al., 2005). Les deux ont été observés au niveau des couches musculaires lisses chez le rat, avec un profil d'expression différent selon que la région soit duodénale ou iléale (Chatzaki et al., 2004). Le CRF2 est présent dans les cellules 5-HT positives de l'épithélium au niveau des villosités (Porcher et al., 2005) (Figure 37). De manière intéressante, l'expression du CRF1 est complémentaire de celle de ses ligands, suggérant que les neurones du SNE sont des cibles potentielles du système CRFergique (Bisschops et al., 2006).

Intestin grêle						
	CRF1	CRF2	CRF	Ucn1	Ucn2	Ucn3
Epithelium	s	h/s/r	s/r	r	h/s/r	h
Enterocyte						
Goblet						
Endocrine		r	r			
Paneth			r			
Lamina propria	s	h/r	r/s		r	
Macrophage	h	h/s/r				
Mastocyte		h/r				
SNE	c/r	c/r	c/r	r	r	
Vasculaire					r	
Muscles lisses	r	r				

Figure 37: Distribution du système CRFergique dans l'intestin grêle.

SNE: Système nerveux entérique, c: cochon d'inde, h: homme, s: souris, r: rat (D'après Ducarouge, B. et Jacquier-Sarlin, M., 2012).

Le CRF est détectée en immuno-histochimie au niveau des plexus nerveux myentériques et sous-muqueux dans le duodénum et l'iléon du cochon d'Inde et du rat (la Fleur et al., 2005). Les ARNm du CRF sont également présents à un niveau plus faible dans les cellules de la lamina propria, les cellules de Paneth et les cellules entéro-endocrines situées dans les cryptes de l'iléon de rat où ils sont absents des entérocytes (la Fleur et al., 2005; Sand et al., 2011). Une étude décrit l'expression des ARNm et de la protéine du CRF au niveau de la lamina propria et faiblement dans les cellules épithéliales de l'iléon chez la souris (Wlk et al., 2002). L'Ucn1 est exprimée au niveau des différents plexus du SNE en ARNm et en protéine (Harada et al., 1999; Kozicz and Arimura, 2002). L'ARNm de l'Ucn2 a été décrit dans l'intestin grêle chez le rat puis plus tard chez la souris (Chang et al., 2007; Chen et al., 2004). Chez le rat, l'Ucn2 a été détectée dans l'épithélium, la lamina propria et les plexus du SNE. Chez l'Homme, l'Ucn2 n'a pas été mise en évidence alors que l'Ucn3 est exprimée dans la muscularis mucosae (Hsu and Hsueh, 2001) (Figure 37).

Expression du système CRFergique dans le côlon

Les deux récepteurs au CRF ont été décrits au niveau de l'ARNm et de la protéine dans le côlon de rongeur et également chez l'Homme. Certaines études montrent que le CRF1 est absent des cellules épithéliales du côlon chez l'Homme: au niveau de l'ARNm dans les cellules épithéliales purifiées ou au niveau de son immunolocalisation dans des coupes de tissus) (Muramatsu et al., 2000; Wallon et al., 2008). En revanche, l'expression du CRF1 est retrouvée au niveau de côlons de volontaires sains, par l'expression des ARNm et par immunomarquage dans la lamina propria (macrophages et mastocytes) et dans le SNE (Yuan et al., 2007). Les macrophages et mastocytes de l'iléon et du côlon expriment également le CRF2 chez l'Homme (Muramatsu et al., 2000; Saruta et al., 2005) et le rat (Chang et al., 2007). La lignée cellulaire HMC-1 dérivée d'une leucémie adopte un phénotype de type mastocytaire et expriment les ARNm du CRF1 et du CRF2a. Elles peuvent constituer un modèle d'étude *in vitro* de l'implication du système CRFergique dans les interaction entre les mastocytes et l'épithélium intestinal (Cao et al., 2005; Wallon et al., 2008). Chez le rongeur, l'expression du CRF1 concerne principalement le SNE avec une distribution différente dans le côlon selon l'espèce considérée. Chez le cochon d'Inde, le marquage immuno-histologique du CRF1 observé est plus important dans les plexus sous-muqueux, alors qu'il est plus intense dans les plexus myentériques chez le Rat (Chatzaki et al., 2004; Kimura et al., 2007; Yuan et al., 2007). Une expression non neuronale du CRF1 a été décrite dans les cellules de la lamina

	Intestin grêle						côlon					
	CRF1	CRF2	CRF	Ucn1	Ucn2	Ucn3	CRF1	CRF2	CRF	Ucn1	Ucn2	Ucn3
Epithelium	s	h/s/r	m/r	r	h/s/r	h	s/o/r	h/r	h/r	h	h/s/r	h
Enterocyte								h				
Goblet							h/o/r					
Endocrine		r	r						h/r			h
Paneth			r									
Lamina propria	s	h/r	r/s		r		h/o/r	h/o/r		r	r	h
Macrophage	h	h/s/r					h	h/r	h	h		
Mastocyte		h/r					h	h/r	h			
SNE	c/r	c/r	c/r	r	r		c/h/o/r	c/h/o/r	c/r	h/r	r	h
Vasculaire					r			h/r		h	s/r	h
Muscles lisses	r	r					o	o			r	h

Figure 38: Distribution du système CRFergique dans le côlon.

SNE: Système nerveux entérique, c: cochon d'inde, h: homme, s: souris, o: ovins, r: rat (D'après Ducarouge, B. et Jacquier-Sarlin, M., 2012).

propria et dans les cellules épithéliales situées à la base des cryptes du côlon de rat qui sont constituées des cellules souches et leurs progéniteurs (Chatzaki et al., 2004). D'autres expériences montrent une expression du CRF1 dans la totalité des cryptes au niveau du côlon proximal de rat, qui disparaît en région distale (O'Malley et al., 2010a; o'malley et al., 2010b; Wlk et al., 2002). Chez la souris l'ARNm codant pour le CRF1 a également été décrit dans les cellules épithéliales. Chez les ovins, le CRF1 est exprimé au niveau de la membrane baso-latérale des cellules épithéliales du côlon durant la maturation du fœtus, mais aucune donnée indique si elle persiste chez les jeunes ou l'adulte (Lakshmanan et al., 2008) (Figure 38).

La présence du CRF2 dans les cellules épithéliales intestinales du côlon à l'état basal est controversée autant pour son expression que pour sa localisation. L'expression des ARNm et de la protéine du CRF2a a été identifiée dans les cellules épithéliales chez l'Homme et le rat et dans les lignées cellulaires HT-29 (cellules tumorales) et NCM460 (cellules non transformées) (Kokkotou et al., 2006; Moss et al., 2007; Muramatsu et al., 2000; o'malley et al., 2010b; Saruta et al., 2005). Cependant, d'autres études montrent que le CRF2 est absent des cellules épithéliales chez l'Homme, le rat et le fœtus d'ovins (Chang et al., 2007; Lakshmanan et al., 2008; O'Malley et al., 2010a; Wallon et al., 2008). La distribution sub-cellulaire du CRF2 dans les cellules épithéliales diffère selon les études et les espèces étudiées. Alors que le CRF2 est situé dans la membrane apicale des entérocytes où il fait face à la lumière digestive chez le rat, il est exprimé au niveau de la membrane baso-latérale chez l'Homme (Chatzaki et al., 2004; Moss et al., 2007). La détermination de la localisation réelle de ce récepteur dans la membrane plasmique des entérocytes est extrêmement importante pour comprendre son rôle dans la modulation de la barrière épithéliale. En effet, une localisation basolatérale signifie que le CRF2 est exposé à des activations autocrines et paracrines, alors qu'une localisation apicale ne l'expose qu'à des facteurs autocrines ou à des ligands circulant dans la lumière intestinale. Les cellules entérochromaffines insérées dans l'épithélium n'expriment pas de CRF2 mais du CRF1 chez l'Homme et les ovins (Lakshmanan et al., 2008; Saruta et al., 2005). En revanche, les deux récepteurs sont exprimés dans la lignée cellulaire BON dérivée d'une tumeur endocrine de carcinome pancréatique dont le phénotype se rapproche de celui des cellules entérochromaffines (von Mentzer et al., 2007) (Figure 38).

L'expression quasi ubiquitaire des récepteurs au CRF dans ces différentes populations cellulaires renforce l'implication du système CRFergique dans l'immuno-modulation de la muqueuse du côlon. L'arborescence micro-vasculaire intestinale est impliquée dans la

diffusion des cytokines pro-inflammatoires et la régulation des cellules immunitaires. Une forte expression du CRF2 est retrouvée dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires du côlon humain (Bale et al., 2002; Saruta et al., 2005). Des profils d'expression identiques ont été observés chez le rat, avec une absence d'expression du CRF1 dans les vaisseaux sanguins (Chatzaki et al., 2004) (Figure 38).

A ce jour, le CRF, l'Ucn1, l'Ucn3 mais non l'Ucn2 ont été détectés dans le côlon chez l'Homme. Alors que le CRF est retrouvé dans la muqueuse au niveau des monocytes de la lamina propria et des cellules épithéliales (principalement dans les cellules entérochromaffines) (Kawahito et al., 1994; Kawahito et al., 1995), l'Ucn1 est présente dans les macrophages de la lamina propria et faiblement, dans les cellules entérochromaffines (Bhatia and Tandon, 2005; Muramatsu et al., 2000; Saruta et al., 2004). L'expression de l'Ucn3 est plus hétérogène: son ARNm et sa protéine sont retrouvés dans les muscles lisses, l'endothélium, les cellules entérochromaffines et le SNE (notamment dans les cellules gliales entériques) (Hsu, 2004; Saruta et al., 2005). Chez le rongeur, il n'existe à ce jour aucune donnée concernant l'expression de l'Ucn3 dans le côlon. L'expression du CRF est principalement neuronale avec une immuno-localisation dans les plexus myentériques et sous-muqueux, mais également au niveau de leurs fibres de projection situées dans la sous-muqueuse et dans les couches musculaires lisses (Barreau et al., 2007; Sand et al., 2011; Yuan et al., 2007). Une expression non-neuronale du CRF chez le rat est parfois retrouvée au niveau des cellules entérochromaffines (Sand et al., 2011). Chez le rat, l'Ucn1 est exprimée à un niveau plus élevé que le CRF dans les fibres nerveuses des plexus entériques et colocalise avec le marquage immunologique du CRF1 (Harada et al., 1999; Kimura et al., 2007). Il est en revanche peu exprimé dans les cellules de la muqueuse (Kozicz and Arimura, 2002). L'Ucn2 est présente dans la muqueuse et la sous-muqueuse du côlon de rat, au niveau des cellules épithéliales, des cellules immunitaires de la lamina propria et des neurones du SNE (Chang et al., 2007; Chen et al., 2004; Hsu, 2004) (Figure 38).

L'ensemble de ces études indique que l'intestin est une cible potentielle du stress. En effet, la plupart des ligands du système CRFergique sont exprimés à proximité de leurs récepteurs, ce qui indique l'existence de boucles locales d'activations autocrines et paracrines. Par conséquent, suivant la nature des régulations du système CRFergique, certaines de ces boucles peuvent être sollicitées plutôt que d'autres. Par exemple, l'activation de l'axe HPA et les modulations de l'activité du SNA suite au stress peuvent conduire à une régulation de la

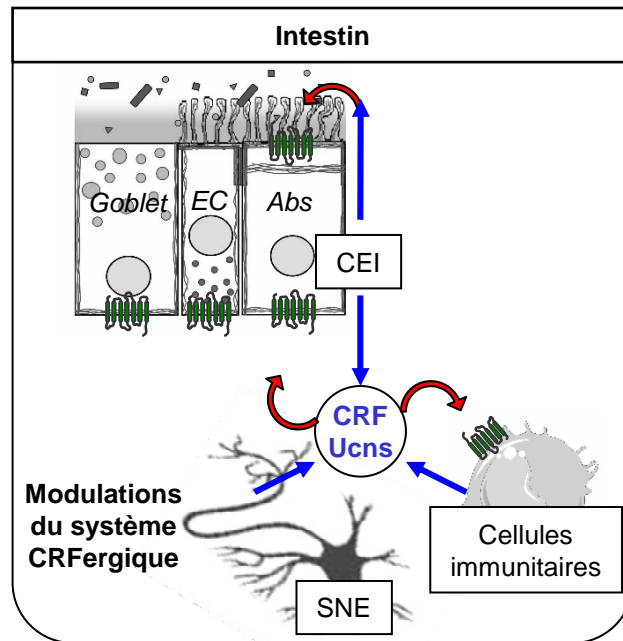


Figure 39: Le système CRFergique intestinal.

Les récepteurs au CRF et leurs ligands peuvent être exprimés par les cellules épithéliales intestinales (CEI) comprenant Goblet, Entérochromaffines (EC) et cellules absorbantes (Abs), et ou par le SNE et les cellules immunitaires. La régulation du système CRFergique permet de solliciter diverses voies de régulation pouvant conduire à des altérations de la barrière épithéliale. Par ailleurs, aucune étude ne s'est intéressée à la localisation précise des récepteurs au CRF dans la membrane apicale et/ou baso-latérale des CEI, alors qu'elle conditionnent les boucles d'activation du système CRFergique. (D'après Ducarouge, B. et Jacquier-Sarlin, M., 2012).

sécrétion de CRF et d'Ucn2 au niveau du SNE ou des cellules immunitaires et de leurs récepteurs au niveau des cellules épithéliales intestinales ou immunitaires. La proximité entre ces différents acteurs dans la muqueuse (Neunlist et al., 2003) pourrait conduire à l'activation du système CRFergique périphérique et altérer l'homéostasie de la muqueuse. Dans ce sens, l'équipe de Wallon a montré que l'activation des récepteurs muscariniques (par l'ACh) au niveau des éosinophiles de la muqueuse libèrent du CRF qui, à son tour, active les mastocytes et conduit à l'altération de la barrière épithéliale dans le côlon de patients atteints de RCH et dans le modèle épithélial intestinal de cellules T84 (Wallon et al., 2011). Les cellules épithéliales produisent également leurs propres ligands qui pourrait réguler la physiologie de l'épithélium par une voie autocrine ou paracrine via les cellules immunitaires (Figure 39).

Régulation du système CRFergique par le stress et l'inflammation

Plusieurs études suggèrent que les stress interoceptifs et extéroceptifs conduisent à une modulation de l'expression des molécules du système CRFergique au niveau du tractus digestif de la même manière que dans le cerveau.

Régulation par le stress

La perception par le cerveau d'une condition stressante est partiellement communiquée dans les tissus périphériques par l'activation de l'axe HPA qui libère des GC dans le sang. Les promoteurs des gènes de la famille du CRF contiennent des éléments de réponse aux GC (GRE) qui modulent leur transcription (Chen et al., 2005a; Chen et al., 2003; Jamieson et al., 2006; Nanda et al., 2004; van der Laan et al., 2008). Cette régulation du système CRFergique par les GC varie suivant les types cellulaires et leur localisation. Par exemple, le CRF et l'Ucn2 sont régulés différemment par les GC libérés en conditions de stress selon les différentes régions du cerveau (Chen et al., 2003). Le système CRFergique est également régulé de manière différentielle au cours du stress (en particulier selon la nature du stress) et de l'inflammation (Figure 40). En comparaison, les stress aigus et chroniques peuvent modifier la réponse au GC qui dépend des récepteurs aux GC (GR) plutôt que des récepteurs aux minéralo-corticoïdes (MR) suivant les types cellulaires (Adzic et al., 2009). Ainsi, l'expression du CRF2b est diminuée dans les cellules A7r5 issues de muscle lisse aortique de rat, dans les cellules C2C12 de muscle squelettique ou dans les cellules HEK293 transfectées avec le promoteur du CRF2a couplé à la luciférase. La dexaméthasone (agoniste GR et MR)

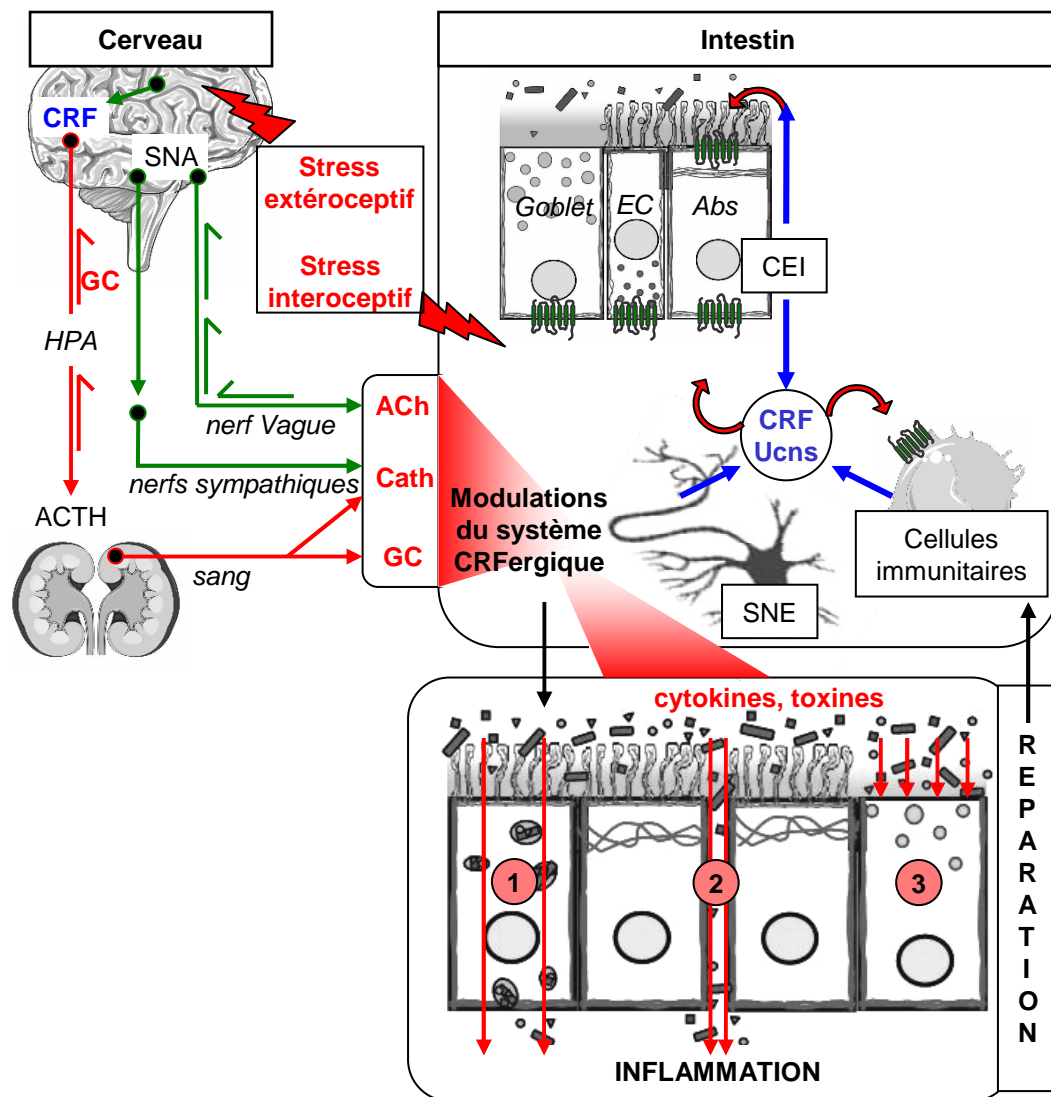


Figure 40: Rôle du système CRFergique dans la régulation de l'épithélium.

La sécrétion d'ACh, de Cath et de GC suite au stress, module l'expression intestinale du système CRFergique au niveau des cellules épithéliales intestinales (CEI), des cellules immunitaires et des neurones du SNE. Le système CRFergique peut agir de manière paracrine / autocrine. Cette signalisation pourrait conduire à l'inflammation par l'ouverture de la barrière intestinale via le contrôle de: **1/** la perméabilité trans-cellulaire, **2/** la perméabilité para-cellulaire et **3/** la réduction de la sécrétion de mucus. L'inflammation pourrait à son tour affecter l'expression des constituants du système CRFergique par la production de cytokines et des toxines. Les stress aiguë et chronique pourraient également induire des dysfonctionnements de la barrière épithéliale pouvant contribuer à l'inflammation. La réparation de la barrière épithéliale permet de revenir dans des conditions basales ou dans un système allostatique dans lequel le système CRFergique serait hyperactif (D'après Ducarouge, B. et Jacquier-Sarlin, M., 2012).

induit une diminution de l'expression du CRF1 et du CRF2b opposée à une augmentation de l'expression du CRF2a dans les lignées MIN6 d'insulinome ou les cellules issues d'îlots pancréatiques de rat (Huising et al., 2011). En conséquence, certains circuits CRFergiques pourraient être coupés dans certains types cellulaires et activées dans d'autres. O'Malley et collaborateurs se sont intéressés à la régulation des récepteurs au CRF suivant la nature du stress (stress aigus versus chroniques ou selon une combinaison des deux), qui semble différente entre les sections proximales et distales du côlon de rat (O'Malley et al., 2010a). Les stress étudiés dans le cadre de ces expériences sont très exhaustifs en terme de modèles utilisés. Cependant, il n'y a aucune information sur la cinétique post-stress de régulation du système CRFergique, dont les variations au cours du temps jouent un rôle important, notamment durant l'inflammation. Par conséquent, si certains composants du système CRFergique sont inchangés durant les phases précoces qui suivent le stress, rien n'exclut qu'elles apparaissent plus tard. Lakshmanan et collaborateurs proposent que l'augmentation des GC et/ou le stress gestationnel puissent contribuer à la diminution de l'expression du CRF2 et à l'augmentation du CRF1 observées à l'approche du terme des fœtus d'ovins (Lakshmanan et al., 2008).

Les peptides du CRF sont également régulés par les GC. Les corticothérapies réversent les augmentations du taux d'expression de l'Ucn1 induits par l'inflammation dans la muqueuse de patients atteints de RCH (Saruta et al., 2004). Au contraire, l'expression du CRF dans le côlon de rat ne semble pas affectée par la corticostérone et par conséquent, ne serait pas modulée par l'activité de l'axe HPA (Yuan et al., 2010a). L'altération de la physiologie digestive ou l'adoption de mauvaises stratégies de gestion du stress conduisent à une réponse inappropriée au stress comme cela peut être observé dans le modèle animal de séparation maternelle ou chez les patients atteints de MICI et de SII (Coutinho et al., 2002; Ren et al., 2007; Soderholm et al., 2002). Certains patients atteints de MICI ne répondent pas à la corticothérapie et parfois, ce traitement peut conduire à une aggravation des symptômes. Une mauvaise régulation du système CRFergique par les GC pourrait expliquer ces phénomènes. Les gènes du CRF et des Ucns contiennent également des éléments de réponse à l'AMPc (CRE) et des motifs GATA dont la fonction est activatrice (Dorin et al., 1993; Schoenherr et al., 1996; Seth and Majzoub, 2001). Les variations d'expression des facteurs de transcription reconnaissant ces éléments de réponse dans les différents types cellulaires intestinaux pourraient réguler différemment l'expression des peptides du CRF dans ces cellules (Zhao et al., 1998). De plus, chez l'Homme et le rongeur, la réponse au stress associée à l'activation de l'axe HPA présente

	Intestin grêle						côlon					
	CRF1	CRF2	CRF	Ucn1	Ucn2	Ucn3	CRF1	CRF2	CRF	Ucn1	Ucn2	Ucn3
Epithelium	S	h/s/r	s/r	r	h/s/r	h	s/o/r	h/r	h/r	h	h/s/r	h
Enterocyte								h				
Goblet							h/o/r					
Endocrine		r	r						h/r			h
Paneth			r									
Lamina propria	s	h/r	r/		r		h/o/r	h/o/r		r	r	h
Macrophage	h	h/s/r					h	h/r	h	h		
Mastocyte		h/r					h	h/r	h			
SNE	c/r	c/r	c/r	r	r		c/h/o/r	c/h/o/r	c/r	h/r	r	h
Vasculaire					r			h/r		h	s/r	h
Muscles lisses	r	r					o	o			r	h
Inflammation								h/r	h	r	h/r	
MC / TNBS							h	h	h	h	h	
RCH / DSS							h	h	h	h	h	
Autre	s	h/s	s/r		s/r		s	h/s	s/r	h	h/s	

Figure 41: Régulation du système CRFergique par le stress et l'inflammation.

SNE: Système nerveux entérique, MC: Maladie de Crohn, RCH: Rectocolite hémorragique, c: cochon d'inde, h: homme, s: souris, o: ovins, r: rat (D'après Ducarouge, B. et Jacquier-Sarlin, M., 2012).

des différences selon le sexe. Les hormones sexuelles telles que les oestrogènes et leurs récepteurs se lient au promoteur du CRF et augmentent son activité transcriptionnelle (Chen et al., 2008a).

Les épisodes de stress participent au déclenchement des poussées inflammatoires chez les patients atteints de MICI et dans les modèles animaux de colite (Collins, 2001; Melgar et al., 2008; Qiu et al., 1999). Ils conduisent également à une aggravation de ces poussées chez les patients atteints de MICI (Mawdsley and Rampton, 2006). De manière dépendante ou non du stress, les modifications locales du ratio ligand/récepteurs contrôlent l'activité du système CRFergique. Elles participent ainsi à l'activité inflammatoire de la muqueuse, mais les mécanismes impliqués dans ce processus sont encore mal connus. Par ailleurs, des différences inter-individuelles de l'expression des composants du système CRFergique peuvent également expliquer certaines susceptibilités au stress. Dans ce sens, les deux souches de rat Sprague Dawley et Wistar Kyoto qui présentent une sensibilité différente à l'anxiété montrent également des profils d'expression différents du système CRFergique, en conditions basales et en réponse au stress (o'malley et al., 2010b).

Régulation par l'inflammation

L'expression des molécules de signalisation du système CRFergique est augmentée chez les patients atteints de MICI et dans les modèles d'inflammation digestive chez l'animal (Figure 41). L'expression de l'Ucn2 et du CRF2 a été identifiée au niveau des cellules épithéliales des patients RCH souffrant de colite active et dans les biopsies de MC (Moss et al., 2007). Dans les biopsies de RCH, le CRF est détecté dans les monocytes et l'Ucn1 dans les cellules immunitaires de la lamina propria avec le CRF1 et le CRF2 (mais pas dans les macrophages) (Kawahito et al., 1994; Saruta et al., 2004). Leur expression est également corrélée à l'intensité inflammatoire chez les patients atteints de RCH (Saruta et al., 2004). Dans cette étude, l'Ucn1 a également été identifiée dans les cellules de l'épithélium comme les cellules entérochromaffines. De manière intéressante, l'Ucn1 est absent dans les fœtus ou chez les nouveau-nés. Il apparaît ensuite dans les cellules inflammatoires de la lamina propria chez le jeune enfant et augmente chez les adultes. L'apport alimentaire et l'exposition aux agents bactériens après la naissance pourraient contribuer à la régulation de l'expression de l'Ucn1 dans la muqueuse (Muramatsu et al., 2000).

Dans le modèle de colite induite au TNBS chez le rat, l'expression du CRF2 est diminuée dans les neurones myentériques et les macrophages durant de la phase précoce de l'inflammation (jours 1-3). A l'inverse, l'ARNm de l'Ucn2 est augmenté dans les stades précoce et tardif de l'inflammation (12-15 jours) (Chang et al., 2007). Chez l'Homme, la colite est associée à une surexpression du CRF2 (Moss et al., 2007). La flore intestinale est impliquée dans le développement de la colite (Elson et al., 1995) et son implication a été suggérée dans la régulation du système CRFergique au niveau de la muqueuse. Cette hypothèse a été testée par injection de LPS chez les rats. L'ARNm et la protéine du CRF sont augmentés dans les cellules inflammatoires, les cellules mésenchymateuses et les plexus myentériques (van Tol et al., 1996; Yuan et al., 2010a). Les TLRs, qui sont les cibles du LPS, ont un effet colitogène en participant à la translocation bactérienne au niveau de la lamina propria par une voie trans-cellulaire. Le TLR4 est fortement exprimé dans le côlon et pourrait alors relayer l'augmentation de l'expression du CRF et de l'Ucn1 en participant au développement de l'inflammation (Biswas et al., 2011). L'expression du TLR4 est également augmentée dans les macrophages et les cellules épithéliales intestinales de patients atteints de MC et pourrait favoriser la sensibilité bactérienne retrouvée dans cette pathologie (Cario and Podolsky, 2000). L'inflammation induite par *Clostridium difficile* toxine A au niveau de l'iléon chez la souris conduit, à un stade précoce (1h), à l'augmentation de l'expression du CRF dans les cellules sous-épithéliales et des récepteurs au CRF dans les cellules de la lamina propria et les cellules épithéliales (Wlk et al., 2002). Le "blocage" du CRF1 par l'Antalarmin (antagoniste sélectif) conduit à une diminution de l'inflammation, suggérant un rôle pro-inflammatoire du CRF. Dans le même modèle, l'Ucn2, l'Ucn3 (mais pas l'Ucn1) et le CRF2 sont augmentés après un traitement de quatre heures chez la souris (Kokkotou et al., 2006), chez le rat (la Fleur et al., 2005) ou chez l'Homme, mais également *in vitro* par le traitement des cellules HT-29 et *in vivo* dans des xéno greffes coliques (Moss et al., 2007). En outre, les récepteurs au CRF sont sensibles aux cytokines inflammatoires et aux toxines, mais leur régulation par endocytose et leur dégradation après fixation du ligand peuvent altérer l'interprétation des niveaux d'expression observés. Cette hypothèse est étayée par l'observation que la *Clostridium difficile* toxine A induit une augmentation du CRF1 dans l'iléon quand l'expression du CRF est diminué par shRNA (et non dans les conditions sh-contrôle ou sh-Ucn2) (la Fleur et al., 2005). Les bactéries commensales sont bénéfiques et/ou pathogènes selon la souche, l'environnement et leur localisation. Les patients atteints de MICI, qui subissent des colites de manière chroniques, présentent une composition de la flore gastro-intestinale modifiée (Backhed et al., 2005). Celle-ci pourrait affecter l'expression basale de

composés du système CRF selon les sections intestinales et par conséquent augmenter la susceptibilité de déclencher une colite.

Alternativement, l'inflammation de la muqueuse peut être considérée sur le plan des cellules immunitaires où une activation inappropriée conduit à une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et participe au déclenchement des poussées inflammatoires dans les MICI. Le système CRFergique pourrait être régulé par des cytokines inflammatoires comme l'IL1, l'IL6 ou le TNF α qui sont exprimés de façon différentielle selon les stades de la colite et les différentes MICI (Yuan et al., 2010a). Cela a été étudié à différentes phases de colite induite par le TNBS chez le rat (Chang et al., 2011; Chang et al., 2007). Au jour 1, durant l'étape précoce de l'inflammation, l'augmentation d'expression de l'Ucn2 dans les macrophages de la muqueuse correspond au pic de production de la myéloperoxydase (marqueur de l'inflammation) alors que l'Ucn1 et le CRF2 sont régulés à la baisse. Au jour 6, durant l'étape tardive de l'inflammation, l'Ucn1 et l'Ucn2 sont à leur niveau maximal au moment du pic de production de TNF α . L'oscillation des niveaux d'expression du système CRFergique peut représenter l'influence de multiples facteurs tels que la production des différentes cytokines. Le profil cytokinique retrouvé durant les poussées inflammatoires est différent chez les patients atteints de RCH par rapport aux patients atteints de MC (Fina and Pallone, 2008) et dans les modèles expérimentaux correspondants (Shi et al., 2011). Ces divergences pourraient expliquer certaines différences dans les populations immunitaires activées et les profils de régulation du système CRFergique. La flore intestinale et l'expression des cytokines agissent ainsi sur les niveaux d'expression des composants du système CRFergique de manière différente selon les types cellulaires et leur localisation (Figure 41).

Rôle du système CRFergique dans la régulation de l'épithélium

L'homéostasie et la fonction épithéliale dépendent des populations cellulaires réparties dans les différentes couches qui constituent le tractus gastro-intestinal. Ces cellules participent au contrôle de la sécrétion, de la motricité digestive, des fonctions immunitaires ainsi que de la perméabilité épithéliale (Larauche et al., 2009b). Elles forment un réseau complexe au niveau de la muqueuse dans lequel le SNE, les immunocytes et les cellules épithéliales établissent des circuits d'interactions qui sont mobilisés au cours du stress et de l'inflammation. Cet équilibre des représentations cellulaires peut également être affecté dans des conditions pathologiques. En effet, les mastocytes, les macrophages et les lymphocytes

sont plus largement représentés dans la lamina propria de côlon de patients atteints de MICI ou de SII (Piche et al., 2008).

Le stress module l'activité des systèmes neuro-endocriniens et immunitaires de l'intestin (Black, 2002; Lightman, 2008). L'altération de la sécrétion de facteurs neuro-endocrines comme les GC, le "vasoactive intestinal peptide" (VIP), la neurotensine, les catécholamines (Cath) ou les peptides du CRF par le stress peut perturber l'équilibre des cytokines intestinales et conduire à une altération de la barrière épithéliale (Gonzalez-Rey et al., 2007; Gross and Pothoulakis, 2007; Santos et al., 2008). L'impact du système CRFergique sur l'épithélium intestinal pourrait être envisagé à deux niveaux différents : d'une part en ciblant le système immunitaire qui interagit avec l'épithélium secondairement par la production de cytokines et d'autre part par la mobilisation des récepteurs au CRF exprimés par les cellules épithéliales (Absorbant, Goblet, Paneth ou entérochromaffine) (Figure 40). En raison d'une faible expression basale des récepteurs au CRF dans les cellules épithéliales intestinales, cette seconde voie a été moins étudiée. Cependant, en considérant que les ligands et les récepteurs aux CRF sont augmentés dans diverses conditions telles que le stress ou l'inflammation, l'aspect épithélial du CRF mérite plus d'investigations.

Régulation dans le cadre du stress

Chez le rongeur, les stress physiques aigus et chroniques augmentent la perméabilité para-cellulaire et trans-cellulaire du côlon. Des études utilisant différents antagonistes des récepteurs au CRF indiquent que la modulation de la perméabilité du côlon semble être dépendante du CRF1 (Barreau et al., 2007; Cameron and Perdue, 2005; Gareau et al., 2008; Santos et al., 1999; Saunders et al., 2002). Chez le rat, l'administration périphérique aiguë ou chronique de CRF mène également à une augmentation de la perméabilité du côlon en stimulant le transport para-cellulaire (Santos et al., 1999; Saunders et al., 2002; Teitelbaum et al., 2008). Ce processus qui semble dépendant du CRF1 et du CRF2 conduit au développement d'un terrain pro-inflammatoire (Larauche et al., 2009a). Le stress psychologique induit la libération de CRF par les éosinophiles, qui activent les mastocytes et entraînent un dysfonctionnement de la barrière épithéliale (Zheng et al., 2009). L'exposition au stress chronique (par répétition d'un stress aigu) par rapport à une exposition unique a des conséquences plus graves sur la fonction intestinale. L'utilisation d'un stress chronique (5-10 jours d'exposition répétée à des facteurs de stress aléatoires) reflète plus précisément les stress

quotidiens subis par les humains. En effet, l'exposition à un stress chronique d'évitement de l'eau occasionne des défauts de la barrière et des anomalies ultrastructurales de la muqueuse plus sévères et plus durables que par un stress aigu (Santos et al., 2001; Soderholm et al., 2002). Suite à un stress aigu, le CRF endogène est responsable d'une augmentation de la sécrétion de mucine, or le CRF1 semble exprimé dans les cellules de Goblet. En outre, le stress aigu provoqué par des stimuli acoustiques conduit à l'augmentation de la perméabilité du côlon, due à la dégranulation des mastocytes, la sur-production d'INF γ et la diminution de la sécrétion de mucine (Castagliuolo et al., 1996; Lakshmanan et al., 2008; Santos et al., 1999; Santos et al., 2008). Dans ces expériences, la barrière épithéliale colique est morphologiquement altérée, l'expression des ARNm codants pour les protéines des jonctions serrées est réduite et la différenciation des colonocytes est modifiée (Demaude et al., 2006). Ces changements transitoires de phénotype des colonocytes sont également observés suite à l'activation des mastocytes et la libération INF γ (Ferrier et al., 2003).

Des stress précoces de la vie entraînent à long terme un impact sur la physiologie épithéliale en modifiant sa composition en terme de répartition des différents types de cellules et de leurs interactions. Chez les patients atteints de SII ou de MICI, des situations d'abus sexuels, d'agressions ou des changements de la structure familiale sont très souvent retrouvés (Heitkemper et al., 2011; Walker et al., 1995). La séparation maternelle (MD) chez des rats induit des altérations de la différenciation des cellules épithéliales intestinales dans le duodénum, ce qui entraîne un appauvrissement des cellules de Paneth et de Goblet dépendant de l'activité du CRF2, mais également à une hyperplasie des cellules endocrines dépendant du CRF1. Ces pertes cellulaires dans ces lignées sécrétoires pourraient contribuer à des défauts de la barrière épithéliale liés au stress, par la diminution de la sécrétion de mucus et l'exposition ultérieure à la flore intestinale et/ou à la diminution de sécrétion de défencines et la prolifération bactérienne. De la même manière que pour la MD, l'administration chronique de CRF chez le rat conduit à une augmentation du nombre de cellules entérochromaffines, tandis que l'administration d'Ucn2 diminue le nombre de cellules de Paneth et de Goblet (Estienne et al., 2010). L'effet généré sur les cellules de Paneth et de Goblet ne dépasse pas la durée du renouvellement de la population cellulaire de l'épithélium contrairement aux cellules entéroendocrines. Ces éléments suggèrent que pour induire un effet à long terme, le CRF1 affecte nécessairement les cellules souches. Par ailleurs, dans le côlon de rat, les récepteurs au CRF sont tous les deux exprimés dans le tiers basal des cryptes et pourraient ainsi affecter la différenciation cellulaire (Chatzaki et al., 2004). Enfin, le stress modifie la prolifération, la

maturation et l'apoptose des cellules épithéliales dans l'iléon de rat. Chez l'adulte, le stress chronique réduit la longueur des cryptes due à une augmentation de l'apoptose, suivie par une augmentation de la prolifération des cellules pour remplacer les cellules endommagées (Boudry et al., 2007). Ainsi, une proportion réduite de cellules épithéliales pleinement différenciées peut être responsable d'une barrière intestinale plus perméable.

Différents mécanismes sont responsables des dysfonctions de la barrière épithéliale. Une combinaison de signaux locaux et extrinsèques peut être impliquée dans les effets du CRF sur la fonction épithéliale colique via les récepteurs au CRF localisés en périphérie. Les dysfonctionnements de la barrière liés au système CRFergique seront successivement abordés du point de vue du système nerveux, des cellules immunitaires et de l'épithélium. Le SNE contrôle la sécrétion de Cl^- par l'ACh et le 5-HT à travers le réflexe sécréto-moteur (Cooke, 1998). La souche de rats susceptibles au stress Wistar-Kyoto a une activité ACh transférase diminuée dans les homogénats de muqueuses par rapport à la souche parentale qui est moins susceptible au stress, ce qui suggère que l'ACh joue un rôle protecteur avant l'exposition au stress de contention (Saunders et al., 1997). Par ailleurs l'atropine, un antagoniste des récepteurs muscariniques, empêche à la fois l'augmentation de la libération de mucine (Castagliuolo et al., 1996) et la perméabilité trans-cellulaire (Kiliaan et al., 1998; Santos et al., 1999) induite par l'exposition à un stress de contention. Dans le cadre de ce stress aigu, l'augmentation de la sécrétion de mucines va à l'encontre de l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium. Elle pourrait constituer un mécanisme protecteur dans le cadre d'une réponse normale au stress. Cependant, elle est régulée négativement dans le cadre d'un stress chronique, reflétant une incapacité à maintenir les systèmes protecteurs sous l'effet de la charge allostatique. Il a été proposé que le dysfonctionnement de la barrière induite dans le modèle de séparation maternelle (maternal deprivation : MD) soit dépendant du CRF. L'activation du CRF2 au niveau du SNE conduit à la libération d'ACh qui, à son tour, active les cellules épithéliales intestinales pour augmenter la perméabilité de l'épithélium (Gareau et al., 2007). Le stress aigu active également les voies cholinergiques pour déclencher la sécrétion pancréatique exocrine d'enzymes. La Trypsine ainsi libérée dans la lumière digestive peut être responsable des altérations de la barrière colonique suite à l'activation de PAR2 (Demaude et al., 2009).

Les animaux dépourvus de mastocytes (y compris Ws/Ws rats) ne développent pas de troubles somatiques gastro-intestinaux après une exposition au stress (Santos et al., 2001;

Soderholm et al., 2002). Ainsi, diverses études ont montré que des altérations du tube digestif induites par le stress font intervenir l'activation des mastocytes et la dégranulation de médiateurs tels que les prostaglandines, des protéases, l'histamine et la 5-HT dans la lamina propria. Dans des explants de côlon distaux de rat, l'administration de CRF induit une augmentation dose-réponse de MCP de rat (RMCP-II), qui est responsable d'une diminution d'expression de l'Occludine et de ZO-1 dans les entérocytes, et de l'ouverture des jonctions serrées (Scudamore et al., 1998). Ces effets sont contrebalancés par le doxantrazole (un stabilisateur des mastocytes) et réduits chez les rats *Ws/Ws*. Cette régulation de la barrière semble être dépendante du CRF2 et des mastocytes, mais la présence de cellules voisines qui expriment également des récepteurs au CRF n'exclut pas d'autres mécanismes d'action (Santos et al., 2008). Des études *in vitro* ont montré que le stress aigu est capable d'induire des transports ioniques, des anomalies de la perméabilité para-cellulaire et trans-cellulaire chez le rat (Kiliaan et al., 1998; Saunders et al., 1994). Ces effets médiés par le CRF périphérique induisent une activation des mastocytes qui est également bloquée par le doxantrazole (Santos et al., 1999; Saunders et al., 2002). Les médiateurs des mastocytes peuvent affecter la perméabilité épithéliale soit directement (par exemple la tryptase en agissant sur l'activation des récepteurs PAR2) (Cenac et al., 2004; Jacob et al., 2005), soit en stimulant le système immunitaire local (Ferrier et al., 2003) ou par la réduction de la sécrétion de mucus (Pfeiffer et al., 2001). Les affections chroniques retrouvées chez les rats MD sont dépendantes du CRF qui est responsable d'une production du nerve growth factor (NGF) dans les mastocytes via le CRF1, avec une augmentation subséquente de la perméabilité para-cellulaire (Barreau et al., 2007; Barreau et al., 2004; Leon et al., 1994). Par conséquent, les mastocytes sont des effecteurs importants de la réponse intestinale au stress et à l'inflammation en induisant des anomalies de sécrétion ionique, une perméabilité accrue et une libération de mucines (Farhadi et al., 2007; Santos et al., 2008). L'expression des récepteurs au CRF et leur fonctionnalité ont été décrites dans les mastocytes de la muqueuse colique chez le rat et chez l'homme. Cependant, chez les humains, seuls les mastocytes résidents sont concernés (Santos et al., 2008; Wallon et al., 2008). Par ailleurs, la lignée de cellules épithéliales humaines NCM460, stimulée par l'Ucn2 produit des chimio-attractants pour les immunocytes comme l'IL8 qui a également été décrit pour contrôler la perméabilité intestinale (Moss et al., 2007; Tixier et al., 2005).

L'augmentation du flux de para-cellulaires de l'épithélium peut aussi être expliquée par l'activation de voies de signalisation directement au niveau des entérocytes. Les récepteurs au

CRF sont couplés à l'adénylcyclase qui produit de l'AMPc. Ce second messager a été décrit pour être responsable de la dissociation des contacts intercellulaires dans la lignée de cellules épithéliales IEC de rat (Boucher et al., 2005). En plus de leurs voies canoniques, les récepteurs au CRF sont capables d'activer la kinase Src en favorisant son auto-phosphorylation sur Y-418 (Yuan et al., 2010b). Ainsi, en modulant l'état de phosphorylation des protéines des jonctions intercellulaires, l'activation de Src pourrait conduire à l'ouverture de la barrière épithéliale (Gumbiner, 2000). Src a également été impliqué dans les mécanismes de flux trans-cellulaire. Son activation conduit à la formation de vésicules par des voies dépendantes de la caveoline, qui permettent le passage de petites molécules du pôle apical au pôle baso-latéral. Chez le rat, le stress de contention et les injections intra-veineuses ou intra-cérébro-ventriculaires de CRF conduisent à une augmentation de l'ARNm de la cyclooxygénase-2 (COX2) et de la sécrétion de prostaglandine E2 (PGE2) au niveau de la muqueuse du côlon (Castagliuolo et al., 1996; Pothoulakis et al., 1998). Or, l'activation de COX2 dépendante de RhoA perturbe la formation des jonctions adhérentes dans le modèle de cellules épithéliales du côlon HCA7 (Chang et al., 2006). La signalisation du PGE2 induit quant à elle la dissociation des jonctions serrées par un mécanisme qui implique la PKC et la Claudine1 dans la lignée de cellules Caco2 (Tanaka et al., 2008).

Ensemble, ces données suggèrent que l'activation périphérique des deux récepteurs au CRF induite par le stress contribue au dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale par le recrutement du SNE, des mastocytes et des cellules épithéliales elle mêmes. Par ailleurs, la chronologie et la durée des épisodes de stress sont des éléments clés pour déterminer l'étendue des atteintes somatiques observées, notamment chez les patients atteints de MICI.

Régulation dans le cadre de l'inflammation

Pour comprendre le rôle du système CRFergique dans la régulation de l'homéostasie intestinale, certaines approches ont été développées basées sur l'inhibition des ligands ou des récepteurs par leur extinction génétique ou pharmacologique. Ces travaux indiquent que les deux récepteurs au CRF jouent un rôle dans l'inflammation provoquée par le stress. Cependant, leurs fonctions semblent opposées selon l'hypothèse que le CRF1 peut agir comme un anti-inflammatoire en contrant l'effet de cytokines pro-inflammatoires, tandis que la signalisation CRF2 potentialise l'inflammation. L'établissement de souris KO fournit un

outil utile pour comprendre le rôle du système CRFergique dans l'inflammation. Cependant, certains résultats sont contradictoires selon le type d'inflammation et étant donné que les KO ne sont pas conditionnels, au niveau du SNC ils n'excluent pas des effets sur le comportement de l'animal. L'altération du système CRFergique central impliqué dans la modulation de l'anxiété, la dépression ou l'activation de l'axe HPA constitue un biais important dans le cadre d'un suivi de l'inflammation chez ces animaux. En effet, le KO du CRF2 est responsable d'une diminution de l'inflammation induite par *Clostridium difficile* toxine A (Kokkotou et al., 2006). En revanche, dans un modèle de colite induite par le DSS, les souris KO CRF1 ont une diminution de l'inflammation, tandis qu'elle augmente chez les souris KO CRF2. Cet effet est également obtenu en antagonisant les récepteurs dans les souches parentales de ces souris (Im et al., 2010). L'hypothèse selon laquelle les KO des récepteurs au CRF sont problématiques compte tenu de leurs effets centraux est renforcée par des données dans lesquelles des injections locales de shRNA ciblant les récepteurs au CRF diminuent les colites induites par le TNBS. Ceci suggère que les deux récepteurs participent aux processus inflammatoires (Chang et al., 2011). Par ailleurs, les patients atteints de MICI ont un niveau d'expression élevé d'Ucn2 et de CRF2 dans le côlon (Moss et al., 2007). Il en est de même dans la phase aiguë de l'inflammation d'un modèle de colite chez le rat où les niveaux d'Ucn2 sont augmentés dans les cellules immunitaires infiltrées dans la muqueuse, alors que les niveaux d'expression de CRF2 sont diminués dans les neurones myentériques. Ceci suggère une régulation négative compensatoire des récepteurs par leurs ligands (Chang et al., 2007). La régulation de l'expression du récepteur par ses ligands est un mécanisme homéostatique assez fréquemment observé dans les voies endocrines/paracrines. Le rôle pro-inflammatoire du CRF2 a également été démontré au niveau cellulaire. Dans les cellules NCM460, l'activation du CRF2 par l'Ucn2 induit l'accumulation nucléaire de NFκB et une libération ultérieure d'IL8 et de MCP-1 (Kokkotou et al., 2006; Moss et al., 2007). Dans ces cellules, l'Ucn2 induit aussi l'activation de MAPK qui participe aux processus de différenciation cellulaire, de survie et d'apoptose et peut ainsi modifier l'équilibre prolifération/différenciation/apoptose de l'axe cryptovillositaire.

Le rôle pro-inflammatoire des peptides du CRF a également été démontré par une approche de KO ou de sh-ARN. Dans le modèle expérimental d'inflammation induite par *Clostridium difficile* toxine A chez la souris, les animaux KO CRF développent une inflammation moins sévère (Anton et al., 2004). Chez le rat, l'extinction de l'ARNm du CRF mais pas celle de l'Ucn2 abroge à la fois la réponse inflammatoire et l'augmentation de

l'expression du CRF1 dans les tissus inflammés (la Fleur et al., 2005), suggérant un rôle important du CRF1 dans l'effet pro-inflammatoire du CRF chez le rat. Toutefois, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs au CRF réduit l'augmentation d'expression du TNF α et de l'IL1 β dans une iléite induite avec *Clostridium difficile* toxine A (Wlk et al., 2002). Dans une colite induite par le TNBS chez la souris, le KO du CRF est responsable d'une réduction de l'inflammation avec une diminution de l'augmentation de l'IL1 β local par rapport aux souris issues de la souche parentale (Gay et al., 2008). En faveur d'un rôle pro-inflammatoires local, il a été montré que le CRF peut moduler la sécrétion de cytokines et de neuropeptides, ainsi que la prolifération, le chimiotactisme et la dégranulation des macrophages ou des lymphocytes *in vitro*. En effet, le CRF et les Ucn augmentent la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL1 et IL6) dans les macrophages *in vitro* et *in vivo* chez la souris injectée avec du LPS. L'administration d'Antalarmine (antagoniste du CRF1) inhibe l'inflammation locale induite par le CRF, suggérant une implication du CRF1 (Webster et al., 2002).

Les effets pro-inflammatoires du CRF contrastent avec les propriétés anti-inflammatoires rapportées pour l'Ucn1 qui se lie avec une affinité plus élevée sur les mêmes récepteurs. Le traitement d'animaux endotoxémiques avec l'Ucn1 réduit la libération de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et augmente également les niveaux d'IL10 aux effets anti-inflammatoires (Gonzalez-Rey et al., 2006a). Des résultats comparables ont été obtenus dans la colite induite au TNBS avec l'induction d'un profil anti-inflammatoires de cytokines qui promeut la réponse des cellules Treg et réduit les Th1 après traitement avec l'Ucn1 (Gonzalez-Rey et al., 2006b). Les résultats opposés obtenus entre le CRF et l'Ucn1 peuvent être attribués à leurs différentes distributions dans la muqueuse intestinale. Quel que soit leur rôle, les études cliniques ont montré que la muqueuse colique de patients atteints de RCH a un nombre accru de cellules entérochromaffines qui expriment le CRF et de macrophages qui surexpriment l'Ucn1 et ce de manière corrélée avec l'intensité de la maladie (Gross and Pothoulakis, 2007; Muramatsu et al., 2000; Saruta et al., 2004). Dans les cardiomyocytes, l'Ucn1 induit une libération temps et dose-dépendante d'IL6 qui est associée à l'activation de ERK, de la p38 MAPK et NF κ B (Huang et al., 2009). Par ailleurs, certaines études montrent que la signalisation des récepteurs au CRF peut également exercer un effet anti-inflammatoire. Les médiateurs périphériques pro-inflammatoires tels que l'IL1 β , le TNF α et l'IL6 stimulent la sécrétion hypothalamique de CRF qui provoque l'activation de l'axe HPA et celle du système nerveux sympathique (Lightman, 2008; Stengel and Tache, 2009). Secondairement, la libération CRF induite par

des GC et les Cath exerce un effet immuno-suppresseur en favorisant la réponse anti-inflammatoire et inhibe le système immunitaire inné et adaptatif (Goetzl et al., 2008; Straub et al., 2006; Webster Marketon and Glaser, 2008). Par ailleurs, la stimulation des cellules dendritiques par le CRF diminue la libération d'IL18 qui est un médiateur pro-inflammatoire favorisant une immunité de type Th1 (Lee et al., 2009). Pendant la phase précoce de l'inflammation, le CRF, l'Ucn1 et l'Ucn2 peuvent transitoirement inhiber la libération de TNF α induite par le LPS dans les macrophages, via l'induction d'une voie COX2/PGE2. Cependant, ils augmentent la transcription et la libération de TNF α dans les stades tardifs de l'inflammation (Tsatsanis et al., 2007). Ces auteurs ont également montré que l'activation du CRF2 par une faible dose de ligands augmente l'apoptose des macrophages et favorise ainsi une réponse anti-inflammatoire (Tsatsanis et al., 2005). La modulation différentielle des processus pro-inflammatoire et anti-inflammatoire par les peptides du CRF peut donc varier dans le temps et en fonction de la dose de ligands.

Durant l'inflammation de la muqueuse, certaines bactéries dont *Escherichia coli* activent les TLR4 exprimés par les cellules épithéliales. Cette activation conduit en retour à la libération d'INF γ et de NO responsables de l'exacerbation d'une iléite chez la souris par l'altération de la barrière intestinale (Heimesaat et al., 2007). Des études *in vitro* ont montré que, dans les macrophages murins, l'expression et la transcription de TLR4 pourraient être augmentées par la stimulation du CRF2 (Tsatsanis et al., 2006). Cependant, une carence dans la voie de signalisation des TLR4 entraîne une augmentation de l'inflammation intestinale dans les modèles animaux d'inflammation digestive (Rakoff-Nahoum et al., 2006) et elle est associée à la physio-pathologie des MICI chez l'homme (De Jager et al., 2006). En utilisant un modèle de colite induite par le DSS chez la souris, Chaniotou et collaborateurs ont montré que les souris KO CRF ont une plus faible expression de TLR4 avant l'apparition de l'inflammation. L'inflammation est également plus grave chez les animaux KO CRF (Chaniotou et al., 2010). Chez l'homme, il a été établi que l'activité sécrétrice des cellules de Paneth exerce un effet protecteur qui est altéré chez les patients MICI (Aldhous et al., 2009; Wehkamp and Stange, 2006). L'altération de l'expression des défensines pourrait avoir des effets délétères sur l'homéostasie intestinale et conduire au développement de l'inflammation par la prolifération bactérienne. Cependant, il n'est pas aisé de déterminer si cette carence en défensines est à l'origine de la pathogénie des MICI ou si elle en est une conséquence (Ramasundara et al., 2009). La possibilité que le stress peut affecter ce mécanisme de défense innée est appuyée par des données récentes montrant que le stress psychologique diminue la

libération de peptides anti-microbiens au niveau de la peau et que le stress de MD ou l'administration périphérique chronique d'Ucn2 diminue le nombre de cellules de Paneth (Estienne et al., 2010).

Implication du système CRFergique dans le cancer

Expression dans les cancers

Les récepteurs au CRF et leurs ligands sont exprimés dans de nombreux types de cancers (Kaprara et al., 2010b). Cependant, un screening large de l'expression des récepteurs au CRF par une autoradiographie de CRF marqué ne permet pas de les identifier dans différents tissus tumoraux comme les tumeurs exocrines du pancréas, les cancers de la prostate, les cancers du poumon à petites cellules ou les adénocarcinomes colorectaux (Reubi et al., 2003), alors qu'ils sont exprimés dans des conditions normales. Ceci suggère que la perte des récepteurs peut contribuer à la transformation maligne et/ou la progression tumorale ou en être une conséquence. Des conclusions similaires ont été établies dans le cancer de la prostate caractérisée par une perte de l'expression du CRF2 par rapport aux tissus sains (Tezval et al., 2009). Cependant, en comparant l'expression des récepteurs au CRF avec des tissus qui les expriment fortement comme les tumeurs endocrines, il est possible de considérer à tort que d'autres tissus ne les expriment pas alors qu'ils l'expriment peu (Reubi et al., 2003). Par exemple, l'étude de Reubi et collaborateurs a montré que le CRF2 n'est pas exprimé dans les CCR alors qu'il a déjà été détecté et qu'il est fonctionnel dans les cellules HT-29 (Kokkotou et al., 2006). La distribution distincte et l'activité du système CRFergique au sein de la tumeur ou entre les tissus normaux et les tumeurs renforcent l'hypothèse que le CRF1 et le CRF2 pourraient moduler différents aspects cellulaires dans les cancers. Une étude réalisée sur 51 patientes atteintes de cancer de l'endomètre non traité a montré que, dans 61% des tumeurs, le marquage du CRF2 est diffus dans le cytoplasme, alors qu'il est nucléaire dans les cellules normales des glandes endométriales (Miceli et al., 2009). La localisation cytoplasmique du CRF2 a été associée au stade plus avancé du cancer (Florio et al., 2006; Miceli et al., 2009).

Comme pour les récepteurs au CRF, l'expression du CRF et des Ucn2 a été largement étudiée dans le tractus gastro-intestinal, mais leur expression dans les CCR n'a pas fait l'objet de beaucoup d'intérêt. L'expression du CRF a d'abord été détectée dans différentes tumeurs par immuno-radiographie, dont un adénocarcinome du côlon sigmoïde (Wakabayashi et al.,

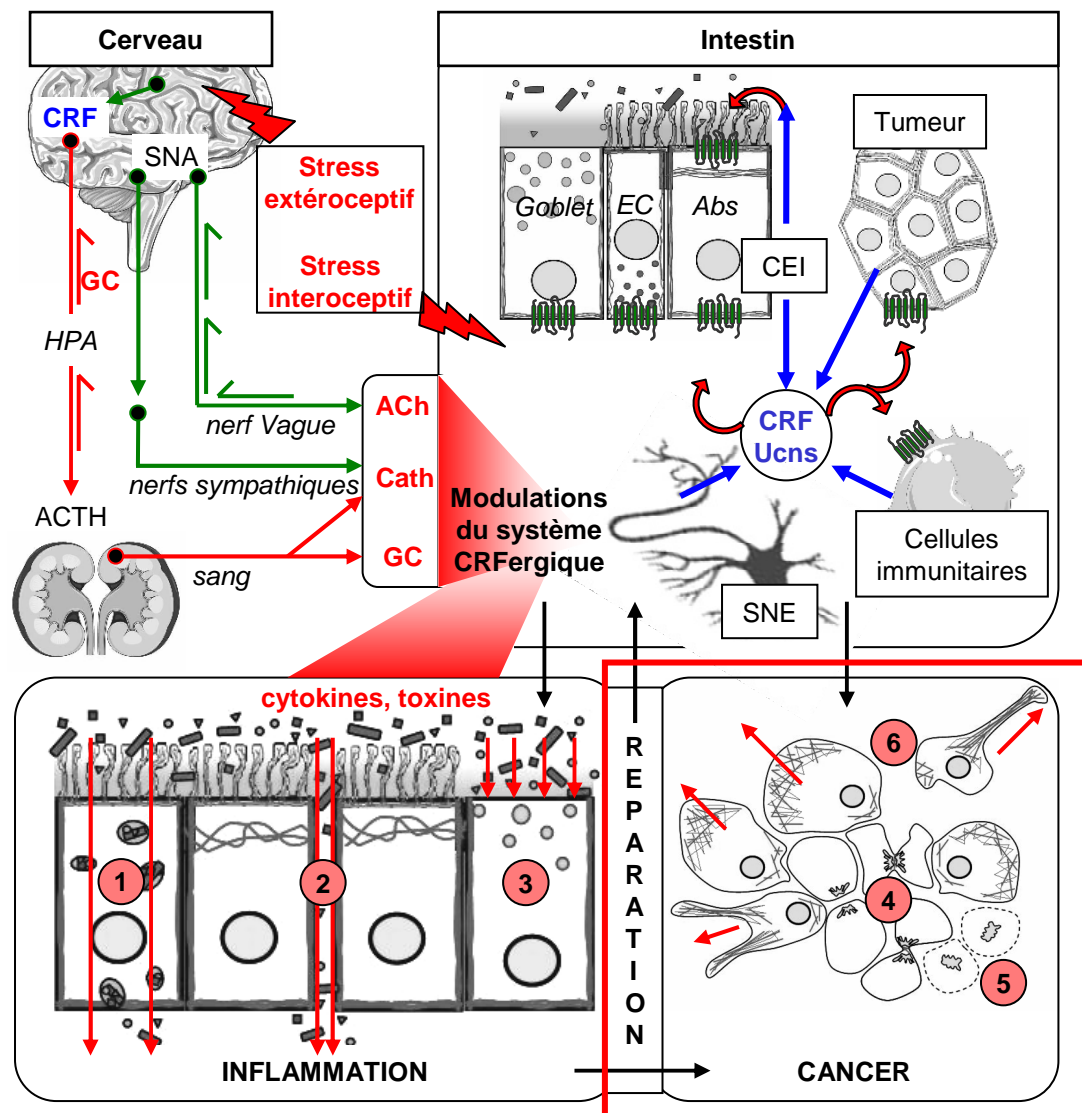


Figure 42: Implication du système CRFergique dans le cancer.

Suite à une inflammation chronique la régénération continue des tissus est un substrat pour le développement du cancer. Les cellules tumorales expriment certains composants du système CRF, qui pourrait participer à la progression du cancer en agissant sur les jonctions intercellulaires et l'organisation du cytosquelette. Ainsi la signalisation du système CRFergique peut avoir une incidence sur: **4/** la prolifération cellulaire, **5/** l'apoptose des cellules et **6/** la migration cellulaire et l'invasion (D'après Ducarouge, B. et Jacquier-Sarlin, M., 2012).

1985). Par ailleurs, une étude a indiqué que les peptides du CRF pourraient être sécrétés de manière inappropriée par de nombreuses tumeurs (Arcuri et al., 2002; Shahani et al., 2010) et parfois en corrélation avec l'agressivité du cancer (Minas et al., 2007). Il serait donc intéressant de déterminer quelle est la régulation des peptides du CRF dans les adénocarcinomes colorectaux. L'activité autocrine/paracrine du système CRFergique a été suggérée pour être impliquée dans le contrôle du micro-environnement des cellules tumorales (Androulidaki et al., 2009; Kaprara et al., 2010a). Dans le micro-environnement de la tumeur, le CRF peut être libéré par les cellules endothéliales qui irriguent la tumeur, les cellules immunitaires et par l'innervation locale du SNE (Arbiser et al., 1999; Baigent, 2001; Bale and Vale, 2004). Les cellules non-tumorales pourraient ainsi également constituer une source de ligands pour les récepteurs au CRF tumoraux dont la production et la libération peut être influencée par le stress et l'inflammation (Figure 42).

L'inflammation chronique peut conduire à l'établissement d'un environnement qui favorise les lésions génomiques et l'initiation des tumeurs. La désorganisation des jonctions intercellulaires de l'épithélium pourrait participer aux processus inflammatoires mais aussi à la dédifférenciation cellulaire précédant la carcinogenèse (Jankowski et al., 1997). Ces altérations épithéliales sont particulièrement prononcées dans les tissus de RCH dans lequel le développement de tumeurs malignes est apparemment plus fréquent que dans les tissus de MC. Ceci suggère que les perturbations des molécules associées aux jonctions sont susceptibles d'être impliquées dans la cancérogenèse chez des patients MICI. En plus d'être des protéines d'adhésion cellule-cellule, les caténines sont aussi des molécules de transduction de signaux qui contrôlent la prolifération et les processus de migration. L'induction de la signalisation Wnt, principalement en affectant la β ctn, joue un rôle crucial dans le maintien à la fois du compartiment prolifératif des cryptes et la tumorigenèse des tissus. L'altération de cette voie de signalisation est caractéristique des cancers du côlon, du sein, de la prostate et des ovaires, qui expriment tous les molécules du système CRFergique (Beachy et al., 2004; Gebeshuber et al., 2007). En utilisant la lignée cellulaire de cancer du sein 4T1, Arranz et collaborateurs ont démontré que le CRF périphérique modifie l'expression de la β ctn et de SMAD2. Ces modulations entraînent une augmentation de la prolifération cellulaire induite par Wnt et le TGF β (Arranz et al., 2010). De même, le CRF stimule la prolifération des cellules de la lignée de neublastome Neuro2a (Mohammad et al., 2002). Toutefois, le système CRFergique peut exercer ses effets sur la régulation de la croissance tumorale en participant à la promotion de la prolifération cellulaire, l'angiogenèse ou l'apoptose cellulaire.

Effet du système CRFergique sur la croissance tumorale

Le CRF a été décrit pour inhiber la prolifération cellulaire via le CRF1 dans la lignée cellulaire adénocarcinome Ishikawa de l'endomètre (Graziani et al., 2002), les kératinocytes humains HaCat, les kératinocytes de souris immortalisés, certains mélanomes (Carlson et al., 2001; Slominski et al., 2006) et la lignée humaine issue de cancer du sein MCF7 (Graziani et al., 2007). Une étude révèle que les Ucn1 pourraient directement inhiber la prolifération et promouvoir l'apoptose de cellules de carcinome pulmonaire à petites cellules par l'intermédiaire de l'activation du CRF2 (Wang et al., 2010), alors que ni le CRF1 ni le CRF2 n'affectent la prolifération de la lignée humaine de cellules de cancer gastrique AGS (Chatzaki et al., 2006). La croissance des tumeurs pourrait également résulter de l'inhibition de l'apoptose. Ce phénomène d'échappement à la mort cellulaire procure à la tumeur des caractéristiques qui participent à la résistance aux traitements de chimiothérapie et à la survie des cellules métastatiques durant leur trajet pré-implantatoire. L'apoptose est inhibée dans les cellules de cancer gastrique humain de la lignée AGS après l'exposition au CRF, à l'Ucn1 ou à l'Ucn2 (Huang et al., 2009). Des résultats similaires ont été observés dans les cellules de rétinoblastome traitées par le CRF via une régulation négative du clivage de la pro-Caspase-3, dépendant de la PKA (Radulovic et al., 2003). En revanche, le CRF induit une immunosuppression locale par la promotion de l'apoptose des lymphocytes T cytotoxiques dépendante de la production du ligand Fas dans les cellules de cancer de l'ovaire (Minas et al., 2007). Dans la lignée cellulaire MR1 de cancer de la prostate de souris, le CRF1 et le CRF2 sont exprimés et exercent des rôles opposés sur l'apoptose. Le CRF réduit l'expression de Bcl-2 tout en activant la Caspase-9 via Bax. En revanche, l'Ucn2 augmente l'expression de Bcl-2 et diminue l'expression de Bax par la voie de signalisation AKT (Jin et al., 2011). L'activation du système CRFergique pourrait agir comme un interrupteur sur la survie de la tumeur en modifiant la balance prolifération/apoptose. Les effets des différents peptides du CRF dépendraient du type de cancer et de la nature des récepteurs activés.

L'autre moyen par lequel le système CRFergique peut influencer la croissance tumorale est l'angiogenèse. Il a été rapporté que Ucn2 inhibe la croissance et la vascularisation des tumeurs du poumon de type carcinome de Lewis *in vivo* et *in vitro* (Hao et al., 2008) ainsi que certains carcinomes hépatocellulaires (Wang et al., 2008). En outre, le CRF2 est fortement exprimé dans les vaisseaux sanguins (Saruta et al., 2005) qui sont néo-générés lors de la

croissance des tumeurs (Folkman, 1971). Dans de nombreuses tumeurs, la néo-angiogenèse est affectée par le système CRFergique via la production de VEGF et pour cette raison a été suggérée d'être une cible thérapeutique potentielle dans le cadre de traitements à l'Ucn1 (Bale et al., 2002; Wang and Li, 2007; Wang et al., 2008). L'activation du CRF2 diminue la production basale de VEGF au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires, ce qui conduit à une diminution de leur prolifération et de la formation de tubules en matrigel. Il a également été montré que l'activation du CRF2 pourrait inhiber la phosphorylation de p38/AKT, supprimant ainsi la sécrétion de VEGF dans les carcinomes du poumon humains à petites cellules (Wang et al., 2010). Par ailleurs, les souris KO CRF2 deviennent hyper-vascularisées après la naissance (Bale et al., 2002). En opposition, dans la peau, le CRF est impliqué dans l'augmentation de l'angiogenèse locale et de la perméabilité vasculaire en agissant sur la dégranulation des mastocytes (Arbiser et al., 1999; Theoharides et al., 1998). La lignée humaine HMC1 de cellules mastocytaires produit également du VEGF en réponse à l'administration CRF via l'activation du CRF1 (Cao et al., 2005). L'inhibition du CRF1 par l'Antalarmine supprime aussi la néo-angiogenèse dans les tumeurs induites avec la lignée cellulaire 4T1 de cancer du sein en utilisant des mécanismes dépendants de COX2 plutôt que la régulation du VEGF (Arranz et al., 2010). Dans l'intestin, lors de la colite induite au DSS, les souris KO CRF1 ou KO CRF2 ont respectivement une diminution ou une augmentation de la densité microvasculaire intestinale (Im et al., 2010). Cet effet a été associé à une diminution (pour CRF1^{-/-}) ou une augmentation (pour CRF2^{-/-}) du VEGF par rapport à l'inflammation développée chez les souris de issues de leurs lignées parentales. Les effets des deux récepteurs sur l'angiogenèse intestinale sont à nouveau opposés. Ce constat conduit à la conclusion que le CRF1 est pro-angiogénique, tandis que le CRF2 est anti-angiogénique, pas seulement lors de l'inflammation mais également dans les conditions basales (Bale et al., 2002).

Implication du système CRFergique dans la progression tumorale

Le système CRFergique a également été proposé pour affecter la migration et l'invasion des cellules cancéreuses, favorisant ainsi la progression tumorale et la formation des métastases (Androulidaki et al., 2009; Yang et al., 2007). Comme décrit précédemment, les récepteurs au CRF induisent de nombreuses voies de signalisation cellulaires impliquées dans la régulation des jonctions cellule-cellule et cellule-MEC, facilitant ainsi la migration et l'invasion cellulaire. Cette augmentation de la migration cellulaire pourrait être entraînée par des réarrangements du cytosquelette et la phosphorylation de la FAK au niveau des

adhérences focales (Androulidaki et al., 2009; Olson and Sahai, 2009). Une réorganisation de l'actine a été observée après le traitement des cellules At1 avec le CRF (Arranz et al., 2010). Dans les CCR, l'activation transitoire de ERK semble être suffisante pour induire la phosphorylation de FAK sur ses résidus de sérine, qui conduit ultérieurement à la migration et à la formation de métastases (Jiang et al., 2007; Li et al., 2010). Les kinases de la famille Src sont les principaux régulateurs des jonctions adhérentes et elles interagissent avec les deux récepteurs au CRF (Yuan et al., 2010a). Le CRF induit la migration et l'invasion des cellules B16F10 issues de mélanome murin de manière dépendante d'une activation transitoire de ERK via le CRF1 (Yang et al., 2007). Il participe également à la régulation de la polymérisation de l'actine et la phosphorylation de FAK et permet la migration des cellules MCF7 (Androulidaki et al., 2009). L'activité des Rho GTPases et la morphologie associée du cytosquelette d'actine sont également modulées par le CRF dans les neurones (Chen et al., 2008b; Swinny and Valentino, 2006). Le CRF1 induit l'activation de Rac-1 par la PKA et la voie MAPK, alors que le CRF2 induit l'activation de RhoA via la PKC. L'implication du système CRFergique dans la régulation de la progression du cancer et des métastases est appuyée par le fait que l'expression du CRF pourrait corrélérer avec le stade tumoral comme il a été observé dans les cancers de l'ovaire (Minas et al., 2007), mais pas pour le cancer du sein (Kaprara et al., 2010a). Par ailleurs, le CRF2 est exprimé en particulier dans les zones d'invasion péri-neurales des cancers du sein où il peut jouer un rôle dans le caractère invasif des tumeurs (Kaprara et al., 2010a). Par conséquent, s'il n'y a pas d'augmentation générale de l'expression du CRF2, celle-ci peut être locale.

En conclusion, la signalisation des récepteurs au CRF est impliquée dans des voies carcinogènes. Parmi ces voies, la signalisation PI3K/AKT est un modulateur clef de la survie des cellules, du cycle cellulaire et de l'angiogenèse. Récemment, la voie PI3K a été suggérée pour jouer un rôle critique dans les effets médiés par les deux récepteurs au CRF (Chandras et al., 2009; Punn et al., 2006). Le CRF est également un régulateur du facteur de transcription NFκB qui est un régulateur de gènes contrôlant la prolifération cellulaire, la survie, la différenciation entérocytaire et la production de cytokines comme le TNFα. Cependant, la diversité des résultats observés indique que les effets du système CRFergique dépendent du type cellulaire et/ou des récepteurs exprimés. Par exemple, dans le cerveau, le CRF inhibe l'activité de liaison à l'ADN de NFκB dans des conditions normales ou lors d'un stress oxydatif. Alors que, dans les leucocytes et les thymocytes, le CRF a été décrit comme activateur de NFκB de manière dépendante de la dose de ligand et du temps (Smith et al.,

2006; Zhao and Karalis, 2002). Une activation aberrante de NF κ B est souvent détectée dans les entérocytes et les macrophages de la lamina propria de biopsies prélevées chez des patients atteints de MICI et/ou de tumeurs colorectales (Rogler et al., 1998; Yu et al., 2003). Dans un modèle de CCR associée aux colites chez des animaux ayant une inactivation génétique de I κ B (activation de NF κ B), il a été démontré que le NF κ B épithélial contribue à l'initiation et la promotion de la tumeur en supprimant l'apoptose. Le NF κ B des cellules myéloïdes supporte également à la fois la promotion et la progression tumorale, à travers la production de cytokines, de COX2 et de facteurs de croissance (Greten et al., 2004).

Objectifs de la thèse

Mon travail de thèse s'est décliné autour de 2 axes :

I- La régulation du système CRFergique intestinal par le stress et l'inflammation

II- Implication du système CRFergique dans la progression des cancers colorectaux

Axe I- Régulation du système CRFergique intestinal par le stress

1- Etude de la régulation du CRF2 et des molécules de jonction intercellulaires dans les cellules épithéliales intestinales du côlon chez le rat Sprague Dawley soumis à des modèles de stress aigu ou chronique et d'inflammation au DSS.

2- Etude de l'implication du CRF2 dans la modulation des jonctions intercellulaires et de la différenciation entérocytaire dans le modèle des cellules épithéliales HT-29 différenciées.

Axe II- Implication du système CRFergique dans la progression des cancers colorectaux

1- Etude de l'expression du CRF2 dans les tumeurs colorectales humaines et les lignées cellulaires issues de cancers colorectaux.

2- Détermination de la signalisation cellulaire associée à l'activation du CRF2 dans les cellules HT-29 non différenciées.

3- Etude de la régulation des jonctions intercellulaires et de la localisation des caténines par le CRF2.

4- Etude de la régulation de la migration, de l'invasion et la prolifération cellulaire par le CRF2 dans les HT-29.

Autres travaux réalisés avant et pendant la thèse :

Annexe I- Etude du rôle de la p120ctn dans le cycle cellulaire et la duplication des centrosomes.

Annexe II- Etude de la maturation des jonctions adhérentes durant la différenciation entérocytaire.

Annexe III- Travail de systèse sur l'implication du système CRFergique intestinal dans la physiopathologie du stress de l'inflammation et des cancers.

Matériels et méthodes

Réactifs	Fournisseur	Espèce	Westernblot	Immunofluorescence
Ucn3	Sigma	Humain		
Astressin-2B	Sigma			
Phalloïdine-TRITC	Sigma			50µg/mL
Anticorps primaires				
E-Cadhérine	Takara	Souris	1/1000	1/100
p120ctn	Santa-cruz	Lapin	1/1000	1/100
Occludine	Zymed	Souris	1/1000	
Claudine-2	Zymed	Souris	1/1000	
Flotilline	Santa-cruz	Souris	1/1000	
Actine	Sigma	Lapin	1/1000	
CRF-R2	Abcam	Lapin	1/1000	
Anticorps secondaires				
Anti-Souris-HRP	Bio-Rad	Chèvre	1/3000	
Anti-Lapin-HRP	Jackson	Ane	1/20000	
Anti-Souris-Alexa Fluor 488	Invitrogen	Chèvre		1/500
Anti-Lapin-Alexa Fluor 546	Invitrogen	Chèvre		1/500

Table 1: Anticorps et réactifs

Anticorps et peptides

Voir dans la Table 1

Stress aigu de contention

Le dispositif de contention comprend une gaine en filet flexible cousu sur l'embout d'une bouteille en plastique (diamètre d'environ 5 cm). Le rat est inséré dans cette gaine jusqu'à ce que son museau dépasse du goulot de la bouteille pour lui permettre de respirer librement. Une fois le rat installé dans le dispositif, le filet est resserré grâce à un laçage jusqu'à ce qu'il épouse les formes du corps de l'animal, entraînant son immobilisation. Le rat est placé dans ce dispositif pour une durée d'une heure avant d'être relâché dans sa propre cage pour le reste de l'expérimentation. La défécation ou "Fecal pellet output" (FPO) est mesurées durant l'heure de contention et il est de 0 chez les animaux CTR.

L'expérimentation est réalisée selon deux cinétiques par jour pendant trois jours et organisées suivant ce chronogramme : A leur réception en animalerie, les animaux sont maintenus en stabulation durant 5 à 7 jours à 2 individus par cage avant toute expérimentation. Les cinq rats d'une première cinétique sont mis en contention pour une durée de une heure. Les rats de la seconde cinétique sont mis en contention avec un décalage de 30min par rapport à la première. Après une heure de contention, les animaux sont remis en cage puis, un individu est sacrifié aux différents points de la cinétique post-stress suivante : 30min, 1h30, 3h00, 6h00 et 24h. Les rats faisant l'objet du point de 24h00 sont gardés sur la nuit dans la salle d'expérimentation et sacrifiés le lendemain matin. Les animaux communiquent entre eux et font part de leur stress à leurs congénères qui se trouvent dans la même pièce. Du fait de leur capacité à se communiquer leur stress, les rats contrôles (CTR) de chaque série sont maintenus dans une salle de stabulation indépendante de l'expérimentation puis euthanasiés le lendemain après les animaux à 24H post-stress. L'euthanasie des animaux est réalisée à l'écart des animaux en expérimentation par injection intra-péritonéale de pentobarbital. Après anesthésie complète de l'animal, sa cage thoracique est ouverte et des prélèvements sanguins en intra-cardiaque sont réalisés avant perfusion en NaCl 9g/L. Le rat est disséqué pour prélever la partie proximale et distale du tube digestif ainsi que le cerveau.

Dans une autre série de stress de contension, les cellules épithéliales du côlon proximal de rats CTR ou à 6h post stress ont été prélevées (O'Keefe et al., 2001). Après un lavage de la muqueuse du côlon avec du PBS à 4°C, des pièces de 0.5 x 0.5cm ont été découpées dans le

côlon proximal et mises sous agitation pendant 45min dans un tube de 2mL contenant du tampon de dissociation PBS/ 1mM EDTA/ 1mM DTT. La fraction enrichie en cellules épithéliales est ensuite récupérée après sédimentation des pièces découpées puis centrifugées 5min à 1500rpm. Le tampon de dissociation restant est retiré et les cellules sont congelées dans l'azote liquide. Les culots sont repris dans 250µL de tampon RIPA et les protéines sont dosées par micro-BCA pour les analyses par westernblot.

Inflammation colique au DSS

Les rats sont distribués selon trois groupes : colite (n=15) soumis au DSS dans leur eau de boisson, contexte (n=15) et contrôle (n=10) ne recevant que de l'eau. Les expérimentations ont été réalisées suivant deux phases différentes. En premier lieu, les rats colite et contexte qui ont été hébergés dans la même pièce à raison d'un animal par cage. Celles-ci sont espacées de 30cm les unes des autres avec une alternance de rat contexte et colite. Une attention particulière est portée au maintien de conditions environnementales identiques suivant les groupes d'animaux utilisés. Ainsi, à la fin de cette première phase, les animaux contrôle sont placés dans la même pièce d'expérimentation avec le même nombre de cages et une disposition de la pièce identique. L'induction de la colite chronique a été réalisée par adaptation du protocole utilisé chez la souris par Melgar et par Wirtz (Melgar et al., 2007; Wirtz et al., 2007). L'eau de boisson est supplémentée avec du Dextran Sodium Sulfate DSS (MW~8,000, Sigma-Aldrich, France) à une concentration finale de 3% pendant deux cycles de 10 jours, séparés d'une période de 8 jours de récupération avec de l'eau uniquement. Les animaux ont été sacrifiés le matin suivant la dernière phase de colite au DSS suivant une procédure aussi rapide et calme que possible afin de limiter tout stress additionnel. Les animaux sont anesthésiés dans leur propre cage par ventilation de O₂ 100%/ Halothane 4% (Laboratoire Belmont, Paris, France). Des échantillons de sang sont prélevés par ponction intra-cardiaque et récoltés dans des tubes contenant de l'héparine ou de l'EDTA. Le plasma a été isolé par centrifugation à 4°C, 4500 g pendant 7 min et stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Les rats ont en suite été décapités et leur cerveau récupéré pour être disséqué sur glace. L'amygdala et le cortex ventrolatéral orbital (VLO) ont été prélevés et conditionnés dans 500µL de RNAlater® (Ambion, Cortaboeuf, France). Les côlons ont été retirés, mesurés puis séparés en sections proximales ou distales. Une suspension de cellules épithéliales a été réalisée à partir du protocole adapté de Menard and Potier (Ménard and Pothier, 1987). Les

segments de côlons distaux ont été ouverts sur la longueur puis lavés à 4°C en PBS. Les cellules épithéliales intestinales ont ensuite été détachées par "scrapping" de la muqueuse dans un tampon 2.5 mM EDTA, 0.25 M NaCl (pH 7.5) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics, Meylan, France). La corticostérone plasmatique a été mesurée avec une kit d'immunoradiodétection (Siemens-DPC, La Garenne-Colombes France).

Culture cellulaire

Les lignées cellulaires d'adénocarcinomes coliques humain HT-29, Caco2/TC7, HCT8-R et SW620 sont cultivées en routines dans un milieu "Dulbecco Minimal Essential Medium » (DMEM) contenant 25 mM de glucose (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et supplémentées avec 10% de sérum de veau foetal (SVF), penicillin et streptomycin (milieu standard). L'incubateur est maintenu à 37°C dans une atmosphère à 5% CO₂. La construction contenant le CRF2 humain fusionné à la GFP (CRF2-GFP) a été cloné dans le vecteur d'expression pBabe. Une infection rétrovirale des cellules HT-29 a été réalisée comme décrit précédemment (Chartier et al., 2011b). Ces cellules ont ensuite été cultivées dans un milieu DMEM 10% SVF contenant 2µg/ml de puromycine (BD Biosciences) puis sélectionnées par FACS selon leur niveau d'expression de GFP. La différenciation des HT-29 est effectuée en substituant le glucose par du galactose durant 10 jours dans le milieu de culture. Pour la culture des cellules HT-29 en sphéroïdes, les cellules sont trypsinées puisensemées à 5 x 10⁶ cellules en boîte de pétri bactériologiques de diamètre 100mm. Les boîtes sont légèrement agitées toutes les 12h durant 48h. Les sphéroïdes sont ensuite récupérées, centrifugées et reprises en milieu sans sérum pour les traitements avec l'Ucn3.

Séparation des membranes sur gradient de saccharose

Les radeaux lipidiques sont isolés à partir d'un gradient discontinu de saccharose 40%-35%-5%. Trois boîtes confluentes sont utilisées pour chaque condition et récupérées à 4°C par grattage dans un tampon 50mM HEPES/ 150mM NaCl/ 5mM EGTA/ pH 7,4 et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (ROCHE). Les lysats sont incubés avec 1% de Triton X-100 pendant 1h à 4°C. Après 10min de centrifugation à 2500g, les surnageants sont gardés puis mélangés (à 1,5mL pour 1,5mL) avec une solution à 80% de saccharose. Ils sont déposés de bas en haut dans des tubes 12mL à ultracentrifugation, 3mL du lysat à 40% saccharose final, 5mL de solution à 35% puis 3mL de celle à 5%. Toutes les solutions de saccharose sont diluées dans le tampon de lyse. Les tubes sont placés dans un rotor Beckman SW-41 pour 19h de centrifugation à 100000g à 4°C. Les gradients sont prélevés par le haut en fractions de

1mL sur 12 fractions. Les fractions sont ensuite regroupées 2 par 2 et un volume équivalent est déposé sur westernblot.

GST pull-down

La précipitation des formes actives de RhoA et Rac1 est réalisée en utilisant respectivement des protéines de fusion glutathion S-transférase (GST)- rhotekin binding domain (GST-RBD) glutathion S-transférase-Pak (P21 activated kinase) qui lient la forme Rac1-GTP (GST Pak). Après lavage des cellules (1P10 à plus de 50% de confluence) en PBS à 4°C, elles sont lysées dans un tampon Triton X-100 1% / Tris pH 7,2 50 mM / EGTA 5 mM / EDTA 5 mM et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche). Les lysats sont ensuite centrifugés 10 minutes à 17.000 g à 4°C pour éliminer les composants insolubles dans ce tampon. Après dosage des protéines, 2mg de protéines du lysat sont ajoutés à 50µL de billes Sepharose couplées aux constructions GST-RBD ou GST-PAK. Les billes sont ensuite incubées 45min à TA pour les pull-down de Rho ou sur la nuit à 4°C pour Rac. Elles sont ensuite lavées 4 fois dans le tampon de lyse et les protéines liées sont éluées dans du tampon Laemmli pendant 5 minutes à 95°C. Les protéines RhoA et Rac1 liées au GTP sont ensuite séparées par électrophorèse SDS-PAGE (12 % de polyacrylamide) et analysées par westernblot avec les anticorps appropriés.

Westernblot

Concernant les comparaisons entre lignées cellulaires ou sur les extraits de tissus digestifs d'animaux, les cellules sont lysées dans un tampon RIPA supplémenté d'inhibiteurs de protéases et de phosphatase et les membranes cellulaires sont cassées par sonication 30 secondes à 400 joules/watt.sec en chambre froide. Après dosage des protéines, 25µg de protéines sont déposées sur gel de polyacrylamide et séparées par électrophorèse SDS-PAGE. Dans certaines expériences, les cellules sont directement lysées dans le tampon laemmli (300µL pour environ 10⁶ cellules) et bouillies pendant 10min.

Mesure de la résistance transépithéliale

Les cellules HT-29 sontensemencées à une densité de 5.10⁵ cellules en inserts de 14mm de diamètre aux pores de 0,4µm (Corning PET) et conservées trois jours pour atteindre la confluence. Elles sont ensuite différenciées durant 10 jours dans le milieu GAL. La résistance trans-épithéliale (TER) est mesurée avec un voltohmmètre (Millicell) au cours des 4 premières heures de traitement à l'Ucn3

Activité Phosphatase alcaline (PA)

Les cellules sont lysées dans un tampon Na₂SO₄ 5 mM / TRIS-HCl pH 7.4 1 mM supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche). Les cellules sont ensuite raclées et les membranes cellulaires sont cassées par sonication, 30 secondes à 400 joules/watt.sec en chambre froide. Puis l'activité de la PA endogène est testée en plaque 96 puits (P96) avec 1, 5 et 10µL de lysat ([protéines] voisine de 2,5µg/µL), complété à 100µL avec le tampon approprié. 100µL de substrat, paranitrophenol phosphate (pNPP) 4 mM / 50mM glycine pH 10,5 / ZnCl 1 mM / MgCl 0,5 mM / CaCl₂ 5 mM sont ajoutés. La réaction est réalisée pendant 30min à 37°C et arrêtée avec 50µL de NaOH 10N. La coloration jaune du paranitrophenol (pNP) proportionnelle à l'activité de la PA est ensuite mesurée par spectrophotométrie à 405 nm et rapportée à la quantité de protéines contenue dans l'échantillon, dosée en microBCA (Pierce). Cette activité est comparée à un échantillon standard de PA commerciale purifiée.

Immunofluorescence et microscopie confocale

Les cellules sont cultivées sur lamelles et fixées 30min à température ambiante (TA) en PBS /PFA 4% /saccharose 3%. Les côlons de rats sont lavés en PBS à 4°C puis fixés en PBS /PFA 4% /saccharose 3% sur la nuit et cryo-protégés par une incubation 24h en PBS 30% saccharose. Ces tissus sont ensuite inclus en OCT et coupés au cryostat à 10µm d'épaisseur. Les cellules ou les coupes de côlons sont ensuite perméabilisées 15min à TA en PBS /Triton X-100 0,1% puis saturées 1h à 37°C en PBS /BSA 3% /Tween-20 0,1%. Les anticorps primaires et secondaires sont dilués dans la solution de saturation (cf.: Table anticorps). Le noyau des cellules est marqué avec du TO-PRO 3 (Invitrogen) pendant 5min dans le dernier lavage en PBS. Les lamelles sont montées sur lames porte-objets avec une goutte de DAKO mount (DAKO). Les acquisitions d'images ont été réalisées sur un microscope confocal Leica TCS SPE aux objectifs x40 ou x100 à huile.

RT-PCR

Les ARNs sont extraits par solubilité de phase dans le réactif Trizol™ (Invitrogen). Après le dosage de l'ARN par lecture au spectrophotomètre à 260nm (1DO= 40µg/mL), 2µg d'échantillons sont soumis à une reverse transcription avec la M-MLV (Invitrogen). La qualité de ces ARNs est également évaluée par migration sur gel d'agarose 2% et identification des ARNs ribosomiaux (28S, 18S et 5S). Les PCR ont été réalisées avec un kit

Taq (Euromedex EUA00103) selon le nombre de cycles et T_m indiqués dans la table matériel et méthodes de l'article suivant. Les produits d'amplification sont analysés par migration sur gel d'agarose 1%.

ELISA

50 μ L des lysats cellulaires de tube digestif dilués à 15 μ g/mL en tampon RIPA sont adsorbés sur la nuit à 4°C dans des plaques 96 puits Maxisorp (NUNC). La spécificité des signaux ELISA est également évaluée par des puits contenant les protéines purifiées du CRF, Ucn1, Ucn2 et Ucn3 diluées à 0,5 et 2 μ g/mL (Sigma). Les plaques sont ensuite saturées 1h à 37°C en PBS/ BSA 3% et incubées avec des anticorps dilués dans la solution de saturation : anti-CRF (Ab1 au 1/500), anti-Ucn1 (Sigma au 1/500), anti-Ucn2 (Phoenix au 1/10 000) et anti-Ucn3 (Phoenix au 1/10 000). Après 3 lavages en PBS/ BSA 3%/ Tween-20 0,1%, les puits sont incubés 1h à 37°C avec les anticorps secondaires anti-lapin couplés HRP (Jackson au 1/10 000). Le signal est révélé par une solution d'ABTS (Pierce) incubée 30min à 37°C. L'absorbance des échantillon est ensuite lue à 405nm.

Analyses densitométrique et statistique

Les westernblots sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes. Les graphiques représentent la valeur moyenne \pm l'écart à la moyenne (SEM), des niveaux d'expression protéique mesurés par analyse densitométrique dans le logiciel « Image J » (NIH). Les tests statistiques utilisés sont des tests de Student pour les données appariées (mesures d'expressions protéiques effectuées dans les lignées cellulaires) et Man et Witney pour les données non appariées (mesures d'expressions protéiques effectuées dans les tissus issus de rats). Les niveaux de significativité sont représentés par des astérisques (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Les mesures de fluorescence sont également effectuées dans le logiciel image J pour les profils de fluorescence sur coupe et dans les cellules HT-29 différenciées.

Résultats et discussion

Régulation du système CRFergique épithélial intestinal par le stress et l'inflammation

Introduction

L'établissement de jonctions intercellulaires cohésives entre les cellules épithéliales intestinales lors de la différenciation entérocytaire permet de maintenir une barrière entre la lumière digestive et le reste de l'organisme. Les jonctions serrées jouent un rôle clé dans le scellement de la barrière. Cependant, leur mise en place et leur maintien est dépendant de la formation des jonctions adhérentes composées de la E-cadhérine membranaire et de la p120ctn qui assurent la stabilité de la jonction en s'associant au domaine intracellulaire des molécules de E-cadhérine. Les jonctions adhérentes se forment durant le stade précoce de la différenciation entérocytaire et leur maturation s'effectue au niveau des radeaux lipidiques (RL). La structure et l'organisation membranaire des RL est également modifiée tout au long de la différenciation et de la mise en place de la polarité cellulaire. Le stress, qu'il soit chronique ou aigu, participe à la physiopathologie des MICI en perturbant l'homéostasie de la barrière intestinale et initie ainsi le développement de processus inflammatoires. Lors de l'inflammation, l'expression et la localisation des molécules de jonctions intercellulaires dans les RL est altérée. L'épithélium est également composé d'entérocytes moins différenciés. Ces effets passent par la sécrétion de médiateurs spécifiques qui agissent sur des récepteurs exprimés par les cellules immunitaires et les cellules épithéliales. Le CRF et les Ucn constituent les principaux neuro-médiateurs du stress et agissent sur le CRF1 et le CRF2. Plusieurs études ont montré que le CRF2 jouerait un rôle pro-inflammatoire au niveau du colon en modulant l'activité des cellules immunitaires de la muqueuse intestinale et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs l'expression du CRF2 et certains de ses ligands est augmentée dans la muqueuse du colon de patients atteints de MICI.

Dans ce contexte, nous avons voulu déterminer l'implication du CRF2 exprimé par les colonocytes dans la régulation de la barrière épithéliale intestinale lors du stress et de l'inflammation.

Pour cela nous avons étudié l'expression et la régulation du CRF2 et de la E-cadhérine au niveau des cellules épithéliales intestinales chez le rat dans un modèle de stress aigu, un

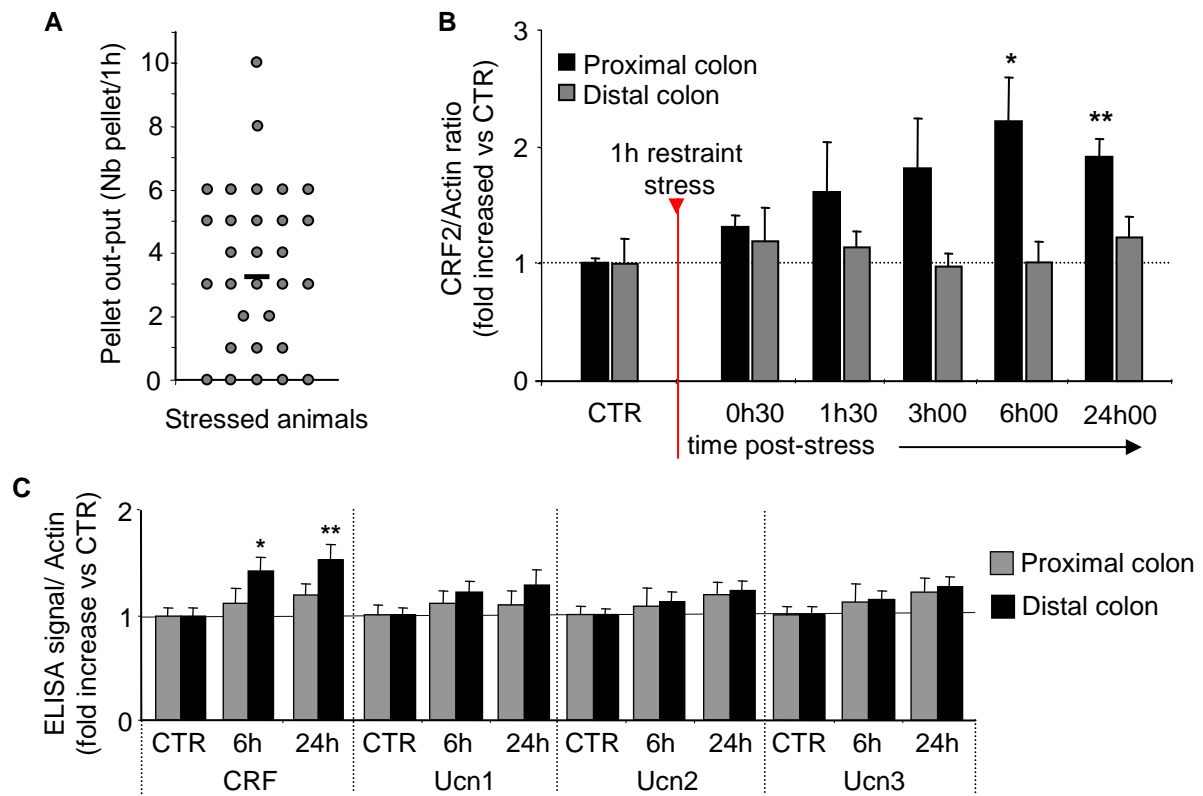


Figure 43: Régulation du système CRFergique dans le côlon par un stress aigu de contention

A/ Défécation (FPO: Fecal pellet output) mesurée chez les animaux pendant l'heure de stress de contention (n=30). (chez les animaux non stressés: CTR, le score FPO=0). **B/** Histogrammes représentant le niveau d'expression du CRF2 ramené à celui de l'actine dans les tissus totaux issus de côlons proximaux (barres noires) et distaux (barres grises) de rats contrôles (CTR) ou subissant un stress de contention de 1h puis sacrifiés 0h30, 1h30, 3h00, 6h00 ou 24h00 post-stress (n=6 par groupe). **C/** L'expression du CRF et des Ucn1-3 a été mesurée par ELISA dans les lysats totaux des côlons proximaux (barres noires) et distaux (barres grises) des rats contrôles (CTR) ou des animaux à 6h et 24h après le stress.

modèle d'inflammation induit par le DSS et chez des animaux sains co-hébergés avec les animaux colitiques. La production de ligands du CRF2 a également été étudiée au niveau des différentes sections du côlon chez l'animal. Nous avons poursuivi par une analyse des mécanismes de régulation de la perméabilité épithéliale par une approche *in vitro* dans le modèle cellulaire de différenciation entérocytaire HT-29. Dans ce modèle, nous nous sommes intéressés à la régulation des jonctions adhérentes et à l'augmentation de la transcytose par une activation aiguë du CRF2 avec l'Ucn3.

Résultats

Régulation du système CRFergique dans les modèles animaux (in vivo)

La défécation (ou fecal pellet output, FPO) est un indicateur de la motricité du côlon, utilisable comme moyen de détecter la perception du stress (Bonaz and Tache, 1994). Nous avons donc suivi ce paramètre pour valider le stress de contention d'une heure appliqué sur les rats Sprague Dawley. Chez les animaux non stressés le FPO est de 0 C/h (« crotte »/1h). Cette valeur passe à 3,2 C/h chez les animaux subissant un stress aigu de contention durant 1h (Figure 43A). Le niveau d'expression du CRF2 dans le tissu total de la partie proximale ou distale du côlon a été mesurée par westernblot chez des rats indemnes de stress ou ayant subi 1h de contention puis libérés et sacrifiés suivant une cinétique post-stress variant de 30 minutes à 24h00 (Figure 43B). L'expression du CRF2 normalisée à l'actine est significativement augmentée dans le colon proximal après 6h00 et jusqu'à 24h00 post-stress. Cependant, l'expression du CRF2 reste inchangée tout au long de la cinétique dans la partie distale du colon. Nous avons également mesuré par ELISA, dans les mêmes conditions expérimentales, l'expression et la régulation des ligands du système CRFergique, à savoir le CRF et les Ucn1, Ucn2 et Ucn3 (Figure 43C). L'absorbance mesurée pour chaque ligand a été rapportée à la quantité d'actine dans les lysats de tissus totaux des rats CTR ou ayant subi un stress aigu de contention (ST6h et ST24h). L'expression du CRF est significativement augmentée au niveau de la partie distale du colon à 6h (+42%) et à 24h (+53%) post-stress. Malgré une tendance à l'augmentation de l'expression des Ucns après le stress, aucune différence significative n'est observée.

Certains travaux montrent que le CRF2 est exprimé au niveau des cellules épithéliales intestinales notamment dans la partie proximale du tube digestif, mais sa distribution membranaire exacte est controversée (pôle apical versus pôle basal). Nous avons donc voulu vérifier la localisation du CRF2 dans la membrane plasmique des colonocytes par

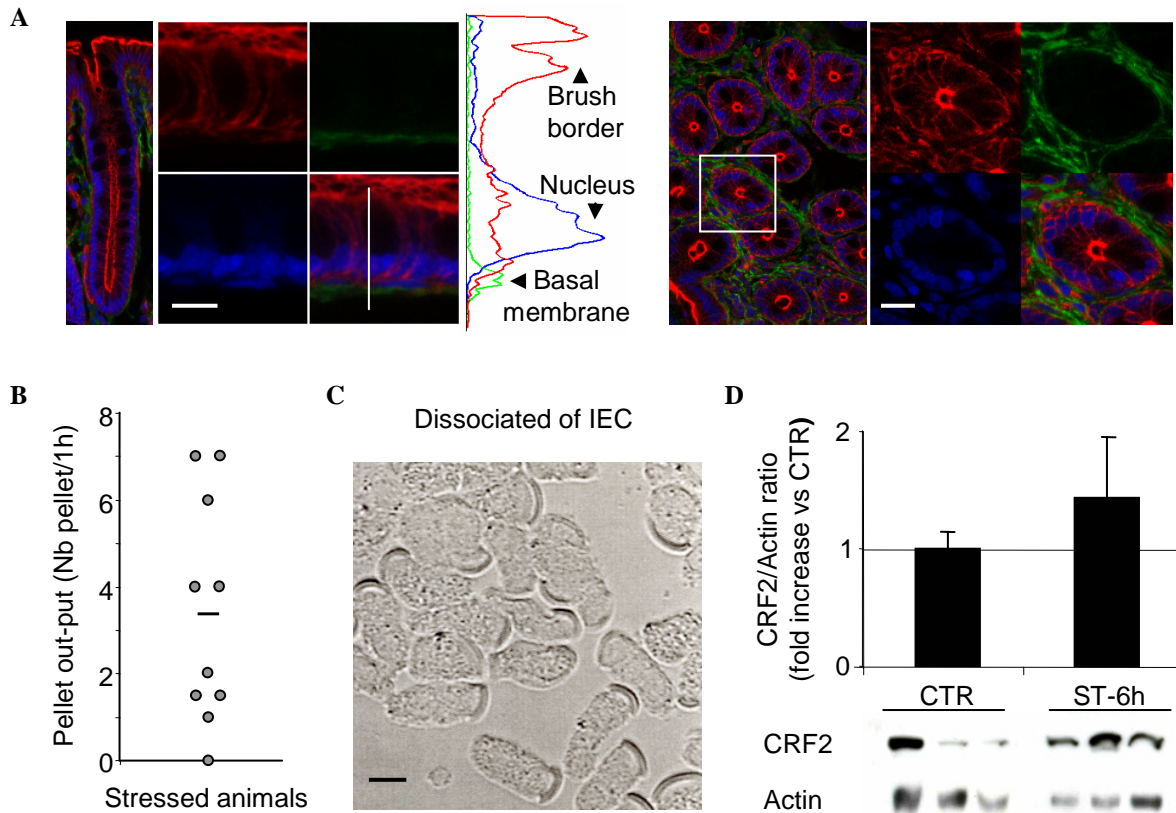


Figure 44: Expression du CRF2 dans les cellules épithéliales et régulation par un stress aigu

A/ Etude par microscopie confocale de l'expression du CRF2 (vert) réalisée sur coupe de colon proximal de rat CTR. L'actine et les noyaux cellulaires ont respectivement été identifiés avec de la phalloïdine-TRITC (rouge) et du Topro-3 (bleu). Coupes longitudinales (gauche) et transversales (droite) représentatives de cryptes de l'épithélium. Les profils de fluorescences sont mesurés selon l'axe baso-apical d'une cellule épithéliale représentative (milieu). **B/** Défécation (FPO: Fecal pellet output) mesurée chez les animaux pendant l'heure de stress de contention (n=10). (chez les animaux non stressés: CTR, le score FPO=0). **C/** Cellules épithéliales dissociées du côlon proximal observées en microscopie à contraste de phase. **D/** Westernblot représentatif de l'expression du CRF2 et de l'actine (utilisée comme contrôle) dans les lysats de cellules épithéliales dissociées des côlons proximaux des animaux CTR et à 6h après stress (ST-6h) (CTR n=10, ST-6h n=10). Les histogrammes représentent le niveau d'expression du CRF2 ramené à l'actine dans les cellules épithéliales de rat contrôles (CTR) ou 6H après le stress de contention. La barre d'échelle est de 5 μ m (**A** et **C**). Acquisitions d'images réalisés sur un microscope confocal Leica TCS SPE aux objectifs x40 ou x100 à huile.

microscopie confocale sur des coupes de colons réalisées chez des animaux non stressés. Les clichés dans des coupes longitudinales (images de gauche) et transversales (images de droite) des cryptes de la Figure 44A montrent que le CRF2 (marquage vert) est exprimé au niveau du pôle basal des cellules épithéliales des cryptes, identifié par rapport au marquage intracellulaire de l'actine avec la phalloïdine-TRITC (marquage rouge) et des noyaux cellulaires avec le Topro-3 (marquage bleu). Il est également présent dans certaines cellules de la lamina propria. L'expression du CRF2 étant maximale à 6H00 post-stress dans le côlon proximal, ces conditions ont été choisies pour étudier la régulation du CRF2 par le stress au niveau des cellules épithéliales. De nouveaux rats non stressés (CTR) ou stressés 6h00 (ST-6h) ont été utilisés afin d'isoler les cellules épithéliales du côlon proximal par chélation de cations dans un tampon HBSS contenant du DTT/EDTA. Chez les animaux stressés la FPO est augmentée à un niveau équivalent au groupe utilisé pour les lysats de tissus totaux (Figure 44B) confirmant l'effet du stress. L'observation en microscopie à contraste de phase de la population cellulaire purifiée indique que seules les cellules épithéliales ont été dissociées par ce traitement (Figure 44C). L'expression du CRF2 a été mesurée par westernblot dans les fractions enrichies en cellules épithéliales des animaux non stressés et ST-6h (Figure 44D). Il n'y a pas de modification significative de l'expression du CRF2, malgré une tendance à l'augmentation après le stress.

La régulation de l'expression du CRF2 a ensuite été analysée au niveau des cellules épithéliales du côlon dans un modèle d'inflammation au DSS et chez des animaux co-hébergés. Dans ces expériences la promiscuité des animaux contexte avec des animaux colitiques induit un stress chronique. Le stress et l'inflammation sont évalués par des marqueurs sériques comme la corticostérone, la glycémie, les triglycérides, les acides gras libres ("free fatty acids" FFA) ou le taux d'hématocrite. L'activation neuronale mesurée au niveau du cortex ventrolateral orbital (VLO) par l'expression d'ARNm de *cfos* constitue également un indicateur du stress psychologique perçu chez ces animaux. Les marqueurs sériques du stress et de l'inflammation ont été mesurés chez des rats Sprague Dawley non stressés hébergés seuls dans leur pièce de stabulation (CTR), chez des animaux ayant subi une colite chronique induite par deux cycles de DSS d'une durée de 10 jours entrecoupés d'une phase de récupération de 6 jours (DSS) ou chez des rats contexte (CTX) indemnes de DSS, mais hébergés dans la même pièce que les animaux colitiques (Figure 45A). La corticostérone plasmatique est augmentée chez les animaux CTX et DSS. En revanche, une augmentation du

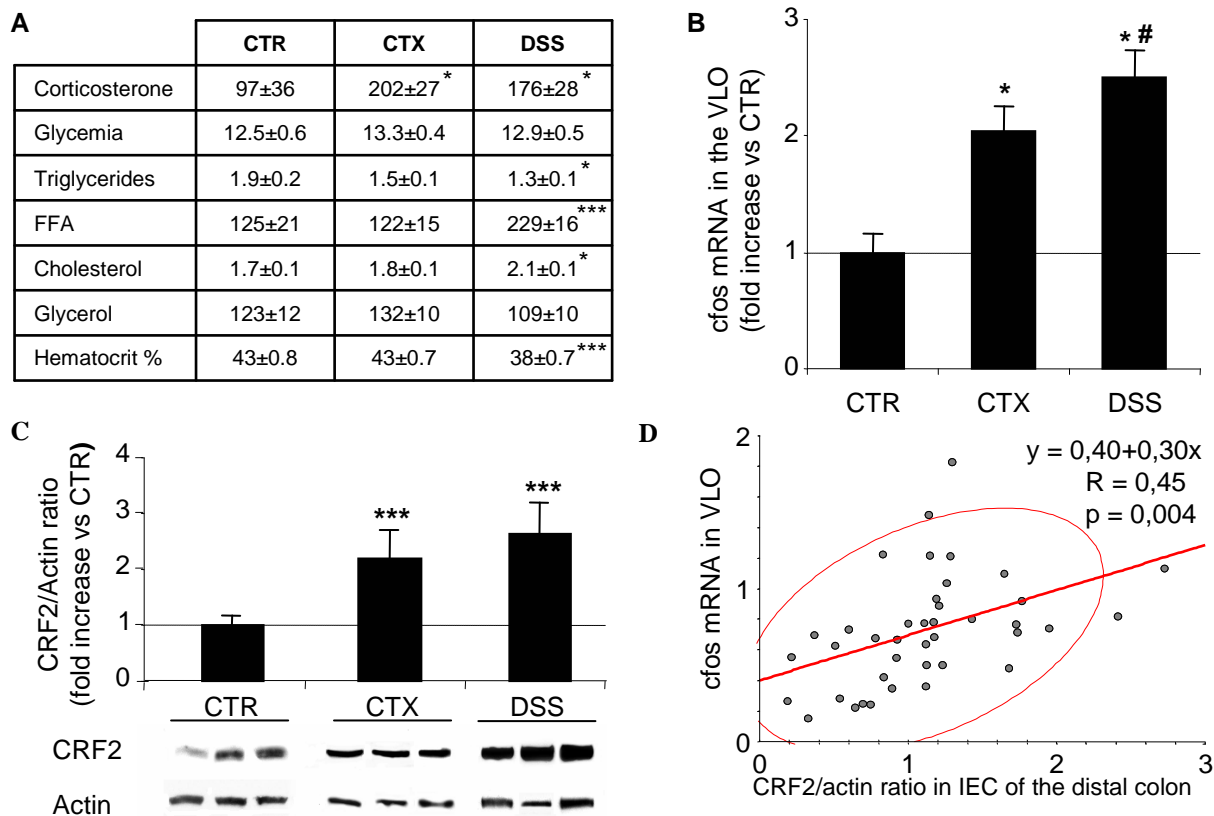


Figure 45: Le stress « environnemental » et l'inflammation au DSS chroniques régulent l'expression du CRF2 dans les cellules épithéliales intestinales

A/ Paramètres métaboliques connus pour varier dans le stress et l'inflammation, dosés dans le plasma des animaux contrôles (CTR) hébergés seuls, des animaux subissant une inflammation chronique au DSS (DSS) et des animaux contextes (CTX) hébergés dans la même pièce que les DSS (CTR n=10, CTX n=15, DSS n=15). **B/** Histogrammes représentant les niveaux d'expression d'ARNm de cfos dans le cortex ventro latéral orbital (VLO) déterminés par QRT-PCR. **C/** Westernblot représentatif de l'expression du CRF2 et de l'actine (utilisée comme contrôle) dans les lysats de cellules épithéliales dissociées des côlons distaux des animaux CTR, CTX et DSS. Les histogrammes représentent le niveau d'expression du CRF2 ramené à celui de l'actine dans les cellules épithéliales de rat CTR, CTX ou DSS. **D/** Régression linéaire représentant la corrélation entre l'expression du cfos dans le VLO et celle du CRF2 dans les cellules épithéliales du côlon distal.

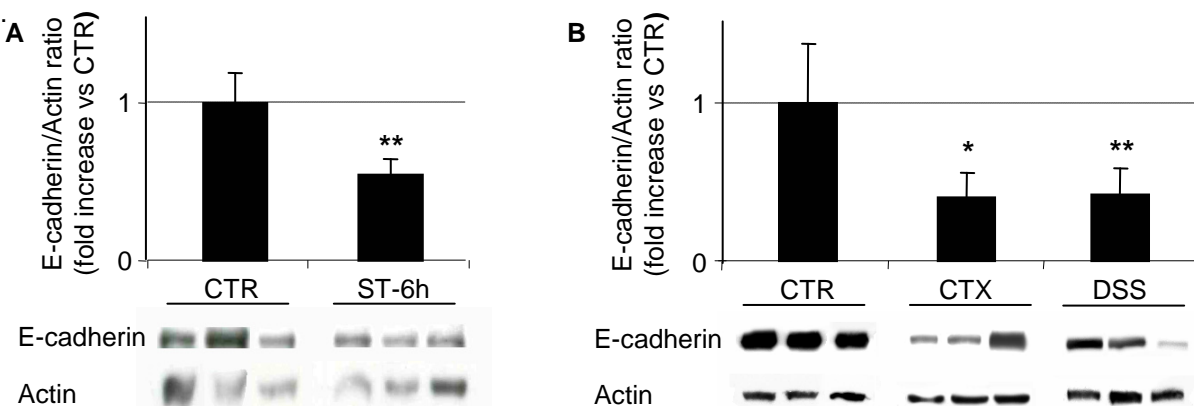


Figure 46: Le stress et l'inflammation altèrent l'expression de la E-cadhérine dans les cellules épithéliales du colon

Westernblot représentatifs de l'expression de la E-cadhérine et de l'actine (utilisée comme contrôle) dans les lysats de cellules épithéliales dissociées du colon proximal de rats CTR et à 6h après un stress de contention (**A**) ou de cellules épithéliales dissociées des côlons distaux des animaux CTR, CTX et DSS (**B**). Les histogrammes représentent le niveau d'expression de la E-cadhérine ramené à l'actine dans les différentes conditions mentionnées ci-dessus.

FFA et du cholestérol ainsi qu'une diminution des triglycérides et du % d'hématocrite ne sont observées que chez les animaux DSS. L'ARNm du c-fos a été mesuré par QRT-PCR dans le VLO de ces animaux (Figure 45B). Son expression est significativement augmentée d'un facteur 2 et 2,5 dans les groupes CTX et DSS respectivement. Le c-fos est également significativement plus élevé dans le groupe DSS que chez les rats CTX, indiquant une plus grande activation neuronale du VLO chez les animaux colitiques. Pour chacun de ces groupes d'animaux, nous avons purifié les cellules épithéliales à partir des colons distaux et l'analyse de l'expression du CRF2 a été réalisée par westernblot (Figure 45C). L'expression du CRF2 rapportée à l'actine est significativement augmentée d'un facteur 2,1 et 2,9 respectivement chez les animaux CTX et DSS. L'expression des ARNm du c-fos dans le VLO est également corrélée à celle du CRF2 dans les cellules épithéliales du colon (Figure 45D).

Le stress et l'inflammation diminuent l'expression de la E-cadhérine dans les cellules épithéliales du colon

Le stress a souvent été associé à des modifications de la perméabilité intestinale. Nous avons donc voulu examiner l'effet du stress sur le niveau d'expression de la E-cadhérine, protéine essentielle à la formation des jonctions adhérentes. Celle-ci a été mesurée par westernblot dans les fractions de cellules épithéliales des rats ayant subi ou non un stress aigu de contention (Figure 46A). Le niveau d'expression de la E-cadhérine rapporté à celui de l'actine est diminué d'un facteur 2 chez les animaux ST-6h. Les mêmes analyses ont été effectuées dans les cellules épithéliales du côlon pour les animaux CTR, CTX et DSS (Figure 46B). L'expression de la E-cadhérine rapportée à celle de l'actine est également significativement diminuée d'un facteur 3 chez les animaux CTX et DSS. L'ensemble de ces résultats indique que le stress qu'il soit aigu (contention) ou chronique (context et DSS) se traduit par une augmentation de l'expression du CRF2 et une diminution de E-cadhérine au niveau des cellules épithéliales du côlon. Ces modifications pourraient être en partie responsable de l'altération de la barrière épithéliale.

Le CRF2 altère la perméabilité épithéliale intestinale (in vitro)

Nous avons voulu déterminer comment le CRF2 peut réguler la perméabilité de l'épithélium intestinal en utilisant la lignée cellulaire HT-29, un modèle de différenciation colique "in vitro". Les cellules HT-29 ont la capacité de se différencier en "colonocyte-like" en substituant le glucose du milieu de culture par du galactose (milieu Gal). Cette différenciation est significative après 10 jours de culture et se caractérise par l'acquisition de

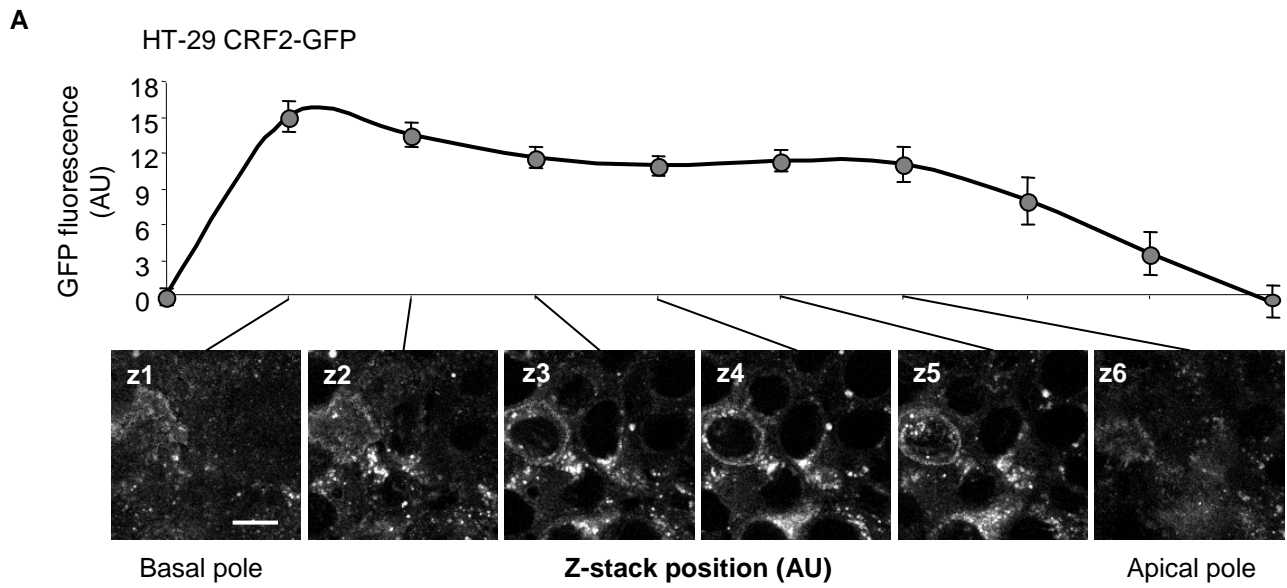


Figure 47: Expression et localisation du CRF2-GFP dans les cellules HT-29 différenciées (J10)

Etude par microscopie confocale de la localisation de la protéine de fusion CRF2-GFP dans les cellules HT-29 différenciées pendant 10 jours en milieu GAL. Quantification de la fluorescence GFP exprimée aux niveau des différents plans de coupe sur l'axe z des cellules HT-29 CRF2-GFP J10. La valeur indiquée représente la moyenne de 4 champs différents. Acquisitions d'images réalisés sur un microscope confocal Leica TCS SPE aux objectifs x40 ou x100 à huile, barre d'échelle 10µm.

propriétés structurales (polarité, mise en place et maturation des complexes d'adhérence intercellulaires, développement de microvillosités...) et enzymatiques (synthèse de plusieurs enzymes digestives dont la PA, la DPP IV...). Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer la localisation du récepteur CRF2 dans les cellules HT-29 différenciées. Nous avons établi une lignée stable de cellules HT-29 surexprimant la protéine de fusion CRF2-GFP (HT-29 CRF2-GFP). Nous avons vérifié que ces cellules possédaient les mêmes propriétés à se différencier que les cellules HT-29 et que la protéine de fusion (CRF2-GFP) était fonctionnelle (activation de voie de signalisation en présence d'ucn3). Les cellules HT-29 CRF2-GFP ont été différenciées 10 jours en milieu GAL (J10). L'expression et la localisation de la protéine CRF2-GFP ont été analysées en microscopie confocale selon 10 coupes (Z0-9) du pôle basal au pôle apical tous les 1µm (Figure 47). L'intensité de la fluorescence a été mesurée aux différents niveaux de la cellule et dans quatre champs différents (panneau du haut). Le niveau d'expression de la protéine CRF2-GFP est plus important au pôle basolatéral des cellules différenciées. A ce niveau CRF2-GFP est localisé à la membrane plasmique et dans des vésicules intra-cytoplasmiques (panneau du bas). Il y a peu d'expression du CRF2-GFP au pôle apical.

Pour apprécier la perméabilité du feuillet épithélial formé par les cellules HT-29 nous avons effectué des mesures de résistance électrique trans-épithéliale (TEER). L'effet de l'Ucn3, ligand du CRF2, sur la perméabilité intestinale a été mesuré sur des cellules HT-29 WT non différenciées (J0) et différenciées 10 jours (J10) traitées 1h, 2h ou 4h avec 100nM d'Ucn3 (Figure 48A). La TEER est augmentée d'environ 70% de J0 à J10 indiquant la mise en place de complexes d'adhérence intercellulaires responsables de l'étanchéité de l'épithélium. Le traitement avec l'Ucn3 induit une perte totale de la perméabilité entre 0 et 2h, traduisant une ouverture des jonctions intercellulaires puis une restauration partielle à 4h (représentant 40% de la TEER initiale des J10 non traitées).

Afin de déterminer si l'augmentation de la perméabilité induite par l'Ucn3 était associée à une altération des complexes jonctionnels intercellulaires, nous avons étudié l'effet de ce ligand sur l'organisation des jonctions intercellulaires dans les cellules HT-29 CRF2-GFP différenciées. L'expression de la E-cadhérine, de la p120ctn et de l'actine a été mesurée dans les lysats totaux de cellules HT-29 CRF2-GFP J0 ou J10 traitées 0 à 5h avec 100nM d'Ucn3 (Figure 48B). Entre J0 et J10, l'expression de la E-cadhérine est fortement augmentée. Elle diminue ensuite progressivement à 2h et 5h de traitement avec l'Ucn3. Dans ces mêmes lysats, l'expression de la p120ctn est très légèrement diminuée et celle de l'actine reste inchangée. La

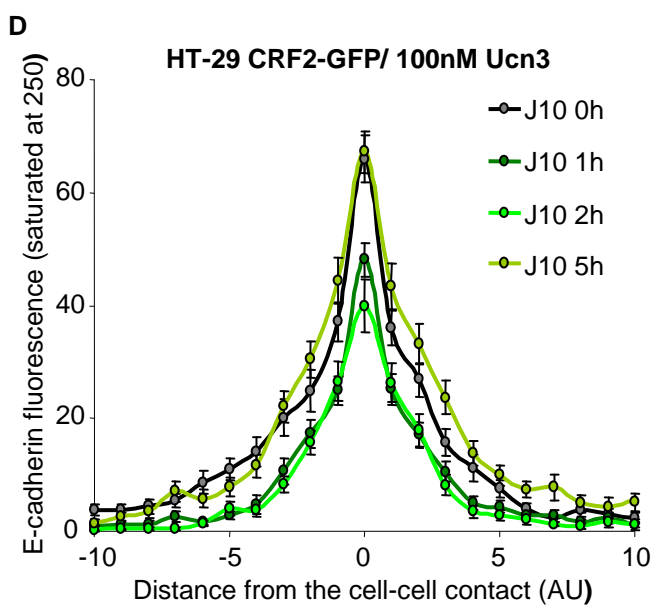
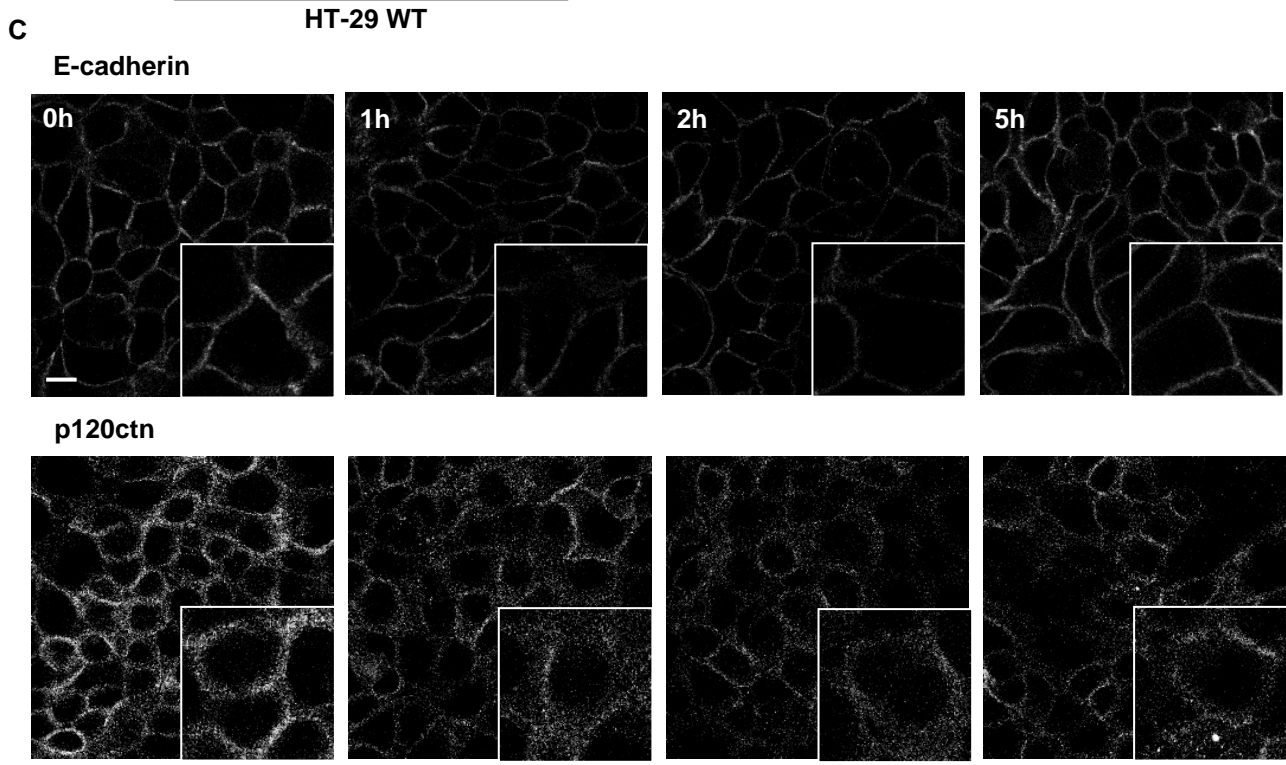
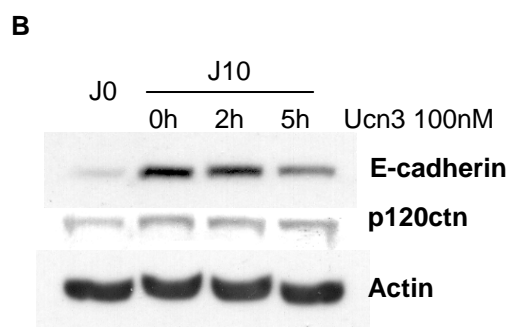
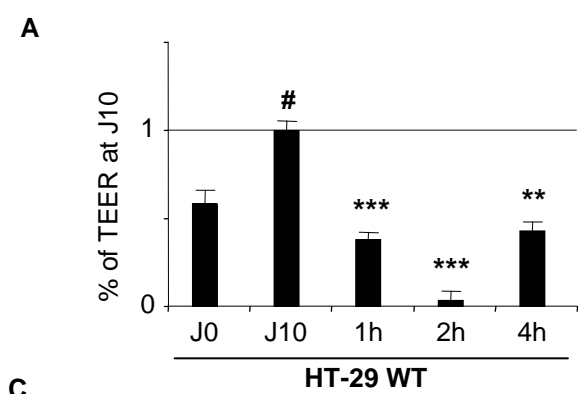


Figure 48: Le CRF2 augmente la perméabilité épithéliale para-cellulaire dans les cellules HT-29
A/ Histogrammes représentant les mesures de la TEER des cellules HT-29 WT J0 et J10 traitées 0 à 4h avec Ucn3 100nM (% TEER à J10). #, $p < 0.05$ entre J0 et J10; **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ vs J10. **B/** Analyses par westernblot de l'expression de la E-cadhérine, de p120ctn et de l'actine dans les cellules HT-29 CRF2-GFP J0 et J10 traitées 0 à 5h avec 100 nM d'Ucn3. **C/** Immunofluorescences de la E-cadhérine et de la p120ctn en microscopie confocale dans cellules HT-29 CRF2-GFP J10 traitées avec 0 à 5h d'Ucn3 100nM (barre d'échelle 5µm). **D/** Quantification par image J de la fluorescence (E-cadhérine) au niveau des contacts inter-cellulaires (n=45 contacts). Acquisitions d'images réalisés sur un microscope confocal Leica TCS SPE aux objectifs x40 ou x100 à huile.

localisation de la E-cadhérine et de la p120ctn a été suivie en microscopie confocale dans ces cellules traitées avec 100nM d'Ucn3 selon les temps indiqués, (Figure 48C). En absence de traitement avec l'Ucn3, la E-cadhérine est localisée à la membrane plasmique au niveau des contacts intercellulaires. Cette distribution membranaire est altérée après 1h et 2h de traitement à l'Ucn3 puis restaurée à 5h. L'expression de la E-cadherine a été quantifiée au niveau des zones de contacts intercellulaires (Figure 48D). L'intensité de la fluorescence au niveau du point de jonction est de 65/250 à 0 et 5h et de 45/250 à 1h et 2h de traitement avec 100nM d'Ucn3. La p120ctn est exprimée au niveau des zones de contacts et au niveau du cytoplasme. Avec 1h et deux heures de traitement avec l'Ucn3, l'expression de la p120ctn est diminuée dans ce plan de la cellule, particulièrement au niveau des zones de contact. A 5h de traitement, la localisation de la p120ctn est retrouvée dans certains contacts intercellulaires.

Nous avons préalablement décrit que la mise en place de jonctions adhérentes fonctionnelles nécessitait une étape de « maturation » caractérisée par un regroupement des protéines des jonctions intercellulaires dans les RL. Nous avons donc examiné l'effet de l'Ucn3 sur la distribution des protéines jonctionnelles dans ces RL identifiés par la flotilin, un marqueur spécifique, après séparation des membranes sur gradient de saccharose. L'expression de la flotilin, de la E-cadhérine et de la p120ctn a été analysée par westernblot dans les différents compartiments membranaires obtenus après leur séparation sur gradients de saccharose, à partir des HT-29 CRF2-GFP non différenciées (J0) et différenciées 10 jours en milieu Gal (J10) puis traitées 0, 2h ou 5h avec 100 nM d'Ucn3 (Figure 49). La flotilin, marqueur des RL, est exprimée dans les fractions 3-4 (F3-4) des différentes conditions. Elle est également très légèrement exprimée dans la fraction F11-12 des cellules à J0. Dans les cellules HT-29 CRF2-GFP non différenciées (J0), la E-cadhérine et la p120ctn sont absentes des RL et exprimées au niveau des fractions 5 à 12 avec un niveau plus élevé dans les fractions 9 à 12 (Figure 49A). Dans les HT-29 CRF2-GFP différenciées (J10), la E-cadherine et la p120ctn sont exprimées à un niveau équivalent dans les fractions 3 à 8 et plus fortement exprimées dans les fractions 9 à 12 (Figure 49B). A 2h d'Ucn3, l'expression de la E-cadhérine diminue dans la fraction F3-4 où la p120ctn n'est déjà plus présente (Figure 49C). Le couple E-cadhérine/p120ctn disparaît également de la fraction F5-6 et leur expression reste inchangée dans les fractions 9 à 12. A 5h d'Ucn3, la E-cadhérine et la p120ctn sont réexprimées dans les fractions 3 à 8 mais à un niveau plus élevé que dans les cellules J10 non traitées (Figure 49D). Les niveaux de E-cadhérine exprimés dans les fractions 9 à 12 sont inchangés alors qu'ils sont diminués pour la p120ctn. Les niveaux de E-cadhérine et de p120ctn on été quantifiés et

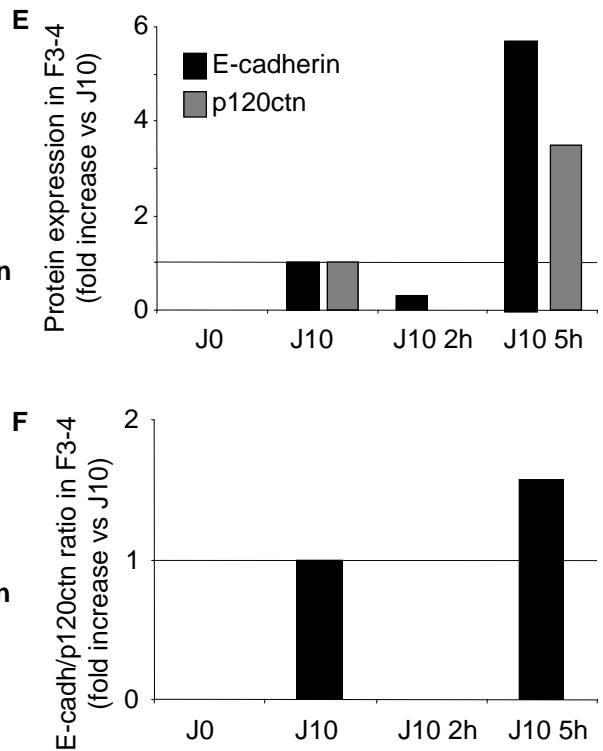
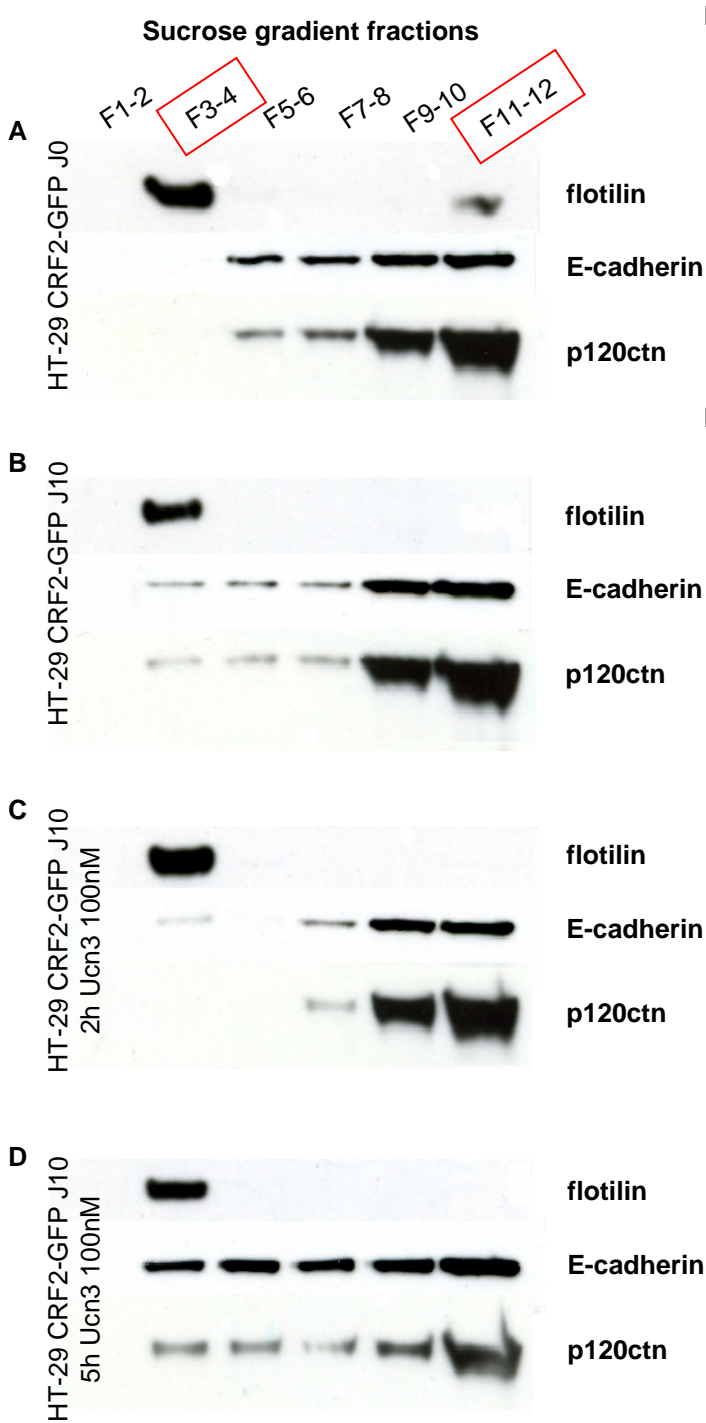


Figure 49: Le CRF2 altère la localisation des jonctions adhérentes dans les cellules HT-29 CRF2-GFP

Les membranes des cellules HT-29 CRF2-GFP ont été séparées sur gradients de saccharose et prélevées en 12 fractions de haut en bas du gradient. Un volume équivalent des fractions F1-2 à F11-12 a été déposé sur gel SDS-PAGE et analysé par westernblot pour la flotiline, la E-cadhérine et la p120ctn. **A/** dans les cellules à J0. **B/** Dans les cellules à J10, **C/** dans les cellules J10 traitées 2h avec 100nM d'Ucn3. **D/** dans les J10 traitées avec 5h d'Ucn3. **E/** Histogrammes représentant le niveau d'expression de la E-cadhérine et de p120ctn rapporté à la flotiline dans les fractions 3-4 enrichies en RL. **F/** Histogrammes représentant le rapport E-cadhérine/ dans les fractions 3-4 enrichies en RL. Les quantifications ont été effectuées avec le logiciel Image J.

rapportés à la flotilin dans les fractions 3-4 (Figure 49E). L'expression de la E-cadhérine diminue d'un facteur 3 à 2h de traitement et augmente d'un facteur 5,7 à 5h. La p120ctn est entièrement perdue dans les fractions 3-4 et augmente d'un facteur 3,5 à 5h. Les rapports d'expression E-cadhérine/p120ctn ont été mesurés dans les RL (Figure 49F). La p120ctn est absente des RL dans les J0 et les J10 traitées 2h avec l'Ucn3 et le rapport E-cadhérine/p120ctn est augmenté d'un facteur 1,6 dans les RL à 5h. L'expression des protéines impliquées dans les jonctions serrées a également été mesurée dans ces différents gradients. Cependant, leur expression est restreinte aux fractions 9 à 12 et ne varie pas avec la différenciation et le traitement à l'Ucn3. L'ensemble de ces résultats indiquent que le traitement par l'Ucn3 altère la localisation et l'organisation des jonctions adhérentes dans les cellules différenciées

Avant leur lyse, les cellules HT-29 CRF2-GFP ont été photographiées en microscopie à contraste de phase (Figure 50A). De J0 à J10, les cellules établissent un tapis cellulaire cohésif. Le traitement des cellules à J10 pendant 2h et 5h avec 100nM d'Ucn3 fait apparaître des zones de 3 à 20µm de diamètre réfringentes au contraste ("Zones réfringentes" ZR) de phase dans le feuillet épithélial. Des événements identiques sont également observés entre 5h et 48h de traitement par l'Ucn3 dans les cellules HT-29 CRF2 non différenciées mais cultivées à forte densité. Un maximum de ZR est observé à 24h de traitement avec l'Ucn3 (Figure 50B). L'induction de ZR identiques peut être produite par traitement des cellules HT-29 CRF2-GFP à la forskoline (FSK). Un tel traitement conduit à la production d'AMPC, comme l'activation de CRF2, suggérant que ce messager secondaire pourrait être un intermédiaire responsable de la formation de ces ZR. Le marquage fluorescent de l'actine fibrillaire avec la phalloïdine-TRITC dans les HT-29 CRF2-GFP permet de mettre en évidence des sphères colocalisées avec le signal DIC et situées au niveau intra-cellulaire à 2h et 5h de traitement (Figure 50C). Des lacunes intercellulaires sont également observées à 2h de traitement.

Le CRF2 retarde la différenciation des cellules HT-29

La mise en place des jonctions intercellulaires étant une des caractéristiques de la différenciation intestinale. Nous avons donc regardé l'effet de l'Ucn3 sur la différenciation des cellules HT-29 en mesurant l'activité de la phosphatase alcaline (PA) dans des lysats cellulaires prélevés au cours de la différenciation des cellules HT-29 traitées ou non avec 100 nM d'Ucn3 (Figure 51). L'Ucn3 est renouvelée tous les jours de la différenciation de J0 jusqu'à J10. En absence d'Ucn3, l'activité de la PA est augmentée progressivement à partir de

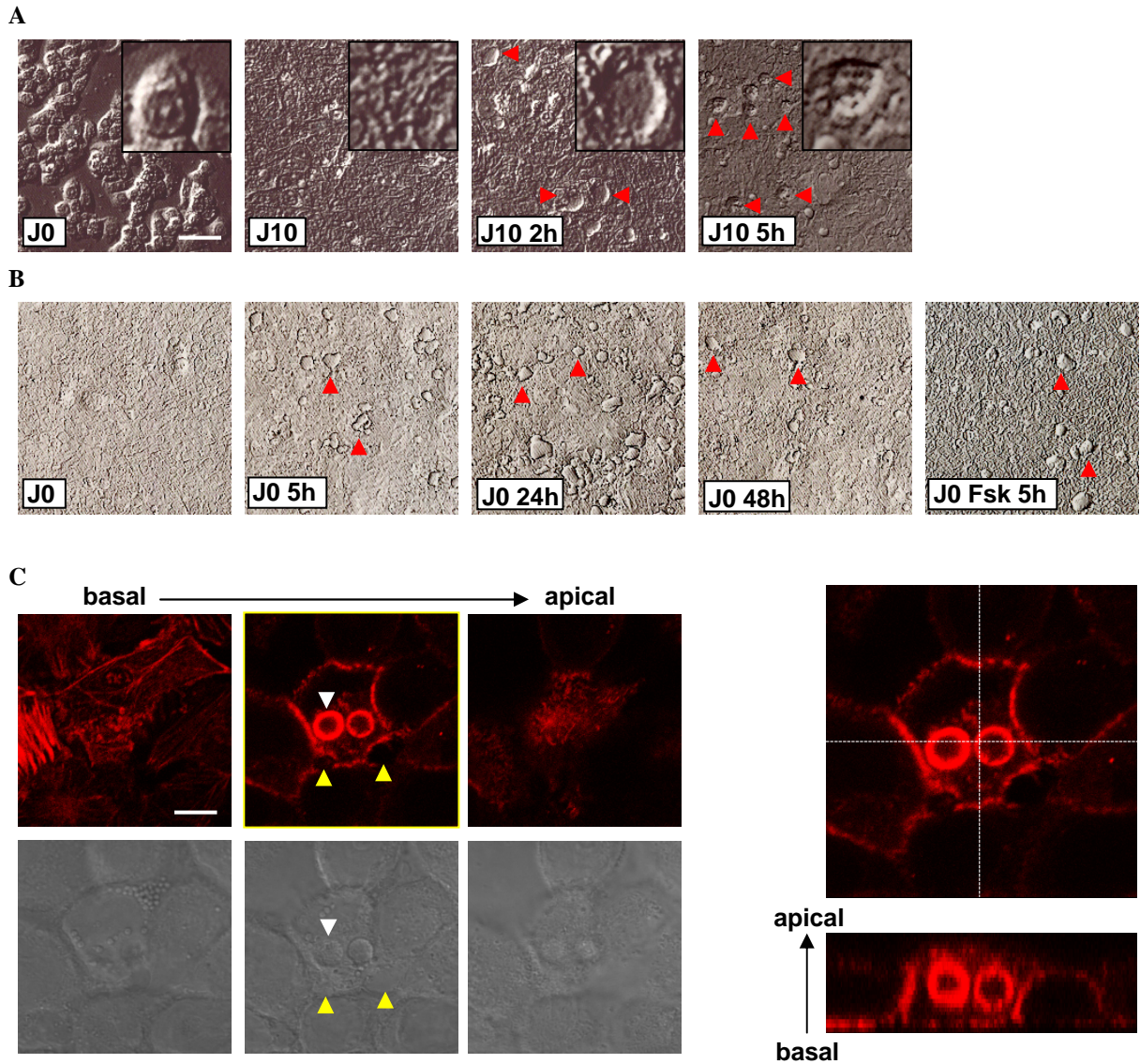


Figure 50: Le CRF2 augmenterait la perméabilité trans-épithéliale dans les cellules HT-29

A/ Les cellules HT-29 CRF2-GFP différenciées 10 jours sont traitées 0 à 5h avec 100 nM d' Ucn3 et observées en microscopie à contraste de phase (barre d'échelle 25 µm). **B/** Les cellules HT-29 CRF2-GFP non différenciées J0 sont traitées 0 à 48h avec 100 nM d' Ucn3 ou 5h avec de la Forskoline 10µM (Fsk) et observées en microscopie à contraste de phase. Formation de zones réfringentes dans le feuillet épithéliale (flèches rouges). **C/** Signal de fluorescence de la phalloïdine-TRITC (haut) et signal DIC (Differential interference contrast) (bas) au microscope confocal du pôle basal au pôle apical dans les HT-29 CRF2 traitées 2h avec 100nM d'Ucn3 (gauche). Formation de zones réfringentes dans les cellules (flèches blanches) et altération des contacts inter-cellulaires (flèches jaunes). Reconstruction en z de la fluorescence TRITC (droite). Acquisitions d'images réalisées sur un microscope confocal Leica TCS SPE aux objectifs x40 ou x100 à huile, barre d'échelle 10µm (C).

J4 (jour où apparaissent plusieurs marqueurs de la différenciation). A J10 son activité est multipliée par 4 comparée aux J0. Le traitement par l'Ucn3 retarde cette augmentation de l'activité PA qui augmente seulement à J10 d'un facteur 2 par rapport au J0.

Discussion

Expression du CRF2 dans l'épithélium intestinal

L'expression et la régulation du CRF2 intestinal ont principalement été décrites au niveau du SNE, des vaisseaux sanguins entériques et des cellules immunitaires de la muqueuse (Larauche et al., 2009b). Néanmoins, plusieurs études ont mis en évidence une expression au niveau des cellules épithéliales intestinales, notamment localisée dans les 2/3 supérieurs des cryptes au niveau du colon (Chatzaki et al., 2004). En revanche, la localisation exacte du récepteur dans la membrane plasmique des cellules épithéliales n'est pas clairement définie. Certains décrivent une localisation purement apicale du CRF2 (Chatzaki et al., 2004) et d'autre une localisation baso-latérale (Moss et al., 2007). Nos expériences de microscopie confocale, réalisées sur des coupes de tissus mais également sur des cellules *in vitro*, sont en faveur d'une distribution du CRF2 au pôle basal des cellules épithéliales du colon chez le rat Sprague Dawley et baso-latéral dans les cellules HT-29 différenciées 10 jours en milieu Gal. A J10, les cellules HT-29 sont à un stade précoce de la différenciation étant donné qu'elles ne présentent pas encore de jonctions serrées matures mises en évidence par l'absence d'occludine dans les RL (Nusrat et al., 2000). En dépit du fait que la ségrégation des protéines membranaires aux pôles apical et baso-latéral ait été suggérée comme indépendante de l'établissement des jonctions intercellulaires (Giepmans and van Ijzendoorn, 2009), le stade précoce de différenciation des cellules HT-29 permet encore la diffusion des protéines membranaires du pôle baso-latéral au pôle apical. Ces résultats confortent l'hypothèse d'une localisation du CRF2 au niveau du pôle baso-latéral des entérocytes différenciés. Une telle localisation expose par conséquent le CRF2 des cellules épithéliales à une stimulation paracrine par les ligands produits par les cellules immunitaires, le SNE ou encore autocrine par ceux produits au niveau de l'épithélium.

Régulation du CRF2 et de ses ligands par le stress

De nombreuses études se sont intéressées à la régulation du CRF2 et de ses ligands dans le tube digestif par l'inflammation (Chang et al., 2007) ou le stress quelle que soit sa nature (O'Malley et al., 2010b). Cependant, peu d'entre elles se sont focalisées sur sa régulation en

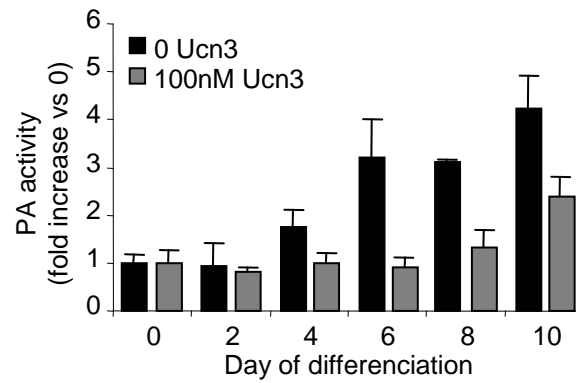


Figure 51: Effet de l'Ucn3 sur l'activité phosphatase alcaline au cours de la différenciation entérocytaire
 L'activité de la PA a été mesurée au cours de la différenciation des cellules HT-29 traitées ou non de manière chronique avec l'Ucn3 (100 nM).

fonction du temps « post-stress ». Des résultats non publiés du laboratoire ont également montré que le CRF2 est augmenté dans le SNC au niveau des noyaux para-ventriculaires (PVN) à 6h après un stress d'évitement de l'eau. Nous montrons qu'un stress aigu de contention de 1h induit une augmentation de l'expression du CRF2 à 6h et à 24h après le stress dans le colon proximal. La défécation est stimulée par le stress aigu (Bonaz and Tache, 1994); son augmentation pendant la phase de stress de contention reflète la réponse viscérale motrice au stress perçu par les animaux. Un autre indicateur du stress perçu pourrait être le taux plasmatique de glucocorticoïdes, mais le prélèvement des tissus digestifs selon une cinétique ne permet pas de relever les taux plasmatiques de glucocorticoïdes de manière comparable dans les différents groupes. La défécation constitue donc le seul indicateur non invasif du stress perçu. Dans le modèle d'inflammation chronique au DSS, les taux plasmatiques de corticostérone ainsi que l'expression du marqueur d'activation neuronale cfos (ARNm) dans le VLO sont augmentés chez les animaux CTX et DSS. Le VLO est une région du SNC impliquée dans l'intégration des afférences sensorielles olfactives, gustatives, visuelles, viscérales et somatiques (Hanamori et al., 1998). Son activation par des stimuli viscéraux nocifs est connue pour intégrer la composante émotionnelle liée à la douleur somatique et viscérale (Follett and Dirks, 1995; Yang and Follett, 1998). Le VLO joue ainsi un rôle pro-nociceptif notamment dans un modèle de douleur chronique chez le rat éveillé (Baliki et al., 2003). Chez les animaux DSS, l'activation neuronale retrouvée dans le VLO représente probablement la douleur viscérale en provenance du côlon inflammatoire. Les augmentations de glucocorticoïdes et de cfos mesurées chez les animaux CTX indiquent que leur hébergement dans la même pièce que les animaux DSS est responsable d'un stress chronique psychologique. L'activité plus importante du VLO chez les animaux DSS résultent probablement de la combinaison d'un stress psychologique chronique induit par la perception de l'état pathologique de leurs congénères additionné à la perception d'un stress intéroceptif induit par la douleur chronique de leur propre colite.

Chez les animaux CTX et DSS, l'expression du CRF2 est augmentée dans les cellules épithéliales des colons distaux. En revanche, l'expression du CRF2 a tendance à augmenter mais n'est pas significative dans les cellules épithéliales dissociées à partir du colon proximal chez les animaux ST-6h. La forte variabilité d'expression présente chez les animaux ST-6h n'exclue pas la présence de sous-goupes d'animaux plus ou moins sensibles au stress mais le manque d'effectifs ne permet pas de séparer en deux le groupe ST-6h. Une telle séparation pourrait être effectuée sur la base de la défécation. Il est également envisageable qu'il n'y ait

pas de régulation du CRF2 par le stress aigu dans les cellules épithéliales du colon et que la récurrence ou la chronicité du stress soit responsable de cette augmentation et de son maintien. Par ailleurs, les résultats obtenus dans le cadre d'une cinétique « post-stress » aigu de contention ne permettent pas de déterminer quelles sont les populations cellulaires impliquées dans cette régulation. Ainsi, les modifications observées dans les tissus totaux pourraient provenir d'une régulation au niveau du SNE, des cellules immunitaires et des vaisseaux sanguins où il est exprimé dans les conditions basales (Chatzaki et al., 2004; o'malley et al., 2010b; Saruta et al., 2005). Chez les animaux CTX et DSS, l'expression du CRF2 est augmentée dans les cellules épithéliales issues de la partie distale du colon et cette expression est corrélée avec l'expression des ARNm de *cfos* dans le VLO, y compris chez les animaux CTR. Ces éléments mettent ainsi en lien la perception du stress dans sa dimension psycho-émotionnelle avec l'augmentation du CRF2 dans les cellules épithéliales du colon. La perception du stress et/ou de l'inflammation conduit à l'activation de l'axe corticotrope et à la modulation de la balance sympatho-vagale. Plusieurs mécanismes faisant intervenir la production de cytokines et/ou de glucocorticoïdes sont impliqués dans la régulation de la transcription du CRF2 respectivement par l'activation des séquences promotrices CRE ou promotrices/activatrices GRE (Nanda et al., 2004). Dans un contexte inflammatoire, le facteur de transcription NFκB est également capable d'augmenter l'expression du CRF2 dans les cellules HT-29 (Moss et al., 2007). L'absence de régulation du CRF2 dans le tissu total issu de la région distale du colon après un stress aigu peut provenir de différences d'innervations sympathiques, parasympathiques et du SNE selon les parties du tube digestif (Altschuler et al., 1993). Ainsi, le CRF2 serait régulé en fonction de la concentration et de la combinaison des différents neuromédiateurs libérés. D'autre part, lors du stress nous avons montré que l'expression du CRF est significativement augmentée dans le colon distal et l'activation des récepteurs au CRF peut conduire à leur désensibilisation et dégradation (Dautzenberg et al., 2001). La dégradation des récepteurs activés par le CRF (principalement CRF1 mais aussi CRF2) pourrait ainsi masquer une variation de la production de CRF2 identique dans les sections proximale et distale du côlon.

L'augmentation des FFA et du cholestérol combinée à une diminution des triglycérides chez les animaux DSS résulte d'une mobilisation des ressources énergétiques, qui ne ressort pas chez les animaux CTX. Ces différences peuvent s'expliquer d'une part par la diminution de la prise de poids des animaux colitiques, d'autre part par la charge allostatique qui pèse sur les différents groupes d'animaux. En effet, l'altération de la barrière épithéliale intestinale des

rats DSS induit un déficit d'absorption des nutriments et mobilise plus de ressources énergétiques lors du développement de l'inflammation. Pour répondre à ces besoins d'énergie, les réserves lipidiques peuvent ainsi être catabolisées. L'activation neuronale dans le VLO semble indiquer que les rats DSS sont soumis à des influx nociceptifs plus importants que les animaux CTX. Le seuil de stress atteint chez les animaux DSS par rapport aux CTX induit probablement une mobilisation différente de la composante noradrénergique médulosurrénalienne de l'axe HPA. Une dysautonomie de la balance sympatho-vagale est également cohérente avec des travaux récents du laboratoire qui indiquent une augmentation du tonus sympathique et une diminution du tonus parasympathique lors de l'installation de la colite au DSS. Elle pourrait également faire intervenir des régulations différentes du métabolisme. L'absence de différences dans la régulation du CRF2 épithélial chez les animaux DSS et CTX indiquerait que cette régulation du CRF2 ferait intervenir des facteurs communs tels que la mobilisation de l'axe HPA.

Après le stress aigu de contention, seule l'expression du CRF est augmentée de manière significative au niveau du colon distal des animaux; néanmoins l'ensemble des peptides du système CRFergique tendent faiblement à augmenter au niveau du colon. Même si ces neuro-médiateurs du stress sont exprimés au niveau des différentes populations cellulaires de l'intestin (Buckinx et al., 2011; Larauche et al., 2009b), leur concentration est faible quand ils sont dosés dans le tissu total (Yuan et al., 2010a). La sensibilité de l'ELISA semble moins appropriée que l'HPLC utilisé dans d'autres études pour doser les Ucns (Saruta et al., 2005; Saruta et al., 2004). Par ailleurs, il est possible que des augmentations locales de la production de ces peptides ne puissent être détectées en raison du fait qu'elles sont très ciblées au niveau de la muqueuse et donc noyées dans le tissu total lors du dosage. Yuan et collaborateurs se sont intéressés à la régulation du CRF par l'axe HPA au niveau du colon proximal de rats traités au LPS (Yuan et al., 2010a). Leurs résultats suggèrent que dans cette section du tube digestif, le gène du CRF ne répond pas à la corticostérone et que l'axe HPA n'est pas responsable de son augmentation par le LPS. Il est par conséquent possible que l'augmentation du CRF observée dans la section distale du colon et non dans la proximale puisse provenir d'une réactivité à la corticostérone dépendante de la section du tube digestif comme c'est le cas dans le SNC (Chen et al., 2003).

Régulation des jonctions intercellulaires et de la différenciation par le CRF2

L'expression du CRF2 est augmentée dans les cellules épithéliales du colon en conditions inflammatoires chez les patients atteints de MICI (Moss et al., 2007). L'utilisation de souris KO CRF2 ou d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques suggère un rôle pro-inflammatoire du CRF2 impliquant les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale (Kokkotou et al., 2006). Son activation au niveau des mastocytes et/ou du SNE suite à l'injection de CRF ou lors d'un stress, conduit à l'augmentation de la perméabilité para-cellulaire et/ou trans-cellulaire (Kiliaan et al., 1998; Santos et al., 2008; Teitelbaum et al., 2008). Récemment, d'autres études proposent au contraire un rôle anti-inflammatoire du CRF2 mais celui-ci fait intervenir la micro-vascularisation intestinale lors d'une colite au DSS (Im et al., 2010). Peu d'études se sont intéressées à l'activation du CRF2 dans les cellules épithéliales intestinales et celles-ci mettent en évidence une régulation de la sécrétion de chemo-attractants comme l'IL8 ou la RMCP2 (Rat mast cell protease) (Kokkotou et al., 2006; Moss et al., 2007). Nous nous sommes intéressés à la régulation des jonctions intercellulaires des cellules épithéliales par le CRF2. Il est probable que les études précédentes soient passées à côté de cette régulation en raison de la localisation membranaire du CRF2 ou de la confluence des cellules utilisées. En effet, la localisation baso-latérale du CRF2 n'est peut être pas accessible dans les cultures de cellules fortement différenciées sur plastique qui ne permettent qu'une stimulation des récepteurs situés au pôle apical. A J10, la différenciation des cellules HT-29 est précoce et ne suffit pas à établir des jonctions entièrement étanches ni à restreindre la localisation du CRF2 au pôle basolatéral. Ainsi les conditions de cultures utilisées lors de la différenciation précoce des cellules HT-29 permettent une accessibilité du CRF2 à l'Ucn3 ajoutée dans le milieu de culture. Pour les modèles épithéliaux de cellules Caco2/TC7 ou de NCM460, la culture en insert permettrait d'accéder aux récepteurs basolatéraux. A l'inverse, l'étude du CRF2 dans un modèle cellulaire trop peu confluent peut mettre en évidence une régulation de la production de chemo-attractants comme l'IL8 mais pas de la cohésion des jonctions.

La présence des protéines des jonctions adhérentes est augmentée dans les RL durant la phase précoce de la différenciation entérocytaire des cellules HT-29 et l'altération des RL déstabilise l'organisation de ces jonctions (Chartier et al., 2011b). Nos résultats sont cohérents avec ces observations étant donné l'augmentation du couple E-cadhérine/p120ctn dans les RL des cellules HT-29 CRF2-GFP entre J0 et J10. Le traitement de ces cellules 2h avec l'Ucn3 induit une diminution de l'expression de la E-cadhérine et de sa localisation au niveau des RL. De même la p120ctn devient absente des RL. Ces modifications, coïncident avec la diminution de la TEER observée dans les HT-29 différenciées traitées pendant 2h à l'Ucn3

suggérant que la désorganisation des jonctions adhérentes suite à l'activation du CRF2 pourrait être responsable d'une augmentation de la perméabilité intestinale. De telles altérations de la distribution des protéines de jonctions intercellulaires sont retrouvées dans des modèles inflammatoires. En effet, la présence des protéines de jonctions serrées est diminuée au niveau des RL dans les cellules épithéliales intestinales de rats soumis à une colite induite au TNBS (Li et al., 2008). Des études récentes ont mis en évidence un couplage des récepteurs au CRF avec la kinase Src dans des myocytes de souris (Yuan et al., 2010b). La stimulation du CRF1 et/ou du CRF2 pourrait favoriser l'activation de Src par auto-phosphorylation ; or Src est fortement impliqué dans la régulation des jonctions adhérentes. Son activation transitoire est nécessaire à l'initiation des jonctions en phosphorylant la PI3K (Pang et al., 2005), mais elle joue un rôle déstabilisateur lorsque les jonctions sont formées (Anastasiadis et al., 2000). En phosphorylant la E-cadhérine et p120ctn, Src pourrait conduire à la dissociation des jonctions adhérentes (Ireton et al., 2002) et à l'ubiquitinylation puis la dégradation de la E-cadhérine par le protéasome (Fujita et al., 2002; Tsukamoto and Nigam, 1999). Ces éléments sont cohérents avec la perte d'expression de E-cadhérine à 2h et 5h de traitement avec l'Ucn3 et la disparition de la p120ctn à 2h au niveau des RL où la E-cadhérine est faiblement présente. Curieusement, nous avons pu constater une augmentation de l'expression de la E-cadhérine au niveau de la fraction déposée sur gradient de saccharose issue des HT-29 CRF2-GFP traitées 5h avec l'Ucn3. Ce résultat peut paraître en opposition avec celui obtenu dans le lysat total où nous observons une diminution d'expression. On pourrait envisager qu'il y ait un enrichissement membranaire de E-cadhérine après 5h de traitement à l'Ucn3 afin de rétablir les jonctions intercellulaires. Cet enrichissement pourrait résulter d'un recyclage plus actif. Quoiqu'il en soit, il est intéressant de constater que le profil d'expression de la E-cadhérine et de p120ctn dans les différentes fractions du gradient est intermédiaire entre celui des cellules non différenciées (J0) et celui des cellules différenciées (J10). Le rapport d'expression E-cadhérine/p120ctn est également modifié en faveur de la E-cadhérine dans les fractions F3 à F8 des cellules traitées à l'Ucn3 comme c'est le cas pour les J0. Ces résultats sont en accord avec la dissociation de p120ctn de la E-cadhérine lors de l'altération des jonctions adhérentes (Ireton et al., 2002). Ainsi, les molécules de E-cadhérines engagées dans les contacts des cellules HT-29 CRF2-GFP traitées 5h et retrouvées dans les fractions F3 à F8 constitueraient des jonctions adhérentes néoformées dont l'état de maturation est intermédiaire entre les J0 et les J10. Ces résultats sont également cohérents avec le retour partiel de la TEER au niveau des HT-29 traitées 4h avec l'Ucn3.

L'apparition de lacunes de tailles variables dans l'épithélium formé par les cellules HT-29 CRF2-GFP traitées avec l'Ucn3 pourrait également participer à l'augmentation de la perméabilité. Si leur formation entre les cellules peut s'expliquer par une diminution de l'expression de la E-cadhérine et la perte de cohésion des cellules, leur formation dans la cellule est plus énigmatique. Par ailleurs, la persistance des lacunes à 5h dans les HT-29 CRF2-GFP J10 alors que la E-cadhérine retourne se localiser à la membrane plasmique au niveau des RL suggère que des mécanismes indépendants pourraient participer à l'augmentation de la perméabilité par l'altération des contacts intercellulaires et la formation de lacunes intra-cellulaires. Les cellules confluentes à J0 sont également capables de former des lacunes dont le nombre et la taille augmentent jusqu'à 24h de traitement par l'Ucn3. Le CRF2 est un récepteur couplé aux protéines *G*αs (Chen et al., 1986). L'obtention de ce même phénotype avec un activateur de l'adénylate cyclase comme la forskoline, suggère que la production d'AMPc est impliquée dans ces mécanismes. *In vitro*, le traitement des cellules épithéliales intestinales avec des analogues de l'AMPc conduit à la diminution de l'expression de la E-cadhérine et des caténines et à la déstabilisation des jonctions adhérentes par des mécanismes dépendants de la PKA (Boucher et al., 2005). Nous ne pouvons déterminer si les "lacunes" observées traversent les cellules de part en part ou s'il s'agit d'un système vacuolaire et/ou endocyttaire volumineux. L'activation du CRF2 par le CRF dans le SNE en conditions de stress conduit à l'augmentation du flux transcellulaire par des mécanismes dépendants des mastocytes (Gareau et al., 2007; Santos et al., 1999; Santos et al., 2008). L'activation du CRF2 au niveau des cellules épithéliales intestinales pourrait également conduire à une augmentation de la perméabilité trans-cellulaire. Ainsi, les phénomènes de pinocytose et d'autophagie impliqués dans l'internalisation du milieu extra-cellulaire apical pourraient, en fusionnant, former les vacuoles correspondant aux ZR observées en microscopie à contraste de phase. Ces résultats sont cohérents avec l'augmentation du flux HRP observé dans différents modèles de stress chez l'animal (Gareau et al., 2007; Kiliaan et al., 1998; Santos et al., 1999).

Une perte d'expression de la E-cadhérine est également observée dans les cellules épithéliales du colon des rats ST-6h ayant subi un stress aigu et des rats CTX soumis à un stress psychologique chronique. Malgré cette déstabilisation des jonctions, les animaux CTX comparés au groupe CTR ne développent pas d'inflammation digestive. Le stress n'est pas nécessairement déclencheur de l'inflammation, dans le sens où il ne fait que favoriser par l'altération de la barrière épithéliale intestinale (Collins, 2001). En revanche, la mise en

contact du contenu de la lumière digestive avec les cellules immunitaires de la muqueuse constitue cet élément déclencheur. Il a été démontré que divers types de stress conduisent à l'augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale. De cette manière, le stress favorise les poussées inflammatoires chez les patients atteints de MICI et favorise les rechutes en rémission de colite dans les modèles animaux. Dans notre étude, les approches *in vivo* ne permettent pas d'établir un lien direct entre l'augmentation de l'expression du CRF2 et l'altération des jonctions adhérentes. Cependant, *in vitro*, l'activation du CRF2 par ses ligands conduit à l'altération des jonctions adhérentes dans les HT-29 CRF2-GFP différenciées. La formation des jonctions adhérentes est fortement impliquée dans les processus de différenciation entérocytaire par l'établissement de la polarité cellulaire et l'activation de voies de signalisation intra-cellulaires telles que la PI3K, responsables de l'expression de marqueurs spécifiques (Laprise et al., 2002; Peignon et al., 2006). L'administration chronique d'Ucn3 pendant la différenciation retarde l'augmentation de l'activité de la PA retrouvée dans les entérocytes différenciés (Chantret et al., 1988). L'altération récurrente des jonctions adhérentes pourrait diminuer l'activation des voies de signalisation nécessaires à la progression de la différenciation entérocytaire. Chez l'animal, l'activation chronique du CRF1 ou du CRF2 au niveau intestinal et le stress de séparation maternelle sont responsables de modifications de la différenciation des cellules épithéliales intestinales dans les différents lignages sécréteurs (Estienne et al., 2010). Par ailleurs, une diminution de la différenciation des colonocytes est observée 72h après un stress aigu chez la souris, conduisant à l'altération des jonctions intercellulaires et à l'augmentation de la perméabilité (Demaude et al., 2006). Nos résultats suggèrent que le lignage absorbant peut également être altéré par l'activation chronique du CRF2, au moins du point de vue qualitatif.

Implication du système CRFergique dans la progression tumorale des CCR

Introduction

L'environnement tumoral joue un rôle important dans la physiologie du cancer, soit par des interactions cellules-cellules ou cellules-MEC, soit par la production de médiateurs solubles (Mueller and Fusenig, 2004). Ces derniers interviennent dans la croissance et l'agressivité des tumeurs en activant des récepteurs spécifiques exprimés au niveau des cellules stromales, vasculaires et cancéreuses. La formation de métastases consécutive à la progression tumorale est la principale cause de décès chez les patients atteints de CCR. Elle fait intervenir la régulation des jonctions intercellulaires et cellule-MEC, favorisant ainsi la migration et l'invasion des cellules tumorales. Par ailleurs, des études ont montré que le stress diminue le pronostic de survie chez les patients atteints de CCR (Kojima et al., 2005). Le système CRFergique qui regroupe les principaux neuromédiateurs du stress (CRF/Ucns) a été fortement étudié pour son expression et sa régulation par le stress et l'inflammation au niveau du tractus gastro-intestinal (Tache and Perdue, 2004). En revanche, peu d'études se sont intéressées à l'expression et la fonction du CRF2 dans les cellules cancéreuse colorectales.

Dans cet article nous nous sommes intéressés à l'expression du CRF2 dans les CCR et à son implication dans la progression tumorale. *In vivo*, nous avons montré que l'expression du CRF2 est augmentée avec le grade tumoral des CCR humains et que sa localisation est altérée dans les tumeurs les plus dédifférenciées. *In vitro*, le CRF2 est exprimé dans diverses lignées tumorales où sa localisation est également altérée en fonction de leur statut de différenciation. Dans les cellules HT-29, l'activation du CRF2 par l'Ucn3 conduit à l'altération des JA par l'endocytose et la dégradation de la E-cadhérine et au remodelage des adhérences focales. Ces phénomènes dépendants de la voie de signalisation Src/ERK/FAK et de la production d'AMPc conduisent à la translocation nucléaire de la β -ctn, la p120ctn et du facteur de transcription kaiso, ainsi qu'à l'augmentation de la production de MMP3 et MMP7 et de la transmigration.

**Cell adhesion modulation by CRF2 signaling favors cell transmigration:
a link between stress and colorectal cancer progression**

Short title: Effects of CRF2 signaling on cell adhesion

B. Ducarouge^{1, 2}, N. Cristina^{1, 2}, M. Pelissier^{1, 2}, Y. Vachez³, M. Lainé^{1, 2}, B. Bonaz^{1, 4} and M.R. Jacquier-Sarlin^{1,2}

From : 1 : *Centre de Recherche Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences. Equipe du Stress et des Interactions Neurodigestives, Site Santé BP 170 La Tronche F-38042 Grenoble Cedex 9, France* ; 2 : *Université de Grenoble, F-38000 Grenoble, France* ; 3: *Student* ; 4 : *CHU Grenoble*

Grant support : Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer, AFA, GEFLUC and ESPOIR. B. Ducarouge and M. Pelisser are the recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. The authors thank Brigitte Peyrusse and Carole Carcenac for their excellent technical assistance

Abbreviations: AJ: adherens junctions, ctn: catenin, CRC: colorectal cancer, CRF, corticotropin releasing factor, ECM: extra cellular matrix, EMT: epithelial-mesenchymal transition, FA: focal adhesion, GI: gastrointestinal, GPCR, G protein coupled receptor, MMP: matrix metalloprotease, RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction, Ucn: urocortin.

Correspondence: Muriel Jacquier-Sarlin, *Centre de Recherche Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences. Equipe du Stress et des Interactions Neurodigestives, Site Santé BP 170 La Tronche F-38042 Grenoble Cedex 9, France.* Tel.: (+33) 456-52-06-50; Fax: (+33) 456-52-05-54;

E-mail: jacquier-sarlin@ujf-grenoble.fr

Disclosures: The authors disclose no conflicts.

Author contributions: B. Ducarouge: acquisition, analysis and interpretation of data; statistical analysis and drafting of the manuscript; N. Cristina, M. Pelissier, Y. Vachez, M. Lainé : acquisition of data; B. Bonaz : critical revision of the manuscript and M.R. Jacquier-Sarlin: drafting of the manuscript and study supervision

Abstract

Background & Aims: Cell adhesion complexes are dysregulated in colorectal cancer (CRC) and associate with their progression. Stress through its specific neuromediators and their receptors (Corticotropin Releasing Factor receptors, CRF1 and CRF2) has been proposed as a tumor promoting factor. . However mechanisms responsible for this process are unknown. We investigated the mechanism by which CRF2 signaling regulates cell adhesion complexes in colon cancer cells.

Materials and Methods: We used tissue microarray to examine the expression of CRF2 in CRC and normal colon samples. We used HT-29 cells, which stably overexpress CRF2-GFP for study CRF2-dependent signaling pathways and used chemical inhibitors to determine their role in CRF2 mediated cell dissociation and nuclear translocation of p120ctn and Kaiso. Cell transmigration and viability assays were performed in these cells. The cellular localization and activation of proteins were done by confocal microscopy and immunoblot analysis.

Results: CRF2 signaling induces an epithelial-mesenchymal transition process, which involves the Src/ERK/FAK phosphorylation cascade. Src activation correlates with E-cadherin endocytosis, p120ctn/kaiso nuclear localization, and matrix metalloprotease (MMP) transcriptional regulation. At the basal pole, focal adhesion complexes disappearance was associated with enhanced cell transmigration. These results correlate with the increased expression of CRF2 in high grade CRC. **Conclusion: CRF2 signaling modifies cell adhesion proprieties to reduce E-cadherin mediated contacts in CRC cells and, increasing their migrating activities. This pathway could be associated with CRC progression.**

Introduction

Microenvironnement controls cancer progression through cell contacts but also via mediator signals ¹. Adherens junctions (AJ) are strongly involved in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulation with the loss of E-cadherin expression at the cell membrane. The intracellular domain of E-cadherin interacts directly with β - and p120 catenins (ctn) which regulate cell-cell adhesion by modulating cadherin clustering and actin cytoskeleton anchorage, or by controlling cadherin endocytosis and stability (reviewed in ²). In E-cadherin deficient cells p120ctn shuttles to the cytoplasm and/or the nucleus where it exerts different functions depending on its partners ^{3,4}. Cytoplasmic p120ctn has key roles in modulating Rho GTPases ⁵ while its localization into the centrosomes of HT-29 cells favors chromosomal instability ⁶. In the nucleus, p120ctn can interact with the transcription factor kaiso and relieves its gene repression activity ^{7,8}. Abnormal localization of p120ctn is prognostic for aggressiveness in CRC ⁹.

Stress is an environmental tumor promoting factor in different *in vivo* models ¹⁰. Stress effects are mediated by specific neuromediators such as the corticotropin releasing factor (CRF) or its analogs urocortins (Ucns) ¹¹. They act through two G protein coupled receptors (GPCR), CRF1 and CRF2, with different affinities ¹². CRF and Ucn1 bind both receptors, while Ucn2/3 are selective for CRF2. CRF receptors are primarily coupled to G α s and trigger cAMP formation via adenylyl cyclase activation ¹³. Recently novel downstream G protein-independent pathways have been described for CRF receptors like Src which directly interacts with the endocytosed CRF receptors and takes part in the activation of ERK ^{14,15}. Stress has been proposed to be responsible for an impaired immune response contributing to tumor development and progression ¹⁶. They also mediate direct autocrine/paracrine actions in the micro-environment of tumor and neighboring cells ^{17,18}. CRF signaling is involved either in tumor initiation and progression or tumor inhibition, affecting cell proliferation, migration or

Résultats partie 2: Le système CRFergique dans les cancers colorectaux

tumor angiogenesis (for review ^{19, 20}). If CRF system is well documented in the gastrointestinal (GI) tract for its expression and regulation by stress and inflammation, its implication in colorectal cancers (CRC) is poorly investigated ^{21, 22}.

Herein, our results described aberrant expression of CRF2 in both CRC tumors and cell lines, according to their grade and/or differentiation status. Using the HT-29 cell line, we discovered that under Ucn3 activation, CRF2 promoted an EMT-like process and established a mechanism by which stress may participate in tumor progression of CRC.

Materials and Methods

Cell culture

The human colon adenocarcinoma cell lines HT-29, Caco2/TC7, HCT8-R and SW620 were cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in DMEM containing 25 mM glucose (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and supplemented with 10% FCS, penicillin and streptomycin. The human CRF2-GFP construct was cloned into the pBabe expression vector. Retroviral infections of HT-29 cells were as described previously²³ and then cultured in medium containing 2µg/ml puromycin (BD Biosciences), following to FACS selection of virus-infected cells.

Antibodies and reagent

For details, please see Supplementary Materials and Methods.

Tissue MicroArrays and immunohistochemistry

TMA CDA3 was purchase at SUPER BIO CHIPS (Korea). Paraffin was removed with xylen baths and blocked in TBS /BSA 3% /Tween-20 0.1%. The slide was incubated over night at 4°C with anti-CRF2 at 1:100. The further IHC was performed with Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Eurobio, Courtaboeuf, France), counterstained with 1 min incubation in Hematoxylin Gill's formula (Vector Laboratories), dehydrated and mounted with DPX. Every microscope acquisitions were down in (TRIBUN) and quantified with Image J.

cAMP quantification

Cells were treated as described, lysed in 0.1M HCl, centrifugated (600g 20 min at RT) and supernatant were quantified for cAMP using the ELISA kit: CorrelateTM EIA (Assay designs) according to the manufacturer's instructions. All experiments were done in triplicates.

Immunoblot and immunoprecipitation

Total lysates or subcellular fractions (obtained as described in Supplemental Experimental Procedures) were processed for immunoblot as described previously²⁴. For immunoprecipitation experiments cells were lysed in RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitor cocktails. An equal volume of each condition was immunoprecipitated

using the PureProteome™ Protein A and Protein G Magnetic beads kit (Millipore) according to manufacturer's instructions.

Confocal microscopy

Cells were grown on glass coverslips were treated as described previously²⁴. Antibodies were diluted in the blocking solution at 1:100 for primary and 1:500 for secondary antibodies. Fluorescence photomicrographs were taken with a confocal microscope at the x100 objective (Leica TCS SPE). For E-cadherin endocytosis, coverslips were incubated at 4°C with the HECD-1 antibody diluted at 1:100 in PBS. After 1h, unspecific binding was removed with three PBS washes and coverslips were returned to the initial cell culture condition, with or without Ucn3. As mentioned, cells were washed on ice with PBS /NaCl 0.5M /Acetic acid 0.5M /Azide 10mM to remove antibodies associated with extracellular cadherins. Coverslips were then treated like normal immunofluorescence.

Cell fractionation

For nuclear fractionation, cell were lysed in HEPES 10mM /MgCl₂ 1.5mM /KCl 10mM / DTT 0.5mM /NP40 0.05% /pH 7.9. After a 10 min centrifugation at 3000 rpm and 4°C, pellets were resuspended in HEPES 5mM / MgCl₂ 1.5mM /EDTA 0.2mM /DTT 0.5mM /glycerol 26% (v/v) /pH 7.9, and homogenized with 20 full strokes in Dounce. After 30 min incubation on ice, lysates were centrifuged 20 min at 24,000 g and 4°C. Supernatants containing nuclear extracts were analyzed by immunoblot. For cell membrane/cytosol fractionation, cells were lysed in Tris-HCl 5mM pH 7.4 /EDTA 1mM /sucrose 0.34M and stroked by 60 passages on a dounce homogenizer. Nuclei were discarded by centrifugation 2800 rpm, 10 min at 4°C. Then cytosol and total membranes were separated by centrifugation 100 000 rpm, 45 min at 4°C.

RT-PCR

Total RNA extractions were performed using Trizol™ reagent and 1µg of total RNA was denatured and subsequently processed for reverse transcription using M-MLV (Invitrogen) according to manufacturer's instructions and run on thermocycler (Eppendorf). MMP primers, annealing temperatures and numbers of cycles used are summarized in Supplemental Experimental Procedures. PCR products were size-separated in 1% agarose gels in Tris–acetate–EDTA.

Cell transmigration and viability

HT-29 CRF2-GFP cells were seeded on 24 well transwells (8µM pore size) (Becton Dickinson). After cell confluence, the culture medium was serum harvested over night in up and down chambers. Transmigration was then initiated by establishment of a serum gradient with 10% FCS in the lower chamber, with or without 100nM Ucn3 in each chamber. 72h after the initiation of transmigration, cotton swabs were used to remove cells on the upper surface of the tranwells. After fixation, migratory cells were stained with Hematoxylin Gill's formula (Vector Laboratories) and manually counted under the microscope. Cell viability was evaluated with the CellTiter 96 Kit (Promega) according to the manufacturer's instructions.

Densitometric analysis and statistics

Immunoblots shown are representative of at least three independent experiments. All graphs represent the mean value \pm SD of protein expression levels measured by densitometric analysis in “Image J” software (NIH). Statistics are unpaired t-test and statistical significance is given by the number of asterisks (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001).

Results

CRF2 expression in CCR tissues and cell lines.

While CRF receptor and ligand expressions have been extensively studied in the GI tract in normal tissues, there is few data concerning CRC. We examined the expression of CRF2 by IHC in colorectal dissections corresponding to normal tissues and different grade of tumors. Tissues were clustered in three groups according to their tumor grade: Normal (n=9), Low grade (n=24) from stage 1 to 3, and High grade (n=18) with stage 4 primary tumors and metastasis. CRF2 immunostaining was quantified and reported to the haematoxylin/eosin counterstained: the value of each sample is displayed as a black bar representative for six different fields (Figure 1A). Mean values (open circles) increased with the tumor grade as revealed by an one way ANOVA analysis $p=0.047$, respectively 1.0, 1.3 and 1.9 for normal, low grade and high grade tissues. High grade tumors express more CRF2 than normal tissues, a phenomenon which is statistically verified with a Man and Whitney test ($p=0.03$). Moreover the proportion of samples above 1 also increased from 22% in normal tissues to 33% and 72% tumors. We further compared CRF2 subcellular localization according to the differentiation status of the tumor (Figure 1B). While CRF2 staining was mainly at the basolateral cell membrane, we observed an increase in the cytoplasmic staining according to the dedifferentiation status of the tumor.

CRF2 expression level was also compared in four human CRC cell lines characterized by different stages of differentiation according to their intercellular junction maturation. Only HT-29 and Caco-2/TC7 cells establish mature AJ. Immunoblot analysis showed that CRF2 expression is revealed by two bands of 48 kDa (the native form) and 35 kDa respectively (Figure 2A). Cell lines expressed similar levels of CRF2: however HT-29 and Caco-2/TC7 cells express the same amount of both forms, while SW620 and HCT-8R mainly expressed the 35 kDa form. Using subcellular fractionation, we found that the native form of CRF2 was

principally identified in the membrane fraction while the 35 kDa fragment was only cytoplasmic (Figure 2B). This fragment could correspond to CRF2 degradation. CRF receptors expression and function are regulated by a desensitizing process characterized by its internalization which can subsequently be degraded in endolysosomal path, or recycling to the membrane^{25, 26}. CRC cell lines could produce CRF2 ligands responsible for its internalization. Using RT-PCR, we compared the ability of these cells to produce specific CRF2 ligands such as Ucn2 and Ucn3 (Figure 2C). Ucn2 mRNA levels were higher in SW620 and HCT8-R cells than in HT-29 and Caco2/TC7 cells. There were no differences in Ucn3 mRNA levels between all these cell lines. Ucn2/3 production was also evidenced at the protein level by ELISA (data not shown). To study CRF2 endocytosis in presence of ligands, we established a HT-29 cell line that stably overexpresses the CRF2 coupled to the GFP (HT-29 CRF2-GFP). Without Ucn3, CRF2-GFP was predominantly membranar at intercellular contacts and in few cytoplasmic vesicles (Figure 2D). In presence of Ucn3, cells dissociate (see arrows) and CRF2-GFP was found in cytoplasmic vesicles.

As CRF2 activates the adenylyl cyclase via Gas subunit, we have measured the production of cAMP in response to the CRF peptides to test the functionality of CRF2 in HT-29 cells (Figure 2E). At the concentration of 1 μ M, CRF, Ucn2 and Ucn3 induced respectively 0.5, 1.0 and 2.4pM of cAMP, which was completely reversed by Astressin 2b (A2b), a CRF2 specific antagonist. Ucn3 the more efficient agonist in our model was kept for further experiments. Exposure of HT-29 cells to Ucn3 induced a time-dependent increase in CRF2 expression (3 fold at 5h) (Figure 2F).

Altogether, these data indicate that CRF2 is expressed in human colorectal tumors as well as in CRC cell lines. Ligands produced by these cells were able to induce CRF2 signaling.

CRF2 signaling in HT-29 cells

CRF2 signalization has been recently extended with non canonical GPCR pathways, including Src kinase via a direct interaction. According to these data we found that CRF2 interacts with Src in HT-29 CRF2-GFP cells (data not shown). This association could trigger the activation of Src by phosphorylation of Tyr⁴¹⁸. We thus investigated Src activity over an 1h kinetic of Ucn3. Src-P^{Tyr418} expression was progressively increased from 5 to 30 min and then decreased, while the total Src remained unchanged (Figure 3A). The phosphorylated form of Src has been co-immunoprecipitated with CRF2 during the early stage of the Ucn3's kinetic (5-15 min) (Figure 3B). Furthermore, the co-localization between Src-P^{Tyr418} and CRF2-GFP was increased (6 fold at 5 min) at the basal pole of HT-29 CRF2-GFP cells in presence of Ucn3 as evidenced by confocal microscopy experiments (Figure 3C). The ERK pathway has often been activated in response to CRF2 activation. In HT-29 CRF2-GFP cells, ERK was phosphorylated on Tyr²⁰⁴ in a short time frame after Ucn3 exposure (Figure 3D). The ratio of phosphorylated/total ERK was increased by a 2.5 fold between 5 and 15 min and returned to its basal level at 30 and 60 min. The Src family inhibitor PP2 reversed the ERK activation induced by Ucn3 without changing its basal level (Figure 3D, lower panel). The MEK inhibitor U0126 induced the loss of the phosphorylated forms of ERK under basal conditions and after Ucn3 treatment.

These finding indicate that Ucn3-mediated CRF2 signaling results in Src phosphorylation, which in part transiently activates the ERK pathway.

Ucn3 disrupts AJ proteins through CRF2 signaling

We previously observed that HT-29 cells dissociate in presence of Ucn3, we thus examined its effect on AJ protein expression (E-cadherin and p120ctn) by confocal microscopy (Figure 4A). Cycloheximide was used to prevent cytoplasmic expression of neo-

synthesized proteins. In absence of Ucn3, both E-cadherin and p120ctn were expressed and localized at the cell membrane cortex. Under Ucn3 treatment, cells started to dissociate (see arrows), a phenomenon associated with morphological changes (cells were more spread) and AJ proteins altered localization. The pattern of E-cadherin appeared with thickened and disrupted linear membrane staining, following by punctuated intracellular staining suggesting the endocytosis of E-cadherin. The localization of p120ctn was also disturbed: membrane distribution was lost only in region where intercellular contacts were disrupted and cytosolic and then nuclear localizations were significantly increased. In order to confirm that Ucn3 induced E-cadherin endocytosis we performed internalization assays with HECD-1 antibodies (Figure 4B). Acidic washes nearly removed the whole membrane fluorescence at t0 (upper picture). Without Ucn3, HECD-1 labeling was slightly increased as punctuated membrane dots (left panel). In presence of Ucn3, cells rapidly dissociated: E-cadherin staining disappeared of the membrane and became predominantly in cytoplasmic vesicles at 15 and 60 min (right panel). Immunoblot analysis regarding the total amount of E-cadherin and p120ctn over Ucn3 treatment, revealed that E-cadherin levels were not altered within 5 hours and slightly decreased after 24 hr, while p120ctn level remain unchanged (Figure 4C).

Confocal microscopy showed increased nuclear localization of p120ctn. In the nucleus, p120ctn has been described to regulate the activity of the transcription factor kaiso. To further analyze p120ctn and kaiso levels in the nucleus, we performed immunoblot after nuclear fractionation. Ucn3 significantly increased p120ctn and kaiso nuclear expression (Figures 5A and 5B). The involvement of Src family kinases and ERK in the nuclear shuttling of these proteins was tested in presence of PP2 and U0126 inhibitors (Figure 5C). They induced a slight increase of basal expression of p120ctn and kaiso probably due to their toxic effect, but they reversed the Ucn3-induced nuclear accumulation of these proteins.

Invasive cells at the border of the tumor have increased levels of nuclear kaiso²⁷. In HT-29 cells, we observed a nuclear distribution of kaiso at the cluster periphery, which correspond to cells with few intercellular contacts (Figure 5D). In presence of Ucn3, the nuclear staining of kaiso reached the cells at the centre of the cluster, suggesting that Ucn3 affects HT-29 cell adhesion and that kaiso may participate in a CRF2-induced dedifferentiation process.

CRF2 signaling reorganizes actin cytoskeleton and cell-matrix contacts in favor of cell migration

Ucn3-induced cell dissociation was associated with cell shape remodeling. This process requires reorganization of the actin cytoskeleton. In this way, we noticed a modification of actin cytoskeleton with phalloidin-TRITC (Figure 6A). At the cortical level, Ucn3 induced a nearly complete loss of the cortical belt and at 30 min a perinuclear ring appeared in some cells (left panels). At the basal pole, actin was distributed at the cell periphery and organized as stress fibers spread across the cells (right panels). Under Ucn3, the actin staining was less intense at the cell periphery where contacts dissociate. There were also few stress fibers, which appeared shorter and more fragmented. Some actin rings and dots can be observed inside the cell at 60 min (arrows). Stress fibers have often been associated with focal adhesion (FA) kinase (FAK) phosphorylation. ERK is a Ser/Thr kinase, which could phosphorylate the FAK on Ser⁹¹⁰. We have thus determined the level of FAK phosphorylated in HT-29 CRF2-GFP cells exposed to Ucn3 (Figure 6B, upper panel). FAK P^{Ser910} was transiently increased with a maximum at 30 min. FAK phosphorylation was inhibited by PP2 and U0126 under basal conditions and after Ucn3 treatment suggesting that FAK phosphorylation was downstream of Src and ERK activations (Figure 6B, lower panel).

Actin stress fibers are closely associated with FA structures, which participate in cell-extracellular matrix interactions. These interactions are mediated by various transmembrane receptors, such as integrins, linked to cytoskeleton components and scaffold molecules like vinculin²⁸. We analyzed the effect of Ucn3 on FA through the distribution of vinculin (Figure 6C). Without Ucn3, vinculin was expressed in strong patches distributed mainly at the cell periphery. In presence of Ucn3, vinculin staining appeared as smaller punctuated claws that were homogeneously distributed all over cell and not only restricted at the periphery, especially at 30min. This label suggests that FA were transformed into nascent focal contacts that have been previously described to participate in cell migration²⁹. Similar patterns were observed for signaling proteins such as the activated form of Src (Src-P^{Tyr418}) which were also relocalized into these cell-matrix adhesion complexes in presence of Ucn3 as shown by confocal analysis (Figure 3C).

Next, we determined causal role of CRF2 activation in cell transmigration assays during 72h (Figure 7A). Ucn3 has induced a two fold increase in cell transmigration. This effect was not supported by modification of cell viability as shown Figure 7B. In addition to cell adhesion modulation, the remodeling of extra-cellular environment by MMP is strongly involved in cell migration and invasion. We hence examined the expression of MMP at the mRNA level (Figures 7C). RT-PCR indicated that Ucn3 induced a transient expression of MMP3 and MMP7 mRNA after 5 hr.

Altogether, these data indicate that CRF2 signaling induced important cell adhesion remodeling: at the basolateral side, AJ are disrupted and p120ctn translocated into the nucleus together with kaiso whereas at the basal pole FA switch for focal contacts. These modifications favor cell migration and provide evidence that CRF2 signaling may contribute to invasive phenotype of CCR.

Discussion

Our data highlights a pivotal role of CRF2 signaling in the regulation of cell adhesion that contribute to EMT process with enhance transmigration as observed during tumor progression.

Indeed, in HT-29 cells, we found that CRF2 signaling following exposure to Ucn3 contributes to the disorganization of AJ, a process associated to the endocytosis and further reduction of E-cadherin expression and to the nuclear localization of p120ctn. Using the 4T1 breast cancer cell line, Arranz and coworkers have previously demonstrated that peripheral CRF modified the expression of β -catenin and induced cell proliferation, showing a crosstalk between CRF and Wnt signaling³⁰. We also observed a nuclear translocation of β -catenin in response to Ucn3 (data not shown), but we focused this work on p120ctn nuclear translocation which relieves kaiso-mediated repression of several cancer-related genes, such as MMP7 or Wnt11 (for review⁸). In addition to its repressor activity, kaiso also contains enhancer motifs but the effect of p120ctn binding on this function is unknown³¹. We found that Ucn3 induced both the regulation of p120ctn/kaiso ratio and the transcription of MMP3 and MMP7. HT-29 cells express p120ctn isoform 3, the only isoform known to directly interact with kaiso, although both isoforms regulate subcellular localization and protein levels of kaiso in cancer lung^{7, 32}. P120ctn/kaiso complex could be regulated by phosphorylation dependent dissociation from cadherins: a process that could be mediated by Src since PP2 inhibited p120ctn/kaiso nuclear translocation. Furthermore, Src kinase activity, which is increased in many CRC in particular with high malignant potential, has been described to trigger cell-cell junction disassembly³³ and induce nuclear translocation of p120ctn. This phenomenon is also observed in a number of tumor cells lacking E-cadherin^{4, 34}, particularly in high grade undifferentiated and invasive tumors. Elevated levels of kaiso are frequently seen in human cancers and kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer³⁵. Invasive cells at the

border of the tumor have increased levels of nuclear kaiso²⁷. In HT-29 cells, we and other, have observed a nuclear distribution of kaiso at the cluster periphery. Nuclear kaiso may point a dedifferentiation process resulting from insufficient contacts with the cell matrix or surrounding cells.

CRF system has been proposed to affect migration and invasiveness of cancer cells, thus supporting tumor progression and metastasis. CRF2 is expressed especially in the infiltrating part of breast tumor¹⁷, where it may play a role in the invasiveness by cytoskeleton rearrangements and FAK phosphorylation^{18, 36}. The key mechanism we elucidated to account for this function is that CRF2 activation induces Src, ERK and FAK phosphorylation coupled to a disorganization of AJ, a rearrangement of actin cytoskeleton and cell transmigration. According to recent data, we observed that Src coimmunoprecipitate with CRF2¹⁴. In CRC, transient ERK activation seems to be sufficient to induce FAK phosphorylation on Ser⁹¹⁰ and subsequent migration and metastasis^{37, 38}. FAK phosphorylation on Ser⁹¹⁰ is also elevated with the tumor grade of CRC³⁸. We found that in HT-29 cells the CRF2 is also responsible for a transient increase in ERK activation that lead to FAK phosphorylation on Ser⁹¹⁰. This signaling could modulate the association of FAK with the scaffold protein paxillin³⁹, which regulates the FA turnover and actin cytoskeleton plasticity at the basal pole of the cell. Structurally, we found that CRF2 activation leads to a decrease in organized stress fibers in favor of shorter and less polarized fibers and/or actin dots. The cytoskeleton reorganization at the basal pole occurs concomitantly with a reduction of FA patches containing vinculin in favor of smaller claws corresponding to less mature FA or focal contacts. This is in agreement with smaller patches of paxillin and vinculin observed in metastatic-derived cell lines (SW620) compared to their primary tumor-derived cell lines (SW480)²⁹. Previous studies have demonstrated that the loss of FA complexes is involved in the transmigration of SW480 and HT-29 cells⁴⁰. The CRF2-induced impairment of AJ combined to FA complexes remodeling could favor HT-29 cells

transmigration. We identified that CRF2 signaling increases the expression of both MMP3 and MMP7. During cancer progression, these MMP enhance cell migration and invasion by degrading ECM components⁴¹ or extracellular fragment of E-cadherin, thus disrupting AJ⁴².

The significance of our *in vitro* data is strengthened by the fact that CRF2 expression is up-regulated in high grade CRC. Furthermore, in endometrial cancer CRF2 is increased in the cytoplasm of tumor cells associated with advanced stage⁴³. In our work, CRF2 expression was at the membrane in normal tissues while cytoplasmic staining increase according to the dedifferentiation status of the tumors or adenocarcinoma cell lines. Expression of CRF receptor ligands was first detected in various tumors of the GI tract by radioimmunoassay⁴⁴. CRF/Ucn peptides are inappropriately secreted by several tumors^{45, 46} and sometimes it correlates with the aggressiveness of cancers⁴⁷. Our results suggest that the dedifferentiation status associated to the loss of cell-cell junctions could modulate CRF2 activation by the increased production of Ucn2. This hypothesis is supported by the overproduction of Ucn2 in SW620 and HCT8-R cells, which induce receptor endocytosis. This autocrine activation could take part in the regulation of cancer cell migration and invasiveness all along the metastasis process.

Stress is recognized to participate in the development and aggravation of GI disorders that are mediated by both brain and peripheral CRF signaling (for review^{48, 49}). Indeed CRF2 and its ligands are overexpressed in the colon of inflammatory bowel diseases (IBD) patients while AJ protein expression is altered⁵⁰. We found that similar cell adhesion alterations occur in tumor cells thus providing a new role of stress-related CRF system in CRC. Our results suggest a mechanism by which microenvironmental production of stress mediators promotes an EMT like process in favor of aggressive and invasive tumors. According to its potential

implication in growth, angiogenesis, migration and metastasis, via activation of locally expressed ligands, the CRF2 could be clinically exploited as a target for new therapeutic approaches.

References

1. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 2001;1:46-54.
2. Reynolds AB, Carnahan RH. Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15:657-63.
3. Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, et al. Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol* 2000;148:189-202.
4. van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes K, et al. Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7980-5.
5. Anastasiadis PZ. p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:34-46.
6. Chartier NT, Oddou CI, Laine MG, et al. Cyclin-dependent kinase 2/cyclin E complex is involved in p120 catenin (p120ctn)-dependent cell growth control: a new role for p120ctn in cancer. *Cancer Res* 2007;67:9781-90.
7. Daniel JM, Reynolds AB. The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol* 1999;19:3614-23.
8. van Roy FM, McCrea PD. A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer? *Nat Rev Cancer* 2005;5:956-64.
9. Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, et al. Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer Res* 2005;65:10938-45.
10. Hasegawa H, Saiki I. Psychosocial stress augments tumor development through beta-adrenergic activation in mice. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:729-35.
11. Vale W, Spiess J, Rivier C, et al. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 1981;213:1394-7.
12. Grace CR, Perrin MH, Cantle JP, et al. Common and divergent structural features of a series of corticotropin releasing factor-related peptides. *J Am Chem Soc* 2007;129:16102-14.
13. Chen FM, Bilezikjian LM, Perrin MH, et al. Corticotropin releasing factor receptor-mediated stimulation of adenylate cyclase activity in the rat brain. *Brain Res* 1986;381:49-57.
14. Yuan Z, McCauley R, Chen-Scarabelli C, et al. Activation of Src protein tyrosine kinase plays an essential role in urocortin-mediated cardioprotection. *Mol Cell Endocrinol* 2010;325:1-7.
15. Van Kolen K, Dautzenberg FM, Verstraeten K, et al. Corticotropin releasing factor-induced ERK phosphorylation in AtT20 cells occurs via a cAMP-dependent mechanism requiring EPAC2. *Neuropharmacology* 2010;58:135-44.
16. Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol* 2004;5:617-25.

17. Kaprara A, Pazaitou-Panayiotou K, Chemonidou MC, et al. Distinct distribution of corticotropin releasing factor receptors in human breast cancer. *Neuropeptides* 2010;44:355-61.
18. Androulidaki A, Dermitzaki E, Venihaki M, et al. Corticotropin Releasing Factor promotes breast cancer cell motility and invasiveness. *Mol Cancer* 2009;8:30.
19. Wang J, Li S. Corticotropin-releasing factor family and its receptors: tumor therapeutic targets? *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:785-8.
20. Kaprara A, Pazaitou-Panayiotou K, Kortsaris A, et al. The corticotropin releasing factor system in cancer: expression and pathophysiological implications. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:1293-306.
21. Ducarouge B, Jacquier-Sarlin M. Stress neuromediators are key regulators of the intestinal barrier: Link to inflammation and cancer. *Trends in Cell & Molecular Biology* 2012.
22. Kiank C, Tache Y, Larauche M. Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: role of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Behav Immun* 2010;24:41-8.
23. Chartier NT, Laine MG, Ducarouge B, et al. Enterocytic differentiation is modulated by lipid rafts-dependent assembly of adherens junctions. *Exp Cell Res* 2011.
24. Chartier NT, Laine M, Gout S, et al. Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. *J Cell Sci* 2006;119:31-46.
25. Markovic D, Punn A, Lehnert H, et al. Intracellular mechanisms regulating corticotropin-releasing hormone receptor-2beta endocytosis and interaction with extracellularly regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol Endocrinol* 2008;22:689-706.
26. Rasmussen TN, Novak I, Nielsen SM. Internalization of the human CRF receptor 1 is independent of classical phosphorylation sites and of beta-arrestin 1 recruitment. *Eur J Biochem* 2004;271:4366-74.
27. Soubry A, van Hengel J, Parthoens E, et al. Expression and nuclear location of the transcriptional repressor Kaiso is regulated by the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2005;65:2224-33.
28. Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, et al. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 1995;131:791-805.
29. von Wichert G, Krndija D, Schmid H, et al. Focal adhesion kinase mediates defects in the force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton linkages in metastatic colon cancer cell lines. *Eur J Cell Biol* 2008;87:1-16.
30. Arranz A, Venihaki M, Mol B, et al. The impact of stress on tumor growth: peripheral CRF mediates tumor-promoting effects of stress. *Mol Cancer* 2010;9:261.
31. Rodova M, Kelly KF, VanSaun M, et al. Regulation of the rapsyn promoter by kaiso and delta-catenin. *Mol Cell Biol* 2004;24:7188-96.
32. Dai SD, Wang Y, Jiang GY, et al. Kaiso is expressed in lung cancer: its expression and localization is affected by p120ctn. *Lung Cancer* 2010;67:205-15.
33. Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22:337-58.
34. Roczniak-Ferguson A, Reynolds AB. Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity. *J Cell Sci* 2003;116:4201-12.
35. Prokhortchouk A, Sansom O, Selfridge J, et al. Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer. *Mol Cell Biol* 2006;26:199-208.
36. Olson MF, Sahai E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* 2009;26:273-87.

37. Jiang X, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. Differential FAK phosphorylation at Ser-910, Ser-843 and Tyr-397 induced by angiotensin II, LPA and EGF in intestinal epithelial cells. *Cell Signal* 2007;19:1000-10.
38. Li LH, Zheng MH, Luo Q, et al. P21-activated protein kinase 1 induces colorectal cancer metastasis involving ERK activation and phosphorylation of FAK at Ser-910. *Int J Oncol* 2010;37:951-62.
39. Hunger-Glaser I, Salazar EP, Sinnett-Smith J, et al. Bombesin, lysophosphatidic acid, and epidermal growth factor rapidly stimulate focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-910: requirement for ERK activation. *J Biol Chem* 2003;278:22631-43.
40. Adachi S, Yasuda I, Nakashima M, et al. Rho-kinase inhibitor upregulates migration by altering focal adhesion formation via the Akt pathway in colon cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2011;650:145-50.
41. Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:101-17.
42. Noe V, Fingleton B, Jacobs K, et al. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 2001;114:111-118.
43. Miceli F, Ranelletti FO, Martinelli E, et al. Expression and subcellular localization of CRH and its receptors in human endometrial cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2009;305:6-11.
44. Wakabayashi I, Ihara T, Hattori M, et al. Presence of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in human tumors. *Cancer* 1985;55:995-1000.
45. Arcuri F, Cintonino M, Florio P, et al. Expression of urocortin mRNA and peptide in the human prostate and in prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 2002;52:167-72.
46. Shahani S, Nudelman RJ, Nalini R, et al. Ectopic corticotropin-releasing hormone (CRH) syndrome from metastatic small cell carcinoma: a case report and review of the literature. *Diagn Pathol* 2010;5:56.
47. Minas V, Rolaki A, Kalantaridou SN, et al. Intratumoral CRH modulates immune-escape of ovarian cancer cells through FasL regulation. *Br J Cancer* 2007;97:637-45.
48. Larauche M, Kiank C, Tache Y. Corticotropin releasing factor signaling in colon and ileum: regulation by stress and pathophysiological implications. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 7:33-46.
49. Tache Y, Bonaz B. Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J Clin Invest* 2007;117:33-40.
50. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Efstathiou J, et al. Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 1998;185:413-8.

Figure Legends

Figure 1: CRF2 expression in CRC

(A) Histograms representing CRF2 expression in normal tissues or human CRC (low and high grades). Each sample is represented as dark bars +/- SD and the mean value of each group as open circles +/- SD. High grade is statistically different from normal at *, $p < 0.05$. (B) CRF2

immunohistochemistry of normal tissue and well, moderately or poorly differentiated tumors.
Scale bar, 10 μm .

Figure 2: CRF2 expression in CRC cell lines

(A) CRF2 expression in SW620, HCT-8R, HT-29 and Caco2/TC7 cell lines as detected by immunoblot analysis. Actin was used as a loading control. (B) Immunoblot analysis of subcellular distribution of CRF2 in HT-29 cells. Total: total lysate, mb: membrane, cyto: cytosol (cyto). (C) RT-PCR showing Ucn2 and Ucn3 mRNA expression in CRC cell lines. GAPDH was used as control. (D) Confocal microscopy analysis of CRF2-GFP distribution in Ucn3-treated HT-29 cells. Scale bar, 15 μm . (E) cAMP production +/- SD by HT-29 cells treated with 1 μM CRF, Ucn2 or Ucn3 in presence (gray bars) of 1 μM Astressin2B (A2B) or not (dark bars). (F) Expression of CRF2 in HT-29 cells following Ucn3: Histograms represent the densitometric levels of CRF2 corresponding to immunoblot analysis.

Figure 3: CRF2 signaling in HT-29 CRF2-GFP cells

(A) Immunoblot analysis of Src-P^{Tyr418} in HT-29 CRF2-GFP cells following Ucn3. (B) CRF2 was immunoprecipitated from total lysate of Ucn3-treated HT-29 CRF2-GFP cells and levels of Src-P^{Tyr418} were detected by immunoblots. (C) Confocal analysis of CRF2-GFP and Src-P^{Tyr418} in HT-29 cells. (D) Immunoblot analysis of ERK-P^{Tyr204} in HT-29 CRF2-GFP cells following Ucn3: Histograms represent the densitometric ratio of ERK-P^{Tyr204} to ERK. Effects of PP2 or U0126 inhibitors on Ucn3 induced ERK-P^{Tyr204}.

Figure 4: CRF2 signaling disrupts AJ

(A) Confocal immunofluorescence analysis of E-cadherin (left) and p120ctn (right) in HT-29 CRF2-GFP cells following Ucn3. Scale bar, 10 μm . (B) Confocal immunofluorescence

analysis of HECD-1 antibodies directed against the extra-cellular domain of the E-cadherin in HT-29 CRF2-GFP treated (right) or not (left) with Ucn3 f. Scale bar, 5µm. (C) Immunoblot analysis of E-cadherin and p120ctn expression in HT-29 CRF2-GFP cells following Ucn3.

Figure 5: CRF2 induces nuclear shuttling of p120ctn and kaiso

Immunoblot analysis of p120ctn (A) and kaiso (B) expression in nuclear extracts of Ucn3-treated HT-29 CRF2-GFP cells. (C) P120ctn and kaiso expression in nuclear extracts of HT-29 CRF2-GFP cells pre-treated 1 hr with PP2 or U0126 inhibitors. (D) Confocal microscopy to determine cellular distribution of kaiso, Topro 3 served as nuclear marker. Scale bar, 50µm.

Figure 6: CRF2 reorganize the actin cytoskeleton and cell-matrix contacts

(A) Phalloidin-TRITC fluorescence is analyzed by confocal microscopy at the cell-cell contact (median pole) or at the basal pole of HT-29 CRF2-GFP cells following Ucn3. Scale bar, 5µm. (B) Immunoblot analysis of FAK-P^{Ser910} in HT-29 CRF2-GFP cells following Ucn3: kinetic experiment (upper panel) and PP2 and U0126 inhibitors effects (lower panel). (C) Confocal analysis of vinculin distribution at the basal pole of HT-29 CRF2-GFP following Ucn3. Scale bar, 10µm.

Figure 7: CRF2 signaling induces MMP expression and cell transmigration

(A) Phase contrast analysis of HT-29 CRF2-GFP cell transmigration (72 hr) following Ucn3. (B) Cell viability of sub-confluent HT-29 CRF2-GFP cells following Ucn3. (C) RT-PCR analysis of MMP3 and MMP7 mRNA expression in HT-29 CRF2-GFP cells.

Supplemental Experimental Procedures

Antibodies and reagent

Polyclonal antibodies directed against CRF2 were from Abcam (12964, Abcam, Paris, France) and Upstate Biotechnology (AB9420, Chemicon International, UK). Anti-human E-cadherin (Clone HECD1) monoclonal antibody was from Takara Biochemicals (Cambrex Bio Science, Paris, France). Monoclonal antibody against p120ctn (clone 98) was purchased from BD Biosciences/Transduction Laboratories (Pont de Claix, France). Anti-actin polyclonal antibodies (Cat. No.A2066), and anti-kaiso (Clone K4263), anti-vinculin (V4505) monoclonal antibodies were obtained from Sigma Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). Polyclonal antibody directed against Src-P^{Tyr418} (AT-7135) was purchased from MBL Calbiochem (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France), monoclonal anti-Src (Clone GD11) was from Millipore (Molsheim, France). Monoclonal antibodies against ERK (E17120) and ERK-P^{Tyr204} (sc-7383) were from BD transduction laboratories (Pont de Claix France) and Santa cruz from TEBU (Le perray en Yvelines, France) respectively. Polyclonal anti-FAK-P^{Ser910} (44-596G) was from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Alexa-conjugated goat anti-mouse secondary antibody was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Horse Radish Peroxydase-conjugated goat anti-mouse was from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France), donkey anti-rabbit antibodies were from Jackson Immunoresearch (Immunotech, Marseille, France). Mouse and Rabbit Trueblot antibodies used as secondary antibodies in immunoprecipitation experiments were from eBioscience (Cliniscience, Montrouge, France). Topro 3 was from Invitrogen. Urocortins, CRF and astressin 2B were purchased from Sigma Aldrich.

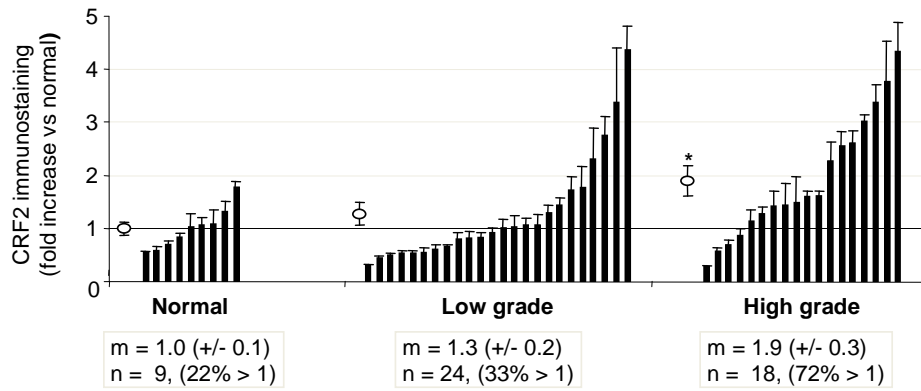
Tables 1: Primers used in reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Gene		Lengh	Annealing temperature	Number of cycles
GAPD H	5'- TCCTCCTGCGACAGTCA-3' 5'- CACCACCTTCTTGATGTCATC-3'	350	60	30
Ucn2	5'- CCTCACGATGACCAGGTG-3' 5'- CTCTCTCAGGCTCAGCAGTG-3'	357	54.4	40
Ucn3	5'- ATGCTGATGCCGGTCCAC-3' 5'-CTACTTCTTCCTCCCAATTTG-3'	357	54.1	40
MMP3	5'- TGTAGAAGGCACAATATGGGCAC-3' 5'- CAGTCACTTGTCTGTTGCACACG-3'	264	60.3	35
MMP7	5'- ATGGGGAAGTCTGACATCAT-3' 5'- CCAGCGTTCATCCTCATCGAA-3'	151	55	35

Résultats partie 2: Le système CRFergique dans les cancers colorectaux

GAPDH, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; MMP, matrixmetalloproteinase; bp, base pairs.

A



B

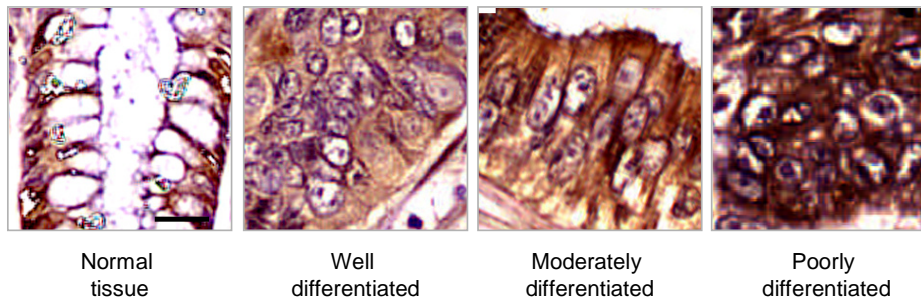


Figure 1

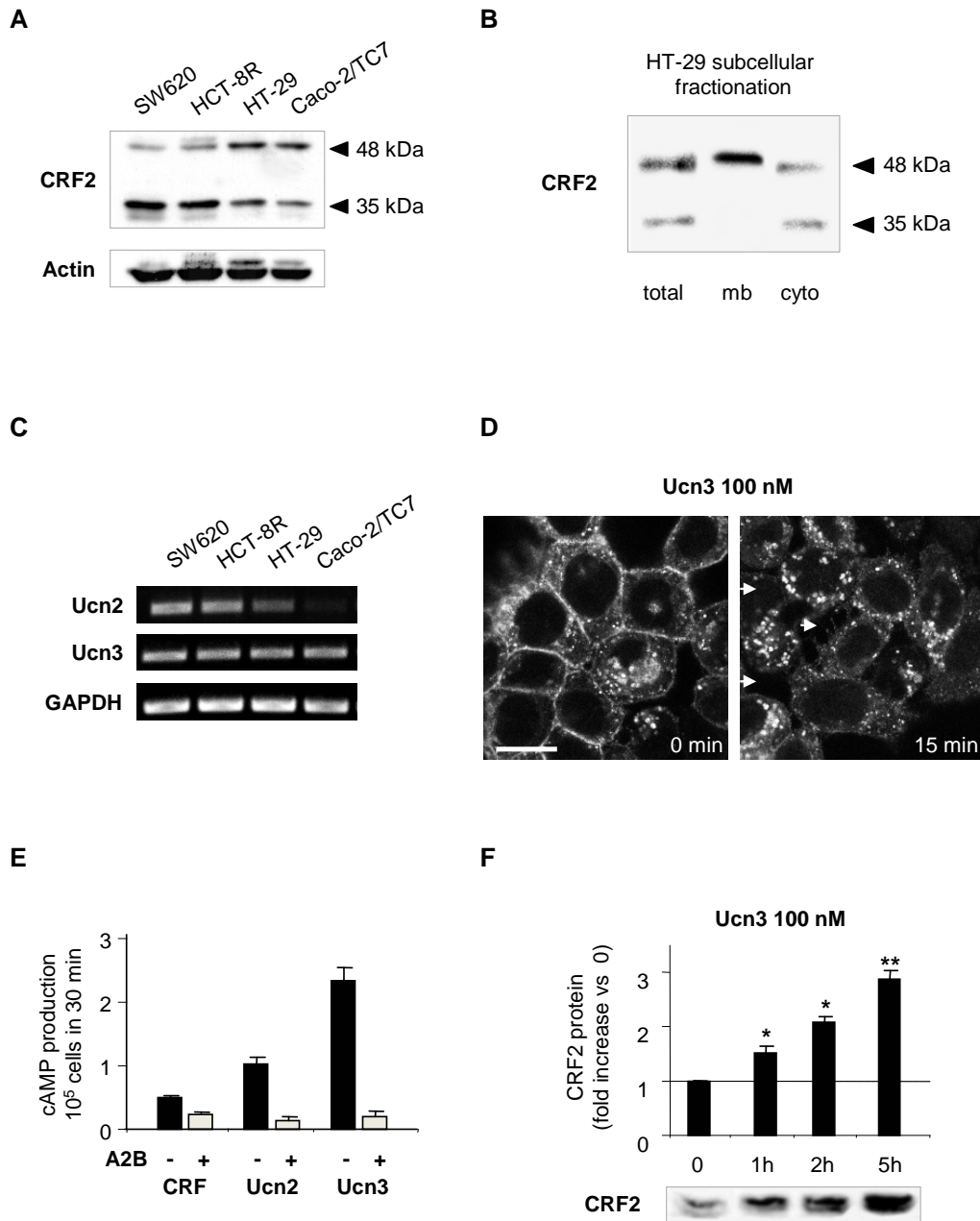


Figure 2

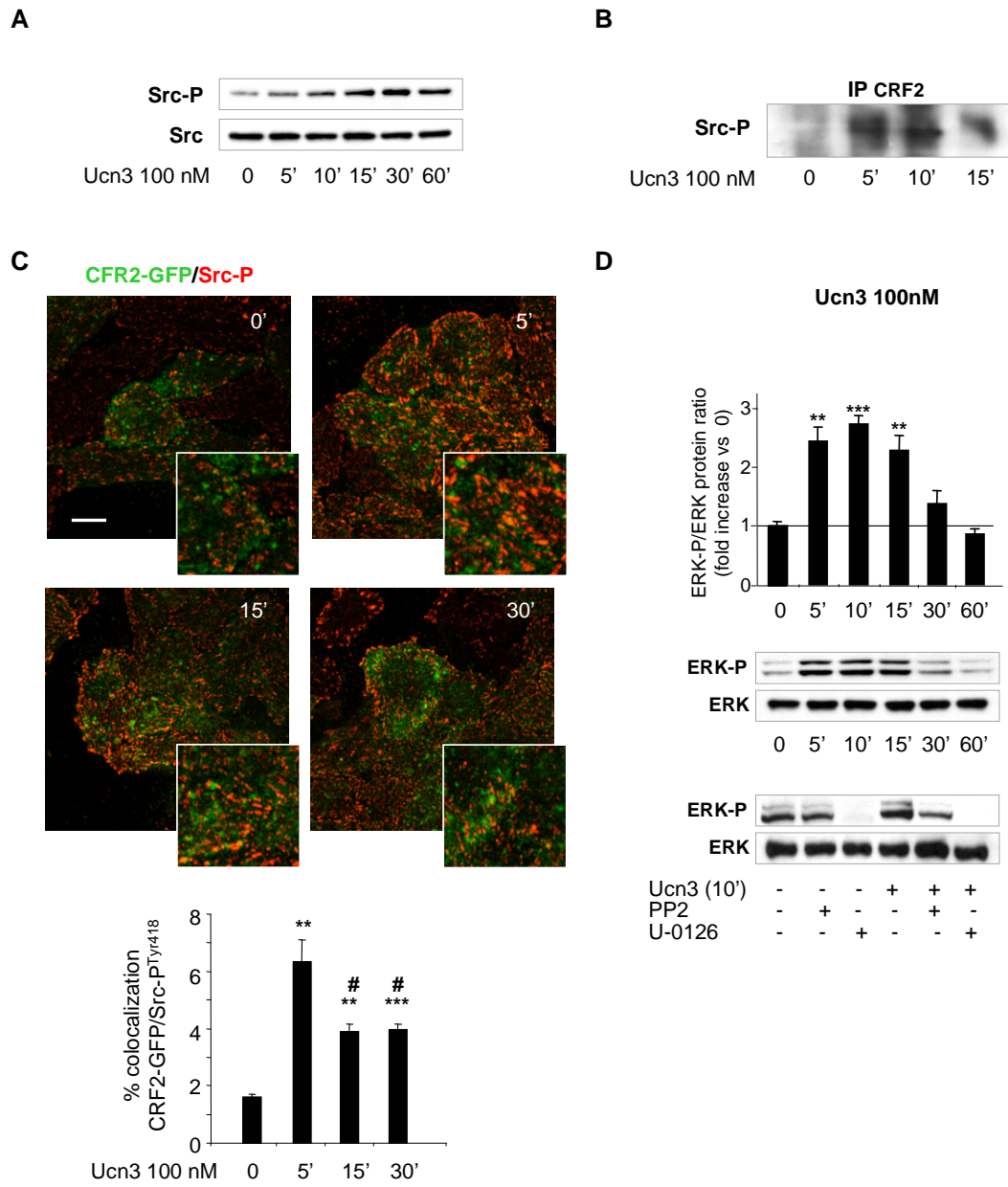


Figure 3

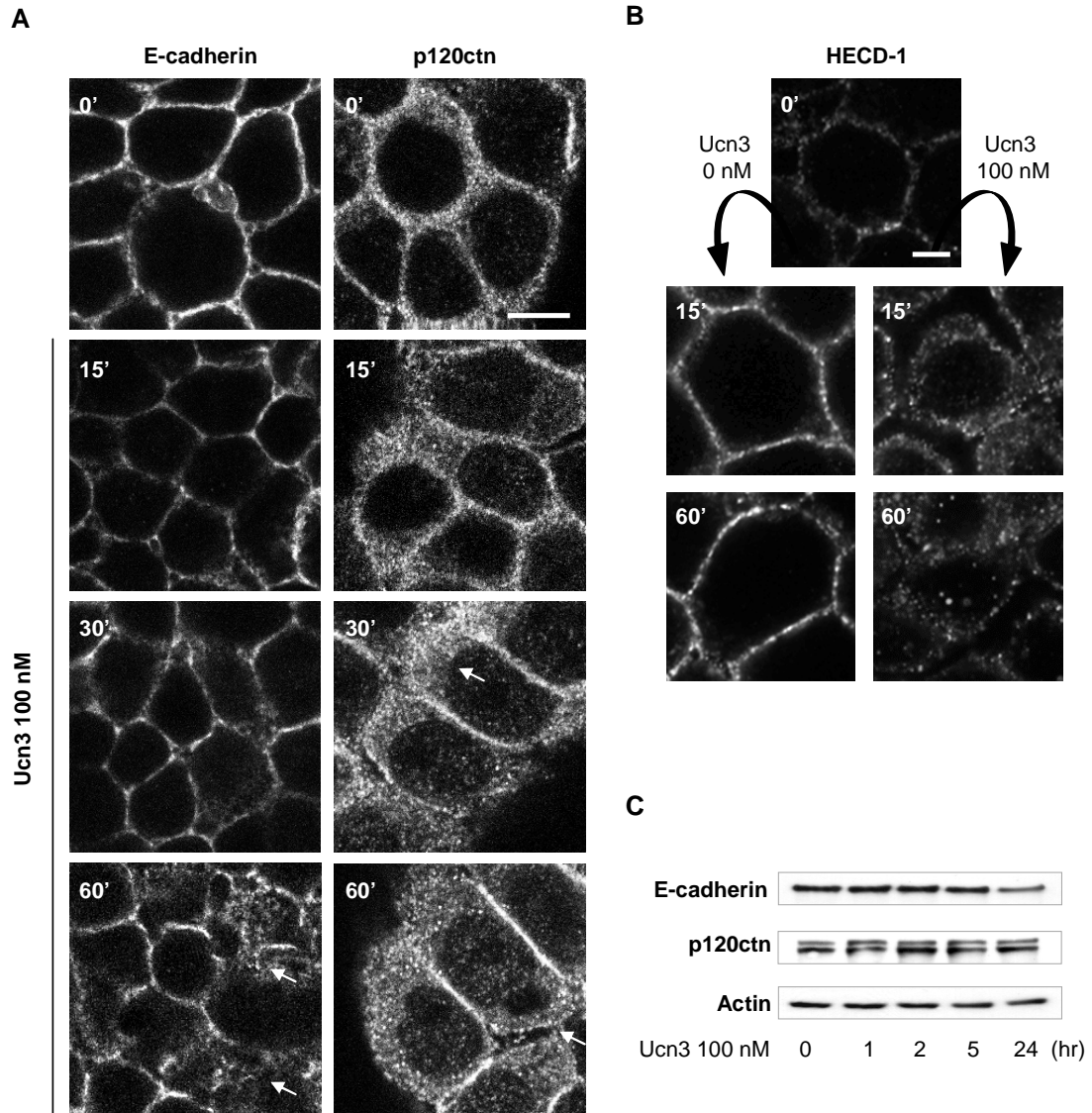


Figure 4

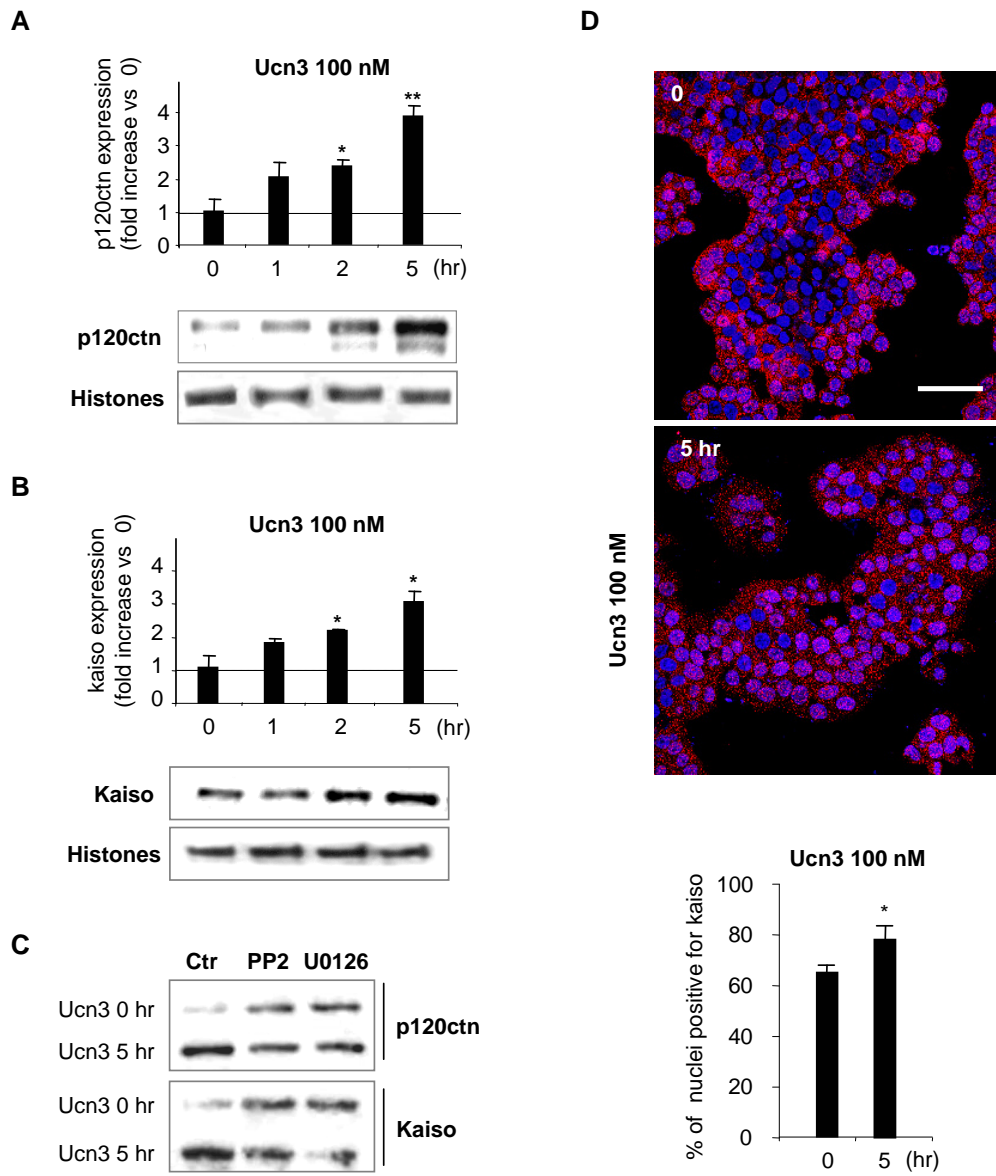


Figure 5

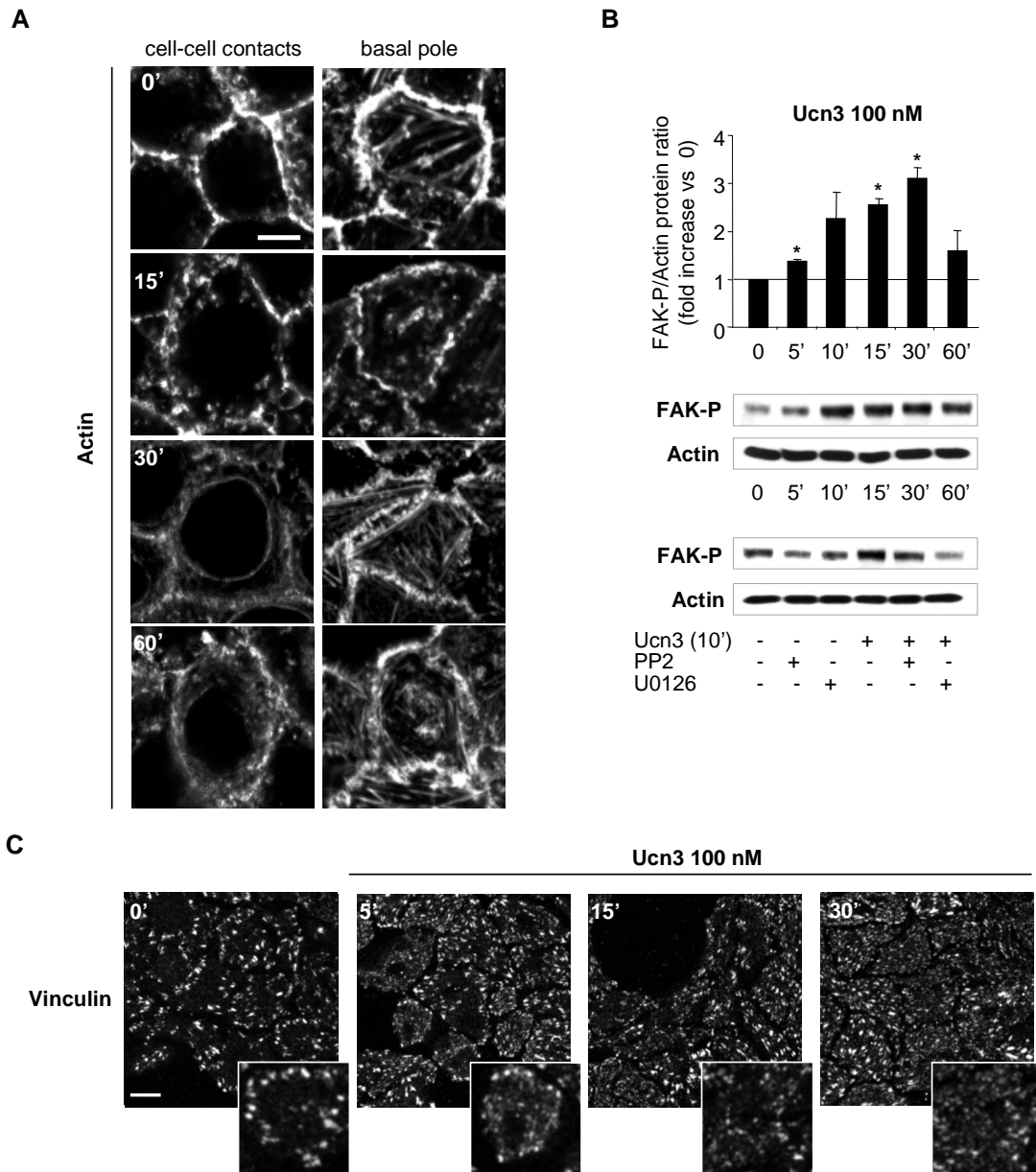


Figure 6

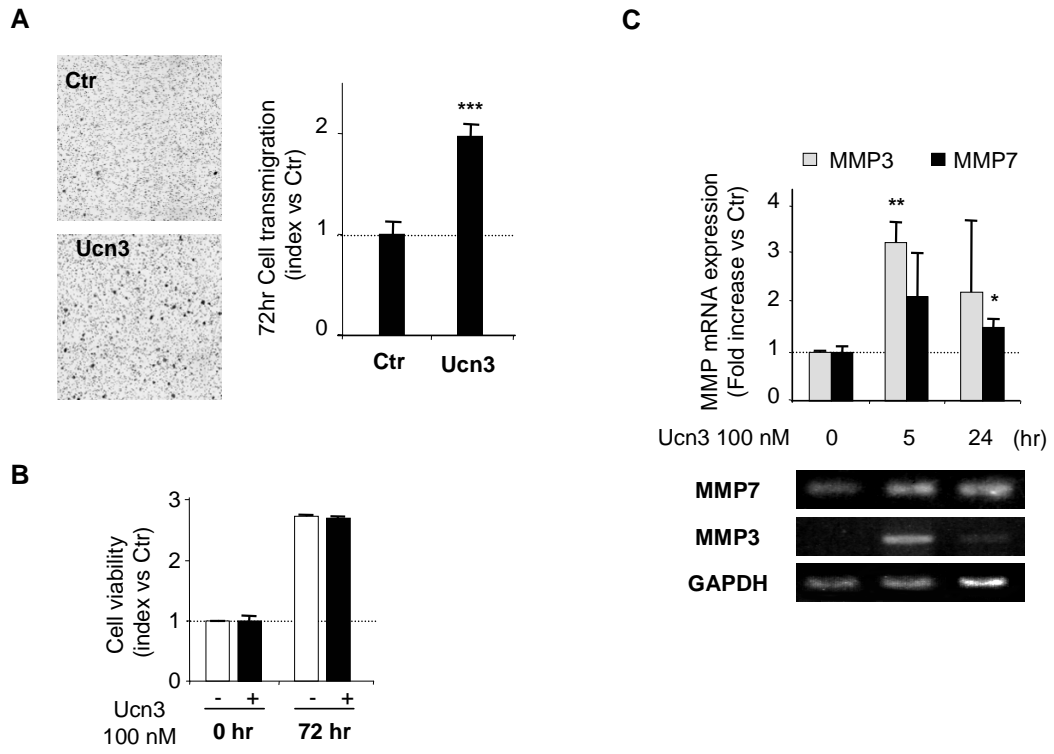


Figure 7

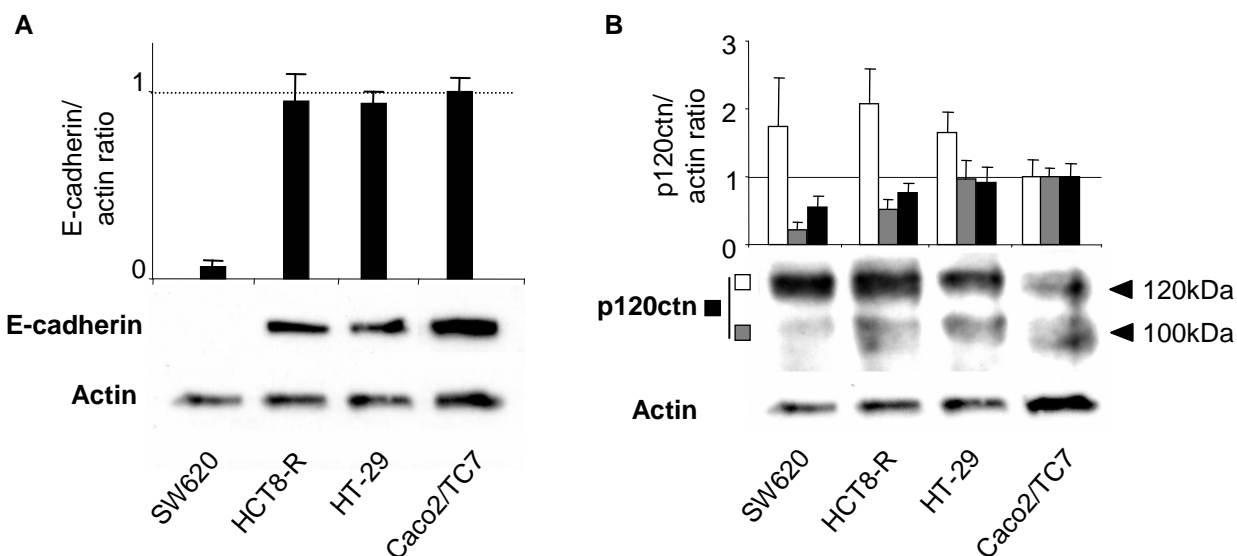


Figure 52: Expression des protéines des jonctions adhérentes dans les lignées d'adénocarcinomes coliques

A/ Expression en westernblot de la E-cadhérine et de l'actine dans les lignées cellulaires SW620, HCT-8R, HT-29 et Caco2/TC7. Les barres noires représentent la moyenne +/-SEM de trois expériences indépendantes. **B/** Expression en westernblot de la p120ctn et de l'actine dans les mêmes lignées cellulaires. Les barres représentent la moyenne +/-SEM de trois expériences indépendantes: p120ctn total (noir), p120ctn 120kDa (blanc) et p120ctn 100kDa (gris).

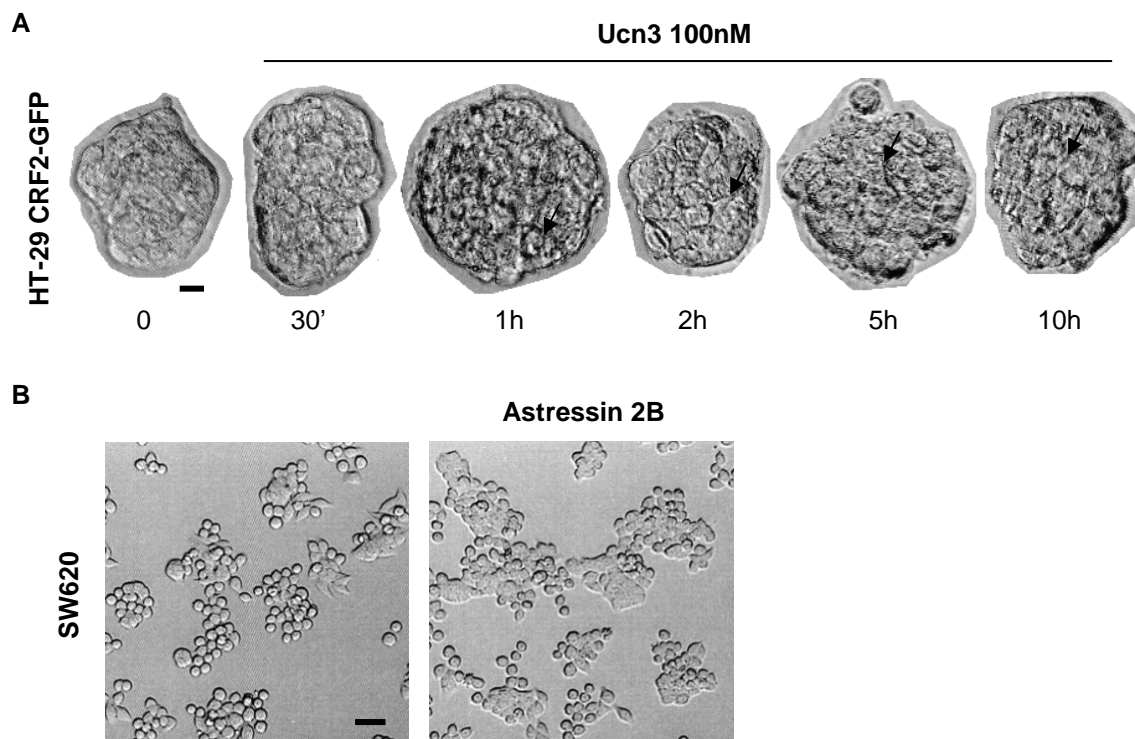


Figure 53: Régulation des jonctions inter-cellulaires

A/ Images en microscopie à contraste de phase représentant les cellules HT-29 CRF2-GFP cultivées en sphéroïdes et traitées de 0 à 10h avec 100nM d'Ucn3. Les flèches indiquent des altérations des jonctions intercellulaires. Barre d'échelle 10µm. **B/** Images de microscopie à contraste de phase représentant les cellules SW620 traitées ou non 24h avec l'Astressine 2B à 1µM (inhibiteur du CRF2). Barre d'échelle 25µm.

Résultats complémentaires/discussion

Expression des constituants des jonctions adhérentes dans les différentes lignées cellulaires d'adénocarcinomes coliques

L'expression de la E-cadhérine et de la p120ctn a été mesurée par westernblot dans les lignées cellulaires SW620, HCT8-R, HT-29 et Caco2/TC7 et rapportée à celle de l'actine. La E-cadhérine est quasiment absente des cellules SW620 et exprimée à un niveau équivalent dans les trois autres lignées (Figure 52A). La p120ctn est exprimée selon deux bandes : une bande à 120kDa et une autre à 100kDa (Figure 52B). L'expression globale de p120ctn est plus importante dans les Caco2/TC7 que dans les HT-29, les HCT8-R et les SW620. La bande à 100kDa suit un profil équivalent suivant ces différentes lignées cellulaires. A l'inverse, la bande à 120kDa est plus faible dans les Caco2/TC7 que dans les HT-29, les HCT8-R et les SW620.

L'absence de E-cadhérine dans les cellules SW620 est cohérente avec le caractère fibroblastique de ces cellules en culture. En revanche, son expression dans les HCT8-R a un niveau équivalent de celui des HT-29 et des Caco2/TC7 suggère une perte de fonction, pouvant provenir des interactions avec ses partenaires cytoplasmiques. La p120ctn est exprimée sous deux formes à 100 et 120kDa. Ces différentes bandes ont été attribuées aux différentes isoformes de p120ctn ou à des états de phosphorylation (Zhang et al., 2011). Ainsi, la bande haute correspondrait à l'isoforme 1A ou à une forme phosphorylée et la bande basse à l'isoforme 3A ou à des formes non phosphorylées de la p120ctn. L'augmentation de la bande haute au détriment de la bande basse dans les lignées moins différenciées est par conséquent cohérente avec ces deux hypothèses.

Régulation des jonctions intercellulaires par le CRF2

Les cellules HT-29 CRF2-GFP cultivées sous forme de sphéroïdes présentent des jonctions intercellulaires mais pas de jonctions cellule-MEC. Au cours du traitement avec 100nM d'Ucn3, on observe une démarcation plus importante entre les cellules de 1h à 10h (Figure 53A). Ces résultats suggèrent que l'activation du CRF2 conduit à l'altération des contacts intercellulaires indépendamment des interactions cellules-MEC. Par conséquent, les modifications de la structure des adhérences focales observées dans les cellules HT-29 (cf. article) n'interviennent pas en amont de la régulation des JA.

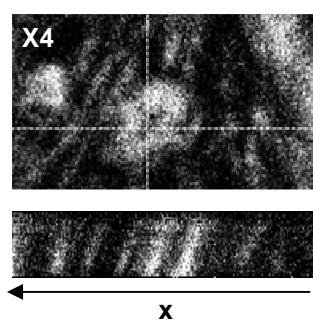
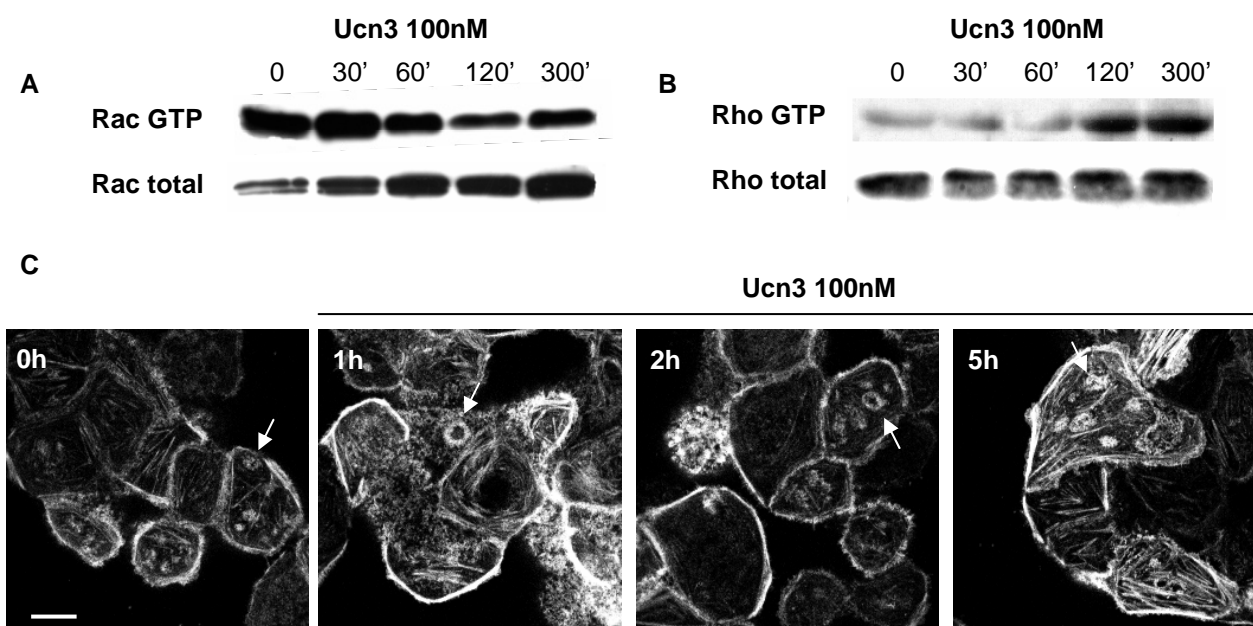


Figure 54: Réorganisation de l'actine

A/ expression de Rac1 total et Rac1 GTP au cours du traitement des cellules HT-29 CRF2-GFP de 0 à 300' avec 100nM d'Ucn3. **B/** Expression de RhoA total et RhoA GTP dans les mêmes conditions. **C/** Fluorescence Phalloïdine-TRITC en microscopie confocale au pôle basale des cellules HT-29 CRF2-GFP (24h d'adhérence) traitées de 0 à 5h avec 100nM d'Ucn3. Barre d'échelle 10µm. Formation d'anneaux d'actine (flèches blanches), grossissement X4 selon les x, y et z (panneau bas). La reconstruction en z est réalisée sur une épaisseur de 2,6µm au pôle basal avec un pas de 0,08µm entre chaque plan.

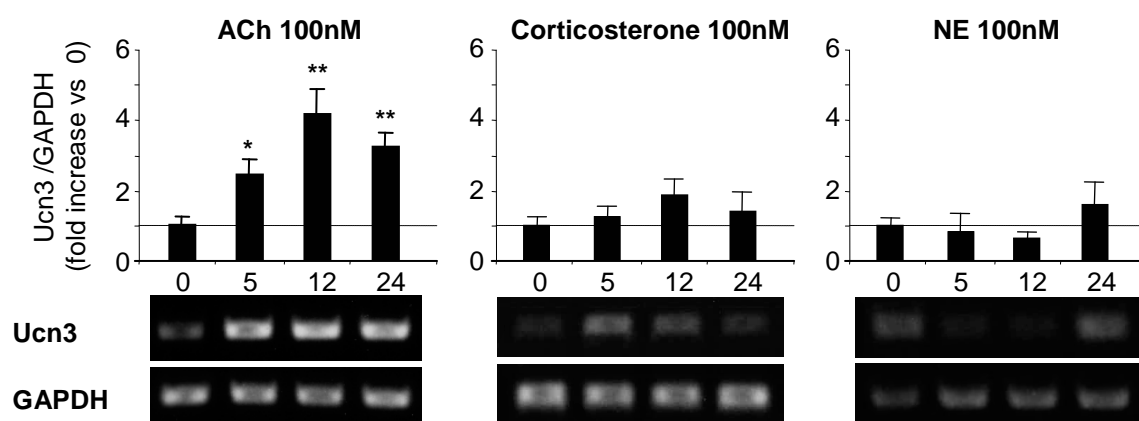


Figure 55: Expression et régulation de l'Ucn3 par les médiateurs du stress

L'expression des ARNm de l'Ucn3 a été mesurée par RT-PCR dans les cellules HT-29 traitées de 0 à 24h avec 100nM d'ACh, de corticostérone ou de NE. Les barres correspondent à la valeur moyenne +/-SEM de trois expériences indépendantes (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

Les cellules SW620 ont été mises en adhérence durant 24h en présence ou non de 1 μ M d'A2B, un inhibiteur spécifique du CRF2 (Figure 53B). L'observation au microscope à contraste de phase indique qu'en absence d'A2b, les cellules sont principalement faiblement adhérentes de forme sphériques et seulement quelques petits clusters de cellules se sont formés. En revanche la taille et le nombre de clusters sont augmentés dans les cellules traitées avec l'A2B, au détriment des cellules faiblement adhérentes. La diminution du nombre de cellules faiblement adhérentes associée à l'augmentation de la formation de clusters de cellules en présence d'A2B suggère que l'inhibition de l'activation autocrine endogène du CRF2 entraînerait un renforcement à la fois des contacts intercellulaires et cellules-MEC.. Nous avons montré que les cellules SW620 n'expriment pas de E-cadhérine en comparaison aux autres lignées cellulaires testées. Précédemment certaines approches ont permis d'induire la réexpression de la E-cadhérine dans ces cellules, ce qui signifie que le gène CDH1 codant pour la E-cadhérine est réprimé de manière basale (Stoops et al., 2011). L'expression du CRF2 associée à la production autocrine de ligands pourrait jouer un rôle déterminant dans la progression tumorale et la dédifférenciation, en régulant l'expression des molécules de jonctions intercellulaires telles que la E-cadhérine. Les cellules SW620 produisant plus d'Ucn2 que les trois autres lignées d'adénocarcinomes colique testées (cf. article), l'activation du récepteur est sans doute plus importante (internalisation et dégradation avec apparition d'une bande cytoplasmique à 35kDa).

Régulation des RhoGTPases et du cytosquelette d'actine par l'Ucn3

Dans les neurones, les CRF1 et CRF2 contrôlent différents aspects de l'arborisation neuritique (Chen et al., 2008b; Swinny and Valentino, 2006). Etant donné leur implication dans le contrôle de la morphologie et la migration cellulaire, l'activité des RhoGTPases et l'organisation du cytosquelette d'actine au pôles basale ont été étudiés dans les cellules HT-29 CRF2-GFP traitées de 0 à 300' avec 100nM d'Ucn3 (Figure 54). L'Ucn3 induit une augmentation de l'activité de Rac1 de 0 à 30', suivie d'une diminution jusqu'à 300' (Figure 54A). Par ailleurs, l'expression de Rac total semble augmenter avec le traitement à l'Ucn3. A l'inverse, l'expression de RhoA semble inchangée au cours du temps et son activation est augmentée entre 60 et 300' de traitement (Figure 54B). Ceci est cohérent avec une activation antagoniste des deux types de RhoGTPases (Chartier et al., 2011b; Comunale et al., 2007). En absence de traitement, sur les cellules n'ayant que 24h d'adhérence, on observe de l'actine fibrillaire organisée sous forme de fibres de stress dans les cellules les plus regroupées (Figure 54C). Au contraire dans les cellules plus isolées ou en périphérie des clusters les fibres de

stress sont moins nombreuses et l'on voit apparaître des « patchs » et des anneaux d'actine polymérisée. Avec le traitement à l'Ucn3, le nombre de patchs et la taille de ces anneaux semblent augmenter alors que les fibres de stress sont moins présentes et moins organisées. La reconstruction en z des images au niveau des structures en anneaux indique une polymérisation verticale des fibres d'actine.

La régulation de l'expression et de l'activité des RhoGTPases joue un rôle important dans les processus de régulation des jonctions adhérentes et de la morphologie cellulaire, que ce soit dans un cadre normal ou pathologique (Braga, 2000; Lozano et al., 2003). Nos expériences montrent également un antagonisme dans l'activation/désactivation de RhoA par rapport à Rac1. La p120ctn est un modulateur important de l'activité des RhoGTPases. Au niveau du cytoplasme elle favorise l'activation de Rac et inhibe celle de Rho (Wildenberg et al., 2006). Dans les cellules HT-29 nous avons montré que l'Ucn3 induit une dissociation des JA associée à court terme à une augmentation de l'expression des caténines au niveau du cytoplasme et à plus long terme à leur translocation au niveau du noyau. Le pic d'augmentation de l'activité de Rac1 pourrait correspondre à l'augmentation cytoplasmique de p120ctn. En revanche, la diminution de l'activité de Rac1 et l'augmentation de celle de RhoA coïnciderait avec la translocation nucléaire de la p120ctn et par conséquent la diminution du pool cytoplasmique. Les variations de l'activité de Rac1 et RhoA induites par l'Ucn3 sont selon cette hypothèse, probablement dépendants de la dissociation des JA en non l'inverse.

Le remodelage du cytosquelette d'actine joue un rôle important dans la régulation des systèmes d'adhérence cellule-MEC et la migration cellulaire. La présence de fibres de stress dans les cellules plus regroupées est cohérente avec nos résultats obtenus dans les HT-29 confluentes et correspondent à de l'étalement cellulaire. Ce type d'organisation implique généralement l'activation de RhoA (Hall, 1998) qui est à un niveau faible dans ces conditions de culture. La sous-confluence des cellules peut expliquer qu'au final peu d'entre elles sont pleinement étalées et donc qu'il y a moins de RhoA et de fibres de stress. Dans les cellules plus isolées et/ou traitées avec l'Ucn3, l'actine polymérise verticalement au pôle basal pour former des patchs et/ou des anneaux. La perte des fibres de stress associée à l'assemblage de ces structures verticales d'actine en anneaux au niveau de la face ventrale des cellules suggère la formation de podosomes (Albiges-Rizo et al., 2009). La formation des podosomes nécessite l'activation de Src et favorise la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Frame, 2004). Dans les HT-29, nous avons également montré que l'Ucn3 induit l'activation de Src,

une altération des adhérences focales, une augmentation de la production de MMP et de la transmigration. Ces éléments renforcent nos hypothèses sur la formation de structures de type podosomes "like".

Régulation de l'Ucn3 par les médiateurs du SNA et de l'axe HPA

Le stress perçu au niveau du SNC est transmis dans les tissus périphériques comme le tube digestif par l'intermédiaire de communications nerveuses et humorales. Ainsi, les cellules de la muqueuse intestinale et les cellules des tumeurs colorectales sont soumises aux modifications de l'activité du SNA et de l'axe HPA en conditions de stress. Nous nous sommes intéressés à la régulation de l'expression de l'Ucn3 par les médiateurs qu'ils libèrent de manière systémique et au niveau de la muqueuse (Xue et al., 2007). Les cellules HT-29 ont été traitées avec 100nM d'ACh, de corticostérone ou de catécholamines telles que la norépinéphrine (NE), effecteurs de l'activité sympatho-vagale et de l'axe HPA (Figure 34). L'expression de l'Ucn3 a été mesurée par RT-PCR au cours de ces traitements. L'ACh induit une augmentation significative de l'expression de l'Ucn3 à 5, 12 et 24h de traitement, respectivement 2,5, 4 et 3 fois le niveau d'expression basale. Aucune différence significative n'a été observée concernant les traitements avec la corticostérone ou la NE. Cependant, la corticostérone aurait tendance à augmenter la transcription de l'Ucn3 et la NE à la diminuer à 5h et 12h de traitement.

L'activité du nerf Vague a été décrite pour exercer un rôle anti-inflammatoire au niveau de l'intestin via la libération d'ACh et l'activation des récepteurs nicotiques (Meregnani et al., 2011; Van Der Zanden et al., 2009). Ces effets sont associés à une régulation de la réponse immunitaires et à la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (Van Der Zanden et al., 2009). Nous envisageons que la neurostimulation vagale pourrait également exercer son rôle anti-inflammatoire en régulant l'expression et/ou l'activation des composants du système CRFergique et donc les modifications des propriétés d'adhérence intercellulaires à l'origine de l'augmentation de la perméabilité. Or nous avons observé que l'ACh induit une augmentation à 12h de l'ucn3. Ces effets pourraient être attribués à la présence des récepteurs muscariniques qui sont également sensible à l'ACh et dont nous avons montré qu'ils potentialisent les effets de l'Ucn3 alors que la nicotine (spécifique des récepteurs nicotiques aurait un rôle protecteur (Pelissier et al., résultats non publiés). Par ailleurs, les dysautonomies de l'activité symaptho-vagal chez les patients atteints des MICI constituent un facteur prédictible des rechutes inflammatoire (Pellissier et al., 2010). Le tabagisme est aggravateur

dans le cadre de la MC et protecteur dans le cadre de la RCH (Karban and Eliakim, 2007). Ainsi l'équilibre cholinergique semble important pour le maintien de l'homéostasie intestinale et le déficit ou l'excès d'ACh joue un rôle pro-inflammatoire. La concentration d'ACh pourrait modifier la nature des récepteurs recrutés en fonction de leur affinité et conduire au développement de l'inflammation. Ces mêmes mécanismes qui régulent l'inflammation, participent également à la modulation des jonctions intercellulaires dans les cellules cancéreuses et favorisent la formation de métastases. Différentes études indiquent que le stress ou l'injection périphérique de CRF est responsable de l'augmentation de la perméabilité par des mécanismes dépendants de la libération d'ACh au niveau du SNE (Kiliaan et al., 1998; Santos et al., 1999). Le nerf Vague n'est par conséquent pas la seule source d'ACh au niveau du tube digestif. D'autres études mettent en évidence un "Vagal rebound" durant la période de récupération après un stress psychologique, qui peut être responsable d'une augmentation de la libération périphérique d'ACh (Mezzacappa et al., 2001).

Les gènes du CRF, de l'Ucn1 et de l'Ucn2 contiennent des séquences régulatrices GRE et CRE au niveau de leur promoteur qui sont impliquées dans l'activation et/ou l'inhibition de la transcription. Etant donné l'origine phylogénique commune des peptides du CRF, il est fort probable que ces séquences soient également présentes dans le promoteur de l'Ucn3. La régulation de l'Ucn3 par le stress et les glucocorticoïdes au niveau du SNC est dépendante des structures étudiées, induisant une augmentation, pas de modifications ou une diminution (Jamieson et al., 2006). A ce jour, peu d'études se sont intéressées à sa régulation dans les tissus périphériques. Une étude a montré que l'expression des ARNm de l'Ucn3 était diminuée par les glucocorticoïdes mais pas par le stress de contention (à 3h et à 12H post stress) dans les ilots β -pancréatiques de souris (Huisin et al., 2011). Malgré l'absence de différences significatives, la corticostérone a tendance à augmenter l'expression de l'Ucn3 dans les cellules HT-29. L'Ucn3 comme les autres peptides du CRF semble subir une régulation par les glucocorticoïdes dépendante de l'organe et du type cellulaire. La NE semble diminuer la transcription de l'Ucn3 dans les cellules HT-29. Le couplage des récepteurs adrénergiques métabotropiques avec la sous-unité G α s et la présence des séquences CRE n'excluent pas une régulation dépendante de l'AMPc. Ces éléments de réponse ont précédemment été décrits comme activateurs pour le CRF2 et l'Ucn2 (Chen et al., 2003). La régulation différentielle des ligands des récepteurs au CRF suivant le type cellulaire et les signaux intera-cellulaires permettraient de recruter différents réseaux d'activation dans les conditions basales ou en réponse au stress et à l'inflammation.

Conclusion et perspectives

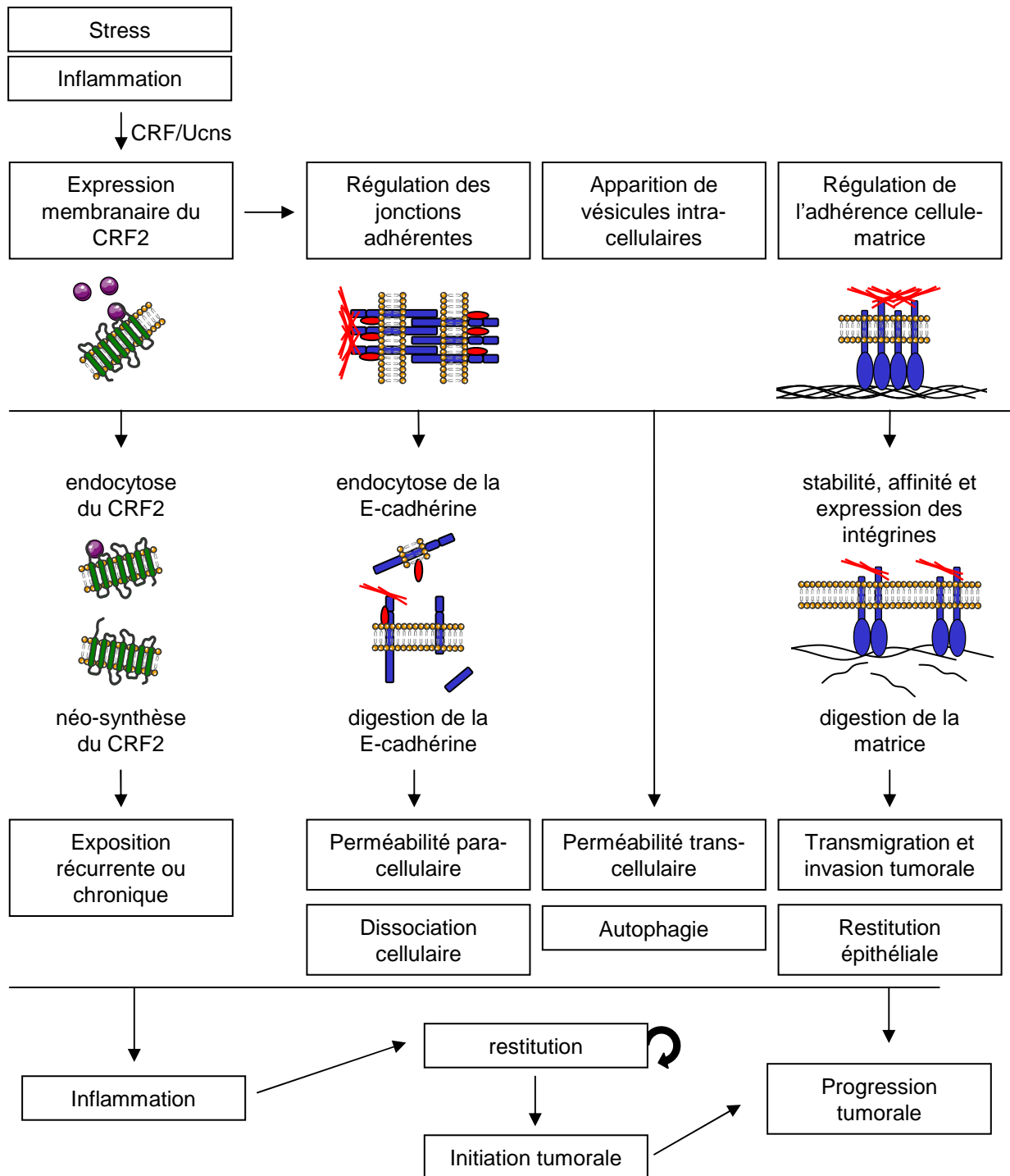


Figure 56: Effets du CRF2 sur l'inflammation et les CCR.

Schéma récapitulatif des effets de l'Ucn3 sur l'expression et la localisation du CRF2, l'état des jonctions adhérentes, des adhérences focales et l'apparitions de vésicules intracellulaires bordées d'actine, dans les cellules HT-29. Ces divers processus cellulaires pourraient être impliqués dans la régulation des mécanismes responsable de l'inflammation et de la progression tumorale.

Conclusion

Dans le contexte socioéconomique actuel des pays industrialisés, les évènements stressants prennent une part importante de l'environnement quotidien. Un nombre grandissant de travaux de recherche s'intéresse à l'impact du stress sur notre santé et mettent en évidence son implication dans le développement et/ou l'exacerbation de diverses pathologies notamment au niveau intestinal (MICI, CCR...). Ceci pose la question de la prise en charge du stress dans notre société et/ou du développement d'agents pharmacologiques destinés à enrayer ses effets. Le système CRFergique a initialement été identifié au niveau du système nerveux central pour son rôle dans la réponse physiologique au stress. Les neuromédiateurs (CRF, Ucn3) et les récepteurs (CRF1, CRF2) qui le composent ont plus récemment été mis en évidence au niveau intestinal où l'injection de CRF exogène mime les effets du stress sur la motricité digestive. Les études menées sur le CRF2 s'intéressent à son implication dans la régulation de l'inflammation digestive ou de la croissance tumorale. Les mécanismes décrits jusqu'à présent se sont focalisés sur les effets du CRF2 exprimé au niveau du SNE, des cellules immunitaires ou du système vasculaire. Les travaux réalisés dans ce mémoire de doctorat appréhendent le système CRFergique intestinal sous un angle original. En effet peu d'études se sont intéressées à la régulation et à la fonction du CRF2 exprimé au niveau des entérocytes ou des cellules tumorales colorectales.

Pour l'étude du CRF2 dans les entérocytes (Figure 56), nous avons utilisé les cellules HT-29 issues d'adénocarcinome colique, qui ont la capacité de se différencier en entérocytes "like" quand elles sont cultivées 10 jours à confluence en absence de glucose. Elles établissent des jonctions adhérentes matures et acquièrent l'expression de marqueurs de différenciation spécifiques (PA, DPPIV). Dans ce modèle de HT-29 différenciées, nous avons mis en évidence que l'activation du CRF2 par l'Ucn3 conduit à une augmentation de la perméabilité épithéliale, notamment par l'altération des jonctions adhérentes. La sollicitation récurrente de ces mécanismes conduit à une altération de la différenciation entérocytaire. L'activation du CRF2 est également responsable de la formation de vacuoles intra-cellulaires entourées d'actine dont l'origine et la fonction restent à déterminer. Par ailleurs, nous avons montré chez le rat, que différents modèles de stress et d'inflammation conduisent à une augmentation de l'expression du CRF2 et une diminution de l'expression de la E-cadhérine dans les cellules épithéliales du côlon. Ces résultats mettent en évidence un nouveau mécanisme de régulation de la barrière épithéliale intestinale par le stress et l'inflammation.

Lorsqu'elles ne sont pas différenciées, les cellules HT-29 établissent des JA peu matures. Dans ce modèle cellulaire (Figure 56), nous avons mis en évidence que l'activation du CRF2 par l'Ucn3 induit la production d'AMPc et l'activation de la cascade de phosphorylation Src/ERK/FAK. Ces voies de signalisation favorisent l'altération des JA au niveau des contacts intercellulaires et des adhérences focales au niveau des contacts cellule-MEC. Ces modifications des propriétés d'adhérence cellulaire conduisent à une augmentation de la transmigration et la production de MMP3 et MMP7. Par ailleurs, nous avons montré que l'expression et l'activation du CRF2 sont respectivement augmentées avec le stade tumoral ou la dédifférenciation des CCR. Ces résultats mettent en évidence un nouveau mécanisme impliquant le CRF2 dans la progression tumorale colorectale.

L'ensemble de ces travaux contribue à la compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de l'inflammation intestinale et de la progression tumorale colorectale par le stress. La caractérisation des voies de signalisations et des effecteurs liés à l'activation du système CRFergique permettrait d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour la prévention et/ou le traitement des MICI et des CCR.

Perspectives

Régulation de la sécrétion des neuromédiateurs du stress

Nous avons mis en évidence que le CRF2 est exprimé au niveau de la membrane basolatérale des colonocytes et des cellules épithéliales intestinales en culture. Cette localisation les expose à une activation autocrine/paracrine via les ligands sécrétés au niveau de la muqueuse intestinale. Suite à la perception d'un stress, l'activation de l'axe HPA et les modulation de la balance sympatho-vagale conduisent à la libération de glucocorticoïdes, de NE et d'ACh qui diffusent dans la muqueuse. En agissant sur les cellules immunitaires de la lamina propria, le SNE ou les cellules épithéliales, ces médiateurs du stress pourraient réguler l'expression et la libération du CRF et des Ucns. Par conséquent, nous proposons de regarder l'effet de ces médiateurs sur la régulation du CRF et des Ucns au niveau de ces différentes populations cellulaires en culture en RT-PCR dans les cellules et en ELISA dans les surnageants de culture. L'étude de la régulation pourrait être réalisée dans les lignées cellulaires d'entérocytes différenciées (Caco2/TC7, HT-29, NCM460), de neurones

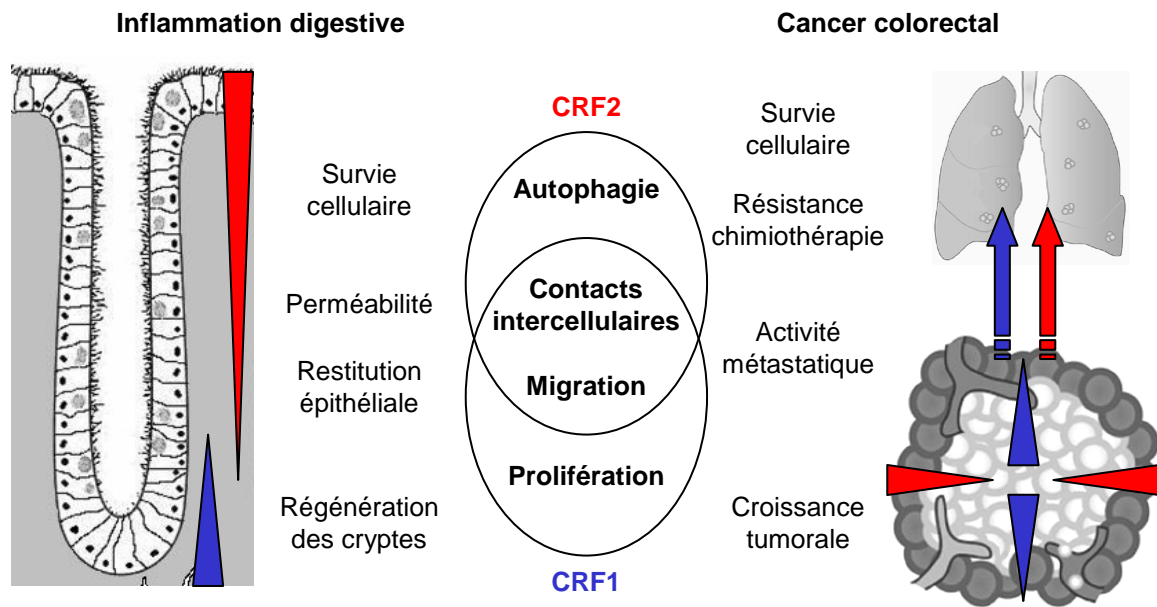


Figure 57: Répartition et rôle des CRFR dans l'inflammation et les CCR.
 Hypothèses sur le rôle des CRF1 et CRF2 dans la régulation de l'inflammation et de la tumorigenèse, au regard de leur localisation dans les cellules épithéliales intestinales et dans les CCR.

périphériques (SH-SY5Y, NT2a). Des cultures primaires de type PCDE (épithéliales), de SNE (collaboration en cours avec Michel NEUNLIST INSERM U913 de Nantes) et de cellules immunitaires de la lamina propria pourraient également être réalisées à partir de biopsies provenant de patients atteints de MICI et/ou de rat stressés.

Fonctions associées à la distribution différentielle du CRF1 et du CRF2

Les travaux de Chatzaki et collaborateurs sur la localisation des récepteurs au CRF dans les cellules épithéliales du côlon suggèrent que le CRF1 est plutôt exprimé dans les cellules situées à la base des cryptes et que le CRF2 est principalement localisé dans les cellules des 2/3 supérieurs de la crypte (compartiment différencié) (Chatzaki et al., 2004). De la même manière, *in vitro* les IEC-17 (progéniteurs de cryptes) expriment peu de CRF2 et plus de CRF1 comparées aux cellules HT-29. Cette représentation des récepteurs au CRF sur l'axe crypte villus et dans les IEC-17 indique que le CRF1 est plutôt exprimé dans les cellules issues des compartiments prolifératifs et le CRF2 au niveau des cellules différenciées (Figure 57). Cette répartition opposée du CRF1 et du CRF2 est également retrouvée dans certaines tumeurs de la glande mammaire avec une localisation du CRF2 au niveau des processus invasifs peri-neuraux en marge de la tumeur et du CRF1 au cœur de la tumeur (Kaprara et al., 2010a). La compartimentation de l'expression CRF1/CRF2 pourrait également être étudiée dans les cancers colorectaux. De la même manière que le CRF1 semble être exprimé au niveau des cellules souches dans le côlon sain, il pourrait être exprimé au niveau des cellules souches cancéreuses situées au cœur des tumeurs colorectales et jouer un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire. Comme nous l'avons décrit dans nos résultats, le CRF2 jouent un rôle dans la régulation des jonctions intercellulaires et de la migration. Des données de la littérature indique que dans certains cancers, le CRF1 régule la migration cellulaire (Yang et al., 2007), suggérant qu'il pourrait également servir la même fonction dans les cancers colorectaux.

Au niveau des cellules épithéliales non transformées (IEC, HIEC), nous déterminerons également l'implication du CRF1 et du CRF2 dans la prolifération par des tests de viabilité et dans la migration cellulaire par des expériences de cicatrisation. Nous envisageons également de caractériser l'expression du CRF1 dans cellules tumorales (SW620, HCT8-R, HT-29, Caco2/TC7) et d'étudier son effet sur la prolifération. L'implication des deux récepteurs sur la prolifération et l'invasion tumorale pourra être testé *in vivo* dans les modèles de xénogreffes

chez la souris Nude et dans les embryons de poulets. La limite de ces expériences est que le traitement avec les différents agonistes et antagonistes du système CRFergique n'est pas sélectif des cellules tumorales. Par conséquent, les effets dépendants du SNC ou du système vasculaire ne permettront pas de conclure sur le rôle de ces récepteurs au niveau des cellules cancéreuses.

Caractérisation des jonctions cellules-MEC lors de la migration

Les processus de migration et d'invasion font intervenir des régulations de la MEC et de l'expression et/ou de l'activation des intégrines. Nous avons montré que l'Ucn3 induit la transmigration des cellules HT-29. L'activation de Src, les modifications de la phosphorylation de FAK sur Ser910 et l'organisation de la vinculine au pôle basal des HT-29 suite à l'activation du CRF2 seraient des arguments en faveur d'un changement d'activation des intégrines. Dans ce contexte, il serait intéressant de regarder quelles sont les modulations de l'activation des intégrines $\alpha 2$ et $\alpha 3$ exprimées dans les HT-29 (Gout et al., 2001) ou l'éventuelle régulation transcriptionnelle des intégrines αV impliquée dans les processus de migration lors de la TEM. Nos résultats préliminaires indiquent des modifications de l'activation des RhoGTPases dans les HT-29 traitées avec l'Ucn3, qui pourraient expliquer les modifications du cytosquelette d'actine que nous observons au niveau des contacts intercellulaires et au pôle basal. La dynamique de formation/désassemblages des adhérences focales fait intervenir la phosphorylation de certaines protéines telles que la paxilline par la FAK, la FAK par Src et de la MLCK par ERK. L'étude de ces différentes activations, permettrait une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la transmigration induite par le CRF2. Par ailleurs, la déstabilisation des adhérences focales peut conduire à la formation de podosomes/invadosomes. Ces structures d'adhérence sont connues pour leur implication dans les régulations du renouvellement osseux par les ostéoclastes et de l'invasion des cellules tumorales (Murphy and Courtneidge, 2011). La présence de structures disposées en patch d'actine au pôle basal des cellules HT-29 traitées avec l'Ucn3 suggère une conversion des adhérences focales en contacts focaux et/ou en podosomes. La cortactine se localise au niveau des podosomes et non des adhérences focales (Albiges-Rizo et al., 2009). Sa localisation sera observée en immunofluorescence dans les cellules HT-29 traitées avec l'Ucn3. L'analyse plus poussée des mécanismes de régulation de l'adhérence cellule-MEC permettra d'identifier les structures impliquées dans la transmigration induite par le CRF2.

Conclusion-perspectives

La production de Ln-332 est augmentée dans les cancers colorectaux et sa dégradation par la MMP3 favorise la migration et l'invasion cellulaire. L'augmentation de la sécrétion de MMP3 dans les cellules HT-29 traitées avec l'Ucn3 pourrait participer au remodelage de la MEC et à la migration par la digestion de la Ln-332. Par ailleurs, les cellules HT-29 pourraient favoriser leur migration en augmentant à la fois la sécrétion de MMP3 et de Ln-332 dont les fragments de dégradation sont promoteurs de l'invasion (Zucker and Vacirca, 2004). L'augmentation de la production de MMP3 et de Ln-332 étant également retrouvées dans le cadre des MICI, ces mécanismes de régulation de la migration cellulaire pourraient être étudiés dans des modèles de cellules épithéliales non transformées.

Autophagie ou transcytose

Dans les cellules HT-29, l'activation du CRF2 sollicite la production d'AMPc via la sous-unité G α s des protéines et l'activation de la voie Src/ERK/FAK par une interaction de Src avec le CRF2. Par ailleurs, le développement d'un système vacuolaire intra-cellulaire est observé dans les cellules HT-29 ne semble pas modifier la viabilité des cellules. Nous proposons que ces processus soient attribués à une régulation de la transcytose ou à une augmentation de l'autophagie. La transcytose joue un rôle important dans la régulation de la perméabilité épithéliale paracellulaire et pourrait participer aux phénomènes inflammatoires déclenchés par le stress. L'autophagie est un processus qui dans des conditions de stress toxique ou métabolique favorise la survie cellulaire. Dans nos expériences, l'activation du CRF2 ne modifie pas la viabilité cellulaire basale. En revanche, elle pourrait favoriser la survie des cellules HT-29 soumises à une induction de la mort cellulaire (respectivement par des agents de chimiothérapie ou des toxines entériques) en induisant l'autophagie. L'ensemble de ces éléments suggère que le CRF2 pourrait jouer un rôle dans l'initiation et l'entretien de l'inflammation, mais également dans la régulation de la progression tumorale et de l'activité métastatique des CCR.

L'activation du CRF2 ou de l'adénylate cyclase est responsable de la formation de vacuoles intracellulaires entourées d'actine que nous suggérons être impliquées dans des processus d'autophagie et/ou de transcytose. Nous envisageons dans un premier temps de caractériser ces vacuoles par des marquages en immunofluorescence de la protéine LC3 (Microtubule-associated proteins 1A/1B light chains 3) qui est exprimée au niveau des autophagosomes. Des tests de viabilité et d'induction des caspases pourrait être réalisés dans

les HT-29 traitées avec des agents de chimiothérapie tels que le 5FU ou le méthotrexate en combinaison avec les ligands du CRF1 et/ou du CRF2. Concernant la transcytose, des expériences d'incorporation de FITC-dextran pourront être réalisées dans les HT-29 différenciées ou les Caco2/TC7.

Interaction entre le système CRFergique et la stimulation du nerf Vague à visée anti-inflammatoire

Les patients atteints de MICI suivent un traitement à vie, dans le but d'éviter le déclenchement des poussées inflammatoires. Lors des phases de rémission prolongées, les patients allant mieux, ils présentent des problèmes d'observance avec leur traitement. Malheureusement, ce comportement peut à nouveau conduire au déclenchement d'une poussée inflammatoire, en levant les protections préventives apportées par le traitement médicamenteux de fond. Les travaux de notre laboratoire se déclinent selon deux axes: l'étude des effets anti-inflammatoires du nerf Vague dans le traitement de l'inflammation digestive et l'étude du stress dans l'inflammation digestive. L'activité anti-inflammatoire de la neurostimulation vagale a été décrite pour son effet immuno-modulateur en agissant sur les populations de cellules immunitaires spléniques (Xue et al., 2011) (Picq résultats non publiés) et coliques (Meregnani et al., 2011). Cette approche permet également d'éviter les problèmes d'observance retrouvés chez les patients atteints de MICI en développant un appareillage autonome, capable de stimuler les efférences du nerf Vague dans un cadre pathologique préventif et curatif. Des paramètres de stimulation du nerf Vague ont été précédemment établis dans les modèles de colites induites avec le TNBS de manière chronique ou aiguë, respectivement au cours des thèses de Julien Merégnani et de Chloé Picq. Au laboratoire, un projet clinique est engagé chez l'Homme, où ces paramètres seront prochainement évalués.

Des travaux préliminaires tendent à montrer qu'il existe une interaction entre les systèmes cholinergique (dépendants en partie de l'activation du nerf Vague) et CRFergique au niveau des cellules épithéliales intestinales. La nature de ces interactions sera étudiée dans le modèle épithélial intestinal des cellules HT-29 et chez l'animal soumis à un stress, et/ou une stimulation du nerf Vague. Ces perspectives développées au cours de la thèse de Marjolaine Pélissier devraient apporter des éléments pertinents sur les mécanismes des effets anti-inflammatoires de la stimulation du nerf Vague et sur ses conditions d'application. En effet, des éléments indiquent que l'équilibre du système cholinergique vagal (ni trop haut, ni trop

bas) joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Ceci suggère que tous les patients atteints de MICI ne sont pas nécessairement éligibles à la neurostimulation vagale. Des études ont montré que le tabagisme (Nicotine) avait des effets négatifs dans la MC et bénéfiques dans la RCH. Par ailleurs, le stress est un des principaux modulateurs de la balance sympatho-vagale, dont la dysautonomie fait partie intégrante de la physiopathologie des MICI: Les patients atteints de MC présentent une augmentation du tonus sympathique tandis que les patients atteints de RCH ont un déficit du tonus vagal.

Système CRFergique et lien entre l'inflammation et le cancer

Dans les différentes parties de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'implication du système CRFergique dans la régulation des jonctions intercellulaires au niveau de l'épithélium intestinal dans le cadre du stress et de l'inflammation ou au niveau des cancers colorectaux dans le cadre de la progression tumorale. L'inflammation chronique du tube digestif favorise l'apparition des dysplasies à l'origine des CCR, chez les patients atteints de MICI et dans le modèle animal AOM/DSS. Il serait intéressant d'étudier l'implication du système CRFergique dans l'initiation et la progression tumorale colorectale en combinant le modèle AOM/DSS avec un stress psychologique chronique et/ou l'injection chronique en IP d'agonistes ou d'antagonistes du système CRFergique.

Bibliographie

Bibliographie

A

- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., and Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* *119*, 1438-1449.
- Adachi, S., Yasuda, I., Nakashima, M., Yamauchi, T., Yoshioka, T., Okano, Y., Moriwaki, H., and Kozawa, O. (2011). Rho-kinase inhibitor upregulates migration by altering focal adhesion formation via the Akt pathway in colon cancer cells. *Eur J Pharmacol* *650*, 145-150.
- Adzic, M., Djordjevic, J., Djordjevic, A., Niciforovic, A., Demonacos, C., Radojicic, M., and Krstic-Demonacos, M. (2009). Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *J Endocrinol* *202*, 87-97.
- Aho, S., Levansuo, L., Montonen, O., Kari, C., Rodeck, U., and Uitto, J. (2002). Specific sequences in p120ctn determine subcellular distribution of its multiple isoforms involved in cellular adhesion of normal and malignant epithelial cells. *J Cell Sci* *115*, 1391-1402.
- Akhtar, N., and Hotchin, N. A. (2001). RAC1 regulates adherens junctions through endocytosis of E-cadherin. *Mol Biol Cell* *12*, 847-862.
- Akimoto, S., Nakanishi, Y., Sakamoto, M., Kanai, Y., and Hirohashi, S. (2004). Laminin 5 beta3 and gamma2 chains are frequently coexpressed in cancer cells. *Pathol Int* *54*, 688-692.
- Al-Sadi, R., Ye, D., Said, H. M., and Ma, T. Y. (2011). Cellular and molecular mechanism of interleukin-1beta modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier. *J Cell Mol Med* *15*, 970-982.
- Albiges-Rizo, C., Destaing, O., Fourcade, B., Planus, E., and Block, M. R. (2009). Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci* *122*, 3037-3049.
- Aldhous, M. C., Noble, C. L., and Satsangi, J. (2009). Dysregulation of human beta-defensin-2 protein in inflammatory bowel disease. *PLoS One* *4*, e6285.
- Altschuler, S. M., Escardo, J., Lynn, R. B., and Miselis, R. R. (1993). The central organization of the vagus nerve innervating the colon of the rat. *Gastroenterology* *104*, 502-509.
- Amalinei, C., Caruntu, I. D., and Balan, R. A. (2007). Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol* *48*, 323-334.
- Anastasiadis, P. Z. (2007). p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochimica et biophysica acta* *1773*, 34-46.
- Anastasiadis, P. Z., Moon, S. Y., Thoreson, M. A., Mariner, D. J., Crawford, H. C., Zheng, Y., and Reynolds, A. B. (2000). Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat Cell Biol* *2*, 637-644.
- Anastasiadis, P. Z., and Reynolds, A. B. (2001). Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol* *13*, 604-610.
- Androulidaki, A., Dermitzaki, E., Venihaki, M., Karagianni, E., Rassouli, O., Andreakou, E., Stournaras, C., Margioris, A. N., and Tsatsanis, C. (2009). Corticotropin Releasing Factor promotes breast cancer cell motility and invasiveness. *Mol Cancer* *8*, 30.
- Anlauf, M., Schafer, M. K., Eiden, L., and Weihe, E. (2003). Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J Comp Neurol* *459*, 90-111.
- Anton, P. M., Gay, J., Mykoniatis, A., Pan, A., O'Brien, M., Brown, D., Karalis, K., and Pothoulakis, C. (2004). Corticotropin-releasing hormone (CRH) requirement in Clostridium difficile toxin A-mediated intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 8503-8508.

Bibliographie

- Arbiser, J. L., Karalis, K., Viswanathan, A., Koike, C., Anand-Apte, B., Flynn, E., Zetter, B., and Majzoub, J. A. (1999). Corticotropin-releasing hormone stimulates angiogenesis and epithelial tumor growth in the skin. *J Invest Dermatol* 113, 838-842.
- Arck, P. C., Slominski, A., Theoharides, T. C., Peters, E. M., and Paus, R. (2006). Neuroimmunology of stress: skin takes center stage. *J Invest Dermatol* 126, 1697-1704.
- Arcuri, F., Cintonino, M., Florio, P., Floccari, F., Pergola, L., Romagnoli, R., Petraglia, F., Tosi, P., and Teresa Del Vecchio, M. (2002). Expression of urocortin mRNA and peptide in the human prostate and in prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 52, 167-172.
- Arranz, A., Venihaki, M., Mol, B., Androulidaki, A., Dermitzaki, E., Rassouli, O., Ripoll, J., Stathopoulos, E. N., Gomariz, R. P., Margioris, A. N., and Tsatsanis, C. (2010). The impact of stress on tumor growth: peripheral CRF mediates tumor-promoting effects of stress. *Mol Cancer* 9, 261.
- Aspenstrom, P. (1999). The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 246, 20-25.
- Assil, I. Q., and Abou-Samra, A. B. (2001). N-glycosylation of CRF receptor type 1 is important for its ligand-specific interaction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E1015-1021.
- Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J. C., *et al.* (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24, 326-332.
- Avizienyte, E., Wyke, A. W., Jones, R. J., McLean, G. W., Westhoff, M. A., Brunton, V. G., and Frame, M. C. (2002). Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat Cell Biol* 4, 632-638.

B

- Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., and Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915-1920.
- Badowski, C., Pawlak, G., Grichine, A., Chabadel, A., Oddou, C., Jurdic, P., Pfaff, M., Albiges-Rizo, C., and Block, M. R. (2008). Paxillin phosphorylation controls invadopodia/podosomes spatiotemporal organization. *Mol Biol Cell* 19, 633-645.
- Baigent, S. M. (2001). Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides* 22, 809-820.
- Bakshi, V. P., Newman, S. M., Smith-Roe, S., Jochman, K. A., and Kalin, N. H. (2007). Stimulation of lateral septum CRF2 receptors promotes anorexia and stress-like behaviors: functional homology to CRF1 receptors in basolateral amygdala. *J Neurosci* 27, 10568-10577.
- Bale, T. L., Giordano, F. J., Hickey, R. P., Huang, Y., Nath, A. K., Peterson, K. L., Vale, W. W., and Lee, K. F. (2002). Corticotropin-releasing factor receptor 2 is a tonic suppressor of vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7734-7739.
- Bale, T. L., and Vale, W. W. (2004). CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 525-557.
- Baliki, M., Al-Amin, H. A., Atweh, S. F., Jaber, M., Hawwa, N., Jabbur, S. J., Apkarian, A. V., and Saade, N. E. (2003). Attenuation of neuropathic manifestations by local block of the activities of the ventrolateral orbito-frontal area in the rat. *Neuroscience* 120, 1093-1104.
- Balkovetz, D. F. (2006). Claudins at the gate: determinants of renal epithelial tight junction paracellular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F572-579.
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res* 339, 269-280.
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., and Clevers, H. (2007).

Bibliographie

- Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003-1007.
- Barreau, F., Cartier, C., Leveque, M., Ferrier, L., Moriez, R., Laroute, V., Rosztoczy, A., Fioramonti, J., and Bueno, L. (2007). Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. *J Physiol* 580, 347-356.
- Barreau, F., Ferrier, L., Fioramonti, J., and Bueno, L. (2004). Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut* 53, 501-506.
- Basora, N., Herring-Gillam, F. E., Boudreau, F., Perreault, N., Pageot, L. P., Simoneau, M., Bouatrouss, Y., and Beaulieu, J. F. (1999). Expression of functionally distinct variants of the beta(4)A integrin subunit in relation to the differentiation state in human intestinal cells. *J Biol Chem* 274, 29819-29825.
- Basora, N., Vachon, P. H., Herring-Gillam, F. E., Perreault, N., and Beaulieu, J. F. (1997). Relation between integrin alpha7Bbeta1 expression in human intestinal cells and enterocytic differentiation. *Gastroenterology* 113, 1510-1521.
- Bates, R. C., and Mercurio, A. M. (2005). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biol Ther* 4, 365-370.
- Battle, E., Henderson, J. T., Beghtel, H., van den Born, M. M., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de Wetering, M., Pawson, T., and Clevers, H. (2002). Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111, 251-263.
- Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-89.
- Beachy, P. A., Karhadkar, S. S., and Berman, D. M. (2004). Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 432, 324-331.
- Beaulieu, J. F. (1999). Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci* 4, D310-321.
- Bellovin, D. I., Bates, R. C., Muzikansky, A., Rimm, D. L., and Mercurio, A. M. (2005). Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer research* 65, 10938-10945.
- Benoit, Y. D., Larrivee, J. F., Groulx, J. F., Stankova, J., Vachon, P. H., and Beaulieu, J. F. (2010a). Integrin alpha8beta1 confers anoikis susceptibility to human intestinal epithelial crypt cells. *Biochem Biophys Res Commun* 399, 434-439.
- Benoit, Y. D., Lussier, C., Ducharme, P. A., Sivret, S., Schnapp, L. M., Basora, N., and Beaulieu, J. F. (2009). Integrin alpha8beta1 regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells via a predominant RhoA/ROCK-dependent mechanism. *Biol Cell* 101, 695-708.
- Benoit, Y. D., Pare, F., Francoeur, C., Jean, D., Tremblay, E., Boudreau, F., Escaffit, F., and Beaulieu, J. F. (2010b). Cooperation between HNF-1alpha, Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298, G504-517.
- Bernstein, C. N. (2010). New insights into IBD epidemiology: Are there any lessons for treatment? *Dig Dis* 28, 406-410.
- Bhatia, V., and Tandon, R. K. (2005). Stress and the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol* 20, 332-339.
- Bisschops, R., Vanden Berghe, P., Sarnelli, G., Janssens, J., and Tack, J. (2006). CRF-induced calcium signaling in guinea pig small intestine myenteric neurons involves CRF-1

Bibliographie

- receptors and activation of voltage-sensitive calcium channels. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *290*, G1252-1260.
- Bissell, M. J., and Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* *1*, 46-54.
- Biswas, A., Wilmanski, J., Forsman, H., Hrnčir, T., Hao, L., Tlaskalova-Hogenova, H., and Kobayashi, K. S. (2011). Negative regulation of Toll-like receptor signaling plays an essential role in homeostasis of the intestine. *Eur J Immunol* *41*, 182-194.
- Black, P. H. (2002). Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain Behav Immun* *16*, 622-653.
- Blaschuk, O. W., Sullivan, R., David, S., and Pouliot, Y. (1990). Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev Biol* *139*, 227-229.
- Boggon, T. J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B. M., and Shapiro, L. (2002). C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* *296*, 1308-1313.
- Bonaz, B., and Tache, Y. (1994). Water-avoidance stress-induced c-fos expression in the rat brain and stimulation of fecal output: role of corticotropin-releasing factor. *Brain Res* *641*, 21-28.
- Boonyaratanakornkit, V., Bi, Y., Rudd, M., and Edwards, D. P. (2008). The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* *73*, 922-928.
- Boorse, G. C., and Denver, R. J. (2006). Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Gen Comp Endocrinol* *146*, 9-18.
- Boucher, M. J., Laprise, P., and Rivard, N. (2005). Cyclic AMP-dependent protein kinase A negatively modulates adherens junction integrity and differentiation of intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* *202*, 178-190.
- Boudry, G., Jury, J., Yang, P. C., and Perdue, M. H. (2007). Chronic psychological stress alters epithelial cell turn-over in rat ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *292*, G1228-1232.
- Braga, V. (2000). Epithelial cell shape: cadherins and small GTPases. *Exp Cell Res* *261*, 83-90.
- Braga, V. M. (2002). Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol* *14*, 546-556.
- Braga, V. M., Del Maschio, A., Machesky, L., and Dejana, E. (1999). Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context. *Mol Biol Cell* *10*, 9-22.
- Braga, V. M., Machesky, L. M., Hall, A., and Hotchin, N. A. (1997). The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol* *137*, 1421-1431.
- Brogna, J., and Hunter, T. (2011). Protein kinase signaling networks in cancer. *Curr Opin Genet Dev* *21*, 4-11.
- Bryant, D. M., Kerr, M. C., Hammond, L. A., Joseph, S. R., Mostov, K. E., Teasdale, R. D., and Stow, J. L. (2007). EGF induces macropinocytosis and SNX1-modulated recycling of E-cadherin. *J Cell Sci* *120*, 1818-1828.
- Bryant, D. M., and Stow, J. L. (2004). The ins and outs of E-cadherin trafficking. *Trends Cell Biol* *14*, 427-434.
- Buchanan, F. G., Gorden, D. L., Matta, P., Shi, Q., Matrisian, L. M., and DuBois, R. N. (2006). Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 1492-1497.
- Buckinx, R., Adriaensen, D., Nassauw, L. V., and Timmermans, J. P. (2011). Corticotropin-releasing factor, related peptides, and receptors in the normal and inflamed gastrointestinal tract. *Front Neurosci* *5*, 54.

Bibliographie

Bullen, T. F., Forrest, S., Campbell, F., Dodson, A. R., Hershman, M. J., Pritchard, D. M., Turner, J. R., Montrose, M. H., and Watson, A. J. (2006). Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. *Lab Invest* 86, 1052-1063.

C

- Calvert, R., and Pothier, P. (1990). Migration of fetal intestinal intervillous cells in neonatal mice. *Anat Rec* 227, 199-206.
- Cameron, H. L., and Perdue, M. H. (2005). Stress impairs murine intestinal barrier function: improvement by glucagon-like peptide-2. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 214-220.
- Canonici, A., Siret, C., Pellegrino, E., Pontier-Bres, R., Pouyet, L., Montero, M. P., Colin, C., Czerucka, D., Rigot, V., and Andre, F. (2011). *Saccharomyces boulardii* improves intestinal cell restitution through activation of the alpha2beta1 integrin collagen receptor. *PLoS One* 6, e18427.
- Cao, J., Papadopoulou, N., Kempuraj, D., Boucher, W. S., Sugimoto, K., Cetrulo, C. L., and Theoharides, T. C. (2005). Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor. *J Immunol* 174, 7665-7675.
- Capaldo, C. T., and Nusrat, A. (2009). Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 1788, 864-871.
- Cario, E., and Podolsky, D. K. (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 68, 7010-7017.
- Carlson, K. W., Nawy, S. S., Wei, E. T., Sadee, W., Filov, V. A., Rezsova, V. V., Slominski, A., and Quillan, J. M. (2001). Inhibition of mouse melanoma cell proliferation by corticotropin-releasing hormone and its analogs. *Anticancer Res* 21, 1173-1179.
- Cassinotti, E., Melson, J., Liggett, T., Melnikov, A., Yi, Q., Replogle, C., Mobarhan, S., Boni, L., Segato, S., and Levenson, V. (2011). DNA methylation patterns in blood of patients with colorectal cancer and adenomatous colorectal polyps. *Int J Cancer*.
- Castagliuolo, I., Lamont, J. T., Qiu, B., Fleming, S. M., Bhaskar, K. R., Nikulasson, S. T., Kornetsky, C., and Pothoulakis, C. (1996). Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells. *Am J Physiol* 271, G884-892.
- Catalano, R. D., Kyriakou, T., Chen, J., Easton, A., and Hillhouse, E. W. (2003). Regulation of corticotropin-releasing hormone type 2 receptors by multiple promoters and alternative splicing: identification of multiple splice variants. *Mol Endocrinol* 17, 395-410.
- Cenac, N., Chin, A. C., Garcia-Villar, R., Salvador-Cartier, C., Ferrier, L., Vergnolle, N., Buret, A. G., Fioramonti, J., and Bueno, L. (2004). PAR2 activation alters colonic paracellular permeability in mice via IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J Physiol* 558, 913-925.
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., and Chakraborti, T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253, 269-285.
- Chan, A. T., and Giovannucci, E. L. (2010). Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2029-2043 e2010.
- Chandras, C., Koutmani, Y., Kokkotou, E., Pothoulakis, C., and Karalis, K. P. (2009). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B by corticotropin-releasing factor in human monocytes. *Endocrinology* 150, 4606-4614.
- Chang, J., Adams, M. R., Clifton, M. S., Liao, M., Brooks, J. H., Hasdemir, B., and Bhargava, A. (2011). Urocortin 1 Modulates Immunosignaling in a Rat Model of Colitis Via Corticotropin-Releasing Factor Receptor 2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.

Bibliographie

- Chang, J., Hoy, J. J., Idumalla, P. S., Clifton, M. S., Pecoraro, N. C., and Bhargava, A. (2007). Urocortin 2 expression in the rat gastrointestinal tract under basal conditions and in chemical colitis. *Peptides* 28, 1453-1460.
- Chang, Y. W., Marlin, J. W., Chance, T. W., and Jakobi, R. (2006). RhoA mediates cyclooxygenase-2 signaling to disrupt the formation of adherens junctions and increase cell motility. *Cancer Res* 66, 11700-11708.
- Chaniotou, Z., Giannogonas, P., Theoharis, S., Teli, T., Gay, J., Savidge, T., Koutmani, Y., Brugni, J., Kokkotou, E., Pothoulakis, C., and Karalis, K. P. (2010). Corticotropin-releasing factor regulates TLR4 expression in the colon and protects mice from colitis. *Gastroenterology* 139, 2083-2092.
- Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M. G., and Zweibaum, A. (1988). Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 48, 1936-1942.
- Charrasse, S., Comunale, F., Grumbach, Y., Poulat, F., Blangy, A., and Gauthier-Rouviere, C. (2006). RhoA GTPase regulates M-cadherin activity and myoblast fusion. *Mol Biol Cell* 17, 749-759.
- Chartier, N. T., Laine, M., Gout, S., Pawlak, G., Marie, C. A., Matos, P., Block, M. R., and Jacquier-Sarlin, M. R. (2006). Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. *J Cell Sci* 119, 31-46.
- Chartier, N. T., Laine, M. G., Ducarouge, B., Oddou, C., Bonaz, B., Albiges-Rizo, C., and Jacquier-Sarlin, M. R. (2011a). Enterocytic differentiation is modulated by lipid rafts-dependent assembly of adherens junctions. *Exp Cell Res* 317, 1422-1436.
- Chartier, N. T., Laine, M. G., Ducarouge, B., Oddou, C., Bonaz, B., Albiges-Rizo, C., and Jacquier-Sarlin, M. R. (2011b). Enterocytic differentiation is modulated by lipid rafts-dependent assembly of adherens junctions. *Exp Cell Res*.
- Chartier, N. T., Oddou, C. I., Laine, M. G., Ducarouge, B., Marie, C. A., Block, M. R., and Jacquier-Sarlin, M. R. (2007). Cyclin-dependent kinase 2/cyclin E complex is involved in p120 catenin (p120ctn)-dependent cell growth control: a new role for p120ctn in cancer. *Cancer Res* 67, 9781-9790.
- Chatzaki, E., Crowe, P. D., Wang, L., Million, M., Tache, Y., and Grigoriadis, D. E. (2004). CRF receptor type 1 and 2 expression and anatomical distribution in the rat colon. *J Neurochem* 90, 309-316.
- Chatzaki, E., Lambropoulou, M., Constantinidis, T. C., Papadopoulos, N., Tache, Y., Minopoulos, G., and Grigoriadis, D. E. (2006). Corticotropin-releasing factor (CRF) receptor type 2 in the human stomach: protective biological role by inhibition of apoptosis. *J Cell Physiol* 209, 905-911.
- Chen, A., Blount, A., Vaughan, J., Brar, B., and Vale, W. (2004). Urocortin II gene is highly expressed in mouse skin and skeletal muscle tissues: localization, basal expression in corticotropin-releasing factor receptor (CRFR) 1- and CRFR2-null mice, and regulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 145, 2445-2457.
- Chen, A., Perrin, M., Brar, B., Li, C., Jamieson, P., Digruccio, M., Lewis, K., and Vale, W. (2005a). Mouse corticotropin-releasing factor receptor type 2alpha gene: isolation, distribution, pharmacological characterization and regulation by stress and glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 19, 441-458.
- Chen, A., Vaughan, J., and Vale, W. W. (2003). Glucocorticoids regulate the expression of the mouse urocortin II gene: a putative connection between the corticotropin-releasing factor receptor pathways. *Mol Endocrinol* 17, 1622-1639.
- Chen, A. M., Perrin, M. H., Digruccio, M. R., Vaughan, J. M., Brar, B. K., Arias, C. M., Lewis, K. A., Rivier, J. E., Sawchenko, P. E., and Vale, W. W. (2005b). A soluble mouse

Bibliographie

- brain splice variant of type 2alpha corticotropin-releasing factor (CRF) receptor binds ligands and modulates their activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2620-2625.
- Chen, F. M., Bilezikjian, L. M., Perrin, M. H., Rivier, J., and Vale, W. (1986). Corticotropin releasing factor receptor-mediated stimulation of adenylate cyclase activity in the rat brain. *Brain Res* 381, 49-57.
- Chen, R., Lewis, K. A., Perrin, M. H., and Vale, W. W. (1993). Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8967-8971.
- Chen, X. N., Zhu, H., Meng, Q. Y., and Zhou, J. N. (2008a). Estrogen receptor-alpha and -beta regulate the human corticotropin-releasing hormone gene through similar pathways. *Brain Res* 1223, 1-10.
- Chen, Y., Dube, C. M., Rice, C. J., and Baram, T. Z. (2008b). Rapid loss of dendritic spines after stress involves derangement of spine dynamics by corticotropin-releasing hormone. *J Neurosci* 28, 2903-2911.
- Chen, Y. T., Stewart, D. B., and Nelson, W. J. (1999). Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 144, 687-699.
- Chrousos, G. P. (1995). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 332, 1351-1362.
- Clark, M. S., and Kaiyala, K. J. (2003). Role of corticotropin-releasing factor family peptides and receptors in stress-related psychiatric disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry* 8, 119-136.
- Collins, S. M. (2001). Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G315-318.
- Comunale, F., Causeret, M., Favard, C., Cau, J., Taulet, N., Charrasse, S., and Gauthier-Rouviere, C. (2007). Rac1 and RhoA GTPases have antagonistic functions during N-cadherin-dependent cell-cell contact formation in C2C12 myoblasts. *Biol Cell* 99, 503-517.
- Conacci-Sorrell, M., Simcha, I., Ben-Yedidia, T., Blechman, J., Savagner, P., and Ben-Ze'ev, A. (2003). Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 163, 847-857.
- Conlin, V. S., Wu, X., Nguyen, C., Dai, C., Vallance, B. A., Buchan, A. M., Boyer, L., and Jacobson, K. (2009). Vasoactive intestinal peptide ameliorates intestinal barrier disruption associated with *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297, G735-750.
- Cooke, H. J. (1998). "Enteric Tears": Chloride Secretion and Its Neural Regulation. *News Physiol Sci* 13, 269-274.
- Cosnes, J. (2004). Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18, 481-496.
- Coutinho, S. V., Plotsky, P. M., Sablad, M., Miller, J. C., Zhou, H., Bayati, A. I., McRoberts, J. A., and Mayer, E. A. (2002). Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282, G307-316.
- Crawford, H. C., Dempsey, P. J., Brown, G., Adam, L., and Moss, M. L. (2009). ADAM10 as a therapeutic target for cancer and inflammation. *Curr Pharm Des* 15, 2288-2299.
- Creamer, B., Shorter, R. G., and Bamforth, J. (1961). The turnover and shedding of epithelial cells. I. The turnover in the gastro-intestinal tract. *Gut* 2, 110-118.
- Cristina, M. L., Lehy, T., Zeitoun, P., and Dufougeray, F. (1978). Fine structural classification and comparative distribution of endocrine cells in normal human large intestine. *Gastroenterology* 75, 20-28.

Bibliographie

Cubas, R., Zhang, S., Li, M., Chen, C., and Yao, Q. (2010). Trop2 expression contributes to tumor pathogenesis by activating the ERK MAPK pathway. *Mol Cancer* 9, 253.

D

- Dai, S. D., Wang, Y., Jiang, G. Y., Zhang, P. X., Dong, X. J., Wei, Q., Xu, H. T., Li, Q. C., Zhao, C., and Wang, E. H. (2010). Kaiso is expressed in lung cancer: its expression and localization is affected by p120ctn. *Lung Cancer* 67, 205-215.
- Danese, S., and Mantovani, A. (2010). Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer. *Oncogene* 29, 3313-3323.
- Daniel, C., Sartory, N. A., Zahn, N., Radeke, H. H., and Stein, J. M. (2008). Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther* 324, 23-33.
- Daniel, J. M. (2007). Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. *Biochim Biophys Acta* 1773, 59-68.
- Daniel, J. M., and Reynolds, A. B. (1999). The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol* 19, 3614-3623.
- Daniel, J. M., Spring, C. M., Crawford, H. C., Reynolds, A. B., and Baig, A. (2002). The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic Acids Res* 30, 2911-2919.
- Dautzenberg, F. M., Braun, S., and Hauger, R. L. (2001). GRK3 mediates desensitization of CRF1 receptors: a potential mechanism regulating stress adaptation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280, R935-946.
- Dautzenberg, F. M., and Hauger, R. L. (2002). The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci* 23, 71-77.
- Davis, M. A., Ireton, R. C., and Reynolds, A. B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* 163, 525-534.
- De Arcangelis, A., Lefebvre, O., Mechine-Neuville, A., Arnold, C., Klein, A., Remy, L., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (2001). Overexpression of laminin alpha1 chain in colonic cancer cells induces an increase in tumor growth. *Int J Cancer* 94, 44-53.
- De Jager, P. L., Graham, R., Farwell, L., Sawcer, S., Richardson, A., Behrens, T. W., Compston, A., Hafler, D. A., Kere, J., Vyse, T. J., and Rioux, J. D. (2006). The role of inflammatory bowel disease susceptibility loci in multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 7, 327-334.
- De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M. L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E., and Fazio, V. M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog* 10, 9.
- de Santa Barbara, P., van den Brink, G. R., and Roberts, D. J. (2003). Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci* 60, 1322-1332.
- Dedhar, S. (1999). Integrins and signal transduction. *Curr Opin Hematol* 6, 37-43.
- Demaude, J., Leveque, M., Chaumaz, G., Eutamene, H., Fioramonti, J., Bueno, L., and Ferrier, L. (2009). Acute stress increases colonic paracellular permeability in mice through a mast cell-independent mechanism: involvement of pancreatic trypsin. *Life Sci* 84, 847-852.
- Demaude, J., Salvador-Cartier, C., Fioramonti, J., Ferrier, L., and Bueno, L. (2006). Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut* 55, 655-661.

Bibliographie

- Deschenes, C., Vezina, A., Beaulieu, J. F., and Rivard, N. (2001). Role of p27(Kip1) in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* 120, 423-438.
- Dhanasekaran, S. M., Barrette, T. R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K. J., Rubin, M. A., and Chinnaiyan, A. M. (2001). Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412, 822-826.
- Dorin, R. I., Zlock, D. W., and Kilpatrick, K. (1993). Transcriptional regulation of human corticotropin releasing factor gene expression by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate: differential effects at proximal and distal promoter elements. *Mol Cell Endocrinol* 96, 99-111.
- Ducarouge, B., and Jacquier-Sarlin, M. (2012). Stress neuromediators are key regulators of the intestinal barrier: Link to inflammation and cancer. *Trends in Cell & Molecular Biology*.
- Dunbier, A., and Guilford, P. (2001). Hereditary diffuse gastric cancer. *Adv Cancer Res* 83, 55-65.
- Dydensborg, A. B., Teller, I. C., Basora, N., Groulx, J. F., Auclair, J., Francoeur, C., Escaffit, F., Pare, F., Herring, E., Menard, D., and Beaulieu, J. F. (2009a). Differential expression of the integrins alpha6Abeta4 and alpha6Bbeta4 along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Histochem Cell Biol* 131, 531-536.
- Dydensborg, A. B., Teller, I. C., Groulx, J. F., Basora, N., Pare, F., Herring, E., Gauthier, R., Jean, D., and Beaulieu, J. F. (2009b). Integrin alpha6Bbeta4 inhibits colon cancer cell proliferation and c-Myc activity. *BMC Cancer* 9, 223.

E

- East, J. E., Saunders, B. P., and Jass, J. R. (2008). Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management. *Gastroenterol Clin North Am* 37, 25-46, v.
- Edidin, M. (2001). Membrane cholesterol, protein phosphorylation, and lipid rafts. *Sci STKE* 2001, pe1.
- Edidin, M. (2003). The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32, 257-283.
- Elias, P. M. (2005). Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* 125, 183-200.
- Elkouby-Naor, L., and Ben-Yosef, T. (2010). Functions of claudin tight junction proteins and their complex interactions in various physiological systems. *Int Rev Cell Mol Biol* 279, 1-32.
- Elson, C. O., Sartor, R. B., Tennyson, G. S., and Riddell, R. H. (1995). Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109, 1344-1367.
- Emami, M. H., Gholamrezaei, A., and Daneshgar, H. (2009). Hypnotherapy as an adjuvant for the management of inflammatory bowel disease: a case report. *Am J Clin Hypn* 51, 255-262.
- Escaffit, F., Pare, F., Gauthier, R., Rivard, N., Boudreau, F., and Beaulieu, J. F. (2006). Cdx2 modulates proliferation in normal human intestinal epithelial crypt cells. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 66-72.
- Escaffit, F., Perreault, N., Jean, D., Francoeur, C., Herring, E., Rancourt, C., Rivard, N., Vachon, P. H., Pare, F., Boucher, M. P., *et al.* (2005). Repressed E-cadherin expression in the lower crypt of human small intestine: a cell marker of functional relevance. *Exp Cell Res* 302, 206-220.
- Espada, J., Perez-Moreno, M., Braga, V. M., Rodriguez-Viciano, P., and Cano, A. (1999). H-Ras activation promotes cytoplasmic accumulation and phosphoinositide 3-OH kinase association of beta-catenin in epidermal keratinocytes. *J Cell Biol* 146, 967-980.

Bibliographie

Estienne, M., Claustre, J., Clain-Gardechaux, G., Paquet, A., Tache, Y., Fioramonti, J., and Plaisancie, P. (2010). Maternal deprivation alters epithelial secretory cell lineages in rat duodenum: role of CRF-related peptides. *Gut* 59, 744-751.

Eutamene, H., Lamine, F., Chabo, C., Theodorou, V., Rochat, F., Bergonzelli, G. E., Corthesy-Theulaz, I., Fioramonti, J., and Bueno, L. (2007). Synergy between *Lactobacillus paracasei* and its bacterial products to counteract stress-induced gut permeability and sensitivity increase in rats. *J Nutr* 137, 1901-1907.

F

Farhadi, A., Fields, J. Z., and Keshavarzian, A. (2007). Mucosal mast cells are pivotal elements in inflammatory bowel disease that connect the dots: stress, intestinal hyperpermeability and inflammation. *World J Gastroenterol* 13, 3027-3030.

Fassler, R., and Meyer, M. (1995). Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* 9, 1896-1908.

Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.

Feichter, S., Meier-Ruge, W. A., and Bruder, E. (2009). The histopathology of gastrointestinal motility disorders in children. *Semin Pediatr Surg* 18, 206-211.

Ferraris, R. P. (2001). Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochem J* 360, 265-276.

Ferrier, L., Mazelin, L., Cenac, N., Desreumaux, P., Janin, A., Emilie, D., Colombel, J. F., Garcia-Villar, R., Fioramonti, J., and Bueno, L. (2003). Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology* 125, 795-804.

Fina, D., and Pallone, F. (2008). What is the role of cytokines and chemokines in IBD? *Inflamm Bowel Dis* 14 Suppl 2, S117-118.

Florio, P., De Falco, G., Leucci, E., Torricelli, M., Torres, P. B., Toti, P., Dell'Anna, A., Tiso, E., Santopietro, R., Leoncini, L., and Petraglia, F. (2006). Urocortin expression is downregulated in human endometrial carcinoma. *J Endocrinol* 190, 99-105.

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285, 1182-1186.

Follett, K. A., and Dirks, B. (1995). Responses of neurons in ventrolateral orbital cortex to noxious visceral stimulation in the rat. *Brain Res* 669, 157-162.

Frame, M. C. (2004). Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J Cell Sci* 117, 989-998.

Francoeur, C., Escaffit, F., Vachon, P. H., and Beaulieu, J. F. (2004). Proinflammatory cytokines TNF-alpha and IFN-gamma alter laminin expression under an apoptosis-independent mechanism in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G592-598.

Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 435, 964-968.

Friedl, P., and Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 188, 11-19.

Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E., Behrens, J., Sommer, T., and Birchmeier, W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* 4, 222-231.

Fukamachi, H. (1992). Proliferation and differentiation of fetal rat intestinal epithelial cells in primary serum-free culture. *J Cell Sci* 103 (Pt 2), 511-519.

Bibliographie

- Furness, J. B., and Costa, M. (1980). Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 5, 1-20.
- Furutani, Y., Morimoto, Y., Shibahara, S., Noda, M., Takahashi, H., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T., and Numa, S. (1983). Cloning and sequence analysis of cDNA for ovine corticotropin-releasing factor precursor. *Nature* 301, 537-540.

G

- Gaestel, M., Kotlyarov, A., and Kracht, M. (2009). Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 8, 480-499.
- Gala, M., and Chung, D. C. (2011). Hereditary colon cancer syndromes. *Semin Oncol* 38, 490-499.
- Galand, G. (1989). Brush border membrane sucrase-isomaltase, maltase-glucoamylase and trehalase in mammals. Comparative development, effects of glucocorticoids, molecular mechanisms, and phylogenetic implications. *Comp Biochem Physiol B* 94, 1-11.
- Garabedian, E. M., Roberts, L. J., McNevin, M. S., and Gordon, J. I. (1997). Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *J Biol Chem* 272, 23729-23740.
- Gareau, M. G., Jury, J., and Perdue, M. H. (2007). Neonatal maternal separation of rat pups results in abnormal cholinergic regulation of epithelial permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293, G198-203.
- Gareau, M. G., Silva, M. A., and Perdue, M. H. (2008). Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Curr Mol Med* 8, 274-281.
- Garg, P., Sarma, D., Jeppsson, S., Patel, N. R., Gewirtz, A. T., Merlin, D., and Sitaraman, S. V. (2010). Matrix metalloproteinase-9 functions as a tumor suppressor in colitis-associated cancer. *Cancer Res* 70, 792-801.
- Garg, P., Vijay-Kumar, M., Wang, L., Gewirtz, A. T., Merlin, D., and Sitaraman, S. V. (2009). Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296, G175-184.
- Gassler, N., Rohr, C., Schneider, A., Kartenbeck, J., Bach, A., Obermuller, N., Otto, H. F., and Autschbach, F. (2001). Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281, G216-228.
- Gates, J., and Peifer, M. (2005). Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions. *Cell* 123, 769-772.
- Gautier, J., Matsukawa, T., Nurse, P., and Maller, J. (1989). Dephosphorylation and activation of *Xenopus* p34cdc2 protein kinase during the cell cycle. *Nature* 339, 626-629.
- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., and Maller, J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 54, 433-439.
- Gay, J., Kokkotou, E., O'Brien, M., Pothoulakis, C., and Karalis, K. P. (2008). Corticotropin-releasing hormone deficiency is associated with reduced local inflammation in a mouse model of experimental colitis. *Endocrinology* 149, 3403-3409.
- Gaykema, R. P., Dijkstra, I., and Tilders, F. J. (1995). Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons and ACTH secretion. *Endocrinology* 136, 4717-4720.
- Gebeshuber, C. A., Sladeczek, S., and Grunert, S. (2007). Beta-catenin/LEF-1 signalling in breast cancer--central players activated by a plethora of inputs. *Cells Tissues Organs* 185, 51-60.
- Georgakopoulos, A., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Shioi, J., Cui, W., Li, H. C., Schutte, M., Gordon, R., Holstein, G. R., Martinelli, G., *et al.* (1999). Presenilin-1 forms

Bibliographie

- complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts. *Mol Cell* 4, 893-902.
- Gerbe, F., van Es, J. H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N. F., Bourgaux, J. F., Pignodel, C., *et al.* (2011). Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J Cell Biol* 192, 767-780.
- Gersemann, M., Stange, E. F., and Wehkamp, J. (2011). From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 17, 3198-3203.
- Giancotti, F. G. (1996). Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: charting the path between laminin binding and nuclear events. *J Cell Sci* 109 (Pt 6), 1165-1172.
- Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W. G., and Quaranta, V. (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277, 225-228.
- Giepmans, B. N., and van Ijzendoorn, S. C. (2009). Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim Biophys Acta* 1788, 820-831.
- Gimona, M., and Buccione, R. (2006). Adhesions that mediate invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1875-1892.
- Goetzl, E. J., Chan, R. C., and Yadav, M. (2008). Diverse mechanisms and consequences of immunoadoption of neuromediator systems. *Ann N Y Acad Sci* 1144, 56-60.
- Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., and Delgado, M. (2007). Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol* 7, 52-63.
- Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Varela, N., Robledo, G., and Delgado, M. (2006a). Urocortin and adrenomedullin prevent lethal endotoxemia by down-regulating the inflammatory response. *Am J Pathol* 168, 1921-1930.
- Gonzalez-Rey, E., Fernandez-Martin, A., Chorny, A., and Delgado, M. (2006b). Therapeutic effect of urocortin and adrenomedullin in a murine model of Crohn's disease. *Gut* 55, 824-832.
- Goodhand, J. R., Wahed, M., and Rampton, D. S. (2009). Management of stress in inflammatory bowel disease: a therapeutic option? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 3, 661-679.
- Gottardi, C. J., Wong, E., and Gumbiner, B. M. (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 153, 1049-1060.
- Gout, S. P., Jacquier-Sarlin, M. R., Rouard-Talbot, L., Rousselle, P., and Block, M. R. (2001). RhoA-dependent switch between alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins is induced by laminin-5 during early stage of HT-29 cell differentiation. *Mol Biol Cell* 12, 3268-3281.
- Grace, C. R., Perrin, M. H., Cantle, J. P., Vale, W. W., Rivier, J. E., and Riek, R. (2007). Common and divergent structural features of a series of corticotropin releasing factor-related peptides. *J Am Chem Soc* 129, 16102-16114.
- Grammatopoulos, D. K., and Chrousos, G. P. (2002). Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab* 13, 436-444.
- Grammatopoulos, D. K., Randeva, H. S., Levine, M. A., Kanellopoulou, K. A., and Hillhouse, E. W. (2001). Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins. *J Neurochem* 76, 509-519.
- Graziani, G., Tentori, L., Muzi, A., Vergati, M., Tringali, G., Pozzoli, G., and Navarra, P. (2007). Evidence that corticotropin-releasing hormone inhibits cell growth of human breast cancer cells via the activation of CRH-R1 receptor subtype. *Mol Cell Endocrinol* 264, 44-49.

Bibliographie

- Graziani, G., Tentori, L., Portarena, I., Barbarino, M., Tringali, G., Pozzoli, G., and Navarra, P. (2002). CRH inhibits cell growth of human endometrial adenocarcinoma cells via CRH-receptor 1-mediated activation of cAMP-PKA pathway. *Endocrinology* *143*, 807-813.
- Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z. W., Egan, L. J., Kagnoff, M. F., and Karin, M. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* *118*, 285-296.
- Grigoriadis, D. E., and De Souza, E. B. (1989). Heterogeneity between brain and pituitary corticotropin-releasing factor receptors is due to differential glycosylation. *Endocrinology* *125*, 1877-1888.
- Grimoud, J., Durand, H., de Souza, S., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V., and Roques, C. (2010). In vitro screening of probiotics and synbiotics according to anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *Int J Food Microbiol* *144*, 42-50.
- Gross, K. J., and Pothoulakis, C. (2007). Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* *13*, 918-932.
- Groux-Degroote, S., Krzewinski-Recchi, M. A., Cazet, A., Vincent, A., Lehoux, S., Lafitte, J. J., Van Seuning, I., and Delannoy, P. (2008). IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewisx epitopes in the human bronchial mucosa. *Biochem J* *410*, 213-223.
- Gumbiner, B. M. (2000). Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* *148*, 399-404.
- Gupta, A. K., and Schoen, R. E. (2009). Aberrant crypt foci: are they intermediate endpoints of colon carcinogenesis in humans? *Curr Opin Gastroenterol* *25*, 59-65.
- Gutknecht, E., Vauquelin, G., and Dautzenberg, F. M. (2010). Corticotropin-releasing factor receptors induce calcium mobilization through cross-talk with Gq-coupled receptors. *Eur J Pharmacol* *642*, 1-9.

H

- Halbleib, J. M., Saaf, A. M., Brown, P. O., and Nelson, W. J. (2007). Transcriptional modulation of genes encoding structural characteristics of differentiating enterocytes during development of a polarized epithelium in vitro. *Mol Biol Cell* *18*, 4261-4278.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* *279*, 509-514.
- Hanamori, T., Kunitake, T., Kato, K., and Kannan, H. (1998). Responses of neurons in the insular cortex to gustatory, visceral, and nociceptive stimuli in rats. *J Neurophysiol* *79*, 2535-2545.
- Hao, Z., Huang, Y., Cleman, J., Jovin, I. S., Vale, W. W., Bale, T. L., and Giordano, F. J. (2008). Urocortin2 inhibits tumor growth via effects on vascularization and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 3939-3944.
- Harada, S., Imaki, T., Naruse, M., Chikada, N., Nakajima, K., and Demura, H. (1999). Urocortin mRNA is expressed in the enteric nervous system of the rat. *Neurosci Lett* *267*, 125-128.
- Haramis, A. P., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G. J., and Clevers, H. (2004). De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* *303*, 1684-1686.
- Hasegawa, H., and Saiki, I. (2002). Psychosocial stress augments tumor development through beta-adrenergic activation in mice. *Jpn J Cancer Res* *93*, 729-735.
- Hatzfeld, M. (1999). The armadillo family of structural proteins. *Int Rev Cytol* *186*, 179-224.
- Hauger, R. L., Olivares-Reyes, J. A., Braun, S., Catt, K. J., and Dautzenberg, F. M. (2003). Mediation of corticotropin releasing factor type 1 receptor phosphorylation and desensitization by protein kinase C: a possible role in stress adaptation. *J Pharmacol Exp Ther* *306*, 794-803.

Bibliographie

- Hayden, D. M., Forsyth, C., and Keshavarzian, A. (2011). The role of matrix metalloproteinases in intestinal epithelial wound healing during normal and inflammatory states. *J Surg Res* 168, 315-324.
- Heimesaat, M. M., Fischer, A., Jahn, H. K., Niebergall, J., Freudenberg, M., Blaut, M., Liesenfeld, O., Schumann, R. R., Gobel, U. B., and Bereswill, S. (2007). Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. *Gut* 56, 941-948.
- Heitkemper, M. M., Cain, K. C., Burr, R. L., Jun, S. E., and Jarrett, M. E. (2011). Is childhood abuse or neglect associated with symptom reports and physiological measures in women with irritable bowel syndrome? *Biol Res Nurs* 13, 399-408.
- Hillhouse, E. W., and Grammatopoulos, D. K. (2006). The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 27, 260-286.
- Hinchcliffe, E. H., Li, C., Thompson, E. A., Maller, J. L., and Sluder, G. (1999). Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* 283, 851-854.
- Hisamatsu, T., Inoue, N., Yajima, T., Izumiya, M., Ichikawa, H., and Hibi, T. (2007). Psychological aspects of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 42 Suppl 17, 34-40.
- Hofmann, B. A., Sydow, S., Jahn, O., van Werven, L., Liepold, T., Eckart, K., and Spiess, J. (2001). Functional and protein chemical characterization of the N-terminal domain of the rat corticotropin-releasing factor receptor 1. *Protein Sci* 10, 2050-2062.
- Hogervorst, F., Kuikman, I., von dem Borne, A. E., and Sonnenberg, A. (1990). Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain. *EMBO J* 9, 765-770.
- Howarth, A. G., and Stevenson, B. R. (1995). Molecular environment of ZO-1 in epithelial and non-epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 31, 323-332.
- Howe, J. R., Bair, J. L., Sayed, M. G., Anderson, M. E., Mitros, F. A., Petersen, G. M., Velculescu, V. E., Traverso, G., and Vogelstein, B. (2001). Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat Genet* 28, 184-187.
- Howe, J. R., Roth, S., Ringold, J. C., Summers, R. W., Jarvinen, H. J., Sistonen, P., Tomlinson, I. P., Houlston, R. S., Bevan, S., Mitros, F. A., *et al.* (1998). Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 280, 1086-1088.
- Hsu, S. Y. (2004). Bioinformatics in reproductive biology--functional annotation based on comparative sequence analysis. *J Reprod Immunol* 63, 75-83.
- Hsu, S. Y., and Hsueh, A. J. (2001). Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med* 7, 605-611.
- Huang, M., Kempuraj, D., Papadopoulou, N., Kourelis, T., Donelan, J., Manola, A., and Theoharides, T. C. (2009). Urocortin induces interleukin-6 release from rat cardiomyocytes through p38 MAP kinase, ERK and NF-kappaB activation. *J Mol Endocrinol* 42, 397-405.
- Huber, A. H., and Weis, W. I. (2001). The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 105, 391-402.
- Huising, M. O., and Flik, G. (2005). The remarkable conservation of corticotropin-releasing hormone (CRH)-binding protein in the honeybee (*Apis mellifera*) dates the CRH system to a common ancestor of insects and vertebrates. *Endocrinology* 146, 2165-2170.
- Huising, M. O., Pilbrow, A. P., Matsumoto, M., van der Meulen, T., Park, H., Vaughan, J. M., Lee, S., and Vale, W. W. (2011). Glucocorticoids differentially regulate the expression of

Bibliographie

CRFR1 and CRFR2alpha in MIN6 insulinoma cells and rodent islets. *Endocrinology* 152, 138-150.

Huising, M. O., Vaughan, J. M., Shah, S. H., Grillot, K. L., Donaldson, C. J., Rivier, J., Flik, G., and Vale, W. W. (2008). Residues of corticotropin releasing factor-binding protein (CRF-BP) that selectively abrogate binding to CRF but not to urocortin 1. *J Biol Chem* 283, 8902-8912.

Hulpiau, P., and van Roy, F. (2009). Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 349-369.

Hunger-Glaser, I., Salazar, E. P., Sinnott-Smith, J., and Rozengurt, E. (2003). Bombesin, lysophosphatidic acid, and epidermal growth factor rapidly stimulate focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-910: requirement for ERK activation. *J Biol Chem* 278, 22631-22643.

I

Iizuka, M., and Konno, S. (2011). Wound healing of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 17, 2161-2171.

Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., and Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171, 939-945.

Im, E., Rhee, S. H., Park, Y. S., Fiocchi, C., Tache, Y., and Pothoulakis, C. (2010). Corticotropin-releasing hormone family of peptides regulates intestinal angiogenesis. *Gastroenterology* 138, 2457-2467, 2467 e2451-2455.

Ireton, R. C., Davis, M. A., van Hengel, J., Mariner, D. J., Barnes, K., Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Matrisian, L., Bundy, L. M., Sealy, L., *et al.* (2002). A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* 159, 465-476.

Ivanov, A. I., Nusrat, A., and Parkos, C. A. (2004). Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol Biol Cell* 15, 176-188.

Ivaska, J. (2011). Vimentin: Central hub in EMT induction? *Small Gtpases* 2, 51-53.

Izumi, G., Sakisaka, T., Baba, T., Tanaka, S., Morimoto, K., and Takai, Y. (2004). Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. *J Cell Biol* 166, 237-248.

J

Jacob, C., Yang, P. C., Darmoul, D., Amadesi, S., Saito, T., Cottrell, G. S., Coelho, A. M., Singh, P., Grady, E. F., Perdue, M., and Bunnett, N. W. (2005). Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *J Biol Chem* 280, 31936-31948.

Jaffe, A. B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.

Jahn, O., Radulovic, J., Stiedl, O., Tezval, H., Eckart, K., and Spiess, J. (2005). Corticotropin-releasing factor binding protein--a ligand trap? *Mini Rev Med Chem* 5, 953-960.

Jamieson, P. M., Li, C., Kukura, C., Vaughan, J., and Vale, W. (2006). Urocortin 3 modulates the neuroendocrine stress response and is regulated in rat amygdala and hypothalamus by stress and glucocorticoids. *Endocrinology* 147, 4578-4588.

Jankowski, J. A., Bedford, F. K., and Kim, Y. S. (1997). Changes in gene structure and regulation of E-cadherin during epithelial development, differentiation, and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 57, 187-215.

Bibliographie

- Jarvi, O., and Keyrilainen, O. (1956). On the cellular structures of the epithelial invasions in the glandular stomach of mice caused by intramural application of 20-methylcholantren. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 39, 72-73.
- Jiang, X., Jacamo, R., Zhukova, E., Sinnett-Smith, J., and Rozengurt, E. (2006). RNA interference reveals a differential role of FAK and Pyk2 in cell migration, leading edge formation and increase in focal adhesions induced by LPA in intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* 207, 816-828.
- Jiang, X., Sinnett-Smith, J., and Rozengurt, E. (2007). Differential FAK phosphorylation at Ser-910, Ser-843 and Tyr-397 induced by angiotensin II, LPA and EGF in intestinal epithelial cells. *Cell Signal* 19, 1000-1010.
- Jin, L., Zhang, Q., Guo, R., Wang, L., Wang, J., Wan, R., Zhang, R., Xu, Y., and Li, S. (2011). Different effects of corticotropin-releasing factor and urocortin 2 on apoptosis of prostate cancer cells in vitro. *J Mol Endocrinol* 47, 219-227.
- John, L. J., Fromm, M., and Schulzke, J. D. (2011). Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxid Redox Signal* 15, 1255-1270.
- Jones, J. C., Hopkinson, S. B., and Goldfinger, L. E. (1998). Structure and assembly of hemidesmosomes. *Bioessays* 20, 488-494.
- Jones, R. G., Li, X., Gray, P. D., Kuang, J., Clayton, F., Samowitz, W. S., Madison, B. B., Gumucio, D. L., and Kuwada, S. K. (2006). Conditional deletion of beta1 integrins in the intestinal epithelium causes a loss of Hedgehog expression, intestinal hyperplasia, and early postnatal lethality. *J Cell Biol* 175, 505-514.

K

- Kamei, T., Matozaki, T., Sakisaka, T., Kodama, A., Yokoyama, S., Peng, Y. F., Nakano, K., Takaishi, K., and Takai, Y. (1999). Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells--regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins. *Oncogene* 18, 6776-6784.
- Kaprara, A., Pazaitou-Panayiotou, K., Chemonidou, M. C., Constantinidis, T. C., Lambropoulou, M., Koffa, M., Kiziridou, A., Kakolyris, S., Kortsaris, A., and Chatzaki, E. (2010a). Distinct distribution of corticotropin releasing factor receptors in human breast cancer. *Neuropeptides* 44, 355-361.
- Kaprara, A., Pazaitou-Panayiotou, K., Kortsaris, A., and Chatzaki, E. (2010b). The corticotropin releasing factor system in cancer: expression and pathophysiological implications. *Cell Mol Life Sci* 67, 1293-1306.
- Karayiannakis, A. J., Syrigos, K. N., Efstathiou, J., Valizadeh, A., Noda, M., Playford, R. J., Kmiot, W., and Pignatelli, M. (1998). Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 185, 413-418.
- Karban, A., and Eliakim, R. (2007). Effect of smoking on inflammatory bowel disease: Is it disease or organ specific? *World J Gastroenterol* 13, 2150-2152.
- Karteris, E., Grammatopoulos, D., Randeve, H., and Hillhouse, E. W. (2000). Signal transduction characteristics of the corticotropin-releasing hormone receptors in the fetoplacental unit. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 1989-1996.
- Karteris, E., Markovic, D., Chen, J., Hillhouse, E. W., and Grammatopoulos, D. K. (2010). Identification of a novel corticotropin-releasing hormone type 1beta-like receptor variant lacking Exon 13 in human pregnant myometrium regulated by estradiol-17beta and progesterone. *Endocrinology* 151, 4959-4968.
- Kawahito, Y., Sano, H., Kawata, M., Yuri, K., Mukai, S., Yamamura, Y., Kato, H., Chrousos, G. P., Wilder, R. L., and Kondo, M. (1994). Local secretion of corticotropin-releasing hormone by enterochromaffin cells in human colon. *Gastroenterology* 106, 859-865.

Bibliographie

- Kawahito, Y., Sano, H., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Yamamura, Y., Kato, H., Chrousos, G. P., Wilder, R. L., and Kondo, M. (1995). Corticotropin releasing hormone in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Gut* *37*, 544-551.
- Kedinger, M., Simon-Assmann, P. M., Lacroix, B., Marxer, A., Hauri, H. P., and Haffen, K. (1986). Fetal gut mesenchyme induces differentiation of cultured intestinal endodermal and crypt cells. *Dev Biol* *113*, 474-483.
- Kelly, K. F., Otchere, A. A., Graham, M., and Daniel, J. M. (2004). Nuclear import of the BTB/POZ transcriptional regulator Kaiso. *J Cell Sci* *117*, 6143-6152.
- Khazaie, K., Blatner, N. R., Khan, M. W., Gounari, F., Gounaris, E., Dennis, K., Bonertz, A., Tsai, F. N., Strouch, M. J., Cheon, E., *et al.* (2011). The significant role of mast cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev* *30*, 45-60.
- Kiank, C., Tache, Y., and Larauche, M. (2010). Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: role of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Behav Immun* *24*, 41-48.
- Kiliaan, A. J., Saunders, P. R., Bijlsma, P. B., Berin, M. C., Taminiu, J. A., Groot, J. A., and Perdue, M. H. (1998). Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol* *275*, G1037-1044.
- Kim, S., Domon-Dell, C., Wang, Q., Chung, D. H., Di Cristofano, A., Pandolfi, P. P., Freund, J. N., and Evers, B. M. (2002). PTEN and TNF-alpha regulation of the intestinal-specific Cdx-2 homeobox gene through a PI3K, PKB/Akt, and NF-kappaB-dependent pathway. *Gastroenterology* *123*, 1163-1178.
- Kim, S. W., Park, J. I., Spring, C. M., Sater, A. K., Ji, H., Otchere, A. A., Daniel, J. M., and McCrea, P. D. (2004). Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin. *Nat Cell Biol* *6*, 1212-1220.
- Kim, Y. S., and Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* *12*, 319-330.
- Kimura, T., Amano, T., Uehara, H., Ariga, H., Ishida, T., Torii, A., Tajiri, H., Matsueda, K., and Yamato, S. (2007). Urocortin I is present in the enteric nervous system and exerts an excitatory effect via cholinergic and serotonergic pathways in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *293*, G903-910.
- Klampfer, L. (2011). Cytokines, inflammation and colon cancer. *Curr Cancer Drug Targets* *11*, 451-464.
- Klavdieva, M. M. (1995). The history of neuropeptides 1. *Front Neuroendocrinol* *16*, 293-321.
- Kobaek-Larsen, M., Thorup, I., Diederichsen, A., Fenger, C., and Hoitinga, M. R. (2000). Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans. *Comp Med* *50*, 16-26.
- Kobielak, A., Pasolli, H. A., and Fuchs, E. (2004). Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol* *6*, 21-30.
- Koizume, S., Tachibana, K., Sekiya, T., Hirohashi, S., and Shiraishi, M. (2002). Heterogeneity in the modification and involvement of chromatin components of the CpG island of the silenced human CDH1 gene in cancer cells. *Nucleic Acids Res* *30*, 4770-4780.
- Kojima, M., Wakai, K., Tokudome, S., Tamakoshi, K., Toyoshima, H., Watanabe, Y., Hayakawa, N., Suzuki, K., Hashimoto, S., Kawado, M., *et al.* (2005). Perceived psychologic stress and colorectal cancer mortality: findings from the Japan Collaborative Cohort Study. *Psychosom Med* *67*, 72-77.
- Kokkotou, E., Torres, D., Moss, A. C., O'Brien, M., Grigoriadis, D. E., Karalis, K., and Pothoulakis, C. (2006). Corticotropin-releasing hormone receptor 2-deficient mice have reduced intestinal inflammatory responses. *J Immunol* *177*, 3355-3361.

Bibliographie

- Kosinski, C., Li, V. S., Chan, A. S., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W. Y., Chan, T. L., Mifflin, R. C., Powell, D. W., Yuen, S. T., *et al.* (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 15418-15423.
- Kotelevets, L., van Hengel, J., Bruyneel, E., Mareel, M., van Roy, F., and Chastre, E. (2001). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for stabilizing intercellular junctions and reverting invasiveness. *J Cell Biol* *155*, 1129-1135.
- Koutroubakis, I., Manousos, O. N., Meuwissen, S. G., and Pena, A. S. (1996). Environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Hepatology* *43*, 381-393.
- Kozicz, T., and Arimura, A. (2002). Distribution of urocortin in the rat's gastrointestinal tract and its colocalization with tyrosine hydroxylase. *Peptides* *23*, 515-521.
- Krasinski, S. D., Estrada, G., Yeh, K. Y., Yeh, M., Traber, P. G., Rings, E. H., Buller, H. A., Verhave, M., Montgomery, R. K., and Grand, R. J. (1994). Transcriptional regulation of intestinal hydrolase biosynthesis during postnatal development in rats. *Am J Physiol* *267*, G584-594.
- Krude, T., Jackman, M., Pines, J., and Laskey, R. A. (1997). Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Cell* *88*, 109-119.
- Kuefer, R., Hofer, M. D., Gschwend, J. E., Pienta, K. J., Sanda, M. G., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A., and Day, M. L. (2003). The role of an 80 kDa fragment of E-cadherin in the metastatic progression of prostate cancer. *Clin Cancer Res* *9*, 6447-6452.
- Kurokawa, M., Lynch, K., and Podolsky, D. K. (1987). Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor beta inhibits proliferation and stimulates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* *142*, 775-782.
- Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (1996). Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* *271*, 24313-24316.

L

- la Fleur, S. E., Wick, E. C., Idumalla, P. S., Grady, E. F., and Bhargava, A. (2005). Role of peripheral corticotropin-releasing factor and urocortin II in intestinal inflammation and motility in terminal ileum. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 7647-7652.
- Lakshmanan, J., Magee, T. R., Richard, J. D., Liu, G. L., Salido, E., Sugano, S. K., Ferrini, M., and Ross, M. G. (2008). Localization and gestation-dependent pattern of corticotrophin-releasing factor receptor subtypes in ovine fetal distal colon. *Neurogastroenterol Motil* *20*, 1328-1339.
- Langhorst, M. F., Reuter, A., and Stuermer, C. A. (2005). Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol Life Sci* *62*, 2228-2240.
- Lanza, G., Messerini, L., Gafa, R., and Risio, M. (2011). Colorectal tumors: the histology report. *Dig Liver Dis* *43 Suppl 4*, S344-355.
- Laprise, P., Chailier, P., Houde, M., Beaulieu, J. F., Boucher, M. J., and 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.
- Laprise, P., Langlois, M. J., Boucher, M. J., Jobin, C., and Rivard, N. (2004). Down-regulation of MEK/ERK signaling by E-cadherin-dependent PI3K/Akt pathway in differentiating intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* *199*, 32-39.
- Larauche, M., Gourcerol, G., Wang, L., Pambukchian, K., Brunnhuber, S., Adelson, D. W., Rivier, J., Million, M., and Tache, Y. (2009a). Cortagine, a CRF1 agonist, induces stresslike alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *297*, G215-227.

Bibliographie

- Larauche, M., Kiank, C., and Tache, Y. (2009b). Corticotropin releasing factor signaling in colon and ileum: regulation by stress and pathophysiological implications. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 7, 33-46.
- Larsen, S., Bendtzen, K., and Nielsen, O. H. (2010). Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: epidemiology, diagnosis, and management. *Ann Med* 42, 97-114.
- Laukoetter, M. G., Nava, P., Lee, W. Y., Severson, E. A., Capaldo, C. T., Babbin, B. A., Williams, I. R., Koval, M., Peatman, E., Campbell, J. A., *et al.* (2007). JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* 204, 3067-3076.
- Laurie, G. W., Leblond, C. P., and Martin, G. R. (1982). Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes. *J Cell Biol* 95, 340-344.
- Laye, S., Bluthé, R. M., Kent, S., Combe, C., Medina, C., Parnet, P., Kelley, K., and Dantzer, R. (1995). Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 beta mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. *Am J Physiol* 268, R1327-1331.
- Le Clainche, C., and Carlier, M. F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* 88, 489-513.
- Le Douarin, N. M., and Teillet, M. A. (1973). The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol* 30, 31-48.
- Le, T. L., Yap, A. S., and Stow, J. L. (1999). Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol* 146, 219-232.
- Lederis, K., Letter, A., McMaster, D., Moore, G., and Schlesinger, D. (1982). Complete amino acid sequence of urotensin I, a hypotensive and corticotropin-releasing neuropeptide from *Catostomus*. *Science* 218, 162-165.
- Lee, H. J., Kwon, Y. S., Park, C. O., Oh, S. H., Lee, J. H., Wu, W. H., Chang, N. S., Lee, M. G., and Lee, K. H. (2009). Corticotropin-releasing factor decreases IL-18 in the monocyte-derived dendritic cell. *Exp Dermatol* 18, 199-204.
- Lenaerts, K., Bouwman, F. G., Lamers, W. H., Renes, J., and Mariman, E. C. (2007). Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. *BMC Genomics* 8, 91.
- Leon, A., Buriani, A., Dal Toso, R., Fabris, M., Romanello, S., Aloe, L., and Levi-Montalcini, R. (1994). Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3739-3743.
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., and Zweibaum, A. (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res* 50, 6334-6343.
- Leung, S., Liu, X., Fang, L., Chen, X., Guo, T., and Zhang, J. (2010). The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell Mol Immunol* 7, 182-189.
- Lewis, K., Li, C., Perrin, M. H., Blount, A., Kunitake, K., Donaldson, C., Vaughan, J., Reyes, T. M., Gulyas, J., Fischer, W., *et al.* (2001). Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7570-7575.
- Li, L. H., Zheng, M. H., Luo, Q., Ye, Q., Feng, B., Lu, A. G., Wang, M. L., Chen, X. H., Su, L. P., and Liu, B. Y. (2010). p21-activated protein kinase 1 induces colorectal cancer metastasis involving ERK activation and phosphorylation of FAK at Ser-910. *Int J Oncol* 37, 951-962.

Bibliographie

- Li, Q., Zhang, Q., Zhang, M., Wang, C., Zhu, Z., Li, N., and Li, J. (2008). Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on membrane microdomain localization of tight junction proteins in experimental colitis. *FEBS J* 275, 411-420.
- Liaw, C. W., Grigoriadis, D. E., Lovenberg, T. W., De Souza, E. B., and Maki, R. A. (1997). Localization of ligand-binding domains of human corticotropin-releasing factor receptor: a chimeric receptor approach. *Mol Endocrinol* 11, 980-985.
- Lightman, S. L. (2008). The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J Neuroendocrinol* 20, 880-884.
- Lilien, J., and Balsamo, J. (2005). The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 17, 459-465.
- Liu, S., Gao, N., Hu, H. Z., Wang, X., Wang, G. D., Fang, X., Gao, X., Xia, Y., and Wood, J. D. (2006). Distribution and chemical coding of corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons in the guinea pig enteric nervous system. *J Comp Neurol* 494, 63-74.
- Lochter, A., Srebrow, A., Sympton, C. J., Terracio, N., Werb, Z., and Bissell, M. J. (1997). Misregulation of stromelysin-1 expression in mouse mammary tumor cells accompanies acquisition of stromelysin-1-dependent invasive properties. *J Biol Chem* 272, 5007-5015.
- Lopes, E. C., Valls, E., Figueroa, M. E., Mazur, A., Meng, F. G., Chiosis, G., Laird, P. W., Schreiber-Agus, N., Grealley, J. M., Prokhortchouk, E., and Melnick, A. (2008). Kaiso contributes to DNA methylation-dependent silencing of tumor suppressor genes in colon cancer cell lines. *Cancer Res* 68, 7258-7263.
- Lovejoy, D. A., and Balment, R. J. (1999). Evolution and physiology of the corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 115, 1-22.
- Lovenberg, T. W., Liaw, C. W., Grigoriadis, D. E., Clevenger, W., Chalmers, D. T., De Souza, E. B., and Oltersdorf, T. (1995). Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 836-840.
- Lozano, E., Betson, M., and Braga, V. M. (2003). Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *Bioessays* 25, 452-463.
- Lu, Z., Ghosh, S., Wang, Z., and Hunter, T. (2003). Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 4, 499-515.
- Lundgren, O., Jodal, M., Jansson, M., Ryberg, A. T., and Svensson, L. (2011). Intestinal epithelial stem/progenitor cells are controlled by mucosal afferent nerves. *PLoS One* 6, e16295.

M

- Madison, B. B., Braunstein, K., Kuizon, E., Portman, K., Qiao, X. T., and Gumucio, D. L. (2005). Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* 132, 279-289.
- Madsen, K. L., Malfair, D., Gray, D., Doyle, J. S., Jewell, L. D., and Fedorak, R. N. (1999). Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis* 5, 262-270.
- Makitalo, L., Kolho, K. L., Karikoski, R., Anthoni, H., and Saarialho-Kere, U. (2010). Expression profiles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colonic inflammation related to pediatric inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 45, 862-871.
- Manicone, A. M., and McGuire, J. K. (2008). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol* 19, 34-41.

Bibliographie

- Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., *et al.* (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J* 21, 1948-1956.
- Marchiando, A. M., Shen, L., Graham, W. V., Weber, C. R., Schwarz, B. T., Austin, J. R., 2nd, Raleigh, D. R., Guan, Y., Watson, A. J., Montrose, M. H., and Turner, J. R. (2010). Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J Cell Biol* 189, 111-126.
- Markovic, D., Punn, A., Lehnert, H., and Grammatopoulos, D. K. (2008). Intracellular mechanisms regulating corticotropin-releasing hormone receptor-2beta endocytosis and interaction with extracellularly regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol Endocrinol* 22, 689-706.
- Masaki, T., Matsuoka, H., Sugiyama, M., Abe, N., Goto, A., Sakamoto, A., and Atomi, Y. (2001). Matrilysin (MMP-7) as a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 84, 1317-1321.
- Masuda, R., Semba, S., Mizuuchi, E., Yanagihara, K., and Yokozaki, H. (2010). Negative regulation of the tight junction protein tricellulin by snail-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric carcinoma cells. *Pathobiology* 77, 106-113.
- Mattila, P. K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 446-454.
- Maunder, R. G., and Levenstein, S. (2008). The role of stress in the development and clinical course of inflammatory bowel disease: epidemiological evidence. *Curr Mol Med* 8, 247-252.
- Mawdsley, J. E., and Rampton, D. S. (2005). Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 54, 1481-1491.
- Mawdsley, J. E., and Rampton, D. S. (2006). The role of psychological stress in inflammatory bowel disease. *Neuroimmunomodulation* 13, 327-336.
- Mayerle, J., Friess, H., Buchler, M. W., Schneckeburger, J., Weiss, F. U., Zimmer, K. P., Domschke, W., and Lerch, M. M. (2003). Up-regulation, nuclear import, and tumor growth stimulation of the adhesion protein p120 in pancreatic cancer. *Gastroenterology* 124, 949-960.
- McCawley, L. J., Li, S., Wattenberg, E. V., and Hudson, L. G. (1999). Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. A mechanism underlying receptor tyrosine kinase specificity for matrix metalloproteinase-9 induction and cell migration. *J Biol Chem* 274, 4347-4353.
- McConalogue, K., and Furness, J. B. (1994). Gastrointestinal neurotransmitters. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 8, 51-76.
- McEwen, B. S. (2006). Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci* 8, 367-381.
- McNeill, H., Ozawa, M., Kemler, R., and Nelson, W. J. (1990). Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity. *Cell* 62, 309-316.
- Meier, J., and Sturm, A. (2011). Current treatment of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 17, 3204-3212.
- Meijer, M. J., Mieremet-Ooms, M. A., van der Zon, A. M., van Duijn, W., van Hogezaand, R. A., Sier, C. F., Hommes, D. W., Lamers, C. B., and Verspaget, H. W. (2007). Increased mucosal matrix metalloproteinase-1, -2, -3 and -9 activity in patients with inflammatory bowel disease and the relation with Crohn's disease phenotype. *Dig Liver Dis* 39, 733-739.

Bibliographie

- Melgar, S., Bjursell, M., Gerdin, A. K., Svensson, L., Michaelsson, E., and Bohlooly, Y. M. (2007). Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G165-172.
- Melgar, S., Engstrom, K., Jagervall, A., and Martinez, V. (2008). Psychological stress reactivates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice. *Stress* 11, 348-362.
- Ménard, D., and Pothier, P. (1987). Differential distribution of digestive enzymes in isolated epithelial cells from developing human fetal small intestine and colon. *J Pediatr Gastroenterol Nutrition* 6, 509-516.
- Mendez, M. G., Kojima, S., and Goldman, R. D. (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J* 24, 1838-1851.
- Meregnani, J., Clarencon, D., Vivier, M., Peinnequin, A., Mouret, C., Sinniger, V., Picq, C., Job, A., Canini, F., Jacquier-Sarlin, M., and Bonaz, B. (2011). Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model of inflammatory bowel disease. *Auton Neurosci* 160, 82-89.
- Mezzacappa, E. S., Kelsey, R. M., Katkin, E. S., and Sloan, R. P. (2001). Vagal rebound and recovery from psychological stress. *Psychosom Med* 63, 650-657.
- Miceli, F., Ranelletti, F. O., Martinelli, E., Petrillo, M., Scambia, G., Navarra, P., and Ferrandina, G. (2009). Expression and subcellular localization of CRH and its receptors in human endometrial cancer. *Mol Cell Endocrinol* 305, 6-11.
- Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R., and Coppede, F. (2011). Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011, 792362.
- Miller, G., Chen, E., and Cole, S. W. (2009). Health psychology: developing biologically plausible models linking the social world and physical health. *Annu Rev Psychol* 60, 501-524.
- Minas, V., Rolaki, A., Kalantaridou, S. N., Sidiropoulos, J., Mitrou, S., Petsas, G., Jeschke, U., Paraskevaidis, E. A., Fountzilias, G., Chrousos, G. P., *et al.* (2007). Intratumoral CRH modulates immuno-escape of ovarian cancer cells through FasL regulation. *Br J Cancer* 97, 637-645.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Burbelo, P. D., Akiyama, S. K., and Yamada, K. M. (1995). Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 131, 791-805.
- Miyoshi, A., Kitajima, Y., Kido, S., Shimonishi, T., Matsuyama, S., Kitahara, K., and Miyazaki, K. (2005). Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 92, 252-258.
- Mohammad, Y. N., Perone, M., Wang, L., Ingleton, P. M., Castro, M. G., and Lovejoy, D. A. (2002). Expression of prolactin receptors and regulation of cell proliferation by prolactin, corticotropin-releasing factor, and corticosterone in a neuroblastoma cell line. *Biochem Cell Biol* 80, 475-482.
- Montecucchi, P. C., Anastasi, A., de Castiglione, R., and Erspamer, V. (1980). Isolation and amino acid composition of sauvagine. An active polypeptide from methanol extracts of the skin of the South American frog *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept Protein Res* 16, 191-199.
- Montgomery, R. K., and Breault, D. T. (2008). Small intestinal stem cell markers. *J Anat* 213, 52-58.
- Mooseker, M. S. (1983). Actin binding proteins of the brush border. *Cell* 35, 11-13.
- Moreno-Bueno, G., Portillo, F., and Cano, A. (2008). Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene* 27, 6958-6969.

Bibliographie

- Morikawa, T., Baba, Y., Yamauchi, M., Kuchiba, A., Nosho, K., Shima, K., Tanaka, N., Huttenhower, C., Frank, D. A., Fuchs, C. S., and Ogino, S. (2011). STAT3 expression, molecular features, inflammation patterns, and prognosis in a database of 724 colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 17, 1452-1462.
- Mosesson, Y., Mills, G. B., and Yarden, Y. (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 835-850.
- Moss, A. C., Anton, P., Savidge, T., Newman, P., Cheifetz, A. S., Gay, J., Paraschos, S., Winter, M. W., Moyer, M. P., Karalis, K., *et al.* (2007). Urocortin II mediates pro-inflammatory effects in human colonocytes via corticotropin-releasing hormone receptor 2alpha. *Gut* 56, 1210-1217.
- Moxey, P. C., and Trier, J. S. (1979). Development of villus absorptive cells in the human fetal small intestine: a morphological and morphometric study. *Anat Rec* 195, 463-482.
- Mueller, M. M., and Fusenig, N. E. (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 839-849.
- Muise, A. M., Walters, T. D., Glowacka, W. K., Griffiths, A. M., Ngan, B. Y., Lan, H., Xu, W., Silverberg, M. S., and Rotin, D. (2009). Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease. *Gut* 58, 1121-1127.
- Muramatsu, Y., Fukushima, K., Iino, K., Totsune, K., Takahashi, K., Suzuki, T., Hirasawa, G., Takeyama, J., Ito, M., Nose, M., *et al.* (2000). Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in the human colonic mucosa. *Peptides* 21, 1799-1809.
- Murillo, L. S., Morre, S. A., and Pena, A. S. (2003). Toll-like receptors and NOD/CARD proteins: pattern recognition receptors are key elements in the regulation of immune response. *Drugs Today (Barc)* 39, 415-438.
- Murphy, D. A., and Courtneidge, S. A. (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 413-426.
- Murphy, L. O., and Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 31, 268-275.

N

- Nagafuchi, A., Shirayoshi, Y., Okazaki, K., Yasuda, K., and Takeichi, M. (1987). Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* 329, 341-343.
- Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., and Rini, J. M. (1996). Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380, 360-364.
- Nanda, S. A., Roseboom, P. H., Nash, G. A., Speers, J. M., and Kalin, N. H. (2004). Characterization of the human corticotropin-releasing factor2(a) receptor promoter: regulation by glucocorticoids and the cyclic adenosine 5'-monophosphate pathway. *Endocrinology* 145, 5605-5615.
- Negri, L., Melchiorri, P., Montecucchi, P. C., Henschen, A., D'Urso, R., Iellamo, R., and Falaschi, P. (1983). Sauvagine induces release of adrenocorticotropin, beta-endorphin and corticosterone in rats. *Pharmacol Res Commun* 15, 427-438.
- Neunlist, M., Toumi, F., Oreschkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Labois, C. L., Galmiche, J. P., and Jarry, A. (2003). Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285, G1028-1036.
- Newell, K. J., Matrisian, L. M., and Driman, D. K. (2002). Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) expression in ulcerative colitis-related tumorigenesis. *Mol Carcinog* 34, 59-63.

Bibliographie

- Niessen, C. M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* *127*, 2525-2532.
- Noe, V., Fingleton, B., Jacobs, K., Crawford, H. C., Vermeulen, S., Steelant, W., Bruyneel, E., Matrisian, L. M., and Mareel, M. (2001). Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* *114*, 111-118.
- Noren, N. K., Liu, B. P., Burrige, K., and Kreft, B. (2000). p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* *150*, 567-580.
- Nusrat, A., Parkos, C. A., Verkade, P., Foley, C. S., Liang, T. W., Innis-Whitehouse, W., Eastburn, K. K., and Madara, J. L. (2000). Tight junctions are membrane microdomains. *J Cell Sci* *113* (Pt 10), 1771-1781.

O

- O'Connor, P. M., Lapointe, T. K., Beck, P. L., and Buret, A. G. (2010). Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* *16*, 1411-1420.
- O'Keefe, J., Lynch, S., Whelan, A., Jackson, J., Kennedy, N. P., Weir, D. G., and Feighery, C. (2001). Flow cytometric measurement of intracellular migration inhibition factor and tumour necrosis factor alpha in the mucosa of patients with coeliac disease. *Clin Exp Immunol* *125*, 376-382.
- O'Malley, D., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2010a). Alterations in colonic corticotropin-releasing factor receptors in the maternally separated rat model of irritable bowel syndrome: differential effects of acute psychological and physical stressors. *Peptides* *31*, 662-670.
- o'malley, D., Julio-Pieper, M., Gibney, S. M., Gosselin, R. D., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2010b). Differential stress-induced alterations of colonic corticotropin-releasing factor receptors in the Wistar Kyoto rat. *Neurogastroenterol Motil* *22*, 301-311.
- Okayasu, I., Ohkusa, T., Kajiura, K., Kanno, J., and Sakamoto, S. (1996). Promotion of colorectal neoplasia in experimental murine ulcerative colitis. *Gut* *39*, 87-92.
- Olson, M. F., and Sahai, E. (2009). The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* *26*, 273-287.
- Owens, M. J., and Nemeroff, C. B. (1993). The role of corticotropin-releasing factor in the pathophysiology of affective and anxiety disorders: laboratory and clinical studies. *Ciba Found Symp* *172*, 296-308; discussion 308-216.

P

- Packey, C. D., and Sartor, R. B. (2008). Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *J Intern Med* *263*, 597-606.
- Pal, K., Swaminathan, K., Xu, H. E., and Pioszak, A. A. (2010). Structural basis for hormone recognition by the Human CRFR2{alpha} G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* *285*, 40351-40361.
- Pang, J. H., Kraemer, A., Stehbins, S. J., Frame, M. C., and Yap, A. S. (2005). Recruitment of phosphoinositide 3-kinase defines a positive contribution of tyrosine kinase signaling to E-cadherin function. *J Biol Chem* *280*, 3043-3050.
- Paradisi, A., Maise, C., Bernet, A., Coissieux, M. M., Maccarrone, M., Scoazec, J. Y., and Mehlen, P. (2008). NF-kappaB regulates netrin-1 expression and affects the conditional tumor suppressive activity of the netrin-1 receptors. *Gastroenterology* *135*, 1248-1257.
- Park, J. I., Kim, S. W., Lyons, J. P., Ji, H., Nguyen, T. T., Cho, K., Barton, M. C., Deroo, T., Vleminckx, K., Moon, R. T., and McCrea, P. D. (2005). Kaiso/p120-catenin and

Bibliographie

- TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. *Dev Cell* 8, 843-854.
- Parsons, J. T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 116, 1409-1416.
- Paterson, A. D., Parton, R. G., Ferguson, C., Stow, J. L., and Yap, A. S. (2003). Characterization of E-cadherin endocytosis in isolated MCF-7 and chinese hamster ovary cells: the initial fate of unbound E-cadherin. *J Biol Chem* 278, 21050-21057.
- Pavlov, V. A., Wang, H., Czura, C. J., Friedman, S. G., and Tracey, K. J. (2003). The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med* 9, 125-134.
- Pece, S., Chiariello, M., Murga, C., and Gutkind, J. S. (1999). Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J Biol Chem* 274, 19347-19351.
- Peignon, G., Thenet, S., Schreider, C., Fouquet, S., Ribeiro, A., Dussaulx, E., Chambaz, J., Cardot, P., Pincon-Raymond, M., and Le Beyec, J. (2006). E-cadherin-dependent transcriptional control of apolipoprotein A-IV gene expression in intestinal epithelial cells: a role for the hepatic nuclear factor 4. *J Biol Chem* 281, 3560-3568.
- Pellissier, S., Dantzer, C., Canini, F., Mathieu, N., and Bonaz, B. (2010). Toward a definition of a global psycho-physiological criterion of vulnerability to relapse in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 105, 1446-1447.
- Perez-Moreno, M., Jamora, C., and Fuchs, E. (2003). Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 112, 535-548.
- Perreault, N., and Beaulieu, J. F. (1998). Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 245, 34-42.
- Perreault, N., and Jean-Francois, B. (1996). Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res* 224, 354-364.
- Perrin, M., Donaldson, C., Chen, R., Blount, A., Berggren, T., Bilezikjian, L., Sawchenko, P., and Vale, W. (1995). Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2969-2973.
- Perrin, M. H., and Vale, W. W. (1999). Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci* 885, 312-328.
- Pertz, O., Bozic, D., Koch, A. W., Fauser, C., Brancaccio, A., and Engel, J. (1999). A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J* 18, 1738-1747.
- Pfeiffer, C. J., Qiu, B., and Lam, S. K. (2001). Reduction of colonic mucus by repeated short-term stress enhances experimental colitis in rats. *J Physiol Paris* 95, 81-87.
- Piche, T., Saint-Paul, M. C., Dainese, R., Marine-Barjoan, E., Iannelli, A., Montoya, M. L., Peyron, J. F., Czerucka, D., Cherikh, F., Filippi, J., *et al.* (2008). Mast cells and cellularity of the colonic mucosa correlated with fatigue and depression in irritable bowel syndrome. *Gut* 57, 468-473.
- Piedra, J., Miravet, S., Castano, J., Palmer, H. G., Heisterkamp, N., Garcia de Herreros, A., and Dunach, M. (2003). p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol* 23, 2287-2297.
- Pinto, D., and Clevers, H. (2005). Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res* 306, 357-363.
- Pisarchik, A., and Slominski, A. (2004). Molecular and functional characterization of novel CRFR1 isoforms from the skin. *Eur J Biochem* 271, 2821-2830.

Bibliographie

- Pontier, C., Pachot, J., Botham, R., Lenfant, B., and Arnaud, P. (2001). HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: role of the mucus layer. *J Pharm Sci* *90*, 1608-1619.
- Porcher, C., Juhem, A., Peinnequin, A., Sinniger, V., and Bonaz, B. (2005). Expression and effects of metabotropic CRF1 and CRF2 receptors in rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *288*, G1091-1103.
- Porras, M., Martin, M. T., Yang, P. C., Jury, J., Perdue, M. H., and Vergara, P. (2006). Correlation between cyclical epithelial barrier dysfunction and bacterial translocation in the relapses of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* *12*, 843-852.
- Pothoulakis, C. (2009). Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Ther* *30*, 826-833.
- Pothoulakis, C., Castagliuolo, I., and Leeman, S. E. (1998). Neuroimmune mechanisms of intestinal responses to stress. Role of corticotropin-releasing factor and neurotensin. *Ann N Y Acad Sci* *840*, 635-648.
- Pothoulakis, C., Kelly, C. P., Joshi, M. A., Gao, N., O'Keane, C. J., Castagliuolo, I., and Lamont, J. T. (1993). *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology* *104*, 1108-1115.
- Potten, C. S. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *353*, 821-830.
- Potten, C. S., Booth, C., Tudor, G. L., Booth, D., Brady, G., Hurley, P., Ashton, G., Clarke, R., Sakakibara, S., and Okano, H. (2003). Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; *musashi-1*. *Differentiation* *71*, 28-41.
- Potten, C. S., and Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* *110*, 1001-1020.
- Potter, E., Behan, D. P., Fischer, W. H., Linton, E. A., Lowry, P. J., and Vale, W. W. (1991). Cloning and characterization of the cDNAs for human and rat corticotropin releasing factor-binding proteins. *Nature* *349*, 423-426.
- Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K. L., Powell, R. M., MacDonald, T. T., and Collins, J. E. (2005). Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Invest* *85*, 1139-1162.
- Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jorgensen, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., Bird, A., and Prokhortchouk, E. (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev* *15*, 1613-1618.
- Prokhortchouk, A., Sansom, O., Selfridge, J., Caballero, I. M., Salozhin, S., Aithozhina, D., Cerchietti, L., Meng, F. G., Augenlicht, L. H., Mariadason, J. M., *et al.* (2006). Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer. *Mol Cell Biol* *26*, 199-208.
- Punn, A., Levine, M. A., and Grammatopoulos, D. K. (2006). Identification of signaling molecules mediating corticotropin-releasing hormone-R1alpha-mitogen-activated protein kinase (MAPK) interactions: the critical role of phosphatidylinositol 3-kinase in regulating ERK1/2 but not p38 MAPK activation. *Mol Endocrinol* *20*, 3179-3195.
- Q**
- Qiu, B. S., Vallance, B. A., Blennerhassett, P. A., and Collins, S. M. (1999). The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nat Med* *5*, 1178-1182.
- Quaroni, A., and Isselbacher, K. J. (1985). Study of intestinal cell differentiation with monoclonal antibodies to intestinal cell surface components. *Dev Biol* *111*, 267-279.
- Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R. L., and Isselbacher, K. J. (1979). Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol* *80*, 248-265.

Bibliographie

R

- Radulovic, M., Hippel, C., and Spiess, J. (2003). Corticotropin-releasing factor (CRF) rapidly suppresses apoptosis by acting upstream of the activation of caspases. *J Neurochem* 84, 1074-1085.
- Rajagopalan, H., Nowak, M. A., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (2003). The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 695-701.
- Rakoff-Nahoum, S., Hao, L., and Medzhitov, R. (2006). Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* 25, 319-329.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229-241.
- Ramasundara, M., Leach, S. T., Lemberg, D. A., and Day, A. S. (2009). Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 24, 202-208.
- Rasmussen, T. N., Novak, I., and Nielsen, S. M. (2004). Internalization of the human CRF receptor 1 is independent of classical phosphorylation sites and of beta-arrestin 1 recruitment. *Eur J Biochem* 271, 4366-4374.
- Reiche, E. M., Nunes, S. O., and Morimoto, H. K. (2004). Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol* 5, 617-625.
- Ren, T. H., Wu, J., Yew, D., Ziea, E., Lao, L., Leung, W. K., Berman, B., Hu, P. J., and Sung, J. J. (2007). Effects of neonatal maternal separation on neurochemical and sensory response to colonic distension in a rat model of irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G849-856.
- Rescigno, M. (2008). The pathogenic role of intestinal flora in IBD and colon cancer. *Curr Drug Targets* 9, 395-403.
- Resnik, N., Sepcic, K., Plemenitas, A., Windoffer, R., Leube, R., and Veranic, P. (2011). Desmosome assembly and cell-cell adhesion are membrane raft-dependent processes. *J Biol Chem* 286, 1499-1507.
- Reubi, J. C., Waser, B., Vale, W., and Rivier, J. (2003). Expression of CRF1 and CRF2 receptors in human cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3312-3320.
- Reyes, T. M., Lewis, K., Perrin, M. H., Kunitake, K. S., Vaughan, J., Arias, C. A., Hogenesch, J. B., Gulyas, J., Rivier, J., Vale, W. W., and Sawchenko, P. E. (2001). Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2843-2848.
- Reynolds, A. B., and Carnahan, R. H. (2004). Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer. *Seminars in cell & developmental biology* 15, 657-663.
- Rhodin, J., and Dalhamn, T. (1956). Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 44, 345-412.
- Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a004978.
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.
- Roczniak-Ferguson, A., and Reynolds, A. B. (2003). Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity. *J Cell Sci* 116, 4201-4212.
- Rodova, M., Kelly, K. F., VanSaun, M., Daniel, J. M., and Werle, M. J. (2004). Regulation of the rapsyn promoter by kaiso and delta-catenin. *Mol Cell Biol* 24, 7188-7196.

Bibliographie

- Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P. A., Scholmerich, J., and Gross, V. (1998). Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* *115*, 357-369.
- Rutter, M., Saunders, B., Wilkinson, K., Rumbles, S., Schofield, G., Kamm, M., Williams, C., Price, A., Talbot, I., and Forbes, A. (2004). Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* *126*, 451-459.
- Rutter, M. D., Saunders, B. P., Wilkinson, K. H., Rumbles, S., Schofield, G., Kamm, M. A., Williams, C. B., Price, A. B., Talbot, I. C., and Forbes, A. (2006). Thirty-year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* *130*, 1030-1038.

S

- Saaf, A. M., Halbleib, J. M., Chen, X., Yuen, S. T., Leung, S. Y., Nelson, W. J., and Brown, P. O. (2007). Parallels between global transcriptional programs of polarizing Caco-2 intestinal epithelial cells in vitro and gene expression programs in normal colon and colon cancer. *Mol Biol Cell* *18*, 4245-4260.
- Sambuy, Y., and De Angelis, I. (1986). Formation of organoid structures and extracellular matrix production in an intestinal epithelial cell line during long-term in vitro culture. *Cell Differ* *19*, 139-147.
- Sanchez-Munoz, F., Dominguez-Lopez, A., and Yamamoto-Furusho, J. K. (2008). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* *14*, 4280-4288.
- Sand, E., Themner-Persson, A., and Ekblad, E. (2011). Corticotropin releasing factor-Distribution in rat intestine and role in neuroprotection. *Regul Pept* *166*, 68-75.
- Sander, G. R., and Powell, B. C. (2004). Expression of notch receptors and ligands in the adult gut. *J Histochem Cytochem* *52*, 509-516.
- Sangiorgi, E., and Capecchi, M. R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* *40*, 915-920.
- Santos, J., Saunders, P. R., Hanssen, N. P., Yang, P. C., Yates, D., Groot, J. A., and Perdue, M. H. (1999). Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *Am J Physiol* *277*, G391-399.
- Santos, J., Yang, P. C., Soderholm, J. D., Benjamin, M., and Perdue, M. H. (2001). Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut* *48*, 630-636.
- Santos, J., Yates, D., Guilarte, M., Vicario, M., Alonso, C., and Perdue, M. H. (2008). Stress neuropeptides evoke epithelial responses via mast cell activation in the rat colon. *Psychoneuroendocrinology* *33*, 1248-1256.
- Saruta, M., Takahashi, K., Suzuki, T., Fukuda, T., Torii, A., and Sasano, H. (2005). Urocortin 3/stresscopin in human colon: possible modulators of gastrointestinal function during stressful conditions. *Peptides* *26*, 1196-1206.
- Saruta, M., Takahashi, K., Suzuki, T., Torii, A., Kawakami, M., and Sasano, H. (2004). Urocortin 1 in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *J Clin Endocrinol Metab* *89*, 5352-5361.
- Sato, A. (2007). Tuft cells. *Anat Sci Int* *82*, 187-199.
- Saunders, P. R., Hanssen, N. P., and Perdue, M. H. (1997). Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol* *273*, G486-490.
- Saunders, P. R., Kosecka, U., McKay, D. M., and Perdue, M. H. (1994). Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *Am J Physiol* *267*, G794-799.

Bibliographie

- Saunders, P. R., Santos, J., Hanssen, N. P., Yates, D., Groot, J. A., and Perdue, M. H. (2002). Physical and psychological stress in rats enhances colonic epithelial permeability via peripheral CRH. *Dig Dis Sci* 47, 208-215.
- Sawchenko, P. E., and Swanson, L. W. (1982). The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res* 257, 275-325.
- Schoenherr, C. J., Paquette, A. J., and Anderson, D. J. (1996). Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9881-9886.
- Schrader, K. A., Masciari, S., Boyd, N., Wiyrick, S., Kaurah, P., Senz, J., Burke, W., Lynch, H. T., Garber, J. E., and Huntsman, D. G. (2008). Hereditary diffuse gastric cancer: association with lobular breast cancer. *Fam Cancer* 7, 73-82.
- Schreider, C., Peignon, G., Thenet, S., Chambaz, J., and Pincon-Raymond, M. (2002). Integrin-mediated functional polarization of Caco-2 cells through E-cadherin--actin complexes. *J Cell Sci* 115, 543-552.
- Scoville, D. H., Sato, T., He, X. C., and Li, L. (2008). Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* 134, 849-864.
- Scudamore, C. L., Jepson, M. A., Hirst, B. H., and Miller, H. R. (1998). The rat mucosal mast cell chymase, RMCP-II, alters epithelial cell monolayer permeability in association with altered distribution of the tight junction proteins ZO-1 and occludin. *Eur J Cell Biol* 75, 321-330.
- See, N. A., Greenwood, B., and Bass, P. (1990). Submucosal plexus alone integrates motor activity and epithelial transport in rat jejunum. *Am J Physiol* 259, G593-598.
- Seltana, A., Basora, N., and Beaulieu, J. F. (2010). Intestinal epithelial wound healing assay in an epithelial-mesenchymal co-culture system. *Wound Repair Regen* 18, 114-122.
- Selye, H. (1956). What is stress? *Metabolism* 5, 525-530.
- Senda, T., Iizuka-Kogo, A., Onouchi, T., and Shimomura, A. (2007). Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia. *Med Mol Morphol* 40, 68-81.
- Sengupta, N., and MacDonald, T. T. (2007). The role of matrix metalloproteinases in stromal/epithelial interactions in the gut. *Physiology (Bethesda)* 22, 401-409.
- Seth, K. A., and Majzoub, J. A. (2001). Repressor element silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) can act as an enhancer as well as a repressor of corticotropin-releasing hormone gene transcription. *J Biol Chem* 276, 13917-13923.
- Shahani, S., Nudelman, R. J., Nalini, R., Kim, H. S., and Samson, S. L. (2010). Ectopic corticotropin-releasing hormone (CRH) syndrome from metastatic small cell carcinoma: a case report and review of the literature. *Diagn Pathol* 5, 56.
- Shapiro, L., and Weis, W. I. (2009). Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a003053.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.
- Shi, X. Z., Winston, J. H., and Sarna, S. K. (2011). Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300, G41-51.
- Shibahara, S., Morimoto, Y., Furutani, Y., Notake, M., Takahashi, H., Shimizu, S., Horikawa, S., and Numa, S. (1983). Isolation and sequence analysis of the human corticotropin-releasing factor precursor gene. *EMBO J* 2, 775-779.
- Shore, E. M., and Nelson, W. J. (1991). Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 266, 19672-19680.

Bibliographie

- Simon-Assmann, P., and Kedinger, M. (1993). Heterotypic cellular cooperation in gut morphogenesis and differentiation. *Semin Cell Biol* 4, 221-230.
- Simon-Assmann, P., Simo, P., Bouziges, F., Haffen, K., and Kedinger, M. (1990). Synthesis of basement membrane proteins in the small intestine. *Digestion* 46 Suppl 2, 12-21.
- Simon-Assmann, P., Spenle, C., Lefebvre, O., and Kedinger, M. (2010). The role of the basement membrane as a modulator of intestinal epithelial-mesenchymal interactions. *Prog Mol Biol Transl Sci* 96, 175-206.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons, K., and Sampaio, J. L. (2011). Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Slominski, A., Zbytek, B., Pisarchik, A., Slominski, R. M., Zmijewski, M. A., and Wortsman, J. (2006). CRH functions as a growth factor/cytokine in the skin. *J Cell Physiol* 206, 780-791.
- Smalley-Freed, W. G., Efimov, A., Burnett, P. E., Short, S. P., Davis, M. A., Gumucio, D. L., Washington, M. K., Coffey, R. J., and Reynolds, A. B. (2010). p120-catenin is essential for maintenance of barrier function and intestinal homeostasis in mice. *J Clin Invest* 120, 1824-1835.
- Smith, E. M., Gregg, M., Hashemi, F., Schott, L., and Hughes, T. K. (2006). Corticotropin Releasing Factor (CRF) activation of NF-kappaB-directed transcription in leukocytes. *Cell Mol Neurobiol* 26, 1021-1036.
- Soderholm, J. D., Yang, P. C., Ceponis, P., Vohra, A., Riddell, R., Sherman, P. M., and Perdue, M. H. (2002). Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* 123, 1099-1108.
- Soffer, E. E. (2000). Small bowel motility: ready for prime time? *Curr Gastroenterol Rep* 2, 364-369.
- Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., and Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149, 901-914.
- Soubry, A., van Hengel, J., Parthoens, E., Colpaert, C., Van Marck, E., Waltregny, D., Reynolds, A. B., and van Roy, F. (2005). Expression and nuclear location of the transcriptional repressor Kaiso is regulated by the tumor microenvironment. *Cancer Res* 65, 2224-2233.
- Sougioultzis, S., Simeonidis, S., Bhaskar, K. R., Chen, X., Anton, P. M., Keates, S., Pothoulakis, C., and Kelly, C. P. (2006). *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 69-76.
- Spence, J. R., Lauf, R., and Shroyer, N. F. (2011a). Vertebrate intestinal endoderm development. *Dev Dyn* 240, 501-520.
- Spence, J. R., Mayhew, C. N., Rankin, S. A., Kuhar, M. F., Vallance, J. E., Tolle, K., Hoskins, E. E., Kalinichenko, V. V., Wells, S. I., Zorn, A. M., *et al.* (2011b). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 470, 105-109.
- Spieß, J., Dautzenberg, F. M., Sydow, S., Hauger, R. L., Ruhmann, A., Blank, T., and Radulovic, J. (1998). Molecular Properties of the CRF Receptor. *Trends Endocrinol Metab* 9, 140-145.
- Stegmann, A., Hansen, M., Wang, Y., Larsen, J. B., Lund, L. R., Ritie, L., Nicholson, J. K., Quistorff, B., Simon-Assmann, P., Troelsen, J. T., and Olsen, J. (2006). Metabolome, transcriptome, and bioinformatic cis-element analyses point to HNF-4 as a central regulator of gene expression during enterocyte differentiation. *Physiol Genomics* 27, 141-155.

Bibliographie

- Steinhusen, U., Weiske, J., Badock, V., Tauber, R., Bommert, K., and Huber, O. (2001). Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J Biol Chem* 276, 4972-4980.
- Stengel, A., and Tache, Y. (2009). Neuroendocrine control of the gut during stress: corticotropin-releasing factor signaling pathways in the spotlight. *Annu Rev Physiol* 71, 219-239.
- Stoops, S. L., Pearson, A. S., Weaver, C., Waterson, A. G., Days, E., Farmer, C., Brady, S., Weaver, C. D., Beauchamp, R. D., and Lindsley, C. W. (2011). Identification and optimization of small molecules that restore E-cadherin expression and reduce invasion in colorectal carcinoma cells. *ACS Chem Biol* 6, 452-465.
- Strathdee, G. (2002). Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol* 12, 373-379.
- Straub, R. H., Wiest, R., Strauch, U. G., Harle, P., and Scholmerich, J. (2006). The role of the sympathetic nervous system in intestinal inflammation. *Gut* 55, 1640-1649.
- Strober, W., Fuss, I. J., and Blumberg, R. S. (2002). The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 20, 495-549.
- Strugala, V., Dettmar, P. W., and Pearson, J. P. (2008). Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int J Clin Pract* 62, 762-769.
- Summy, J. M., and Gallick, G. E. (2003). Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 22, 337-358.
- Surlin, V., Ioana, M., and Plesea, I. E. (2011). Genetic patterns of metalloproteinases and their tissular inhibitors - clinicopathologic and prognostic significance in colorectal cancer. *Rom J Morphol Embryol* 52, 231-236.
- Swinny, J. D., and Valentino, R. J. (2006). Corticotropin-releasing factor promotes growth of brain norepinephrine neuronal processes through Rho GTPase regulators of the actin cytoskeleton in rat. *Eur J Neurosci* 24, 2481-2490.
- Symons, M., and Rusk, N. (2003). Control of vesicular trafficking by Rho GTPases. *Curr Biol* 13, R409-418.
- Sztainberg, Y., Kuperman, Y., Issler, O., Gil, S., Vaughan, J., Rivier, J., Vale, W., and Chen, A. (2009). A novel corticotropin-releasing factor receptor splice variant exhibits dominant negative activity: a putative link to stress-induced heart disease. *FASEB J* 23, 2186-2196.

T

- Tache, Y., and Bonaz, B. (2007). Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J Clin Invest* 117, 33-40.
- Tache, Y., and Perdue, M. H. (2004). Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1, 137-142.
- Tallant, C., Marrero, A., and Gomis-Ruth, F. X. (2010). Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta* 1803, 20-28.
- Tanaka, M. N., Diaz, B. L., de Souza, W., and Morgado-Diaz, J. A. (2008). Prostaglandin E2-EP1 and EP2 receptor signaling promotes apical junctional complex disassembly of Caco-2 human colorectal cancer cells. *BMC Cell Biol* 9, 63.
- te Velde, A. A., de Kort, F., Sterrenburg, E., Pronk, I., ten Kate, F. J., Hommes, D. W., and van Deventer, S. J. (2007). Comparative analysis of colonic gene expression of three experimental colitis models mimicking inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 13, 325-330.
- te Velde, A. A., Verstege, M. I., and Hommes, D. W. (2006). Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 12, 995-999.

Bibliographie

- Teitelbaum, A. A., Gareau, M. G., Jury, J., Yang, P. C., and Perdue, M. H. (2008). Chronic peripheral administration of corticotropin-releasing factor causes colonic barrier dysfunction similar to psychological stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295, G452-459.
- Teli, T., Markovic, D., Levine, M. A., Hillhouse, E. W., and Grammatopoulos, D. K. (2005). Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor type 1alpha signaling: structural determinants for G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and agonist-mediated desensitization. *Mol Endocrinol* 19, 474-490.
- Teller, I. C., Auclair, J., Herring, E., Gauthier, R., Menard, D., and Beaulieu, J. F. (2007). Laminins in the developing and adult human small intestine: relation with the functional absorptive unit. *Dev Dyn* 236, 1980-1990.
- Teller, I. C., and Beaulieu, J. F. (2001). Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Rev Mol Med* 3, 1-18.
- Tezval, H., Jurk, S., Atschekzei, F., Serth, J., Kuczyk, M. A., and Merseburger, A. S. (2009). The involvement of altered corticotropin releasing factor receptor 2 expression in prostate cancer due to alteration of anti-angiogenic signaling pathways. *Prostate* 69, 443-448.
- Theoharides, T. C., Singh, L. K., Boucher, W., Pang, X., Letourneau, R., Webster, E., and Chrousos, G. (1998). Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. *Endocrinology* 139, 403-413.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454.
- Thomas, S. M., and Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 513-609.
- Thomason, H. A., Scothern, A., McHarg, S., and Garrod, D. R. (2010). Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochem J* 429, 419-433.
- Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Daniel, J. M., Ireton, R. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Hummingbird, D. K., and Reynolds, A. B. (2000). Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol* 148, 189-202.
- Tixier, E., Lalanne, F., Just, I., Galmiche, J. P., and Neunlist, M. (2005). Human mucosa/submucosa interactions during intestinal inflammation: involvement of the enteric nervous system in interleukin-8 secretion. *Cell Microbiol* 7, 1798-1810.
- Tlaskalova-Hogenova, H., Farre-Castany, M. A., Stepankova, R., Kozakova, H., Tuckova, L., Funda, D. P., Barot, R., Cukrowska, B., Sinkora, J., Mandel, L., and et al. (1995). The gut as a lymphoepithelial organ: the role of intestinal epithelial cells in mucosal immunity. *Folia Microbiol (Praha)* 40, 385-391.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., and Issa, J. P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8681-8686.
- Toyota, M., and Suzuki, H. (2010). Epigenetic drivers of genetic alterations. *Adv Genet* 70, 309-323.
- Traber, P. G. (1998). Control of gene expression in intestinal epithelial cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353, 911-914.
- Tracey, K. J. (2007). Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest* 117, 289-296.
- Troughton, W. D., and Trier, J. S. (1969). Paneth and goblet cell renewal in mouse duodenal crypts. *J Cell Biol* 41, 251-268.
- Tsareva, S. A., Moriggl, R., Corvinus, F. M., Wiederanders, B., Schutz, A., Kovacic, B., and Friedrich, K. (2007). Signal transducer and activator of transcription 3 activation promotes

Bibliographie

- invasive growth of colon carcinomas through matrix metalloproteinase induction. *Neoplasia* 9, 279-291.
- Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Alissafi, T., Charalampopoulos, I., Dermitzaki, E., Roger, T., Gravanis, A., and Margioris, A. N. (2006). Corticotropin-releasing factor and the urocortins induce the expression of TLR4 in macrophages via activation of the transcription factors PU.1 and AP-1. *J Immunol* 176, 1869-1877.
- Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Dermitzaki, E., Charalampopoulos, I., Spiess, J., Gravanis, A., and Margioris, A. N. (2005). Urocortin 1 and Urocortin 2 induce macrophage apoptosis via CRFR2. *FEBS Lett* 579, 4259-4264.
- Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Dermitzaki, E., Gravanis, A., and Margioris, A. N. (2007). Corticotropin releasing factor receptor 1 (CRF1) and CRF2 agonists exert an anti-inflammatory effect during the early phase of inflammation suppressing LPS-induced TNF-alpha release from macrophages via induction of COX-2 and PGE2. *J Cell Physiol* 210, 774-783.
- Tsukamoto, T., and Nigam, S. K. (1999). Cell-cell dissociation upon epithelial cell scattering requires a step mediated by the proteasome. *J Biol Chem* 274, 24579-24584.
- Tsukita, S., Oishi, K., Akiyama, T., Yamanashi, Y., and Yamamoto, T. (1991). Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J Cell Biol* 113, 867-879.
- Turck, N., Gross, I., Gendry, P., Stutzmann, J., Freund, J. N., Kedinger, M., Simon-Assmann, P., and Launay, J. F. (2005). Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 303, 494-503.
- Turck, N., Lefebvre, O., Gross, I., Gendry, P., Kedinger, M., Simon-Assmann, P., and Launay, J. F. (2006). Effect of laminin-1 on intestinal cell differentiation involves inhibition of nuclear nucleolin. *J Cell Physiol* 206, 545-555.
- Turner, D. J., Martin, P. C., Rao, J. N., Greenspon, J., Zou, T., Bass, B. L., Wang, J. Y., and Strauch, E. D. (2007). Substance P regulates migration in rat intestinal epithelial cells. *Ann Surg* 245, 408-414.
- Turner, F. E., Broad, S., Khanim, F. L., Jeanes, A., Talma, S., Hughes, S., Tselepis, C., and Hotchin, N. A. (2006). Slug regulates integrin expression and cell proliferation in human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 281, 21321-21331.

U

- Ulrich, F., and Heisenberg, C. P. (2009). Trafficking and cell migration. *Traffic* 10, 811-818.

V

- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., and Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213, 1394-1397.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., *et al.* (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-250.
- van der Laan, S., Lachize, S. B., Vreugdenhil, E., de Kloet, E. R., and Meijer, O. C. (2008). Nuclear receptor coregulators differentially modulate induction and glucocorticoid receptor-mediated repression of the corticotropin-releasing hormone gene. *Endocrinology* 149, 725-732.

Bibliographie

- Van der Sluis, M., De Koning, B. A., De Bruijn, A. C., Velcich, A., Meijerink, J. P., Van Goudoever, J. B., Buller, H. A., Dekker, J., Van Seuning, I., Renes, I. B., and Einerhand, A. W. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* *131*, 117-129.
- Van Der Zanden, E. P., Boeckxstaens, G. E., and de Jonge, W. J. (2009). The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* *21*, 6-17.
- van Dop, W. A., Uhmann, A., Wijgerde, M., Sleddens-Linkels, E., Heijmans, J., Offerhaus, G. J., van den Bergh Weerman, M. A., Boeckxstaens, G. E., Hommes, D. W., Hardwick, J. C., *et al.* (2009). Depletion of the colonic epithelial precursor cell compartment upon conditional activation of the hedgehog pathway. *Gastroenterology* *136*, 2195-2203 e2191-2197.
- van Es, J. H., Jay, P., Gregorieff, A., van Gijn, M. E., Jonkheer, S., Hatzis, P., Thiele, A., van den Born, M., Begthel, H., Brabletz, T., *et al.* (2005a). Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol* *7*, 381-386.
- van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F., and Clevers, H. (2005b). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* *435*, 959-963.
- van Hengel, J., and van Roy, F. (2007). Diverse functions of p120ctn in tumors. *Biochim Biophys Acta* *1773*, 78-88.
- van Hengel, J., Vanhoenacker, P., Staes, K., and van Roy, F. (1999). Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 7980-7985.
- Van Kolen, K., Dautzenberg, F. M., Verstraeten, K., Royaux, I., De Hoogt, R., Gutknecht, E., and Peeters, P. J. (2010). Corticotropin releasing factor-induced ERK phosphorylation in AtT20 cells occurs via a cAMP-dependent mechanism requiring EPAC2. *Neuropharmacology* *58*, 135-144.
- Van Limbergen, J., Wilson, D. C., and Satsangi, J. (2009). The genetics of Crohn's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* *10*, 89-116.
- van Roy, F., and Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* *65*, 3756-3788.
- van Roy, F. M., and McCrea, P. D. (2005). A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer? *Nat Rev Cancer* *5*, 956-964.
- van Tol, E. A., Petrusz, P., Lund, P. K., Yamauchi, M., and Sartor, R. B. (1996). Local production of corticotropin releasing hormone is increased in experimental intestinal inflammation in rats. *Gut* *39*, 385-392.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M., and Fuchs, E. (2000). Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* *100*, 209-219.
- Vassilieva, E. V., Ivanov, A. I., and Nusrat, A. (2009). Flotillin-1 stabilizes caveolin-1 in intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* *379*, 460-465.
- Vaughan, J., Donaldson, C., Bittencourt, J., Perrin, M. H., Lewis, K., Sutton, S., Chan, R., Turnbull, A. V., Lovejoy, D., and Rivier, C. (1995). Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* *378*, 287-292.
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K., and Augenlicht, L. (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* *295*, 1726-1729.
- von Lampe, B., Barthel, B., Coupland, S. E., Riecken, E. O., and Rosewicz, S. (2000). Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* *47*, 63-73.

Bibliographie

- von Mentzer, B., Murata, Y., Ahlstedt, I., Lindstrom, E., and Martinez, V. (2007). Functional CRF receptors in BON cells stimulate serotonin release. *Biochem Pharmacol* 73, 805-813.
- von Wichert, G., Krndija, D., Schmid, H., Haerter, G., Adler, G., Seufferlein, T., and Sheetz, M. P. (2008). Focal adhesion kinase mediates defects in the force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton linkages in metastatic colon cancer cell lines. *Eur J Cell Biol* 87, 1-16.

W

- Wagenaar-Miller, R. A., Gorden, L., and Matrisian, L. M. (2004). Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: is it worth talking about? *Cancer Metastasis Rev* 23, 119-135.
- Wakabayashi, I., Ihara, T., Hattori, M., Tonegawa, Y., Shibasaki, T., and Hashimoto, K. (1985). Presence of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in human tumors. *Cancer* 55, 995-1000.
- Walker, E. A., Gelfand, A. N., Gelfand, M. D., and Katon, W. J. (1995). Psychiatric diagnoses, sexual and physical victimization, and disability in patients with irritable bowel syndrome or inflammatory bowel disease. *Psychol Med* 25, 1259-1267.
- Wallon, C., Persborn, M., Jonsson, M., Wang, A., Phan, V., Lampinen, M., Vicario, M., Santos, J., Sherman, P. M., Carlson, M., *et al.* (2011). Eosinophils Express Muscarinic Receptors and Corticotropin-Releasing Factor to Disrupt the Mucosal Barrier in Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*.
- Wallon, C., Yang, P. C., Keita, A. V., Ericson, A. C., McKay, D. M., Sherman, P. M., Perdue, M. H., and Soderholm, J. D. (2008). Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro. *Gut* 57, 50-58.
- Walter, E., Janich, S., Roessler, B. J., Hilfinger, J. M., and Amidon, G. L. (1996). HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: in vitro-in vivo correlation with permeability data from rats and humans. *J Pharm Sci* 85, 1070-1076.
- Walter, J., and Ley, R. E. (2010). The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes. *Annu Rev Microbiol*.
- Walters, M., and Sperandio, V. (2006). Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol* 296, 125-131.
- Waltzer, L., and Bienz, M. (1999). The control of beta-catenin and TCF during embryonic development and cancer. *Cancer metastasis reviews* 18, 231-246.
- Wang, F., Graham, W. V., Wang, Y., Witkowski, E. D., Schwarz, B. T., and Turner, J. R. (2005). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol* 166, 409-419.
- Wang, J., Jin, L., Chen, J., and Li, S. (2010). Activation of corticotropin-releasing factor receptor 2 inhibits the growth of human small cell lung carcinoma cells. *Cancer Invest* 28, 146-155.
- Wang, J., and Li, S. (2007). Corticotropin-releasing factor family and its receptors: tumor therapeutic targets? *Biochem Biophys Res Commun* 362, 785-788.
- Wang, J., Xu, Y., Zhu, H., Zhang, R., Zhang, G., and Li, S. (2008). Urocortin's inhibition of tumor growth and angiogenesis in hepatocellular carcinoma via corticotrophin-releasing factor receptor 2. *Cancer Invest* 26, 359-368.
- Wang, Q., Wang, X., Hernandez, A., Kim, S., and Evers, B. M. (2001). Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to HT29 and Caco-2 intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* 120, 1381-1392.
- Webster, E. L., Barrientos, R. M., Contoreggi, C., Isaac, M. G., Ligier, S., Gabry, K. E., Chrousos, G. P., McCarthy, E. F., Rice, K. C., Gold, P. W., and Sternberg, E. M. (2002).

Bibliographie

- Corticotropin releasing hormone (CRH) antagonist attenuates adjuvant induced arthritis: role of CRH in peripheral inflammation. *J Rheumatol* 29, 1252-1261.
- Webster Marketon, J. I., and Glaser, R. (2008). Stress hormones and immune function. *Cell Immunol* 252, 16-26.
- Wehkamp, J., and Stange, E. F. (2006). A new look at Crohn's disease: breakdown of the mucosal antibacterial defense. *Ann N Y Acad Sci* 1072, 321-331.
- Wiche, G., Gromov, D., Donovan, A., Castanon, M. J., and Fuchs, E. (1993). Expression of plectin mutant cDNA in cultured cells indicates a role of COOH-terminal domain in intermediate filament association. *J Cell Biol* 121, 607-619.
- Wildenberg, G. A., Dohn, M. R., Carnahan, R. H., Davis, M. A., Lobdell, N. A., Settleman, J., and Reynolds, A. B. (2006). p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell* 127, 1027-1039.
- Wilson, A. J., and Gibson, P. R. (1997). Epithelial migration in the colon: filling in the gaps. *Clin Sci (Lond)* 93, 97-108.
- Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., and Neurath, M. F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2, 541-546.
- Wlk, M., Wang, C. C., Venihaki, M., Liu, J., Zhao, D., Anton, P. M., Mykoniatis, A., Pan, A., Zacks, J., Karalis, K., and Pothoulakis, C. (2002). Corticotropin-releasing hormone antagonists possess anti-inflammatory effects in the mouse ileum. *Gastroenterology* 123, 505-515.
- Wong, S. Y., Chiam, K. H., Lim, C. T., and Matsudaira, P. (2010). Computational model of cell positioning: directed and collective migration in the intestinal crypt epithelium. *J R Soc Interface* 7 Suppl 3, S351-363.
- Wu, S. V., Yuan, P. Q., Lai, J., Wong, K., Chen, M. C., Ohning, G. V., and Tache, Y. (2011). Activation of Type 1 CRH receptor isoforms induces serotonin release from human carcinoid BON-1N cells: an enterochromaffin cell model. *Endocrinology* 152, 126-137.

X

- Xu, J., Rodriguez, D., Petitclerc, E., Kim, J. J., Hangai, M., Moon, Y. S., Davis, G. E., and Brooks, P. C. (2001). Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Cell Biol* 154, 1069-1079.
- Xu, Y., Hu, B., Choi, A. J., Gopalan, B., Lee, B. H., Kalady, M. F., Church, J. M., and Ting, A. H. (2011). Unique DNA methylome profiles in CpG island methylator phenotype colon cancers. *Genome Res*.
- Xue, J., Askwith, C., Javed, N. H., and Cooke, H. J. (2007). Autonomic nervous system and secretion across the intestinal mucosal surface. *Auton Neurosci* 133, 55-63.
- Xue, N., Liang, H., Yao, H., Song, X. M., and Li, J. G. (2011). The role of spleen in vagus nerve stimulation for treatment against septic shock in rats. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 23, 263-266.

Y

- Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2005). Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci* 96, 379-386.
- Yanagisawa, M., Kaverina, I. N., Wang, A., Fujita, Y., Reynolds, A. B., and Anastasiadis, P. Z. (2004). A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function. *J Biol Chem* 279, 9512-9521.
- Yang, S., and Follett, K. A. (1998). The effect of morphine on responses of ventrolateral orbital cortex (VLO) neurons to colorectal distension in the rat. *Brain Res* 808, 101-105.

Bibliographie

- Yang, Y., Park, H., Kim, T. S., Bang, S. I., and Cho, D. (2007). Enhancement of cell migration by corticotropin-releasing hormone through ERK1/2 pathway in murine melanoma cell line, B16F10. *Exp Dermatol* 16, 22-27.
- Yazdanyar, S., and Nordestgaard, B. G. (2010). NOD2/CARD15 genotype and common gastrointestinal diseases in 43,600 individuals. *J Intern Med* 267, 228-236.
- Yoon, H. G., Chan, D. W., Reynolds, A. B., Qin, J., and Wong, J. (2003). N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol Cell* 12, 723-734.
- Yu, H. G., Yu, L. L., Yang, Y., Luo, H. S., Yu, J. P., Meier, J. J., Schrader, H., Bastian, A., Schmidt, W. E., and Schmitz, F. (2003). Increased expression of RelA/nuclear factor-kappa B protein correlates with colorectal tumorigenesis. *Oncology* 65, 37-45.
- Yuan, P. Q., Million, M., Wu, S. V., Rivier, J., and Tache, Y. (2007). Peripheral corticotropin releasing factor (CRF) and a novel CRF1 receptor agonist, stressin1-A activate CRF1 receptor expressing cholinergic and nitrergic myenteric neurons selectively in the colon of conscious rats. *Neurogastroenterol Motil* 19, 923-936.
- Yuan, P. Q., Wu, S. V., Wang, L., and Tache, Y. (2010a). Corticotropin releasing factor in the rat colon: expression, localization and upregulation by endotoxin. *Peptides* 31, 322-331.
- Yuan, Z., McCauley, R., Chen-Scarabelli, C., Abounit, K., Stephanou, A., Barry, S. P., Knight, R., Saravolatz, S. F., Saravolatz, L. D., Ulgen, B. O., *et al.* (2010b). Activation of Src protein tyrosine kinase plays an essential role in urocortin-mediated cardioprotection. *Mol Cell Endocrinol* 325, 1-7.

Z

- Zamarron, B. F., and Chen, W. (2011). Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci* 7, 651-658.
- Zapatka, M., Zboralski, D., Radacz, Y., Bockmann, M., Arnold, C., Schoneck, A., Hoppe, S., Tannapfel, A., Schmiegel, W., Simon-Assmann, P., and Schwarte-Waldhoff, I. (2007). Basement membrane component laminin-5 is a target of the tumor suppressor Smad4. *Oncogene* 26, 1417-1427.
- Zboralski, D., Warscheid, B., Klein-Scory, S., Malas, M. B., Becker, H., Bockmann, M., Meyer, H. E., Schmiegel, W., Simon-Assmann, P., and Schwarte-Waldhoff, I. (2010). Uncoupled responses of Smad4-deficient cancer cells to TNFalpha result in secretion of monomeric laminin-gamma2. *Mol Cancer* 9, 65.
- Zecchini, V., Domaschitz, R., Winton, D., and Jones, P. (2005). Notch signaling regulates the differentiation of post-mitotic intestinal epithelial cells. *Genes Dev* 19, 1686-1691.
- Zen, K., Babbitt, B. A., Liu, Y., Whelan, J. B., Nusrat, A., and Parkos, C. A. (2004). JAM-C is a component of desmosomes and a ligand for CD11b/CD18-mediated neutrophil transepithelial migration. *Mol Biol Cell* 15, 3926-3937.
- Zhang, J., Betson, M., Erasmus, J., Zeikos, K., Bailly, M., Cramer, L. P., and Braga, V. M. (2005). Actin at cell-cell junctions is composed of two dynamic and functional populations. *J Cell Sci* 118, 5549-5562.
- Zhang, P. X., Wang, Y., Liu, Y., Jiang, G. Y., Li, Q. C., and Wang, E. H. (2011). p120-catenin isoform 3 regulates subcellular localization of Kaiso and promotes invasion in lung cancer cells via a phosphorylation-dependent mechanism. *Int J Oncol* 38, 1625-1635.
- Zhang, Y., Sivasankar, S., Nelson, W. J., and Chu, S. (2009). Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 109-114.
- Zhao, J., and Karalis, K. P. (2002). Regulation of nuclear factor-kappaB by corticotropin-releasing hormone in mouse thymocytes. *Mol Endocrinol* 16, 2561-2570.

Bibliographie

- Zhao, L., Donaldson, C. J., Smith, G. W., and Vale, W. W. (1998). The structures of the mouse and human urocortin genes (Ucn and UCN). *Genomics* 50, 23-33.
- Zheng, J., Meng, J., Zhao, S., Singh, R., and Song, W. (2008). Campylobacter-induced interleukin-8 secretion in polarized human intestinal epithelial cells requires Campylobacter-secreted cytolethal distending toxin- and Toll-like receptor-mediated activation of NF-kappaB. *Infect Immun* 76, 4498-4508.
- Zheng, P. Y., Feng, B. S., Oluwole, C., Struiksmas, S., Chen, X., Li, P., Tang, S. G., and Yang, P. C. (2009). Psychological stress induces eosinophils to produce corticotrophin releasing hormone in the intestine. *Gut* 58, 1473-1479.
- Zmijewski, M. A., and Slominski, A. T. (2010). Emerging role of alternative splicing of CRF1 receptor in CRF signaling. *Acta Biochim Pol* 57, 1-13.
- Zorrilla, E. P., Tache, Y., and Koob, G. F. (2003). Nibbling at CRF receptor control of feeding and gastrocolonic motility. *Trends Pharmacol Sci* 24, 421-427.
- Zucker, S., and Vacirca, J. (2004). Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23, 101-117.
- Zuckerman, S. H., Evans, G. F., and Guthrie, L. (1991). Transcriptional and post-transcriptional mechanisms involved in the differential expression of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA. *Immunology* 73, 460-465.
- Zweibaum, A., Pinto, M., Chevalier, G., Dussaulx, E., Triadou, N., Lacroix, B., Haffen, K., Brun, J. L., and Rousset, M. (1985). Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *J Cell Physiol* 122, 21-29.

Annexes

Etude du rôle de la p120ctn dans le cycle cellulaire et la duplication des centrosomes.

Cancer Research

Cyclin-Dependent Kinase 2/Cyclin E Complex Is Involved in p120 Catenin (p120ctn) –Dependent Cell Growth Control: A New Role for p120ctn in Cancer

Nicolas T. Chartier, Christiane I. Oddou, Michèle G. Lainé, et al.

Cancer Res 2007;67:9781-9790. Published online October 17, 2007.

Updated Version

Access the most recent version of this article at:
doi:[10.1158/0008-5472.CAN-07-0233](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0233)

Supplementary Material

Access the most recent supplemental material at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2007/10/18/67.20.9781.DC1.html>

Cited Articles

This article cites 50 articles, 22 of which you can access for free at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/20/9781.full.html#ref-list-1>

Citing Articles

This article has been cited by 2 HighWire-hosted articles. Access the articles at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/20/9781.full.html#related-urls>

E-mail alerts

[Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions

To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions

To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org.

Cyclin-Dependent Kinase 2/Cyclin E Complex Is Involved in p120 Catenin (p120ctn)–Dependent Cell Growth Control: A New Role for p120ctn in Cancer

Nicolas T. Chartier, Christiane I. Oddou, Michèle G. Lainé, Benjamin Ducarouge, Christiane A. Marie, Marc R. Block, and Muriel R. Jacquier-Sarlin

INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Equipe DySAD Site Santé, Grenoble; Université Joseph Fourier, Grenoble; CNRS, Grenoble, France

Abstract

Depending on its cellular localization, p120 catenin (p120ctn) can participate in various processes, such as cadherin-dependent cell-cell adhesion, actin cytoskeleton remodeling, and intracellular trafficking. Recent studies also indicate that p120ctn could regulate cell proliferation and contact inhibition. This report describes a new function of p120ctn in the regulation of cell cycle progression. Overexpression of the p120ctn isoform 3A in human colon adenocarcinoma cells (HT-29) results in cytoplasmic accumulation of the protein, as observed in many tumors. This cytoplasmic increase is correlated with a reduction in proliferation and inhibition of DNA synthesis. Under these conditions, experiments on synchronized cells revealed a prolonged S phase associated with cyclin E stabilization. Both confocal microscopy and biochemical analysis showed that cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 colocalized with p120ctn in centrosomes during mitosis. These proteins are associated in a functional complex evidenced by coimmunoprecipitation experiments and the emergence of Thr¹⁹⁹-phosphorylated nucleophosmin/B23. Such post-translational modification of this centrosomal target has been shown to trigger the initiation of centrosome duplication. Therefore, p120ctn-mediated accumulation of cyclin E in centrosomes may participate in abnormal amplification of centrosomes and the inhibition of DNA replication, thus leading to aberrant mitosis and polyploidy. Because these modifications are often observed in cancer, p120ctn may represent a new therapeutic target for future therapy. [Cancer Res 2007;67(20):9781–90]

Introduction

E-cadherin is the main epithelial cell-cell adhesion molecule. Its loss of function or expression is observed during tumor progression and contributes to tumor cell invasion and metastasis (1, 2). The molecular basis for this epithelial phenotypic “gatekeeper” function of E-cadherin remains unclear. The intracellular domain of E-cadherin interacts directly with β -catenin and p120 catenin (p120ctn) via distinct conserved binding domains. These inter-

actions are necessary to dynamically regulate cell-cell adhesion via the modulation of events, such as cadherin clustering and connection with the actin cytoskeleton, or by the control of cadherin endocytosis and metabolic stability (reviewed in ref. 3). Loss of E-cadherin may induce signaling by catenins released from the cell membrane. Indeed, β -catenin released from the membrane is either rapidly degraded in the cytoplasm or acts as an oncogenic transcription cofactor under the activation of the Wnt signaling pathway (4). In contrast, the level of p120ctn is not altered in cadherin-deficient cells but the protein mislocalizes to the cytoplasm and/or the nucleus (5, 6). Abnormal localization of p120ctn in breast or colon carcinomas is prognostic for aggressive diseases (7, 8). In the cytoplasm, p120ctn has key roles in modulating Rho-GTPases and thereby cytoskeletal and cell cycle functions (9). In the nucleus, p120ctn can interact with the transcription factor Kaiso and relieves its gene repression activity (10, 11). Mechanisms underlying the trafficking of p120ctn to and from these various locations have not been elucidated. However, the recently described binding of p120ctn to kinesin and microtubules would affect both the targeting and the activity of p120ctn (12–14). Consistent with its interphasic microtubule localization, endogenous p120ctn was also found localized to the centrosomes and the mitotic spindle during mitosis in MDA-MB-231 breast adenocarcinoma cells (13). This peculiar localization suggests an implication of this catenin in cell cycle regulation.

The interaction of transiently expressed cyclins with cyclin-dependent kinases (cdk) permits cell cycle progression. It has been shown that cyclin E is involved in both S-phase entry and centrosome duplication. Cyclin E interacts with cdk2 and the resulting complex phosphorylates several targets including nucleophosmin, the phosphorylated form of which is required for centrosome duplication (15). Cyclin E overexpression in human cancer cells increases the frequency of centrosome hyperamplification. This thereby favors chromosome instability (CIN) and hence emphasizes the importance of understanding the regulatory mechanism that governs faithful centrosome duplication in cells (16).

In the present study, we used the HT-29 human colon carcinoma cell line to examine the expression and function of p120ctn when the balance between E-cadherin and p120ctn was modified. We show that mislocalized p120ctn can interact with the cdk2/cyclin E complex within the centrosome leading to the stabilization of cyclin E levels. This effect correlated with the inhibition of DNA replication, a delayed S phase, hyperamplification of centrosomes, and, finally, polyploidy. Altogether, our observations reveal a new functional interaction and mechanism by which p120ctn may participate in tumor initiation and/or progression of colorectal carcinoma.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Requests for reprints: Muriel R. Jacquier-Sarlin, Equipe de la Dynamique des Systèmes d'Adhérence et de la Différenciation, Centre de Recherche Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Université Joseph Fourier U823, Institut Albert Bonniot, Site Santé BP 170, 38042 Grenoble, France. Phone: 33-476-54-95-52; Fax: 33-476-54-94-25; E-mail: jacquier-sarlin@ujf-grenoble.fr.

©2007 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0233

Materials and Methods

Cell culture. The human colon adenocarcinoma HT-29 cell line was cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in DMEM containing 25 mmol/L glucose (Invitrogen/Life Technologies) and supplemented with 10% FCS, penicillin, and streptomycin.

Antibodies and reagents. Monoclonal antibody (mAb) against p120ctn (clone 98) and green fluorescent protein (GFP) were purchased from BD Biosciences/Transduction Laboratories. Anti-actin polyclonal antibodies, anti-bromodeoxyuridine (BrdUrd; clone BU-33), β -tubulin (clone 2.1), and γ -tubulin (clone GTU-88) mAbs were obtained from Sigma-Aldrich. Anti-human E-cadherin (clone HECD1) mAb was obtained from Takara Biochemicals (Cambrex Bioscience). Polyclonal antibody directed against Aurora A kinase was purchased from Calbiochem (VWR International), and monoclonal anti-human cyclin E (clone HE12) was from Upstate Biotechnology (Chemicon International). Polyclonal anti-cdk2 antibody was purchased from BD Biosciences/PharMingen and polyclonal antibody recognizing nucleophosmin phosphorylated on Thr¹⁹⁹ was from Cell Signaling (Ozyme). Alexa-conjugated goat anti-mouse secondary antibody was obtained from Molecular Probes. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse (1:3,000) was from Bio-Rad, and donkey anti-rabbit (1:20,000) and control IgG2A antibodies were from Jackson Immuno-Research (Immunotech). Mouse and rabbit TrueBlot antibodies used as secondary antibodies (1:1,000) in immunoprecipitation experiments were from eBioscience (Cliniscience). Nocodazole and aphidicolin were purchased from Sigma-Aldrich. MG132 was from Calbiochem.

Western blot analysis. Cells were lysed and extracts were processed as described previously (17). Primary antibodies dilutions were 1:1,000 for p120ctn, GFP, cdk2, E-cadherin, cyclin E, and nucleophosmin and 1:250 for Aurora A and actin.

Plasmids and cell transfections. The p120-3A cDNA (gift of Prof. Albert B. Reynolds, Vanderbilt University, Nashville, TN) was extracted from PRC/RSV p120-3A plasmid by *EcoRI* and *KpnI* digestions and subcloned in pEGFP-C3 plasmid (BD Biosciences). GFP-p120-3A cDNA and control GFP cDNA were amplified by PCR from pEGFP-C3 constructs and cloned into pEF6/V5/His-TOPO plasmid (Invitrogen). HT-29 cells were transfected with 1 μ g of plasmid DNA using LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and seeded at one cell per well in a 96-well plates before selection with 5 μ g/mL blasticidin. In this study, the HT-29 GFP-p120ctn cells represent the average of two independent clones.

Immunofluorescence microscopy. Cells grown on glass coverslips were treated as described previously (17). Antibody dilutions were 1:200 for anti- β -tubulin, 1:500 for anti- γ -tubulin, and 1:100 for anti-cyclin E, anti-cdk2, and anti-nucleophosmin, and 1:1,000 for secondary antibodies (see Supplementary Materials and Methods).

Immunoprecipitations. Cells were lysed in 10 mmol/L PIPES (pH 6.8), 100 mmol/L NaCl, 300 mmol/L sucrose, 3 mmol/L MgCl₂, 0.5% NP40, and protease inhibitor cocktail for 10 min on ice. Extracts were immunoprecipitated using anti-cdk2 antibody and processed as described previously (ref. 17; see Supplementary Material and Methods).

Cell numeration. Cells were seeded in 24-wells plates at 2×10^4 cells per well, trypsinized after the indicated times, and mixed with trypan blue solution (1:1; Sigma-Aldrich) to count living cells. All experiments were reproduced at least thrice.

Caspase activity test. Cells (1.6×10^3) were seeded in each well of a 96-well plate and cell death was analyzed after the indicated times using Apo-One homogeneous Caspase-3/7 assay (Promega) according to the manufacturer's instructions. Fluorescence emission was quantified using a Fluoroskan Ascent (Thermo Fischer Scientific). All experiments were done in triplicates.

BrdUrd incorporation and staining. Cells were exposed to BrdUrd (5 μ mol/L) for 15 min at 37°C before trypsinization. After centrifugation, the cell pellet was resuspended in 100 μ L glucose-1 g/L in PBS, brought to 10⁶/mL with 70% ethanol, and fixed for 30 min at 4°C. After centrifugation (1,000 \times g, 10 min), cells were resuspended in 1 mL PBS-glucose and allowed to rehydrate 4 h at 4°C and HCl 4N (1:1) was added for 15 min at room temperature. After centrifugation (1,000 \times g, 10 min), cells were

washed successively in 2 mL PBS containing 0.1 mol/L sodium tetraborate, 0.5% Tween 20, and 0.5% bovine serum albumin (BSA), and in 2 mL PBS-BSA-Tween (PBT). The pellet was incubated with anti-BrdUrd antibody (1:10) for 30 min at room temperature and then with Alexa Fluor 546-coupled antibody (1:500) for 30 min at room temperature. After washes with PBT, cells were analyzed by flow cytometry (Facstar, BD Biosciences).

Cell cycle analysis. Cells (2×10^6) were fixed in 1 mL of cold absolute ethanol for 30 min at room temperature and left overnight in ethanol at 4°C. After centrifugation, pellet was resuspended for 20 min at 37°C in 1 mL propidium iodide staining solution (50 μ g/mL propidium iodide, 0.1% NP40, and 0.1 mg/mL RNase A in PBS) and stored at 4°C. Cells were then centrifuged (260 \times g, 5 min) and resuspended in PBS before flow cytometry analysis (Facstar, BD Biosciences).

Centrosome preparation. Cell centrosomal fractions were purified from 10⁸ cells pretreated 16 h with 50 ng/mL nocodazole using a sucrose gradient according to the original protocol developed by Bornens and Moudjou (18). Fractions (500 μ L) were collected from the bottom and numbered from 1 to 13; the remaining solution was collected as fraction 14.

Statistical analyses. All experiments were done at least thrice and Student's *t* test was used for statistical analysis. Values are expressed as mean \pm SE and were considered statistically significant with *P* < 0.05.

Results

Cytoplasmic localization of p120ctn after overexpression in HT-29 cells. Although having no significant effect on p120ctn levels, cadherin deficiency does release p120ctn into the cytoplasm and/or the nucleus where it is thought to promote cell migration, invasion, and metastasis (19). To investigate the cellular roles aside for cell adhesion of p120ctn, we modified the E-cadherin/p120ctn balance by overexpressing p120ctn in a HT-29 human colon adenocarcinoma cell line.

HT-29 cells were stably transfected with the isoform 3A of p120ctn fused to GFP. We next determined the expression level of the construct by Western blotting (Fig. 1A). In addition to the endogenous p120ctn (band \sim 120 kDa), the anti-p120ctn antibody revealed an additional band of \sim 140 kDa in the GFP-p120ctn-transfected HT-29 cells, corresponding to the expected size of the fusion protein (Fig. 1A, top). Although transfection only resulted in a weak increase in the expression of p120ctn, GFP detection indicated that the GFP-p120ctn construction was not degraded (Fig. 1A, bottom). Previous studies have described that p120ctn overexpression can stabilize cadherins at the plasma membrane, thereby increasing their expression (5). Surprisingly, E-cadherin expression levels showed no difference between control, GFP, and GFP-p120ctn HT-29 cells. These results were further confirmed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis (data not shown).

Analysis of GFP fluorescence by confocal microscopy indicated that whereas GFP protein was evenly distributed in the nucleus and cytoplasm in HT-29 GFP cells, GFP-p120ctn protein was preferentially localized at the plasma membrane with enhanced signals at cell-cell contacts and in the cytoplasm of HT-29 GFP-p120ctn cells (Fig. 1B). A low level of fluorescence was detected in the nucleus. We further confirmed the increased cytoplasmic distribution of both endogenous and exogenous p120ctn in HT-29 GFP-p120 cells by Western blotting after cell fractionation (Fig. 1C).

These results suggest that in HT-29 cells, a moderate overexpression of p120ctn is sufficient to induce cadherin saturation without altering their expression and favors an increase in the cytoplasmic pool of p120ctn.

Overexpression of p120ctn slows down the progression of HT-29 cells through the cell cycle. One cellular function that can

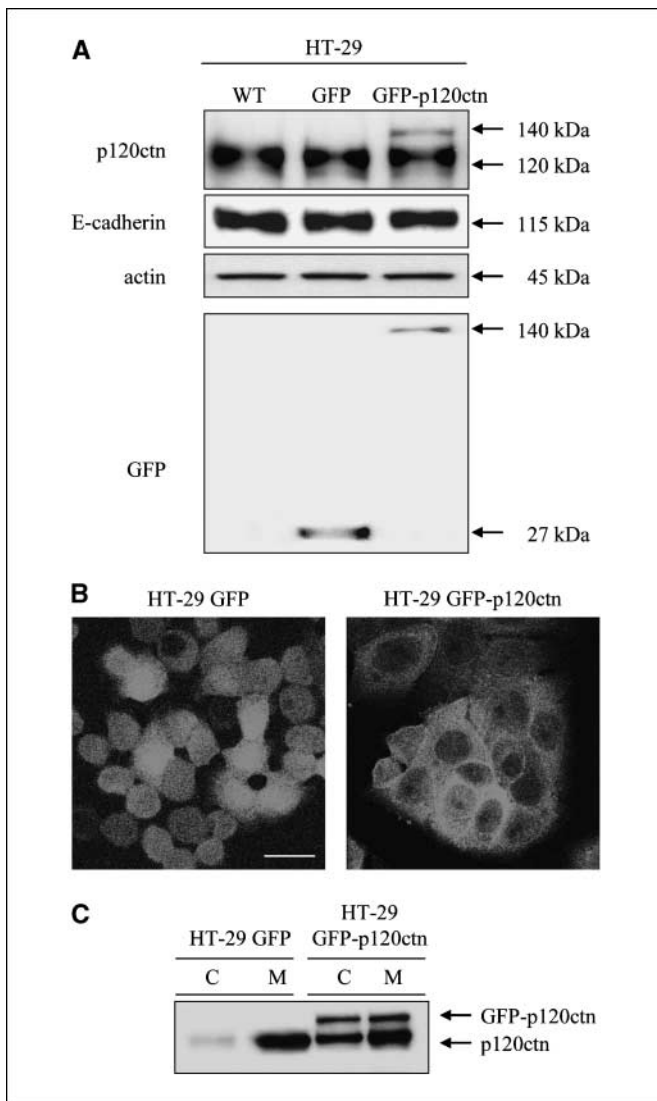


Figure 1. Overexpressed p120ctn accumulates in the cytoplasm. **A**, WT HT-29 cells (*WT*) were transfected with pEF6-GFP (*GFP*) or pEF6-GFP-p120ctn (*GFP-p120ctn*). Expression levels of p120ctn, GFP, and E-cadherin were analyzed by Western blotting of whole-cell lysates. Actin blotting was used as a loading control. **B**, GFP or GFP-p120ctn HT-29 cells cultured for 48 h on coverslips were fixed in 3% paraformaldehyde before confocal microscopy analysis. Bar, 50 μ m. **C**, total GFP or GFP-p120ctn cell lysates were separated into cytoplasmic (C) and membrane-associated (M) fractions and detection of endogenous and exogenous p120ctn was achieved by Western blotting.

be regulated by cell adhesion molecules is progression through the cell cycle (20). In the course of our experiments, we observed a growth delay in HT-29 GFP-p120ctn cells compared with HT-29 GFP cells. Whereas HT-29 GFP cells typically reached confluency 120 h after plating and formed a cell monolayer, GFP-p120ctn cells remained sparsely clustered without reaching full confluency (Fig. 2A). To quantify this growth delay, we seeded an equal number of HT-29 GFP or HT-29 GFP-p120ctn cells and established growth curves by counting live cells every 24 h (Fig. 2B). During the first 48 h of culture, the number of living cells increased slowly in HT-29 GFP cells, with no change in HT-29 GFP-p120ctn cells. After this lag period, the number of living cells increased in both populations although at a slower rate in HT-29 GFP-p120ctn cells. Indeed, at

96 h, we observed 43% less living HT-29 GFP-p120ctn cells compared with HT-29 GFP cells. These data suggest a delayed progression in the cell cycle. To investigate the effects of p120ctn overexpression on DNA replication, we did flow cytometry analysis of cells subjected to a short pulse of BrdUrd incorporation. Compared with control cells (HT-29 GFP), HT-29 GFP-p120ctn showed significantly decreased BrdUrd incorporation into their nuclei (>33% less), indicating a reduced rate of DNA replication, perhaps partly accounting for their delayed growth (Fig. 2C).

Impaired DNA replication slows down S-phase progression. We therefore investigated the effects of p120ctn overexpression on cell cycle progression (Fig. 2D). HT-29 GFP and GFP-p120ctn cells were synchronized at G₁-S transition by aphidicolin treatment and then released by replacing the medium with complete medium supplemented with fresh serum. Flow cytometry analysis showed that HT-29 GFP cells progressed correctly through the cell cycle: the DNA content was totally duplicated when cells reached G₂-M 8 to 10 h after the release (75% of cells were in G₂-M) and a complete cycle was observed after 24 h (Fig. 2D, left). In contrast, HT-29 GFP-p120ctn cells remained arrested in G₁-S up to 8 h after aphidicolin release (90% of cells in G₁-S; Fig. 2D, right). Subsequently, these cells progressed into S phase but only 16% reached G₂-M within 24 h.

Taken together, these data indicate that stable overexpression of p120ctn in HT-29 cells induces an overall reduction in cell growth via a negative regulation on cell cycle progression.

Cyclin E is up-regulated in p120ctn-overexpressing cells.

Cyclins and their catalytic subunits, the cdk, control cell cycle progression by regulating events that drive the transition between cell cycle phases. Among these, the cdk2/cyclin E complex is involved in G₁-S transition and DNA replication (21, 22). The delayed transition observed in HT-29 GFP-p120ctn cells prompted us to examine cyclin E levels and subcellular distributions throughout cell cycle progression (Fig. 3A and B). Western blotting analyses of cyclin E showed dynamic changes according to the cell cycle phases in HT-29 GFP cells: high cyclin E levels in G₁-S phase-synchronized cells (0 h) were followed by a sharp decrease after entry into the S and G₂-M phases (2–10 h; Fig. 3A, HT-29 GFP). Subsequently, the cyclin concentration increased again, reaching a new steady state following reentry into the G₁ phase. In contrast, we observed no such dynamism in HT-29 GFP-p120ctn cells, with a high level of cyclin E maintained in these cells during the first 18 h after aphidicolin release, consistent with the observed persisting G₁-S phase in these cells (Fig. 3A, HT-29 GFP-p120ctn). This plateau was followed by a slow decrease in the cyclin E content after S-phase entry (18–24 h). At the same time, the levels of cdk2 and p120ctn remained constant during the cell cycle (Fig. 3A). Confocal microscopy indicated that in asynchronous HT-29 GFP and HT-29 GFP-p120ctn cells, a low amount of cyclin E was localized into cytoplasmic patches and the nucleus (Fig. 3B). After synchronization by aphidicolin, both cell lines displayed a strong nuclear staining for cyclin E. Following entry into the S phase and during the G₂-M phase (6–16 h), the labeling of cyclin E became weaker and diffuse in the cytoplasm of HT-29 GFP cells (corresponding to proteolytic degradation of the protein as shown previously by Western blotting). Vesicular cytoplasmic staining of cyclin E reappeared at 24 h when cells entered into a new cell cycle (Fig. 3B, top). In HT-29 GFP-p120ctn cells, a weak nuclear staining was maintained up to 24 h (Fig. 3B, bottom), in agreement with a stabilization of the protein level (Fig. 3A) and the persistence of cells in the G₁-S phase (Fig. 2D).

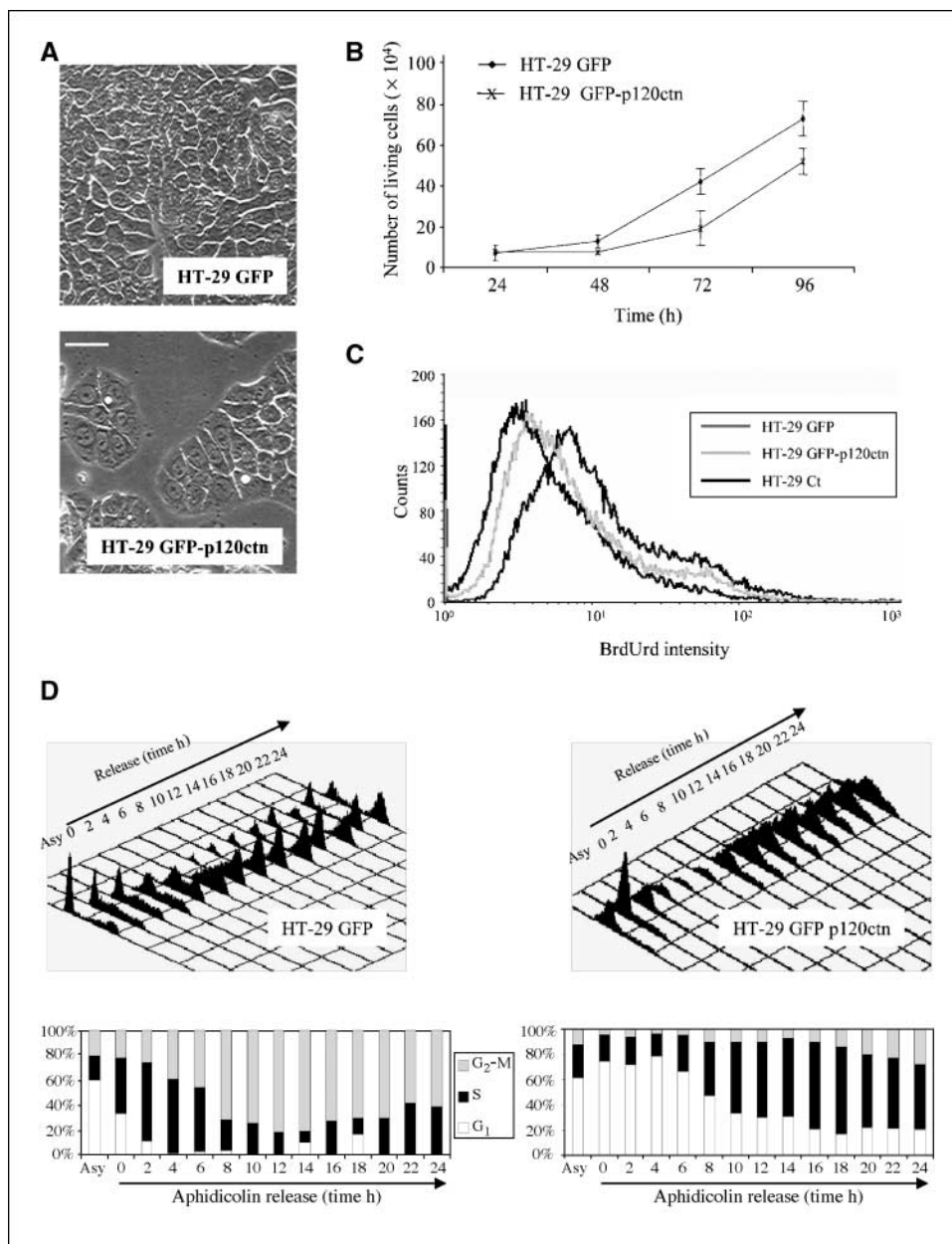


Figure 2. Overexpression of p120ctn slows down HT-29 cell proliferation. *A*, HT-29 GFP and HT-29 GFP-p120ctn cells were cultured for 120 h and observed under phase-contrast microscopy. *Bar*, 50 μ m. *B*, HT-29 GFP and HT-29 GFP-p120ctn cells were seeded at 2×10^4 cells per well, grown for the indicated times and living cells, then counted using trypan blue solution. *Points*, mean of three independent experiments; *bars*, SE. *C*, BrdUrd incorporation assay. BrdUrd (5 μ mol/L) was added for 15 min to the culture medium of 24-h precultured HT-29 GFP (dark gray line) or HT-29 GFP-p120ctn (gray line) cells. After fixation and BrdUrd immunostaining, positive cells were counted using a Becton Dickinson Facstar flow cytometer. Control cells non-treated with BrdUrd were used as negative control (black line). *D*, top, HT-29 GFP (left) or HT-29 GFP-p120ctn (right) cells were synchronized at G₁-S transition with aphidicolin (5 μ g/mL, 24 h) and released in fresh medium for the indicated time. DNA content was then analyzed by FACS after propidium iodide staining. *Bottom*, histograms indicate the percentage of cells in G₁, S, and G₂-M phases. *Asy*, asynchronous.

The level of cyclin E is strictly regulated throughout the cell cycle by transcriptional and proteolytic mechanisms. It is an unstable protein that is rapidly degraded by two different ubiquitin-dependent proteolysis pathways (23). Indeed, inhibition of the 26S proteasome with MG132 8 h after aphidicolin release resulted in the accumulation of cyclin E protein similar to that observed within HT-29 GFP-p120ctn cells. This suggests that the steady-state level of cyclin E in cells overexpressing p120ctn results from limited degradation of cyclin E (Fig. 3C). Post-translational regulation was confirmed by reverse transcription-PCR experiments indicating similar cyclin E/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA ratios in both cell types (data not shown).

Taken together, these observations strongly suggest that p120ctn overexpression results in impaired proteasome degradation and maintenance within the nucleus, which in turn causes cyclin E level persistence and S-phase lengthening.

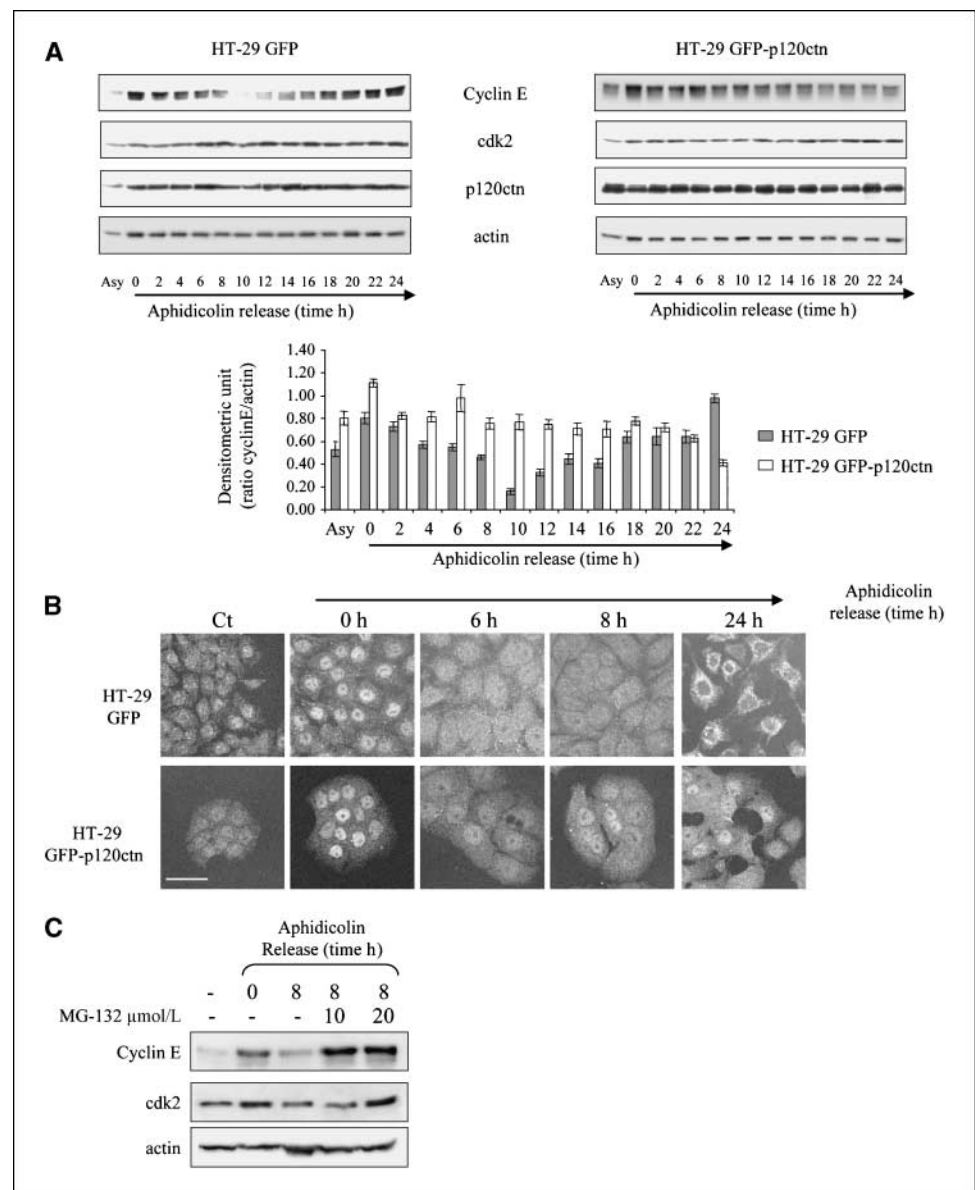
Cyclin E and p120ctn accumulate at centrosomes in HT-29 GFP-p120ctn cells. Recently, cyclin E-dependent kinases have been implicated in the control of centrosome duplication, a process associated with their recruitment to this organelle (24). Interestingly, an increase in the cytoplasmic pool of p120ctn, for instance in tumor cells, causes a localization of p120ctn at centrosomes (13, 14). This localization of p120ctn at centrosomes was suggested in our model by confocal microscopy on mitotic cells (Fig. 4A). Double immunofluorescence analysis of GFP-p120ctn and β -tubulin showed the colocalization of both molecules at the mitotic furrow and centrosomes. Centrosomes from HT-29 GFP and GFP-p120ctn cells were then isolated by centrifugation on sucrose gradient as described previously (18). Indeed, immunoblot analysis of this fractionated gradient revealed the presence of p120ctn in fractions reported previously as containing centrosomes that sedimented together with the centrosomal marker Aurora A (Fig. 4B).

We then compared the distribution of various endogenous proteins in centrosomal and membrane-enriched fractions prepared from HT-29 GFP and HT-29 GFP-p120ctn cells (Fig. 4C). We detected endogenous cyclin E, cdk2, and p120ctn in the centrosomal fractions isolated from HT-29 GFP cells. Moreover, p120ctn overexpression resulted in increased amounts of cyclin E and cdk2 in these fractions when compared with levels of Aurora A (Fig. 4C, right). Finally, we detected E-cadherin and actin only in the membrane-enriched fractions, indicating that little or no contamination occurred with membranous or cytoplasmic proteins in our centrosome preparation. Altogether, our data confirm that p120ctn localizes to centrosomes and suggest the implication of this catenin in cyclin E and cdk2 regulation at this peculiar location.

The cyclin E/cdk2 complex is associated with p120ctn in centrosomes. From our results, we hypothesized that the increased levels of cyclin E and cdk2 in the centrosome could arise from their association with p120ctn. A RXL motif is required

for stable binding of cyclin E/cdk2 complexes to substrates (25, 26). Sequence analysis of p120ctn revealed the presence of six putative RXL motifs in the protein structure. Confocal analysis showed that GFP-p120ctn colocalized with cyclin E and cdk2 in structures corresponding to centrosomes during mitosis (Fig. 5A). To further determine whether p120ctn binds cyclin E/cdk2 complexes during mitosis, we immunoprecipitated cdk2 from synchronized HT-29 GFP and GFP-p120ctn cells and assayed its association with cyclin E and p120ctn by immunoblotting (Fig. 5B). We observed the presence of cyclin E/cdk2/p120ctn complexes in both cell types. As expected, normalized to the amount of immunoprecipitated cdk2, the association of p120ctn and cyclin E with cdk2 was respectively 6.5- and 2.5-fold greater in HT-29 GFP-p120ctn cells than in control. One of the main targets of cdk2/cyclin E at centrosomes is nucleophosmin, a protein allowing centrosome duplication following phosphorylation on Thr¹⁹⁹. Staining of HT-29 GFP-p120ctn cells with an antibody recognizing phosphorylated nucleophosmin (Thr¹⁹⁹)

Figure 3. Cyclin E protein is stabilized by p120ctn overexpression. *A, top*, asynchronous HT-29 GFP or HT-29 GFP-p120ctn cells or cells synchronized at G₁-S transition with aphidicolin blockade and released in fresh medium for indicated times were lysed. Total lysates were analyzed for cyclin E, cdk2, p120ctn, and actin expression by Western blotting. *Bottom*, histograms represent the densitometric ratio of cyclin E to actin levels. *Columns*, mean of three independent experiments; *bars*, SE. *B*, in parallel, the cells were immunostained for cyclin E and analyzed by confocal microscopy. *Bar*, 50 μ m. *C*, G₂-M-enriched GFP cells were treated or not with the indicated concentrations of proteasome inhibitor MG132. Total cell lysates were then analyzed for cyclin E and cdk2 expression by Western blotting. Actin staining was used as a loading control.



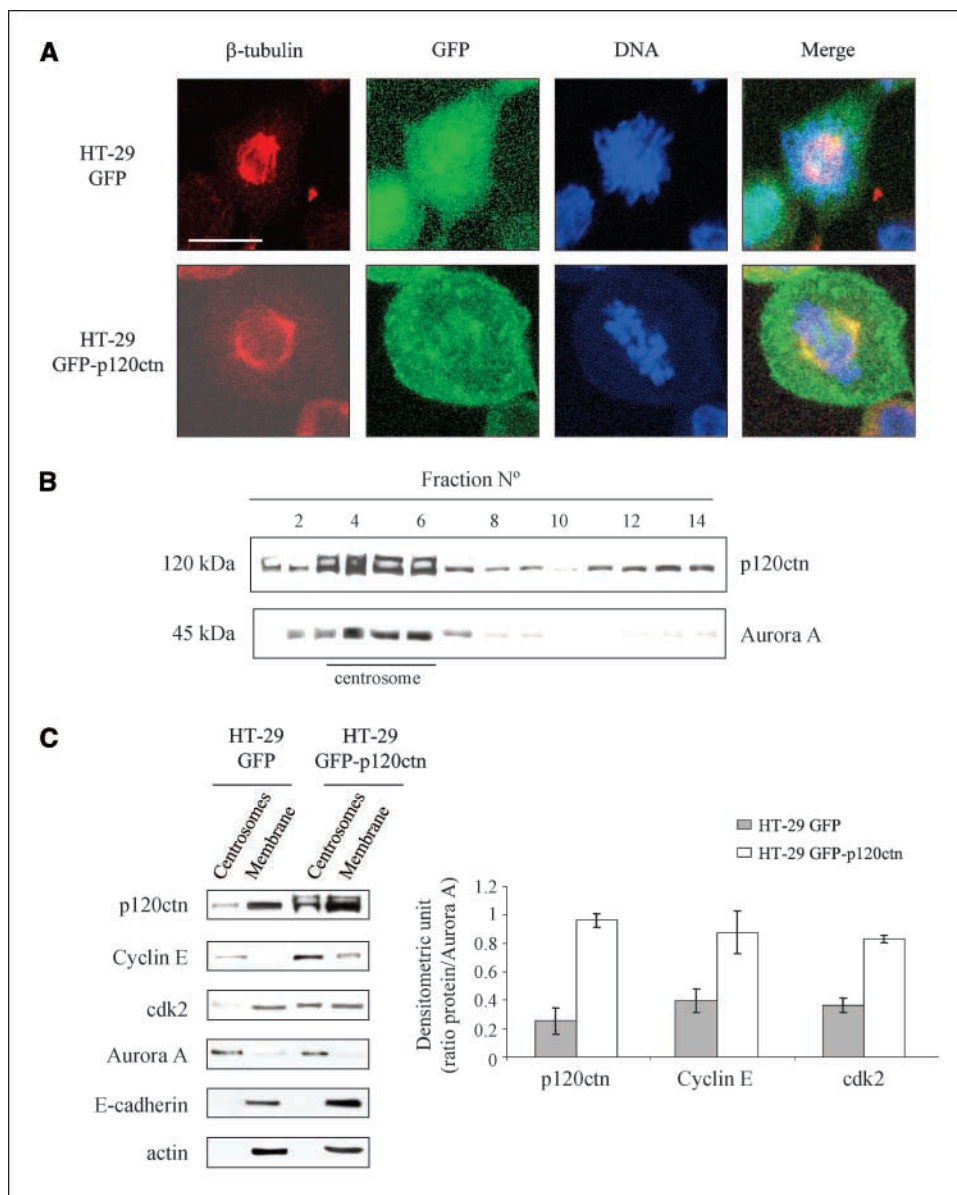


Figure 4. p120ctn localizes to the mitotic furrow and the centrosomes in mitotic HT-29 cells. **A**, HT-29 GFP (top) and HT-29 GFP-p120ctn (bottom) cells were grown for 48 h on coverslips, fixed with 3% paraformaldehyde, and immunostained for β -tubulin before observation under a confocal microscope DNA was stained blue with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Chosen fields are representative of mitotic cells in each condition. Bar, 10 μ m. **B**, centrosome fractions were enriched from mitotic HT-29 GFP-p120ctn cells using a discontinuous sucrose gradient (see Material and Methods). Antibodies against p120ctn and Aurora A were used for Western blotting analyses of each collected fraction. **C**, left, centrosome- and cell membrane-enriched fractions obtained from the previously described discontinuous sucrose gradient were analyzed by Western blotting using antibodies against p120ctn, cyclin E, cdk2, Aurora A, E-cadherin, and actin. Right, histograms represent the densitometric ratio of p120ctn, cyclin E, and cdk2 to Aurora A levels in centrosomal fractions. Columns, mean of three independent experiments; bars, SE.

indicated the presence of the phosphorylated protein in the cytoplasm and the centrosome of dividing cells (Fig. 5C). We then detected levels of phosphorylated nucleophosmin in centrosomal and total fractions of HT-29 GFP or GFP-p120ctn cells by Western blotting (Fig. 5D). We found more phosphorylated nucleophosmin in HT-29 GFP-p120ctn than in control cells, suggesting a functional association between the increased recruitment of the cdk2/cyclin E complex and its increased phosphorylation activity within the centrosomes.

p120ctn-mediated deregulation of cyclin E is associated with centrosome amplification and genomic instability. Because various reports have indicated a common association between up-regulated cyclin E and such centrosome defects and genetic instability (16), p120ctn stabilization of cyclin E might also alter centrosome duplication. To address this question, we immunomarked centrosomes with anti- γ -tubulin and compared centrosome profiles of HT-29 GFP versus HT-29 GFP-p120ctn cells under a confocal microscope. Whereas almost all dividing

HT-29 GFP cells contained two centrosomes, we reproducibly detected centrosome amplifications in HT-29 GFP-p120ctn cells (Fig. 6A). We found a low frequency of centrosome amplification in wild-type (WT) HT-29 cells (<2%), which showed a poorly significant increase in HT-29 GFP cells (<4%). Conversely, >12% of HT-29 GFP-p120ctn cells showed a pronounced amplification of centrosomes (Fig. 6B, left). Statistical analysis indicated that these cells displayed three to eight centrosomes with a peak of the histogram distribution at four centrosomes per cell (56%; Fig. 6B, right).

Observation by phase-contrast microscopy showed an increased number of multinucleated cells in HT-29 GFP-p120ctn (Fig. 6C), indicating that p120ctn-mediated cyclin E overexpression was translated into dysfunctioning mitosis and genetic instability. According to the time of culture, we noticed a decline in the percentage of these cells, in correlation with an increase in caspase-3 activity (Fig. 6D). These observations suggest the involvement of an apoptotic pathway in the elimination of these

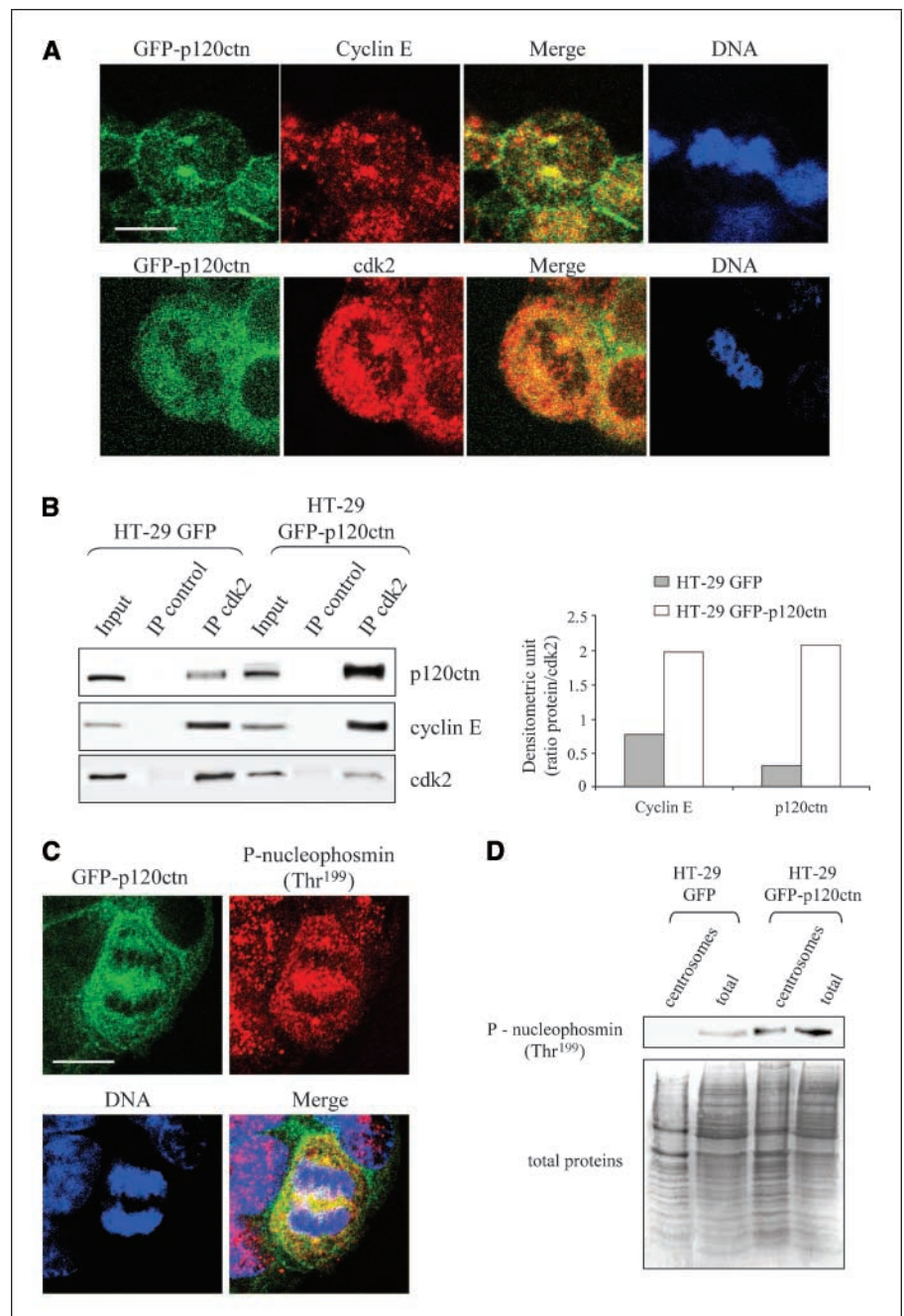
multinucleated cells *in vitro*. Therefore, p120ctn overexpression induces centrosome amplification and polynucleation, events both depending on impaired cyclin E proteolysis.

Discussion

E-cadherin expression is frequently down-regulated in many tumors, thus leading to the accumulation of cytoplasmic and/or nuclear catenins. Recently, Nong et al. described that overexpression of p120ctn in hepatoma cells can recruit β -catenin to the membrane and the cytoplasm while inhibiting cell proliferation by down-regulating survivin and cyclin D1 expression (27). Wildenberg et al. (28) showed that the lack of p120ctn in NIH3T3 allows

these cells to proliferate in the absence of serum and reveals the involvement of p120ctn in the regulation of cell contact inhibition. Moreover, the conditional knockdown of p120ctn in mouse epidermis leads to hyperplasia through nuclear factor- κ B activation (29). The generation of stable cell lines overexpressing p120ctn allowed us to modify the E-cadherin/p120ctn balance, thus leading to mislocalization of p120ctn and the unexpected revelation of its role in cell cycle progression. Stabilization of cyclin E leads to its overexpression and accumulation in centrosomes, together with p120ctn and cdk2, forming a functional ternary complex. These data are consistent with a previous report describing p120ctn targeting in centrosomes of breast tumor cells (13). However, the underlying mechanism remains unclear. Park et al. (26) showed that β -catenin

Figure 5. p120ctn interacts with the cdk2/cyclin E complex. HT-29 GFP-p120ctn cells were grown for 48 h on coverslips, fixed with 3% paraformaldehyde, and immunostained for cyclin E and cdk2 (A) or phosphorylated nucleophosmin (P-nucleophosmin; C) before confocal microscopic analysis. DNA was stained blue with DAPI. Bar, 10 μ m. B, left, HT-29 GFP or GFP-p120ctn cells were synchronized at G₁-S transition with aphidicolin and released in fresh medium for 6 h. cdk2 was immunoprecipitated (IP) from total cell lysates and levels of p120ctn, cyclin E, and cdk2 were detected by Western blotting. Right, histograms represent the densitometric ratio of cyclin E and p120ctn to immunoprecipitated cdk2 levels. This experiment was reproduced at least thrice. D, centrosome-enriched and total fractions from HT-29 GFP and GFP-p120ctn cells were analyzed by Western blotting using antibodies against nucleophosmin phosphorylated on Thr¹⁹⁹ (top). Coomassie blue staining of the transferred membrane was used as a loading control (bottom).



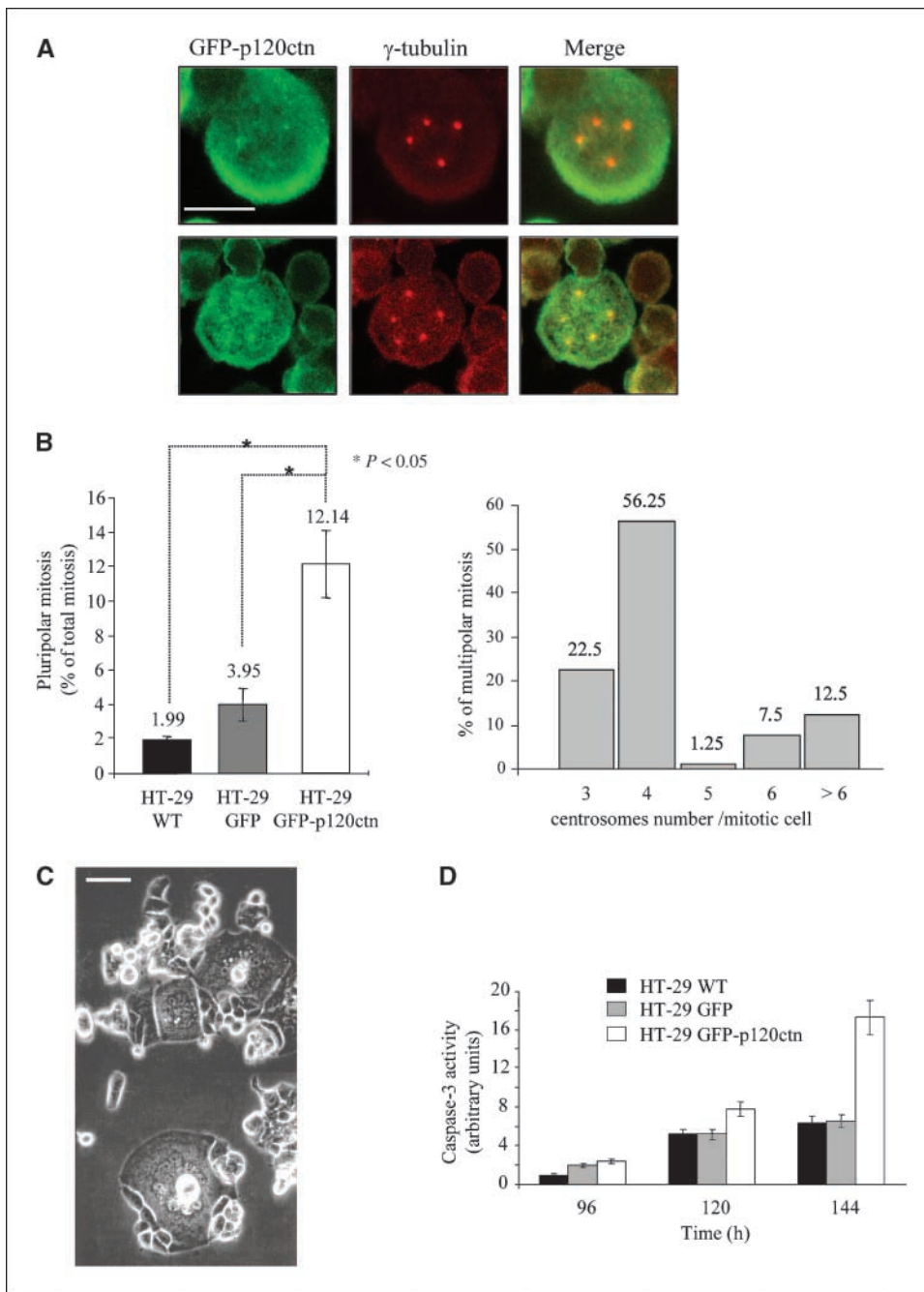


Figure 6. p120ctn overexpression leads to overduplication of centrosomes and polyploidy. *A*, HT-29 GFP-p120ctn cells were grown for 48 h on coverslips, fixed with 3% paraformaldehyde, and immunostained for γ -tubulin before confocal microscopic observation. *Bar*, 10 μ m. *B*, the number of centrosomes per mitotic cell was then quantified under confocal microscopy. Multipolar mitotic cells were represented as the percentage of total mitotic cells ($n = 200$). *, $P < 0.05$, Student's *t* test (*left*). Histogram showing the repartition of HT-29 GFP-p120ctn cells with supernumerary centrosomes ($n = 200$; *right*). *C*, polynuclear HT-29 GFP-p120 cells were observed under phase-contrast microscopy after 48 h of culture. *D*, caspase-3/caspase-7 activity was analyzed using Apo-One homogeneous assay in HT-29 GFP or HT-29 GFP-p120ctn cells according to the manufacturer's instructions. Fluorescence emission at 527 nm was quantified using a Fluoroskan Ascent. All experiments were done in triplicate.

could interact directly with cdk2 via RXL motifs present in armadillo repeat domains. *In silico* analysis of p120ctn sequence revealed that it contains six RXL motifs (data not shown) that may be involved in a p120ctn/cdk2 interaction.

Cyclin E plays an essential role in fundamental biological processes, such as cell cycle control, DNA replication, apoptosis, and DNA repair (30). Therefore, its expression must be finely regulated throughout the cell cycle (31). We found an impaired cyclin E down-regulation and accumulation in centrosomes in cells overexpressing p120ctn, suggesting that the p120ctn offers protection from proteasome degradation. In Chinese hamster ovary cells, the expression of the anchoring protein CG-NAP/D localizing in centrosomes throughout the cell cycle causes

centrosome amplification by recruiting an abnormally high level of cyclin E/cdk2 complexes (32). In these cells, we found that endogenous p120ctn also colocalizes with centrosomes (data not shown). Similarly to CG-NAP/D, p120ctn may recruit cyclin E/cdk2 complexes to centrosomes or alternatively modify the association of cyclin E with cdk inhibitors, a process described previously as strictly regulating cyclin E/cdk2 activity (22). Whereas cyclin E overexpression is known to accelerate G_1 -S transition in different cell lines (33, 34), we observed a delay in S-phase progression associated with the reduced proliferation of HT-29 cells overexpressing p120ctn, in accordance with other reports (33–36). This paradox can be explained by the role(s) played by cdk2 in regulating DNA replication (37). Indeed, high cyclin E/cdk2 activity was found

to interfere with the assembly of prereplication complexes leading to defects in replication initiation and possibly fork movement, thereby slowing down the S phase (36).

Overduplication of centrosomes can occur during prolonged S phases, when DNA replication is impaired and in primary tumors or cancer cell lines (38, 39). In many cases, a strong link between centrosome amplification and cyclin E overexpression has been described (32, 40). Our data reveal an increased number of centrosomes in cells overexpressing p120ctn. Nucleophosmin/B23, a chaperonin abundantly found in the nucleolus, has been identified as the primary target of cdk2/cyclin E in the initiation of centrosome duplication (15, 41). We noticed an increase in nucleophosmin phosphorylation on Thr¹⁹⁹, strongly suggesting that the p120ctn-mediated cdk2/cyclin E complex is active in centrosomes and may be directly responsible for centrosome amplification. p120ctn-mediated elevated levels of cyclin E could affect processes involved in the faithful duplication and segregation of chromosomes and may generate CIN, as described by Lengauer (42). This hypothesis fits with the significant levels of aneuploidy observed in both fibroblasts and epithelial cells on cyclin E ectopic expression (35). Interestingly, as for tumoral cells, overexpression of p120ctn in normal rat intestinal cells leads to reduced proliferation and an increased cyclin E expression, which accumulates together with p120ctn in centrosomes. These findings correlate with the apparition of p120ctn-positive polyploid cells (Supplementary Data S1). It thus seems that changes in protein stability might be the major reason for cyclin E-dependent effects of p120ctn overexpression in our biological system (normal and tumoral cells). This may also explain the CIN observed in many human colorectal cancers (43). Indeed, cyclin E has been found overexpressed in several solid tumors (reviewed in ref. 44), proving to be a prognostic marker for poor outcome in breast cancer and associated with increased tumor progression (45). Our observations suggest that the frequency of p120ctn-mediated polyploidy in normal cells may represent an early phenomenon that could contribute to tumor initiation. *Ex vivo*, HT-29 cells expressing these supernumerary centrosomes represented only 10% to 15% of the total population. However, this population remained constant, reflecting equilibrium between new cells acquiring this phenotype and aged cells that die (after 140 h of culture, ~15% of cells died by a caspase-dependent process). *In vivo*, the situation is quite different because the number of cells presenting an abnormal duplication of chromosomes increases with tumor progression (46).

Recent reports support a significant relationship between deregulation of cyclin E protein levels and the development of human cancers (47). It would be interesting to analyze the expression and distribution of p120ctn in these tumors to determine whether this catenin is the primary cause of cyclin E up-regulation. A study done in the breast cancer cell line MDA-MB-468 indicated a link between cyclin E and adhesive properties shown by changes in adhesion associated gene expression (48). Surprisingly, although cyclin E overexpression is associated with an aggressive phenotype, it significantly decreased the invasive potential of MDA-MB-468 cells compared with control clones in this study. Interaction of p120ctn with cyclin E/cdk2 complex may modulate the capacity of catenin to regulate Rho-GTPase activity, responsible for cytoskeletal reorganization and therefore impaired migration. A recent study by Bellovin et al. (8) done on 557 tumors showed a sustained p120ctn expression in the majority of colorectal carcinomas and a cytoplasmic localization as a statistically significant indicator of advanced disease. Interestingly, relatively few tumors exhibited a loss of p120ctn expression (5.4%).

Mechanistically, p120ctn seems to contribute to invasiveness and tumor progression in various independent ways via (a) p120ctn association-dependent regulation of mesenchymal cadherin levels (49); (b) p120ctn-mediated regulation of Rho-GTPases (9); and (c) p120ctn-dependent release of kaiso-mediated repression of gene expression (50). Altogether, our results provide new arguments for the importance of p120ctn in cancer progression: on the one hand, its centrosomal distribution could contribute to aberrant centrosome duplication and cell cycle progression, both leading to genomic instability, and, on the other hand, its cytoplasmic localization could increase invasiveness and migration. Because these modifications are often observed in cancer, p120ctn may represent a new therapeutic target for future therapy.

Acknowledgments

Received 1/18/2007; revised 7/30/2007; accepted 8/9/2007.

Grant support: Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer (Comité de Savoie). N.T. Chartier is the recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

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

We thank Géraldine Pawlak and Xavier Renot for their constructive criticism and Alexei Grichine and Brigitte Peyrusse for their excellent technical assistance in confocal microscopy and reprography artwork.

References

- Berx G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001;3:289-93.
- Vlemingckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 1991;66:107-19.
- Reynolds AB, Carnahan RH. Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15:657-63.
- Waltzer L, Bienz M. The control of β -catenin and TCF during embryonic development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18:231-46.
- Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, et al. Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol* 2000;148:189-202.
- van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes K, van Roy F. Nuclear localization of the p120(ctn) armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7980-5.
- Sarrío D, Perez-Mies B, Hardisson D, et al. Cytoplasmic localization of p120ctn and E-cadherin loss characterize lobular breast carcinoma from preinvasive to metastatic lesions. *Oncogene* 2004;23:3272-83.
- Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, Rimm DL, Mercurio AM. Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer Res* 2005;65:10938-45.
- Anastasiadis PZ. p120-ctn: a nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:34-46.
- Daniel JM, Reynolds AB. The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol* 1999;19:3614-23.
- van Roy FM, McCrea PD. A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer? *Nat Rev Cancer* 2005;5:956-64.
- Chen X, Kojima S, Borisy GG, Green KJ. p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol* 2003;163:547-57.
- Franz CM, Ridley AJ. p120 catenin associates with microtubules: inverse relationship between microtubule binding and Rho GTPase regulation. *J Biol Chem* 2004;279:6588-94.
- Yanagisawa M, Kaverina IN, Wang A, Fujita Y, Reynolds AB, Anastasiadis PZ. A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function. *J Biol Chem* 2004;279:9512-21.
- Okuda M, Horn HF, Tarapore P, et al. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 2000;103:127-40.

16. Kawamura K, Izumi H, Ma Z, et al. Induction of centrosome amplification and chromosome instability in human bladder cancer cells by p53 mutation and cyclin E overexpression. *Cancer Res* 2004;64:4800-9.
17. Chartier NT, Laine M, Gout S, et al. Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. *J Cell Sci* 2006;119:31-46.
18. Bornens M, Moudjou M. Studying the composition and function of centrosomes in vertebrates. *Methods Cell Biol* 1999;61:13-34.
19. Reynolds AB, Rocznik-Ferguson A. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene* 2004;23:7947-56.
20. Pugacheva EN, Roegiers F, Golemis EA. Interdependence of cell attachment and cell cycle signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:507-15.
21. Sauer K, Lehner CF. The role of cyclin E in the regulation of entry into S phase. *Prog Cell Cycle Res* 1995;1:125-39.
22. Ekholm SV, Reed SI. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:676-84.
23. Won KA, Reed SI. Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *EMBO J* 1996;15:4182-93.
24. Lacey KR, Jackson PK, Stearns T. Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2817-22.
25. Adams PD, Sellers WR, Sharma SK, Wu AD, Nalin CM, Kaelin WG, Jr. Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol* 1996;16:6623-33.
26. Park CS, Kim SI, Lee MS, et al. Modulation of β -catenin phosphorylation/degradation by cyclin-dependent kinase 2. *J Biol Chem* 2004;279:19592-9.
27. Nong CZ, Pan LL, He WS, Zha XL, Ye HH, Huang HY. p120ctn overexpression enhances β -catenin-E-cadherin binding and down regulates expression of survivin and cyclin D1 in BEL-7404 hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2006;12:1187-91.
28. Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, et al. p120-Catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell* 2006;127:1027-39.
29. Perez-Moreno M, Davis MA, Wong E, Pasolli HA, Reynolds AB, Fuchs E. p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin. *Cell* 2006;124:631-44.
30. Mazumder S, DuPree EL, Almasan A. A dual role of cyclin E in cell proliferation and apoptosis may provide a target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4:65-75.
31. Ekholm SV, Zickert P, Reed SI, Zetterberg A. Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. *Mol Cell Biol* 2001;21:3256-65.
32. Nishimura T, Takahashi M, Kim HS, Mukai H, Ono Y. Centrosome-targeting region of CG-NAP causes centrosome amplification by recruiting cyclin E-cdk2 complex. *Genes Cells* 2005;10:75-86.
33. Ohtsubo M, Roberts JM. Cyclin-dependent regulation of G₁ in mammalian fibroblasts. *Science* 1993;259:1908-12.
34. Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI. Acceleration of the G₁/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 1994;14:1669-79.
35. Spruck CH, Won KA, Reed SI. Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* 1999;401:297-300.
36. Ekholm-Reed S, Mendez J, Tedesco D, Zetterberg A, Stillman B, Reed SI. Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. *J Cell Biol* 2004;165:789-800.
37. Woo RA, Poon RY. Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* 2003;2:316-24.
38. Fukasawa K. Centrosome amplification, chromosome instability, and cancer development. *Cancer Lett* 2005;230:6-19.
39. Balczon R, Bao L, Zimmer WE, Brown K, Zinkowski RP, Brinkley BR. Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea-arrested Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol* 1995;130:105-15.
40. Hinchcliffe EH, Li C, Thompson EA, Maller JL, Sluder G. Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* 1999;283:851-4.
41. Tarapore P, Okuda M, Fukasawa K. A mammalian *in vitro* centriole duplication system: evidence for involvement of CDK2/cyclin E and nucleophosmin/B23 in centrosome duplication. *Cell Cycle* 2002;1:75-81.
42. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997;386:623-7.
43. Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:695-701.
44. Akli S, Keyomarsi K. Cyclin E and its low molecular weight forms in human cancer and as targets for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2003;2:S38-47.
45. Porter PL, El-Bastawisi AY, Mandelson MT, et al. Breast tumor characteristics as predictors of mammographic detection: comparison of interval- and screen-detected cancers. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:2020-8.
46. Lingle WL, Barrett SL, Negron VC, et al. Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:1978-83.
47. Hwang HC, Clurman BE. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* 2005;24:2776-86.
48. Berglund P, Landberg G. Cyclin e overexpression reduces infiltrative growth in breast cancer: yet another link between proliferation control and tumor invasion. *Cell Cycle* 2006;5:606-9.
49. Yanagisawa M, Anastasiadis PZ. p120 catenin is essential for mesenchymal cadherin-mediated regulation of cell motility and invasiveness. *J Cell Biol* 2006;174:1087-96.
50. Kelly KF, Spring CM, Otchere AA, Daniel JM. NLS-dependent nuclear localization of p120ctn is necessary to relieve Kaiso-mediated transcriptional repression. *J Cell Sci* 2004;117:2675-86.

Etude de la maturation des jonctions
adhérentes durant la différenciation
entérocytaire

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

Enterocytic differentiation is modulated by lipid rafts-dependent assembly of adherens junctions[☆]

Nicolas T. Chartier^{a,b,1,2}, Michèle G. Lainé^{a,b,1,3}, Benjamin Ducarouge^{a,b}, Christiane Oddou^{a,c}, Bruno Bonaz^{b,3}, Corinne Albiges-Rizo^{a,b,c}, Muriel R. Jacquier-Sarlin^{a,b,*,3}

^aCentre de Recherche Inserm U823, Institut Albert Bonniot, Equipe de la Dynamique des Systèmes d'Adhérence et de la Différenciation, Site Santé BP 170 La Tronche F-38042 Grenoble Cedex 9, France

^bUniversité Joseph Fourier, F-38000 Grenoble, France

^cCentre National de la Recherche Scientifique, Equipe de Recherche Labellisée 3148

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 26 October 2010

Revised version received

18 February 2011

Accepted 9 March 2011

Available online 16 March 2011

Keywords:

Rac1, adherens junctions

Lipid rafts

Flotillin

Intestinal cell differentiation

ABSTRACT

Integrity of the epithelial barrier is determined by apical junctional complexes which also participate in the signalling pathways inducing intestinal cell differentiation. Lipid rafts (LR) have been proposed to play a role in the organization and the function of these intercellular complexes. This study investigated potential mechanisms by which LR could participate in the establishment of adherens junctions (AJ) and the initiation of enterocytic differentiation.

We showed that the differentiation of epithelial cells in rat colons correlates with the emergence of LR. Using HT-29 cells we demonstrated that during the differentiation process, LR are required for the recruitment and the association of p120ctn to E-cadherin. Silencing of flotillin-1, a LR component, alters the recruitment of AJ proteins in LR and delays the expression of differentiation markers. Furthermore, the ability of p120ctn/E-cadherin complexes to support cell differentiation is altered in HT-29 Rac1N17 cells. These results show a contributory role of LR in the enterocytic differentiation process, which serve as signalling platforms for Rac1-mediated organization of AJ. A better understanding of the mechanism involved in the establishment of junctional complex and their role in enterocytic differentiation provides new insights into the regulation of intestinal homeostasis.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

[☆] Author involved with the manuscript: Lainé, Chartier and Ducarouge: acquisition of data; analysis and interpretation of data; statistical analysis and drafting of the manuscript; Oddou: technical assistance; Bonaz and Albiges-Rizo: critical revision of the manuscript and obtained funding; Jacquier-sarlin: study concept and design, drafting of the manuscript and study supervision.

* Corresponding author at: Centre de Recherche Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Equipe du Stress et des Interactions Neurodigestives, Site Santé BP 170 La Tronche F-38042 Grenoble Cedex 9, France. Fax: +33 476 56 05 54.

E-mail address: jacquier-sarlin@ujf-grenoble.fr (M.R. Jacquier-Sarlin).

Abbreviations: AJ, adherens junctions; LR, lipid raft; CTX, cholera Toxin; ALP, alkaline phosphatase; DPPIV, dipeptidyl IV; shRNA, short hairpin RNA

¹ These authors contributed equally to this work.

² Present address: Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie, Unité de recherche en division et différenciation cellulaire, Université de Montréal, CP 6128, Succ. Centre-Ville, Montreal, QC, Canada H3C 3J7.

³ Present address: Centre de Recherche Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Equipe du Stress et des Interactions Neurodigestives, Site Santé BP 170 La Tronche F-38042 Grenoble Cedex 9, France.

0014-4827/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.yexcr.2011.03.009

Introduction

The digestive and protective functions of the intestinal mucosa depend on constant renewal and differentiation of the epithelium which forms a barrier of polarized cells joined by a complex set of cell–cell junctions. Adhesive interactions between cells are key determinants of normal tissue organisation during development and restitution but also in diseases. Increased permeability of the intestinal epithelium is responsible for the physiopathology of a variety of gastrointestinal disorders [1]. Cadherins are transmembrane adhesion receptors that mediate calcium-dependent cell–cell adhesion within adherens junctions (AJ) through homodimerization of their extracellular domains [2]. Catenins, the proteins interacting with the cytoplasmic domain of cadherin, couple cadherin either directly or indirectly to the cortical cytoskeleton [3]. Cadherin clustering and the anchorage to the cortical cytoskeleton transform the weak adhesive bonds into a mature AJ. This dynamic equilibrium is important for tissue morphogenesis or wound healing, when epithelial cells need to become motile [4].

Adhesion complexes are also preferential sites for signal transduction controlling the cell state, proliferation and differentiation [5–7]. Several mechanisms have been implicated in the regulation of cadherin-mediated adhesiveness including association of their cytoplasmic domain with catenins, the phosphorylation status of catenin/cadherin complexes and clustering of cadherins at the cell membrane (reviewed in [2]). Accumulating evidences indicate a role for p120ctn in the regulation of cell adhesiveness in epithelial cells, by regulating cadherin stability and turnover (reviewed in [8]). We and others have shown that E-cadherin binding to p120ctn at the plasma membrane ensures local strengthening and maturation of AJ [9–11]. Overexpression studies demonstrated that cytoplasmic proteins, such as the Rho family small GTPases, are another partners by which p120ctn might regulate cadherin-dependent adhesion (reviewed in [12]). Rho GTPases are well known for their pleiotropic activities on the actin cytoskeleton, vesicular trafficking, protein phosphorylation and gene transcription [13]. Members of these GTP-binding proteins have also emerged as key mediators of cadherin functions (reviewed by [14,15]). Nevertheless, the involvement of each Rho GTPases in cell–cell adhesion differs, depending on the cellular context and the maturation status of the junction [16–18]. It was proposed that p120ctn, a member of the Armadillo repeat family of catenins, could act by differentially recruiting and activating small GTPases at the site of cell–cell adherens but the timing and the way these proteins are co-recruited is still unclear.

In epithelial cells, assembly of adhesion complexes occurs at the plasma membrane, where individual proteins and lipids are known to be restricted to apical and basolateral domains. Specialized subdomains that are highly enriched in cholesterol and sphingolipids, referred to lipid raft (LR) microdomains are involved in the biogenesis of apical membrane (reviewed by [19]). LR are also enriched in key signalling molecules suggesting that they could function as organizing centers for signalling [20,21]. Indeed, these microdomains have been proposed to play a role in the spatial organization and function of tight junctions [22], and later, in the regulation of N-cadherin function [23]. The physiological context of intestinal epithelium which is in constant renewal, may place constraints on how LR can be organized and

therefore, on how they participate in AJ-mediated cell differentiation. The flotillin protein family consists of two ubiquitously expressed isoforms, flotillin-1 and flotillin-2, that are evolutionarily highly conserved. They have been linked to many cellular events and in particular, cellular traffic [24–26]. While they have been described to be expressed in LR, the subcellular localization of flotillins is highly dynamic: flotillins externalize from intracellular compartments to the plasma membrane during the process of cellular differentiation [27] and their traffic is down-regulated upon establishment of cell–cell contact or cytoskeleton disruption, suggesting a role for flotillin in the regulation of AJ assembly and/or maturation [28]. Here we show that E-cadherin and p120ctn interact preferentially in LR at the site of cell–cell contacts and that the disruption of LR impairs the formation of this complex. Using shRNA or dominant negative form of Rac1, we show that flotillin-1 as well as Rac1 activity are both necessary for the recruitment of p120ctn and the formation of E-cadherin-p120ctn complexes in LR. This signaling pathway is required for the enterocytic differentiation of HT-29 cells. Our results unravel the complex relationship between p120ctn, Rho-GTPases and cadherin, and identify a new function for flotillin-1 in LR-mediated maturation of AJ and intestinal cell differentiation.

Materials and methods

Cell culture and animals

The human colon adenocarcinoma HT-29 cell line was used as an *in vitro* model of intestinal epithelial cells. They were routinely cultured at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere in Dulbecco Minimal Essential Medium (DMEM) containing 25 mM glucose (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and supplemented with 10% foetal calf serum, penicillin and streptomycin (standard medium). The medium was changed everyday to avoid glucose exhaustion, which leads to differentiation. The differentiation of HT-29 cells was initiated by replacing the standard medium for glucose free DMEM supplemented with 10% dialyzed foetal calf serum, 5 mM galactose, 15 mM HEPES, penicillin, and streptomycin. This medium (Gal-medium or differentiating medium) was changed every day. Male Spague Dawley rats, 250–300 g, were purchased from Charles River France and housed in a temperature-controlled environment for 1 week. They were sacrificed in agreement with local ethic committee policies, by 40 mg/kg IP injection of pentobarbital and submitted to 200 mL intra-cardiac perfusion of NaCl 0.9%.

Antibodies and reagents

Anti-villin was kindly provided by Dr. Louvard (Institute Curie, Paris, France). Anti-human E-cadherin monoclonal antibody (HECD1) was purchased from Takara Biochemicals (Shiga, Japan). Anti-Rac1 monoclonal antibody was obtained from Upstate Biotechnology. Monoclonal antibodies against flotillin-1, p120ctn (clone 98), green fluorescent protein (GFP) and p27^{Kip1} (clone 57) were purchased from BD Biosciences (Pont de Claix, France). Rabbit polyclonal anti-p120ctn and anti-RhoA were from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). Polyclonal antibody against actin, Fluorescein IsoThioCyanate conjugated Cholera Toxin B subunit (FITC-CTX) and methyl- β

cyclo dextrin (MCD) were purchased from Sigma-Aldrich (L'isle d'Abeau, France). Goat anti-IgG2a, (Immunotech, Marseille, France) was used as control in immunoprecipitation experiments. Secondary antibodies used were antibodies coupled to Alexa 546 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) and to Horseradish peroxidase (Biorad, Hercules, CA, USA). Phosphatase and protease inhibitor cocktails, and amphotericin B were purchased from Calbiochem (Montluçon, France) and cholesterol oxidase was from Roche (Meylan, France).

Retrovirus production and infection

shRNA oligonucleotides targeting GFP, human p120ctn and flotillin-1 cloned into pSM2c vectors were purchased from Openbiosystems (Huntsville, Alabama, USA). The Rac1N17 construct encoding the dominant-negative form of Rac1 GTPase was cloned into the pBabe retroviral expression vector. Amphotropic retrovirus stocks were obtained by Exgen (Euromedex, Souffelweyersheim, France) mediated transient transfection of the retroviral vector DNAs into Phoenix packaging cells. Target HT-29 cells were infected in the presence of 4 µg/mL polybrene (Sigma-Aldrich) then cultured in medium containing 2 µg/mL puromycin (BD Biosciences) to select virus-infected cells. Following selection, cells were pooled, expanded, and tested for protein expression by western blotting.

Isolation of lipid rafts

Briefly, postnuclear supernatant from 5×10^7 HT-29 cells was solubilized in 1.5 ml of buffer A (25 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, protease inhibitors mixture) containing 1% Triton X100 for 1 h at 4 °C. Lysates were ultracentrifuged after mixing with an equal volume of 80% sucrose in buffer A and laid down at the bottom of a ultracentrifuge tube, which was then overlaid with 6 mL of 38% sucrose followed by 3 mL of 5% sucrose, all diluted in buffer A. After centrifugation at 38,000 rpm for 16 h in a SW41 rotor (Beckman Coulter) at 4 °C, 1 mL fractions were harvested from the top. Detection of cholesterol was performed using the Amplex Red Cholesterol assay kit (Invitrogen) according to the instructions of the manufacturer. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay (Pierce-Thermo Fisher Scientific, Brebières, France).

Cholesterol depletion

Three different methods were used to specifically remove cholesterol. Differentiated HT-29 cells were washed three times in PBS and then incubated in serum-free DMEM containing 4 mM methyl-beta-cyclodextrin (MCD) for 6 h at 37 °C or 2 unit/mL of cholesterol oxidase for 2 h at 37 °C. Differentiating medium containing Amphotericin B (25 µg/mL) was added every day in HT-29 cells.

Co-immunoprecipitation experiments

500 µL of gradient fractions (generally fractions n° 3 and 11) were incubated 2 h at 4 °C with 2 µg of IgG2a isotype coupled to protein A-Sepharose (GE Healthcare). After a 10 min centrifugation at 14,000 rpm, the supernatants were incubated overnight at 4 °C with 2 µg of antibodies raised against p120ctn or E-cadherin and

immobilized on protein A-Sepharose. Beads were washed four times in PBS, and bound proteins were eluted from the beads by boiling in 20 µL of Laemmli's sample buffer. The samples were analyzed by western blot.

Western blot analysis

Cells were lysed and extracts processed as previously described [29]. Antibodies dilutions were 1:1000 for E-cadherin, p120ctn, flotillin-1, Rac1; 1:5000 for villin, and 1:250 for actin and p27kip1. In each experiment, actin expression was used as a loading control.

Immunofluorescence microscopy

Cells grown on glass coverslips were treated as previously described [29]. Antibodies dilutions were: anti-p120ctn and anti E-cadherin (1:200), anti-villin (1:500), FITC-CTx (1 µg/mL) and 1:1000 for secondary antibodies. Coverslips were permanently mounted with Mowiol (Calbiochem). Fluorescence photomicrographs were taken using a confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 510).

Rat proximal colons were collected, fixed over night in PFA 4%, sucrose 3% and cryoprotected 12 h in sucrose 30% until freezing in isopentane. Samples of 3 different rats were embedded in Tissue-Teck OCT compound cryosectioned at 30 µm thickness and performed for immunofluorescence on Superfrost plus slides. Confocal immunofluorescent sections were acquired using a Leica TCS SPE confocal microscope.

Rac1-GTP pull-down assays

Levels of active Rac1 were estimated using the Rac-binding domain of p21-activated kinase (PAK) as previously described [30] and adapted in Ref. [29]. GTP-bound Rac1 was analyzed by western blotting with anti-Rac1 antibody. Whole cell lysates were run in parallel.

Enzymatic activity assays

Cell lysate procedure was adapted from [31]. Briefly, the cells were resuspended in 5 mM Na₂SO₄, 1 mM Tris/HCl, pH 7.6, 40 µg/ml PMSF and sonicated for 30 sec at 4 °C (400 J/W s). Then the homogenate was centrifuged for 10 min at 1060 g. The supernatant was collected for the enzymatic assays. Alkaline phosphatase activity was measured in 50 mM glycine pH 10.5, 0.2 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂ and 2 mM ZnCl₂ with 10 mM *p*-nitrophenylphosphate disodium salt (Sigma-Aldrich) as substrate during 2 h at 37 °C and stopped by the addition of 1 mol/L NaOH. The production of *p*-nitrophenol was estimated by measuring the optical density at 420 nm. Dipeptidyl dipeptidase activity was determined by the digestion of 3 mM GlyPro-*p*-nitroanilide (Sigma-Aldrich) by cell lysates for 30 minutes at 37 °C. The reaction was stopped with 1 M acetate and reaction products were measured at 420 nm. Results are expressed as enzyme activity in international units per milligram of protein. All experiments were performed in triplicates.

Statistical analysis

All the experiments were performed at least three times. Values are expressed as mean ± standard error of the mean.

Results

E-cadherin and p120ctn translocate into LR during HT-29 cell differentiation

In epithelial cells, LR are essentially organized at the apical plasma membrane of differentiated cells where they serve as platforms for cell signaling and membrane trafficking. We previously showed that HT-29 cell differentiation results in morphological changes associated with modifications of intercellular junctions [11]. To test whether LR organization and intercellular adhesion are associated during epithelial differentiation, we performed a time-course analysis of LR distribution during the first 10 days of HT-29 cell differentiation. Binding of FITC- cholera toxin (FITC-CTx), which presents a high affinity for LR-associated ganglioside GM1 [32], was used as a marker. Fluorescence microscopy analysis showed that the FITC-CTx staining evolves from diffuse at the cell cortex (day 0) to condensed membranous patches (day 4) which accumulate until day 10 (Fig. 1A). Furthermore, expression levels of flotillin-1, a component of LR in intestinal cells, gradually increased during the first 10 days of HT-29 cell differentiation (Fig. 1B). FITC-CTx and flotillin-1 labeling of rat colon cryosections, confirmed that similar LR organization occurs *in vivo* during intestinal differentiation. Indeed, the two signals were colocalized and more intense at the top of the crypts (upper crypt with differentiated cells) than in the bottom (lower crypt with undifferentiated cells) (Fig. 1C). Taken together, these results indicate that LR emergence correlates to enterocytic differentiation.

HT-29 cell differentiation is characterized by a transition from immature to mature E-cadherin-dependent cell–cell contacts, a process linked to the recruitment of p120ctn [11,29]. To determine whether LR are involved in this process, these microdomains were isolated by centrifugation on a sucrose gradient. Each fraction was subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting with flotillin-1 and actin antibodies (Fig. 2A). Flotillin-1 and cholesterol were enriched in fractions 3–5, corresponding to LR. Analysis of the gradient protein profile shows that only few proteins were retained in LR fractions, while overall proteins were localized in the high-density bottom fractions (fractions 9–12) corresponding to plasma and vesicular membranes (Fig. 2A, gray dashed line). LR and membrane fractions were prepared from HT-29 cells undergoing differentiation and the expression level of E-cadherin and p120ctn in each fraction was analyzed by immunoblotting (Fig. 2B). The quality of purification was assessed by the detection of flotillin-1 only in the LR fractions whatever the stage of cell differentiation. In undifferentiated HT-29 cells (day 0 to 4), p120ctn and E-cadherin were found in membrane fractions, with only traces amounts in the LR fractions. However, as the differentiation takes place (days 6 to 10), E-cadherin and p120ctn translocate from membrane to LR fractions. Importance of LR in this process has been studied after their disruption, achieved by endocytosis, cholesterol depletion or oxidation, through the addition of amphotericin B, cholesterol oxidase or methyl- β -cyclodextrin, respectively [33]. Disruption of LR leads to a decrease in the recruitment of E-cadherin and p120ctn in these structures, and conversely, to their accumulation in membrane-enriched fractions (Fig. 2C). This effect was more pronounced for p120ctn, which is a cytoplasmic protein, than for E-cadherin, a transmembrane protein. Surprisingly, we noticed an enhance level of

flotillin-1 in the LR of differentiated cells treated with LR destabilizing drugs, in particular, with amphotericin B and methyl- β -cyclodextrin. While these treatments change the organization of LR (data not shown), these structures still contain flotillin-1. Indeed, amphotericin B treatment produces bigger patches compared to controls which might be enriched in flotillin-1. In contrast, methyl- β -cyclodextrin treatment modifies the plasma membrane fluidity (and cell morphology) and LR are more scattered within the plasma membrane. Thus, LR domains still contain flotillin-1 even if their organization is affected by either intra-cytoplasmic clustering or diffusion in the plasma membrane.

The subcellular distribution of these proteins was further characterized by confocal microscopy analysis (Fig. 2D). Both E-cadherin and p120ctn were expressed and localized at the cortex of undifferentiated cells (day 0) but they become concentrated in FITC-CTx stained LR in differentiated HT-29 cells (day 10). Z axis reconstructions showed that E-cadherin and p120ctn association with LR preferentially occurs at the apico-basolateral cell junctions. Interestingly, the same colocalization was observed in the upper crypt of rat colon corresponding to epithelial differentiated cells (Fig. 2E).

Overall these data indicate that E-cadherin and p120ctn associate with LR during intestinal differentiation *in vitro* and *in vivo*, mainly at the apico-basolateral membranes where intercellular contacts are engaged.

p120ctn binding to E-cadherin preferentially occurs in LR

To further address the impact of AJ components recruitment in LR on intercellular junction assembly during HT-29 cell differentiation, we tested by co-immunoprecipitation the ability of p120ctn to bind E-cadherin according to its subcellular localization (Fig. 3). In differentiated HT-29 cells, the amount of E-cadherin/p120ctn complexes increases in both LR and membrane (Mb) fractions (lanes IP). However, densitometric analysis of E-cadherin/p120ctn complexes indicated that the amount of these complexes is higher in LR.

Our results show that the maturation of AJ which occurs during HT-29 cell differentiation correlates with a recruitment of E-cadherin and p120ctn into LR where they form a complex.

The recruitment of p120ctn and E-cadherin into LR are necessary for HT-29 cell differentiation

We next investigated the individual contribution of p120ctn and LR in the differentiation program of HT-29 cells, by silencing the expression of p120ctn and flotillin-1. Cells treated with p120ctn-specific shRNA (HT-29^{sh p120} cells) displayed a 50% reduction in the level of p120ctn, associated with a 30% decrease in E-cadherin expression (Fig. 4A). This effect of p120ctn depletion on E-cadherin was already observed [34] and is specific since the levels of flotillin-1 and actin remained unaffected. A shRNA directed against flotillin-1 (HT-29^{sh flot} cells) reduced the expression of flotillin-1 by 70% with no change in p120ctn and E-cadherin expression. The impact of p120ctn and flotillin-1 reduction on HT-29 cells differentiation was then assessed by following the kinetic of intestinal differentiation marker during 10 days. The enzymatic activities of ALP and DPPIV are known to increase during intestinal cell differentiation [35]. While increasing with time of HT-29 cell differentiation, the activities of these two enzymes were

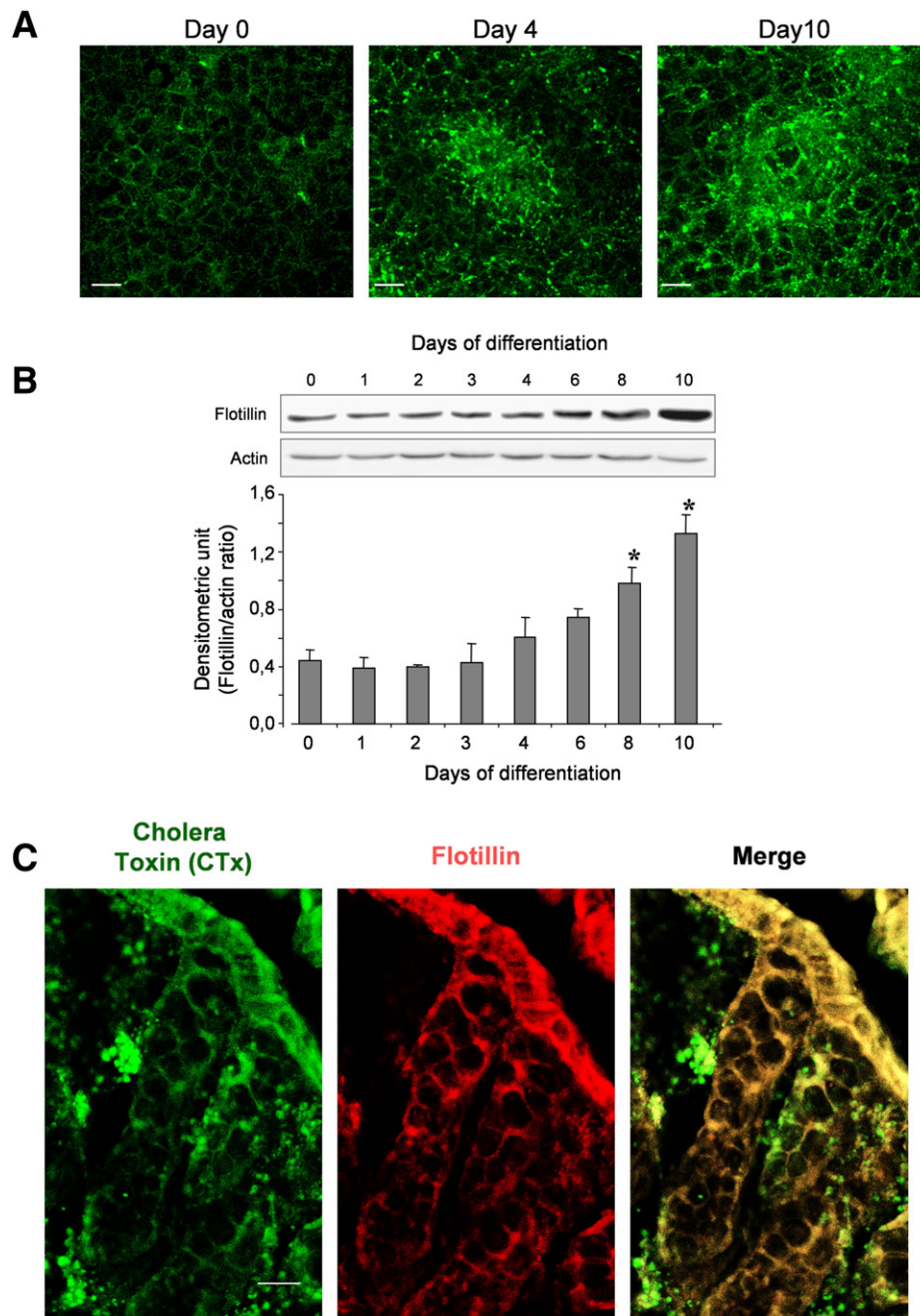


Fig. 1 – Early enterocytic differentiation of HT-29 cells is associated with the emergence of flotillin-1 LR. (A) Middle plane confocal sections of HT-29 cells differentiated for 0, 4 or 10 days in Gal-medium and immunostained with FITC-CTx. Bar is 20 μm . (B) Western blot showing flotillin-1 expression levels in lysates from HT-29 cells differentiated for the indicated times. Histograms represent the densitometric ratio of flotillin-1 to actin levels (mean \pm s.e.m. of three independent experiments). * $p < 0.01$ compared to J0 as determined by Student's *t*-test. (C) Confocal analysis of rat colon cryosections immunostained with FITC-CTx (green) and flotillin-1 (red). Bar = 100 μm .

significantly reduced in p120ctn and flotillin-1 shRNA expressing cells when compared to controls (Fig. 4B). The silencing of p120ctn and flotillin-1 is not total and leads to a delay in cell differentiation which was confirmed by immunoblotting of p27kip and villin expression (Fig. 4C). As for enzymatic activities, the increase in p27kip and villin expression was delayed and lower in both

p120ctn and flotillin-1 depleted HT-29 cells. Flotillin-1, p120ctn and E-cadherin expression levels were used as control. These experiments indicate that both p120ctn and flotillin-1 are needed for HT-29 cell differentiation program. However, we have to determine if LR act upstream of AJ proteins, promoting their maturation as complexes allowing differentiation signals.

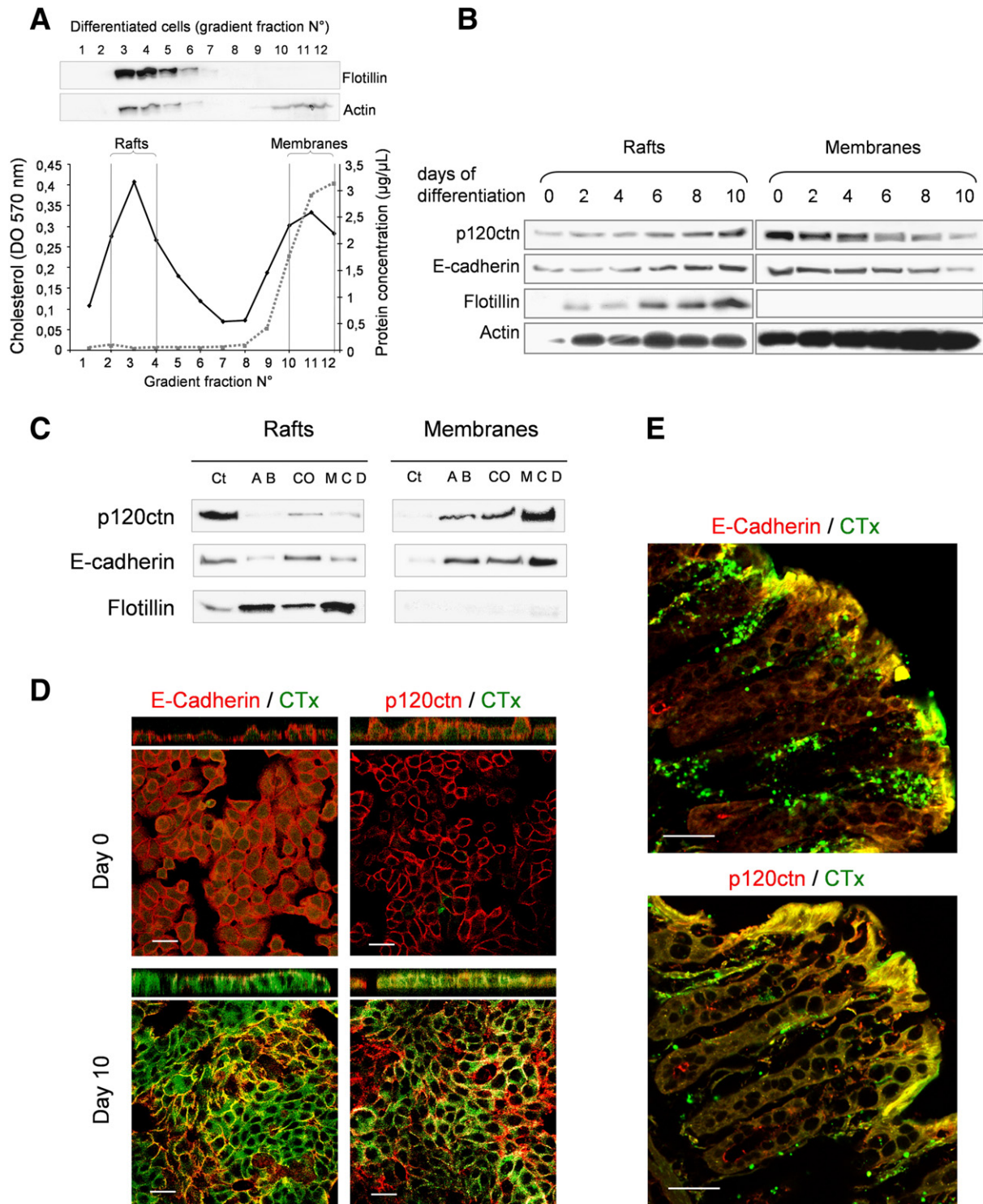


Fig. 2 – A–J proteins are associated with Flotillin-1 enriched LR during HT-29 cells differentiation. (A) Lysates from HT-29 cells differentiated for 10 days was fractionated using a sucrose gradient. The presence of LR was assessed by western blot against flotillin-1. Curves indicate the concentration of cholesterol (dark full line) and protein (gray dotted line) for each fraction. (B) Western blots showing the expression level of p120ctn, E-cadherin and flotillin-1 in LR and in membranes fractions of HT-29 cells differentiated for 10 days. Actin was used as loading control. (C) Differentiated HT-29 cells were treated or not with LR destabilizing drugs: amphotericin B (AB); cholesterol oxidase (CO) and methyl-cyclodextrin (MCD). Then they were fractionated on a sucrose gradient before western blot analysis. (D) HT-29 cells undifferentiated (day 0) or differentiated (day 10) were immunostained for E-cadherin (left panels) and p120ctn (right panels) together with FITC-CTx. Projection on the Z-axis is presented upon each picture. Bar is 20 μm . (E) Immunofluorescent labeling of FITC-CTx (green) and E-cadherin (red, upper panel) or p120ctn (red, lower panel) demonstrating colocalization of these proteins (yellow) in the epithelial cells of the rat colon. Bar = 60 μm .

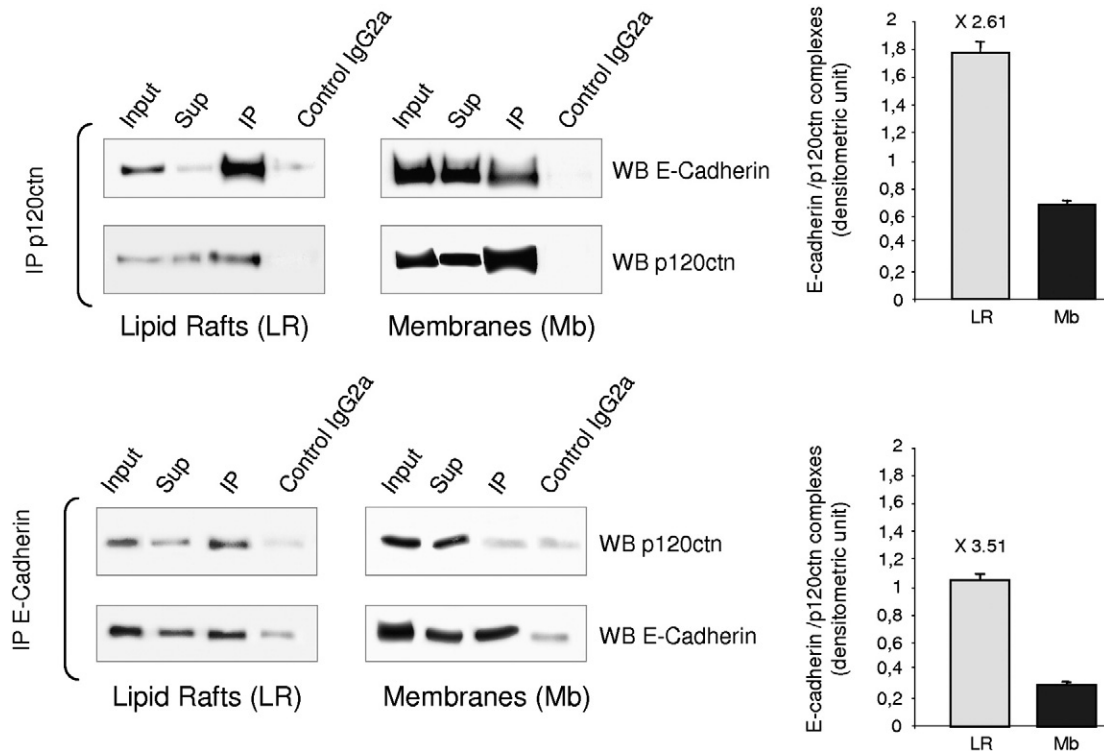


Fig. 3 – E-cadherin/p120ctn interaction occurs preferentially in LR. P120ctn and E-cadherin were immunoprecipitated from equal volume of LR or membranes fractions of HT-29 cells differentiated for 10 days. The amount of E-cadherin/p120ctn complexes was then assessed by western blot. Input: 25 μ L of each fractions; Sup: Supernatant of immunoprecipitation; IP: Immunoprecipitate; Control: IgG2a immunoprecipitation. Histograms represent the relative quantity of adherens junctions protein complexes. Quantification of complexes obtained in fractions 3 and 11, was determined as follow: values of densitometry ratio of the co-immunoprecipitated protein bands/immunoprecipitated protein bands.

The colocalization of E-cadherin and p120ctn with LR was analyzed in differentiated HT-29 cells (day 10) silenced by RNAi. p120ctn and E-cadherin were recruited into LR in control shRNA cells (Fig. 5A). Silencing of p120ctn had no effect on the formation of LR, still present as patches at the cell cortex. Impaired expression of p120ctn leads to a reduction of p120ctn as well as E-cadherin recruitment into LR (Figs. 5A and B). On the opposite, the silencing of flotillin-1 impaired the formation of LR in HT-29 cells and lead to a diffuse localization of E-cadherin and p120ctn. This result was confirmed by biochemical analysis of the distribution of p120ctn and E-cadherin in the remaining LR fractions of HT-29^{shflot} cells (Fig. 5B). Densitometric analyses indicate that the recruitment of E-cadherin and p120ctn in LR is inhibited by 50% in HT-29^{shp120ctn} cells and by 60% and 80% respectively in HT-29^{shflot} cells (Fig. 5C).

Therefore, during HT-29 cell differentiation, flotillin-1 is required for LR emergence which thus acts upstream of AJ protein recruitment and signalling.

Rac1 activation is required for E-cadherin and p120ctn recruitment into LR and induction of HT-29 cell differentiation

The small GTPase Rac1 has been described to regulate AJ assembly in several systems [36]. We thus investigated the relationship between Rac1, LR emergence and AJ maturation in intestinal cell

differentiation. For this purpose, we established a HT-29 cell line expressing a dominant negative form of Rac1 (HT-29 Rac1N17). In these cells, the Rac1 activity is inhibited by approximately 60% and did not vary during the differentiation process compared to control cells (expressing pBabe vector alone) (Fig. 6A).

The kinetic of intestinal differentiation markers was compared in these two cell lines: ALP and DPPIV enzymatic activities were respectively delayed and diminished by 50% and 70% in HT-29 Rac1N17 at 10 days of differentiation (Fig. 6B). In this cell line, the increase of villin expression was also impaired and the protein was not enriched at the apical surface compared to control cells (Fig. 6C). The presence of FITC-CTx aggregates at the cortex of HT-29 Rac1N17 cells suggests that LR emergence may occur in the presence of reduced Rac1 activity. However, levels of flotillin-1 recruited in these LR were slightly reduced in HT-29 Rac1N17 cells compared to control cells (Fig. 7). This observation indicates that Rac1 activity is required for LR emergence. To test whether Rac1 activity has a role in the recruitment of AJ components in the LR, we performed p120ctn and E-cadherin immunostainings in differentiated HT-29 pBabe or HT-29 Rac1N17 cells. While these two cell lines expressed similar level of E-cadherin and p120ctn (Fig. 7A), we observed that p120ctn and E-cadherin do not colocalize with FITC-CTx labeling in HT-29 Rac1N17 whereas they do in HT-29 cells (Fig. 7B). Analysis of the protein profile along the sucrose gradient performed on HT-29 pBabe and HT-29 Rac1N17 cells differentiated for 10 days showed that p120ctn

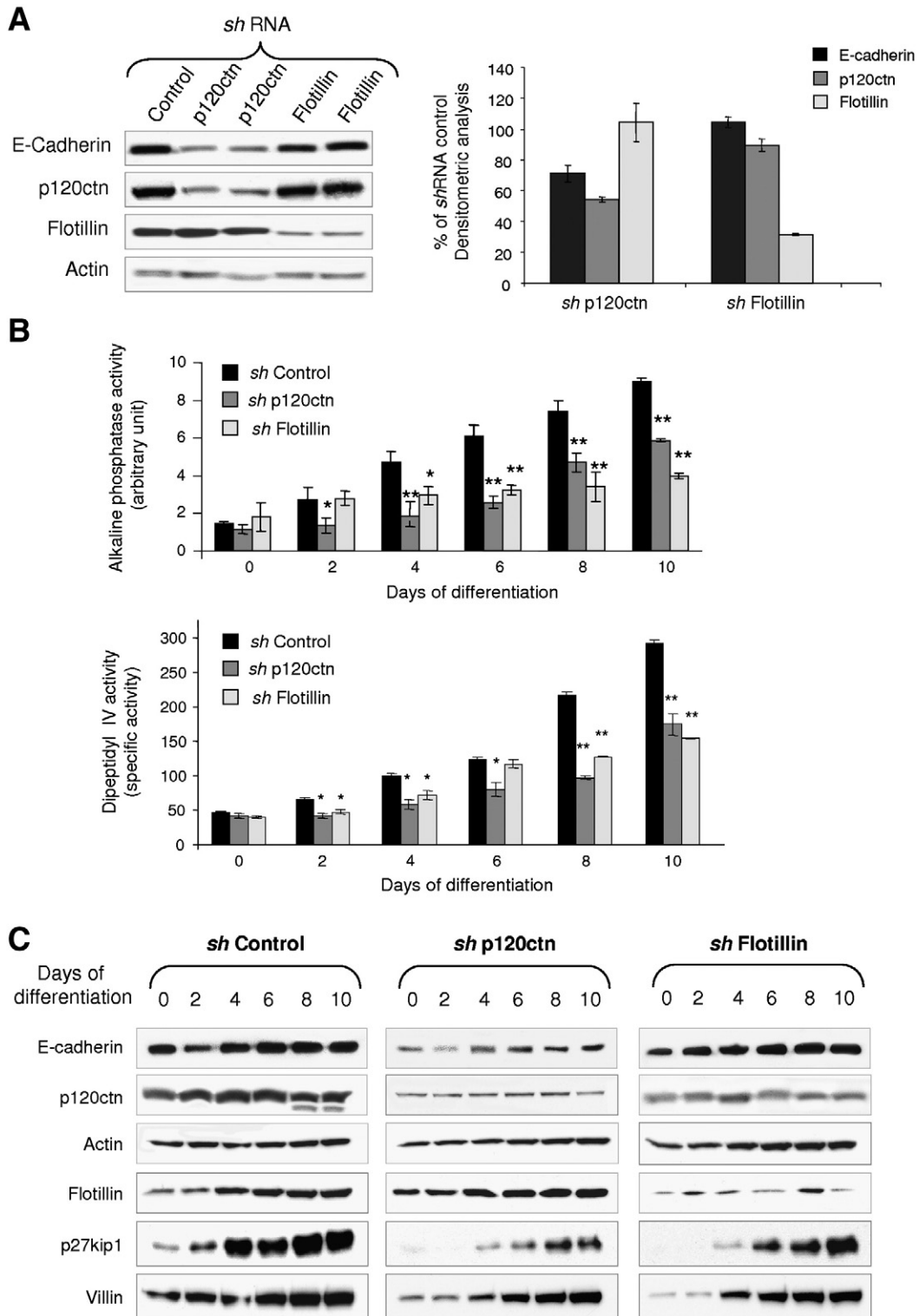


Fig. 4 – Flotillin-1 enriched LR and p120ctn are required for intestinal cell differentiation. (A) Western blots showing E-cadherin, p120ctn, flotillin-1 and actin expression levels in lysates from HT-29 cells stably expressing the indicated shRNA. Histograms represent the percentage of each protein (average of two different shRNA constructs) compared to control shRNA directed against GFP (mean \pm s.e.m. of three independent experiments). (B) Lysates from shRNA treated cells differentiated from 0 to 10 days were assayed for ALP activity or DPPIV activity. Data represent the mean \pm s.e.m. of three independent experiments. *P* values (compared to *Sh* control) are determined by Student's *t*-test and correspond to: **P* value < 0.002 and ***P* value < 0.001 for ALP activity; and **P* value < 0.05 and ***P* value < 0.002 for DPPIV activity. (C) The same lysates were analyzed by western-blot for the expression of the differentiation markers p27kip1, villin and for E-cadherin, p120ctn and flotillin-1.

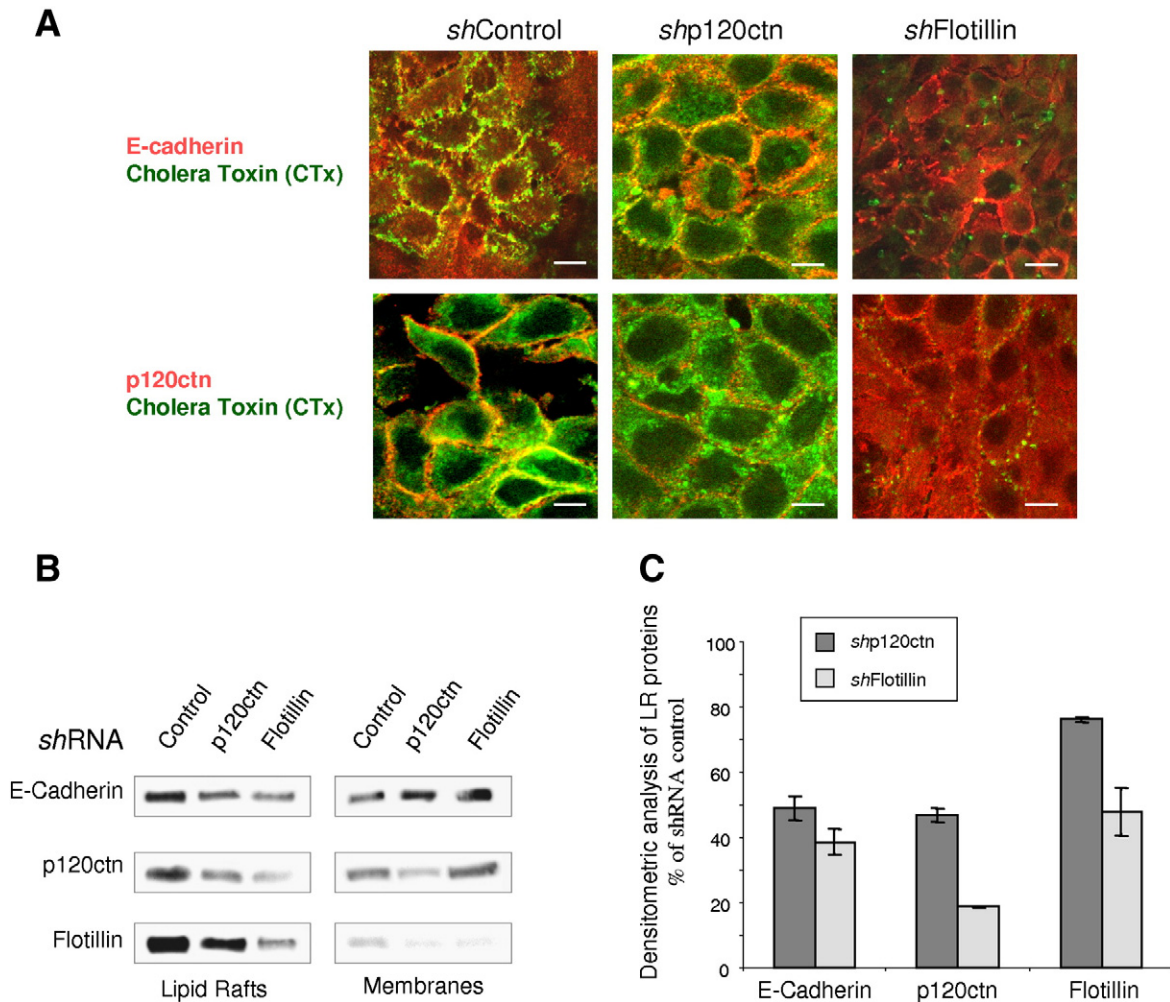


Fig. 5 – Flotillin-1 is required for the recruitment of AJ proteins in LR. (A) Differentiated HT-29 cells treated with shRNA were immunostained for E-cadherin or p120ctn together with FITC-CTx. Bar is 10 μ m. **(B)** Lysates from differentiated HT-29 cells treated with shRNA were fractionated on a sucrose gradient. The levels of E-cadherin, p120ctn and flotillin-1 from LR and membrane fractions were assessed by western blot. **(C)** Histograms representing the percentage of each protein into LR compared to control conditions in the different sh RNA cell lines (mean \pm s.e.m. of three independent experiments).

and E-cadherin were present in LR (fractions 3 to 5) only in control HT-29 cells (Fig. 7C, left panel). Interestingly, the p190RhoGAP, known to interact and regulate AJ stability downstream of Rac1 [37], was also enriched in HT-29 cells LR fractions but not in HT-29 Rac1N17 cells. As down-regulation of Rac1 activity reduced flotillin-1 expression, a process associated to p120ctn and E-cadherin recruitment in LR, we compared the p120ctn and E-cadherin ratios relative to flotillin-1 (Fig. 7C, right panel). Histograms confirmed that p120ctn and E-cadherin recruitment into LR is quantitatively reduced in Rac1N17 by factors 3.7 and 2.8 respectively.

Collectively, our data demonstrate that Rac1-mediated recruitment of p120ctn and E-cadherin in LR is involved in HT-29 cell intestinal differentiation. To further characterize the sequence of events that occurs during enterocytic differentiation of HT-29 cells, we compared the kinetic of Rac1 activity during the first 10 days of differentiation of the different sh HT-29 cell lines by GST-pull-down assays (Fig. 8). In control cells, two peaks of Rac1-GTP were observed at day 0 and day 4 which corresponds to the onset of differentiation

marker expression (Fig. 6B). Similar Rac1 activation was obtained with shControl cells (Fig. 8, upper panel). As expected, a shRNA directed towards flotillin-1 reduces the activation of Rac1 but only during the early steps of differentiation (from 0 to 4 days of differentiation), Rac1 activation being stabilized to a wild-type level at 10 days of differentiation. This result indicates that flotillin-1 is earlier required to activate Rac1. Surprisingly, a shRNA targeting p120ctn leads to an increase in Rac-1 activity, although p120ctn have been documented as a Rac and Cdc-42 activator [12,37] (Fig. 8, lower panel). This discrepancy may be explained by the different isoforms of Rac1 (Rac1 and Rac1b) expressed in HT-29 cells [29]. At the beginning of differentiation, we could only observe Rac1b in HT-29 shp120ctn cells indicating that this isoform represent the only activated form and could compensate the lack of Rac1. In these cells, the reduced expression of p120ctn is effectively correlated with Rac1 down-regulation. Interestingly Rac1 expression appears at day 6 according to the expression of differentiation markers. Altogether, these data suggest that Rac1 activity lies downstream of flotillin-1 and LR emergence.

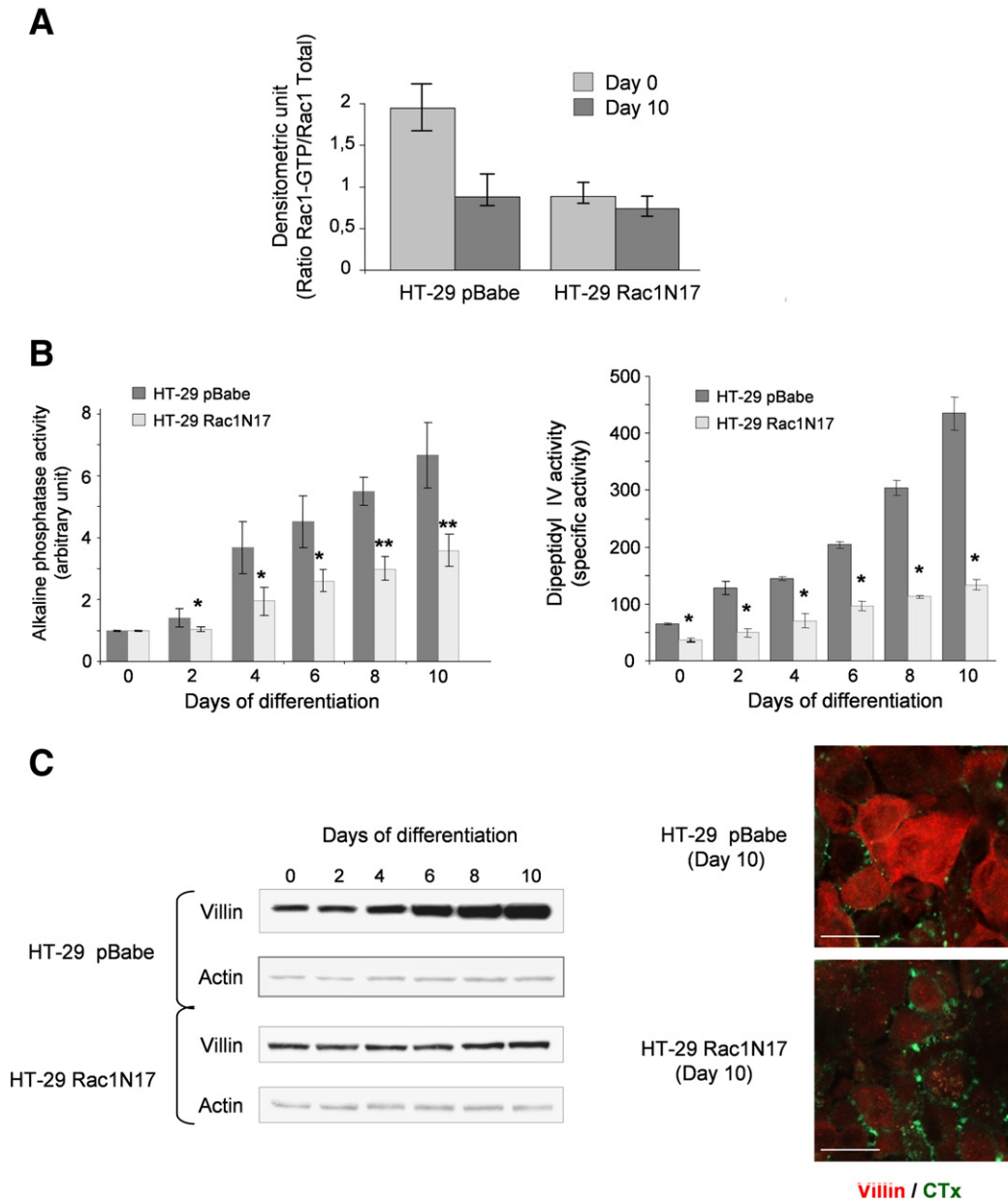


Fig. 6 – Rac1 activity is required for enterocytic differentiation of HT-29 cells. (A) Rac1 activity was assessed in undifferentiated or differentiated HT-29 cells expressing vector alone (HT-29 pBabe cells) or pBabe Rac1N17 construction (HT-29 Rac1N17 cells). Histograms represent the densitometric ratio of active Rac1-GTP/ Rac1 total (mean \pm s.e.m. of three independent experiments). (B) Lysates from HT-29 pBabe cells and HT-29 Rac1N17 cells differentiated from 0 to 10 days were assayed for ALP activity and DPP-IV activity. Data represent the mean \pm s.e.m. of three independent experiments. *P* values (compared to HT-29 pBabe) are determined by Student's *t*-test and correspond to: **P* value < 0.05 and ***P* value < 0.015 for ALP activity; and **P* value < 0.01 for DPP-IV activity. (C) Villin expression was analyzed by western blot in lysates of HT-29 pBabe cells and HT-29 Rac1N17 cells differentiated from 0 to 10 days and by confocal microscopy at 10 days bar is 20 μ m.

Discussion

Clustering of specialized proteins into LR has been described to be associated to several differentiation processes [38]. Our results indicate that HT-29 cell differentiation is associated with the emergence and clustering of LR. LR are known to organize trafficking at the apical brush border of enterocytes [39] and

play a role in the organization of cell adhesion complexes at the basolateral side [40]. This work provides evidences that LR also participate in AJ maturation. We demonstrate that E-cadherin and p120ctn are recruited into LR, which in turn favours p120ctn binding to E-cadherin and maturation of AJ. These results are consistent with work on myoblasts showing that N-cadherin associates with p120ctn specifically in LR at the cell contacts [23]. The recruitment of cadherins in LR may account for their

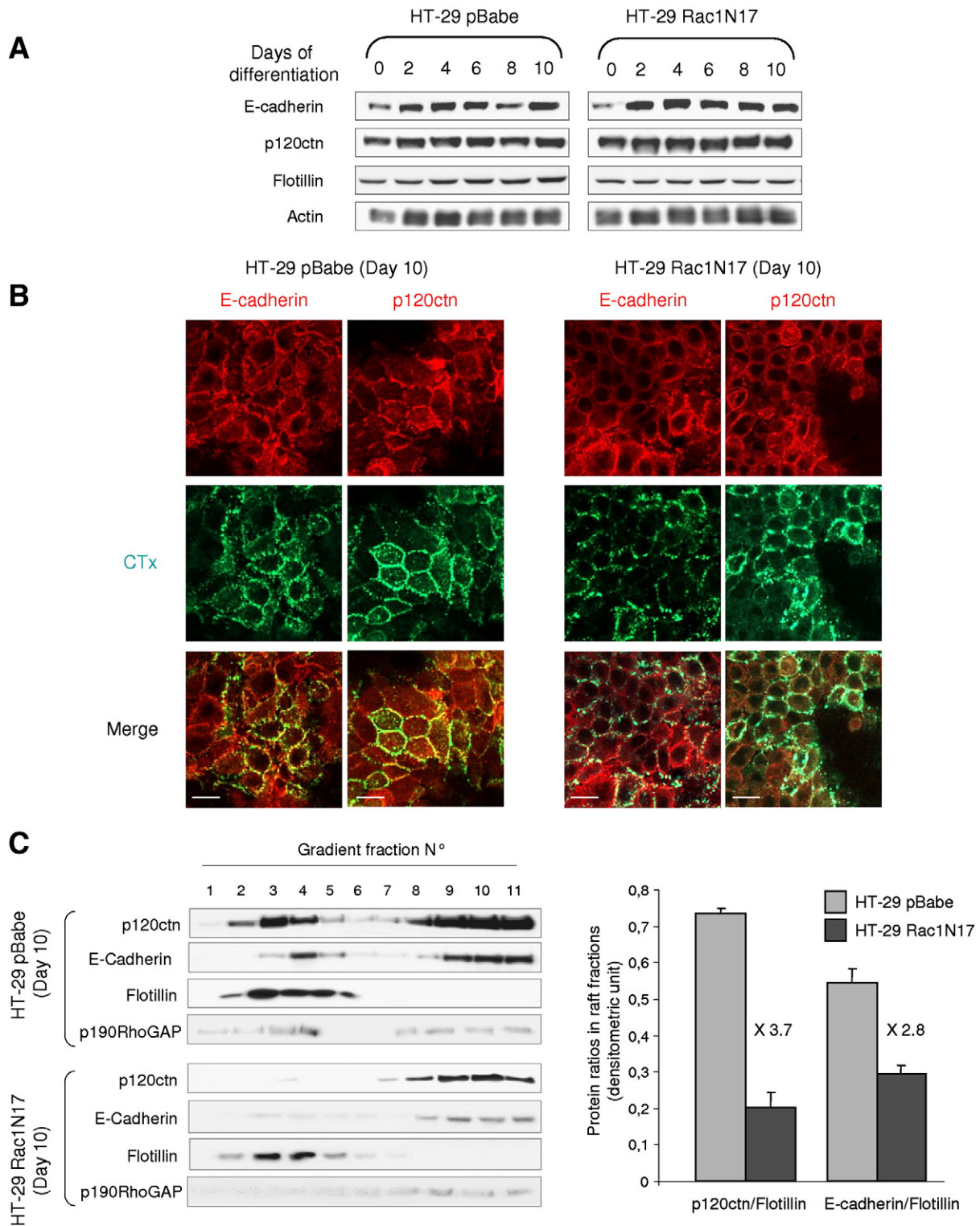


Fig. 7 – Rac1 activity is correlated to E-cadherin/p120ctn complexes recruitment in lipid rafts. (A) E-cadherin, p120ctn, flotillin-1 and actin expressions were assessed by western blot in lysates from HT-29 pBabe and HT-29 Rac1N17 cells differentiated from 0 to 10 days. **(B)** HT-29 cells expressing the pBabe or the pBabe Rac1N17 constructs were allowed to differentiate for 10 days and immunostained for E-cadherin and p120ctn together with FITC-CTx. Bar is 20 μ m. **(C)** Lysates from differentiated HT-29 pBabe or HT-29 Rac1N17 cells were fractionated on a sucrose gradient. The amount of p120ctn, E-cadherin, flotillin-1 and p190RhoGAP in each fraction was assessed by western blot. Histograms represent the ratio of p120ctn or E-cadherin on flotillin-1 in LR fractions (mean \pm s.e.m. of three independent experiments).

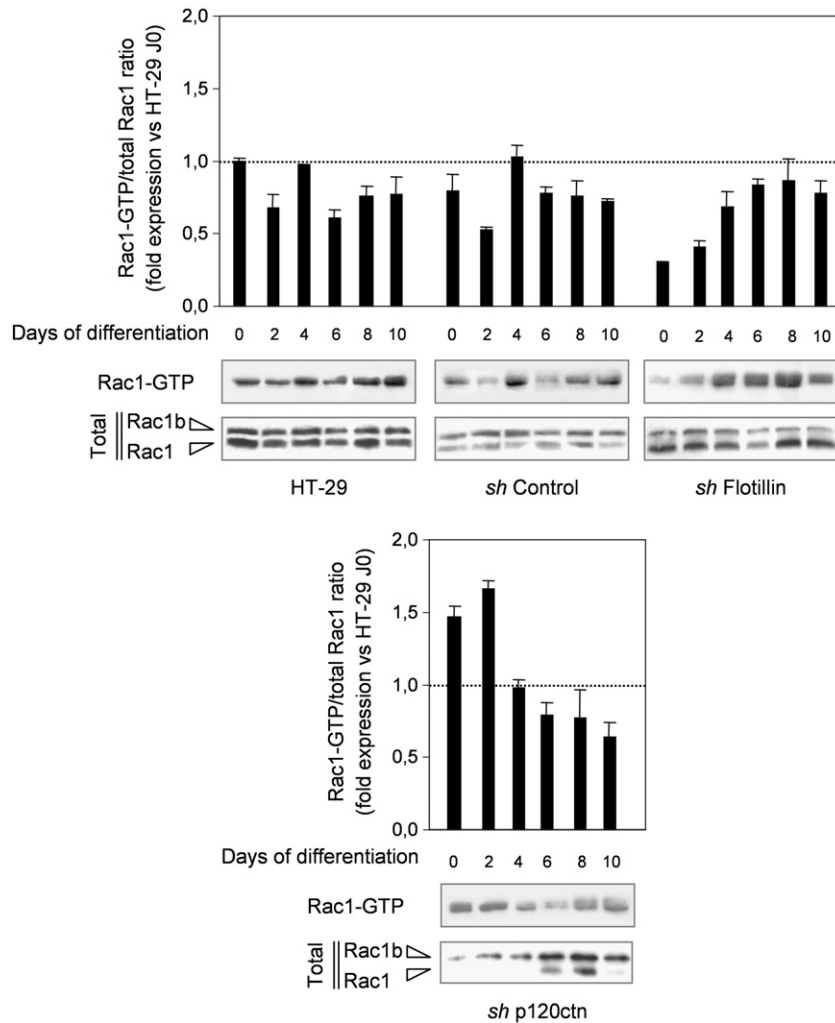


Fig. 8 – Rac1 activity lies downstream of flotillin-1 and LR emergence. Rac1-GTP was precipitated by GST-PAK pulldown from lysates of control and the different sh HT-29 cells allowed differentiating for 10 days. The levels of active and total Rac1 were analyzed by western blot. Histograms on upper panel represent the densitometric ratio of active Rac1-GTP/ Rac1 total (mean \pm s.e.m. of two independent experiments) determined in HT-29 cells, and in shControl and shFlotillin HT-29 cells. All these lines expressed the both isoforms of Rac1. In contrast, shp120ctn expressed mainly Rac1b isoform, we thus described histogram representing the densitometric ratio of active Rac1-GTP/total Rac1b (mean \pm s.e.m. of two independent experiments) (lower panel).

stabilization, but also allows the scaffolding of signalling molecules involved in the dynamic and the function of AJ. The mechanism of cadherin recruitment in LR is still unclear and one can wonder whether immature AJ proteins freely diffuse in the plasma membrane and are stopped in their diffusion in the LR, thereby resulting in local enrichment; or whether these immature AJ are already present in small raft domains that cluster to give rise to larger domains. The gradual patching of GM1 observed at the plasma membrane during HT-29 cell differentiation, argues for the later mechanism. Concomitantly, E-cadherin and p120ctn which are distributed all-around the cell membrane before differentiation become more colocalized with LR, suggesting that these proteins are progressively recruited in growing rafts. The presence of potential Cholesterol recognition/interaction Amino Acid Consensus sequence in the C-terminal region of p120ctn might be involved in the localization of this protein in LR [41]. The recruitment of adhesion molecules into LR could depend on flotillin-1. Indeed, we noticed an up-regulation of flotillin-1 expression during HT-29

cell differentiation which is probably associated with increasing confluence and to the presence of motifs for binding transcription factors involved in cell differentiation in the promoter region of flotillin-1 [42]. Our results show that silencing of flotillin-1 strongly reduces the recruitment of p120ctn and E-cadherin in LR and delays HT-29 cell differentiation, suggesting that blocking the translocation of these molecules in LR alters adhesive complex functionality. The available data on interference with flotillin function during development of zebrafish and imaginal discs in *Drosophila* points to an important role for flotillin in regulating formation of cell-cell contacts during morphogenesis [43]. Emerging evidence suggests that flotillin plays a role in the regulation of actin cytoskeleton organization and enhances the spreading of cells on extracellular matrix-coated surface in a phosphorylation dependent manner [44]. Similarly, a src family kinase dependent phosphorylation of flotillin [45,46] may also regulate the maturation of cell adhesion complexes and their association with the actin cytoskeleton.

Our work also pointed at a major role for Rac1 in LR-mediated intestinal differentiation. Consistent with previous studies demonstrating roles for Rac and Rho in regulating AJ assembly [47,48], we found that an antagonism between the activities of these two GTPases is necessary for E-cadherin dependent cell–cell contacts during HT-29 cell differentiation (supplementary data). RhoA activity is necessary for cell proliferation as it was observed in the intestinal crypt, while inhibition of RhoA activity occurs into differentiating intestinal epithelium [49,50]. The Rho-Rac antagonism observed during AJ assembly could be mediated by the activation of the p190RhoGAP. Rac1 activity causes translocation of p190RhoGAP to AJ, where it couples to cadherin complex via p120ctn and induces a local inhibition of Rho [37]. In intestinal cells this interaction occurs in LR since we found that p190RhoGAP is recruited together with E-cadherin and p120ctn and that Rac1 is necessary for this step. The Rho/Rac antagonism could also be associated to flotillin-1 recruitment in LR: indeed, in neurons the flotillin-mediated recruitment of CAP/ponsin to focal contacts is crucial for the balanced activation of the Rho-GTPases [28]. During HT-29 cell differentiation, early Rac1 activity could favour plasma membrane protrusions and contacts [51,52] and then RhoA activation could increase the actomyosin contractility locally and thereby concentrate cadherin dimmers [53]. Silencing of flotillin-1 altered this initial activation of Rac1, indicating that Rac1 activity lies downstream of flotillin-1 and LR emergence. The second peak of Rac1 activity correlates with E-cadherin and p120ctn recruitment into LR, suggesting that Rac1 activation could favour this process. This hypothesis was confirmed using HT-29 Rac1N17 cells, in which E-cadherin and p120ctn were no longer recruited in LR and failed to colocalize. At this stage, *sh*flotillin-1 did not affect Rac1 activation probably by a compensatory mechanism between the different member of flotillin's family. The fact that Rac1 activation correlates with LR accumulation at the site of AJ suggests a specific signalling of Rac1 at this stage, probably to build mature AJ and to fully differentiate epithelial cells. This is confirmed by the fact that HT-29 Rac1N17 cells show a delay in the emergence of differentiation markers. A similar mechanism has been proposed for cell–matrix adhesion, and is regulated by integrins [54].

Recent report indicates that p120ctn is essential for barrier function and intestinal epithelial homeostasis. P120 conditional KO in mice small intestine and colon is characterized by barrier defects resulting from a selective loss of adherens junctions [55]. Using HT-29 cells silenced for p120ctn we show that p120ctn is required for AJ-associated cell differentiation. In this process, p120ctn may act at different steps: 1) by stabilizing E-cadherin at the plasma membrane and thus contributing to mature AJ able to activate specific intestinal transcription factors [5,6]; 2) by coordinating Rho-GTPases activities. Our results indicate that Rac1 regulates p120ctn recruitment in LR where it could participate in the amplification of Rac1 signalization. Indeed the delayed differentiation observed in *sh*p120ctn cells is similar to the one observed in Rac1N17 cells. The residual differentiation observed in these two models can be attributed to the partial down-regulation of p120ctn /or Rac1 expression and the maintenance of some Rac1 activity.

In conclusion, the LR-dependent association of p120ctn with E-cadherin provides new insight into the crucial role of p120ctn as a “positive regulator” of E-cadherin function in intestinal cell differentiation. Interestingly, E-cadherin and p120ctn expression

has been shown to be down-regulated in inflammatory bowel disease [56]. Furthermore alteration of flotillin-1 expression is observed in TNBS-induced colitis in mice [57]. Thus, modification of LR structure and adherens junctions function would be associated to barrier alteration and inflammation.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.yexcr.2011.03.009.

Conflict of interest statement

The authors disclose no conflicts.

Acknowledgments

We thank Alexandre Chatelain, Alexei Grichine and Brigitte Peyrusse for their expert technical assistance in confocal microscopy and the reprography artwork. Grant support: Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer (Comité de Savoie), Groupement des Entreprises Françaises dans la lutte contre le Cancer and Espoir. N. Chartier and B. Ducarouge were the recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

REFERENCES

- [1] D. Clayburgh, L. Shen, J. Turner, A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease, *Lab. Invest.* 84 (2004) 282–291.
- [2] B.M. Gumbiner, Regulation of cadherin adhesive activity, *J. Cell Biol.* 148 (2000) 399–404.
- [3] M. Perez-Moreno, E. Fuchs, Catenins: keeping cells from getting their signals crossed, *Dev. Cell* 11 (2006) 601–612.
- [4] B.M. Gumbiner, Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 622–634.
- [5] P. Laprise, P. Chailier, M. Houde, J.F. Beaulieu, M.J. Boucher, N. Rivard, Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 8226–8234.
- [6] G. Peignon, S. Thenet, C. Schreider, S. Fouquet, A. Ribeiro, E. Dussaulx, J. Chambaz, P. Cardot, M. Pincon-Raymond, J. Le Beyec, E-cadherin-dependent transcriptional control of apolipoprotein A-IV gene expression in intestinal epithelial cells: a role for the hepatic nuclear factor 4, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 3560–3568.
- [7] J.M. Mariadason, M. Bordonaro, F. Aslam, L. Shi, M. Kuraguchi, A. Velcich, L.H. Augenlicht, Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation, *Cancer Res.* 61 (2001) 3465–3471.
- [8] A.B. Reynolds, R.H. Carnahan, Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer, *Semin. Cell Dev. Biol.* 15 (2004) 657–663.
- [9] M.A. Davis, R.C. Ireton, A.B. Reynolds, A core function for p120-catenin in cadherin turnover, *J. Cell Biol.* 163 (2003) 525–534.
- [10] R.C. Ireton, M.A. Davis, J. van Hengel, D.J. Mariner, K. Barnes, M.A. Thoreson, P.Z. Anastasiadis, L. Matrisian, L.M. Bundy, L. Sealy, B. Gilbert, F. van Roy, A.B. Reynolds, A novel role for p120 catenin in E-cadherin function, *J. Cell Biol.* 159 (2002) 465–476.
- [11] S. Gout, C. Marie, M. Laine, G. Tavernier, M.R. Block, M. Jacquier-Sarlin, Early enterocytic differentiation of HT-29 cells:

- biochemical changes and strength increases of adherens junctions, *Exp. Cell Res.* 299 (2004) 498–510.
- [12] P.Z. Anastasiadis, p120-ctn: a nexus for contextual signaling via Rho GTPases, *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (2007) 34–46.
- [13] Jaffe, in: Hall (Ed.), 2005.
- [14] M. Fukata, K. Kaibuchi, Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell–cell adhesion, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 887–897.
- [15] S. Samarín, A. Nusrat, Regulation of epithelial apical junctional complex by Rho family GTPases, *Front. Biosci.* 14 (2009) 1129–1142.
- [16] V.M. Braga, A. Del Maschio, L. Machesky, E. Dejana, Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context, *Mol. Biol. Cell* 10 (1999) 9–22.
- [17] A.S. Yap, E.M. Kovacs, Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane, *J. Cell Biol.* 160 (2003) 11–16.
- [18] K. Takaiishi, T. Sasaki, H. Kotani, H. Nishioka, Y. Takai, Regulation of cell–cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells, *J. Cell Biol.* 139 (1997) 1047–1059.
- [19] S. Schuck, K. Simons, Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 5955–5964.
- [20] P. Niethammer, M. Delling, V. Sytnyk, A. Dityatev, K. Fukami, M. Schachner, Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neurogenesis, *J. Cell Biol.* 157 (2002) 521–532.
- [21] B. van Deurs, K. Roepstorff, A.M. Hommelgaard, K. Sandvig, Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean, *Trends Cell Biol.* 13 (2003) 92–100.
- [22] A. Nusrat, C.A. Parkos, P. Verkade, C.S. Foley, T.W. Liang, W. Innis-Whitehouse, K.K. Eastburn, J.L. Madara, Tight junctions are membrane microdomains, *J. Cell Sci.* 113 (Pt 10) (2000) 1771–1781.
- [23] N. Taulet, F. Comunale, C. Favard, S. Charrasse, S. Bodin, C. Gauthier-Rouviere, N-cadherin/P120 catenin association at cell–cell contacts occurs in cholesterol-rich membrane domains and is required for rho activation and myogenesis, *J. Biol. Chem.* (2009).
- [24] M.F. Langhorst, A. Reuter, C.A. Stuermer, Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 2228–2240.
- [25] E.V. Vassilieva, A.I. Ivanov, A. Nusrat, Flotillin-1 stabilizes caveolin-1 in intestinal epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379 (2009) 460–465.
- [26] T. Babuke, R. Tikkanen, Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins, *Eur. J. Cell Biol.* 86 (2007) 525–532.
- [27] J. Liu, S.M. Deyoung, M. Zhang, L.H. Dold, A.R. Saltiel, The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 16125–16134.
- [28] M.F. Langhorst, F.A. Jaeger, S. Mueller, L. Sven Hartmann, G. Luxenhofer, C.A. Stuermer, Reggies/flotillins regulate cytoskeletal remodeling during neuronal differentiation via CAP/ponsin and Rho GTPases, *Eur. J. Cell Biol.* 87 (2008) 921–931.
- [29] N.T. Chartier, M. Laine, S. Gout, G. Pawlak, C.A. Marie, P. Matos, M.R. Block, M.R. Jacquier-Sarlin, Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 31–46.
- [30] E.E. Sander, S. van Delft, J.P. ten Klooster, T. Reid, R.A. van der Kammen, F. Michiels, J.G. Collard, Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell–cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 1385–1398.
- [31] B. Stieger, A. Marxer, H.P. Hauri, Isolation of brush-border membranes from rat and rabbit colonocytes: is alkaline phosphatase a marker enzyme? *J. Membr. Biol.* 91 (1986) 19–31.
- [32] E.A. Merritt, S. Sarfaty, F. van den Akker, C. L'Hoir, J.A. Martial, W.G. Hol, Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide, *Protein Sci.* 3 (1994) 166–175.
- [33] E.J. Smart, R.G. Anderson, Alterations in membrane cholesterol that affect structure and function of caveolae, *Meth. Enzymol.* 353 (2002) 131–139.
- [34] A.P. Kowalczyk, A.B. Reynolds, Protecting your tail: regulation of cadherin degradation by p120-catenin, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (2004) 522–527.
- [35] A. Quaroni, J.Q. Tian, P. Seth, C. Ap Rhys, p27(Kip1) is an inducer of intestinal epithelial cell differentiation, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279 (2000) C1045–C1057.
- [36] M. Betson, E. Lozano, J. Zhang, V.M. Braga, Rac activation upon cell–cell contact formation is dependent on signaling from the epidermal growth factor receptor, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 36962–36969.
- [37] G.A. Wildenberg, M.R. Dohn, R.H. Carnahan, M.A. Davis, N.A. Lobdell, J. Settleman, A.B. Reynolds, p120-Catenin and p190RhoGAP regulate cell–cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho, *Cell* 127 (2006) 1027–1039.
- [38] M.M. Moreno-Altamirano, I. Aguilar-Carmona, F.J. Sanchez-Garcia, Expression of GM1, a marker of lipid rafts, defines two subsets of human monocytes with differential endocytic capacity and lipopolysaccharide responsiveness, *Immunology* 120 (2007) 536–543.
- [39] E.M. Danielsen, G.H. Hansen, Lipid rafts in epithelial brush borders: atypical membrane microdomains with specialized functions, *Biochim. Biophys. Acta* 1617 (2003) 1–9.
- [40] T.J. Harris, C.H. Siu, Reciprocal raft-receptor interactions and the assembly of adhesion complexes, *Bioessays* 24 (2002) 996–1003.
- [41] R.M. Epand, Proteins and cholesterol-rich domains, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 1576–1582.
- [42] P.P. Lopez-Casas, J. del Mazo, Regulation of flotillin-1 in the establishment of NIH-3T3 cell–cell interactions, *FEBS Lett.* 555 (2003) 223–228.
- [43] M. Hoehne, H.G. de Couet, C.A. Stuermer, K.F. Fischbach, Loss- and gain-of-function analysis of the lipid raft proteins Reggie/Flotillin in *Drosophila*: they are posttranslationally regulated, and misexpression interferes with wing and eye development, *Mol. Cell. Neurosci.* 30 (2005) 326–338.
- [44] C. Neumann-Giesen, I. Fernow, M. Amaddii, R. Tikkanen, Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton, *J. Cell Sci.* 120 (2007) 395–406.
- [45] T. Roitbak, Z. Surviladze, R. Tikkanen, A. Wandinger-Ness, A polycystin multiprotein complex constitutes a cholesterol-containing signalling microdomain in human kidney epithelia, *Biochem. J.* 392 (2005) 29–38.
- [46] C.A. Stuermer, D.M. Lang, F. Kirsch, M. Wiechers, S.O. Deininger, H. Plattner, Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2, *Mol. Biol. Cell* 12 (2001) 3031–3045.
- [47] V.M. Braga, M. Betson, X. Li, N. Lamarque-Vane, Activation of the small GTPase Rac is sufficient to disrupt cadherin-dependent cell–cell adhesion in normal human keratinocytes, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 3703–3721.
- [48] F. Comunale, M. Causeret, C. Favard, J. Cau, N. Taulet, S. Charrasse, C. Gauthier-Rouviere, Rac1 and RhoA GTPases have antagonistic functions during N-cadherin-dependent cell–cell contact formation in C2C12 myoblasts, *Biol. Cell* 99 (2007) 503–517.
- [49] Y.D. Benoit, C. Lussier, P.A. Ducharme, S. Sivret, L.M. Schnapp, N. Basora, J.F. Beaulieu, Integrin alpha8beta1 regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells via a predominant RhoA/ROCK dependent mechanism, *Biol. Cell* (2009).
- [50] L.P. Pageot, N. Perreault, N. Basora, C. Francoeur, P. Magny, J.F. Beaulieu, Human cell models to study small intestinal functions:

- recapitulation of the crypt–villus axis, *Microsc. Res. Tech.* 49 (2000) 394–406.
- [51] J.S. Ehrlich, M.D. Hansen, W.J. Nelson, Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell–cell adhesion, *Dev. Cell* 3 (2002) 259–270.
- [52] E.M. Kovacs, R.G. Ali, A.J. McCormack, A.S. Yap, E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6708–6718.
- [53] A.M. Shewan, M. Maddugoda, A. Kraemer, S.J. Stehbens, S. Verma, E.M. Kovacs, A.S. Yap, Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell–cell contacts, *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 4531–4542.
- [54] M.A. del Pozo, N.B. Alderson, W.B. Kiosses, H.H. Chiang, R.G. Anderson, M.A. Schwartz, Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains, *Science* 303 (2004) 839–842.
- [55] W. Smalley-Freed, A. Efimov, P. Burnett, S. Short, M. Davis, D. Gumucio, M. Washington, R. Coffey, A. Reynolds, p120-catenin is essential for maintenance of barrier function and intestinal homeostasis in mice, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 1824–1835.
- [56] A.J. Karayiannakis, K.N. Syrigos, J. Efstathiou, A. Valizadeh, M. Noda, R.J. Playford, W. Kmiot, M. Pignatelli, Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease, *J. Pathol.* 185 (1998) 413–418.
- [57] Q. Li, Q. Zhang, M. Zhang, C. Wang, Z. Zhu, N. Li, J. Li, Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on membrane microdomain localization of tight junction proteins in experimental colitis, *FEBS J.* 275 (2008) 411–420.

Travail de systèse sur l'implication du système
CRFergique intestinal dans la
physiopathologie du stress, de l'inflammation
et des cancers colorectaux

Stress neuromediators are key regulators of the intestinal barrier: Link to inflammation and cancer

B. Ducarouge^{1,2} and M. R. Jacquier-Sarlin^{1,2,*}

¹Centre de Recherche Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Equipe du Stress et des Interactions Neurodigestives, Site Santé BP 170 La Tronche, F-38042 Grenoble Cedex 9,

²Université de Grenoble, F-38000 Grenoble, France

ABSTRACT

In the past year, the influence of psychosocial and environmental stressors in different pathogenesis received increased awareness. The brain is the master manager of the interpretation of what is stressful and of the physiological responses that are produced. Animals have developed conserved strategies to respond to stressful conditions, in particular, the secretion of stress-specific neuromediators which mediate protective and adaptative effects in the short run and yet can accelerate pathophysiology when they are over-produced or mis-managed. The Cortico-Releasing Factor (CRF) and their derived peptides are the majors stress neuromediators. Their localization has originally been described in the central nervous system where they play a pivotal role to activate the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and was recently extended to the periphery. While the peripheral effects of CRF signalling need to be more thoroughly investigated, it has been described to influence disease negatively, in particular in the intestine. The epithelial barrier is a crucial checkpoint to control body entrances. Prolonged exposure to stress can cause ultra-structural epithelial abnormalities and can increase barrier permeability, which favors luminal translocation, immune activation and thus induces inflammation. This review summarizes the present

knowledge on the stress response and the effects of both acute and chronic stress to induce pathological damage to the intestine. We present the potential pathways involved, and the proposed mechanisms of action, mediating these effects. The CRF system is potentially useful as a diagnostic marker or a therapy target for inflammatory diseases and cancer.

KEYWORDS: stress, CRF, inflammation, cancer, intestinal epithelial barrier

INTRODUCTION

In medical language the concept of “Stress” has been introduced by Hans Selye (1907-1982) [1]. In response to various stressors, living organisms have developed adaptative behaviors and coping strategies in order to maintain their homoeostasis. Stress is a complex process that involves the endocrine, immune and nervous systems. Altogether, they communicate by the production of mediators (hormones, cytokines, neuromediators) which target their specific receptors. “Cognitive stress” (from the central nervous system activity) such as psychological and emotional events is distinguished from the “non cognitive stress” induced by physical damage, infection or inflammation, although some “non cognitive stress” may be relayed by the nervous system especially via the vagal afferences (Figure 1). The stress is also characterized by various parameters such as duration, frequency (acute versus chronic stress) and intensity. Chronic or recurrent stress results in

*To whom correspondence should be addressed
jacquier-sarlin@ujf-grenoble.fr

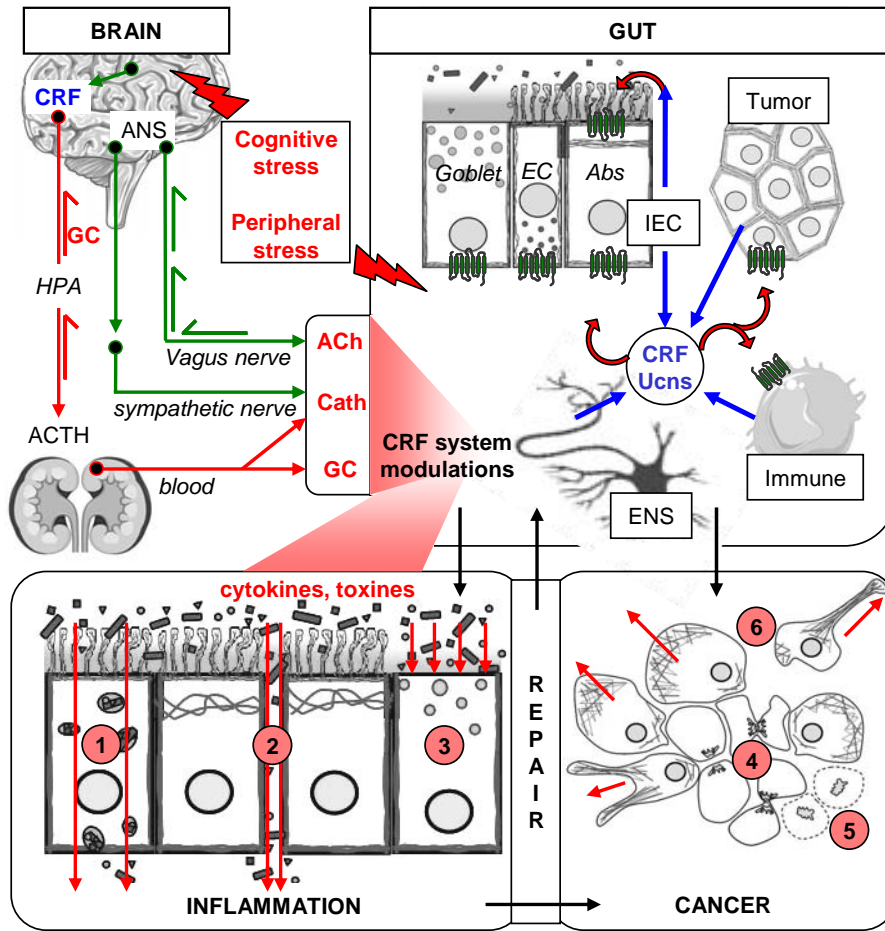


Figure 1

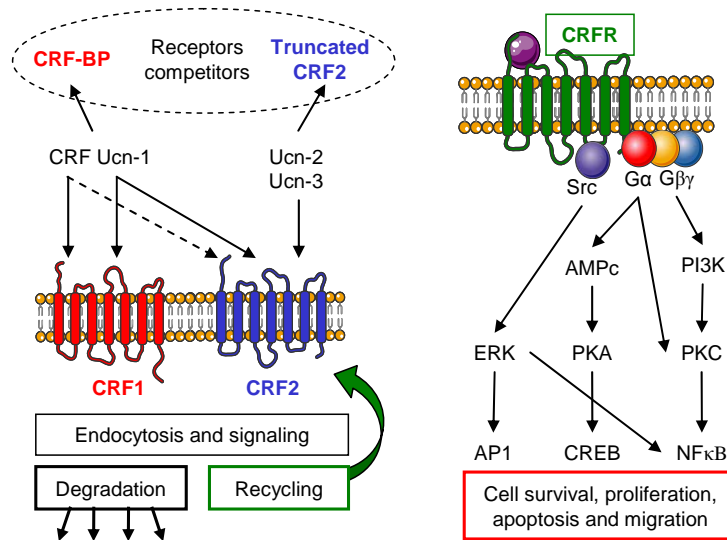


Figure 2

an increased demand of physiological systems (cardiac, immune, metabolic, hormonal...) that can lead to diseases and contribute to wear and tear on the body, a condition known as “allostatic load” [2].

According to the community of pathways used and processes generated, mediators and receptors used, stress of various nature leads to convergent effects. Indeed, whatever the nature of the stress, the main adaptative response is mediated by the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis with a central role of the neurohormone, the corticotrophin-releasing factor (CRF). This stress response begins with the hypothalamic production of CRF which in turn, induces the production and release of adrenocorticotrophic hormone (ACTH). Pituitary-derived ACTH stimulates adrenocortical production of glucocorticoids (GC) which counteract the effect of stressors, suppress the immune system, and attenuate the functional activity of HPA axis via feedback inhibition of the hypothalamic CRF expression [3, 4] (Figure 1). However, the brain is not the only centre of information and decisions: the interactions between the different systems also occur at a local level in some organs such as the

skin, the heart and the digestive tract. They are particularly described in the brain-gut axis, which also contributes to manage the stress in the intestine using the same mediators and signalling pathways in reciprocity to the brain.

Stress and pathologies

In the past ten years, the influence of psychological and environmental stressors on pathogenesis such as obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes, as well as pain and chronic fatigue syndromes, received increased awareness [5]. Furthermore, a large number of skin diseases, including atopic dermatitis and psoriasis, appear to be triggered or exacerbated by psychological stress [6]. They are also often associated with a perturbation of the cutaneous homeostatic permeability barrier [7]. Stress is recognized to participate in the development and/or aggravation of gastrointestinal (GI) disorders, such as inflammatory bowel diseases (IBD) and irritable bowel syndrome (IBS) despite differences in their etiologies [8-12]. IBD which includes Chron's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), consist of a measurable over-inflammatory response leading

Legend to Figure 1. Involvement of the CRF system in stress, inflammation and cancer.

Brain-gut communications are exerted via the ANS regrouping vagal and sympathetic nerves, and the HPA axis. The cognitive stress induces both HPA activation and ANS modulations, which respectively lead to GC and catecholamins (Cath) release into the blood, and liberation into the gut of Ach and Cath. A GC feedback regulates the central activation of the HPA by inhibiting the hypothalamic CRF production. The brain perceives both cognitive stress and peripheral stress by the activation of the vagal afferences from the gut. ACh, Cath and GC all regulate the intestinal expression of CRF receptors and ligands from IEC, immune cells and neurons from ENS. However the CRF system may act as a paracrine/autocrine system. CRF signalling could drive the inflammation related to the intestinal barrier opening by the control of: **1.** the trans-cellular permeability, **2.** the para-cellular permeability and **3.** the reduced mucus secretion. The inflammatory processes could in turn affect the CRF system expression by the production of cytokines and toxins. Acute and chronic stresses could also induce epithelial barrier dysfunctions which may contribute to inflammation. The epithelial barrier repair brings back to healthy conditions, but in the chronic inflammation this continual regeneration is a substrate for the development of cancer. Tumor cells express some CRF system components, which could participate to the cancer progression by affecting the cell-cell junctions and cytoskeleton organisation. Thus CRF signalling may affect: **4.** cell proliferation, **5.** cell apoptosis and **6.** cell migration and invasion.

Legend to Figure 2. The CRF system and receptor signalling.

Left panel: CRF and Ucn1 could activate the CRF1 and the CRF2 with a lower affinity for the CRF, whereas the Ucn2 and Ucn3 bind exclusively the CRF2. These ligand/receptor interactions are challenged by a competition with the CRF-BP, or soluble truncated forms of the receptors. The activated receptors are endocytosed and further either degraded or recycled to the cell membrane. *Right panel:* CRF receptors downstream signalling are linked to the GPCR Gαβγ activity and the Src kinase which interact with their cytoplasmic domains. Thus, numerous intra-cellular proteins could regulate cell processes like survival, proliferation, apoptosis, or migration.

to gut damage [13]. Many *in vitro* and *in vivo* studies indicate that stress-related alterations of GI functions are mediated by both brain and peripheral CRF signalling pathways (for review see [14]). While the expression pattern of CRF receptors and ligands in the GI tract have been extensively described (for review see [15]), the cellular and molecular mechanisms of their interactions are still poorly understood and principally focused on the neuronal CRF signalling influence on the immune response in the GI tract (for review [16]). Using data from clinical and basic research literature, the objectives of this review are to summarize evidence in support of a major role of stress and CRF signalling in the induction and progression of inflammatory intestinal disorders with a special emphasis on the intestinal barrier alteration. We also discuss the implication of CRF system in the colorectal cancer (CRC) initiation and progression.

The CRF system: Signalling and expression in the epithelium

An overview of the CRF system

In mammals, the CRF family (including urocortins, Ucn) is composed of 38 to 41aa peptides called CRF or urocortins (Ucn) such as Ucn1, Ucn2 and Ucn3. CRF and Ucn1 were first characterized for their ability to control ACTH secretion from anterior pituitary cells [3, 17], and hence play a pivotal role in the stress response by regulating the HPA axis. Later, DNA analysis has identified Ucn2 and Ucn3 by sequence homologies [18, 19]. Other orthologs have also been described, like the Urotensin1 [20] in fish or the sauvagine in frogs [21, 22]. Phylogenetic analyses indicated that CRF-like peptides are well conserved through the evolution and derived from a common stem involved in osmo-regulation as an ancestral stress adaptation, neuro-endocrine system [23-25]. Like many hormones, these peptides are derived from precursor proteins [26, 27] and their bioactivities are modulated by the secreted CRF-binding protein (CRF-BP) or soluble splice variants of their receptors [28-32] (Figure 2).

These polypeptides exert their activities through the activation of two known class II G Protein Coupled Receptors (GPCR), CRF1 [33] and CRF2 [34]. While CRF receptors arise from the

transcription of two different genes they share about 70% homology, but differ by their N-terminal ligand binding domains [35, 36]. CRF recognizes both receptors, but displays a higher affinity for CRF1. Ucn1 activates CRF1 and CRF2 with the same potency, whereas Ucn2 and Ucn3 exclusively bind to CRF2 [37, 38]. CRF receptors are subjected to additional modifications consisting of splicing regulation and glycosylation [39]. Several CRF1 splice variants classified from CRF1a to CRF1h were identified at the mRNA level but there is little knowledge about their protein expression and functionality within the different tissues. Except for CRF1a, these variants display low ligand affinity or are unable to induce intracellular signalling: they have been suggested to exert regulatory functions by titrating free ligands [40-43]. Recently, a novel functional isoform CRF1i has been identified in the BON cell line, which is also expressed in human ileum [44]. CRF2 undergoes three distinct functional forms: CRF2a, CRF2b and CRF2c, which consist of an alternative transcription start a, c versus b and alternative splicing between a and c, only detected in humans [45, 46]. This results in the modification of the N-terminus, involved in the ligands' affinity [47]. Several dysfunctional CRF2 forms have also been described, in particular soluble truncated forms. First, they have been proposed as ligand scavengers which are in competition with membrane expressed receptors for free ligands [48]. However recent studies found that despite its correct translation, the variant of CRF2a is not secreted. This protein may regulate the CRF2 signalling by altering the transcription of full-length CRF2a mRNA [49, 50]. Similarly, a dominant-negative CRF2b splice variant has been described in mouse heart, to impair mCRF2b function by retaining its cellular location to the endoplasmic reticulum-golgi sites [51]. There is also some variability in the molecular weight observed by western blot analysis for these receptors depending on tissue, cell type and species. These differences are often due to the splicing, the antibodies used, or the glycosylation status of CRF receptors [52, 53] according to the five potential sites of N-glycosylation identified in the primary structure [39]. However CRF1 activity has been described to be regulated by inflammation [39] which also

influences the glycosylation status of proteins [54]. Together these studies indicate that the CRF system is finely tuned by different regulatory pathways at the receptor and ligand levels.

CRF signaling

CRF signalling has been studied in many cell lines and tissues including the Central Nervous System (CNS) and the periphery. It appears that the binding of ligands give rise to structural arrangements of CRF receptors that increase the affinity of their third intracellular loop for the $G\alpha$ subunits which become activated. CRF receptors are primarily coupled to $G_{\alpha s}$ and trigger cAMP formation via adenylyl cyclase activation [55] (Figure 2). However they could in few cases bind to $G_{\alpha q}$, i , o , z and involve other signalling pathways like Phospholipase C (PLC) [56-59]. $G\beta\gamma$ subunits are also able to mobilize intracellular pathways like PI3K/Akt and Ca^{2+} flux but their involvements in CRF signalling are poorly investigated. Thus, depending on the $G\alpha$ subtype recruited and on the cell type, CRF receptors are able to transduce plethora of intracellular signalisations, such as Protein Kinase A, B, C (PKA, PKB, PKC), P42/p44, p38 Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) Ca^{2+} flux, NOS activation Fas-ligand, and NF κ b [60]. Recently novel downstream G protein-independent pathways have been described for the CRF receptors like Src which directly interacts with the endocytosed CRF receptors and takes part in the activation of ERK 1/2 [56, 61, 62].

Like other GPCR, CRF receptors expression and function are regulated by a desensitizing process. Moreover, the recruitment of G protein-coupled receptor kinase GRK3 and GRK6 by the activated receptor leads to the phosphorylation of its C-terminus and β -arrestin binding [40, 63]. All of these events are involved in the internalization of the receptor which can subsequently be degraded in the endo-lysosomal path, or recycling to the membrane. If both receptors are subjected to internalization after ligand binding, it seems that the time course of desensitization could be different depending on the cell model and the receptor sub-type [64, 65]. Sequences analyses also report multiple phosphorylation sites for either PKA or PKC, which can regulate CRF receptor function [40, 66]. However, the use of

specific mutants, truncated forms or PKA inhibitors showed that these modifications are not required for the receptor internalization [65].

Distribution of CRF receptors and peptides through the intestinal mucosa

The CRF system was first characterized in the CNS for its implication in the brain response and adaptation to stress as well as in food intake [67, 68] and psychiatric disorders [69, 70]. Later, CRF receptors and their ligands have been identified in peripheral tissues like digestive tract (for review [15]), cardiovascular, immune, reproductive systems or skin [71]. There is a growing number of studies interested in CRF receptor expression and localization in the gut but the emerging features are often heterogeneous and incomplete. This can be explained by the CRF receptor isoforms, species and antibodies recognition, as mentioned previously [72]. It could also be due to the disparity in global and cell type expression between the different sections of the digestive tract [73]. According to our interest in the regulatory role of CRF system on the epithelial barrier, in this section, we will focus on what is known on epithelial cells (EC), lamina propria (LP) cells and on the enteric nervous system (ENS), at the small intestine and colonic levels (Figure 3). Indeed, the LP contains innate immune cells which participate in the primary response to intestinal homeostasis perturbations.

Expression of CRF receptors and ligands in the small intestine

In contrast to the colon, the expression and distribution of CRF receptors and their related peptides in the ileum have been poorly investigated in rodents and humans. In mouse, only one study has reported the expression of CRF1 mRNA and at low levels CRF2 mRNA in LP and EC in the ileum [74]. CRF2 mRNA was found in mucosa and at the base of villi in the duodenum [75]. Both CRF receptors have been principally detected in neuronal myenteric plexus (NMP) and neuronal submucous plexus (SNP) in guinea pigs and rats [73, 76, 77]. Their expression can also be observed in muscle layers of rats, however with opposite patterns depending on the region considered duodenal versus ileal. Lastly, CRF2 expression was found in enteric neurons and nerve fibers, in

	Small intestine						Colon					
	CRF1	CRF2	CRF	Ucn1	Ucn2	Ucn3	CRF1	CRF2	CRF	Ucn1	Ucn2	Ucn3
Epithelium	m	h/m/r	m/r	r	h/m/r	h	m/o/r	h/r	h/r	h	h/m/r	h
Enterocyte								h				
Goblet							h/o/r					
Endocrine		r	r						h/r			h
Paneth			r									
Lamina propria	m	h/r	r/m		r		h/o/r	h/o/r		r	r	h
Macrophage	h	h/m/r					h	h/r	h	h		
Mastocyte		h/r					h	h/r	h			
ENS	g/r	g/r	g/r	r	r		g/h/o/r	g/h/o/r	g/r	h/r	r	h
Vascular					r			h/r		h	m/r	h
Smooth muscles	r	r					o	o			r	h
Inflammation								h/r	h	r	h/r	
CD / TNBS							h	h	h	h	h	
UC / DSS							m	h/m	m/r	h	h/m	
Other	m	h/m	m/r		m/r		m	h/m	m/r	h	h/m	
Cancer								h			h	h

Figure 3. Distribution of CRF receptors and ligands in human and rodent colon and ileum. ENS: enteric nervous system, CD: Crohn disease, UC: ulcerative colitis, g: guinea pig, h: human, m: mouse, o: ovine, r: rat.

the duodenal glands [78] and in 5-HT negative EC in the villi [77]. Interestingly, the expression of CRF1 is complementary to that of CRF peptides suggesting that neurons are a potential target for CRF signalling [79].

CRF immunoreactivity was detected in MNP and SNP of the ileum and the duodenum in guinea-pigs as well as in rats [80]. CRF mRNA was also located at low levels in LP cells, Paneth cells and endocrine cells in the crypts of rat ileum, but not in enterocytes [80, 81]. Only one report describes CRF expression in LP and in a few EC of mouse ileum at both mRNA and protein levels [74]. The expression of Ucn in the ileum has been principally investigated in rat tissue. Ucn1 proteins and transcripts were found in both enteric plexuses [82, 83]. Ucn2 mRNA has been described in rat and to a lesser extent in mouse small intestine [73, 84]. In rat, Ucn2 was detected in the epithelium, LP and enteric plexuses. In human, Ucn2 was

absent, while Ucn3 was detected in the *Muscularis mucosae* [85].

Expression of CRF receptors and ligands in the colon

Both CRF receptors have been detected at the gene and/or protein levels in human and rodent colons (Figure 3). Some reports mentioned that CRF1 is unexpressed in human IEC of the colon, neither at the mRNA level on total purified EC, nor with tissue immunolocalization [86, 87]. Nevertheless, CRF1 transcripts have been detected in colonic sections from healthy adults and a CRF1 positive staining can be observed in LP cells (macrophages and mast cells), as well as in both enteric plexuses [88]. LP macrophages and mast cells from ileum and colon also express CRF2 receptors in humans [86, 89] and rats [73]. The mast cell leukaemia-derived cell line HMC-1 also expresses CRF1 and CRF2a specific mRNA isoforms and provides a useful model to study

in vitro mastocyte-epithelial interactions [87, 90]. In rodents, CRF1 expression especially concerns neural plexuses. However regional differences were observed between species. In guinea pigs, the signal is more important in the SNP than in the MNP, whereas the opposite is observed in rats [78, 88, 91]. Non-neuronal expression of CRF1 has been reported in some LP cells and in IEC located at the base of rat colon crypts, which also contain stem cells [78]. Other experiments depict a protein expression in the whole crypts of rat proximal colons, which disappears distally, and mRNA is also described in the IEC of the mice ileum [74, 92, 93]. In ovines, CRF1 is expressed at the baso-lateral membrane in the IEC of the colon, during the foetus maturation but there are no data whether it's still present in young and adults [72].

The presence of CRF2 in IEC, at a basal level is quite controversial in terms of expression and localization. CRF2a mRNA or protein expression have been identified in human and rat IEC and in the epithelial derived carcinoma cell lines HT-29 or in the untransformed NCM460 [86, 89, 93-95]. However, in other studies, CRF2 has not been detected in rat, human or foetal ovine IEC [72, 73, 87, 92]. The CRF2 subcellular localization differs in EC, depending on the studies or species. While CRF2 immunostaining is apical in rats, localized in the luminal surface of the crypts, it seems to be localized on the baso-lateral membrane in humans [78, 95]. The real localization of this receptor is very important to understand its role in the direct regulation of epithelial barrier functions. Therefore, baso-lateral expression would signify that EC could be exposed to autocrine/paracrine activation, while apical expression would be restricted to autocrine stimulation or activation by luminal circulating ligands. Enterochromaffin cells, which are inserted within the epithelium, do not express CRF2 but CRF1 in humans and ovines [72, 89]. Both receptors have been identified in BON cells, a pancreatic carcinoid-derived human endocrine cell line, which shares functional similarities with intestinal enterochromaffin cells [96].

The quasi ubiquitous expression of the CRF receptors in these cell populations of the digestive wall reinforces the involvement of the CRF system in the immunomodulation response. The micro

vasculature of the intestine plays an important role in the delivery of proinflammatory cytokines and the regulation of immune cells. There is a strong expression of CRF2 in endothelium and smooth muscles from the human colon vasculature [89, 97]. Identical patterns are found in rats with no CRF1 [78].

To date, CRF, Ucn1 and Ucn3 but not Ucn2 were detected in human colons. While CRF was found in the mucosa, in monocytes and IEC, mainly in enterochromaffin cells [98, 99], Ucn1 (protein and mRNA) was present in LP macrophages with a few amount in enterochromaffin cells [86, 100, 101]. Ucn3 expression is more heterogenous, since protein and mRNA were found in both enteric plexuses, smooth muscle, endothelium, enterochromaffin cells as well as in enteric glial cells [89, 102]. In rodents, there is no data available on Ucn3 expression, to date. Expression of CRF is predominantly neuronal with an immunoreactivity observed in both enteric plexuses, and in nerve fibers located in mucosal projections and submucosa ganglia and in the circular muscle layer [81, 88, 103]. Non-neuronal expression of CRF in rats was controversial, and was detected in enterochromaffin cells [81]. Expression of Ucn1 is higher than of CRF and was observed in rat enteric nervous plexuses and co-localized with CRF1 receptors [83, 91]. In contrast, mucosal expression of Ucn1 has been detected in very few cells [82]. Ucn2 protein was identified in mucosal and submucosal layers of rat colon in IEC, LP immune cells and enteric neurons [73, 84, 102].

Altogether these studies indicate that the intestine is a target for stress signalling. Most of the studies show that ligands are expressed in close proximity of the CRF receptors, indicating the existence of local autocrine/paracrine regulatory loops. However, stress ligands produced by enteric neurons could contribute to endocrine regulation. So whatever the nature of this regulation, different loops could be established (Figure 1). For example, neuronal activation following stress may regulate expression of stress-ligand and receptors in IEC and their function, directly according to the close proximity of enteric neurones and these cells [104] as well as indirectly after LP immune cell stimulation. Indeed, Wallon *et al.* have shown that the release

of CRF by eosinophils following the activation of muscarinic receptors can activate mast cells and leads to colonic mucosal barrier dysfunction in patients with UC or in epithelial T84 cells [105]. Immune cells may also regulate CRF signalling on IEC, independently of neurones after infection. Finally, IEC may produce ligands which may regulate epithelial barrier function by an autocrine way. We found that rat IEC from the duodenum to the colon as well as human adenocarcinoma cells were able to produce CRF and Ucn1 (personal data).

Regulation of the CRF system by stress and inflammation

Cumulative studies suggest that stress, whatever its origin, either interoceptive (infection, inflammation) or exteroceptive (psychological or physical stress), modulates the expression of stress signalling molecules in the GI tract as it was observed for the brain.

Regulation by stress

During stressful conditions, brain perception is communicated to the periphery partially via the HPA axis that rapidly produces GC discharges into the blood. Promoters of CRF family genes contain Glucocorticoid Response Elements (GRE) which modulate their gene expression [48, 106-109]. However, GC regulate the expression of the CRF system compounds depending on cell type or location. For example, CRF and Ucn2 are differentially regulated by stress-related GC depending on the brain region [109]. Ligands and receptors are also submitted to regulation in different intestinal cell types, during stress and inflammation. The stress-induced regulation of intestinal CRF system could also be dependent on the nature of the stress inputs. Acute versus chronic stress could modify the GC response which depends on GC receptor signalling, rather than on mineralocorticoid receptors (MR) according to the GR expression profile of cells [110]. CRF2 is down-regulated by GC in the rat aortic smooth muscle A7r5, the skeletal muscle C2C12 for the β isoform or the HEK 293 cells transfected with the "a" promoter coupled to luciferase. Dexamethasone induces a decrease of CRF1 and CRF2b opposite to a CRF2a increase of the promoter activity in pancreatic islets or in

the insulinoma cell line MIN6 [111]. Consequently, some CRF circuits could be shut down in some cell types or activated in others. O' Malley *et al.* have investigated the CRF receptor regulation during acute versus chronic stress or the association of both. Regulation appears to be different between proximal and distal sections of the rat colon, according to the nature of stressors [92]. Their experiments are very exhaustive in stress models but there is no information on the time course which is important according to the variation in CRF system expression during the inflammation process. In that way, our unpublished data show that acute restraint stress induces an increase in CRF2 expression which becomes significant in the proximal colon of rats, only after six hours post stress. Hence, if the level of CRF system components is unchanged at the early phase of stress, it doesn't exclude that some modifications occur later. Lakshmanan *et al.* speculate that in ovines the increase of endogenous foetal GC and/or gestational stress contributes both to the down-regulation of the CRF2 and to the up-regulation of the CRF1 observed near the term and term foetuses [72].

CRF ligands are also differentially regulated by GC. Cortico-therapies reverse the Ucn1 up-regulation observed in the intestinal mucosa of UC patients [101], whereas CRF levels seem to be not regulated by the corticosterone and hence independent of the HPA axis [112]. When altered, the physiological state of the bowel and coping strategies will lead to inappropriate response to stress, as observed in maternally deprived (MD) rats and IBD or IBS patients [113-115]. Some IBD patients don't respond to corticotherapy and in few cases, these treatments lead to worsening symptoms. Misregulations of the CRF system dependent on GC could explain these phenomena. Also, CRF and Ucn genes contain CRE and GATA sequences that enhance promoter activity [116-118]. These sequences may participate to the tissue- and cell type-specific expression of CRF peptides [119]. Moreover, in human and rodents, the stress response and the associated HPA axis activation display sex related differences. Sex hormones like oestrogen and their receptors target the CRF promoter and up-regulate its activity [120].

Stress causes relapse after the remission of inflammation in IBD and animal colitis models [121-123], it also exacerbates flares in IBD [124]. Depending or not on stress, local modifications of the ratio ligands/receptors control the CRF signalling which participates to mucosal inflammation but the molecular mechanisms involved in this process are not well known. Finally, individual differences in CRF system compounds may explain differential susceptibility to stress. In this way, Wistar Kyoto and Sprague-Dawley, two strains of rats with diverse anxiety sensitivities, exhibit differential profiles of CRF1 and CRF2 receptor expression in their colon under basal conditions and following various stresses [93].

Regulation by inflammation

CRF signalling molecules are increased in IBD biopsies versus healthy volunteers and in animal models of inflammation. Both Ucn2 and CRF2 expression were reported in IEC in regions with active colitis in UC and CD biopsies compared to healthy samples [95]. In UC biopsies, CRF was detected in monocytes, and Ucn1 in LP immune cells together with CRF1 and CRF2, but not in macrophages [99, 101]. Their expression correlates with the inflammatory stage of UC patients [101]. In this study, Ucn1 was also reported in mucosal cells such as enterochromaffin cells. Interestingly, Ucn1 is absent in foetuses or neonates but appears in the LP inflammatory cells of pediatric subjects and increase in adults. Food intake and bacterial agent exposure after birth were supposed to contribute to Ucn1 expression and regulation [86].

Different models of animals developing inflammatory colitis have been described: 1) spontaneous colitis in animals with genetic manipulation, 2) colitis induced by the transfer of activated cells (T lymphocytes in nude mice, SCID), by chemical agents (indomethacin, 2,4,6-trinitrobenzene-sulfonic acid, TNBS; dextran sulphate sodique, DSS; acetic acid), by bacterial products (peptidoglycan-polysaccharide, PG-PS) [125]. TNBS-induced colitis in rats is associated with a decrease in CRF2 expression in myenteric neurons and macrophages during the early phase (days 1-3) of inflammation while its agonist Ucn2 mRNA is up-regulated in the early and late stages (days 12-15) of inflammation [73]. Our unpublished data depict an up-regulation of the CRF2 in the chronic

DSS model of rat colitis that is coherent with the CRF2 overexpression observed in human colitis [95]. In these models, the development of colitis is influenced by the intestinal bacterial flora [126]. This suggested flora to mucosa regulation has been investigated in lipopolysaccharides (LPS) treated rats in which CRF mRNA and proteins are up-regulated in inflammatory cells, mesenchymal cells and myenteric plexus [112, 127]. Toll-Like Receptors (TLR) which are targets of LPS, participate for a bacteria-dependent colitogenic effect by internalizing and transporting pathogens from the lumen to the LP. The TLR-4 is strongly expressed in the colon and could then relay the inflammation-dependent increased expression of CRF and Ucn1 peptides [128]. The TLR-4 expression is increased in macrophages and IEC of CD patients and could favor the bacterial-induced inflammatory susceptibility [129]. *Clostridium Difficile* toxin A (*C. Difficile* Tx A)-induced inflammation in mice ileum leads to an early increased expression (within 1 hour) of CRF in subepithelial cells and both CRF receptors in LP cells and IEC [74]. Blocking of CRF1 led to decreased inflammation suggesting a pro-inflammatory role of CRF. In the same model, Ucn2, Ucn3 (but not Ucn1) and CRF2 mRNA levels were increased after a four hour treatment in mice [94] or rats [80], while in humans, exposure to *C. Difficile* Tx A was reported to increase the expression of CRF2 mRNA and protein levels in HT-29 cells and colonic xenografts [95]. Also, CRF receptors are sensitive to cytokines and inflammatory toxins but their regulation by endocytosis and degradation after ligand binding counteracts the observed levels. This hypothesis is supported by the observation that *C. Difficile* Tx A raises CRF1 levels in the ileum when CRF is down-regulated but not in control or Ucn2 silencing [80]. This differential modulation between ligand and receptor expression could be a regulatory response to stress signals. Commensal bacteria are beneficial or/and pathogenic, depending on strain, environment and localization. IBD patients, who are subjected to chronic colitis, present a modified enteric microflora composition (for review [130]), that could affect the basal expression of CRF system compounds depending on intestinal sections, and consequently enhances colitis susceptibility.

Alternatively, mucosal inflammation can be considered on the immune cell side, where an inappropriate activation leads to pro-inflammatory cytokine secretion and participates in inflammatory flares in IBD. The CRF system could be regulated by inflammatory cytokines like IL1, IL6 or TNF α [112], which are differentially expressed depending on the colitis stage. This has been studied at the different phases of TNBS-induced colitis in rats [12, 73]. On day 1, at the early step of inflammation, the MPO peak matches with an Ucn2 up-regulation in mucosal macrophages, whereas Ucn1 and CRF2 are down-regulated. On day 6, at the late step of inflammation, Ucn1 and Ucn2 expressions are at their maximal levels with the TNF α peak. Up and down regulations may represent the multi-factorial influence of cytokine production. The cytokine profile is different in UC versus CD patients [131] and the respectively corresponding experimental models, DSS and TNBS colitis [132]. These divergences could explain some differences of both the immune activated population and the CRF system regulation pattern. Altogether, microflora and cytokines impact the basal level expression and localization of the CRF system according to the cell types and their location.

Influence of CRF signalling in epithelial function: Normal and pathological

Intestinal epithelial homeostasis and function depend on various cell populations distributed on the different layers that constitute the GI tract. These cells participate in the control of intestinal secretory, motor and immune functions as well as epithelium permeability (for review [14]). Mucosal cells make up a complex network in which ENS, immunocytes, enterocytes and enterochromaffin cells, establish interaction circuits that are mobilized during stress and inflammation. This equilibrium of cell representations could also be affected in pathological conditions, as mastocytes, macrophages and lymphocytes are more vastly represented in the colon LP of IBD and IBS [133]. In this review, we will focus on epithelial barrier defects induced by CRF signalling.

The intestinal homeostasis is maintained by the epithelial monolayer which separates immune cells from luminal contents. Thus the epithelium

prevents unwanted solutes, micro-organisms, and antigens entering into the body. However, monocyte activation, epithelial cell-cell interaction weakness or down-regulation of goblet cells induced-mucus secretion lead to a higher influx from the lumen that makes these two populations in contact (Figure 1). The GI epithelial lining consists of a monolayer of cells that are held together by circumferential intercellular junctions. Tight junctions (TJ) are composed of transmembrane proteins (claudins (CL), occludins and junctional adhesion molecules (JAM)), scaffold proteins like zona occludens (ZOs) that link the actin cytoskeleton, and intracellular regulatory molecules including kinases [134]. TJ proteins regulate the flux of water and solutes in the intercellular space, but also the movement of transmembrane proteins, thereby promoting apical-basal polarity [135]. Directly beneath TJ are the adherens junctions (AJ) which comprise E-cadherin and nectin connected to the actin cytoskeleton via α/β catenin and afadin respectively, and are regulated by 120ctn [136]. Rather than providing barrier function, AJ are thought to act as a dynamic connection between the actin contractile rings of adjacent cells [137]. The third group of cell-cell contacts, desmosomes, is structurally similar to AJ [138]. The transmembrane desmosomal cadherin, desmoglein and desmocollin, bind to the intercellular scaffold proteins plakoglobin and desmoplakin, which link the protein complexes to intermediate filaments to provide structural strength. In addition to form a physical barrier, EC participate in the innate defence mechanisms through the expression of a wide range of pattern-recognition receptors, such as TLRs and by the production of immunomodulatory molecules. By releasing 5-HT, enterochromaffin can cause the secretion of mucus from goblet cells [139], while Paneth cells produce defensins, cryptidines and lysozymes which exert antibacterial activities [140]. The mucus protects from bacterial penetration by the formation of a coating laid at the epithelial surface [141].

Stress modulates the activity of neuroendocrine, immune and GI systems [142, 143]. Altered release of neuroendocrine factors, such as GC, vasoactive intestinal peptides, neurotensin, adrenomedullin, catecholamines or CRF and its related peptides,

by stress, may disturb the intestinal cytokine balance and barrier integrity [10, 144, 145]. The impact of the CRF system on the intestinal epithelium could be considered at two different levels: On one hand, by targeting the immune system, which secondarily interacts with the epithelium through the production of cytokines, and on the other hand, by the mobilization of the enterocyte's CRF receptors. According to the low expression of the enterocytic CRFergic system in basal conditions, this way has been less studied. However, considering the CRF ligand and receptor up-regulation that could occur under various conditions such as stress or inflammation, the EC aspect needs to be more thoroughly investigated.

Stress and barrier dysfunction:

Role of CRF signaling

While maintaining an effective barrier to harmful macromolecules and micro-organisms, enterocytes have also developed two mechanisms to control the selective permeability of the barrier. The management of ion selectivity, nutrients and solute occurs via the para-cellular route crossing between the epithelial cells, while large molecules such as antigens and immunoglobulins pass through epithelial cells via the trans-cellular route [146] (Figure 1). In humans, the effect of stress on mucosal barrier function has not been deeply investigated. The reason might be that it is difficult to evaluate the stress and to obtain intestinal biopsies of these patients without adding exogenous stress. However, some studies showed that acute stress leads to the reduction of water absorption, and sodium/chloride secretion, cooperatively with the luminal release of mast cell mediators in the colon [147, 148] and/or α -defensin in the jejunum [149]. Other studies reported increased small intestinal permeability in some patients with IBS compared to healthy controls [150, 151]. Furthermore colonic biopsies from IBS patients had increased para-cellular permeability [152] and a release in mast cell neuromediators [153]. Soluble mediators produced from cultured colonic biopsies of these IBS patients increased the permeability of human intestinal epithelial Caco-2 cells, a process correlated with a reduction of ZO-1 mRNA [152]. So far, the components that alter epithelial barrier

in humans have not all been identified. However unpublished data of Kiank *et al.* indicate that activation of peripheral CRF signalling contributes to defect in epithelial barrier by reducing the expression of TJ proteins and altering the expression of IFN γ and IL10 (Kiank *et al.*, unpublished data). This effect seems to be related to the recruitment of CRF2 pathways by CRF1 activation.

In rodents, both acute physical and chronic stresses increase the para- and trans-cellular permeability in colon. Studies, using various CRF antagonists, indicate that the modulation of colonic permeability seems to be CRF1 dependent [103, 154-160]. In rats, acute or chronic administration of peripheral CRF also leads to an increase in the colonic permeability by stimulating para-cellular transport, [154, 155, 161]. This process that appeared to be dependent on either CRF1 or CRF2 drives potential pro-inflammatory events [162]. Psychological stress induces eosinophils-derived CRF to activate mast cells, leading to epithelial barrier dysfunction [163]. As it might be expected, the exposure to chronic stress compared to a single exposure has more severe consequences on the intestinal function. The use of chronic stress (5-10 days of repeated exposure to stressors) is thought to reflect more accurately the daily stressors of humans. Indeed, the exposure to chronic water avoidance stress (WAS) caused longer lasting mucosal barrier defects than in acute stress, with enhanced ultrastructural abnormalities in the epithelium, inflammation and mucus depletion [158, 164, 165]. Following acute stress, the endogenous CRF is responsible for the increased mucin secretion since IEC expressing CRF1 are partly goblet cells [10, 72, 154, 166]. On the other hand, murine experiments advocated that under acute stress, provoked by high level acoustic stimuli, colonic permeability occurs, associated with mast cell degranulation and overproduction of interferon gamma (IFN γ). The colonic epithelial barrier was morphologically altered, mRNA encoding TJ proteins were reduced and colonocyte differentiation was altered [157]. These transient phenotypic changes in colonocytes are mediated by mast cell activation and IFN γ release [167].

Early life stress also generates long term impacts on the epithelial physiology by changing its cell

composition and interactions. Maternal deprivation (MD) of rat pups induces alterations in the differentiation of IEC, resulting in a CRF2-dependent depletion of Paneth and goblet cells, concomitant to a CRF1-dependent hyperplasia of endocrine cells in the rat duodenum. These losses in the secretory epithelial cell lineage could contribute to the stress-associated epithelial barrier defects, disturb the mucosal function and promote subsequent exposure to sensitising antigen or bacterial infections. Similarly to MD, chronic administration of CRF in rats, increases enterochromaffin cells, while Ucn2 administration decreases Paneth and goblet cells [168]. The effect on goblet and Paneth cells but not on enteroendocrine cells does not exceed the duration of the renewal of cellular population, suggesting that the stem cell population was altered by a CRF/CRF1-dependant mechanism at a critical stage of the intestinal maturation. Intestinal crypts may contain both short-lived (days) as well as long-lived (months) multipotent progenitors that are able to differentiate in all epithelial cell fates [169]. Furthermore, in the rat colon, CRF receptors are both expressed in the basal third of the crypts on intestinal stem cells and could affect cell differentiation [78]. Finally, stress impairs rat ileal epithelial cell kinetics including proliferation, maturation and apoptosis. In adult rats, chronic stress reduced crypt length due to apoptosis, followed by an increase in cell proliferation to replace these damaged cells [170]. Hence, a reduced proportion of fully differentiated epithelial cells may produce a more permeable intestinal barrier.

Various mechanisms are responsible for mucosal barrier dysfunction. A combination of local and extrinsic signals may be involved in mediating the effect of CRF on colonic epithelial function since CRF receptors were localized in the periphery as described previously. Here we will successively focus on the CRF system-dependent barrier dysfunctions at the neural, immunologic and epithelial level. The enteric nervous system (ENS) controls chloride secretion by acetylcholine (ACh) and 5-HT, through the secreto-motor reflex [171]. The stress susceptible Wistar-Kyoto strain of rats have a decreased ACh transferase activity in mucosal homogenates, compared to the parental

strain which is less stress-susceptible, suggesting that ACh plays a role in these rats prior to restraint stress exposure [172]. Furthermore, atropine, a muscarinic receptor antagonist prevented the stress-induced increase in both mucin release following exposure to immobilization stress [166] and trans-cellular permeability [154, 173]. Then it has been proposed that MD-induced barrier dysfunction was dependent on CRF activation *via* CRF2 of enteric nerves to release ACh, which in turn activated EC to increase the permeability of the epithelium [174]. Acute stress also activates cholinergic pathways, to trigger exocrine pancreatic secretion. Trypsin released in these conditions may be responsible for colonic barrier alterations through activation of PAR2 [175].

Animals devoid of mastocytes (including Ws/Ws rats) do not develop gastrointestinal disorders following the exposure to stress [158, 164]. Hence, various studies have shown that stress-mediated changes in GI are mediated by mast cell activation and degranulation in the LP of mediators such as prostaglandins, proteases, histamine and 5-HT. In distal colon explants of rats, the administration of CRF induces a dose response increase in rat mast cell proteases (RMCP-II), which is responsible for enterocyte down-regulation of occludin and ZO-1, and subsequent TJ opening [176]. These effects are reverted in presence of doxantrazole (a mast cell stabilizer) and significantly reduced in Ws/Ws rats. This seems to be mast cell and CRF2 dependent but the presence of neighboring cells that also express CRF receptors does not exclude other targets [10]. *In vitro* studies have shown that acute stress is able to induce ion-transport and abnormalities in para/trans-cellular permeability of rats [159, 173]. These effects mediated by peripheral CRF induce activation of mast cells, which is also blocked by doxantrazole [154, 155]. Mast cell mediators may affect epithelial permeability either directly eg tryptase acting through PAR2 receptors [177, 178], either by stimulating local immune system [167] or by the reduction of colonic mucus [179]. Chronic affections found in MD are responsible for a CRF-dependent production of the nerve growth factor (NGF) in mastocytes *via* CRF1, with a subsequent increase in para-cellular permeability

[103, 180, 181]. Therefore, mast cells are important effectors of the intestinal responses to stress and inflammation, which include ion secretion abnormalities, increased permeability and mucin release [10, 182]. CRF receptor expression and functionality have been described in mast cells in rat and human colonic mucosa, however in humans, only resident mast cells are concerned [10, 87]. NCM460 IEC stimulated by Ucn2, produce chemo-attractants for immunocytes, like IL8, which has been described to control intestinal permeability [95, 183].

Furthermore, the increased para-cellular flux of the epithelium can be explained by cell signalling that are activated directly on enterocytes. Therefore, CRF receptors coupled to adenylyl cyclase and cAMP have been described to be responsible for the inter-cellular dissociation of IEC [184]. In addition to their canonical pathways, GPCRs as well as CRF receptors are able to activate the Src kinase by promoting its auto-phosphorylation on Y-418 [61] as observed in the HT-29 cell line (our unpublished data). Thus, by modulating the phosphorylation status of inter-cellular junction proteins Src activation could lead to the barrier opening [185]. Src kinase has also been implicated in transcytosis mechanisms, its activation leads to caveole formation and small molecules flux, from the apical to the basal pole, through a trans-cellular route. Both immobilization stress of rats and intravenous/intracerebral injection of CRF in conscious non stressed rats, lead to increased colonic mucosal levels of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA and prostaglandin E2 (PGE2) secretion [166, 186]. However, RhoA-dependent COX-2 signalling has been shown to disrupt formation of AJ in HCA-7 cells [187], whereas PGE2 signalling mediates TJ disassembly through a mechanism that involves PKC and CL1 in human colorectal cancer Caco-2 cells [188]. Our results indicate that exposure of HT-29 cells to Ucn3 lead to AJ dissociation and increase cell motility, a process associated in part with RhoA activation (Ducarouge *et al.*; unpublished data).

Together, these data suggest that stress-induced activation of both peripheral CRF receptors contributes to mucosal barrier dysfunction, with the recruitment of enteric nerves, mastocytes and the less investigated, IEC. Furthermore, timing

and duration of the stressor are key elements determining the extent of the damage observed.

Inflammation and barrier dysfunction: Role of CRF signalling

Inflammation is a main component in the pathogenesis of IBD [13, 145] and there is increasing evidence that low grade pro-inflammatory processes may also have a role in the development of IBS, particularly in post-infectious IBS [10, 189, 190]. Psychological stress, including dismal life events and depression, triggers sympathetic activation and favors inflammatory reactions that increase the risk of relapse and/or exacerbation of IBD symptoms [9]. Thus, a stress/inflammation relationship has been found in IBD patients, particularly for the stress in UC and the depressive symptoms in CD. Moreover, whether stress presents itself as a causative factor or a consequence of the IBD development remains questionable, since psychosocial stress might trigger or increase the inflammatory cascade through neuro-immunological interactions, whereas disease symptoms can themselves cause stress. It is already well-established that, in parallel to the indirect influences of the CRF system on the immune function through neuroendocrine activation of the HPA-axis, a direct pathway exists through immune tissue-derived local inflammatory actions. The CRF receptors are found in different immune cells, including macrophages, lymphocytes and mast cells and locally secreted CRF ligands are thought to act directly as autocrine/paracrine immuno-modulators [191].

The development of inflammatory processes could result from the increased passage of antigens and pathogens in the LP subsequent to a prolonged impairment of colonic epithelial secretion [192] or to an epithelial barrier dysfunction [193] (for review [194]). Both colitis and chronic psychological stress enhance bacterial translocation, which in turn exacerbates the course of colonic inflammation [195, 196]. During the mucosal inflammation, *E. coli* bacteria activate the TLR4 of immune cells, which enhance the local release of IFN γ and NO [197]. This exacerbates ileitis and thus causes local damages of tissues. *In vitro* study showed that in murine macrophages, the expression and transcription of TLR4 could be increased by stimulating CRF2 [198]. However,

deficiency in the TLR4 signalling pathway leads to increased intestinal inflammation in animal models [199] and is associated with IBD pathology in humans [200]. Using a DSS-induced colitis model in mice, Chaniotou *et al.* showed that CRF-deficient mice have a lower expression of TLR4 before the onset of inflammation and that inflammation is more severe in these animals [201]. In humans, it has been established that a protective pathway mediated by Paneth cells's secretory activity is altered in IBD patients [202, 203]. Alterations in the expression of defensins could have deleterious effects on gut homeostasis and shift this balance toward inflammation. However, it is not clear whether defensin deficiency is implicated in the pathogenesis of IBD or is a symptom [204]. The possibility that stress may affect this innate defence mechanism is supported by recent data showing that psychological stress decreases the release of anti-microbial peptides in the skin and that MD stress or Ucn2 administration decreases Paneth cells [168].

IBD-associated inflammatory response in the gut also includes activation of the adaptive immune system. Both Th1 and Th2, T cells have been shown to cause chronic gut inflammation by releasing pro-inflammatory cytokines, with CD having a predominantly Th1 cytokine profile (IFN γ or TNF α) and UC having a Th2 cytokine profile (IL4, IL5, IL13) mediated by specialized cells such as natural killer (NK) T-cells. In addition to the Th1/Th2 theory, recent studies have unveiled in the pathogenesis of CD, the critical involvement of a third subset of effectors T helper cells, Th17 cells [13, 205]. These cells produce IL17, which promotes a local inflammatory response including a IL6 and IL8 release and neutrophil chemotaxis to remove microbes. Under physiological conditions, the Th1/Th2 balance is equilibrated and regulatory T (Treg) cell driven responses, which include the release of IL10, TGF β and IL4, counteract the Th1 mediated microbial and autoimmune actions [205, 206]. In several tissues, CRF signalling promotes the immune response: indeed, CRF stimulates the proliferation of human lymphocytes by increasing IL2 receptor expression and enhancing the production of IL1 and IL2 [207]. Tache and collaborators found that in mice treated with

CRF1 agonist, the colon responds with increased TGF β expression (a modulator of intestinal mast cell effector functions), while the ileum exhibits a dose-related IFN γ response indicating T cell and/or NK cell activation (Kiank *et al.* unpublished data). Finally, IBS patients who present high levels of psychological stress, exhibit a higher number of mucosal mast cells (in the jejunum and colon) as well as CD8⁺ T lymphocytes (in the colon) [133, 208, 209]. Similarly, chemically DNBS induced colitis in rodents can be reactivated by acute stress. Stress reduced colonic mucin, increased colon permeability and T lymphocytes mucosal infiltration [121, 210]. Stress susceptible reactivation required CD4⁺ lymphocytes. Furthermore, stress neuro-mediators like CRF can recruit and activate mast cells, neutrophils, eosinophils mononuclear cells in the intestinal mucosa which can either cause tissue damage (pro-inflammatory actions) or have protective effects on intestinal homeostasis (anti-inflammatory) (for review [16]).

To understand the role of the CRF system in the regulation of the intestinal homeostasis, some approaches were developed based on receptor and ligand inhibition by either genetic or chemical extinction. These works indicate that both CRF receptors play a role in the stress-induced inflammation but they may have a contrasting function since it was hypothesized that CRF1 acts as an anti-inflammatory by countering the effect of pro-inflammatory cytokines, while CRF2 signalling potentiates the inflammation. The establishment of knockout (KO) mice provided a useful tool for this purpose. However, there are some contradictory results possibly depending on the type of inflammation and since they are not conditional, they do not exclude central mediated effects on the animal behaviour, that impact the intestinal mucosa through the "brain-gut axis" [211-213]. Indeed, CRF2 KO is responsible for a reduced inflammation in *C. Difficile* Tx A-treated mice [94]. In contrast, in a DSS-induced colitis model, CRF1 KO mice showed decreased inflammation, while CRF2 KO mice displayed increased intestinal inflammation. This effect could also be obtained by antagonizing receptors in littermate mice [214]. This hypothesis is reinforced by contradictory data in which local

injections of shRNA targeting CRF-receptors diminish TNBS-induced colitis suggesting that both receptors participate in the inflammation process [12]. Furthermore, IBD patients display a high level expression of Ucn2 and CRF2 in the colon [95]. Likewise, in the acute phase of inflammation, in a rat model of chemically-induced colitis, Ucn2 levels are increased in infiltrating cells whereas expression levels of CRF2 are decreased in myenteric neurons, suggesting a compensatory down-regulation [73]. Regulation of receptor expression by its ligands is a rather frequent homeostatic mechanism observed in endocrine/paracrine pathways. The pro-inflammatory role of CRF2 has also been demonstrated at the cellular level. In human NCM460 colonocytes, CRF2 activation by Ucn2 induces NF- κ b signalling and a subsequent exaggerated release of IL8 and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) [94, 95]. In these cells, Ucn2 also induces the mitogen-activated protein (MAP) kinase which participates in cell differentiation, survival and apoptosis. The pro-inflammatory role of CRF ligands has also been demonstrated by KO or *sh* interference. In an experimental mouse model of *C. Difficile* Tx A induced intestinal inflammation, CRF KO animals developed a less severe inflammation [215]. In rats, CRF mRNA silencing but not UcnII dsRNA treatment abrogated both the inflammatory response and the increased CRF1 expression in inflamed tissue [80] suggesting an important role of CRF1 in the pro-inflammatory effect of CRF in rats. However, CRF receptors antagonists reduced the rise of TNF α and IL1 β in *C. Difficile* Tx A-induced ileitis [74]. In murine TNBS-induced colitis, CRF KO reduced inflammation with a decline in the local IL1 β upregulation [216]. Supporting a local pro-inflammatory role, CRF was shown to modulate secretion of cytokines and neuropeptides, as well as proliferation, chemotaxis and degranulation of purified macrophages and lymphocytes *in vitro*. Indeed, CRF/Ucns augments proinflammatory cytokine production (TNF α , IL1 and IL6) from macrophages *in vitro* and in LPS-induced endotoxin shock in mice. This induced the chemotaxis of mononuclear cells and macrophage activation, which are associated with a local release of oxidative mediators [74, 142, 198, 217]. Antalarmin administration inhibits CRF-induced

local inflammation, suggesting the implication of CRF1 [218]. The pro-inflammatory effects of CRF are in contrast to the anti-inflammatory properties reported for Ucn1, which bind with higher affinity the same receptors. Treatment of endotoxemic animals with Ucn1 reduced several pro-inflammatory cytokines release, and also increased the levels of the anti-inflammatory IL10 [219]. Comparable results were obtained in TNBS-induced colitis with the induction of a clear anti-inflammatory cytokine profile that promoted Treg cell responses but reduced the Th1 after treatment with Ucn1 [220]. The contrasting results between CRF and Ucn1, may be attributed to their different distribution patterns. Whatever their role, clinical studies showed that the colonic mucosa of UC patients displays increased numbers of CRF positive enterochromaffin and macrophage cells and Ucn1 is upregulated in these cells in a positive correlation with the intensity of the disease [86, 101, 145]. Furthermore, multiple pathological conditions associated with chronic inflammation present high levels of CRF and/or Ucn1 in the affected tissues [221] including endometriosis, Hashimoto thyroiditis and rheumatoid arthritis, where they seem to act as pro-inflammatory factors. In cardiomyocytes, Ucn1 induces an IL6 release in a time- and dose-dependent manner which is associated with the activation of ERK and p38 MAP kinases and the stimulation of NF- κ b [222]. On the other hand, some studies show that CRF receptor signalling may also favor an anti-inflammatory process. Peripheral immune pro-inflammatory mediators such as IL1 β , TNF α and IL6, stimulate the hypothalamic secretion of CRF which evokes adrenal GC release and activation of the sympathetic nervous system [143, 223]. Secondly, the CRF-induced release of GC and catecholamines displays an immunosuppressive effect by favoring anti-inflammatory responses and inhibiting innate and adaptive immune systems [224-226]. Furthermore, CRF stimulation of human monocyte-derived dendritic cells (DC) decreased the release of IL18, which is a pro-inflammatory mediator that promotes a Th1 shift [227]. During the early stage of inflammation, CRF, Ucn1 and Ucn2 can transiently inhibit the LPS-induced TNF α response in murine macrophages, via the induction of a COX-2/PGE2 pathway. However, it increases the

TNF α transcription and release in late stages of inflammation [228]. These authors also previously showed that the CRF2 activation by low dose of ligands enhances macrophage apoptosis and thus promotes an anti-inflammatory response [229]. The differential modulation of inflammatory process by CRF peptides is time and dose dependent.

It has been suggested that dysfunction in the epithelial barrier stimulates the mucosal immune system and may be the primary cause of IBD (reviewed in [230]). Permeability defects could conceivably be due to the pronounced apoptosis that occurs during inflammation processes. However it has been shown that IEC apoptosis alone is not sufficient for the entire deficit. Several studies have provided evidence for the perturbation of AJ or TJ in IBD, however the question of whether any altered expression of junctional molecules is a primary event in IBD mucosa, or a phenomenon secondary to the inflammatory process has yet to be clarified. It has been hypothesized that permeability defects might represent a primary disorder in CD, since intestinal permeability alterations have been observed not only in inflamed gut tissues but also in areas lacking any sign of macroscopic injury [231, 232]. Animal models mimicking CD such as the SAMP1/Yit mode, showed increased intestinal para-cellular permeability at an early stage of disease, prior to the onset of inflammation [233]. In UC, perturbations in permeability seem to be limited to the inflamed intestinal segment. However the debate still persists since animal studies support both tendencies [234, 235]. Various junctional molecules are affected by the actively inflamed status in IBD, in particular the expression of ZO-1, occludin, E-cadherin and desmoglein-2 [235]. E-cadherin mRNA transcripts were clearly expressed in actively inflamed mucosa of CD and UC, whereas the protein is less detected, suggesting a posttranscriptional regulation of barrier integrity as it was observed with cytokines and various growth factors (TGF, HGF, TNF) [236]. Transgenic animal models revealed the importance of E-cadherin in maintaining the epithelial of barrier by showing that AJ proteins contributed to IBD-like processes [237] ([238] for review). Jankowski and co-workers have demonstrated

that deregulation of E- and P- cadherin correlates with the progression of human colitis [239]. Intestinal permeability is also directly regulated through alteration of TJ proteins [240]. Using non invasive techniques, various studies demonstrated an increased intestinal permeability in CD [241-244] which is most likely attributed to the actions of Th1 cytokines (TNF α and INF γ) that are characteristic of this disease [245]. Underlying this increased permeability are disrupted TJ resulting in an up-regulation of pore-forming CL2 and a down-regulation and a redistribution of sealing CL3, CL4, CL5 and CL8 along the inflamed crypt epithelium, whilst absent or barely detectable in normal colon [246, 247]. *In vitro* models have demonstrated that TNF α can induce both apoptosis-independent disruption of epithelial barrier function via alteration of TJ and up-regulation of apoptosis in absence of changes in the expression of TJ proteins, suggesting that TNF α , may constitute a major link between a more leaky barrier and CD [248-250]. Furthermore, INF γ can prime intestinal epithelial monolayers to respond to TNF α by disrupting TJ morphology and barrier function via myosin light chain (MLC) kinase up-regulation and MLC phosphorylation [245]. The mechanism by which INF γ induces permeability changes is incompletely understood. It has been associated to endocytosis of occludin, JAM-A and CL1 following activation of Rho GTPases [249]. In contrast to CD, increased intestinal permeability is not easily demonstrated in UC while ultrastructural evidence of inadequate TJ has been established without increasing bacterial translocation such as in CD patients. These alterations have been attributed to UC cytokine profiles IL1 β , TNF α and IL13 which are able to alter TJ and permeability in cell cultures [251, 252]. IL13 impairs epithelial barrier function by affecting epithelial apoptosis, CL2 expression and restitution velocity [251]. Unlike CD patients, UC is characterized by a reduction of goblet cells and a diminished mucus barrier [253].

Interplay between inflammation and cancer: Role of the CRF system

Even though CRC does not always develop after IBD, its high frequency in patients with IBD represents a paradigm for the connection between inflammation and cancer in terms of epidemiology

and mechanistic studies in preclinical models (for review [254]). Although there is a very clear association between UC and an elevated risk for CRC, there has been some debate concerning CD patients. However, the increased risk of CRC in IBD patients seems correlate with the chronic inflammatory conditions in the intestinal mucosa, in particular with the degree [255], duration [256, 257] and anatomical extent of colonic inflammation [258]. There is evidence that the regular use of anti-inflammatory medications can reduce the development of cancers in IBD patients, but these cancers are lymphomas and are not developed from intestinal epithelial cells [259, 260]. In animals models such as intraperitoneal injection of the carcinogen azoxymethane (AOM) followed by repeated cycles of DSS or mice lacking the gene for the IL10 cytokine, chronic inflammation also results in an increased frequency of intestinal tumors [261, 262]. However these data do not provide mechanistic insight into how inflammatory processes might contribute to cancer. Inflammation could contribute to carcinogenesis by: 1) enhancing levels of reactive oxygen species that have a mutagenic effect on DNA (tumor initiation) [263]; 2) activating pro-survival or anti-apoptotic pathways in EC (tumor promotion) and 3) generating an environment in favor of sustained growth, angiogenesis, migration and invasion of tumor cells (tumor progression and metastasis). Various components of the inflammatory environment in IBD are key elements in the different steps of cancer [264]. Recent works have elucidated the role of various immune cells and mediators in all the steps of colon carcinogenesis with the dissection of some molecular pathways. The most significant findings are reviewed in [254, 265, 266]. The relationship between cancer and inflammation is not simple and cannot be reduced to the deleterious role of various inflammatory cells, mediators or signalling pathways in cancer. The inflammatory response also maintains physiological processes such as tissue homeostasis and repair after injury. Indeed, many molecules and pathways double-up, playing roles in homeostasis, tissue repair, and tumorigenesis. However, dedicated tissue injury and wounding supports tumor growth and neoplastic progression such making the two processes of tissue repair and tumorigenesis inseparable, in particular

during chronic stress. (See review from [267]). In this review, we will focus on the role of CRF signalling in the regulation of cancer development. Our analysis will be extended to various cancers since there is little specific data concerning colon cancer.

CRF receptors and ligands are expressed in many types of cancers and melanoma (for review [268]). However, a wide range screening of the CRF receptor expression by CRF autoradiography misses to identify the CRF receptors in different tumoral tissues like colorectal adenocarcinomas [269], while they were expressed in normal conditions suggesting that receptor loss may contribute to malignant transformation and/or tumor progression either as a causal or as a resulting effect. Similar conclusions have been drawn in prostate cancer characterized by an expression loss of CRF2 compared to benign tissues [270]. The comparison with high expressing tissues like endocrine tumors could dismiss less expressing tissues such as GI. However, CRF2 has been previously immunodetected in HT-29 cells [94] and further in Caco2, SW620, SW1222 and HCT8 cells (Ducarouge *et al.*, unpublished data), all adenocarcinoma cell lines which display differential metastatic properties. Finally, the distinct distribution and activities of the CRF system within the tumor or between normal tissues and tumors reinforce the hypothesis that CRF1 and/or CRF2 could modulate different aspects of cancer. A study performed on 51 untreated endometrial cancer patients as well as on normal surrounding tissues showed that in 61% of tumors specimens, CRF2 staining was diffuse in the cytoplasm while it was nuclear in normal endometrial glands [271]. The CRF2 cytoplasmic pattern was associated with a more advanced FIGO stage disease [271, 272]. As for CRF receptors, CRF and Ucn expressions have been extensively investigated in the GI tract, but their expression in colorectal cancers has not been the center of interest. Expression of CRF was first detected in various tumors of the GI by radioimmunoassay including one adenocarcinoma of the sigmoid colon [273]. One report indicated that CRF/Ucn peptides could inappropriately be secreted by several tumors [274, 275] and sometimes correlates with the aggressiveness of

cancers [276]. It would therefore be interesting to determine the CRF peptide regulation in colorectal adenocarcinomas. Autocrine/paracrine actions of the CRF system have been suggested to be involved in the micro-environment control of the tumor and neighboring cells [277, 278]. In the tumor microenvironment, CRF is released by endothelial and immune cells and by the local neuronal innervations [279-281]. The non-tumoral cells could also be source of CRF ligands, which is influenced by stress and inflammation.

The chronic inflammatory states may lead to environments that foster genomic lesions and tumor initiation. Disorganization of inter-epithelial junctions could participate in the infection process but also in the cellular dedifferentiation preceding carcinogenesis [282]. These epithelial alterations were more pronounced in UC tissues in which the development of malignancies is apparently more frequent than in CD tissues, suggesting that disturbances of junction-associated molecules are likely to be involved in carcinogenesis from IBD patients. In HT-29 cells, we found that exposure to Ucn3 contributes to the disorganization of AJ with an endocytosis of E-cadherin and a nuclear translocation of both β -catenins and p120ctn (Ducarouge *et al.*, unpublished data). Apart from being cell-cell adhesion proteins, these catenins are also important signal transduction molecules that control proliferation and migration processes. The induction of Wnt signalling, mostly by affecting β -catenin, plays a critical role in both the maintenance of the steady-state proliferative compartment and tumorigenesis of tissue since it has been described as a hallmark of colon, breast, prostate and ovarian cancers, all of which express CRF system molecules [283, 284]. Using the 4T1 breast cancer cell line, Arranz *et al.* demonstrate that peripheral CRF modified the expression of SMAD2 and β -catenin, induced cell proliferation and increased the TGF β action on proliferation, confirming its impact on TGF β and the Wnt signalling [285]. Similarly, CRF stimulates Neuro2a neuroblastoma cell line proliferation [286]. However, the effects exerted by CRF in cancer cells range from promotion of cell proliferation and angiogenesis versus cell apoptosis; all of these processes participating in the regulation of the tumor growth. Thus, CRF has been described

to inhibit cell proliferation via CRF1 in the endometrial adenocarcinoma cell line Ishikawa [287], in human HaCat keratinocytes, in mouse immortalized keratinocytes and melanoma [288, 289], and in MCF7, an oestrogen dependent human breast cancer [290]. One study reports that Ucn1 could directly inhibit the proliferation and promote apoptosis of human small cell lung carcinoma via CRF2 activation [291] whereas both receptors don't affect the proliferation of the human gastric cancer cell line AGS [221]. Thus, tumor growth could also result from inhibition of apoptosis, which procures characteristics that participate in the chemotherapy escape and the survival of metastatic cells. Apoptosis is inhibited in the human gastric cancer cell line AGS after exposure to CRF, Ucn1 or Ucn2 [221]. Similar results were observed in the retinoblastoma cells treated by CRF via a PKA-mediated down-regulation of pro-caspase-3 cleavage and subsequent activation [292]. In contrast, CRF induces local immunosuppression by promoting apoptosis of cytotoxic T-cell via the production of Fas ligand in ovarian cancer cells [276]. In the mouse RM-1 prostate cancer cell line, CRF1 and CRF2 are expressed and exert opposite apoptotic roles. CRF reduces Bcl-2 expression while activating Bax-dependent caspase-9 and Ucn2 increases Bcl-2 expression and decreases Bax expression via a cAMP, AKT pathway [293]. The balance between proliferation and apoptosis could switch ON or OFF the tumor survival or death, depending on the cancer type and the nature of CRF peptides and the activated CRF receptors.

Another way by which the CRF system may influence tumor growth is angiogenesis. It has been reported that Ucn2 inhibits the growth and vascularization of Lewis lung carcinoma cell tumors *in vivo* and *in vitro* [294] as well as in hepatocellular carcinoma [295]. Furthermore, the CRF2 is strongly expressed in blood vessels [89] that are neo-generated in growing solid tumors [296]. In many tumors, the neo-angiogenesis is affected by the CRF system via the production of VEGF and has been suggested to be a potential therapeutic target with Ucn treatments [97, 295, 297]. The CRF2 activation down-regulates VEGF production from vascular smooth muscle cells, which leads to a decrease of their proliferation and

tubule formation in matrigel, and CRF2 deficient mice become hyper-vascularized post-natally [97]. Similarly, it was also shown that the activation of CRF2 could inhibit p38/AKT phosphorylation to suppress the secretion of VEGF in human small cell lung carcinoma [291]. In contrast, in the skin, peripheral CRF has been shown to enhance local angiogenesis and vascular permeability [280, 298]. This effect involves skin mast cell degranulation (Theoharides, 1998). The HMC-1 human mastocyte cell line also produces VEGF in response to CRF administration by a CRF1 pathway, as it is reversed by Antalarmin [90]. This CRF1 antagonist also suppresses neo-angiogenesis in 4T1 breast cancer cell line using a COX-2 but not VEGF-dependent mechanism [285]. In the intestine, during DSS-induced colitis, KO of CRF1 and CRF2 decreased or increased microvascular density, respectively [214]. This effect was associated with a decrease (for CRF1^{-/-}) or an increase (for CRF2^{-/-}) in VEGF compared to inflammation in control mice. The effects of the two receptors on intestinal angiogenesis are again opposite to each other. This finding leads to the conclusion that CRF1 is pro-angiogenic, while CRF2 is anti-angiogenic. The anti-angiogenic property of CRF2 is not only true during inflammation [97].

Finally, the CRF system has been proposed to affect migration and invasion of tumor cells, thus supporting tumor progression and metastasis [278, 299]. As described previously, the CRF receptors induce numerous cell signalling pathways, which are involved in cell-cell junction regulation and/or cell migration. This increased cell motility might be driven by cytoskeleton rearrangements and focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation [278, 300]. Actin reorganization has been observed following CRF-treatment of At1 cells [285]. In colorectal cancers, transient ERK activation seems to be sufficient to induce FAK phosphorylation on serine and subsequent migration and metastasis [301, 302]. In HT-29 cells, the CRF2 activation induces Src, ERK and FAK phosphorylation coupled to a disorganization of AJ, a rearrangement of actin cytoskeleton and cell migration (Ducarouge *et al.*, unpublished data). The Src family kinases are master regulators of the AJ and interact with both CRF receptors [61]. The CRF induces the migration and invasion of the B16F10

murine melanoma cells that also depend on a transient ERK activation via the CRF1 [299]. It also participates to actin polymerization and FAK phosphorylation, which lead to MCF-7 motility [278]. CRF-dependent modulations of RhoGTPase and their associated actin cytoskeleton morphology have been described in neurons [303, 304]. CRF1 induces Rac-1 activation via PKA, MAPK signals, whereas CRF2 induces RhoA via PKC. The involvement of the CRF system in the regulation of cancer progression and metastasis is supported by the fact that ligand expression could correlate with the tumor grade, as it has been observed in ovarian cancers [276] but not breast cancer [277]. CRF2 is also expressed especially in peri-neural invasion of breast tumor and may play a role in the invasiveness [277].

In conclusion CRF receptor signalling is implicated in carcinogenesis-related pathways which could therefore be regulated by CRF ligands. Among these pathways, the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT pathway is a key modulator of cell survival, cell cycle and angiogenesis. Recently the PI3K pathway has been suggested to play a critical role in both CRF receptor-mediated effects [305, 306]. CRF is also a regulator of NF- κ B which is a regulator of genes that control cell proliferation and survival. However the varying results observed indicate cell- or receptor specific actions. In the brain, CRF inhibits the DNA binding activity of NF- κ B under normal or oxidative stress-induced conditions while in leucocytes and thymocytes CRF has been described to enhance NF- κ B DNA activity in a time and dose dependent manner [307, 308]. Aberrant activation of NF- κ B is frequently detected in enterocytes and LP macrophages of IBD patient biopsies and colorectal tumors [309, 310]. In a model of colitis associated-CRC and by deletion of IK- κ B (impaired activation of NF- κ B), it has been demonstrated that epithelial NF- κ B contributes to tumor initiation and promotion by suppressing apoptosis while, myeloid NF- κ B supports both tumor promotion and progression through production of cytokines, COX-2 and growth factors [311].

CONCLUSION

A great deal of evidence from recent literature demonstrates that the CRF system is widely

expressed and active throughout the GI tract. Even some important specie differences in the expression patterns of these molecules at the cellular level, they could be modulated by both stress and inflammation. The CRF system may act as an autocrine/paracrine modulator of inflammatory pathways, which affects the immune system, the epithelial barrier physiology via the increase of trans- and para-cellular permeability and the mucus secretion. Life stress events are able to induce or aggravate the inflammatory state of either healthy people or IBD via CRF system modulations. Chronic inflammation observed in IBD patients or chronic stresses both lead to tissue damage that could be repaired. Thus, the chronic wounding makes hyper-proliferative IEC populations, which favors the cancer development. Furthermore, as cell-cell junction impairment leads to inflammatory processes in non-tumor tissues, this loss also participates in cancer progression. The CRF system seems to be expressed and functional in colorectal cancer cells. Hence, there is direct and indirect evidence for a role of the CRF signalling in human cancers, growth, survival and metastasis. Consequently, CRF receptors become potential targets for novel therapeutic strategies against IBD and colorectal cancers. These compounds are readily available for clinical use: while the synthesis of non-peptide selective CRF2 antagonists still remains a challenge in medicinal chemistry, non-peptide CRF1 antagonists have been recently synthesized and tested in the treatment of CNS-related diseases.

REFERENCES

- Selye, H. 1956, *Metabolism*, 5, 525-30.
- Mcewen, B. S. 2006, *Dialogues Clin. Neurosci.*, 8, 367-81.
- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., and Rivier, J. 1981, *Science*, 213, 1394-7.
- Chrousos, G. P. 1995, *N. Engl. J. Med.*, 332, 1351-62.
- Miller, G., Chen, E., and Cole, S. W. 2009, *Annu. Rev. Psychol.*, 60, 501-24.
- Arck, P. C., Slominski, A., Theoharides, T. C., Peters, E. M., and Paus, R. 2006, *J. Invest. Dermatol.*, 126, 1697-704.
- Elias, P. M. 2005, *J. Invest. Dermatol.*, 125, 183-200.
- Maunder, R. G. and Levenstein, S. 2008, *Curr. Mol. Med.*, 8, 247-52.
- Mawdsley, J. E. and Rampton, D. S. 2005, *Gut*, 54, 1481-91.
- Santos, J., Yates, D., Guilarte, M., Vicario, M., Alonso, C., and Perdue, M. H. 2008, *Psychoneuroendocrinology*, 33, 1248-56.
- Hisamatsu, T., Inoue, N., Yajima, T., Izumiya, M., Ichikawa, H., and Hibi, T. 2007, *J. Gastroenterol.*, 42(Suppl. 17), 34-40.
- Chang, J., Adams, M. R., Clifton, M. S., Liao, M., Brooks, J. H., Hasdemir, B., and Bhargava, A. 2011, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, in press.
- Shih, D. Q., Targan, S. R., and McGovern, D. 2008, *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 10, 568-75.
- Larauche, M., Kiank, C., and Tache, Y. 2009, *J. Physiol. Pharmacol.*, 60 (Suppl. 7), 33-46.
- Buckinx, R., Adriaensen, D., Nassauw, L. V., and Timmermans, J. P. 2011, *Front Neurosci.*, 5, 54.
- Kiank, C., Tache, Y., and Larauche, M. 2010, *Brain Behav. Immun.*, 24, 41-8.
- Vaughan, J., Donaldson, C., Bittencourt, J., Perrin, M. H., Lewis, K., Sutton, S., Chan, R., Turnbull, A. V., Lovejoy, D., and Rivier, C. 1995, *Nature*, 378, 287-92.
- Lewis, K., Li, C., Perrin, M. H., Blount, A., Kunitake, K., Donaldson, C., Vaughan, J., Reyes, T. M., Gulyas, J., Fischer, W., Bilezikjian, L., Rivier, J., Sawchenko, P. E., and Vale, W. W. 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 7570-5.
- Reyes, T. M., Lewis, K., Perrin, M. H., Kunitake, K. S., Vaughan, J., Arias, C. A., Hogenesch, J. B., Gulyas, J., Rivier, J., Vale, W. W., and Sawchenko, P. E. 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 2843-8.
- Lederis, K., Letter, A., McMaster, D., Moore, G., and Schlesinger, D. 1982, *Science*, 218, 162-5.
- Montecucchi, P. C., Anastasi, A., De Castiglione, R., and Erspamer, V. 1980, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 16, 191-9.
- Negri, L., Melchiorri, P., Montecucchi, P. C., Henschel, A., D'urso, R., Iellamo, R., and Falaschi, P. 1983, *Pharmacol. Res. Commun.*, 15, 427-38.

23. Lovejoy, D. A. and Balment, R. J. 1999, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 115, 1-22.
24. Perrin, M. H. and Vale, W. W. 1999, *Ann. NY Acad. Sci.*, 885, 312-28.
25. Huising, M. O. and Flik, G. 2005, *Endocrinology*, 146, 2165-70.
26. Furutani, Y., Morimoto, Y., Shibahara, S., Noda, M., Takahashi, H., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T., and Numa, S. 1983, *Nature*, 301, 537-40.
27. Shibahara, S., Morimoto, Y., Furutani, Y., Notake, M., Takahashi, H., Shimizu, S., Horikawa, S., and Numa, S. 1983, *EMBO J.*, 2, 775-9.
28. Klavdieva, M. M. 1995, *Front Neuroendocrinol.*, 16, 293-321.
29. Jahn, O., Radulovic, J., Stiedl, O., Tezval, H., Eckart, K., and Spiess, J. 2005, *Mini Rev. Med. Chem.*, 5, 953-60.
30. Potter, E., Behan, D. P., Fischer, W. H., Linton, E. A., Lowry, P. J., and Vale, W. W. 1991, *Nature*, 349, 423-6.
31. Chen, A. M., Perrin, M. H., Digruccio, M. R., Vaughan, J. M., Brar, B. K., Arias, C. M., Lewis, K. A., Rivier, J. E., Sawchenko, P. E., and Vale, W. W. 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 2620-5.
32. Huising, M. O., Vaughan, J. M., Shah, S. H., Grillot, K. L., Donaldson, C. J., Rivier, J., Flik, G., and Vale, W. W. 2008, *J. Biol. Chem.*, 283, 8902-12.
33. Chen, R., Lewis, K. A., Perrin, M. H., and Vale, W. W. 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8967-71.
34. Lovenberg, T. W., Liaw, C. W., Grigoriadis, D. E., Clevenger, W., Chalmers, D. T., De Souza, E. B., and Oltersdorf, T. 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 836-40.
35. Hofmann, B. A., Sydow, S., Jahn, O., Van Werven, L., Liepold, T., Eckart, K., and Spiess, J. 2001, *Protein Sci.*, 10, 2050-62.
36. Pal, K., Swaminathan, K., Xu, H. E., and Pioszak, A. A. 2010, *J. Biol. Chem.*, 285, 40351-61.
37. Dautzenberg, F. M. and Hauger, R. L. 2002, *Trends Pharmacol. Sci.*, 23, 71-7.
38. Grace, C. R., Perrin, M. H., Cantle, J. P., Vale, W. W., Rivier, J. E., and Riek, R. 2007, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 16102-14.
39. Assil, I. Q. and Abou-Samra, A. B. 2001, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 281, E1015-21.
40. Dautzenberg, F. M., Braun, S., and Hauger, R. L. 2001, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 280, R935-46.
41. Pisarchik, A. and Slominski, A. 2004, *Eur. J. Biochem.*, 271, 2821-30.
42. Zmijewski, M. A. and Slominski, A. T. 2010, *Acta. Biochim. Pol.*, 57, 1-13.
43. Karteris, E., Markovic, D., Chen, J., Hillhouse, E. W., and Grammatopoulos, D. K. 2010, *Endocrinology*, 151, 4959-68.
44. Wu, S. V., Yuan, P. Q., Lai, J., Wong, K., Chen, M. C., Ohning, G. V., and Tache, Y. 2011, *Endocrinology*, 152, 126-37.
45. Catalano, R. D., Kyriakou, T., Chen, J., Easton, A., and Hillhouse, E. W. 2003, *Mol. Endocrinol.*, 17, 395-410.
46. Hauger, R. L., Grigoriadis, D. E., Dallman, M. F., Plotsky, P. M., Vale, W. W., and Dautzenberg, F. M. 2003, *Pharmacol. Rev.*, 55, 21-6.
47. Liaw, C. W., Grigoriadis, D. E., Lovenberg, T. W., De Souza, E. B., and Maki, R. A. 1997, *Mol. Endocrinol.*, 11, 980-5.
48. Chen, A., Perrin, M., Brar, B., Li, C., Jamieson, P., Digruccio, M., Lewis, K., and Vale, W. 2005, *Mol. Endocrinol.*, 19, 441-58.
49. Wu, S. V., Yuan, P. Q., Wang, L., Peng, Y. L., Chen, C. Y., and Tache, Y. 2007, *Endocrinology*, 148, 1675-87.
50. Evans, R. T. and Seasholtz, A. F. 2009, *Endocrinology*, 150, 4191-202.
51. Sztainberg, Y., Kuperman, Y., Issler, O., Gil, S., Vaughan, J., Rivier, J., Vale, W., and Chen, A. 2009, *FASEB J.*, 23, 2186-96.
52. Grigoriadis, D. E. and De Souza, E. B. 1989, *Endocrinology*, 125, 1877-88.
53. Spiess, J., Dautzenberg, F. M., Sydow, S., Hauger, R. L., Ruhmann, A., Blank, T., and Radulovic, J. 1998, *Trends Endocrinol. Metab.*, 9, 140-5.
54. Groux-Degroote, S., Krzewinski-Recchi, M. A., Cazet, A., Vincent, A., Lehoux, S., Lafitte, J. J., Van Seuning, I., and Delannoy, P. 2008, *Biochem. J.*, 410, 213-23.

55. Chen, F. M., Bilezikjian, L. M., Perrin, M. H., Rivier, J., and Vale, W. 1986, *Brain Res.*, 381, 49-57.
56. Hillhouse, E. W. and Grammatopoulos, D. K. 2006, *Endocr. Rev.*, 27, 260-86.
57. Gutknecht, E., Vauquelin, G., and Dautzenberg, F. M. 2010, *Eur. J. Pharmacol.*, 642, 1-9.
58. Grammatopoulos, D. K., Randeva, H. S., Levine, M. A., Kanellopoulou, K. A., and Hillhouse, E. W. 2001, *J. Neurochem.*, 76, 509-19.
59. Karteris, E., Grammatopoulos, D., Randeva, H., and Hillhouse, E. W. 2000, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 1989-96.
60. Grammatopoulos, D. K. and Chrousos, G. P. 2002, *Trends Endocrinol. Metab.*, 13, 436-44.
61. Yuan, Z., Mccauley, R., Chen-Scarabelli, C., Abounit, K., Stephanou, A., Barry, S. P., Knight, R., Saravolatz, S. F., Saravolatz, L. D., Ulgen, B. O., Scarabelli, G. M., Faggian, G., Mazzucco, A., Saravolatz, L., and Scarabelli, T. M. 2010, *Mol. Cell Endocrinol.*, 325, 1-7.
62. Van Kolen, K., Dautzenberg, F. M., Verstraeten, K., Royaux, I., De Hoogt, R., Gutknecht, E., and Peeters, P. J. 2010, *Neuropharmacology*, 58, 135-44.
63. Teli, T., Markovic, D., Levine, M. A., Hillhouse, E. W., and Grammatopoulos, D. K. 2005, *Mol. Endocrinol.*, 19, 474-90.
64. Markovic, D., Punn, A., Lehnert, H., and Grammatopoulos, D. K. 2008, *Mol. Endocrinol.*, 22, 689-706.
65. Rasmussen, T. N., Novak, I., and Nielsen, S. M. 2004, *Eur. J. Biochem.*, 271, 4366-74.
66. Hauger, R. L., Olivares-Reyes, J. A., Braun, S., Catt, K. J., and Dautzenberg, F. M. 2003, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 306, 794-803.
67. Zorrilla, E. P., Tache, Y., and Koob, G. F. 2003, *Trends Pharmacol. Sci.*, 24, 421-7.
68. Bakshi, V. P., Newman, S. M., Smith-Roe, S., Jochman, K. A., and Kalin, N. H. 2007, *J. Neurosci.*, 27, 10568-77.
69. Clark, M. S. and Kaiyala, K. J. 2003, *Semin. Clin. Neuropsychiatry*, 8, 119-36.
70. Owens, M. J. and Nemeroff, C. B. 1993, *Ciba Found Symp.*, 172, 296-308, discussion 308-16.
71. Boorse, G. C. and Denver, R. J. 2006, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 146, 9-18.
72. Lakshmanan, J., Magee, T. R., Richard, J. D., Liu, G. L., Salido, E., Sugano, S. K., Ferrini, M., and Ross, M. G. 2008, *Neurogastroenterol. Motil.*, 20, 1328-39.
73. Chang, J., Hoy, J. J., Idumalla, P. S., Clifton, M. S., Pecoraro, N. C., and Bhargava, A. 2007, *Peptides*, 28, 1453-60.
74. Wlk, M., Wang, C. C., Venihaki, M., Liu, J., Zhao, D., Anton, P. M., Mykoniatis, A., Pan, A., Zacks, J., Karalis, K., and Pothoulakis, C. 2002, *Gastroenterology*, 123, 505-15.
75. Perrin, M., Donaldson, C., Chen, R., Blount, A., Berggren, T., Bilezikjian, L., Sawchenko, P., and Vale, W. 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 2969-73.
76. Liu, S., Gao, N., Hu, H. Z., Wang, X., Wang, G. D., Fang, X., Gao, X., Xia, Y., and Wood, J. D. 2006, *J. Comp. Neurol.*, 494, 63-74.
77. Porcher, C., Juhem, A., Peinnequin, A., Sinniger, V., and Bonaz, B. 2005, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 288, G1091-103.
78. Chatzaki, E., Crowe, P. D., Wang, L., Million, M., Tache, Y., and Grigoriadis, D. E. 2004, *J. Neurochem.*, 90, 309-16.
79. Bisschops, R., Vanden Berghe, P., Sarnelli, G., Janssens, J., and Tack, J. 2006, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 290, G1252-60.
80. La Fleur, S. E., Wick, E. C., Idumalla, P. S., Grady, E. F., and Bhargava, A. 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 7647-52.
81. Sand, E., Themner-Persson, A., and Ekblad, E. 2011, *Regul. Pept.*, 166, 68-75.
82. Kozicz, T. and Arimura, A. 2002, *Peptides*, 23, 515-21.
83. Harada, S., Imaki, T., Naruse, M., Chikada, N., Nakajima, K., and Demura, H. 1999, *Neurosci. Lett.*, 267, 125-8.
84. Chen, A., Blount, A., Vaughan, J., Brar, B., and Vale, W. 2004, *Endocrinology*, 145, 2445-57.

85. Hsu, S. Y. and Hsueh, A. J. 2001, *Nat. Med.*, 7, 605-11.
86. Muramatsu, Y., Fukushima, K., Iino, K., Totsune, K., Takahashi, K., Suzuki, T., Hirasawa, G., Takeyama, J., Ito, M., Nose, M., Tashiro, A., Hongo, M., Oki, Y., Nagura, H., and Sasano, H. 2000, *Peptides*, 21, 1799-809.
87. Wallon, C., Yang, P. C., Keita, A. V., Ericson, A. C., McKay, D. M., Sherman, P. M., Perdue, M. H., and Soderholm, J. D. 2008, *Gut*, 57, 50-8.
88. Yuan, P. Q., Million, M., Wu, S. V., Rivier, J., and Tache, Y. 2007, *Neurogastroenterol. Motil.*, 19, 923-36.
89. Saruta, M., Takahashi, K., Suzuki, T., Fukuda, T., Torii, A., and Sasano, H. 2005, *Peptides*, 26, 1196-206.
90. Cao, J., Papadopoulou, N., Kempuraj, D., Boucher, W. S., Sugimoto, K., Cetrulo, C. L., and Theoharides, T. C. 2005, *J. Immunol.*, 174, 7665-75.
91. Kimura, T., Amano, T., Uehara, H., Ariga, H., Ishida, T., Torii, A., Tajiri, H., Matsueda, K., and Yamato, S. 2007, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 293, G903-10.
92. O'malley, D., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. 2010, *Peptides*, 31, 662-70.
93. O'malley, D., Julio-Pieper, M., Gibney, S. M., Gosselin, R. D., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. 2010, *Neurogastroenterol. Motil.*, 22, 301-11.
94. Kokkotou, E., Torres, D., Moss, A. C., O'brien, M., Grigoriadis, D. E., Karalis, K., and Pothoulakis, C. 2006, *J. Immunol.*, 177, 3355-61.
95. Moss, A. C., Anton, P., Savidge, T., Newman, P., Cheifetz, A. S., Gay, J., Paraschos, S., Winter, M. W., Moyer, M. P., Karalis, K., Kokkotou, E., and Pothoulakis, C. 2007, *Gut*, 56, 1210-7.
96. Von Mentzer, B., Murata, Y., Ahlstedt, I., Lindstrom, E., and Martinez, V. 2007, *Biochem. Pharmacol.*, 73, 805-13.
97. Bale, T. L., Giordano, F. J., Hickey, R. P., Huang, Y., Nath, A. K., Peterson, K. L., Vale, W. W., and Lee, K. F. 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 7734-9.
98. Kawahito, Y., Sano, H., Kawata, M., Yuri, K., Mukai, S., Yamamura, Y., Kato, H., Chrousos, G. P., Wilder, R. L., and Kondo, M. 1994, *Gastroenterology*, 106, 859-65.
99. Kawahito, Y., Sano, H., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Yamamura, Y., Kato, H., Chrousos, G. P., Wilder, R. L., and Kondo, M. 1995, *Gut*, 37, 544-51.
100. Bhatia, V. and Tandon, R. K. 2005, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 20, 332-9.
101. Saruta, M., Takahashi, K., Suzuki, T., Torii, A., Kawakami, M., and Sasano, H. 2004, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89, 5352-61.
102. Hsu, S. Y. 2004, *J. Reprod. Immunol.*, 63, 75-83.
103. Barreau, F., Cartier, C., Leveque, M., Ferrier, L., Moriez, R., Laroute, V., Rosztoczy, A., Fioramonti, J., and Bueno, L. 2007, *J. Physiol.*, 580, 347-56.
104. Neunlist, M., Toumi, F., Oreschkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Labois, C. L., Galmiche, J. P., and Jarry, A. 2003, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 285, G1028-36.
105. Wallon, C., Persborn, M., Jonsson, M., Wang, A., Phan, V., Lampinen, M., Vicario, M., Santos, J., Sherman, P. M., Carlson, M., Ericson, A. C., McKay, D. M., and Soderholm, J. D. 2011, *Gastroenterology*, in press.
106. Van Der Laan, S., Lachize, S. B., Vreugdenhil, E., De Kloet, E. R., and Meijer, O. C. 2008, *Endocrinology*, 149, 725-32.
107. Nanda, S. A., Roseboom, P. H., Nash, G. A., Speers, J. M., and Kalin, N. H. 2004, *Endocrinology*, 145, 5605-15.
108. Jamieson, P. M., Li, C., Kukura, C., Vaughan, J., and Vale, W. 2006, *Endocrinology*, 147, 4578-88.
109. Chen, A., Vaughan, J., and Vale, W. W. 2003, *Mol. Endocrinol.*, 17, 1622-39.
110. Adzic, M., Djordjevic, J., Djordjevic, A., Niciforovic, A., Demonacos, C., Radojic, M., and Krstic-Demonacos, M. 2009, *J. Endocrinol.*, 202, 87-97.
111. Huising, M. O., Pilbrow, A. P., Matsumoto, M., Van Der Meulen, T., Park, H., Vaughan, J. M., Lee, S., and Vale, W. W. 2011, *Endocrinology*, 152, 138-50.

112. Yuan, P. Q., Wu, S. V., Wang, L., and Tache, Y. 2010, *Peptides*, 31, 322-31.
113. Coutinho, S. V., Plotsky, P. M., Sablad, M., Miller, J. C., Zhou, H., Bayati, A. I., Mcroberts, J. A., and Mayer, E. A. 2002, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 282, G307-16.
114. Soderholm, J. D., Yates, D. A., Gareau, M. G., Yang, P. C., Macqueen, G., and Perdue, M. H. 2002, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 283, G1257-63.
115. Ren, T. H., Wu, J., Yew, D., Ziea, E., Lao, L., Leung, W. K., Berman, B., Hu, P. J., and Sung, J. J. 2007, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 292, G849-56.
116. Schoenherr, C. J., Paquette, A. J., and Anderson, D. J. 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 9881-6.
117. Seth, K. A. and Majzoub, J. A. 2001, *J. Biol. Chem.*, 276, 13917-23.
118. Dorin, R. I., Zlock, D. W., and Kilpatrick, K. 1993, *Mol. Cell Endocrinol.*, 96, 99-111.
119. Zhao, L., Donaldson, C. J., Smith, G. W., and Vale, W. W. 1998, *Genomics*, 50, 23-33.
120. Chen, X. N., Zhu, H., Meng, Q. Y., and Zhou, J. N. 2008, *Brain Res.*, 1223, 1-10.
121. Qiu, B. S., Vallance, B. A., Blennerhassett, P. A., and Collins, S. M. 1999, *Nat. Med.*, 5, 1178-82.
122. Melgar, S., Engstrom, K., Jagervall, A., and Martinez, V. 2008, *Stress*, 11, 348-62.
123. Collins, S. M. 2001, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 280, G315-8.
124. Mawdsley, J. E. and Rampton, D. S. 2006, *Neuroimmunomodulation*, 13, 327-36.
125. Strober, W., Fuss, I. J., and Blumberg, R. S. 2002, *Annu. Rev. Immunol.*, 20, 495-549.
126. Elson, C. O., Sartor, R. B., Tennyson, G. S., and Riddell, R. H. 1995, *Gastroenterology*, 109, 1344-67.
127. Van Tol, E. A., Petrusz, P., Lund, P. K., Yamauchi, M., and Sartor, R. B. 1996, *Gut*, 39, 385-92.
128. Biswas, A., Wilmanski, J., Forsman, H., Hrnecir, T., Hao, L., Tlaskalova-Hogenova, H., and Kobayashi, K. S. 2011, *Eur. J. Immunol.*, 41, 182-94.
129. Cario, E. and Podolsky, D. K. 2000, *Infect. Immun.*, 68, 7010-7.
130. Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., and Gordon, J. I. 2005, *Science*, 307, 1915-20.
131. Fina, D. and Pallone, F. 2008, *Inflamm. Bowel Dis.*, 14(Suppl. 2), S117-8.
132. Shi, X. Z., Winston, J. H., and Sarna, S. K. 2011, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 300, G41-51.
133. Piche, T., Saint-Paul, M. C., Dainese, R., Marine-Barjoan, E., Iannelli, A., Montoya, M. L., Peyron, J. F., Czerucka, D., Cherikh, F., Filippi, J., Tran, A., and Hebuterne, X. 2008, *Gut*, 57, 468-73.
134. Hossain, Z. and Hirata, T. 2008, *Mol. Biosyst.*, 4, 1181-5.
135. Anderson, J. M., Van Itallie, C. M., and Fanning, A. S. 2004, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16, 140-5.
136. Niessen, C. M. 2007, *J. Invest. Dermatol.*, 127, 2525-32.
137. Perez-Moreno, M., Jamora, C., and Fuchs, E. 2003, *Cell*, 112, 535-48.
138. Dusek, R. L., Godsel, L. M., and Green, K. J. 2007, *J. Dermatol. Sci.*, 45, 7-21.
139. Gershon, M. D. and Tack, J. 2007, *Gastroenterology*, 132, 397-414.
140. Duerkop, B. A., Vaishnava, S., and Hooper, L. V. 2009, *Immunity*, 31, 368-76.
141. Patsos, G. and Corfield, A. 2009, *Biol. Chem.*, 390, 581-90.
142. Black, P. H. 2002, *Brain Behav. Immun.*, 16, 622-53.
143. Lightman, S. L. 2008, *J. Neuroendocrinol.*, 20, 880-4.
144. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., and Delgado, M. 2007, *Nat. Rev. Immunol.*, 7, 52-63.
145. Gross, K. J. and Pothoulakis, C. 2007, *Inflamm. Bowel Dis.*, 13, 918-32.
146. Shao, L., Serrano, D., and Mayer, L. 2001, *Semin. Immunol.*, 13, 163-76.
147. Barclay, G. R. and Turnberg, L. A. 1987, *Gastroenterology*, 93, 91-7.
148. Santos, J., Saperas, E., Nogueiras, C., Mourelle, M., Antolin, M., Cadahia, A., and Malagelada, J. R. 1998, *Gastroenterology*, 114, 640-8.

149. Alonso, C., Guilarte, M., Vicario, M., Ramos, L., Ramadan, Z., Antolin, M., Martinez, C., Rezzi, S., Saperas, E., Kochhar, S., Santos, J., and Malagelada, J. R. 2008, *Gastroenterology*, 135, 163-172 e1.
150. Dunlop, S. P., Hebden, J., Campbell, E., Naesdal, J., Olbe, L., Perkins, A. C., and Spiller, R. C. 2006, *Am. J. Gastroenterol.*, 101, 1288-94.
151. Zhou, Q., Zhang, B., and Verne, G. N. 2009, *Pain*, 146, 41-6.
152. Piche, T., Barbara, G., Aubert, P., Bruley Des Varannes, S., Dainese, R., Nano, J. L., Cremon, C., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Galmiche, J. P., and Neunlist, M. 2009, *Gut*, 58, 196-201.
153. Barbara, G., Wang, B., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Cremon, C., Di Nardo, G., Trevisani, M., Campi, B., Geppetti, P., Tonini, M., Bunnett, N. W., Grundy, D., and Corinaldesi, R. 2007, *Gastroenterology*, 132, 26-37.
154. Santos, J., Saunders, P. R., Hanssen, N. P., Yang, P. C., Yates, D., Groot, J. A., and Perdue, M. H. 1999, *Am. J. Physiol.*, 277, G391-9.
155. Saunders, P. R., Santos, J., Hanssen, N. P., Yates, D., Groot, J. A., and Perdue, M. H. 2002, *Dig. Dis. Sci.*, 47, 208-15.
156. Cameron, H. L. and Perdue, M. H. 2005, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 314, 214-20.
157. Demaude, J., Salvador-Cartier, C., Fioramonti, J., Ferrier, L., and Bueno, L. 2006, *Gut*, 55, 655-61.
158. Soderholm, J. D., Yang, P. C., Ceponis, P., Vohra, A., Riddell, R., Sherman, P. M., and Perdue, M. H. 2002, *Gastroenterology*, 123, 1099-108.
159. Saunders, P. R., Kosecka, U., McKay, D. M., and Perdue, M. H. 1994, *Am. J. Physiol.*, 267, G794-9.
160. Gareau, M. G., Silva, M. A., and Perdue, M. H. 2008, *Curr. Mol. Med.*, 8, 274-81.
161. Teitelbaum, A. A., Gareau, M. G., Jury, J., Yang, P. C., and Perdue, M. H. 2008, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 295, G452-9.
162. Larauche, M., Gourcerol, G., Wang, L., Pambukchian, K., Brunnhuber, S., Adelson, D. W., Rivier, J., Million, M., and Tache, Y. 2009, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 297, G215-27.
163. Zheng, P. Y., Feng, B. S., Oluwole, C., Struiksmas, S., Chen, X., Li, P., Tang, S. G., and Yang, P. C. 2009, *Gut*, 58, 1473-9.
164. Santos, J., Yang, P. C., Soderholm, J. D., Benjamin, M., and Perdue, M. H. 2001, *Gut*, 48, 630-6.
165. Zweers, M. C., Davidson, J. M., Pozzi, A., Hallinger, R., Janz, K., Quondamatteo, F., Leutgeb, B., Krieg, T., and Eckes, B. 2007, *J. Invest. Dermatol.*, 127, 467-78.
166. Castagliuolo, I., Lamont, J. T., Qiu, B., Fleming, S. M., Bhaskar, K. R., Nikulasson, S. T., Kornetsky, C., and Pothoulakis, C. 1996, *Am. J. Physiol.*, 271, G884-92.
167. Ferrier, L., Mazelin, L., Cenac, N., Desreumaux, P., Janin, A., Emilie, D., Colombel, J. F., Garcia-Villar, R., Fioramonti, J., and Bueno, L. 2003, *Gastroenterology*, 125, 795-804.
168. Estienne, M., Clautre, J., Clain-Gardechaux, G., Paquet, A., Tache, Y., Fioramonti, J., and Plaisancie, P. 2010, *Gut*, 59, 744-51.
169. Bjerknes, M. and Cheng, H. 1999, *Gastroenterology*, 116, 7-14.
170. Boudry, G., Jury, J., Yang, P. C., and Perdue, M. H. 2007, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 292, G1228-32.
171. Cooke, H. J. 1998, *News Physiol. Sci.*, 13, 269-274.
172. Saunders, P. R., Hanssen, N. P., and Perdue, M. H. 1997, *Am. J. Physiol.*, 273, G486-90.
173. Kiliaan, A. J., Saunders, P. R., Bijlsma, P. B., Berin, M. C., Taminiiau, J. A., Groot, J. A., and Perdue, M. H. 1998, *Am. J. Physiol.*, 275, G1037-44.
174. Gareau, M. G., Jury, J., and Perdue, M. H. 2007, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 293, G198-203.
175. Demaude, J., Leveque, M., Chaumaz, G., Eutamene, H., Fioramonti, J., Bueno, L., and Ferrier, L. 2009, *Life Sci.*, 84, 847-52.

176. Scudamore, C. L., Jepson, M. A., Hirst, B. H., and Miller, H. R. 1998, *Eur. J. Cell Biol.*, 75, 321-30.
177. Cenac, N., Chin, A. C., Garcia-Villar, R., Salvador-Cartier, C., Ferrier, L., Vergnolle, N., Buret, A. G., Fioramonti, J., and Bueno, L. 2004, *J. Physiol.*, 558, 913-25.
178. Jacob, C., Yang, P. C., Darmoul, D., Amadesi, S., Saito, T., Cottrell, G. S., Coelho, A. M., Singh, P., Grady, E. F., Perdue, M., and Bunnett, N. W. 2005, *J. Biol. Chem.*, 280, 31936-48.
179. Pfeiffer, C. J., Qiu, B., and Lam, S. K. 2001, *J. Physiol. Paris*, 95, 81-7.
180. Barreau, F., Ferrier, L., Fioramonti, J., and Bueno, L. 2004, *Gut*, 53, 501-6.
181. Leon, A., Burianni, A., Dal Toso, R., Fabris, M., Romanello, S., Aloe, L., and Levi-Montalcini, R. 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3739-43.
182. Farhadi, A., Fields, J. Z., and Keshavarzian, A. 2007, *World J. Gastroenterol.*, 13, 3027-30.
183. Tixier, E., Lalanne, F., Just, I., Galmiche, J. P., and Neunlist, M. 2005, *Cell Microbiol.*, 7, 1798-810.
184. Boucher, M. J., Laprise, P., and Rivard, N. 2005, *J. Cell Physiol.*, 202, 178-90.
185. Gumbiner, B. M. 2000, *J. Cell Biol.*, 148, 399-404.
186. Pothoulakis, C., Castagliuolo, I., and Leeman, S. E. 1998, *Ann. NY Acad. Sci.*, 840, 635-48.
187. Chang, Y. W., Marlin, J. W., Chance, T. W., and Jakobi, R. 2006, *Cancer Res.*, 66, 11700-8.
188. Tanaka, M. N., Diaz, B. L., De Souza, W., and Morgado-Diaz, J. A. 2008, *BMC Cell Biol.*, 9, 63.
189. De Giorgio, R. and Barbara, G. 2008, *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 10, 385-90.
190. Spiller, R. and Garsed, K. 2009, *Dig. Liver Dis.*, 41, 844-9.
191. Radulovic, M. and Spiess, J. 2001, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 49, 33-8.
192. Asfaha, S., Macnaughton, W. K., Appleyard, C. B., Chadee, K., and Wallace, J. L. 2001, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 281, G635-44.
193. Artis, D. 2008, *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 411-20.
194. Salim, S. Y. and Soderholm, J. D. 2011, *Inflamm. Bowel Dis.*, 17, 362-81.
195. Velin, A. K., Ericson, A. C., Braaf, Y., Wallon, C., and Soderholm, J. D. 2004, *Gut*, 53, 494-500.
196. Keita, A. V., Salim, S. Y., Jiang, T., Yang, P. C., Franzen, L., Soderkvist, P., Magnusson, K. E., and Soderholm, J. D. 2008, *J. Pathol.*, 215, 135-44.
197. Heimesaat, M. M., Fischer, A., Jahn, H. K., Niebergall, J., Freudenberg, M., Blaut, M., Liesenfeld, O., Schumann, R. R., Gobel, U. B., and Bereswill, S. 2007, *Gut*, 56, 941-8.
198. Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Alissafi, T., Charalampopoulos, I., Dermizaki, E., Roger, T., Gravanis, A., and Margioris, A. N. 2006, *J. Immunol.*, 176, 1869-77.
199. Rakoff-Nahoum, S., Hao, L., and Medzhitov, R. 2006, *Immunity*, 25, 319-29.
200. De Jager, P. L., Graham, R., Farwell, L., Sawcer, S., Richardson, A., Behrens, T. W., Compston, A., Hafler, D. A., Kere, J., Vyse, T. J., and Rioux, J. D. 2006, *Genes Immun.*, 7, 327-34.
201. Chaniotou, Z., Giannogonas, P., Theoharis, S., Teli, T., Gay, J., Savidge, T., Koutmani, Y., Brugni, J., Kokkotou, E., Pothoulakis, C., and Karalis, K. P. 2010, *Gastroenterology*, 139, 2083-92.
202. Wehkamp, J. and Stange, E. F. 2006, *Ann. NY Acad. Sci.*, 1072, 321-31.
203. Aldhous, M. C., Noble, C. L., and Satsangi, J. 2009, *PLoS One*, 4, e6285.
204. Ramasundara, M., Leach, S. T., Lemberg, D. A., and Day, A. S. 2009, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 24, 202-8.
205. Arseneau, K. O., Tamagawa, H., Pizarro, T. T., and Cominelli, F. 2007, *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 9, 508-12.
206. Sanchez-Munoz, F., Dominguez-Lopez, A., and Yamamoto-Furusho, J. K. 2008, *World J. Gastroenterol.*, 14, 4280-8.
207. Singh, V. K. and Leu, S. J. 1990, *Neurosci. Lett.*, 120, 151-4.
208. Guilarte, M., Santos, J., De Torres, I., Alonso, C., Vicario, M., Ramos, L., Martinez, C., Casellas, F., Saperas, E., and Malagelada, J. R. 2007, *Gut*, 56, 203-9.

209. Ohman, L., Isaksson, S., Lundgren, A., Simren, M., and Sjovall, H. 2005, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 3, 980-6.
210. Saunders, P. R., Miceli, P., Vallance, B. A., Wang, L., Pinto, S., Tougas, G., Kamath, M., and Jacobson, K. 2006, *Auton. Neurosci.*, 124, 56-68.
211. Bale, T. L. and Vale, W. W. 2003, *J. Neurosci.*, 23, 5295-301.
212. Coste, S. C., Heard, A. D., Phillips, T. J., and Stenzel-Poore, M. P. 2006, *Genes Brain Behav.*, 5, 131-8.
213. Neufeld-Cohen, A., Evans, A. K., Getselter, D., Spyroglou, A., Hill, A., Gil, S., Tsoory, M., Beuschlein, F., Lowry, C. A., Vale, W., and Chen, A. 2010, *Mol. Psychiatry*, 15, 426-41, 339.
214. Im, E., Rhee, S. H., Park, Y. S., Fiocchi, C., Tache, Y., and Pothoulakis, C. 2010, *Gastroenterology*, 138, 2457-67, 2467 e1-5.
215. Anton, P. M., Gay, J., Mykoniatis, A., Pan, A., O'brien, M., Brown, D., Karalis, K., and Pothoulakis, C. 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 8503-8.
216. Gay, J., Kokkotou, E., O'brien, M., Pothoulakis, C., and Karalis, K. P. 2008, *Endocrinology*, 149, 3403-9.
217. Agelaki, S., Tsatsanis, C., Gravanis, A., and Margioris, A. N. 2002, *Infect. Immun.*, 70, 6068-74.
218. Webster, E. L., Barrientos, R. M., Contoreggi, C., Isaac, M. G., Ligier, S., Gabry, K. E., Chrousos, G. P., Mccarthy, E. F., Rice, K. C., Gold, P. W., and Sternberg, E. M. 2002, *J. Rheumatol.*, 29, 1252-61.
219. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Varela, N., Robledo, G., and Delgado, M. 2006, *Am. J. Pathol.*, 168, 1921-30.
220. Gonzalez-Rey, E., Fernandez-Martin, A., Chorny, A., and Delgado, M. 2006, *Gut*, 55, 824-32.
221. Chatzaki, E., Lambropoulou, M., Constantinidis, T. C., Papadopoulos, N., Tache, Y., Minopoulos, G., and Grigoriadis, D. E. 2006, *J. Cell Physiol.*, 209, 905-11.
222. Huang, M., Kempuraj, D., Papadopolou, N., Kourelis, T., Donelan, J., Manola, A., and Theoharides, T. C. 2009, *J. Mol. Endocrinol.*, 42, 397-405.
223. Stengel, A. and Tache, Y. 2009, *Annu. Rev. Physiol.*, 71, 219-39.
224. Goetzl, E. J., Chan, R. C., and Yadav, M. 2008, *Ann. NY Acad. Sci.*, 1144, 56-60.
225. Webster Marketon, J. I. and Glaser, R. 2008, *Cell Immunol.*, 252, 16-26.
226. Straub, R. H., Wiest, R., Strauch, U. G., Harle, P., and Scholmerich, J. 2006, *Gut*, 55, 1640-9.
227. Lee, H. J., Kwon, Y. S., Park, C. O., Oh, S. H., Lee, J. H., Wu, W. H., Chang, N. S., Lee, M. G., and Lee, K. H. 2009, *Exp. Dermatol.*, 18, 199-204.
228. Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Dermizaki, E., Gravanis, A., and Margioris, A. N. 2007, *J. Cell Physiol.*, 210, 774-83.
229. Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Dermizaki, E., Charalampopoulos, I., Spiess, J., Gravanis, A., and Margioris, A. N. 2005, *FEBS Lett.*, 579, 4259-64.
230. Laukoetter, M. G., Nava, P., and Nusrat, A. 2008, *World J. Gastroenterol.*, 14, 401-7.
231. Marin, M. L., Greenstein, A. J., Geller, S. A., Gordon, R. E., and Aufses, A. H. Jr. 1983, *Am. J. Gastroenterol.*, 78, 537-47.
232. Fries, W., Mazzon, E., Squarzoni, S., Martin, A., Martines, D., Micali, A., Sturniolo, G. C., Citi, S., and Longo, G. 1999, *Lab Invest.*, 79, 49-57.
233. Olson, T. S., Reuter, B. K., Scott, K. G., Morris, M. A., Wang, X. M., Hancock, L. N., Burcin, T. L., Cohn, S. M., Ernst, P. B., Cominelli, F., Meddings, J. B., Ley, K., and Pizarro, T. T. 2006, *J. Exp. Med.*, 203, 541-52.
234. Bouma, G. and Strober, W. 2003, *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 521-33.
235. Gassler, N., Rohr, C., Schneider, A., Kartenbeck, J., Bach, A., Obermuller, N., Otto, H. F., and Autschbach, F. 2001, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 281, G216-28.
236. Radford-Smith, G. and Jewell, D. P. 1996, *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 10, 151-64.
237. Hermiston, M. L. and Gordon, J. I. 1995, *Science*, 270, 1203-7.

-
238. Zbar, A. P., Simopoulos, C., and Karayiannakis, A. J. 2004, *J. Gastroenterol.*, 39, 413-21.
239. Jankowski, J. A., Bedford, F. K., Boulton, R. A., Cruickshank, N., Hall, C., Elder, J., Allan, R., Forbes, A., Kim, Y. S., Wright, N. A., and Sanders, D. S. 1998, *Lab. Invest.*, 78, 1155-67.
240. Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X., and Reinecker, H. C. 2000, *Gastroenterology*, 118, 1001-11.
241. Issenman, R. M., Jenkins, R. T., and Radoja, C. 1993, *Clin. Invest. Med.*, 16, 187-96.
242. Jenkins, R. T., Ramage, J. K., Jones, D. B., Collins, S. M., Goodacre, R. L., and Hunt, R. H. 1988, *Clin. Invest. Med.*, 11, 151-5.
243. Munkholm, P., Langholz, E., Hollander, D., Thornberg, K., Orholm, M., Katz, K. D., and Binder, V. 1994, *Gut*, 35, 68-72.
244. Miki, K., Moore, D. J., Butler, R. N., Southcott, E., Couper, R. T., and Davidson, G. P. 1998, *J. Pediatr.*, 133, 750-4.
245. Wang, F., Graham, W. V., Wang, Y., Witkowski, E. D., Schwarz, B. T., and Turner, J. R. 2005, *Am. J. Pathol.*, 166, 409-19.
246. Zeissig, S., Burgel, N., Gunzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A. J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J. D. 2007, *Gut*, 56, 61-72.
247. Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K. L., Powell, R. M., Macdonald, T. T., and Collins, J. E. 2005, *Lab. Invest.*, 85, 1139-62.
248. Bruewer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, C. A., Madara, J. L., Hopkins, A. M., and Nusrat, A. 2003, *J. Immunol.*, 171, 6164-72.
249. Bruewer, M., Utech, M., Ivanov, A. I., Hopkins, A. M., Parkos, C. A., and Nusrat, A. 2005, *FASEB J.*, 19, 923-33.
250. Poritz, L. S., Garver, K. I., Tilberg, A. F., and Koltun, W. A. 2004, *J. Surg. Res.*, 116, 14-8.
251. Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A. H., Burgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W., and Schulzke, J. D. 2005, *Gastroenterology*, 129, 550-64.
252. Al-Sadi, R. M. and Ma, T. Y. 2007, *J. Immunol.*, 178, 4641-9.
253. Tytgat, K. M., Van Der Wal, J. W., Einerhand, A. W., Buller, H. A., and Dekker, J. 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 224, 397-405.
254. Danese, S. and Mantovani, A. 2010, *Oncogene*, 29, 3313-23.
255. Rutter, M., Saunders, B., Wilkinson, K., Rumbles, S., Schofield, G., Kamm, M., Williams, C., Price, A., Talbot, I., and Forbes, A. 2004, *Gastroenterology*, 126, 451-9.
256. Eaden, J. A., Abrams, K. R., and Mayberry, J. F. 2001, *Gut*, 48, 526-35.
257. Rutter, M. D., Saunders, B. P., Wilkinson, K. H., Rumbles, S., Schofield, G., Kamm, M. A., Williams, C. B., Price, A. B., Talbot, I. C., and Forbes, A. 2006, *Gastroenterology*, 130, 1030-8.
258. Ekbo, A., Helmick, C., Zack, M., and Adami, H. O. 1991, *Gastroenterology*, 100, 350-8.
259. Van Staa, T. P., Card, T., Logan, R. F., and Leufkens, H. G. 2005, *Gut*, 54, 1573-8.
260. Velayos, F. S., Terdiman, J. P., and Walsh, J. M. 2005, *Am. J. Gastroenterol.*, 100, 1345-53.
261. Cooper, H. S., Murthy, S., Kido, K., Yoshitake, H., and Flanigan, A. 2000, *Carcinogenesis*, 21, 757-68.
262. Shattuck-Brandt, R. L., Varilek, G. W., Radhika, A., Yang, F., Washington, M. K., and Dubois, R. N. 2000, *Gastroenterology*, 118, 337-45.
263. Hussain, S. P., Hofseth, L. J., and Harris, C. C. 2003, *Nat. Rev. Cancer*, 3, 276-85.
264. Zupanc, G. K., Horschke, I., and Lovejoy, D. A. 1999, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 114, 349-64.
265. O'connor, P. M., Lapointe, T. K., Beck, P. L., and Buret, A. G. 2010, *Inflamm. Bowel Dis.*, 16, 1411-20.

266. Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. 2010, *Gastroenterology*, 138, 2101-2114 e5.
267. Rakoff-Nahoum, S. 2006, *Yale J. Biol. Med.*, 79, 123-30.
268. Kaprara, A., Pazaitou-Panayiotou, K., Kortsaris, A., and Chatzaki, E. 2010, *Cell Mol. Life Sci.*, 67, 1293-306.
269. Reubi, J. C., Waser, B., Vale, W., and Rivier, J. 2003, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88, 3312-20.
270. Tezval, H., Jurk, S., Atschekzei, F., Serth, J., Kuczyk, M. A., and Merseburger, A. S. 2009, *Prostate*, 69, 443-8.
271. Miceli, F., Ranelletti, F. O., Martinelli, E., Petrillo, M., Scambia, G., Navarra, P., and Ferrandina, G. 2009, *Mol. Cell Endocrinol.*, 305, 6-11.
272. Florio, P., De Falco, G., Leucci, E., Torricelli, M., Torres, P. B., Toti, P., Dell'anna, A., Tiso, E., Santopietro, R., Leoncini, L., and Petraglia, F. 2006, *J. Endocrinol.*, 190, 99-105.
273. Wakabayashi, I., Ihara, T., Hattori, M., Tonegawa, Y., Shibasaki, T., and Hashimoto, K. 1985, *Cancer*, 55, 995-1000.
274. Shahani, S., Nudelman, R. J., Nalini, R., Kim, H. S., and Samson, S. L. 2010, *Diagn. Pathol.*, 5, 56.
275. Arcuri, F., Cintonino, M., Florio, P., Floccari, F., Pergola, L., Romagnoli, R., Petraglia, F., Tosi, P., and Teresa Del Vecchio, M. 2002, *Prostate*, 52, 167-72.
276. Minas, V., Rolaki, A., Kalantaridou, S. N., Sidiropoulos, J., Mitrou, S., Petsas, G., Jeschke, U., Paraskevidis, E. A., Fountzilias, G., Chrousos, G. P., Pavlidis, N., and Makrigiannakis, A. 2007, *Br. J. Cancer*, 97, 637-45.
277. Kaprara, A., Pazaitou-Panayiotou, K., Chemonidou, M. C., Constantinidis, T. C., Lambropoulou, M., Koffa, M., Kiziridou, A., Kakolyris, S., Kortsaris, A., and Chatzaki, E. 2010, *Neuropeptides*, 44, 355-61.
278. Androulidaki, A., Dermitzaki, E., Venihaki, M., Karagianni, E., Rassouli, O., Andreakou, E., Stournaras, C., Margioris, A. N., and Tsatsanis, C. 2009, *Mol. Cancer*, 8, 30.
279. Baigent, S. M. 2001, *Peptides*, 22, 809-20.
280. Arbiser, J. L., Karalis, K., Viswanathan, A., Koike, C., Anand-Apte, B., Flynn, E., Zetter, B., and Majzoub, J. A. 1999, *J. Invest. Dermatol.*, 113, 838-42.
281. Bale, T. L. and Vale, W. W. 2004, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44, 525-57.
282. Jankowski, J. A., Bedford, F. K., and Kim, Y. S. 1997, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 57, 187-215.
283. Beachy, P. A., Karhadkar, S. S., and Berman, D. M. 2004, *Nature*, 432, 324-31.
284. Gebeshuber, C. A., Sladecsek, S., and Grunert, S. 2007, *Cells Tissues Organs*, 185, 51-60.
285. Arranz, A., Venihaki, M., Mol, B., Androulidaki, A., Dermitzaki, E., Rassouli, O., Ripoll, J., Stathopoulos, E. N., Gomariz, R. P., Margioris, A. N., and Tsatsanis, C. 2010, *Mol. Cancer*, 9, 261.
286. Mohammad, Y. N., Perone, M., Wang, L., Ingleton, P. M., Castro, M. G., and Lovejoy, D. A. 2002, *Biochem. Cell. Biol.*, 80, 475-82.
287. Graziani, G., Tentori, L., Portarena, I., Barbarino, M., Tringali, G., Pozzoli, G., and Navarra, P. 2002, *Endocrinology*, 143, 807-13.
288. Slominski, A., Zbytek, B., Pisarchik, A., Slominski, R. M., Zmijewski, M. A., and Wortsman, J. 2006, *J. Cell Physiol.*, 206, 780-91.
289. Carlson, K. W., Nawy, S. S., Wei, E. T., Sadee, W., Filov, V. A., Rezsova, V. V., Slominski, A., and Quillan, J. M. 2001, *Anticancer Res.*, 21, 1173-9.
290. Graziani, G., Tentori, L., Muzi, A., Vergati, M., Tringali, G., Pozzoli, G., and Navarra, P. 2007, *Mol. Cell Endocrinol.*, 264, 44-9.
291. Wang, J., Jin, L., Chen, J., and Li, S. 2010, *Cancer Invest.*, 28, 146-55.
292. Radulovic, M., Hippel, C., and Spiess, J. 2003, *J. Neurochem.*, 84, 1074-85.
293. Jin, L., Zhang, Q., Guo, R., Wang, L., Wang, J., Wan, R., Zhang, R., Xu, Y., and Li, S. 2011, *J. Mol. Endocrinol.*, 47, 219-27.
294. Hao, Z., Huang, Y., Cleman, J., Jovin, I. S., Vale, W. W., Bale, T. L., and Giordano, F. J. 2008, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 3939-44.

-
295. Wang, J., Xu, Y., Zhu, H., Zhang, R., Zhang, G., and Li, S. 2008, *Cancer Invest.*, 26, 359-68.
296. Folkman, J. 1971, *N. Engl. J. Med.*, 285, 1182-6.
297. Wang, J. and Li, S. 2007, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 362, 785-8.
298. Theoharides, T. C., Singh, L. K., Boucher, W., Pang, X., Letourneau, R., Webster, E., and Chrousos, G. 1998, *Endocrinology*, 139, 403-13.
299. Yang, Y., Park, H., Kim, T. S., Bang, S. I., and Cho, D. 2007, *Exp. Dermatol.*, 16, 22-7.
300. Olson, M. F. and Sahai, E. 2009, *Clin. Exp. Metastasis*, 26, 273-87.
301. Jiang, X., Sinnett-Smith, J., and Rozengurt, E. 2007, *Cell Signal*, 19, 1000-10.
302. Li, L. H., Zheng, M. H., Luo, Q., Ye, Q., Feng, B., Lu, A. G., Wang, M. L., Chen, X. H., Su, L. P., and Liu, B. Y. 2010, *Int. J. Oncol.*, 37, 951-62.
303. Chen, Y., Dube, C. M., Rice, C. J., and Baram, T. Z. 2008, *J. Neurosci.*, 28, 2903-11.
304. Swinny, J. D. and Valentino, R. J. 2006, *Eur. J. Neurosci.*, 24, 2481-90.
305. Punn, A., Levine, M. A., and Grammatopoulos, D. K. 2006, *Mol. Endocrinol.*, 20, 3179-95.
306. Chandras, C., Koutmani, Y., Kokkotou, E., Pothoulakis, C., and Karalis, K. P. 2009, *Endocrinology*, 150, 4606-14.
307. Smith, E. M., Gregg, M., Hashemi, F., Schott, L., and Hughes, T. K. 2006, *Cell Mol. Neurobiol.*, 26, 1021-36.
308. Zhao, J. and Karalis, K. P. 2002, *Mol. Endocrinol.*, 16, 2561-70.
309. Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P. A., Scholmerich, J., and Gross, V. 1998, *Gastroenterology*, 115, 357-69.
310. Yu, H. G., Yu, L. L., Yang, Y., Luo, H. S., Yu, J. P., Meier, J. J., Schrader, H., Bastian, A., Schmidt, W. E., and Schmitz, F. 2003, *Oncology*, 65, 37-45.
311. Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z. W., Egan, L. J., Kagnoff, M. F., and Karin, M. 2004, *Cell*, 118, 285-96.

Résumé

Le stress est impliqué dans le développement et l'exacerbation de diverses pathologies notamment au niveau intestinal. Les effets du stress dépendent de l'expression de neuromédiateurs spécifiques, le Corticotropin-Releasing Factor (CRF), les Urocortines et de leurs récepteurs (CRF1 et CRF2). Notre étude porte sur la régulation et la fonction du CRF2 au niveau des entérocytes et des cellules tumorales coliques humaines. *In vivo*, nous avons montré que le stress et l'inflammation conduisent à l'augmentation de l'expression du CRF2 dans les colonocytes chez le rat. Dans les tumeurs, l'expression du CRF2 augmente avec le grade tumoral. *In vitro*, dans les cellules HT-29, l'activation du CRF2 induit une altération des jonctions adhérentes et des adhérences focales par la voie Src/ERK/FAK. Ces mécanismes sont responsables de la régulation de la perméabilité épithéliale et de l'augmentation de la migration des cellules tumorales. Ces travaux contribuent à la compréhension des mécanismes impliquant le stress dans le développement des pathologies intestinales.

Abstract

Stress is involved in the initiation and the exacerbation of several diseases especially in the intestine. Stress effects depends on the expression of specific neuromediators like Corticotropin-Releasing Factor (CRF), Urocortins and there receptors (CRF1 and CRF2). Our study is about regulation and function of the CRF2, a stress receptor expressed in human enterocytes and colorectal cancer cells. *In vivo*, we showed that stress and inflammation are responsible for the increased expression of the CRF2 in colon epithelial cells of rats. In tumors, the CRF2 expression is increased with the tumor. *In vitro*, in HT-29 cells, the CRF2 activation leads to the alteration of adherens junctions and focal adhesions by a Src/ERK/FAK pathway. These mechanisms are responsible for the regulation of epithelial cell permeability and the increased migration of tumor cells. This work contributes to the understanding of the pathways involved in the regulation of intestinal diseases by stress.