

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

Université de Sherbrooke

Étude du système d'adhésion RGD dépendant
dans la muqueuse intestinale humaine

Par

Carine Lussier

Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

Sherbrooke, août 2002



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file / votre référence

Our file / notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-80619-7

Canada

*Je dédie ces pages à
ma grand-mère Édith, ainsi qu'à
ma mère pour son soutien...*

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
LISTE DES PUBLICATIONS	XIII
RÉSUMÉ	XIV
I – INTRODUCTION.....	1
1. La muqueuse de l'intestin grêle: modèle par excellence pour l'étude des fonctions cellulaires.....	1
1.1. L'axe crypte-villosité.....	1
1.2. Le développement de la muqueuse intestinale.....	2
1.3. Les fonctions cellulaires dans la muqueuse de l'intestin grêle.....	3
1.4. Les modèles cellulaires.....	3
1.4.1. Caco-2/15.....	4
1.4.2. HIEC-6.....	4
1.4.3. HIM.....	5
2. Les interactions cellules/matrice-extracellulaire dans la régulation morphologique et fonctionnelle de l'intestin.....	8
2.1. Importance des interactions épithélio-mésenchymateuses au cours de la morphogénèse et la cytodifférenciation intestinales.....	8
2.2. Interaction intégrine/matrice-extracellulaire.....	9
2.2.1. La lame basale.....	9

2.2.2. Les intégrines.....	10
2.2.3. Les interactions intégrine/matrice-extracellulaire dans la muqueuse intestinale humaine.....	11
3. Le système adhésif RGD.....	14
3.1. L'adhésion RGD dépendante.....	14
3.2. Système adhésif RGD dans la muqueuse intestinale humaine.....	15
3.2.1. Interaction potentielle d' $\alpha 5\beta 1$ et de la fibronectine.....	15
3.2.2. La ténascine-C et $\alpha 9\beta 1$, une interaction impossible.....	17
3.2.2.1. La ténascine-C.....	17
3.2.2.2. L'intégrine $\alpha 9\beta 1$	18
3.2.2.3. La ténascine-C sans récepteur et $\alpha 9\beta 1$ sans ligand.....	20
4. Molécules du système adhésif RGD dont l'expression est inconnue dans la muqueuse intestinale humaine en développement.....	22
4.1. L'ostéopontine (OPN).....	22
4.1.1. Caractérisation de l'OPN.....	22
4.1.2. Fonctions de l'OPN.....	23
4.1.3. Expression de l'OPN dans le système digestif.....	24
4.2. L'intégrine $\alpha 8\beta 1$	24
4.2.1. Caractérisation et fonctions d' $\alpha 8\beta 1$	25
4.2.2. Expression d' $\alpha 8\beta 1$ dans le système digestif.....	25
4.3. Les intégrines αv	26
5. Hypothèses et objectifs de mon projet de maîtrise.....	27

5.1. Analyse de l'expression dans la muqueuse intestinale humaine d'autres molécules impliquées dans le système RGD.....	27
5.2. Cerner les intégrines permettant l'adhésion des cellules HIEC-6 sur le TNfn3.....	28
5.3. Préparation d'un modèle cellulaire qui permettra d'éclaircir le rôle d' $\alpha 8\beta 1$ dans l'adhésion RGD dépendante des cellules HIEC-6.....	28
II – MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	30
1. Spécimens.....	30
2. Culture cellulaire.....	30
2.1 Cellules Caco-2/15.....	30
2.2 Cellules HIEC-6.....	31
2.3 Cellules HIM.....	31
3. Immunofluorescence indirecte.....	32
3.1 Préparation des spécimens.....	32
3.1.1 Tissus.....	32
3.1.2 Cellules.....	32
3.2 Procédure d'immunofluorescence indirecte.....	33
4. Analyse des protéines par transfert Western.....	34
4.1 Isolement des protéines.....	34
4.2 Migration des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant.....	34
4.3 Transfert des protéines sur membranes de nitrocellulose.....	35
4.4 Détection des antigènes.....	35

5. Extraction des ARNs totaux.....	38
5.1 Extraction des ARNs totaux de cellules en culture.....	38
5.2 Extraction des ARNs totaux de tissus.....	38
6. RT-PCR.....	39
6.1 Réaction de transcription inverse (RT).....	39
6.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	40
7. Production de la protéine de fusion GST-TNfn3.....	41
7.1. Production du peptide.....	41
7.2. Purification du peptide.....	42
8. Essai d'adhésion cellulaire.....	43
8.1 Préparation des plaques 96 puits.....	43
8.2 Préparation des cellules HIEC-6.....	44
8.3 Essai d'adhésion avec les HIEC-6.....	44
8.3.1 Récupération des cellules et ensemencement.....	44
8.3.2 Traitement et dénombrement des cellules adhérees.....	45
9. Préparation de cellules exprimant de façon stable la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines complète ou un anti-sens de celle-ci.....	46
9.1. Préparation des vecteurs et des inserts.....	46
9.1.1. Traitement des vecteurs avec les enzymes de restrictions.....	46
9.1.2. Purification des produits de digestion.....	47
9.2. Production des vecteurs.....	48
9.2.1. Ligation et transformation des bactéries <i>E.coli</i> compétentes.....	48
9.2.2. Sélection et amplification des clones.....	49

9.3. Préparation des virus.....	49
9.4 Infection des cellules et sélection.....	50
III – RÉSULTATS.....	55
1. Analyse de l'expression de molécules du système adhésif RGD dans la muqueuse de l'intestin grêle et ces modèles cellulaires.....	55
1.1. Dépôt de l'ostéopontine au niveau de la lame basale intestinale au cours du développement.....	55
1.2. Néo-dépôt de l'OPN dans les lames basales des tumeurs côlorectales.....	56
1.3. Présence de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines dans la muqueuse intestinale.....	61
1.4. La sous-unité αv est exprimée dans la muqueuse intestinale.....	64
2. Essai d'adhésion cellulaire.....	66
2.1. L'adhésion des HIEC-6 sur le TNfn3.....	66
2.2. Intégrines responsables de l'adhésion des HIEC-6 sur le TNfn3.....	66
3. Préparation de cellules HIEC-6 infectées de façon stable avec des vecteurs permettant l'expression de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines et un anti-sens de celle-ci.....	70
3.1 Expression d'un anti-sens de la sous-unité $\alpha 8$	70
3.2 Expression de la sous-unité $\alpha 8$	71
IV – DISCUSSION.....	73

1. Fonctions et interactions potentielles des différentes molécules dont l'expression a été analysée dans la muqueuse intestinale humaine en développement.....	73
1.1. Expression et fonction de l'ostéopontine.....	73
1.1.1. L'OPN présente un patron d'expression onco-fœtal.....	73
1.1.2. L'OPN pourrait interagir dans l'invagination mésenchymateuse lors du développement villositaire.....	75
1.1.3. L'OPN pourrait induire la migration de l'épithélium intestinal fœtal.....	76
1.2. Expression et fonction de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$	77
1.2.1. $\alpha 8\beta 1$ intervient dans la morphogenèse de la muqueuse intestinale.....	77
1.2.2. Fonction organisatrice d' $\alpha 8\beta 1$ dans la mise en place d'une lame basale appropriée.....	78
1.2.3. Signalisation potentielle d' $\alpha 8\beta 1$ dans les cellules mésenchymateuses.....	79
1.3. Ligand et fonction de l'intégrine $\alpha 9\beta 1$	80
1.3.1. $\alpha 9\beta 1$ a-t-elle besoin d'un ligand ?.....	80
1.3.2. $\alpha 9\beta 1$ pourrait interagir avec une molécule de la famille ADAM.....	81
1.4. La ténascine-C... toujours sans récepteur épithélial.....	82
2. Caractérisation de l'adhésion des HIEC-6 sur le TNfn3.....	84
2.1. Les HIEC-6 s'attachent au TNfn3 via un ensemble d'intégrines.....	84
2.1.1. Adhésion des HIEC-6 médiée via $\alpha \nu \beta 3$	85

2.1.2. Adhésion des HIEC-6 médiée via $\alpha v\beta 1$	86
2.1.3. Adhésion des HIEC-6 médiée via $\alpha 8\beta 1$	87
2.2. L'intégrine $\alpha 9\beta 1$ n'est pas fonctionnelle pour médier une adhésion des HIEC-6 sur le TNfn3.....	88
V – CONCLUSION.....	92
REMERCIEMENTS.....	94
BIBLIOGRAPHIE.....	95

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures

1.	L'axe crypte-villosité et ses modèles cellulaires.....	6
2.	Morphogenèse de la muqueuse de l'intestin grêle humain.....	7
3.	Les intégrines.....	13
4.	Distribution le long de l'axe crypte-villosité des molécules impliquées dans le système RGD.....	21
5.	Stratégie pour la préparation du vecteur pLNCX2 exprimant l'ADNc complet de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines.....	51
6.	Stratégie pour la préparation du vecteur pLNCX2 exprimant un anti-sens de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines.....	52
7.	Stratégie pour la préparation du vecteur pBabe exprimant un anti-sens de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines.....	53
8.	Vecteurs utilisés pour infecter les cellules HIEC-6.....	54
9.	Expression et distribution de l'OPN dans la muqueuse de l'intestin grêle humain au cours du développement.....	58
10.	Expression de l'OPN dans les tissus intestinaux adultes et fœtaux, ainsi que dans les lignées cellulaires intestinales.....	59
11.	Expression de l'OPN chez les patients atteints de cancers de côlon et dans les lignées cellulaires épithéliales dérivées d'adénocarcinomes de côlon.....	60
12.	Expression et distribution de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines dans la muqueuse de l'intestin grêle humain en cours de développement.....	62
13.	Expression de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines dans les tissus intestinaux adultes et fœtaux, ainsi que dans les lignées cellulaires intestinales.....	63
14.	Expression du messager de la sous-unité αv des intégrines dans les tissus intestinaux adultes et fœtaux, ainsi que dans les lignées cellulaires	

	intestinales et distribution dans la muqueuse de l'intestin grêle mature.....	65
15.	L'adhésion des cellules HIEC-6 sur le TNfn3 est RGD dépendante.....	68
16.	L'adhésion des cellules HIEC-6 sur le TNfn3 est dépendante d'intégrines αv et d'une autre intégrine présentant une sous-unité $\beta 1$	69
17.	Caractérisation des cellules HIEC-6 infectées de façon stable avec un vecteur exprimant la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines, ainsi qu'un vecteur exprimant un anti-sens d' $\alpha 8$	72
18.	Régulation de la morphogénèse de la muqueuse intestinale humaine par l'OPN : un modèle.....	90
19.	Distribution le long de l'axe crypte-villosité des molécules impliquées dans le système RGD.....	91

Tableaux

1.	Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence indirecte et lors de l'analyse des protéines par transfert Western.....	37
2.	Différentes amorces utilisées pour effectuer les PCR.....	41
3.	Concentrations des différentes matrices pour les essais d'adhésion.....	44
4.	Liste des peptides solubles et des anticorps neutralisant utilisés lors des essais d'adhésion.....	46

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADNc : ADN complémentaire
- BSA : Albumine sérique bovine
- DAPI : 4,6-Diamidino-2-phénylindole
- dNTPs : Déoxynucléotides triphosphates
- dT : Déoxythymine
- EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique
- EGFh : Facteur de croissance épidermique humain
- FBS : Sérum bovin foetal
- GST : Gluthathione S-transférase
- HEPES : 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonate
- IPTG : Isopropylythio- β -D-galactoside
- PAL : Phosphatase alcaline
- PBS : Tampon phosphate salin
- PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyl
- pb : Paires de bases
- RGD: Arginine-glycine-aspartate
- RGE : Arginine-glycine-glutamate
- SDS : Sodium dodécyl sulfate
- TIR : Réactif d'isolation Tripure

LISTE DES PUBLICATIONS

Lussier, C., Basora, N., Bouatrouss, Y. et Beaulieu, J.-F. (2000) Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa. *Microsc. Res. Tech.* **51**:169-178

Lussier, C., Sodek, J. et Beaulieu, J.-F. (2001) Expression of SPARC/Osteonectin/BM40 in the human gut: predominance in the stroma of the remodeling distal intestine. *J. Cell. Biochem.* **81**(3):463-476

RÉSUMÉ

Caractérisation du système d'adhésion RGD dans la muqueuse de l'intestin grêle humain

Carine Lussier

Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Faculté de médecine,
Université de Sherbrooke

Les interactions cellule-matrice extracellulaire jouent un rôle important au niveau de processus tels la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. Les récepteurs principaux impliqués dans l'adhésion cellulaire sont les intégrines. Une sous-classe d'intégrines reconnaît de façon bien spécifique chez ses ligands la séquence peptidique RGD. La présente étude comporte, tout d'abord, une caractérisation de l'expression de différents membres de la famille RGD (récepteurs: sous-unités $\alpha 8$ et αv ; ligand: ostéopontine) dans la muqueuse de l'intestin grêle au cours du développement, ainsi que dans les modèles cellulaires correspondants. Les patrons d'expression obtenus par immunofluorescence indirecte, immunobuvardage Western et RT-PCR, ont permis de déterminer que l'ostéopontine, ainsi que la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines sont présents et agissent probablement au cours de la morphogenèse de la muqueuse intestinale. D'autre part, le récepteur épithélial de la ténascine-C n'ayant pas été identifié dans la muqueuse intestinale, la seconde partie du projet consistait à analyser, avec le modèle cellulaire HIEC-6, les différents récepteurs entrant en jeu dans l'interaction des entérocytes avec un fragment recombinant de la ténascine-C, le TNfn3. Cette adhésion s'est avérée RGD dépendante et effectuée par des intégrines présentant la sous-unité αv , ainsi que d'une autre intégrine, fort probablement $\alpha 8\beta 1$. Pour vérifier le rôle de cette dernière dans l'adhésion sur la ténascine-C, des cellules HIEC-6 ont été infectées avec un vecteur rétroviral permettant l'expression d'un anti-sens de la sous-unité $\alpha 8$ ou de la sous-unité $\alpha 8$ complète. Ces cellules pourront permettre d'élucider le rôle d' $\alpha 8\beta 1$ dans l'adhésion RGD dépendante des cellules cryptales intestinales sur la ténascine-C.

I - INTRODUCTION

1. La muqueuse de l'intestin grêle: modèle par excellence pour l'étude des fonctions cellulaires

1.1. L'axe crypte-villosité

La muqueuse de l'intestin grêle mature possède une morphologie complexe. Effectivement, sa surface luminale est constituée de villosités et de cryptes formant une unité fonctionnelle bien définie, l'axe crypte-villosité (Figure 1), dont l'épithélium présente une compartimentation spécifique (Leblond, 1981). En effet, les cryptes contiennent la population proliférative, soit les cellules souches pluripotentes et les entérocytes en voie de différenciation (Potten et Loeffler, 1991), alors que la surface villositaire est uniquement recouverte d'entérocytes matures, possédant des fonctions spécialisées de digestion et d'absorption (Leblond, 1981).

À tous les 5 jours environ, la population épithéliale villositaire est renouvelée par un processus migratoire continu (Klein et McKenzie, 1983). Effectivement, les cellules souches du fond des cryptes, par une division asymétrique, donnent naissance à des cellules filles. Ces dernières se différencient progressivement au cours de leur migration le long de la paroi

cryptale, puis progressent sous un phénotype mature le long de la villosité jusqu'à une élimination, par apoptose, à l'atteinte de l'apex (Altmann et Leblond, 1982; Babyatsky et Podolsky, 1999; Leblond, 1981).

1.2. Le développement de la muqueuse intestinale

Le remodelage de la paroi du tube digestif primitif se déroule sur une période d'environ 10 semaines chez l'humain (Figure 2). À la huitième semaine de la gestation, la paroi de l'intestin consiste simplement en un tube recouvert d'un épithélium pluristratifié (endoderme intestinal), où les cellules prolifératives se distribuent de façon aléatoire (Arsenault et Ménard, 1987). L'infiltration progressive du mésenchyme (mésoderme intestinal) dans cet épithélium permet la formation de villosités présentant un épithélium simple et cylindrique. À partir de la quatorzième semaine de la gestation, l'invagination dans le mésenchyme de l'épithélium intervillaire donne naissance à des cryptes primitives, où se re-localise rapidement la population de cellules prolifératives (Arsenault et Ménard, 1987). Ainsi, à la mi-gestation (vers 18-20 semaines), la morphologie de la muqueuse de l'intestin foetal ressemble à celle de la muqueuse de l'intestin grêle adulte, avec des cryptes et des villosités bien définies (Ménard, 1989; Ménard et Beaulieu, 1994; Montgomery et al., 1999).

1.3. Les fonctions cellulaires dans la muqueuse de l'intestin grêle

La muqueuse de l'intestin grêle représente un système attrayant pour l'étude des processus moléculaires entourant la régulation des fonctions cellulaires épithéliales. En effet, la prolifération et la différenciation de l'épithélium y sont présentes non seulement au cours de la morphogenèse, mais aussi tout au long de la période de maturité. Il est ainsi possible, au cours du développement, d'étudier les processus morphogénétiques entourant la différenciation de l'endoderme en un épithélium fonctionnel et compartimenté. Alors que l'axe crypte-villosité mature permet d'analyser les différentes propriétés qui distinguent les compartiments cryptal et villositaire, c'est-à-dire les cellules prolifératives des entérocytes matures (Beaulieu, 2001).

1.4. Les modèles cellulaires

L'étude des processus moléculaires entourant la morphogenèse et le maintien de la muqueuse de l'intestin grêle, nécessite des modèles *in vitro*. De nombreux modèles cellulaires ont ainsi été développés afin de récapituler l'axe crypte-villosité (Pageot et al. 2000; Vachon et al., 1993). De ceux-ci, trois furent utilisés lors de cette étude (Figure 1).

1.4.1. Caco-2/15

La lignée épithéliale Caco-2 (American Type Culture Collection) est dérivée d'un adénocarcinome de côlon humain (Rousset, 1986) et entreprend spontanément un processus de différenciation entérocytaire à l'atteinte de la confluence (Pinto et al., 1983). Ainsi, sur une période de 20 à 40 jours post-confluence, les cellules Caco-2 acquièrent la morphologie des entérocytes différenciés (Beaulieu et Quaroni, 1991; Hauri et al., 1985; Pinto et al., 1983; Vachon et Beaulieu, 1992). Cette lignée a été clonée par dilution (Beaulieu et Quaroni, 1991), ce qui a permis d'isoler le clone 15 (Caco-2/15). Ce dernier, après différenciation, présente un niveau élevé de sucrase-isomaltase, marqueur d'un niveau élevé de différenciation puisque cette enzyme est retrouvée chez les entérocytes matures (Vachon et Beaulieu, 1992; Vachon et al., 1996). Les cellules Caco-2/15 exhibent ainsi les caractéristiques des cellules épithéliales de l'intestin fœtal humain (Ménard et Beaulieu, 1994; Rousset, 1986; Zweibaum et Chantret, 1989).

1.4.2. HIEC-6 (Human intestinal epithelial cells)

Les cellules HIEC-6 sont des cellules normales, qui ont été isolées à partir d'iléon humain de 17 à 19 semaines (Perreault et Beaulieu, 1996). La séparation des cellules épithéliales du mésenchyme a été effectuée par l'utilisation de la thermolysine, une enzyme de dissociation préalablement

utilisée pour isoler les kératinocytes (Germain et al., 1993). Les études morphologiques et fonctionnelles des HIEC-6 ont permis d'établir qu'elles sont comparables aux cellules indifférenciées de la crypte (Perreault et Beaulieu, 1996). Ce modèle est ainsi particulièrement intéressant pour la caractérisation fonctionnelle de cette population cellulaire très peu connue de l'épithélium intestinal humain.

1.4.3. HIM (Human intestinal mesenchymal cells)

Les cellules HIM ont été isolées mécaniquement d'un fragment intestinal foetal humain dont le stade de développement se situait entre 17 et 19 semaines (Vachon et al., 1993). Ces cellules constituent une population pure de cellules mésenchymateuses.

Figure 1. L'axe crypte-villosité et ses modèles cellulaires

L'axe crypte-villosité constitue l'unité fonctionnelle de la muqueuse intestinale de l'intestin grêle. Dans cet épithélium à renouvellement rapide, les cellules prolifératives, qui proviennent de la population de cellules souches à la base des cryptes, migrent le long de la crypte en se différenciant et perdent leur aptitude à proliférer. Elles progressent ensuite jusqu'à l'apex de la villosité où elles sont éliminées par apoptose.

Différents modèles cellulaires épithéliaux permettent de récapituler l'axe crypte-villosité. Les HIEC-6 constituent une lignée épithéliale normale représentative de la population de cellules prolifératives indifférenciées des cryptes. La lignée Caco-2/15, malgré son origine carcinomateuse (côlon), permet d'effectuer des analyse de différenciation caractéristiques des cellules intestinales fœtales.

Afin d'étudier les interactions épithélio-mésenchymateuses de la muqueuse intestinale, les cellules HIM, population de cellules mésenchymateuses, ont été isolées de tissus fœtaux.

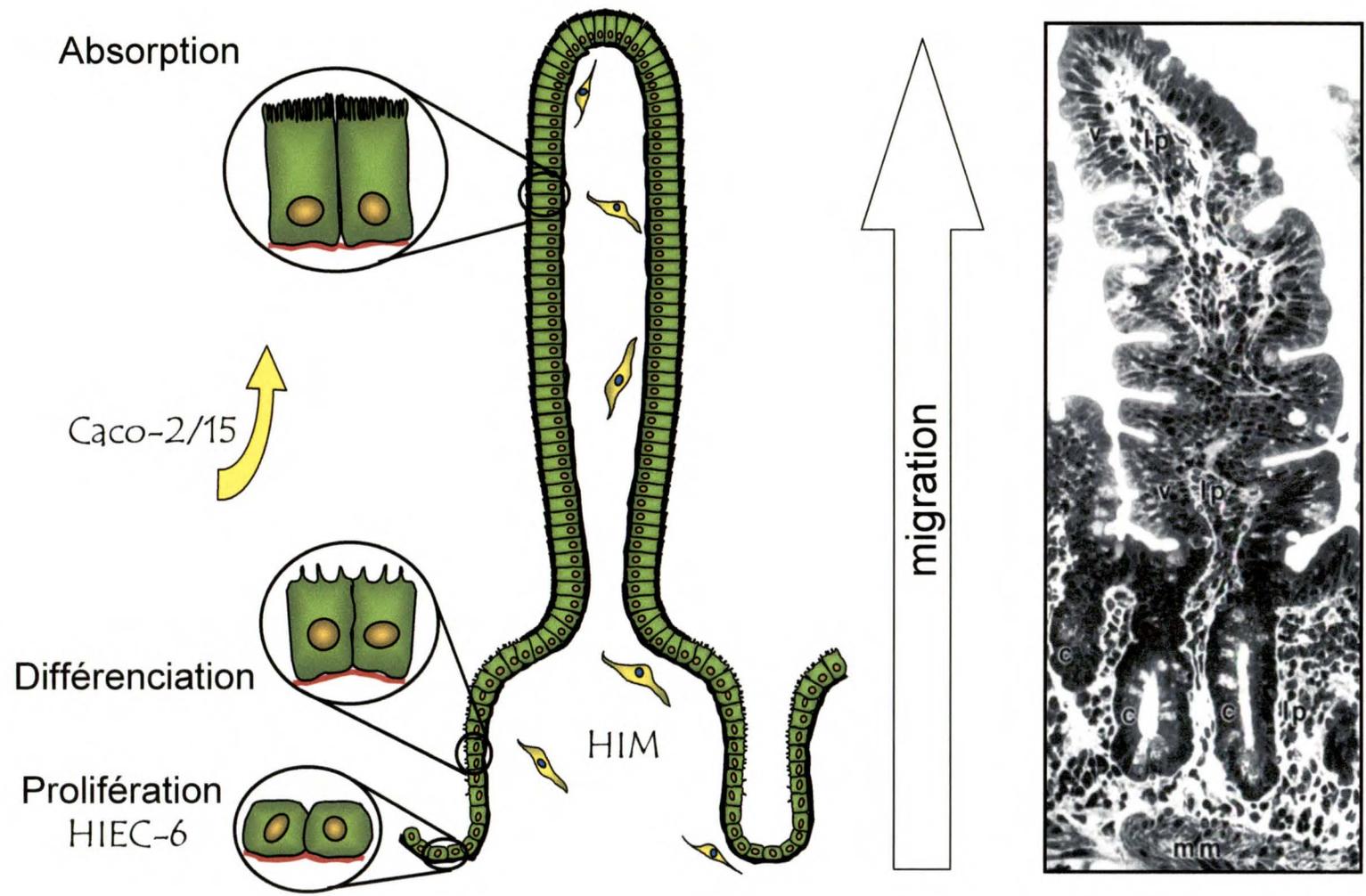
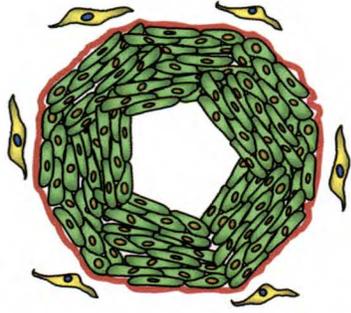


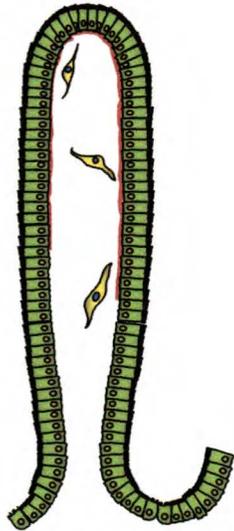
Figure 2. Morphogenèse de la muqueuse de l'intestin grêle humain

À partir de la huitième semaine de croissance fœtale, le tube digestif humain entreprend un processus de remodelage qui le mène, 10 semaines plus tard, à un état mature.

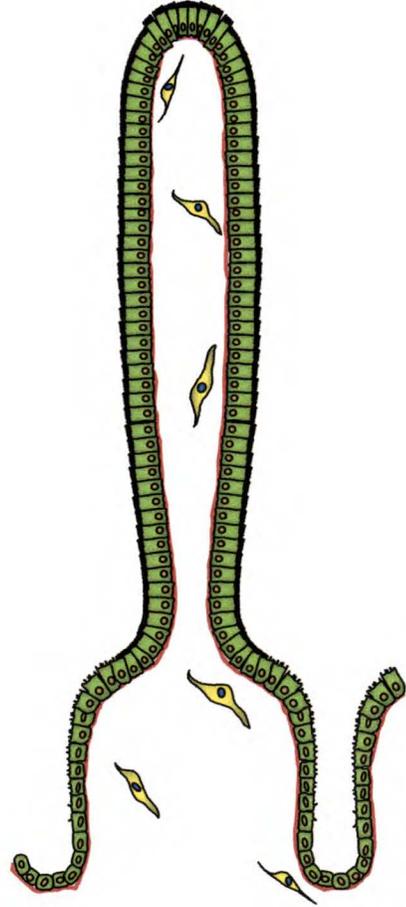
Tout d'abord, le tube primitif, recouvert d'un épithélium pluristratifié (**A**), se recouvre progressivement d'un épithélium simple et cylindrique, sous l'évagination mésenchymateuse, laissant place à de petites villosités (**B**). Vers la quatorzième semaine, l'épithélium intervillaire s'invagine et induit la formation des cryptes, ce qui permet l'obtention, vers la dix-huitième semaine, d'un axe crypte-villosité fonctionnel qui sera maintenu dans la muqueuse mature (**C**).



A - 6 semaines



B - 8-12 semaines



C - 17 semaines et plus

2. Les interactions cellules/matrice-extracellulaire dans la régulation morphologique et fonctionnelle de l'intestin

2.1. Importance des interactions épithélio-mésenchymateuses au cours de la morphogenèse et la cytodifférenciation intestinales

Il a été démontré que la différenciation du tube digestif primitif en un intestin fonctionnel dépend d'une interaction entre le mésenchyme intestinal et l'endoderme qui le recouvre (Kedinger et al., 1981; Kedinger et al., 1986). Bien que l'endoderme intestinal soit déterminé génétiquement à se différencier en un épithélium intestinal mature (Montgomery et al., 1981), ce processus dépend de son interaction avec le mésenchyme sous-jacent. En retour, l'endoderme va permettre la différenciation et la compartimentation du mésenchyme en tissu conjonctif et muscles lisses intestinaux (Haffen et al., 1987; Savidge et al., 1995; Yasugi, 1993).

La communication entre le mésenchyme et l'épithélium peut être effectuée de plusieurs façon. La cellule a la capacité de sécréter et de reconnaître une multitude de facteurs solubles (facteurs de croissance, cytokines) et insolubles (matrice extracellulaire), en plus de pouvoir entrer en contact direct avec les cellules qui l'entourent (Montgomery et al., 1999). Comme le processus de différenciation cellulaire nécessite un contrôle spécifique et soutenu de l'expression génique (Blau et Baltimore, 1991), la

cellule intègre l'ensemble des signaux qu'elle perçoit puis génère une réponse spécifique (Nanthakumar, 2001; Sastry et Horwitz, 1996).

2.2. Interaction intégrine/matrice-extracellulaire

2.2.1. La lame basale

La lame basale est un mince feuillet spécialisé à l'interface épithélio-mésenchymateuse, où se concentrent certains composés de la matrice extracellulaire. De façon générale, elle est constituée de réseaux de collagène de type IV et de laminines, auxquels s'associent des protéoglycans, ainsi que d'autres glycoprotéines non-exclusives aux lames basales, telles la fibronectine (Leblond et Inoue, 1989; Timpl et Brown, 1996). Provenant d'une déposition cellulaire, les molécules insolubles qui la constitue se sont avérées être à la base de la signalisation entre les cellules d'un même tissu et/ou de tissus voisins. En effet, de nombreuses interactions entre les compartiments épithéliaux et mésenchymateux dépendent de la présence de la lame basale, cette dernière pouvant réguler indirectement le passage de molécules solubles et/ou interagir directement avec les récepteurs de la surface cellulaire (Adams et Watt, 1993; Clark et Brugge, 1995). Plusieurs constituants de la lame basale ont ainsi été caractérisés comme des régulateurs de fonctions cellulaires telles la prolifération et la différenciation (Adams et Watt, 1993; Lofri et Fröjdman, 1998).

2.2.2. Les intégrines

Les cellules interagissent avec les molécules de la lame basale via des récepteurs spécifiques, les principaux étant ceux de la superfamille des intégrines (Figure 3; Hynes, 1992; Ruoslahti, 1991). Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (Humphries, 2000). Jusqu'à aujourd'hui, plus de 22 hétérodimères ont été identifiés, chacun ayant la capacité de reconnaître une ou quelques séquences d'acides aminés spécifiques. Alors que certaines intégrines sont impliquées dans des interactions cellule/cellule, un grand nombre est reconnu pour sa capacité à médier une adhésion cellule/matrice-extracellulaire (Hynes, 1992).

L'intégrine entre en contact avec son ligand via son domaine extracellulaire, et ce, par l'intermédiaire de ses deux sous-unités (Humphries, 2000). Cette interaction induit un changement conformationnel de son domaine cytoplasmique, qui recrute alors un ensemble de molécules permettant son association au cytosquelette et, ainsi, un ancrage cellulaire spécifique (Pavalko et Otey, 1994). D'un point de vue fonctionnel, l'interaction intégrine/ligand, en plus de permettre l'adhésion cellulaire, donne naissance à une transduction de signal. En effet, le domaine cytoplasmique a aussi la capacité de s'associer avec des protéines impliquées dans de multiples voies de signalisation cellulaire. Les intégrines ont donc la capacité d'induire des cascades de

signalisation de tyrosines et de sérines/thréonines kinases, des altérations de pH, ainsi que des influx calciques (Coppolino et Dedhar, 2000; Dedhar, 1999; Giacotti, 2000; Kumar, 1998), et ce, en collaboration avec la signalisation induite par les facteurs de croissance (Juliano, 1996; Schwartz et Baron, 1999).

De part sa capacité à induire différentes voies de signalisation cellulaire, l'interaction des intégrines avec les composantes de la lame basale a été identifiée comme effectrice directe de processus directement impliqués dans l'organisation tissulaire, tels la migration, la différenciation, la prolifération, ainsi que l'apoptose (Ruoslahti et Öbrink, 1996).

2.2.3. Les interactions intégrine/MEC dans la muqueuse intestinale humaine

La lame basale intestinale contient toutes les composantes majeures spécifiques à la plupart des lames basales, comme le collagène de type IV, auxquelles s'associent certaines macromolécules non-exclusives, aussi retrouvées dans la matrice extracellulaire interstitielle, telle la fibronectine cellulaire (Beaulieu, 1997). Les différentes molécules qui la constitue proviennent d'une déposition épithéliale et/ou mésenchymateuse (Perreault et al., 1998) et leur nature varie de façon spatio-temporelle le long de l'axe crypte-villosité (Beaulieu, 1992), ainsi qu'au cours du développement (Desloges et al., 1994 ; Lussier et al., 2001; Simon-Assmann et al., 1995).

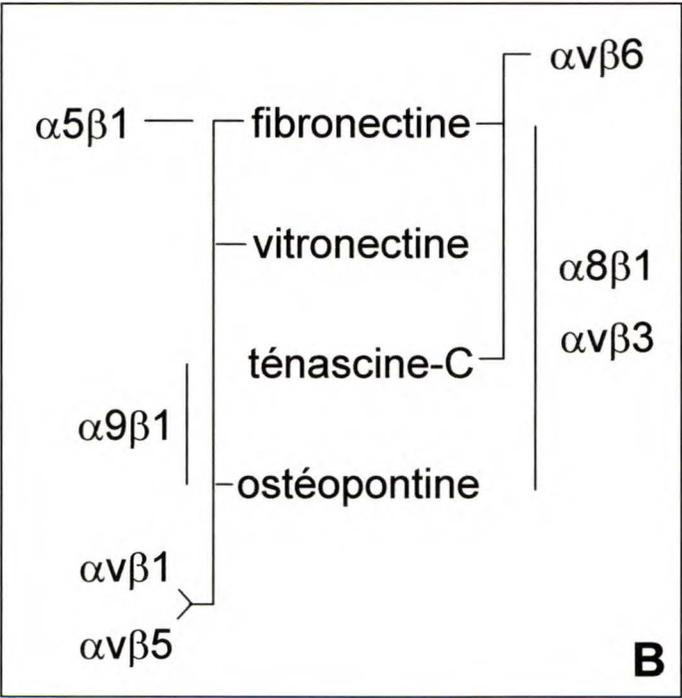
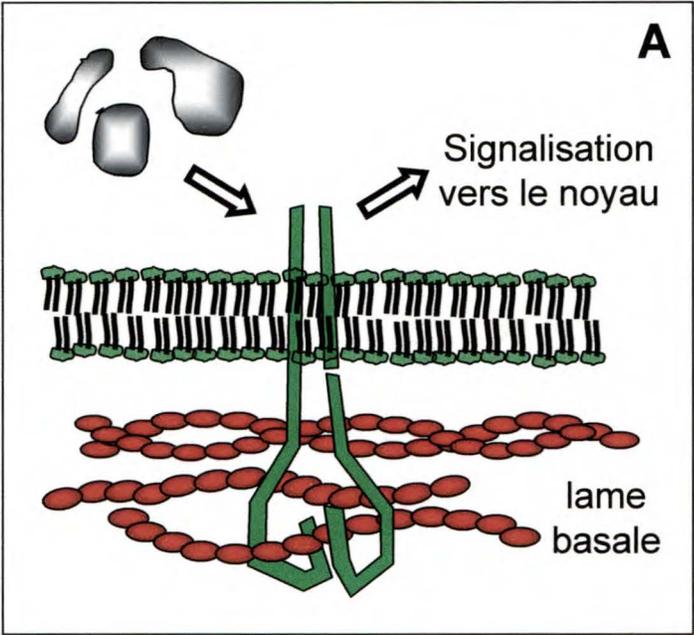
Afin d'interagir avec les différentes molécules présentes dans leur lame basale, les entérocytes possèdent au niveau de leur membrane baso-latérale une panoplie d'intégrines spécifiques. Comme la composition de la lame basale varie de façon spatio-temporelle le long de l'axe crypte villosité, les récepteurs correspondant sont aussi amenés à présenter une expression différentielle (Beaulieu, 1997; Lussier et al. 2000). Ainsi, l'adhésion spécifique le long de l'axe crypte-villosité donne naissance à une signalisation différentielle qui est impliquée dans la régulation morphologique et fonctionnelle de l'intestin (Beaulieu, 1999).

L'analyse de l'expression des différentes composantes de la lame basale, ainsi que de leur récepteurs dans la muqueuse intestinale en développement et mature, constitue une excellente approche pour évaluer leurs rôles au niveau cellulaire. En effet, leur distribution spécifique en fonction du stade de développement et/ou du compartiment épithélial où ils sont présents peuvent permettre l'implication potentielle de chaque constituant dans une fonction cellulaire précise.

Figure 3. Les intégrines

(A) Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires constituées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β , reliées ensemble par une interaction non-covalente. Les extrémités N-terminales extracellulaires des deux sous-unités permettent l'interaction avec le ligand, alors que les domaines C-terminaux cytoplasmiques induisent une signalisation intra-cellulaire par le recrutement de protéines impliquées dans le contrôle des fonctions cellulaires.

(B) Plusieurs intégrines impliquées dans les interactions cellules/matrice-extracellulaire reconnaissent leurs ligands de façon RGD dépendante. L'intégrine $\alpha_9\beta_1$ a été ajouté au groupe puisque son interaction avec ses ligands, sur des séquences adjacentes au RGD, interfère avec la liaison des autres récepteurs à la séquence RGD.



3. Le système adhésif RGD

3.1. L'adhésion RGD dépendante

L'identification, chez les différentes molécules de la matrice-extracellulaire, de séquences peptidiques permettant spécifiquement l'interaction avec une ou des intégrines, a permis d'apporter un progrès considérable dans la compréhension de la nature de leur association. Le tripeptide arginine-glycine-aspartate (RGD) fut la première séquence de reconnaissance identifiée, sa capacité à médier l'adhésion cellulaire ayant été reconnue il y a plus de 16 ans (Pierschbacher et Ruoslahti, 1984). Isolé à partir de fragments peptidiques synthétiques découlant de la séquence de la fibronectine cellulaire, le RGD a été retrouvé au niveau du site d'attachement d'une multitude de protéines adhésives non-exclusives aux lames basales (Ruoslahti, 1996). De plus, l'observation que non seulement le récepteur de la fibronectine ($\alpha 5\beta 1$) liait son ligand de façon RGD dépendante (Pytela et al. 1985a), mais qu'un autre récepteur ($\alpha v\beta 3$) reconnaissait la vitronectine aussi sous la dépendance d'une séquence RGD (Pytela et al. 1985b), a mené à la caractérisation d'une sous-famille d'intégrines médiant leur adhésion via la reconnaissance d'un RGD (Figure 3; Ruoslahti, 1996).

Comme plusieurs intégrines reconnaissent et interagissent avec le RGD, la spécificité de l'adhésion et de la signalisation qui en découle dépend de

l'affinité du récepteur pour son ligand. Cette dernière semble contrôlée par de nombreux processus, tels la reconnaissance par l'intégrine d'un RGD cryptique impliquant un clivage protéolytique du ligand, la reconnaissance d'une séquence synergique, la méthylation du résidu arginine, ou une variation stéréochimique d'un des résidus du RGD (Hyun et al., 2000; Koivunen et al., 1994; Pierschbacher et Ruoslahti, 1987; Senger et al., 1994).

3.2. Système adhésif RGD dans la muqueuse intestinale humaine

La figure 4 présente un résumé de ce qui est connue sur l'expression des molécules RGD dans la muqueuse de l'intestin grêle humain au cours du développement fœtal, ainsi que chez l'adulte.

3.2.1. Interaction potentielle d' $\alpha 5\beta 1$ et de la fibronectine

La fibronectine est une protéine de la matrice-extracellulaire, non exclusive aux lames basales. Isolée sous forme soluble à partir de plasma sanguin dans les années 60-70, elle s'est rapidement avérée exprimée par plusieurs types cellulaires, dans plusieurs tissus, et ce, sous plusieurs formes (Hynes, 1990). Effectivement, son transcrit, synthétisé à partir d'un gène unique, subit un épissage alternatif variable selon le type ou la fonction de la cellule qui l'exprime (French-Constant et Hynes, 1988, 1989; Schwarzbauer et al., 1983, 1987). La fibronectine est impliquée dans les processus d'adhésion cellulaire via

les intégrines $\alpha 5\beta 1$ (Pytela et al., 1985a), $\alpha 8\beta 1$ (Müller et al., 1995; Schnapp et al., 1995b), αv (Busk et al., 1992; Pasqualini et al., 1993; Pytela et al., 1985b; Vogel et al., 1990), et $\alpha 4\beta 1$ (Guan et Hynes, 1990; Wayner et al., 1989), ainsi que certains protéoglycans (Saunders et Bernfield, 1988). Les intégrines αv , $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 8\beta 1$ interagissent avec la fibronectine via une séquence RGD située dans sa dixième répétition de type III (Pierschbacher et Ruoslahti, 1984; Pytela et al., 1985a). Pour sa part, l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ reconnaît plusieurs séquences, régulées par épissage alternatif, situées dans la région V (Guan et Hynes, 1990; Humphries et al., 1986, 1987; Wayner et al., 1989).

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ a été le premier récepteur caractérisé dans le système RGD (Pytela et al., 1985a). À l'opposé des autres intégrines de ce groupe, elle se lie uniquement à la fibronectine (Hemler, 1990). La spécificité, ainsi que la très forte affinité de cette interaction, sont modulées par la reconnaissance d'une séquence synergique retrouvée sur la molécule, en N-terminal du RGD (Aota et al., 1994; Koivunen et al., 1994).

Dans la muqueuse intestinale humaine, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la fibronectine sont co-exprimées de façon spatio-temporelle, ce qui laisse croire en une interaction potentielle de ces deux molécules. Effectivement, le récepteur est exprimé à la base des entérocytes alors que la fibronectine est insérée dans leur lame basale, et ce, de la crypte à l'apex de la villosité selon un gradient décroissant (Figure 4; Beaulieu, 1992).

La co-distribution d' $\alpha 5\beta 1$ et de la fibronectine dans la région cryptale de la muqueuse intestinale suggère un rôle au niveau de la prolifération des cellules épithéliales (Beaulieu, 1992). De plus, il a récemment été démontré *in vitro* que l'interaction d' $\alpha 5\beta 1$ avec la fibronectine médie la prolifération de cellules épithéliales intestinales (Kuwada et al., 2000). Par contre, il est possible que cette interaction puisse permettre l'activation de plus d'une voie de signalisation, selon son emplacement le long de l'axe crypte-villosité. En effet, une fonction anti-apoptotique a aussi été conférée au duo $\alpha 5\beta 1$ -fibronectine dans un autre modèle de cellules épithéliales intestinales (Lee et Juliano, 2000)

3.2.2. La ténascine-C et l'intégrine $\alpha 9\beta 1$, une interaction impossible

3.2.2.1. La ténascine-C

La ténascine-C est une glycoprotéine exclusive à la matrice extracellulaire, dont le segment distal contient plusieurs séquences répétitives de type III caractérisées chez la fibronectine (Bélanger et Beaulieu, 2000). La troisième de ces séquences (TNfn3) présente un RGD permettant l'interaction avec plusieurs intégrines dont $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 6$ (Denda et al., 1998a; Joshi et al., 1993; Prieto et al., 1993; Schnapp et al., 1995b). Non loin du RGD, le TNfn3 présente aussi une séquence de reconnaissance spécifique pour l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ (Yokosaki et al., 1994; Yokosaki et al., 1998). Produit sous forme de

peptide GST-TNfn3, ce fragment est très utile dans la caractérisation de l'adhésion cellulaire à la ténascine-C (Prieto et al., 1993; Yokosaki., 1996).

L'expression unique de la ténascine-C au cours de l'organogenèse et dans des conditions pathologiques tel le cancer (Chiquet-Ehrismann et al., 1986), a permis de faire de la ténascine-C un élément potentiel clef au cours du remodelage tissulaire. Par contre, contrairement à ce qui est observé dans les autres organes, l'expression de la ténascine-C débute très tard au cours du développement de la muqueuse de l'intestin grêle humain (Beaulieu et al., 1993a,b; Bélanger et Beaulieu, 2000). Son apparition a lieu dans le mésenchyme de l'apex des villosités, seulement vers la onzième semaine de gestation, elle descend ensuite vers les cryptes progressivement au cours du développement. À 18 semaines, la ténascine-C est présente au niveau de tout le mésenchyme selon un gradient croissant vers l'apex des villosités (Figure 4). Chez l'adulte, ce gradient est conservé, mais la molécule est déposée uniquement au niveau de l'interface épithélio-mésenchymateuse.

3.2.2.2. L'intégrine $\alpha 9\beta 1$

L'intégrine $\alpha 9\beta 1$ a été caractérisée au début des années 90 (Forsberg et al., 1994; Palmer et al., 1993). La séquence en acides aminés de la sous-unité $\alpha 9$ est fortement différentes de celles des intégrines reconnaissant un RGD (20% de similarité avec $\alpha 8$; Palmer et al., 1993) et, à l'opposé de ces dernières,

elle présente une adhésion RGD indépendante (Smith et al., 1996; Smith et Giachelli, 1998; Yokosaki et al., 1994). Par contre, dans ce mémoire, elle sera incluse dans le groupe des molécules RGD, puisqu'elle interagit avec la ténascine-C et l'ostéopontine sur une séquence voisine de leur RGD, rendant les deux types d'adhésion mutuellement exclusive (Yokosaki et al., 1998; Yokosaki et al., 1999).

Chez la souris adulte, l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ est exprimée dans quelques tissus spécialisés, comme l'épithélium respiratoire, les hépatocytes et les muscles lisse et squelettique, elle n'a toutefois pas été détectée dans l'épithélium intestinal normal (Palmer et al., 1993). Au cours du développement, sa synthèse débute généralement lors du processus de différenciation tissulaire, suggérant un rôle dans la maturation et/ou la maintenance de tissus différenciés (Stepp et al., 1995; Wang et al., 1995). Par contre, son expression, restreinte aux cellules prolifératives, suggère une ou des fonctions additionnelles (Desloges et al., 1998; Palmer et al., 1993; Wang et al., 1995). En effet, il a été démontré que l'association d' $\alpha 9\beta 1$ avec la ténascine-C stimule la prolifération cellulaire (Yokosaki et al., 1996).

Le long du segment intestinal humain (Figure 4), $\alpha 9\beta 1$ se retrouve au niveau de la membrane baso-latérale des cellules épithéliales de la crypte dès la formation de ces dernières (vers 14 semaines) et y est toujours exprimée à la mi-gestation (19 semaines; Basora et al., 1998; Desloges et al., 1998). La

protéine n'est, par contre, pas présente dans l'épithélium adulte normal, son expression étant seulement retrouvée dans l'épithélium de plusieurs adénocarcinomes de côlon modérément différenciés (Basora et al., 1998).

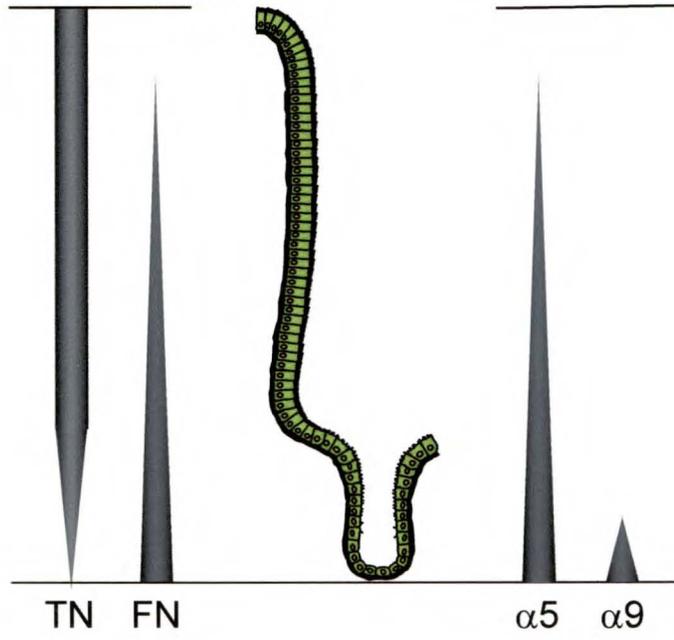
3.2.2.3. La ténascine-C sans récepteur et $\alpha 9\beta 1$ sans ligand

Lorsque l'on s'attarde à l'analyse des patrons d'expression de la ténascine-C et de l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ dans les tissus fœtaux et adultes normaux (Figure 4), la conclusion se fait rapidement : il manque des éléments au tableau! Effectivement, comme la ténascine-C devient présente progressivement au niveau de la lame basale cryptale pendant le développement (Beaulieu et al., 1993a,b), l'intégrine $\alpha 9\beta 1$, qui y est strictement concentrée, tend à disparaître (Desloges et al., 1998). Ces molécules n'étant pas co-distribuées de façon spatio-temporelle dans la muqueuse intestinale, leur interaction y est impossible. Il est donc évident que d'autres molécules du système adhésif RGD sont exprimées dans la muqueuse intestinale humaine.

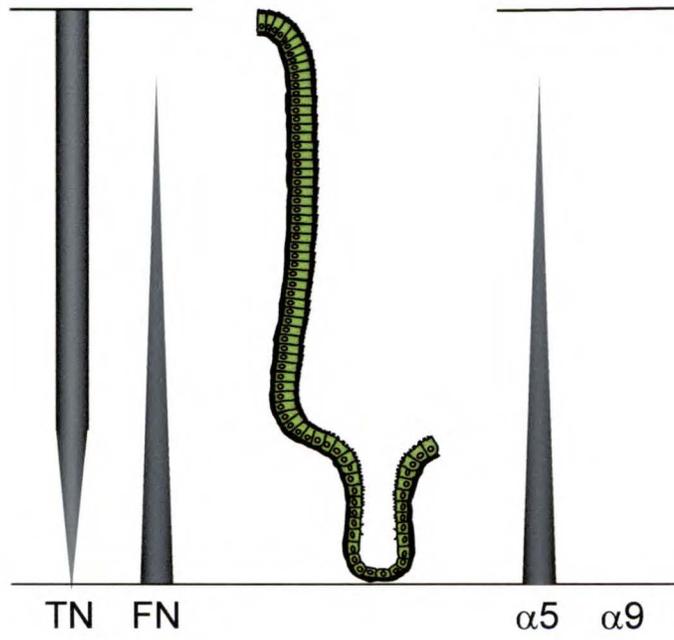
Figure 4. Distribution le long de l'axe crypte-villosité des molécules impliquées dans le système RGD.

Représentation schématique, dans la lame basale de l'axe crypte-villosité à 18 semaines (**A**) et chez l'adulte (**B**), de la distribution de molécules impliquées dans le système RGD. Le niveau d'expression de chacune des protéines est fonction de la largeur de la bande correspondante. Les intégrines sont présentées à droite, alors que les ligands se retrouvent à gauche.

A



B



4. Molécules du système adhésif RGD dont l'expression est inconnue dans la muqueuse intestinale humaine en développement

4.1. L'ostéopontine (OPN)

4.1.1. Caractérisation de l'OPN

L'OPN est une protéine de la matrice-extracellulaire, dont le squelette polypeptidique subit de nombreuses modifications post-transcriptionnelles (phosphorylations et glycosylations; Denhardt et Guo, 1993; Franzen et Heinegard, 1985). Une fois sécrétée, cette molécule a la capacité de s'associer à l'hydroxyapatite (Oldberg et al., 1986), ainsi qu'à certains autres composants de la matrice extracellulaire, tels le collagène (Chen et al., 1992; Nemir et al., 1989).

La séquence polypeptidique de l'OPN présente plusieurs sites d'interaction avec des intégrines, lui conférant ainsi un rôle dans l'adhésion cellulaire (Bayless et al., 1998; Oldberg et al., 1986; Yokosaki et al., 1999). Tout d'abord, l'OPN présente une séquence adhésive RGD fonctionnelle (Figure 3; Oldberg et al., 1986; Xuan et al. 1995) lui permettant d'interagir avec les intégrines $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ (Hu et al., 1995a,b; Liaw et al., 1995; Ross et al., 1993), ainsi qu' $\alpha8\beta1$ (Denda et al., 1998b). Il a également été démontré que les intégrines $\alpha9\beta1$ et $\alpha4\beta1$ médient une adhésion à l'OPN, mais ce via la

reconnaissance de séquences ne contenant pas de RGD (Bayless et al., 1998; Yokosaki et al., 1999).

4.1.2. Fonctions de l'OPN

L'OPN a tout d'abord été isolée et caractérisée à partir de matrice osseuse calcifiée (Franzen et Heinegard, 1985), où elle interagit au cours de la déposition, ainsi que la résorption calcique (Oldberg et al., 1986; Ross et al., 1993). Elle a par la suite été localisée dans divers tissus et liquides corporels, sa déposition étant effectuée par une multitude de types cellulaires aux fonctions diverses (Denhardt et Guo, 1993). De façon surprenante, la souris déficiente en OPN (souris OPN^{-/-}) ne présente aucun changement phénotypique majeur lorsqu'elle est comparée à la souris de type sauvage, ce qui ne suggère pas de rôle essentiel pour l'OPN au cours du développement murin (Rittling et Denhardt, 1999).

Par contre, la capacité de réponse des souris OPN^{-/-} à différentes pathologies est altérée, soulignant des fonctions importantes au niveau physiopathologique. En effet, l'absence d'OPN corrèle parfois avec une perte de protection lors de dommages tissulaires, et ce, souvent en rapport avec un manque ou une diminution de l'activation des macrophages (Rittling et Denhardt, 1999). En opposition, certains cas pathologiques sont atténués par l'absence de l'OPN, notamment les cancers, où les cellules tumorales

répondent à une interaction avec l'OPN par une augmentation de leur croissance, ainsi que par une élévation de leur motilité (Crawford et al., 1998; Philip et al. 2001; Tuck et al. 1999).

4.1.3. Expression de l'OPN dans le système digestif

Au cours du développement intestinal, il a été établi que l'OPN n'est pas, ou très peu, exprimée dans les principaux modèles animaux (Moore et al., 1991; Nomura et al., 1988;). De plus, la molécule est absente dans l'intestin du rat adulte (Yoon et al., 1987). Au niveau du système digestif humain adulte, Brown et son équipe, ont mis à jour la présence de l'OPN à la surface apicale de l'épithélium intestinal (Brown et al., 1992). Depuis, il a été déterminé que l'OPN est sécrétée par l'épithélium de la vésicule biliaire, ainsi que certaines cellules de l'épithélium gastrique, ce qui explique sa présence dans le segment intestinal, où sa production est restreinte aux cellules du système immunitaire (Qu-Hong et al., 1994; Qu-Hong et al., 1997a; Qu-Hong et al., 1997b).

Comme dans la plupart des cancers, l'OPN est surexprimée dans les carcinomes de côlon, où sa sécrétion semble effectuée, principalement, par les cellules du système immunitaire (Brown et al., 1994).

4.2. L'intégrine $\alpha 8\beta 1$

4.2.1. Caractérisation et fonctions d' $\alpha 8\beta 1$

La sous-unité $\alpha 8$ humaine, caractérisée en 1995, s'associe exclusivement à la sous-unité $\beta 1$ (Schnapp et al., 1995a). Cette intégrine reconnaît la fibronectine, la vitronectine, la ténascine-C, l'ostéopontine, ainsi que la néphronectine de façon RGD dépendante (Figure 3; Brandenberger et al., 2001; Denda et al., 1998b; Müller et al., 1995; Schnapp et al. 1995b; Varnum-Finney et al., 1995).

Du côté fonctionnel, elle joue un rôle essentielle en tant qu'organisateur de molécules matricielles, dont l'ostéopontine, pendant l'organogenèse du rein, au cours de laquelle elle est exprimée de façon ponctuelle (Müller et al., 1997). Elle semble aussi promouvoir la croissance neuronale au cours du développement du système nerveux (Einheber et al., 1996; Varnum-Finney et al., 1995). Vue sa découverte récente, rien n'est encore connu au niveau de la signalisation spécifique qu'elle pourrait engendrer.

4.2.2. Expression d' $\alpha 8\beta 1$ dans le système digestif

Des études ont été effectuées chez le rat adulte (Schnapp et al., 1995a), ainsi que chez les embryons de poulet (Bossy et al., 1991) et de souris (Müller et al., 1997), afin de déterminer l'expression de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines dans l'intestin. Sa présence a alors été démontrée par immunofluorescence

indirecte dans le muscle lisse de la paroi gastrointestinale des trois espèces, ainsi que dans les lames basales embryonnaires. Sa déposition sous l'épithélium intestinal embryonnaire a été jugée d'origine mésenchymateuse (Müller et al., 1997).

4.3. Les intégrines αv

La sous-unité αv des intégrines peut s'associer aux sous-unités $\beta 1$ (Bodary et McLean, 1990; Vogel et al., 1990), $\beta 3$ (Pytela et al., 1985b), $\beta 5$ (Smith et al., 1990), $\beta 6$ (Sheppard et al., 1990) et $\beta 8$ (Moyle et al., 1991). Chacun des récepteurs formés possédant des propriétés adhésives qui lui sont propres (Figure 3), les intégrines αv sont impliquées dans une multitude de fonctions cellulaires. Par exemple, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ et $\alpha v\beta 6$ sont reconnues pour leur implication dans la migration (Huang et al., 1998; Klemke et al., 1994; Leavesley et al., 1992), ainsi que la prolifération cellulaire (Agrez et al., 1994; Huang et al., 2000; Montgomery et al., 1994).

Les nombreuses implications des intégrines αv au niveau cellulaire se traduisent dans certains processus biologiques, tels l'angiogenèse (Brooks et al., 1994; Friedlander et al., 1995; Zhu et al., 2002) et la tumorigenèse (Felding-Habermann et al., 1992; Li et al., 1998; Townsend et al., 2000), où leur activité est primordiale. Au niveau du système digestif, elle est très peu étudiée et aucune fonction primordiale n'a été soulevée pour le moment.

5. Hypothèses et objectifs de mon projet de maîtrise

5.1. Analyse de l'expression dans la muqueuse intestinale humaine d'autres molécules impliquées dans le système RGD

Les études d'expression menées jusqu'à maintenant dans la muqueuse intestinale humaine en développement laissent l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ sans ligand et la TN-C sans récepteur potentiel.

Puisqu'une intégrine médie généralement sa fonction via une interaction avec un ligand spécifique et qu'une grande part des fonctions de la TN-C dépend de sont interaction avec des intégrines, l'hypothèse de départ était qu'il y a certainement d'autre molécules impliquées dans le système adhésif RGD exprimées dans la muqueuse intestinale humaine. Le premier objectif visait donc l'identification d'un ligand pour l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ et d'un récepteur pour la TN-C, au cours du développement de la muqueuse intestinale humaine. L'analyse de l'expression de l'OPN, autre ligand d' $\alpha 9\beta 1$, ainsi que des sous-unités $\alpha 8$ et αv des intégrines, autres récepteurs de la TN-C, a donc été entreprise par immunofluorescence indirecte, analyse Western et RT-PCR dans la muqueuse intestinale humaine en développement et ses modèles cellulaires.

5.2. Cerner les intégrines permettant l'adhésion des cellules HIEC-6 sur le TNfn3

Des études préliminaires, soulignant la capacité d'adhésion des cellules HIEC-6 sur un fragment recombinant de la TN-C, le TNfn3, ont permis d'établir une deuxième hypothèse: ces cellules adhèrent de façon RGD dépendante au TNfn3, et ce, via plusieurs récepteurs. Pour cette partie du projet, l'objectif principal était donc de démontrer que les cellules HIEC-6 adhèrent au TNfn3 via la séquence RGD. S'ajoutait ensuite la nécessité d'établir l'implication de plusieurs intégrines dans cette interaction. Des essais d'adhésion ont donc été effectués, et ce en présence de peptides GRGDS, GRGES et d'anticorps neutralisants différentes intégrines, afin de cerner précisément quelles intégrines médient l'interaction des cellules HIEC-6 au TNfn3 et dans quelles proportions.

5.3. Préparation d'un modèle cellulaire qui permettra d'éclaircir le rôle d' $\alpha 8\beta 1$ dans l'adhésion RGD dépendante des cellules HIEC-6

En cours d'étude, l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ s'est avérée exprimée par les cellules HIEC-6. Les résultats obtenus lors des essais d'adhésion cellulaire ont permis d'établir une hypothèse supplémentaire voulant qu'il y est implication de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ dans l'adhésion RGD dépendante des cellules HIEC-6 sur le TNfn3. Le dernier objectif de ce projet visait donc à prouver la fonctionnalité

d' $\alpha 8\beta 1$ à médier une adhésion sur le TNfn3. Comme aucun anticorps neutralisant $\alpha 8\beta 1$ n'est disponible, les cellules HIEC-6 ont été infectées avec des vecteurs rétroviraux permettant l'expression de la sous-unité $\alpha 8$ complète et d'un anti-sens de celle-ci.

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Spécimens

Les échantillons d'intestin grêle et de côlon provenant de foetus âgés entre 8 et 20 semaines furent obtenus à la suite d'interruptions légales de grossesses réalisées au Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. Les échantillons de tissus adultes furent récupérés à la suite d'interventions chirurgicales dans le même établissement. Ceci en conformité avec les protocoles d'éthique approuvés.

2. Culture cellulaire

2.1 Cellules Caco-2/15

La lignée cellulaire Caco-2/15 a été fournie par le Dr. A. Quaroni (Cornell University, Ithaca, NY). Ce clone est dérivé de la lignée parentale Caco-2 (HTB 37; American Type Culture Collection, Manassas, VA) et a été caractérisé précédemment (Beaulieu et Quaroni, 1991; Vachon et Beaulieu, 1992; Vachon et al., 1996). Ces cellules étaient cultivées dans des pétris de plastique de 100 mm (Falcon; Becton-Dickenson Labware) à 37°C dans une atmosphère 95% air et 5% CO₂. Le milieu utilisé était le Eagle modifié de Dulbecco (DMEM; Gibco

BRL) additionné de 10% de FBS ICN CELlect Gold (ICN Pharmaceuticals, Grand Island, NY), de 10 mM HEPES et de 2 mM de glutamine (tous deux provenant de Gibco BRL). Le milieu était remplacé par 10 ml de milieu frais aux 48 heures et, pour l'expansion, les cellules étaient repiquées un dans cinq lorsqu'elles atteignaient 80% de confluence.

2.2 Cellules HIEC-6

Les cellules HIEC-6 ont été isolées dans notre laboratoire (Perreault et Beaulieu, 1996). Ces cellules étaient cultivées dans des pétris de plastique de 100 mm, à 37°C dans une atmosphère 95% air et 5% CO₂, avec du milieu OptiMEM I (Gibco BRL) additionné de 4% de FBS, de 2 mM de glutamine, de 10 mM HEPES et de 5 ng/ml du EGFh (BD Biosciences). Le milieu était changé aux 48 heures avec 10 ml de milieu frais et les cellules étaient passées un dans trois à l'atteinte de la confluence.

2.3 Cellules HIM

Les cellules HIM étaient cultivées dans des pétris de plastique de 100 mm à 37°C dans une atmosphère 95% air et 5% CO₂. Le milieu utilisé était le DMEM additionné de 10% de FBS, de 10 mM d'HEPES et de 2 mM de glutamine. Le milieu était remplacé par 10 ml de milieu frais aux 48 heures et,

pour l'expansion, les cellules étaient passées un dans cinq lorsqu'elles atteignaient 80% de confluence.

3. Immunofluorescence indirecte

3.1 Préparation des spécimens

3.1.1 Tissus

Dès réception (1 heure maximum), les tissus étaient inclus dans de l'O.C.T. (Canemco Inc., St-Laurent, PQ, CAN) et immédiatement congelés dans l'azote liquide. Des coupes de 3 μm d'épaisseur des différents spécimens étaient effectuées et disposées sur des lames de verre préalablement silanisées (Sigma). Les lames étaient conservées à -80°C et décongelées 1 heure avant la procédure d'immunofluorescence indirecte.

3.1.2 Cellules

Les cellules étaient ensemencées sur des lames multichamps (Lab-Tek; Nalge Nunc International) 24 heures avant la procédure d'immunofluorescence indirecte. Avant leur utilisation, les cellules étaient rincées avec du PBS (0,137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4).

3.2 Procédure d'immunofluorescence indirecte

Un protocole d'immunofluorescence indirect standard était utilisé (Beaulieu, 1992). Les spécimens étaient fixés pendant 10 minutes à -20°C avec l'acétone, l'éthanol ou le méthanol, ou 60 minutes à 4°C avec la paraformaldéhyde 2% dans du PBS, pH 8,5. La nature de la fixation dépendait de l'anticorps primaire utilisé (voir tableau 1). Pour les cellules, il y avait ensuite une perméabilisation de 10 minutes dans 0,5% Triton X100 dans du PBS. Les spécimens étaient par la suite rincés dans du PBS et incubés pendant 45 minutes à 4°C dans une solution de PBS contenant 100 mM de glycine, avant d'être incubés pendant 30 minutes dans une solution de 10% de lait en poudre écrémé dans du PBS (blotto 10%; Johnson et al., 1984), puis une heure en présence des anticorps primaires dilués dans le blotto 10% (voir tableau 1 pour les différentes dilutions). Après 3 lavages dans du PBS, les spécimens étaient incubés en présence d'immunoglobuline de chèvre anti-souris, anti-rat ou anti-lapin (selon la nature de l'anticorps primaire utilisé, voir tableau 1) conjuguée à la fluorescéine ou à la rhodamine (Boehringer Mannheim) diluée 1:25 dans le blotto 10%. Finalement, les spécimens étaient préparés à l'observation dans une solution de glycérol-PBS (9:1) contenant 0,1% de phénylènediamine (Johnson et De C Nogueira Araujo, 1981) et visionnés à l'aide d'un microscope à fluorescence Reichert Polyvar 2 (Leica Instrument, Australie).

4. Analyse des protéines par transfert Western

4.1 Isolement des protéines

Le milieu était aspiré des pétris de 100 mm dans lesquels les cellules étaient cultivées et ces dernières étaient rincées avec du PBS. À chacun des pétris, on ajoutait 250 μ l de tampon de solubilisation 1X (tampon Tris-HCl 0,125M pH 6,8; 0,23% de SDS; 10% de glycérol; 0,001% de bleu de Bromophénol; 5% β -mercaptoéthanol). Chacun des échantillons était ensuite soniqué avec un sonicateur de type Ultrasonic Processor XL (Mandel Scientific Company) pendant 10 secondes à intensité 2.5, chauffé pendant 5 minutes à 95°C et centrifugé pendant 5 minutes à 16 000 g. Les surnageants étaient récupérés et conservés à -80°C.

4.2 Migration des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant

Le gel séparateur utilisé était de type Thomas et Kornberg (Thomas et Kornberg, 1975) et contenait de 10 à 15% d'acrylamide (rapport acrylamide:bis-acrylamide 30:0,15) ainsi que 0,75 M de Tris-HCl pH 8,8 et 1% de SDS. Le gel concentrateur contenait 4% d'acrylamide (rapport acrylamide:bis-acrylamide 29:1) ainsi que 0,25 M Tris-HCl pH 6,8 et 1% SDS. Pour la migration, le gel était placé dans un tampon contenant 0,1% SDS, 2,88% glycine et 0,61% Tris-HCl dans de l'eau bidistillée. La séparation des protéines était effectuée par

électrophorèse sur une période de 16 heures à 60 volts ou de 5 heures à 150 volts.

4.3 Transfert des protéines sur membranes de nitrocellulose

À la suite de la migration, le gel était récupéré et équilibré pendant 30 minutes dans le tampon de transfert à 4°C (glycine 1,4%, Tris 0,3% dans de l'eau bidistillée; si la protéine d'intérêt était plus petite que 100 kD, 20% de méthanol était ajouté), puis monté en sandwich avec la membrane de nitrocellulose (Bio-Rad, Richmond, CA) entre deux papiers Whatman. Le transfert avait lieu pendant 30 minutes à 20 volts suivies de une heure à 100 volts dans un système BioRad. Les membranes étaient récupérées et lavées dans de l'eau bidistillée. Les protéines étaient ensuite localisées par une coloration au rouge de Ponceau (Towbin et al., 1979), puis les membranes étaient décolorées complètement par des lavages dans du PBS.

4.4 Détection des antigènes

Les membranes de nitrocellulose étaient d'abord incubées dans du blotto 10% une heure, puis incubées de 2 à 16-heures en présence des anticorps primaires dilués dans la solution de blocage (voir tableau 1 pour les différentes dilutions). Après des lavages dans du PBS, les membranes étaient incubées pendant une heure en présence d'immunoglobuline de chèvre anti-souris, anti-

rat ou anti-lapin (selon la nature de l'anticorps primaire utilisé, voir tableau 1) conjuguée à la PAL (Bio-Rad). À la suite de lavages dans du TBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2,5 mM Tris base; pH 7,4), les membranes étaient équilibrées avec le tampon de la PAL (1,21% Tris-HCl, 0,58% NaCl, 1,02% MgCl₂; pH 9,5) puis finalement incubées avec le substrat chromogénique de la PAL (Bio-Rad). La réaction enzymatique était arrêtée par un lavage dans de l'eau bidistillée, puis les membranes étaient séchées à l'air libre.

Tableau 1. Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence indirecte et lors de l'analyse des protéines par transfert Western

Nom	Nature	Antigène	Dilution	Fixation	Référence
MPIIB10 ₁	M/S	Ostéopontine	1/100 IF 1/500 WB	Éthanol ---	Gorski et al., 1990
MAB3057	M/R	Ostéopontine	1/100 IF	Acétone	Hu et al., 1995
Anti- α 8-GST	P/L	Sous-unité α 8	1/100 IF 1/250 WB	Méthanol ---	Varnum-Finney et al., 1995
Anti- α 8	P/L	Sous-unité α 8	1/500 IF 1/1000 WB	Méthanol ---	Schnapp et al., 1995a
Anti- α v	P/L	Sous-unité α v	1/50 IF	Acétone	Don du Dr. E. Ruoslahti
MAB1953Z	M/S	Sous-unité α v	1/100 IF	Acétone	Weinacker et al., 1994
MAB13	M/R	Sous-unité β 1	1/1000 WB	---	Mould et al., 1996

Légende

M : monoclonal P : polyclonal

S : souris L : lapin R : rat

IF : immunofluorescence indirecte WB : analyse Western

5. Extraction des ARNs totaux

5.1 Extraction des ARNs totaux de cellules en culture

Les cellules, cultivées dans des pétris de 100 mm, étaient rincées au PBS et 3 ml de TriPure Isolation Reagent (TIR; Boehringer Mannheim) étaient ajoutés à chaque pétri. Le produit de la lyse cellulaire était rapidement transféré dans un tube stérile. À la suite d'une incubation de 5 minutes à la température de la pièce, on ajoutait à chaque tube 0,2 ml de chloroforme pour chaque ml de TIR. Les tubes étaient vortexés pendant 15 secondes, incubés à 4°C pendant 2 minutes et centrifugés à 15 000 g pendant 15 minutes à 4°C, puis la phase aqueuse était récupérée. On ajoutait à celle-ci 0,5 ml d'isopropanol pour chaque ml de TIR utilisé. À la suite d'un mélange par inversion, les tubes étaient incubés pendant 5 minutes à 4°C, puis centrifugés pendant 10 minutes dans les mêmes conditions que précédemment. Le surnageant était ensuite décanté et les culots lavés à l'éthanol 75%. Ces derniers étaient resuspendus dans 30 µl de la solution RNAsecure (Ambion, Fort Erie, ONT, CAN) et chauffés pendant 10 minutes à 60°C.

5.2 Extraction des ARNs totaux de tissus

Dès réception, les tissus étaient congelés rapidement (1 heure maximum) dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. L'homogénéisation

de 200 mg de tissu dans 2 ml de solution dénaturante (2,7 M thiocyanate de guanidine, 1,3 M thiocyanate d'ammonium, 100 mM acetate de sodium pH 4,0; Clontech Laboratories, Mississauga, ON) était effectuée sur glace, à la force 7 d'un Polytron monté avec une microtige (Brinkmann Instruments, Westbury, NY). Après une incubation sur glace de 10 minutes, l'homogénat était centrifugé à 15 000 g pendant 5 minutes à 4°C. La première étape consistait en une extraction phénol : chloroforme. On ajoutait tout d'abord au surnageant 4 ml de phénol saturé avec de l'acétate de sodium 2M pH 4,0, puis les solutions étaient homogénéisées au vortex pendant 1 minute et incubées sur glace pendant 5 minutes. Par la suite, 1,2 ml de chloroforme était ajouté et les solutions étaient encore une fois homogénéisées au vortex et incubées sur glace pendant 5 minutes avant d'être centrifugés à 15 000 g pendant 5 minutes à 4°C. La phase aqueuse était utilisée pour refaire une extraction phénol : chloroforme, mais cette fois avec 3,2 ml de phénol saturé et 0,8 ml de chloroforme. On ajoutait ensuite 4 ml d'isopropanol à la phase aqueuse et après une incubation sur glace de 10 minutes, les échantillons étaient centrifugés à 15000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot d'ARN était ensuite lavé avec 2 ml d'éthanol aqueux 80%, séché et resuspendu dans la solution RNasecure (Ambion).

6. RT-PCR

6.1 Réaction de transcription inverse (RT)

La réaction de RT était effectuée dans une solution composée de 0,5 mM de chaque dNTP, 1 μ M de l'amorce oligo-dT, 10 unités d'inhibiteur de RNase, 4 unités de la transcriptase inverse (Omniscript; Qiagen) et 2 μ l du tampon 10X fournit à l'achat de la transcriptase inverse, le volume était complété à 20 μ l avec de l'eau sans nucléase (Promega Corp., Madison, WI). On ajoutait à cette préparation 2 μ g des extraits d'ARNs totaux, puis on incubait le tout pendant 1 heure à 37°C afin d'obtenir les ADNc. La solution était conservée à -20°C pour amplification par PCR.

6.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de PCR était effectuée dans une solution composée de 1 μ l de la réaction de transcription inverse (ADNc), 0,2 mM de chaque dNTP, 0,2 μ M de chacune des amorces (tableau 2), 2,5 unités de l'ADN polymérase Taq (Qiagen) et 10 μ l du tampon 10X fournit à l'achat de la polymérase, le volume était complété à 100 μ l avec de l'eau sans nucléase (Promega Corp.). L'amplification des fragments d'ADNc était effectuée selon un protocole de Touchdown PCR (Don et al., 1991), c'est-à-dire que le processus d'amplification consistait en une dénaturation (94°C, 1 minute), suivie d'une hybridation et d'une extension (72°C, 1 minute). Les périodes d'hybridation étaient d'une durée de 2 minutes, les deux premiers cycles étaient effectués avec une hybridation à 65°C, puis la température d'hybridation était diminuée d'un degré à tous les deux cycles. L'amplification était effectuée ainsi, jusqu'à l'atteinte d'une

température d'hybridation minimale de 50°C, puis elle était suivie d'une dernière extension de 13 minutes à 72°C. Le nombre de cycle à effectuer afin d'obtenir une amplification spécifique était déterminé pour chacune des séquences à l'aide d'un contrôle positif. Les produits de PCR étaient ensuite séparés sur gel d'agarose et analysés pour des fins de quantification relative.

Tableau 2. Différentes amorces utilisées pour effectuer les PCR

protéine	amorce en 5'	amorce en 3'	Séquence ADNc
ostéopontine	gcatcacctgtgccatacc	cagtttgacgaatccacct	Anderson et al., 1996
sous-unité $\alpha 8$	tggggctctacaaccagcata	tgctgtctggattgtccttg	Schnapp et al., 1995a
sous-unité αv	gaccttggaacccaatgaa	ggcaaccgtgtcattctttt	NCBI XM_002379
sous-unité $\beta 1$	acacatgcacacaggaatg	tgccctaaagctacctaactg	Argraves et al., 1987

7. Production du peptide de fusion GST-TNfn3

7.1 Production du peptide

La séquence encodant le TNfn3 avait préalablement été insérée dans le vecteur pGEX-5X-3 (pGEX Vectors – GST gene fusion; Amersham Pharmacia Biotech) et le tout avait été utilisé pour transformé des bactéries *E.coli* DH5 α .

compétentes. Ces bactéries étaient dégelées et utilisées pour ensemercer 200 ml de LB-Amp. À la suite d'une incubation de 16 heures à 37°C, 6 fois 25 ml de cette pré-culture étaient prélevés et incubés avec 6 fois 500 ml de LB-Amp à 37°C jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ de 0,4. On ajoutait alors 0,1 mM d'IPTG à chacune des cultures et on incubait le tout pendant 3 heures à 37°C. Ces cultures étaient ensuite centrifugées à 1000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les culots de bactéries étaient rassemblés par des lavages au PBS et resuspendus dans 8 ml de tampon de lyse (1 mM PMSF, 0,5 µg/ml leupeptine et aprotinine, 0,07 µg/ml pepstatine, 10 mM EDTA dans du PBS pH 7,5) avant d'être soniqué (Ultrasonic Processor XL; Mandel Scientific Company) 2 fois pendant 15 secondes à intensité 2,5. On ajoutait alors 1% de Triton X-100 et, après une incubation de 10 minutes sur glace, on effectuait une centrifugation à 12 000 x g de 15 minutes à 4°C. Le surnageant était récupéré et conservé.

7.2 Purification du peptide

Les billes de glutathione-Sépharose (Amersham Pharmacia Biotech) étaient tout d'abord lavées 2 fois dans le tampon de lyse additionné de 1% Triton X-100 (tampon de lyse-Triton) et équilibrées 1 heure à 4°C dans 10 ml de ce même tampon. Après récupération par une centrifugation de 3 minutes à 500 g, les billes étaient ajoutées au surnageant récupéré à l'étape précédente pour une incubation de 30 minutes à 4°C. Les billes associées aux peptides GST étaient ensuite plusieurs fois lavées au PBS, avant d'être adsorbées sur une

colonne de chromatographie Poly-Prep de 10 ml (Bio-Rad). L'élution était effectuée avec 10 ml de tampon d'élution (100 mM HEPES, 50 mM glutathione dans PBS pH 7,6) et l'éluat était récupéré en fractions de 1 ml. Les fractions démontrant la présence de protéines à DO_{280} étaient concentrées sur Centricon 30 (Millipore, Bedford, MA) et lavées avec HEPES 100 mM dans du PBS pH 7,6. Les peptides GST isolés étaient aliquotés et conservés à -80°C . La pureté des peptides était vérifiée par une migration sur gel de polyacrylamide (voir section 4.2).

8. Essai d'adhésion cellulaire

8.1 Préparation des plaques

Les essais d'adhésion cellulaire sur différentes matrices ont été effectués dans des plaques 96 puits (Sarstedt), selon une procédure décrite préalablement (Niessen et al., 1994). Tout d'abord, les matrices étaient solubilisées dans du PBS (voir tableau 3 pour les différentes concentrations) et déposées dans les puits (200 μl /puits), la période d'incubation était de 16 heures à 4°C . Par la suite, les puits étaient rincés au PBS avant d'être traités avec du PBS contenant 1% de BSA (Sigma) deux heures à 37°C . Les puits étaient ensuite lavés au PBS et 100 μl de milieu OptiMEM I contenant 0,5% BSA, 2 mM de glutamine, 10 mM HEPES et 0,3 mM Mn^{2+} (OptiMEM 0,5% BSA) étaient placés dans chacun des puits.

Tableau 3. Concentration des différentes matrices pour les essais d'adhésion

Matrices	Concentration	Quantité par puits	Origine
Collagène	25 µg / ml	5 µg	BD Biosciences
GST	20 µg / ml	4 µg	Voir section 7
GST-TNfn3	20 µg / ml	4 µg	Voir section 7

8.2 Préparation des cellules HIEC-6

Les cellules HIEC-6 étaient rincées une fois au PBS et placées dans 10 ml de milieu OptiMEM 0,5% BSA pour une période de 20 à 24 heures avant leur récupération pour l'essai d'adhésion (sevrage). Après 5 à 6 heures de sevrage, les cellules étaient transférées dans un nouveau pétri, afin d'éliminer le plus possible de matrice extracellulaire et de permettre une récupération des cellules sans l'utilisation de la trypsine pour une préservation des récepteurs de la surface cellulaire.

8.3 Essai d'adhésion avec les cellules HIEC-6

8.3.1 Récupération des cellules et ensemencement

Les cellules étaient rincées avec du PBS, puis elles étaient détachées par une incubation de 10 minutes dans 1 ml par pétri de PBS 0,5 mM EDTA. Elles

étaient ensuite centrifugées pendant 5 minutes à 100 g à 4°C dans du milieu OptiMEM 0,5% BSA et resuspendues dans ce même milieu. La période au cours de laquelle les cellules étaient gardées en suspension était d'une heure. S'il y avait incubation avec des peptides solubles ou des anticorps, ceux-ci étaient ajoutés aux cellules pour les 30 dernières minutes de cette période (voir tableau 4 pour différentes concentrations). Par la suite, 50 000 cellules étaientensemencées dans chaque puits et les plaques étaient placées à 37°C dans une atmosphère 95% air et 5% CO₂, pour une période fixe d'une heure.

8.3.2 Traitement et dénombrement des cellules adhérees

Après la période d'adhésion, les plaques étaient plongées dans du PBS et ce dernier était retiré des puits par aspiration. Un volume d'environ 100 µl était laissé dans le fond de chacun des puits, auquel on ajoutait 100 µl de formaldéhyde 7,4% dans du PBS. La période de fixation était de 25 minutes à 4°C, à la suite de laquelle les cellules étaient rincées au PBS. Les noyaux des cellules adhérees étaient colorés pendant 4 minutes dans une solution 1 :10000 de DAPI (Sigma). Après rinçage dans du PBS, les noyaux étaient dénombrés par un système informatique (Métamorph Imaging systems; Universal imaging corporation).

Tableau 4. Liste des peptides solubles et des anticorps neutralisant utilisés lors des essais d'adhésion

Nom	Antigène	Concentration	Origine
GRGDSP	----	100 μ M	Gibco BRL
GRGESP	----	100 μ M	Gibco BRL
MAB13	Sous-unité β 1	10 μ g/ml	Mould et al., 1996
MAB16	Sous-unité α 5	25 μ g/ml	Fogerty et al., 1990
Y9A2	Sous-unité α 9	10 μ g/ml	Yokosaki et al., 1994
MAB2021Z	Sous-unité α v	50 μ l/ml	Chemicon
LM 609	Intégrine α v β 3	10 μ g/ml	Biogenesis Cheresh et al., 1987
P1F6	Intégrine α v β 5	5 μ g/ml	GIBCO BRL Wayner et al., 1991
IgG de souris	----	10 μ g/ml	Sigma

9. Préparation de cellules exprimant de façon stable la sous-unité α 8 des intégrines complète ou un anti-sens de celle-ci.

Les stratégies de clonages utilisées sont illustrés aux figures 5, 6, et 7 et les vecteurs obtenus sont présentés à la figure 8.

9.1. Préparation des vecteurs et des inserts

9.1.1. Traitement des vecteurs avec les enzymes de restrictions

Les digestions par les enzymes de restrictions étaient effectuées sur 10 μg d'ADN, dans un volume total de 50 μl comprenant 10 unités de l'enzyme désirée (Boehringer Mannheim), ainsi que son tampon. L'incubation avait lieu à 37°C pendant 3 heures. À la suite de chaque étape de digestion, on effectuait une extraction au phénol/chloroforme et une précipitation à l'éthanol. Un volume égal de phénol/chloroforme était ajouté, puis, après avoir bien homogénéisé au vortex, la solution était centrifugée 5 minutes à 16 000 g. La phase aqueuse était isolée, et on y ajoutait 5 μl d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 165 μl d'éthanol 95% froid, puis on centrifugeait 30 minutes à 16 000 g. Le culot était ensuite lavé avec de l'éthanol 70%, séché et resuspendu dans 20 μl de Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Si nécessaire, les extrémités cohésives obtenues étaient complétées par une incubation de une heure à 37°C avec 10 unités d'enzyme de Klenow (Boehringer Mannheim), en présence de 250 μM de chaque dNTP et du tampon M (Boehringer Mannheim), dans un volume de 50 μl .

9.1.2. Purification des produits de digestion

Avant leur purification, les vecteurs hôtes étaient déphosphorylés par un traitement de 30 minutes à 37°C en présence de 4 unités de PAL (Boehringer Mannheim) et de son tampon, le tout dans un volume de 50 μl . Les produits de digestion étaient ensuite séparés par migration sur gel d'agarose 1%. L'ADN correspondant à l'ADNc de la sous-unité $\alpha 8$, ainsi qu'aux vecteurs hôtes, était extrait du gel par une électro-élution. Les fragments de gel étaient tout d'abord

placés dans un boudin à dialyse en présence de 450 μ l de tampon de migration, pour une période de 20 minutes à 100 V. Le tampon contenant l'ADN était retiré du boudin et ajouté à un volume de phénol saturé avec du Tris-HCl 1M pH 8, puis la solution obtenue était homogénéisée au vortex et centrifugée pendant 5 minutes à 16 000 g. La phase aqueuse était recueillie et ajoutée à un volume de chloroforme, puis le tout était centrifugé à nouveau, dans les mêmes conditions. L'ADN contenu dans la phase aqueuse était alors précipité par l'ajout de 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M et un volume d'isopropanol froid, suivi d'une centrifugation de 30 minutes à 16 000 g. Vu sa petite taille (183 pb), l'ADN de l'anti-sens de la sous-unité $\alpha 8$ était extrait du gel d'agarose par l'utilisation du système Qiaex II (Qiagen).

9.2. Production des vecteurs

9.2.1. Ligation et transformation des bactéries *E.coli* compétentes

À l'ADN du vecteur et de l'insert, 1 unité de ligase (Gibco BRL) et 1 μ l de son tampon étaient ajoutés, puis le volume était complété à 10 μ l avec de l'eau. La ligation avait lieu à la température de la pièce pendant 1 heure minimum (pouvant aller jusqu'à 16 heures). Par la suite, 1 μ l du produit de ligation était utilisé pour transformer 50 μ l de bactéries *E.coli* DH5 α compétentes. La solution contenant les bactéries et l'ADN était transférée dans une cuvette pour électroporation et subissait un champ électrique de 1,8 kV. Immédiatement

après, 900 µl de milieu SOC (2% bactotryptone, 0,5% extrait de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Mg SO₄ et 20 mM glucose) à 37°C étaient ajoutés aux bactéries et celles-ci étaient incubées 45 minutes à 37°C sous agitation. Les bactéries étaient ensuiteensemencées sur des pétris de L-Broth-Agar contenant 100 µg/ml d'ampicilline, la croissance avait lieu à 37°C pendant 16 heures.

9.2.2. Sélection et amplification des clones contenant les vecteurs désirés

Les colonies isolées obtenues à la suite de la transformation étaient repiquées et ensemencées dans des bouillons de 3 ml de milieu LB-Amp, des mini-préparations d'ADN (Qiagen) étant effectuées suite à 16 heures de croissance à 37°C. Les clones comportant les vecteurs désirés étaient sélectionnés par digestions enzymatiques et amplifiés par maxi-préparations (Qiagen). Les vecteurs comportant l'anti-sens étaient vérifiés par séquençages automatiques.

9.3. Préparation des virus

Tout d'abord, on effectuait une co-transfection au phosphate de calcium (Amersham Pharmacia Biotech) de pBabe ou de pLNCX2 contenant le gène d'intérêt avec 20 µg de pAmpho (vecteur comportant les gènes nécessaires à la formation des capsides rétrovirales) dans des cellules 293T. Le lendemain, on

remplaçait le milieu de culture par 4 ml de milieu frais par pétris. Les surnageants contenant les particules virales étaient recueillis 40 heures plus tard, filtrés sur filtre de 0,45 μm et concentrés dans un volume de 0,5 ml de milieu avec « UltraFree 15 Centrifuge Filter device » (Biomax; Millipore Corporation) par une centrifugation de 30 minutes à 2000 g. Les virus étaient conservés à -80°C .

9.4 Infection des cellules et sélection

La veille de l'infection, les cellules HIEC-6 étaient ensemencées dans des pétris de 35 mm de sorte qu'elles soient en phase exponentielle de croissance le lendemain. Pour l'infection, les milieux étaient remplacés par la solution contenant les virus, ainsi que 4 $\mu\text{g/ml}$ de Polybrene (Sigma). Les cellules HIEC-6 étaient ensuite laissées une heure en présence du virus avec agitation aux 10 minutes. Par la suite, le surnageant viral était remplacé par 8 ml de milieu frais. La sélection appropriée était appliquée dans les 24-48 heures suivantes. Les cellules infectées avec pLNCX2 étaient sélectionnées avec 0,25 mg/ml de Geneticin et celles infectées avec pBabe recevaient 0,75 $\mu\text{g/ml}$ de Puromycin.

Figure 5. Stratégie pour la préparation du vecteur pLNCX2 exprimant l'ADNc complet de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines

Le vecteur pBS $\alpha 8$ a été gracieusement offert par le Dr. Schnapp (University of Washington, Seattle, WA), il est constitué du vecteur pBluescript dans lequel l'ADNc complet de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines a été inséré. La stratégie utilisée visait à transférer l'ADNc complet d' $\alpha 8$ dans le vecteur pLNCX2 (Clontech Laboratories), sous le contrôle du promoteur CMV.

Les digestions enzymatiques étaient effectuées sur une période de 3 heures à 37°C. Chacune des étapes en présence d'enzymes étaient suivies d'une extraction phénol-chloroforme, puis d'une précipitation à l'éthanol. La digestion des deux vecteurs par *Hind* III a permis de diriger l'insertion de l'ADNc dans le vecteur. La digestion de pBS $\alpha 8$ par *Sca* I était, quant à elle, essentielle afin de permettre de séparer sur gel d'agarose la bande d'ADN correspondant à l'ADNc et les fragments du vecteur pBluescript. À la suite des digestions, la déphosphorylation, par traitement à la PAL, de pLNCX2 permettait de réduire le taux de vecteurs qui se refermaient sur eux-mêmes.

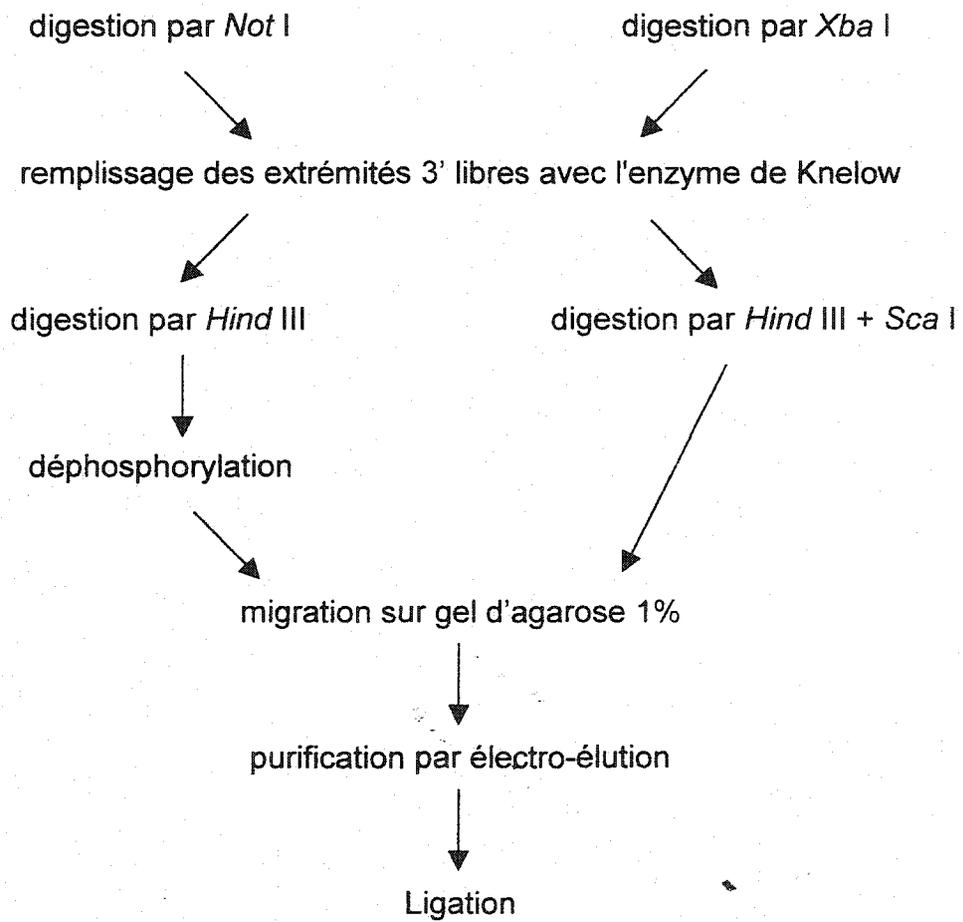
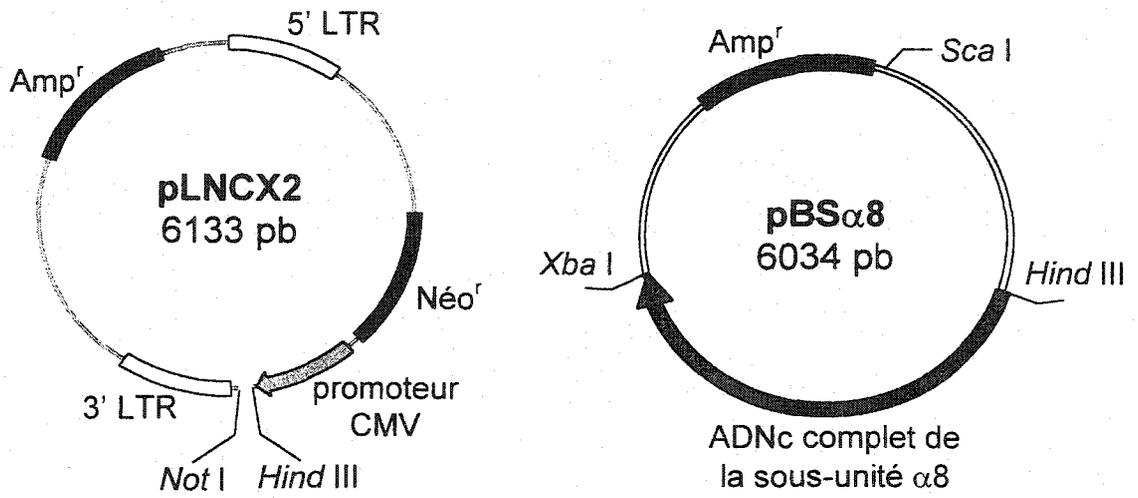


Figure 6. Stratégie pour la préparation du vecteur pLNCX2 exprimant un anti-sens de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines

Le vecteur pBS $\alpha 8$ a été gracieusement offert par le Dr. Schnapp (University of Washington, Seattle, WA), il est constitué du vecteur pBluescript dans lequel l'ADNc complet de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines a été inséré. La stratégie utilisée visait à transférer les 183 pb en 5' de l'ADNc d' $\alpha 8$ dans le vecteur pLNCX2 (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA), sous le contrôle du promoteur CMV, de sorte que ce fragment soit transcrit de façon anti-sens.

Les digestions enzymatiques étaient effectuées sur une période de 3 heures à 37°C. Chacune des étapes en présence d'enzymes étaient suivies d'une extraction phénol-chloroforme, puis d'une précipitation à l'éthanol. La digestion des deux vecteurs par *Hind* III a permis de diriger l'insertion du fragment de 183 pb dans le vecteur. À la suite des digestions, la déphosphorylation, par traitement à la PAL, de pLNCX2 permettait de réduire le taux de vecteurs qui se refermaient sur eux-mêmes. La purification avec la méthode Qiaex II du fragment de 183 pb a permis d'augmenter le rendement de la purification de ce fragment de petite taille. Les vecteurs obtenus à la suite des ligations ont été vérifiés par séquençage.

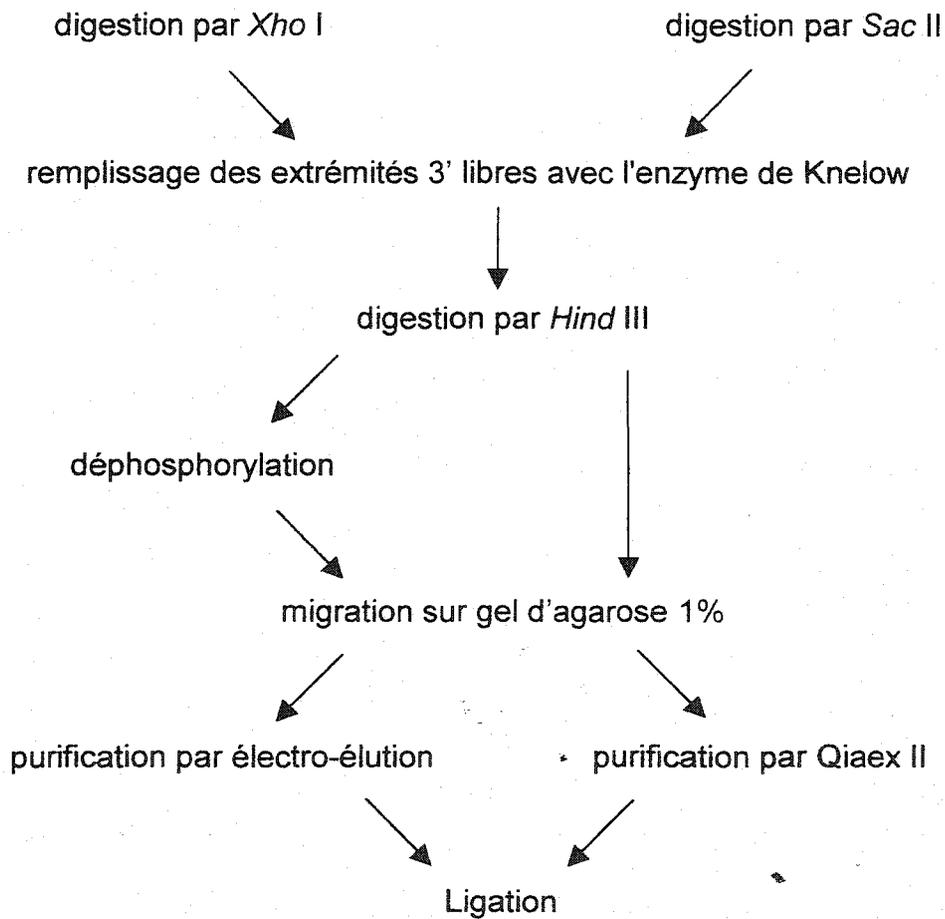
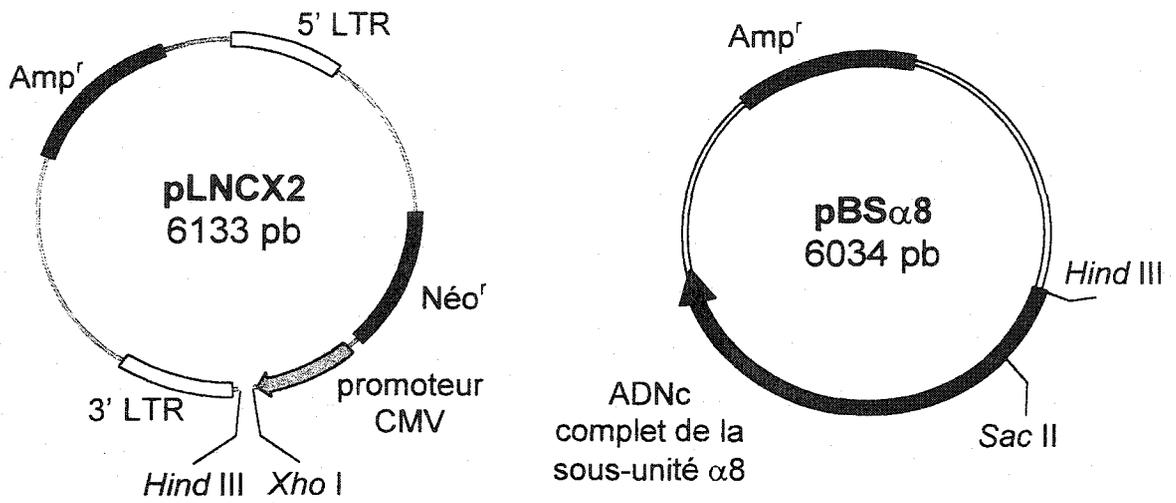
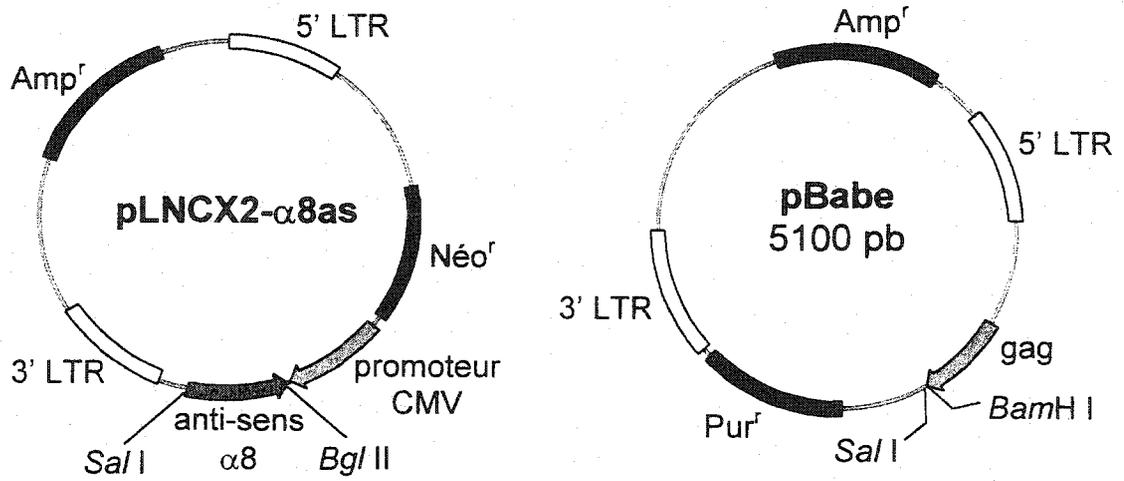


Figure 7. Stratégie pour la préparation du vecteur pBabe exprimant un anti-sens de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines

Le vecteur pLNCX2- $\alpha 8$ as est constitué du vecteur pLNCX2, dans lequel les 183 pb en 5' de l'ADNc de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines ont été insérées de sorte que ce fragment soit transcrit de façon anti-sens (voir figures 4). La stratégie utilisée visait à transférer le fragment provenant d' $\alpha 8$ dans le vecteur pBabe, de sorte que ce fragment soit transcrit de façon anti-sens sous le contrôle du LTR rétroviral.

Les digestions enzymatiques étaient effectuées sur une période de 3 heures à 37°C. Chacune des étapes en présence d'enzymes étaient suivies d'une extraction phénol-chloroforme, puis d'une précipitation à l'éthanol. La digestion des deux vecteurs par *Sal* I a permis de diriger l'insertion du fragment de 183 pb dans le vecteur. À la suite des digestions, la déphosphorylation, par traitement à la PAL, de pBabe permettait de réduire le taux de vecteurs qui se refermaient sur eux-mêmes. La purification avec la méthode Qiaex II du fragment de 183 pb a permis d'augmenter le rendement de la purification de ce fragment de petite taille. Les vecteurs obtenus à la suite des ligations ont été vérifiés par séquençage.



digestion par *BamH I*

digestion par *Bgl II*

remplissage des extrémités 3' libres avec l'enzyme de Klenow

digestion par *Sal I*

déphosphorylation

migration sur gel d'agarose 1%

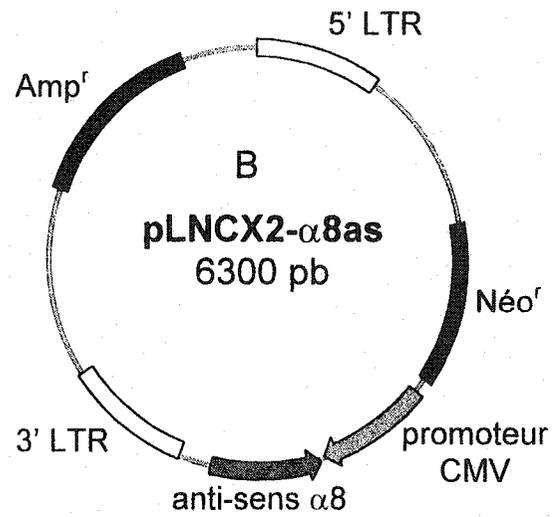
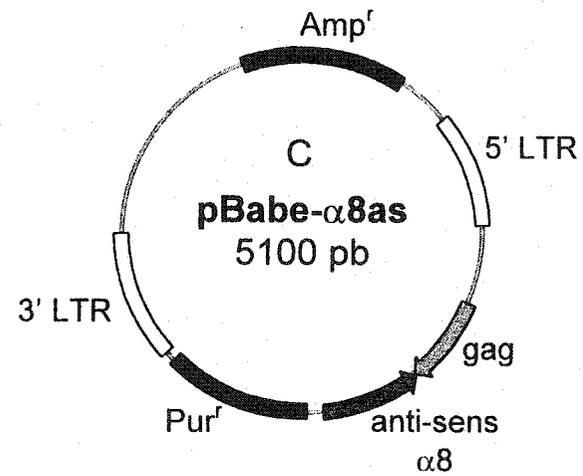
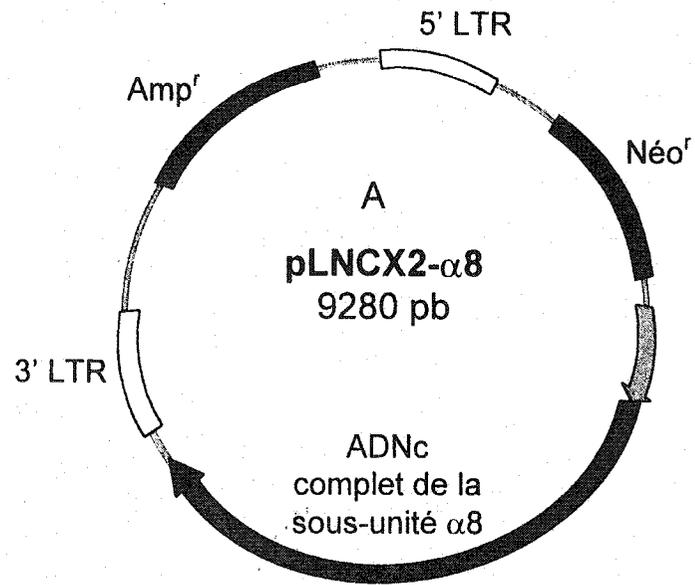
purification par électro-élution

purification par Qiaex II

Ligation

Figure 8. Vecteurs utilisés pour infecter les cellules HIEC-6

Différents vecteurs utilisés afin de produire des rétrovirus pour infecter de façon stable les HIEC-6. **A.** pLNCX2- α 8 permet l'expression de l'ADNc complet de la sous-unité α 8 sous le contrôle du promoteur CMV. Il possède le gène de résistance Néo^r, permettant ainsi une sélection par la Geneticin. **B.** pLNCX2- α 8as permet l'expression des 183 pb en 5' de l'ADNc complet de la sous-unité α 8 de façon anti-sens sous le contrôle du promoteur CMV. Il possède le gène de résistance Néo^r, permettant ainsi une sélection par la Geneticin. **C.** pBabe- α 8as permet l'expression des 183 pb en 5' de l'ADNc complet de la sous-unité α 8 de façon anti-sens sous le contrôle des LTR rétroviraux. Il possède le gène de résistance Pur^r, permettant ainsi une sélection par la Puromycin.



III – RÉSULTATS

1. Analyse de l'expression de molécules du système adhésif RGD dans la muqueuse intestinale humaine et ses modèles cellulaires

1.1. Déposition de l'OPN au niveau de la lame basale intestinale en cours de développement

Afin d'établir un tableau plus complet des différentes molécules présentant un RGD au niveau de la muqueuse intestinale humaine, la présence d'OPN a été analysée par immunofluorescence indirecte sur des tissus de 8 à 18 semaines, ainsi que chez l'adulte (Figure 9). Tout d'abord, dans l'intestin grêle, une déposition d'OPN est observée au niveau de la lame basale de l'épithélium, dès la formation des villosités, et la présence de la molécule y est maintenue pendant tout le processus de remodelage (9A-B). Cette déposition diminue à partir du moment où la muqueuse prend sa forme mature (vers 18 semaines; 9C) et est absente chez l'adulte (9D). Il est important de noter que l'accumulation d'OPN à l'interface épithélio-mésenchymateuse présente un gradient croissant de l'espace intervillaire/crypte à l'apex des villosités. En parallèle avec cette analyse, les mêmes résultats ont été obtenus dans les tissus provenant de côlon. D'autre part, un marquage dans le cytoplasme des entérocytes à tous les stades de développement est aussi identifié. Ce qui confirme une étude préalable, effectuée par microscopie électronique, qui

spécifiait la présence d'OPN dans les vésicules endocytaires et lysosomiales des entérocytes humains (Hong et Dvorak, 1997).

Afin de déterminer l'origine de l'OPN concentrée dans la lame basale de la muqueuse intestinale en développement, des études RT-PCR permettant l'amplification spécifique d'une portion de son ARNm ont été effectuées sur des extraits d'ARNs totaux de tissus intestinaux, ainsi que de cellules HIEC-6 et Caco-2/15 (Figure 10). L'analyse séparée des portions épithéliale et mésenchymateuse de la muqueuse d'intestin grêle foetal a permis de démontrer que la molécule origine strictement des cellules mésenchymateuses. Ce qui est confirmé par l'absence du transcrit dans les lignées cellulaires épithéliales.

1.2. Néo-déposition de l'OPN dans les lames basales des tumeurs côlorectales

L'expression de l'OPN dans les carcinomes, et plus particulièrement dans les carcinomes de côlon, avait préalablement été observée (Brown et al., 1994). La déposition de l'OPN à l'interface épithélio-mésenchymateuse de la muqueuse intestinale normale étant liée à la période de remodelage observée lors du développement, des analyses par immunofluorescence indirecte et RT-PCR ont été effectuées sur des tissus provenant de patients atteints de cancers de côlon, où le phénomène de remodelage est aussi important (Figure 11). La figure 11A met en évidence, tout comme dans les tissus foetaux, une déposition de la molécule à la base de l'épithélium. Cette accumulation demeure purement

d'origine mésenchymateuse puisque, tout comme les cellules Caco-2/15, aucune des lignées cellulaires épithéliales dérivées d'adénocarcinomes de côlon ne présentent le transcrit de l'OPN (Figure 11B-C). Par contre, les analyses RT-PCR comparatives dans les tumeurs primaires de côlon et leurs marges de résection ne permettent pas de conclure en une augmentation significative du messenger.

Figure 9. Expression et distribution de l'OPN dans la muqueuse de l'intestin grêle humain au cours du développement

Micrographies immunofluorescentes représentatives de jéjunum humain à 11 (A), 15 (B) et 18 (C) semaines de gestation, ainsi qu'adulte (D) marqué avec un anticorps monoclonal de souris (MPIIIB10₁) dirigé envers une portion recombinante de l'OPN humaine.

Dès la mise en place des villosités, un marquage spécifique est observé à l'interface épithélio (e) –mésenchymateuse (m), ainsi que dans le cytoplasme des entérocytes (e). Maintenu tout au long du processus de remodelage (A-B), la déposition à la base des cellules épithéliales diminue à la mi-gestation (C), et demeure à un niveau à la limite de la détection chez l'adulte (D).

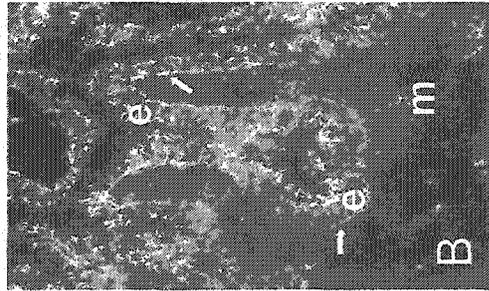
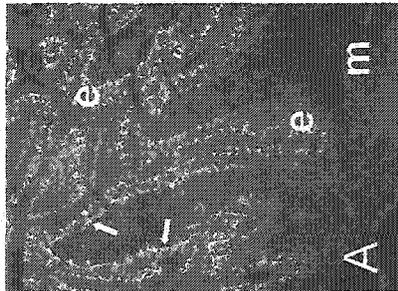
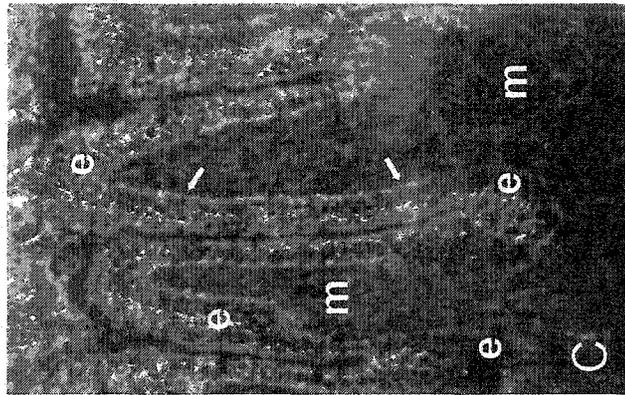
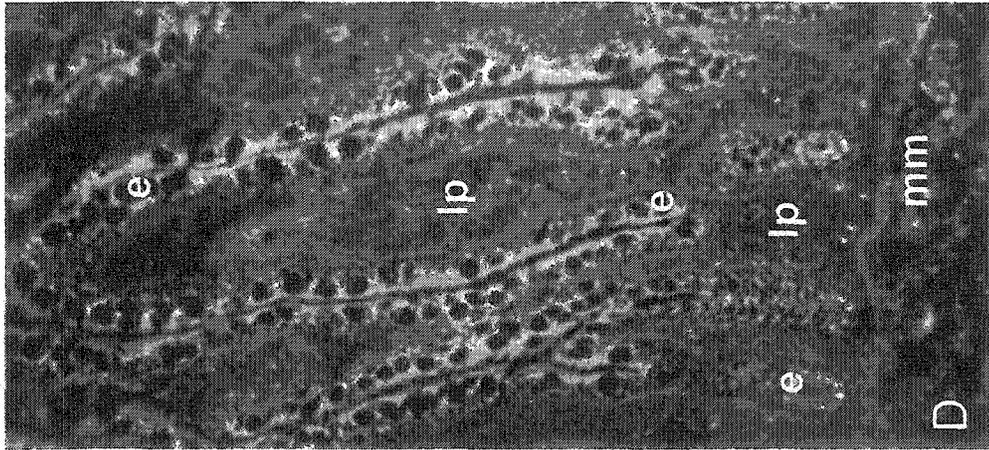


Figure 10. Expression de l'OPN dans les tissus intestinaux adultes et foetaux, ainsi que dans les lignées cellulaires intestinales

(A) Analyse représentative de l'ARNm de l'OPN par RT-PCR dans le côlon adulte (1), le grêle adulte (2), la fraction mésenchymateuse (3) et la fraction épithéliale (4) isolées d'intestin grêle foetal, les cellules HIEC-6 (5), ainsi que les cellules Caco-2/15 (6). Le transcrit de l'OPN est exprimée par les cellules d'origines mésenchymateuses uniquement. (B) La quantité de transcrit d'OPN dans les différents tissus et cellules a été déterminé en relation avec le transcrit de S14 ($n \geq 3$). (C) Analyse Western des lignées cellulaires intestinales pour l'expression de l'OPN. Les extraits de protéines des lysats cellulaires (100 μ g/puits) ont été séparés par SDS-PAGE sous conditions réductrices et transférés sur des membranes de nitrocellulose pour la détection de l'OPN avec un anticorps monoclonal de souris (MPIIIB10₁) dirigé contre une portion recombinante de l'OPN humaine. L'antigène de 60 kD est retrouvé uniquement chez les HIM.

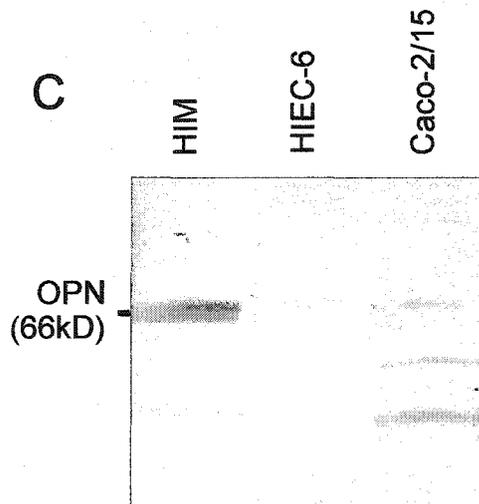
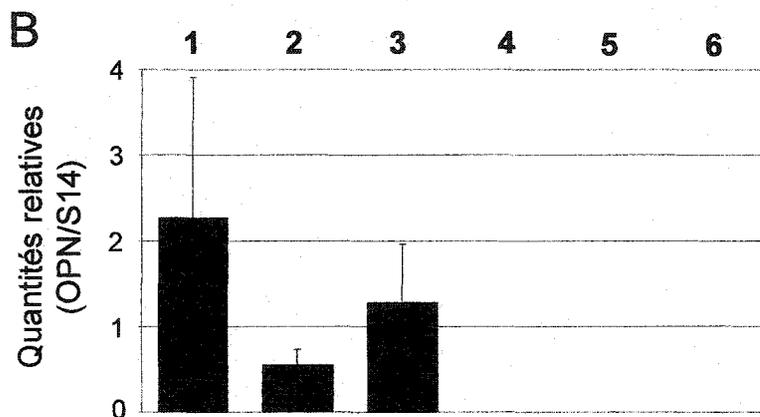
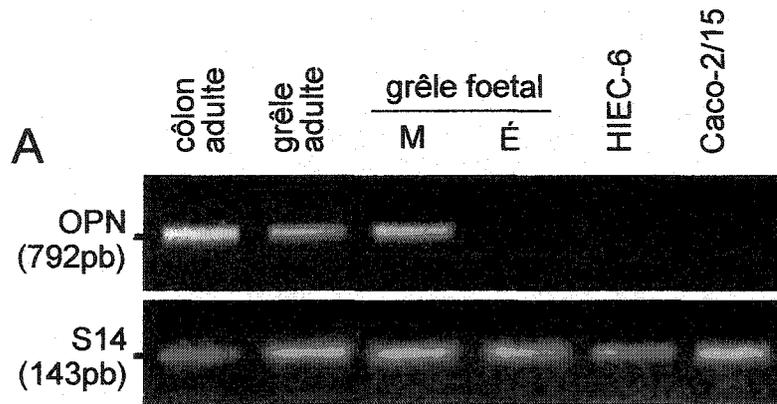
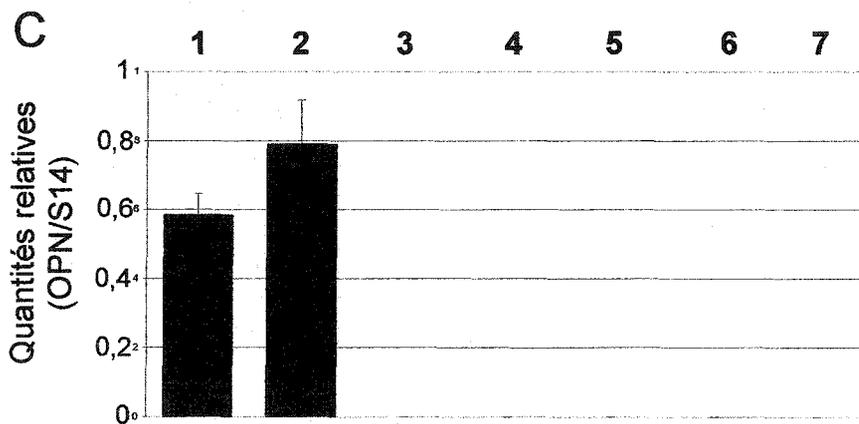
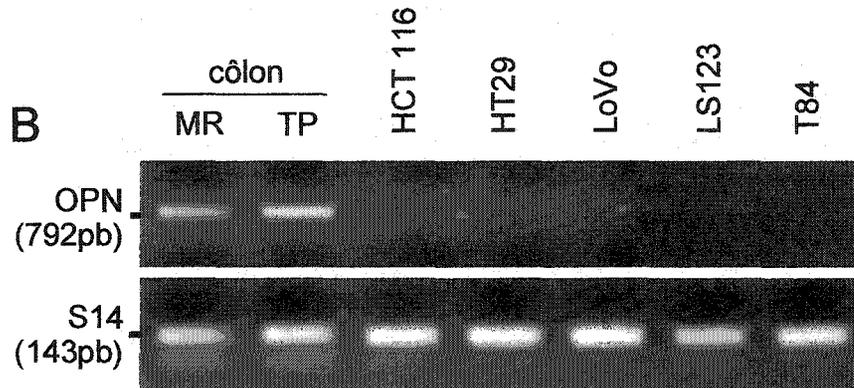
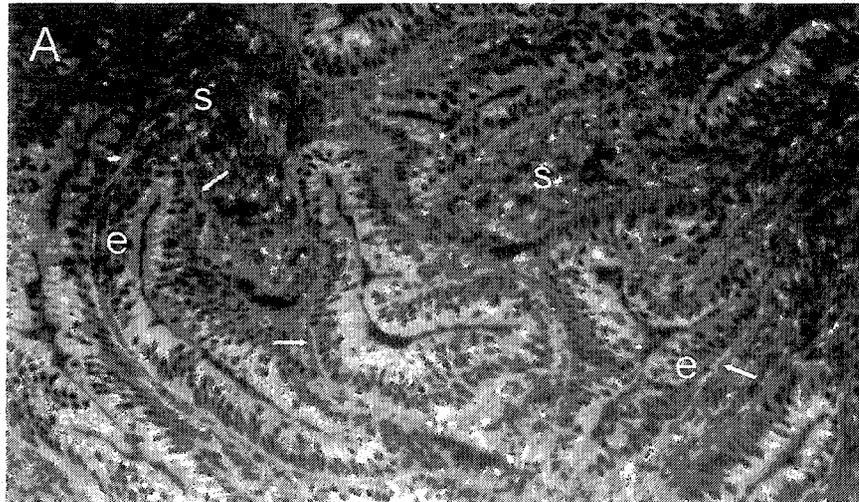


Figure 11. Expression de l'OPN chez les patients atteints de cancers du côlon et dans les lignées cellulaires épithéliales dérivées d'adénocarcinomes de côlon

(A) Micrographie immunofluorescente représentative de tumeur primaire de carcinome de côlon marqué avec un anticorps monoclonal de souris (MPLIIB10₁) dirigé contre une portion recombinante de l'OPN humaine. Un marquage spécifique est détecté dans le stroma (s) et ce de façon plus accentué au niveau de son interface avec l'épithélium (e). (B) Analyse représentative de l'ARNm de l'OPN par RT-PCR dans les marges de résection (MR, 1) et les tumeurs primaires de côlon correspondantes (TP, 2), ainsi que dans les lignées cellulaires épithéliales dérivées d'adénocarcinomes de côlon HCT116, HT29, LoVo, LS123 et T84 (3-7). (C) Les quantités de transcrits d'OPN dans les spécimens (n = 5) en paire, marge de résection (1) et tumeur primaire (2), ainsi que dans les lignées cellulaires, ont été déterminés en relation avec la quantité de transcrit de S14.



1.3. Présence de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines dans la muqueuse intestinale

La sous-unité $\alpha 8$ des intégrines a été localisée par immunofluorescence indirecte dans des tissus d'intestin grêle fœtal de 9 à 20 semaines, ainsi que chez l'adulte (Figure 12). Tout d'abord, dès la neuvième semaine de développement, les cellules mésenchymateuses retrouvées dans la zone des villosités expriment la sous-unité (Figure 12A). Cette expression demeure tout au long de la mise en place de la muqueuse fonctionnelle (Figure 12B-C) et s'atténue chez l'adulte, à l'exception des cellules musculaires dispersées dans la lamina propria (Figure 12D). De plus, à tous les stades fœtaux, la sous-unité $\alpha 8$ est identifiée dans la région de la lame basale (Figure 12A-C). Sa présence y est maintenue chez l'adulte, mais à une concentration près de la limite de détection (Figure 12D). Les analyses effectuées sur des tissus de côlon ont permis d'y établir le même patron d'expression. D'autre part, $\alpha 8$ est détectée dans les muscles lisses intestinaux à tous les stades de développement.

L'analyse par RT-PCR du transcrite de la sous-unité $\alpha 8$ (Figure 13A-B) permet de confirmer sa présence dans les tissus adultes. D'autre part, les portions mésenchymateuse et épithéliale d'intestin grêle fœtal montrent une expression mésenchymateuse (Figure 13A). Par contre, l'expression d' $\alpha 8$ par les cellules épithéliales cryptales est probable, puisqu'elle est fortement produite par les cellules HIEC-6, et ce, tant au niveau du messager (Figure 13A-B), que de la protéine (Figure 13C).

Figure 12. Expression et distribution de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines dans la muqueuse de l'intestin grêle humain en cours de développement

Micrographies immunofluorescentes représentatives de jéjunum humain à 9 (A), 12 (B) et 17 (C) semaines de développement, ainsi qu'adulte (D) marqué avec un anti-sérum de rat dirigé envers la sous-unité $\alpha 8$ humaine des intégrines.

Au cours de la morphogénèse intestinale, un marquage spécifique est observé dans le mésenchyme (m) des villosités en formation (A). La sous-unité $\alpha 8$ y est ensuite détectée tout au long du développement (B-C). Chez l'adulte, la sous-unité demeure présente dans la musculaire muqueuse (mm) et les cellules musculaires retrouvées au niveau de la lamina propria (lp). De plus, au cours du développement, ainsi que chez l'adulte, mais à une intensité moindre, il est possible d'observer un marquage spécifique à la base des cellules épithéliales.

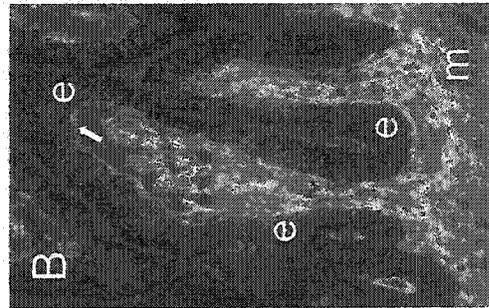
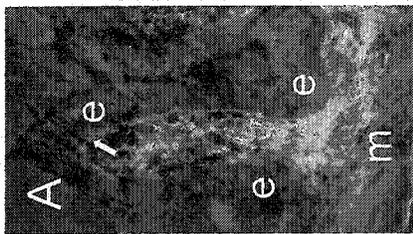
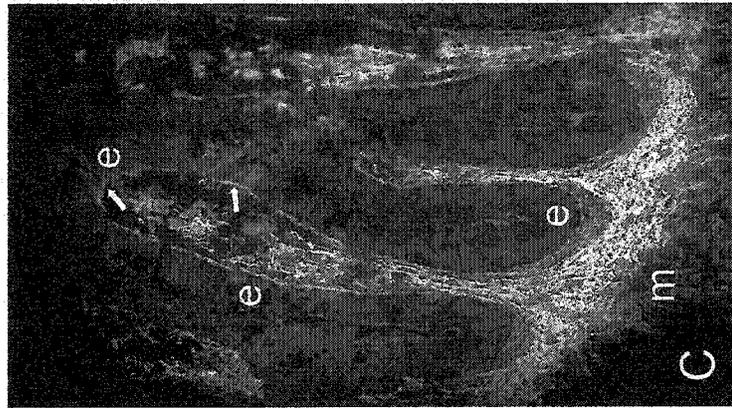
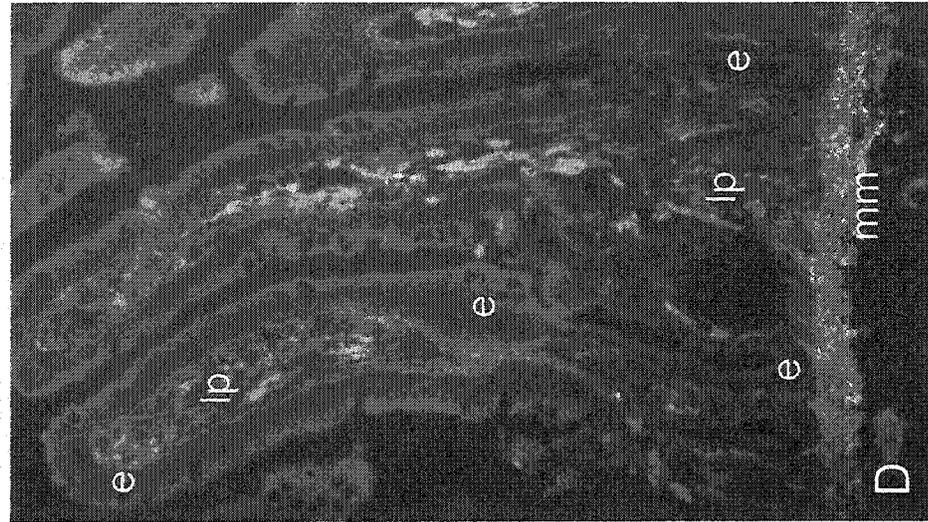
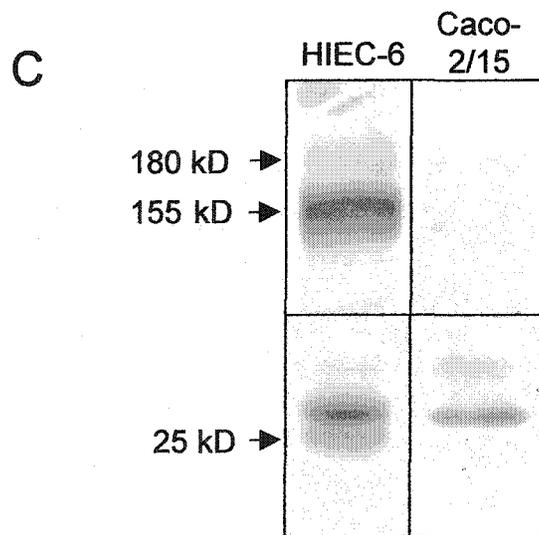
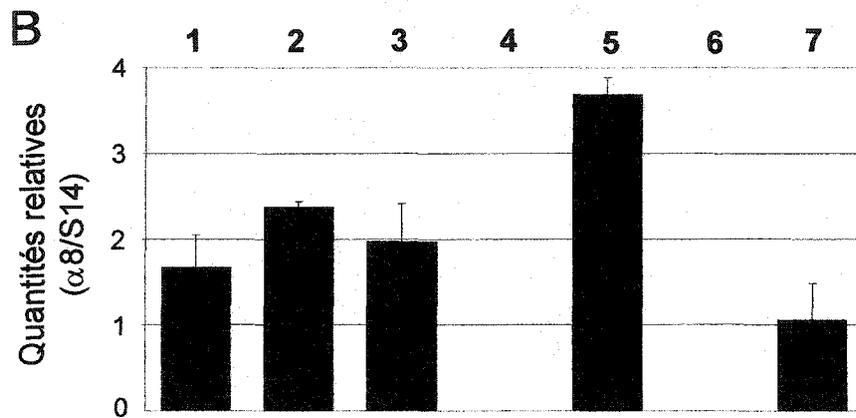
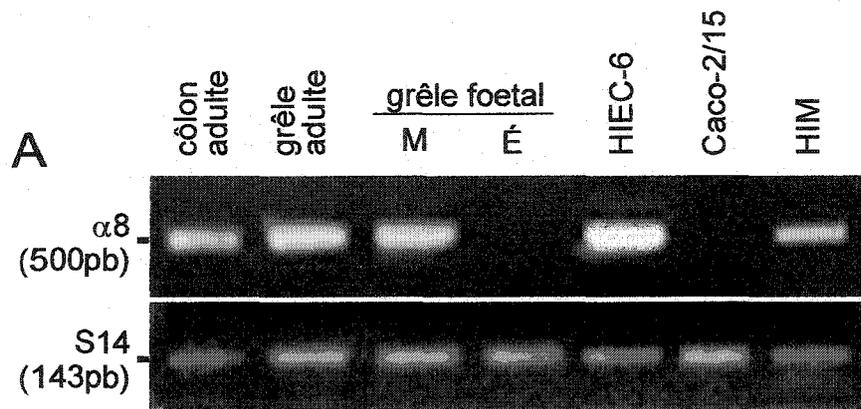


Figure 13. Expression de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines dans les tissus intestinaux adultes et fœtaux, ainsi que dans les lignées cellulaires intestinales

(A) Analyse représentative de l'ARNm d' $\alpha 8$ par RT-PCR dans le côlon adulte (1), le grêle adulte (2), la fraction mésenchymateuse (3) et la fraction épithéliale (4) isolées d'intestin grêle fœtal, les cellules HIEC-6 (5), les cellules Caco-2/15 (6), ainsi que les cellules HIM (7). Dans les tissus, la partie mésenchymateuse est grandement responsable de l'expression de la molécule, par contre, les cellules épithéliales normales HIEC-6 en expriment une quantité élevée. (B) La quantité de transcrite d' $\alpha 8$ dans les différents tissus et cellules a été déterminé en relation avec le transcrite de S14 ($n \geq 3$). (C) Analyse Western des lignées cellulaires HIEC-6 et Caco-2/15 pour l'expression d' $\alpha 8$. Les extraits de protéines des lysats cellulaires (100 $\mu\text{g/puit}$) furent séparés par SDS-PAGE sous conditions réductrices et transférés sur des membranes de nitrocellulose pour la détection d' $\alpha 8$ avec un anti-sérum de rat dirigé envers la sous-unité $\alpha 8$ humaine des intégrines. L'antigène (155 et 25 kD) est retrouvé uniquement chez les HIEC-6.



1.4. La sous-unité αv est exprimée dans la muqueuse intestinale humaine

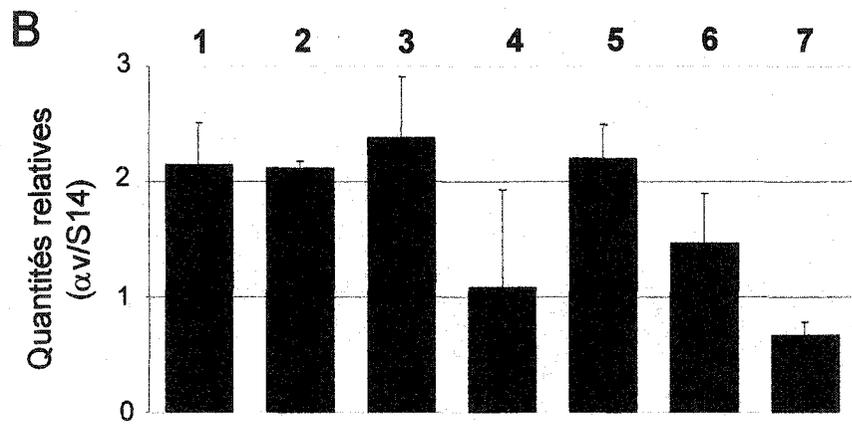
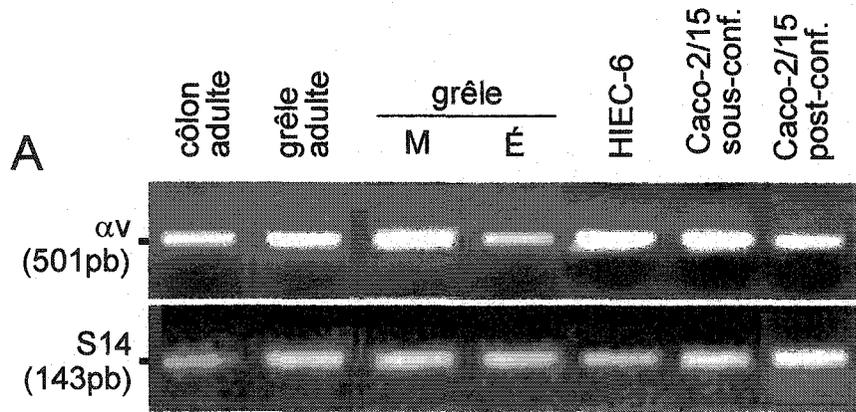
La distribution de la sous-unité αv a aussi été analysée par immunofluorescence indirecte dans des tissus d'intestin grêle fœtal de 9 à 20 semaines (résultat non présenté), ainsi que chez l'adulte (Figure 14C). Il s'avère que cette sous-unité est présente dans le mésenchyme, l'épithélium et le muscle lisse de la muqueuse, et ce, aux différents stades fœtaux et adulte (Figure 14C). Chez l'adulte, l'expression à la base de l'épithélium est nettement plus faible.

L'expression ubiquitaire d' αv observée par immunofluorescence indirecte est corrélée par l'analyse de son messenger dans les extraits d'ARN totaux des tissus et modèles cellulaires (Figure 14A-B).

Figure 14. Expression du messenger de la sous-unité αv des intégrines dans les tissus intestinaux adultes et foetaux, ainsi que dans les lignées cellulaires intestinales et distribution dans la muqueuse de l'intestin grêle mature

(A) Analyse représentative de l'ARNm d' αv par RT-PCR dans le côlon adulte (1), le grêle adulte (2), la fraction mésenchymateuse (3) et la fraction épithéliale (4) isolées d'intestin grêle foetal, les cellules HIEC-6 (5), les cellules Caco-2/15 prolifératives (6), ainsi que les cellules Caco-2/15 à post-confluence (7). (B) La quantité de transcrit d' $\alpha 8$ dans les différents tissus et cellules a été déterminé en relation avec le transcrit de S14 ($n \geq 3$). (C) Micrographie immunofluorescente représentative de jéjunum humain adulte marqué avec un anti-sérum de lapin dirigé envers la sous-unité αv humaine des intégrines.

Le messenger d' αv est exprimé de façon ubiquitaire dans toute la muqueuse intestinale humaine.



2. Essai d'adhésion cellulaire

2.1. Adhésion des cellules HIEC-6 sur le TNfn3

Il avait préalablement été établi que les cellules HIEC-6 ont la capacité d'adhérer au fragment peptidique TNfn3 (Dionne et al., résultats non publiés). La première étape des essais d'adhésion consistait à déterminer la portion de l'adhésion des cellules HIEC-6 qui est médiée par les intégrines reconnaissant la séquence RGD. Pour ce faire, les essais d'adhésion ont été effectués en présence du peptide GRGDSP soluble ou du peptide témoin GRGESP. Le peptide GRGDSP étant reconnu par des intégrines interagissant avec un RGD, l'adhésion résiduelle sur le TNfn3 est donc médiée via l'intégrine $\alpha 9\beta 1$. La figure 15 montre que l'adhésion des cellules HIEC-6 sur le TNfn3 est presque totalement inhibée en présence du peptide GRGDSP. L'adhésion au peptide est donc fortement dépendante de la séquence RGD et $\alpha 9\beta 1$ n'y joue pas de rôle significatif. Ceci est confirmé par les essais en présence d'un anticorps soluble neutralisant $\alpha 9\beta 1$, lors desquels les cellules présentent un niveau d'adhésion semblable à celui du contrôle GST (Figure 16).

2.2. Intégrines responsables de l'adhésion des cellules HIEC-6 sur le TNfn3

Par la suite, l'utilisation d'anticorps neutralisant solubles a permis de cerner les intégrines responsables de l'adhésion RGD dépendante des cellules

HIEC-6 sur le TNfn3 (Figure 16). L'anticorps dirigé envers l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ a été utilisé comme contrôle négatif, puisque cette intégrine ne reconnaît pas la séquence RGD du TNfn3. Tout d'abord, l'utilisation d'un anticorps neutralisant la sous-unité $\beta 1$ a permis de conclure en une adhésion complètement dépendante d'intégrines présentant cette sous-unité, puisque l'adhésion résiduelle de ces cellules se situe au niveau de celle observée sur le peptide GST seul. Par la suite, il a été possible d'établir que la sous-unité αv est responsable de $51,6 \pm 4,1\%$ de l'adhésion observée et que l'intégrine $\alpha v\beta 3$ médie une portion de cette interaction ($19,6 \pm 1,9\%$ de l'adhésion totale). Comme l'anticorps neutralisant $\alpha v\beta 5$ n'a aucun effet sur l'adhésion, et sachant que seuls les transcrits des sous-unités $\beta 1$, $\beta 3$ et $\beta 5$ sont exprimés chez les cellules HIEC-6 (résultats non présentés), l'adhésion résiduelle due à la sous-unité αv serait médiée par le complexe $\alpha v\beta 1$. Pour ce qui est de la portion d'adhésion qui ne serait pas due aux intégrines αv ($45 \pm 4,1\%$), il est possible de conclure qu'elle serait médiée par l'intégrine $\alpha 8\beta 1$. Cependant, aucun anticorps neutralisant la sous-unité $\alpha 8$ efficacement n'est disponible en ce moment.

Figure 15. L'adhésion des cellules HIEC-6 sur le TNfn3 est RGD dépendante

Les cellules HIEC-6 ont étéensemencées dans des puits où le peptide GST-TNfn3 avait préalablement été adsorbé. L'adhésion avait lieu pendant 1 heure à 37°C, en présence ou non de 100 µM de peptides solubles. Le nombre de cellules adhérees sur le GST-TNfn3 a été défini à 100% d'adhésion cellulaire pour chacune des expériences. Le fragment GST a permis de déterminer le niveau d'adhésion non spécifique engendré par sa présence (3,1±0,9%).

Lorsqu'elles sont placées en présence du peptide RGD (GRGDSP), les cellules HIEC-6 présentent un niveau d'adhésion de 8,6±2,2%, ce qui est très près du niveau de base observé sur GST. Cet effet étant éliminé lorsque le peptide RGE (GRGESP) est utilisé (98,5±2,7%), il est possible de conclure en une adhésion des cellules HIEC-6 sur le TNfn3 grandement dépendante d'intégrines reconnaissant le RGD.

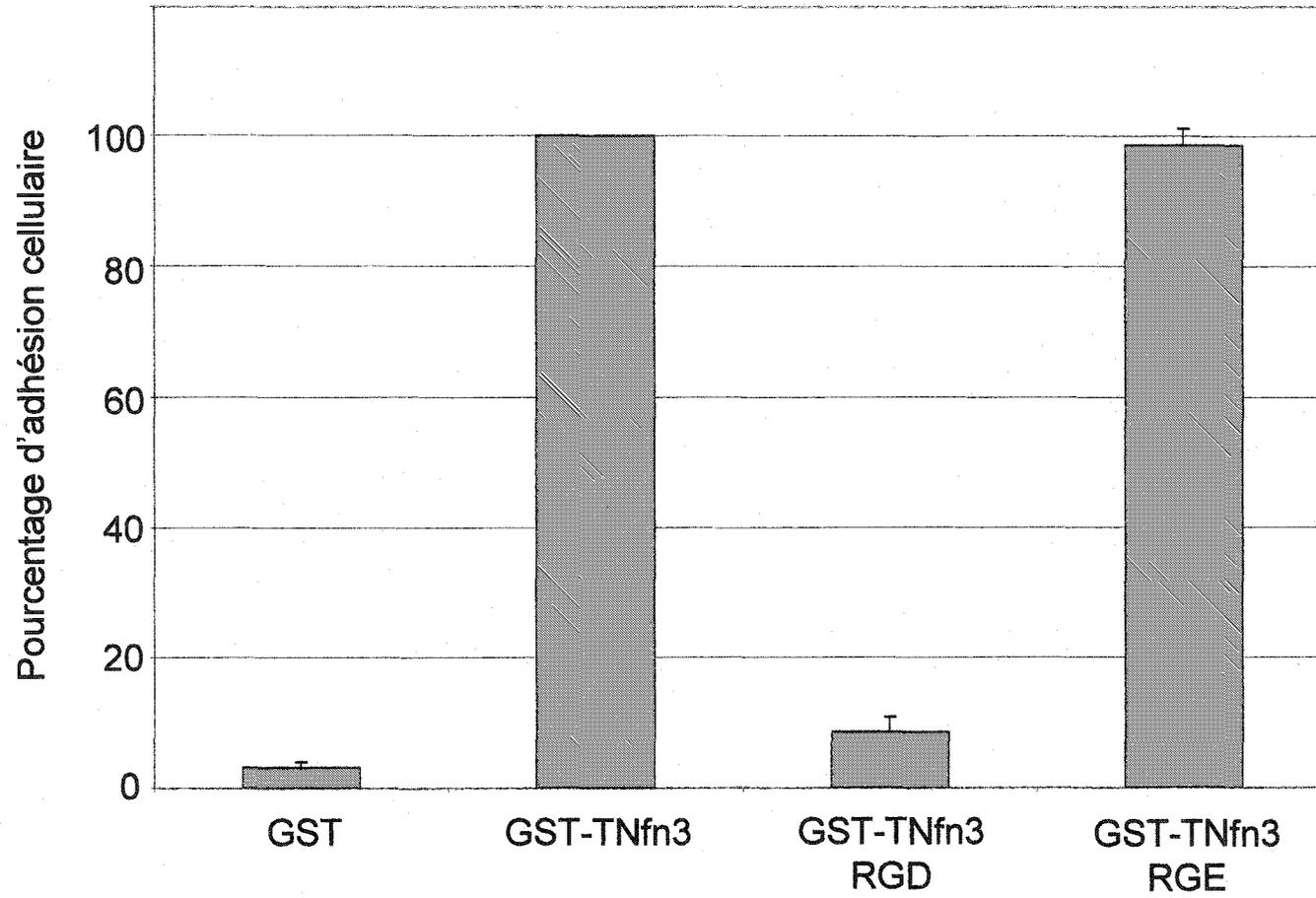
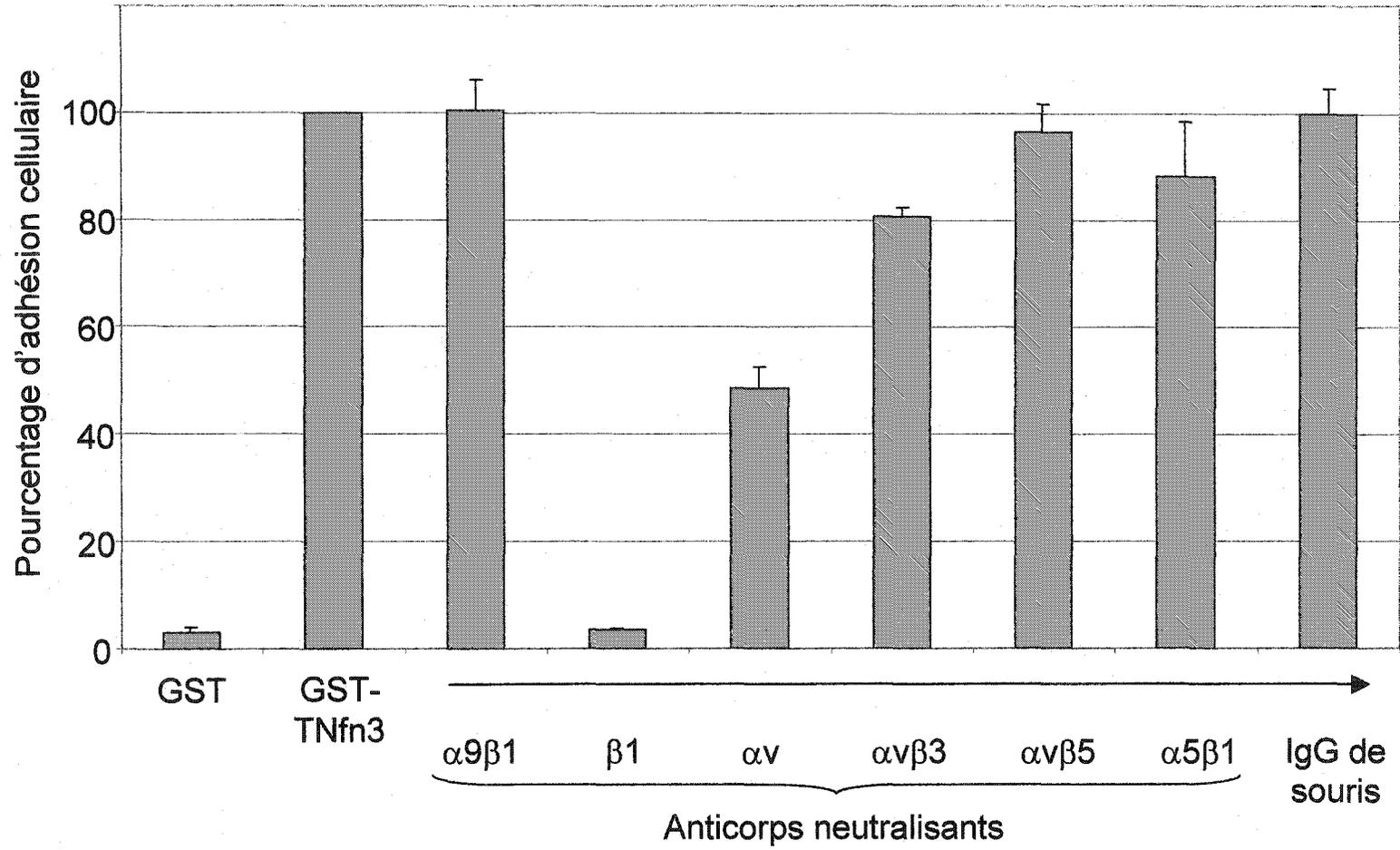


Figure 16. L'adhésion des cellules HIEC-6 sur le TNfn3 est dépendante d'intégrines αv et d'une autre intégrine présentant une sous-unité $\beta 1$

Les cellules HIEC-6 ont étéensemencées dans des puits où le peptide GST-TNfn3 avait préalablement été adsorbé. L'adhésion avait lieu pendant 1 heure à 37°C, en présence ou non d'anticorps neutralisant ($\alpha v\beta 5$ à 5 $\mu g/ml$; $\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ et IgG de souris à 10 $\mu g/ml$; $\alpha 5\beta 1$ à 25 $\mu g/ml$; αv à 50 $\mu l/ml$). Le nombre de cellules adhérees sur le GST-TNfn3 a été défini à 100% d'adhésion cellulaire pour chacune des expériences. Le fragment GST a permis de déterminer le niveau d'adhésion non spécifique induit par sa présence (3,1 \pm 0,9%). L'anticorps neutralisant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ainsi que les IgG de souris ont été utilisés en tant que contrôle négatif.

L'adhésion des HIEC sur le TNfn3 n'est en aucun cas modifiée par la présence de l'anti- $\alpha 9\beta 1$ (100,5 \pm 5,7%). Par contre, l'anticorps neutralisant la sous-unité $\beta 1$ seulement inhibe complètement la capacité des cellules à adhérer sur le fragment. De plus, lorsqu'un anticorps bloquant la sous-unité αv est utilisé, le taux d'adhésion diminue à 48,4 \pm 4,1%. Comme l'anticorps envers $\alpha v\beta 3$ permet de conserver 80,7 \pm 1,9% d'adhésion, une autre intégrine αv , possiblement $\alpha v\beta 1$ doit intervenir, puisque l'anti- $\alpha v\beta 5$ n'a aucun effet sur l'adhésion. D'autre part, l'adhésion non inhibée par l'anti- αv (45%), serait due à une autre intégrine $\beta 1$, reconnaissant la séquence RGD du TNfn3.



3. Préparation de cellules HIEC-6 infectées de façon stable avec des vecteurs permettant l'expression de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines ou un anti-sens de celle-ci.

3.1. Expression d'un anti-sens de la sous-unité $\alpha 8$

Afin de s'assurer d'un rôle actif de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ dans l'adhésion des cellules HIEC-6 sur le TNfn3, l'infection des cellules avec le vecteur pLNCX2- $\alpha 8as$ (Figure 8B) a été entreprise. Celui-ci permet l'expression, sous le contrôle du promoteur CMV, d'un fragment de 183 pb correspondant à la portion 5' anti-sens de la sous-unité $\alpha 8$. La séquence correspondante de l'ADNc de poulet avait préalablement été exprimée sous forme d'anti-sens pour réduire, et ce, de façon significative, l'expression de la sous-unité $\alpha 8$ (Zhang et Galileo, 1998). À la suite de la sélection, les cellules, exprimant un niveau plus faible de la sous-unité $\alpha 8$, devraient présenter un niveau d'adhésion moindre sur le TNfn3 si cette sous-unité y est impliquée.

Il n'a pas été possible de mettre en évidence une diminution d'expression de la sous-unité $\alpha 8$ chez les cellules sélectionnées par immunofluorescence indirecte et analyse Western (Figure 17). De plus, les essais d'adhésion préliminaires n'ont pas permis de démontrer une différence au niveau de l'adhésion de ces cellules sur le TNfn3.

Pour essayer de favoriser l'expression du fragment anti-sens chez les cellules HIEC-6, celui-ci a été transféré dans le vecteur pBabe, sous le contrôle des LTR rétroviraux (Figure 8C). Les cellules HIEC-6 infectées, puis sélectionnées ne présentaient pas une diminution d'expression significative de la sous-unité $\alpha 8$ par immunofluorescence indirecte et analyse Western (Figure 17).

3.2. Expression de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines chez les cellules HIEC-6

Afin de contrer le problème d'efficacité de l'anti-sens de la sous-unité $\alpha 8$ chez les cellules HIEC-6, des infections avec le vecteur pLNCX2- $\alpha 8$ (Figure 8A) ont été effectuées. Ce vecteur permettant la sur-expression de la sous-unité $\alpha 8$, les cellules infectées devraient présenter une proportion plus élevée d'adhésion sur le TNfn3 indépendante des intégrines αv .

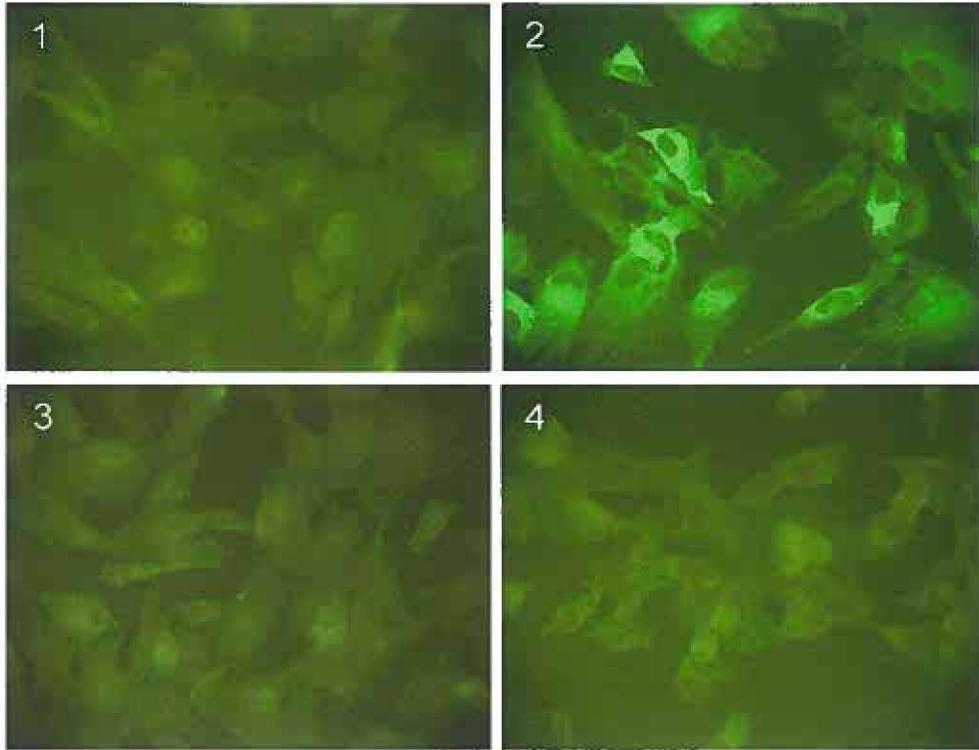
La population cellulaire infectée présente une augmentation de la sous-unité $\alpha 8$ en immunofluorescence indirecte et par analyse Western (Figure 17). Les études futures vont permettre de vérifier la fonctionnalité de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ dans ces cellules.

Figure 17. Caractérisation des cellules HIEC-6 infectées de façon stable avec un vecteur exprimant la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines, ainsi qu'un vecteur exprimant un anti-sens d' $\alpha 8$

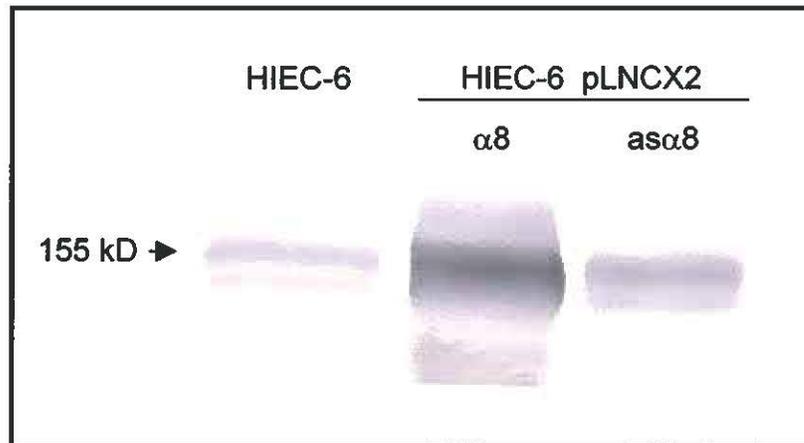
(A) Micrographies immunofluorescentes représentatives de cellules HIEC-6 infectées de façon stable avec un vecteur exprimant la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines ou un anti-sens de cette dernière. Les cellules ont été marquées avec un anti-sérum de rat dirigé contre la sous-unité $\alpha 8$ humaine des intégrines. Cellules de type sauvage (1), cellules infectées de façon stable avec le vecteur pLNCX2- $\alpha 8$ permettant l'expression de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines (2), cellules infectées de façon stable avec le vecteur pBabe-as $\alpha 8$ (3) et le vecteur pLNCX2-as $\alpha 8$ (4) permettant l'expression d'un anti-sens de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines.

(B) Analyse Western de ces mêmes cellules pour l'expression de la sous-unité $\alpha 8$ humaine des intégrines. Les extraits de protéines des lysats cellulaires (100 μg /puits) furent séparés par SDS-PAGE sous conditions réductrices et transférés sur des membranes de nitrocellulose pour la détection d' $\alpha 8$ avec un anti-sérum de rat dirigé contre cette sous-unité des intégrines. Notez que les cellules infectées avec le vecteur pBabe-as $\alpha 8$ (non présentées) donnaient un résultat similaire à celui présenté pour les cellules infectées avec pLNCX2-as $\alpha 8$.

A



B



IV – DISCUSSION

1. Fonctions et interactions potentielles des différentes molécules dont l'expression a été analysée dans la muqueuse intestinale humaine en développement

1.1. Expression et fonction de l'ostéopontine

1.1.1. L'OPN présente un patron d'expression onco-fœtal

L'OPN a été identifiée dans la muqueuse intestinale humaine fœtale, où elle est présente selon un patron distinct, restreint au processus de morphogénèse. L'OPN est exprimée par les cellules mésenchymateuses et accumulée dans la lame basale des villosités dès l'amorce de leur formation (8-9 semaines), et ce, jusqu'à ce que ces dernières soient fonctionnelles, c'est-à-dire vers 18-19 semaines (Ménard et Beaulieu, 1994). Elle est ensuite absente des lames basales des muqueuses matures saines de l'intestin grêle et du côlon (Brown et al., 1992; Qu-Hong et Dvorak, 1997b), une néo-accumulation sous l'épithélium étant toutefois observée lors d'un processus de carcinogénèse. La déposition restreinte de l'OPN dans la lame basale villositaire fœtale, ainsi qu'en pourtour des tumeurs de côlon, suggère une fonction dans le remodelage tissulaire.

Pourtant, malgré une résistance accrue au phénomène métastatique tumoral (Crawford et al., 1998), les souris OPN^{-/-} ne présentent pas d'anomalies structurelles et fonctionnelles au niveau du système digestif (Rittling et Denhardt, 1999). Notons cependant que le messenger de l'OPN n'est pas détecté dans l'intestin de la souris foetale normale (Nomura et al., 1988). Ce manque de corrélation entre le modèle murin et l'humain empêche la transposition des observations de l'un à l'autre. Il est donc préférable, afin de parfaire nos connaissances sur les fonctions de l'OPN dans le développement du système digestif humain, d'effectuer des études *in vitro* et *in situ*.

D'autre part, plusieurs modèles d'inhibition de molécules de la matrice-extracellulaire ne permettent pas de mettre en évidence les fonctions qui leurs étaient attribuées à la suite d'études *in situ* et *in vitro*, et ce, malgré une corrélation d'expression entre le modèle murin et l'humain. Les glycoprotéines de la matrice-extracellulaire, telles l'OPN, la ténascine-C et la vitronectine, font partie d'une classe de molécules partageant des caractéristiques semblables, ce qui rend justifiable de croire en un processus de compensation lors de l'absence d'une des molécules du groupe (Rittling et Denhardt, 1999). Pour contourner cette problématique, il sera essentiel de développer des modèles où l'inhibition de la molécule cible sera induite de façon tissu spécifique et au stade de développement désiré (Kühn et al., 1995; Rossant et Nagy, 1995)

1.1.2. L'OPN pourrait interagir dans l'invagination mésenchymateuse lors du développement villositaire

Lors de la formation et du développement des villosités, les cellules mésenchymateuses s'évaginent sous la couche épithéliale (Ménard et Beaulieu, 1994; Montgomery et al., 1999). Au cours de ce processus, il est important que la lame basale demeure malléable pour permettre une adaptation progressive de cette dernière à la pression exercée par le mésenchyme sous-jacent. La sécrétion de protéases spécifiques peut constituer un excellent moyen pour induire un relâchement de la lame basale (Nagase et Woessner, 1999).

Il a été montré, chez des cellules transformées, que l'OPN entre en interaction avec l'intégrine $\alpha\beta3$ afin de médier l'expression et l'activation de la métalloprotéinase-2 (MMP-2), cette dernière permettant alors l'invasion tumorale (Philip et al., 2001). L'OPN, déposée au niveau de la lame basale des villosités en formation, pourrait ainsi être utilisée comme activateur d'une MMP spécifique, qui favoriserait l'évagination du mésenchyme (Figure 18). En parallèle avec cette hypothèse, des résultats préliminaires d'immunofluorescence indirecte laissent croire qu' $\alpha\beta3$ est présente à la surface des cellules mésenchymateuses et pourrait entrer en contact avec l'OPN pour induire l'activation de la protéase.

Afin d'éclaircir la possibilité d'une fonction de l'OPN médiée par l'activation d'une MMP, il serait essentiel de confirmer la présence de ces dernières dans la lame basale intestinale foetale, et ce, en débutant par MMP-2. Suite à une confirmation, l'inhibition de l'OPN dans les cellules HIM pourrait indiquer si il y a effectivement modulation de l'activité de la MMP en question.

1.1.3. L'OPN pourrait induire la migration de l'épithélium intestinal foetal

Il a été établi que la MMP-2 a la capacité de cliver la laminine-5 de façon à favoriser la migration de cellules épithéliales mammaires normales (Giannelli et al., 1997). Ainsi, en plus de favoriser l'évagination mésenchymateuse, l'OPN, par l'activation de la MMP-2, pourrait avoir une fonction indirecte dans la migration de l'épithélium intestinal foetal (Figure 18). En effet, la laminine-5 est déposée dans la lame basale intestinale dès l'apparition des villosités (Teller et Beaulieu, 2001). Un immunobuvardage Western d'une fraction d'intestin foetal permettrait de déterminer si il y a présence ou non de la chaîne $\gamma 2$ clivée par la MMP-2, et soulignerait l'intérêt de mener une étude exhaustive sur la régulation de cette MMP par l'ostéopontine.

D'autre part, il se pourrait que l'OPN interagisse avec un récepteur au niveau de l'épithélium afin d'activer directement la migration cellulaire. En effet, plusieurs intégrines ont la capacité d'induire un processus migratoire via une interaction avec l'OPN (Hu et al., 1995a,b; Liaw et al., 1995; Tuck et al., 2000).

Toutefois, ces récepteurs étant tous des intégrines αv , il faudra s'attarder aux patrons d'expression épithéliaux des différentes sous-unités β afin d'identifier une co-localisation potentielle.

1.2. Expression et fonction de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$

1.2.1. $\alpha 8 \beta 1$ intervient dans la morphogenèse de la muqueuse intestinale

La sous-unité $\alpha 8$ des intégrines a été identifiée à l'interface épithélio-mésenchymateuse dans l'intestin foetal humain. Elle se situe sous l'épithélium intestinal dès la formation des villosités et jusqu'à la mi-gestation, alors que son expression faiblit chez l'adulte. Il a été possible de déterminer par RT-PCR qu'elle est exprimée par les cellules mésenchymateuses, ce qui corrobore sa présence dans tout le mésenchyme par immunofluorescence indirecte et corrèle avec les observations préalablement effectuées chez l'embryon de souris (Müller et al., 1997). Il est, par contre, probable que les cellules épithéliales cryptales expriment l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$, puisqu'elle se retrouve à la surface des cellules HIEC-6, modèle de cellules épithéliales cryptales normales (Perreault et Beaulieu, 1996). Cette possibilité demanderait toutefois une confirmation par immunocytochimie en microscopie électronique ou hybridation *in situ*.

L'expression de la sous-unité $\alpha 8$ à l'interface épithélio-mésenchymateuse de la muqueuse intestinale étant majoritairement restreinte à la période foetale

au cours de laquelle il y a remodelage et constitution d'une muqueuse fonctionnelle, cette dernière semble impliquée dans la morphogenèse de la muqueuse intestinale humaine.

1.2.2. Fonction organisatrice d' $\alpha 8\beta 1$ dans la mise en place d'une lame basale appropriée

L'intégrine $\alpha 8\beta 1$ est essentielle au cours du développement du rein, son inhibition entraînant jusqu'à l'absence complète de cet organe (Müller et al., 1997). Il semble qu'elle y agisse en tant qu'organisateur de certaines molécules de la matrice-extracellulaire, permettant ainsi la formation d'un réseau adéquat pour la signalisation entre l'épithélium et le mésenchyme (Müller et al., 1997). La maturation de la muqueuse intestinale étant basée, tout comme celle du rein, sur de nombreuses interactions épithélio-mésenchymateuses (Kedinger et al., 1981; Montgomery et al., 1999), il est intéressant d'envisager que l'intégrine $\alpha 8\beta 1$, exprimée par les fibroblastes en pourtour de la lame basale, remplisse une fonction d'organisatrice de molécules matricielles. Parmi ces molécules, l'OPN, qui est aussi exprimée par les cellules mésenchymateuses foetales, pourraient nécessiter l'implication d' $\alpha 8\beta 1$ pour son orientation et son insertion dans la lame basale (figure 19).

1.2.3. Signalisation potentielle d' $\alpha 8\beta 1$ dans les cellules mésenchymateuses

Un nouveau ligand d' $\alpha 8\beta 1$, la néphronectine, a récemment été identifié dans le rein (Brandenberger et al., 2001; Morimura et al., 2001). Cette glycoprotéine est exprimée par les cellules épithéliales et sécrétée dans la matrice-extracellulaire, où elle interagit avec $\alpha 8\beta 1$ à la surface des fibroblastes sous-jacents, permettant ainsi une signalisation de l'épithélium vers le mésenchyme (Brandenberger et al., 2001). Il est envisageable que la néphronectine soit déposée dans la lame basale intestinale au cours du développement et qu'elle soit perçue par le mésenchyme via $\alpha 8\beta 1$. Elle pourrait ainsi interagir dans le processus morphogénique par l'induction, chez les cellules mésenchymateuses, de la prolifération ou de la migration essentielles à la formation des villosités. Il serait donc intéressant de vérifier la présence de la néphronectine dans la lame basale fœtale humaine.

D'autre part, il est aussi probable que l'insertion de l'OPN dans la lame basale via $\alpha 8\beta 1$ active chez les fibroblastes une voie de signalisation intracellulaire induisant la prolifération de ces derniers. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ déclenche ainsi la prolifération cellulaire par la déposition de la matrice de fibronectine (Christopher et al., 1999; Sottile et al., 1998). Des essais d'adhésion et de migration sur la néphronectine et l'ostéopontine pourraient être effectués avec des cellules HIM (cellules mésenchymateuses fœtales; Vachon et al., 1993) afin de déterminer si elles y induisent une signalisation particulière.

1.3. Ligand et fonction de l'intégrine $\alpha 9\beta 1$

1.3.1. L'intégrine $\alpha 9\beta 1$ a-t-elle besoin d'un ligand ?

L'expression de l'intégrine $\alpha 9\beta 1$, restreinte aux cellules épithéliales de la région cryptale de la muqueuse intestinale immature, suggère un rôle pour cette dernière au niveau de la prolifération de l'épithélium intestinal (Desloges et al., 1998). Cette supposition est appuyée par la démonstration qu' $\alpha 9\beta 1$ possède la capacité de médier la prolifération de cellules de carcinomes de côlon lors de leur interaction avec un fragment recombinant de la ténascine-C, le TNfn3 (Yokosaki et al., 1996). Toutefois, aucun des deux ligands d' $\alpha 9\beta 1$ au niveau de la matrice-extracellulaire n'a pu être co-localisé avec elle de façon spatio-temporelle. En effet, la ténascine-C est déposée de façon prédominante dans la membrane basale de la villosité mature (Desloges et al., 1994), alors que les résultats obtenus dans cette étude décrivent une expression de l'OPN selon un gradient croissant vers l'apex des villosités en formation. De plus, les cellules cryptales fœtales ne semblent pas avoir la capacité d'adhérer via $\alpha 9\beta 1$ à la TN-C, ce qui est discuté plus spécifiquement dans la section 2.2.

Le manque de co-localisation entre $\alpha 9\beta 1$ et ses ligands pourrait souligner qu'il a un ou des ligands d' $\alpha 9\beta 1$ qui ne sont toujours pas identifiés au niveau de la matrice-extracellulaire de la muqueuse intestinale, et qui seraient responsables de son implication dans la prolifération de l'épithélium. Cette

hypothèse pourrait être vérifiée par l'utilisation en histochimie d'une chimère soluble intégrine $\alpha 9\beta 1$ -phosphatase alcaline, telle qu'utilisée par l'équipe de Reichardt pour identifier les ligands d' $\alpha 8\beta 1$ dans le rein (Brandenberger et al., 2001; Denda et al., 1998a,b).

Par contre, il a récemment été rapporté que les voies de signalisation découlant de l'activation de l'intégrine $\alpha v\beta 5$ peuvent être enclenchées via l'activation de récepteurs de facteurs de croissance tissus spécifiques, et ce, sans l'interaction de l'intégrine avec un ligand (Eliceiri et al., 2002). La présence d'une multitude de récepteurs de facteurs de croissance au niveau de l'épithélium cryptal (Dignass, 2001; Rosselin, 1989), suggère qu'une signalisation via $\alpha 9\beta 1$, mais ligand indépendante, serait peut-être possible. L'étude et la compréhension plus approfondie des voies de signalisation découlant des récepteurs de facteurs de croissance chez les cellules HIEC-6, qui expriment $\alpha 9\beta 1$, pourrait mettre à jour un tel système.

1.3.2. $\alpha 9\beta 1$ pourrait interagir avec une molécule de la famille ADAM

De façon similaire à son association avec ses ligands de la matrice-extracellulaire, $\alpha 9\beta 1$ a la capacité d'interagir avec les protéines de la surface cellulaire ADAM-12 et 15 (Eto et al., 2000). Il est suggéré dans la littérature que l'adhésion cellule-cellule via ADAM- $\alpha 9\beta 1$ puisse médier une signalisation proliférative (Eto et al., 2000).

D'autre part, les molécules de la famille ADAM sont reconnues pour leur activité métalloprotéase (Wolfsberg et al., 1995). Bien qu'aucune étude n'ait confirmé une régulation de l'activité catalytique d'une ADAM via son interaction avec une intégrine, il serait possible d'extrapoler un rôle semblable pour $\alpha 9\beta 1$ sur ADAM-12 et 15. Ainsi, la fonction de cette intégrine, dont l'expression est restreinte à la période de la formation des cryptes (Desloges et al., 1998), pourraient être une régulation de la dégradation de la matrice-extracellulaire par certaines ADAMs spécifiques afin de permettre l'invagination épithéliale à travers le mésenchyme, et ainsi la mise en place des cryptes. L'expression d' $\alpha 9\beta 1$ dans les tumeurs colorectales (Basora et al., 1998) appuyerait cette hypothèse.

Il serait donc intéressant d'effectuer des études d'expression d'ADAM-12 et -15 dans la muqueuse intestinale afin de déterminer si elles sont exprimées à la surface des cellules épithéliales cryptales fœtales.

1.4. La ténascine-C... toujours sans récepteur épithélial

Puisque l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ n'est exprimée que par les entérocytes fœtaux situés dans le tiers inférieur des cryptes (Basora et al., 1998; Desloges et al., 1998), et que la présence de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ au niveau de la lame basale intestinale est majoritairement restreinte au stade fœtal, le récepteur de la ténascine-C dans la muqueuse intestinale mature n'a toujours pas été identifié.

Effectivement, cette dernière est déposée dans la lame basale le long de tout l'axe crypte-villosité chez l'adulte (Beaulieu et al., 1993a,b; Bélanger et Beaulieu, 2000), là où $\alpha 9\beta 1$ et $\alpha 8\beta 1$ ne sont pas, ou très faiblement localisées.

Il y a cependant deux autres intégrines qui ont la capacité de reconnaître et permettre l'adhésion cellulaire à la TN-C: $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 6$ (Prieto et al., 1993; Yokosaki et al., 1996). Bien que la sous-unité αv semble peu exprimée chez l'adulte (Lussier et al., 2000), $\alpha v\beta 6$ constitue une excellente candidate pour cette fonction. En effet, le messenger de cette intégrine, qui est strictement d'origine épithéliale (Breuss et al., 1993, 1995), est exprimé par l'épithélium de tout l'axe crypte-villosité chez le singe adulte (Breuss et al., 1993), ce qui suggère qu'elle pourrait être présente dans la membrane baso-latérale des entérocytes humains. Ce récepteur est d'autant plus intéressant, qu'une fonction lui a été attribuée dans la migration de cellules de carcinomes de côlon (Kemperman et al., 1997) et que la distribution de la TN-C dans la lame basale de toute la villosité souligne qu'elle pourrait être impliquée dans un processus migratoire. Pour sa part, $\alpha v\beta 3$ n'est pas considérée comme une intégrine épithéliale (Horton, 1997), son expression par les entérocytes de la villosité est donc peu probable. Toutefois, sa capacité à induire une migration cellulaire via la TN-C a été démontré (Yokosaki et al., 1996) et, tel qu'élaboré dans la section suivante, elle interagit dans l'adhésion des cellules HIEC-6 sur le TNfn3.

Afin de compléter le tableau d'expression de la famille des molécules RGD dans la muqueuse intestinale humaine, il semble qu'il sera maintenant nécessaire de s'attarder à l'expression des différentes sous-unités β des intégrines αv .

2. Caractérisation de l'adhésion des cellules HIEC-6 sur le TNfn3

2.1. Les cellules HIEC-6 s'attachent au TNfn3 via un ensemble d'intégrines

Les seules cellules épithéliales intestinales humaines normales qu'il soit possible d'utiliser afin de caractériser les fonctions entérocytaires sont les HIEC-6 (Perreault et Beaulieu, 1996). Ces cellules sont caractérisées comme des cellules indifférenciées et prolifératives de l'épithélium foetal de 18 semaines, période à laquelle la TN-C est déposée dans la lame basale de la région cryptale (Desloges et al., 1994). Les cellules HIEC-6 s'avèrent donc être un excellent modèle pour l'étude des différents récepteurs permettant l'adhésion des cellules épithéliales intestinales à la TN-C.

La reconnaissance de la TN-C par des intégrines est effectuée via son domaine TNfn3 qui contient une séquence de reconnaissance pour $\alpha 9\beta 1$ (Yokosaki et al., 1998), ainsi qu'une séquence RGD. En effectuant des essais d'adhésion des cellules HIEC-6 sur un fragment recombinant du TNfn3 en présence de peptides et d'anticorps neutralisants, il est possible de déterminer

les intégrines qui ont la capacité de reconnaître le TNfn3, et plus spécifiquement la TN-C (Prieto et al., 1993). Ainsi, il semblerait que les cellules épithéliales fœtales entrent en interaction avec la TN-C via trois principales intégrines, soit $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 1$ et probablement $\alpha 8\beta 1$.

2.1.1. Adhésion des cellules HIEC-6 médiée via $\alpha v\beta 3$

L'équipe de Yokosaki avait préalablement montré la forte capacité d' $\alpha v\beta 3$ à permettre une adhésion cellulaire sur le TNfn3 (Yokosaki et al., 1996). Les cellules HIEC-6 exprimant le messenger de $\beta 3$ (résultat non-présenté), il n'est pas surprenant de voir que 20% de leur adhésion soit médiée par cette intégrine. Pour ce qui est de son rôle dans l'adhésion des entérocytes normaux à la TN-C, il faut cependant être prudent. En effet, $\alpha v\beta 3$, qui n'est pas caractérisée comme un récepteur épithélial, est souvent exprimée suite à une adaptation des cellules mises en culture (Horton, 1990). Des études en immunofluorescence indirecte sur les tissus, ainsi que des analyses des messagers et protéines des extraits épithéliaux fœtaux devraient permettre de vérifier qu'il y a présence d' $\alpha v\beta 3$ chez les entérocytes. Cette intégrine possède, par contre, la capacité de médier une migration cellulaire sur le TNfn3 (Yokosaki et al., 1996), ce qui pourrait faire d'elle le récepteur de la TN-C le long de la villosité mature.

D'autre part, l'anticorps bloquant $\beta 1$ inhibant toute adhésion cellulaire au TNfn3, l'implication d' $\alpha v\beta 3$ peut sembler contradictoire. Deux explications sont possibles pour cette observation. Premièrement, il se pourrait que le 20% d'adhésion médié via $\alpha v\beta 3$ ne soit pas suffisant pour permettre aux cellules HIEC-6 de s'attacher solidement en une heure seulement. Il est aussi probable que l'activité d' $\alpha v\beta 3$ soit dépendante de l'adhésion d'une intégrine $\beta 1$ déjà en interaction avec la cellule. En effet, il a été montré que l'activité d'une intégrine peut être modulée, via son domaine cytoplasmique, par les voies de signalisation d'autres intégrines déjà engagées dans l'adhésion cellulaire (Blystone et al., 1999; Simon et al., 1997).

2.1.2. Adhésion des cellules HIEC-6 médiée via $\alpha v\beta 1$

À la lumière de mes connaissances, il n'a pas été démontré qu' $\alpha v\beta 1$ puissent permettre l'adhésion cellulaire à la TN-C entière ou au TNfn3. Néanmoins, cette intégrine présente des propriétés adhésives variables selon les différents types cellulaires qui l'exprime (Bodary et al., 1990; Vogel et al., 1990) et jusqu'à maintenant, peu de chercheurs se sont penchés sur ses fonctions. De plus, la portion d'adhésion dépendante d' αv qui est indépendante d' $\alpha v\beta 3$ (environ 30% de l'adhésion totale) ne peut être médiée par un autre récepteur qu' $\alpha v\beta 1$, puisque les messagers de $\beta 6$ et $\beta 8$ ne sont pas exprimés par les cellules HIEC-6 (résultats non présentés) et qu' $\alpha v\beta 5$ n'adhère pas au TNfn3

(Prieto et al., 1993; Yokosaki et al., 1996). Il serait toutefois essentiel d'appuyer cette déduction par la co-immunoprécipitation de $\beta 1$ et αv chez les cellules HIEC-6, les anticorps disponibles au laboratoire ne permettant pas cette expérience pour le moment. Une adhésion des cellules cryptales sur la TN-C via $\alpha v \beta 1$ serait intéressante, puisque cette dernière semble associée avec un phénotype prolifératif chez les cellules oligodendrogiales (Milner et French-Constant, 1994).

2.1.3. Adhésion des cellules HIEC-6 médiée via $\alpha 8 \beta 1$

L'implication d' $\alpha 8 \beta 1$ dans ce processus d'adhésion est aussi issue d'une déduction: puisqu'il y a près de 50 % d'adhésion $\beta 1$ dépendante, non médiée par αv ou $\alpha 9 \beta 1$, il est logique de conclure en une interaction via $\alpha 8 \beta 1$, le dernier récepteur de la TN-C identifié dans la littérature (Schnapp et al., 1995). Cependant, malgré l'expression par les cellules HIEC-6 de cette intégrine, il faudrait réussir à prouver son rôle direct dans le processus adhésif via un anticorps neutralisant, mais pour l'instant aucun n'a été produit.

Une voie alternative consisterait en l'augmentation ou l'inhibition de l'expression de la sous-unité $\alpha 8$ dans les cellules HIEC-6. Pour ce qui est de la première option, tel que présenté dans la section 3 des résultats, des cellules HIEC-6 sur-exprimant $\alpha 8$ ont été produites et elles sont maintenant utilisées pour vérifier une augmentation de l'importance d' $\alpha 8 \beta 1$ dans leur adhésion sur le

TNfn3. L'inhibition de la sous-unité par l'utilisation d'un anti-sens spécifique s'est cependant avérée plus ardue. Comme cette option est la plus directe, des siRNA ont été sélectionnés et ils sont en ce moment en essais de transfection sur les cellules HIEC-6 pour analyser leur capacité à diminuer l'expression de la sous-unité $\alpha 8$. Si cette méthode fonctionne, il sera possible de confirmer qu' $\alpha 8\beta 1$ est responsable de l'adhésion résiduelle des cellules HIEC-6 sur le TNfn3. Bien que la capacité de ce récepteur à médier l'adhésion cellulaire à la télescine-C ait déjà été déterminée (Schnapp et al., 1995b), aucun rôle direct pour cette interaction n'a été caractérisé. Si son inhibition est réussie chez les cellules HIEC-6, ce pourrait être un excellent modèle d'étude.

2.2. L'intégrine $\alpha 9\beta 1$ n'est pas fonctionnelle pour médier une adhésion des cellules HIEC-6 sur le TNfn3

L'équipe de Yokosaki a démontré qu' $\alpha 9\beta 1$ a une affinité très forte pour le TNfn3 (Yokosaki et al., 1994, 1996). Les cellules HIEC-6 exprimant cette intégrine (Desloges et al., 1998), il est surprenant qu' $\alpha 9\beta 1$ ne soit pas responsable d'une portion de l'adhésion des cellules HIEC-6 sur le TNfn3. Par contre, dans les études de Yokosaki et son équipe, les intégrines sont sur-exprimées de façon exogène et elles ne sont pas co-exprimées. L'impact de l'adhésion des unes sur les autres n'a donc pas été analysé. En effet, la séquence RGD et la séquence reconnue par $\alpha 9\beta 1$ se retrouvent sur des sites adjacents dans le TNfn3 (Yokosaki et al., 1999), permettant ainsi la liaison d'une

seule intégrine à chaque polypeptide, soit celle qui a l'affinité la plus élevée pour ce fragment. En conséquence, si l'affinité d' $\alpha v\beta 3$ est plus élevée que celle d' $\alpha 9\beta 1$, cette dernière pourrait inhiber l'effet adhésif d' $\alpha 9\beta 1$. Si $\alpha v\beta 3$ est exprimée suite à une adaptation des cellules à la culture (Horton, 1990), les résultats obtenus lors de ces essais d'adhésion pourraient donc être non représentatifs des capacités adhésives des entérocytes. Pour vérifier que l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ est fonctionnelle pour la liaison au TNfn3 chez les cellules HIEC-6, mais que la présence des intégrines αv nuit à cette adhésion, des essais d'adhésion en présence d'anticorps bloquant αv et $\alpha 9$ pourraient être effectués. S'il est possible de constater un effet combinatoire des deux anticorps, cela signifiera qu' $\alpha 9\beta 1$, exprimé par les cellules épithéliales fœtales prolifératives, peut reconnaître le TNfn3.

Toutefois, l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ et la TN-C n'étant pas co-localisées de façon spatio-temporelle au cours du développement intestinal (Desloges et al., 1994, 1998), il est peu probable qu'ils y interagissent ensemble. Et ce, malgré la possibilité que leur interaction puisse médier une prolifération cellulaire (Yokosaki et al., 1996). Il est ainsi possible qu' $\alpha 9\beta 1$ soit tout simplement non-fonctionnelle pour l'adhésion à la TN-C chez les cellules intestinales. Plusieurs études ont en effet montré que, d'un type cellulaire à l'autre, il y a une spécificité dans l'activité des intégrines (Bodary et McLean, 1990; Vogel et al., 1990).

Figure 18. Régulation de la morphogénèse de la muqueuse intestinale humaine par l'OPN : un modèle...

Au cours du processus de formation villositaire, l'OPN est sécrétée par le mésenchyme sous-jacent à la lame basale. Son insertion efficace à l'intérieur de celle-ci pourrait être effectuée par l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ qui se retrouve alors à la surface des cellules mésenchymateuses (A). L'OPN correctement présentée pourrait alors entrer en interaction avec l'intégrine $\alpha v \beta 3$, aussi exprimée par le mésenchyme villositaire, et causer une induction de l'activité de la MMP-2 (B). Cette dernière aurait ainsi la possibilité d'effectuer des protéolyses permettant d'augmenter le niveau de malléabilité de la lame basale et ainsi permettre l'évagination du mésenchyme (C).

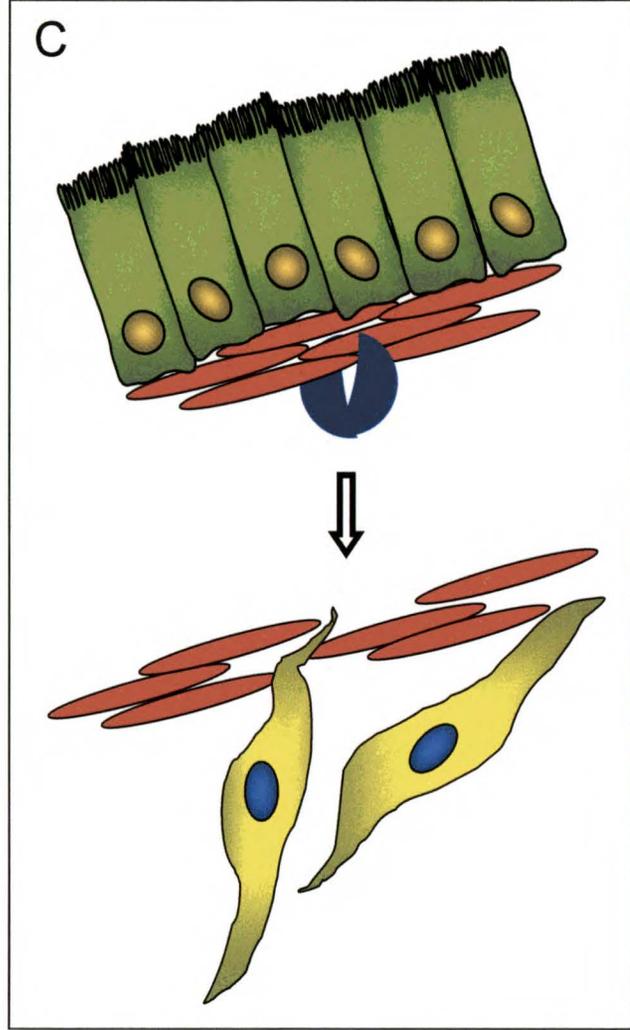
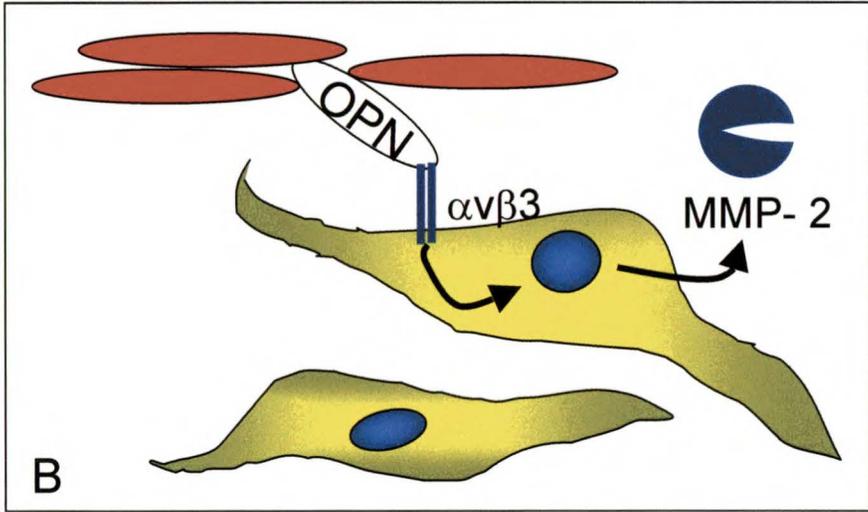
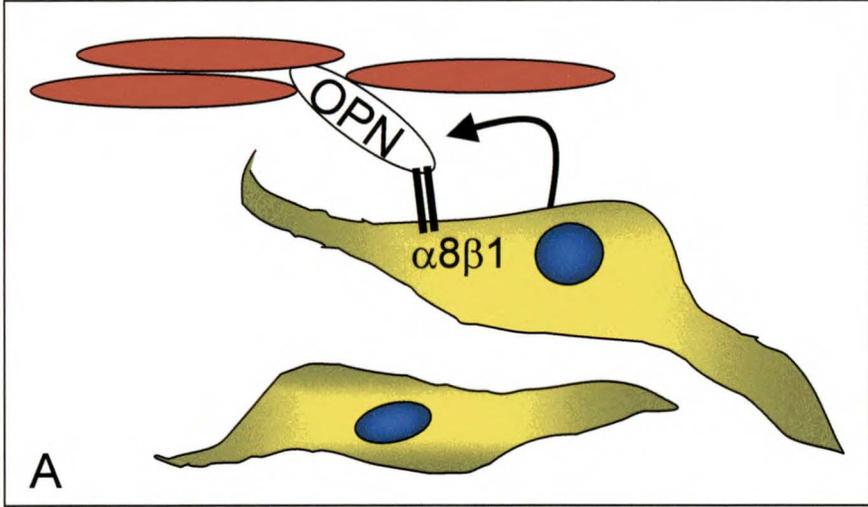
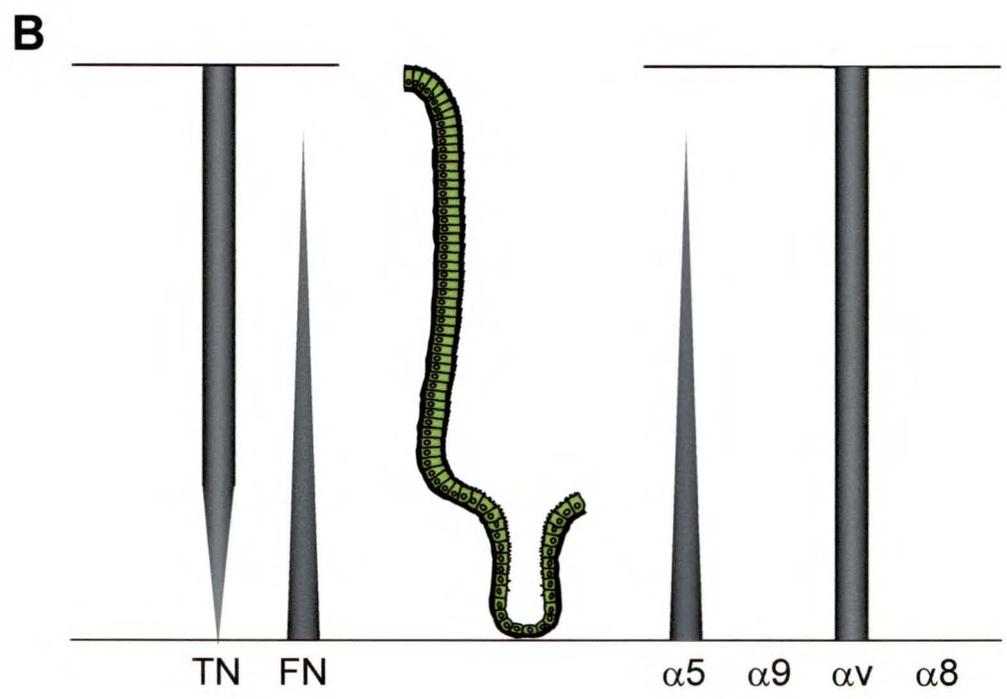
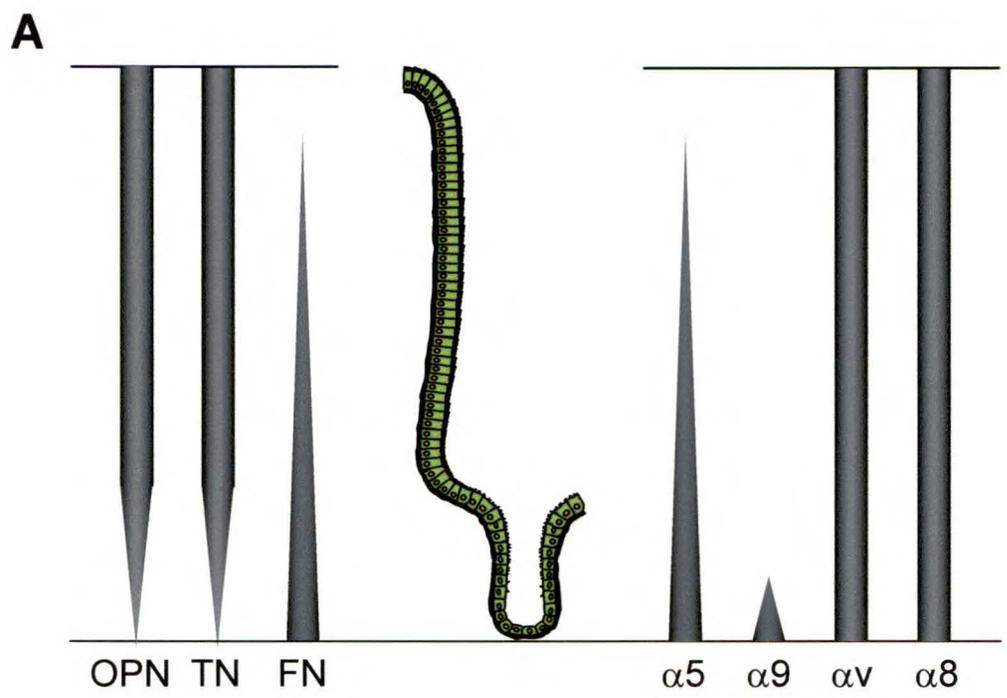


Figure 19. Distribution le long de l'axe crypte-villosité des molécules impliquées dans le système RGD

Représentation schématique, dans la lame basale de l'axe crypte-villosité à 18 semaines (**A**) et chez l'adulte (**B**), de la distribution de molécules impliquées dans le système RGD. Le niveau d'expression de chacune des protéines est fonction de la largeur de la bande correspondante. Les intégrines sont présentées à droite, alors que les ligands se retrouvent à gauche.



V – CONCLUSION

Les patrons d'expression des diverses molécules impliquées dans le système adhésif RGD sont maintenant bien établis dans la muqueuse intestinale humaine (figure 19).

Ces résultats, combinés à l'ensemble de la littérature, me permettent de proposer un modèle de régulation de la morphogenèse de la muqueuse intestinale au cœur duquel se retrouve l'OPN (figure 18). En effet, cette glycoprotéine, qui est déposée dans la lame basale des villosités, pourrait permettre via son interaction avec les intégrines $\alpha 8\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ l'activation d'une métalloprotéase qui induirait l'évagination mésenchymateuse. Ce modèle pourra guider de futures recherches vers une compréhension plus approfondie du remodelage de la muqueuse intestinale foetale.

De plus, de nouvelles perspectives sont maintenant ouvertes. Par exemple, l'intégrine $\alpha 9\beta 1$, avec laquelle aucun de ses ligands connus n'est co-localisé de façon spatio-temporelle dans la muqueuse foetale, pourrait médier sa fonction indépendamment d'une liaison avec une molécule de la matrice-extracellulaire.

En parallèle aux études d'expression, les essais d'adhésion des cellules HIEC-6 sur un fragment recombinant de la ténascine-C (TNfn3) ont permis d'établir que les intégrines identifiées au cours de cette étude dans l'épithélium cryptal ($\alpha 8\beta 1$ et $\alpha v..$) sont fonctionnelles pour médier une adhésion RGD dépendante.

Finalement, un modèle cellulaire de sur-expression de la sous-unité $\alpha 8$ des intégrines a été mis au point et permettra la caractérisation fonctionnelle de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$.

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence l'expression, ainsi que la fonctionnalité de plusieurs molécules du système adhésif RGD au cours du développement de la muqueuse intestinale humaine. Ce qui suggère une implication importante de ce système dans la morphogenèse intestinale.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon superviseur, le Dr. Jean-François Beaulieu, pour sa confiance, ses encouragements, et particulièrement pour chacune des fois où ses oreilles furent là pour m'écouter.

Je voudrais spécialement remercier ma mère pour son soutien, ses encouragements et plus spécifiquement pour ce goût d'apprendre qu'elle m'a transmis. Un gros merci aussi à toute ma famille qui a su être là pour m'épauler tant psychologiquement que financièrement!

Un merci tout particulier à mon copain Benoît qui m'a redonné la force et le courage de terminer ce mémoire...

Merci à Liz pour tout le support technique qu'elle m'a fourni, mais particulièrement pour son amitié et tous les petits potins partagés! De même pour Dominique et Fabrice. J'aimerais également saluer tous les gens qui ont travaillé avec moi dans le laboratoire, ainsi qu'au département, pour la réponse à une de mes questions, la démonstration du fonctionnement d'un appareil, un sourire ou une bonne blague échangée...

Finalement, je tiens à remercier les docteurs L.M. Schnapp et L.F. Reichardt qui ont fourni des outils essentiels pour ces travaux, ainsi que les docteurs Pierre H. Vachon et Gilles Dupuis qui ont accepté de réviser ce mémoire.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, J.C. et Watt, F.M. (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* **117**:1183-1198
- Agrez, M., Chen, A., Cone, R.I., Pytela, R. et Sheppard, D. (1994) The $\alpha v \beta 6$ integrin promotes proliferation of colon carcinoma cells through a unique region of the $\beta 6$ cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* **127**: 547-556
- Altmann, G.G. et Leblond, C.P. (1982) Changes in the sizes and structure of the nucleolus of columnar cells during their migration from crypt base to villus top in rat jejunum. *J. Cell. Sci.* **56**:83-89
- Anderson, B., Wentland, M.A., Ricafrente, J.Y., Liu, W., et Gibbs, R.A. (1996) A double adaptor method for improved shotgun library construction. *Anal. Biochem.* **236**:107-113
- Aota, S., Nomizu, M. et Yamada, K.M. (1994) The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J. Biol. Chem.* **269**:24756-24761
- Argaves, W.S., Suzuki, S., Arai, H., Thompson, K., Pierschbacher, M.D. et Ruoslahti, E. (1987) Amino acid sequence of the human fibronectin receptor. *J. Cell Biol.* **105**:1183-1190
- Arsenault, P. et Ménard, D. (1987) Cell proliferation in developing human jejunum. *Biol. Neonate* **51**:297-304
- Babyatsky, M.W. et Podolsky, D.K. (1999) Growth and development of the gastrointestinal tract. Yamada, T. (ed), *Textbook of gastroenterology*. 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, p. 547-584
- Basora, N., Desloges, N., Chang, Q., Bouatrouss, Y., Gosselin, J., Poisson, J., Sheppard, D., et Beaulieu, J.-F. (1998) Expression of the $\alpha 9 \beta 1$ integrin in human colonic epithelial cells: resurgence of the fetal phenotype in a subset of colon cancers and adenocarcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* **75**:738-743
- Bayless, K.J., Meininger, G.A., Scholtz, J.M. et Davis, G.E. (1998) Osteopontin is a ligand for the $\alpha 4 \beta 1$ integrin. *J. Cell Sci.* **111**:1165-1174
- Beaulieu, J.-F. (1992) Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine. *J. Cell. Sci.* **102**:427-436

Beaulieu, J.-F. (1997) Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog. Histochem. Cytochem.* **34**:1-76

Beaulieu, J.-F. (1999) Integrins and human intestinal cell functions. *Front. Bioscience* **4**:D310-D321

Beaulieu, J.-F. (2001) Role of extracellular matrix proteins on human intestinal cell function: laminin-epithelial cell interactions. In *Gastrointestinal functions*. (ed) E.E. Delvin et M.J. Lentze. Nestlé Nutrition Workshop Series, Pediatric program, Vol. 46, Nestec Ltd., Vevey/Lippincott Williams et Wilkins, Philadelphie, p. 59-75

Beaulieu, J.-F., Jutras, S., Durand, J., Vachon, P.H. et Perreault, N. (1993a) Relationship between tenascin and α -smooth muscle actin expression in the developing human small intestinal mucosa. *Anat. Embryol.* **188**:149-158

Beaulieu, J.-F., Jutras, S., Kuksakabe, M. et Perreault, N. (1993b) Expression of tenascin in the developing human small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**:1086-1092

Beaulieu, J.-F., et Quaroni, A. (1991) Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem. J.* **280**:599-608

Bélanger, I. et Beaulieu, J.-F. (2000) Tenascin in the developing and adult human intestine. *Histol. Histopathol.* **15**:577-585

Blau, H.M. et Baltimore, D. (1991) Differentiation requires continuous regulation. *J. Cell Biol.* **112**:781-783

Blystone, S.D., Slater, S.E., Williams, M.P., Crow, M.T. et Brown, E.J. (1999) A molecular mechanism of integrin crosstalk: α v β 3 suppression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates α 5 β 1 function. *J. Cell. Biol.* **145**:889-897

Bodary, S.C. et McLean, J.W. (1990) The integrin β 1 subunit associates with the vitronectin receptor α v subunit to form a novel vitronectin receptor in a human embryonic kidney cell line. *J. Biol.Chem.* **265**:5938-5941

Bossy, B., Bossy-Wetzel, E. et Reichardt, L.F. (1991) Characterization of the integrin α 8 subunit: a new integrin β 1-associated subunit, which is prominently expressed on axons and on cells in contact with basal laminae in chick embryos. *EMBO J.* **10**:2375-2385

Brandenberger, R., Schmidt, A., Linton, J., Wang, D., Backus, C., Denda, S., Müller, U. et Reichardt, L.F. (2001) Identification and characterization of a novel extracellular matrix protein nephronectin that is associated with integrin $\alpha 8\beta 1$ in the embryonic kidney. *J. Cell Biol.* **154**:447-458

Breuss, J.M., Gallo, J., DeLisser, H.M., Klimanskaya, I.V., Folkesson, H.G., Pittet, J.F., Nishimura, S.L., Aldape, K., Landers, D.V., Carpenter, W., Gillett, N.,

Sheppard, D., Matthay, M.A., Abelda, S.M., Kramer, R.H. et Pytela, R. (1995) Expression of the $\beta 6$ integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J. Cell Sci.* **108**:2241-2251

Breuss, J.M., Gillett, N., Lu L., Sheppard, D. et Pytela, R. (1993) Restricted distribution of integrin $\beta 6$ in primate epithelial tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **41**:1521-1527

Brooks, P.C., Clark, R.A.F. et Cheresch, D.A. (1994) Requirement of vascular integrin $\alpha v\beta 3$ for angiogenesis. *Science* **264**:569-571

Brown, L.F., Berse, B., Van de Water, L., Papadopoulos-Serigiou, A., Perruzzi, C.A., Manseau, E.J., Dvorak, H.F., et D.R. Senger. (1992) Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol. Biol. Cell.* **3**:1169-1180

Brown, L.F., Papadopoulos-Serigiou, A., Berse, B., Manseau, E.J., Tognazzi, K., Perruzzi, C.A., Dvorak, H.F. et Senger, D.R. (1994) Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. *Am. J. Pathol.* **145**(3):610-623

Busk, M., Pytela, R. et Sheppard, D. (1992) Characterization of the integrin $\alpha v\beta 6$ as a fibronectin-binding protein. *J. Biol. Chem.* **267**:5790-5796

Chen, Y., Bal, B.S. et Gorski, J.P. (1992) Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *J. Biol. Chem.* **267**:24871-24878

Cheresch, D.A. et Spiro, R.C. (1987) Biosynthetic and functional properties of an arg-gly-asp-directed receptor involved in human melanoma cell attachment to vitronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* **262**:17703-17711

Chiquet-Ehrismann, R., Mackie, E.J., Pearson, C.A. et Sakakura, T. (1986) Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* **47**:131-139

Christopher, R.A., Judge, S.R., Vincent, P.A., Higgins, P.J. et McKeown-Longo, P.J. (1999) The amino-terminal matrix assembly domain of fibronectin stabilizes cell shape and prevents cell cycle progression. *J. Cell Sci.* **112**:3225-3235

Clark, E.A. et Brugge, J.S. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**:233-239

Coppolino, M.G. et Dedhar, S. (2000) Bi-directional signal transduction by integrin receptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32** :171-1888

Crawford, H.C., Matrisian, L.M. et Liaw, L. (1998) Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression *in vivo*. *Can. Res.* **58**:5206-5215

Dedhar, S. (1999) Integrins and signal transduction. *Curr. Opin. Hemat.* **6**:37-43

Denda, S., Müller, U., Crossin, K.L., Erickson, H.P. et Reichardt, L.F. (1998a) Utilization of a soluble integrin-alkaline phosphatase chimera to characterize integrin $\alpha 8\beta 1$ receptor interactions with tenascin: murine $\alpha 8\beta 1$ binds to the RGD site in tenascin-C fragments, but not to native tenascin-C. *Biochem.* **37**:5464-5474

Denda, S., Reichardt, L.F., et Müller, U. (1998b) Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin $\alpha 8\beta 1$ and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* **9**:1425-1435

Denhardt, D.T. et Guo, X. (1993) Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.* **7**:1475-1482

Desloges, N., Basora, N., Perreault, N., Bouatrouss, Y., Sheppard, D. et Beaulieu, J.-F. (1998) Regulated expression of the integrin $\alpha 9\beta 1$ in the epithelium of the developing human gut and in intestinal cell lines: relation with cell proliferation. *J. Cell. Biochem.* **71**:536-545

Desloges, N., Simoneau, A., Jutras, S. et Beaulieu, J.-F. (1994) Tenascin may not be required for intestinal villus development. *Int. J. Dev. Biol.* **38**:737-739

Dignass, A.U. (2001) Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflamm. Bowel Dis.* **7**:68-77

Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. et Mattick, J.S. (1991) "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* **19**:4008

Einheber, S., Schnapp, L.M., Salzer, J.L., Cappelletto, Z.B. et Milner, T.A. (1996) Regional and ultrastructural distribution of the $\alpha 8$ integrin subunit in developing and adult rat brain suggests a role in synaptic function. *J. Comp. Neur.* **370**:105-134

Eliceiri, B.P., Puente, X.S., Hood, J.D., Stupack, D.G., Schlaepfer, D.D., Huang, X.Z., Sheppard, D. et Cheresch, D.A. (2002) Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin $\alpha v \beta 5$ in vascular endothelial growth factor signaling. *J. Cell Biol.* **157**:149-159

Eto, K., Puzon-McLaughlin, W., Sheppard, D., Sehara-Fujisawa, A., Zhang, X.-P. et Takada, Y. (2000) RGD-independent binding of integrin $\alpha 9 \beta 1$ to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. *J. Biol. Chem.* **275**:34922-34930

Felding-Habermann, B., Mueller, B.M., Romerdahl, C.A. et Cheresch, D.A. (1992) Involvement of integrin αv gene expression in human melanoma tumorigenicity. *Am. Soc. Clin. Inves.* **89**:2018-2022

Ffrench-Constant, C. et Hynes, R.O. (1988) Patterns of fibronectin gene expression and splicing during cell migration in chicken embryos. *Development* **104**:369-382

Ffrench-Constant, C. et Hynes, R.O. (1989) Alternative splicing of fibronectine is temporally and spatially regulated in the chicken embryo. *Development* **106**:375-388

Fogerty, F.J., Akiyama, S.K., Tamada, K.M. et Mosher, D.F. (1990) Inhibition of binding of fibronectin to matrix assembly sites by anti-integrin (alpha 5 beta 1) antibodies. *J. Cell Biol.* **111**:699-708

Forsberg, E., Ek, B., Engström, Å. et Johansson, S. (1994) Purification and characterization of integrin $\alpha 9 \beta 1$. *Exp. Cell Res.* **213**:183-190

Franzen, A. et Heinegard, D. (1985) Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem. J.* **232**:715-724

Friedlander, M., Brooks, P.C., Shaffer, R.W., Kincaid, C.M., Varner, J.A. et Cheresch, D.A. (1995) Definition of two angiogenic pathways by distinct αv integrins. *Science* **270**:1500-1502

Germain, L., Rouabhia, M., Guignard, R., Carrier, L. Bouvard, V. et Auger, F.A. (1993) Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns* **19**:99-104

Giancotti, F.G. (2000) Complexity and specificity of integrin signaling. *Nature Cell Biol.* **2**:E13-E14

Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W.G. et Quaranta, V. (1997) Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminine-5. *Science* **277**:225-228

Gorski, J.P., Griffin, D., Dudley, G., Stanford, C., Thomas, R., Huang, C., Lai, E., Karr, B. et Solursh, M. (1990) Bone acidic glycoprotein-75 is a major synthetic product of osteoblastic cells and localized as 75- and/or 50-kDa forms in mineralized phases of bone and growth plate in serum. *J. Biol. Chem.* **265**:14956-14963

Guan, J.-L. et Hynes, R.O. (1990) Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor $\alpha 4\beta 1$. *Cell* **60**:53-61

Haffen, K., Keding, M. et Simon-Assmann P. (1987) Mesenchyme-dependent differentiation of epithelial progenitor cells in the gut. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **6**:14-23

Hauri, H.P., Sterchi, E.E., Bienz, D., Fransen, J.A. et Marxer, A. (1985) Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* **101**:838-851

Hemler, M.E. (1990) VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **8**:365-400

Horton, M.A. (1990) Vitronectin receptor: tissue specific expression or adaptation to culture? *Int. J. Exp. Pathol.* **71**:741-759

Horton, M.A. (1997) The $\alpha v\beta 3$ integrin "vitronectin receptor". *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**:721-725

Hu, D.D., Hoyer, J.R., et J.W. Smith. (1995a) Calcium suppresses cell adhesion to osteopontin by attenuating binding affinity for integrin $\alpha v\beta 3$. *J. Biol. Chem.* **270**:9917-9925

Hu, D.D., Lin, E.C., Kovach, N.L., Hoyer, J.R. et Smith, J.W. (1995b) A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins $\alpha v\beta 1$ and $\alpha v\beta 5$. *J. Biol. Chem.* **270**:26232-26238

Huang, S., Stupack, D., Liu, A., Cheresch, D. et Nemerow, G.R. (2000) Cell growth and matrix invasion of EBV-immortalized human B lymphocytes is regulated by expression of αv integrins. *Oncogene* **19**:1915-1923

Huang, X., Wu, J., Spong, S. et Sheppard, D. (1998) The integrin $\alpha v \beta 6$ is critical for keratinocyte migration on both its known ligand, fibronectin, and on vitronectin. *J. Cell Sci.* **111**:2189-2195

Humphries, M.J. (2000) Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.* **28**:311-339

Humphries, M.J., Akiyama, S.K., Komoriya, A., Olden, K. et Yamada, K.M. (1986) Identification of an alternatively spliced site in human plasma fibronectin that mediates cell type-specific adhesion. *J. Cell Biol.* **103**:2637-2647

Humphries, M.J., Komoriya, A., Akiyama, S.K., Olden, K. et Yamada, K.M. (1987) Identification of two distinct regions of the type III connecting segment of human plasma fibronectin that promote cell type-specific adhesion. *J. Biol. Chem.* **262**:6886-6892

Hynes, R.O. (1990) *Fibronectins*. Springer-Verlag, New-York

Hynes, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**:11-25

Hyun, Y.-L., Lew, D.B., Park, S.H., Kim, C.-W., Paik, W.K. et Kim, S. (2000) Enzymatic methylation of arinyl residues in -gly-arg-gly- peptides. *Biochem. J.* **348**:573-578

Johnson, A.G., Gautsch, J.W., Sportsman, J.R. et Elder, J.H. (1984) Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene. Anal. Tech.* **1**:3-8.

Johnson, G.D. et de C Nogueira Araujo, G.M. (1981) A simple method of reducing the finding of immunofluorescence during microscopy. *J. Immunol. Methods.* **43**:349-350

Joshi, P., Chung, C.Y., Aukhil, I. et Erickson, H.P. (1993) Endothelial cells adhere to the RGD domain and the fibrinogen-like terminal knob of tenascin. *J. Cell Sci.* **106**:389-400

Juliano, R. (1996) Cooperation between soluble factors and integrin-mediated cell anchorage in the control of cell growth and differentiation. *BioEssays*, **18**:911-917

Kedinger, M., Simon, P.M., Grenier, J.F. et Haffen, K. (1981) Role of epithelial-mesenchymal interactions in the ontogenesis of intestinal brush-border enzymes. *Dev. Biol.* **86**:339-347

Kedinger, M., Simon-Assmann, P.M., Lacroix, B., Marxer, A., Hauri, H.P. et Haffen, K. (1986) Fetal gut mesenchyme induces differentiation of cultured intestinal endodermal and crypt cells. *Dev. Biol.* **113**:474-483

Kemperman, H., Wijnands, Y.M. et Roos, E. (1997) αv integrins on HT-29 colon carcinoma cells: adhesion to fibronectin is mediated solely by small amounts of $\alpha v\beta 6$, and $\alpha v\beta 5$ is codistributed with actin fibers. *Exp. Cell Res.* **234**:156-164

Klein, R.M. et McKenzie, J.C. (1983) The role of cell renewal in the ontogeny of the intestine. II. Regulation of cell proliferation in adult, fetal, and neonatal intestine. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2**:204-228

Klemke, R.L., Yebra, M., Bayna, E.M. et Cheresh, D.A. (1994) Receptor tyrosine kinase signaling required for integrin $\alpha v\beta 5$ -directed cell motility but not adhesion on vitronectin. *J. Cell Biol.* **127**:859-866

Koivunen, E., Wang, B. et Ruoslahti, E. (1994) Isolation of a highly specific ligand for the $\alpha 5\beta 1$ integrin from a phage display library. *J. Cell Biol.* **124**: 373-380

Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M., et Rajewsky, K. (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**:1427-1429

Kumar, C.C. (1998) Signaling by integrin receptors. *Oncogene* **17**: 1365-1373

Kuwada, S.K. et Li, X. (2000) Integrin $\alpha 5\beta 1$ mediates fibronectin-dependant epithelial cell proliferation through epidermal growth factor receptor activation. *Mol. Biol. Cell* **11**:2485-2496

Leavesley, D.I., Ferguson, G.D., Wayner, E.A. et Cheresh, D.A. (1992) Requirement of the integrin $\beta 3$ subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. *J. Cell Biol.* **117**:1101-1107

Leblond, C.P. (1981) The life history of cells in renewing systems. *Am. J. Anat.* **160**:114-159

Leblond, C.P. et Inoue, S. (1989) Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am. J. Anat.* **185**:367-390

Lee, J.W. et Juliano, R.L. (2000) $\alpha 5\beta 1$ integrin protects intestinal epithelial cells from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway. *Mol. Biol. Cell* **11**:1973-1987

Li, X., Chen, B., Blystone, S.D., McHugh, K.P., Ross, F.P. et Ramos, D.M. (1998) Differential expression of αv integrins in K1735 melanoma cells. *Invas. Metas.* **18**:1-14

Liaw, L., Skinner, M.P., Raines, E.W., Ross, R., Cheresch, D.A., Schwartz, S.M. et Giachelli, C.M. (1995) The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. *J. Clin. Invest.* **95**:713-724

Lohi, J. et Fröjdman, K. (1998) Regulation of the cell differentiation at the basement membrane level: the intestinal epithelium as an example. *Cancer J.* **11**:127-131

Lussier, C., Basora, N., Bouatrouss, Y. et Beaulieu, J.-F. (2000) Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa. *Microsc. Res. Tech.* **51**:169-178

Lussier, C., Sodek, J. et Beaulieu, J.-F. (2001) Expression of SPARC/Osteonectin/BM40 in the human gut: predominance in the stroma of the remodeling distal intestine. *J. Cell. Biochem.* **81**(3):463-476

Ménard, D. (1989) Growth-promoting factors and the development of the human gut. *Human gastrointestinal development*, Lebenthal, E. (ed), Raven Press., New York, p.123-125

Ménard, D. et Beaulieu, J.-F. (1994) Human intestinal brush border membrane hydrolases. *Membrane physiopathology*, Bkaily, G. (ed), Kluwer Academic Publishers, Boston, p.319-341

Milner, R. et French-Constant, C. (1994) A developmental analysis of oligodendroglial integrins in primary cells: changes in αv -associated β subunits during differentiation. *Development* **120**:3497-3506

Montgomery, A.M.P., Reisfeld, R.A. et Cheresch, D.A. (1994) Integrin $\alpha v \beta 3$ rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:8856-8860

Montgomery, R.K., Mulberg, A.E. et Grand, R.J. (1999) Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. *Gastroenterology* **116**:702-731

Montgomery, R.K., Sybicki, M.A. et Grand, R.J. (1981) Autonomous biochemical and morphological differentiation in fetal rat intestine transplanted at 17 and 20 days of gestation. *Devel. Biol.* **87**:76-84

- Moore, M.A., Gotoh, Y., Rafidi, K. et Gerstenfeld, L.C. (1991) Characterization of a cDNA for chicken osteopontin: Expression during bone development, osteoblast differentiation, and tissue distribution. *Biochemistry* **30**:2501-2508
- Morimura, N., Tezuka, Y., Watanabe, N., Yasuda, M., Miyatani, S., Hozumi, N. et Tezuka, K.-i. (2001) Molecular cloning of POEM: a novel adhesion molecule that interacts with $\alpha 8\beta 1$ integrin. *J. Biol. Chem.* **276**:42172-42181
- Mould, A.P., Akiyama, S.K. et Humphries, M.J. (1996) The inhibitory anti- $\beta 1$ integrin monoclonal antibody 13 recognizes an epitope that is attenuated by ligand occupancy. Evidence for allosteric inhibition of integrin function. *J. Biol. Chem.* **271**(34):20365-74
- Moyle, M., Napier, M.A. et McLean, J.W. (1991) Cloning and expression of a divergent integrin subunit, $\beta 8$. *J. Biol. Chem.* **266**:19650-19658
- Müller, U., Bossy, B., Venstrom, K. et Reichardt, L.F. (1995) Integrin $\alpha 8\beta 1$ promotes attachment, cell spreading, and neurite outgrowth on fibronectin. *Mol. Biol. Cell* **6**:433-448
- Müller, U., Wang, D., Denda, S., Meneses, J.J., Pedersen, R.A. et Reichardt, L.F. (1997) Integrin $\alpha 8\beta 1$ is critically important for epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis. *Cell* **88**:603-613
- Nagase, H. et Woessner, J.F.Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **274**:21491-21494
- Nanthakumar, N.N. (2001) Regulation of functional development of the small intestine. In *Gastrointestinal functions*. (ed) E.E. Delvin et M.J. Lentze. Nestlé Nutrition Workshop Series, Pediatric program, Vol. 46, Nestec Ltd., Vevey/Lippincott Williams et Wilkins, Philadelphie, 39-58
- Nemir, M., DeVouge, M.W. et Mukherjee, B.B. (1989) Normal rat kidney cells secrete both phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin showing different physiological properties. *J. Biol. Chem.* **264**:18202-18208
- Nomura, S., Wills, A.J., Edwards, D.R., Heath, J.K. et Hogan, B.L.M. (1988) developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by *in situ* hybridization. *J. Cell Biol.* **106**:441-450
- Oldberg, A., Franzen, A. et Heinegard, D. (1986) Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:8819-8823

Pageot, L.-P., Perreault, N., Basora, N., Francoeur, C., Magny, P. et Beaulieu, J.-F. (2000) Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Microsc. Res. Techn.* **49**:394-406

Palmer, E.L., Rüegg, C., Ferrando, R., Pytela, R. et Sheppard, D. (1993) Sequence and tissue distribution of the integrin $\alpha 9$ subunit, a novel partner of $\beta 1$ that is widely distributed in epithelia and muscle. *J. Cell. Biol.* **123**:1289-1297

Pasqualini, R., Bodorova, J., Ye, S. et Hemler, M.E. (1993) A study of the structure, function and distribution of $\beta 5$ integrins using novel anti- $\beta 5$ monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* **105**:101-111

Pavalko, F.M. et Otey, C.A. (1994) Role of adhesion molecule cytoplasmic domains in mediating interactions with the cytoskeleton. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **205**:282-293

Perreault, N. et Beaulieu, J.-F. (1996) Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp. Cell Research* **224**:354-364

Perreault, N., Herring-Gillam, F.E., Desloges, N., Bélanger, I., Pageot, L.-P. et Beaulieu, J.F. (1998) Epithelial vs mesenchymal contribution to extracellular matrix in human intestine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **248**:121-126

Philip, S., Bulbule, A. et Kundu, G.C. (2001) Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor- κB -mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **276**:44926-44935

Pierschbacher, M.D. et Ruoslahti, E. (1984) The cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small fragments of the molecule. *Nature* **309**:30-33

Pierschbacher, M.D. et Ruoslahti, E. (1987) Influence of stereochemistry of the sequence arg-gly-asp-xaa on binding specificity in cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **262**:17294-17298

Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M.D., Keding, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J. et Zweibaum, A. (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* **47**:323-330

Potten, C.S. et Loeffler, M. (1991) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties: lessons for and from the crypt. *Development* **110**:1001-1020

- Prieto, A.L., Edelman, G.M. et Crossin, K.L. (1993) Multiple integrins mediate cell attachment to cytotactin/tenascin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:10154-10158
- Pytela, R., Pierschbacher, M.D. et Ruoslahti, E. (1985a) Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell* **40**:191-198
- Pytela, R., Pierschbacher, M.D. et Ruoslahti, E. (1985b) A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:5766-5770
- Qu-Hong, Brown, L.F., Senger, D.R., Geng, L.L., Dvorak, H.F. et Dvorak, A.M. (1994) Ultrastructural immunogold localization of osteopontin in human gallbladder epithelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* **42**:351-361
- Qu-Hong, Brown, L.F., Dvorak, H.F. et Dvorak, A.M. (1997a) Ultrastructural immunogold localization of osteopontin in human gastric mucosa. *J. Histochem. Cytochem.* **45**:21-33
- Qu-Hong et Dvorak, A.M. (1997b) Ultrastructural localization of osteopontin immunoreactivity in phagolysosomes and secretory granules of cells in human intestine. *Histochem. J.* **29**:801-812
- Rittling, S.R. et Denhardt, D.T. (1999) Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice. *Exp.Nephrol.* **7**:103-113
- Ross, F.P., Chappel, J., Alvarez, J.I., Sander, D., Butler, W.T., Farach-Carson, M.C., Mintz, K.A., Robey, P.G., Teitelbaum, S.L. et Cheresch, D.A. (1993) Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin $\alpha\beta 3$ potentiate bone resorption. *J. Biol. Chem.* **268**:9901-9907
- Rossant, J. et Nagy, A. (1995) Genome engineering: The new mouse genetics. *Nature Med.* **1**:592-594
- Rosselin, G. (1989) Les récepteurs de surface des cellules épithéliales digestives. *Annales Endocrin.* **50**:447-463
- Rousset, M. (1986) The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* **68**:1035-1040
- Ruoslahti, E. (1991) Integrins. *J. Clin. Invest.* **87**:1-5

Ruoslahti, E. (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**:697-715

Ruoslahti, E. et Öbrink, B. (1996) Common principles in cell adhesion. *Exp. Cell Res.* **227**:1-11

Sastry, S.K. et Horwitz, A.F. (1996) Adhesion-Growth factor interactions during differentiation: An integrated biological response. *Devel. Biol.* **180**:455-467

Saunders, S. et Bernfield, M. (1988) Cell surface proteoglycan binds mouse mammary epithelial cells to fibronectin and behaves as a receptor for interstitial matrix. *J. Cell Biol.* **106**:423-430

Savidge, T.C., Morey, A.L., Ferguson, D.J.P., Fleming, K.A., Shmakov, A.N. et Phillips, A.D. (1995) Human intestinal development in a severe-combined immunodeficient xenograft model. *Differentiation* **58**:361-371

Schnapp, L.M., Breuss, J.M., Ramos, D.M., Sheppard, D., et Pytela, R. (1995a) Sequence and tissue distribution of the human integrin $\alpha 8$ subunit: a $\beta 1$ associated alpha subunit expressed in smooth muscle cells. *J. Cell. Sci.* **108**:537-544

Schnapp, L.M., Hatch, N., Ramos, D.M., Klimanskaya, I.V., Sheppard, D., et Pytela, R. (1995b) The human integrin $\alpha 8\beta 1$ functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin. *J. Biological Chem.* **270**:23196-23202

Schwartz, M.A. et Baron, V. (1999) Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:197-202

Schwarzbauer, J.E., Patel, R.S., Fonda, D. et Hynes, R.O. (1987) Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript. *EMBO J.* **6**:2573-2580

Schwarzbauer, J.E., Tamkun, J.W., Lemischka, I.R. et Hynes, R.O. (1983) Three different fibronectin mRNAs arise by alternative splicing within the coding region. *Cell* **35**:421-431

Senger, D.R., Peruzzi, C.A., Papadopoulos-Sergiou, A. et Van de Water, L. (1994) Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain. *Mol. Biol. Cell* **5**:565-574

Sheppard, D., Rozzo, C., Starr, L., Quaranta, V., Erle, D.J. et Pytela, R. (1990) Complete amino acid sequence of a novel integrin β subunit ($\beta 6$) identified in

epithelial cells using the polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* **265**:11502-11507

Simon, K.O., Nutt, E.M., Abraham, D.G., Rodan, G.A. et Duong, L.T. (1997) The $\alpha v \beta 3$ integrin regulates $\alpha 5 \beta 1$ -mediated cell migration toward fibronectin. *J. Biol. Chem.* **272**:29380-29389

Simon-Assmann, P., Kedinger, M., De Archangelis, A., Rousseau, V. et Simon, P. (1995) Extracellular matrix components in the intestinal development. *Experientia* **51**:883-900

Sottile, J., Hocking, D.C. et Swiatek, P.J. (1998) Fibronectin matrix assembly enhances adhesion-dependent cell growth. *J. Cell Sci.* **111**:2933-2943

Smith, J.W., Vestal, D.J., Irwin, S.V., Burke, T.A. et Cheresh, D.A. (1990) Purification and functional characterization of integrin $\alpha v \beta 5$. *J. Biol. Chem.* **265**:11008-11013

Smith, L.L., Cheung, H.-K., Ling, L.E., Chen, J., Sheppard, D., Pytela, R. et Giachelli, C.M. (1996) Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by $\alpha 9 \beta 1$ integrin. *J. Biol. Chem.* **271**:28485-28491

Smith, L.L. et Giachelli, C.M. (1998) Structural requirements for $\alpha 9 \beta 1$ -mediated adhesion and migration to thrombin-cleaved osteopontin. *Exp. Cell Res.* **242**:351-360

Stepp, M.A., Zhu, L., Sheppard, D. et Cranfill, R.L. (1995) Localized distribution of $\alpha 9$ integrin in the cornea and changes expression during corneal epithelial cell differentiation. *J. Histochem. Cytochem.* **43**:353-362

Teller, I.C. et Beaulieu, J.-F. (2001) Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Exp. Rev. Mol. Med.* **28 September**, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01003623h.htm>

Thomas, J.O., et Kornberg, R.D. (1975) An octamer of histone in chromatin and free in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:2626-2630

Timpl, R. et Brown, J.C. (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *BioEssays* **18**:123-132

Towbin, H., Staehelin, T., et Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4350-4354

Townsend, P.A., Villanova, I., Uhlmann, E., Peyman, A., Knolle, J., Baron, R., Teti, A. et Horton, M.A. (2000) An antisense oligonucleotide targeting the αv integrin gene inhibits adhesion and induces apoptosis in breast cancer cells. *Eur. J. Cancer* **36**:397-409

Tuck, A.B., Arsenault, D.M., O'Malley, F.P., Hota, C., Ling, M.C., Wilson, S.M. et Chambers, A.F. (1999) Osteopontin induces increased invasiveness and plasminogen activator expression of human mammary epithelial cells. *Oncogene* **18**:4237-4246

Tuck, A.B., Elliott, B.E., Hota, C., Tremblay, E. et Chambers, A.F. (2000) Osteopontin-induced, integrin-dependent migration of human mammary epithelial cells involves activation of the hepatocyte growth factor receptor (Met). *J. Cell. Biochem.* **78**:465-475

Vachon, P.H. et Beaulieu, J.-F. (1992) Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology.* **103**:414-423

Vachon, P.H., Durand, J. et Beaulieu, J.-F. (1993) Basement membrane formation and re-distribution of the $\beta 1$ integrins in a human intestinal co-culture system. *Anat. Rec.* **235**:567-576

Vachon, P.H., Perreault, N., Magny, P., et Beaulieu, J.-F. (1996) Uncoordinated, transient mosaic patterns of intestinal hydrolase expression in differentiating human enterocytes. *J. Cell. Physiol.* **166**:198-207

Varnum-Finney, B., Venstrom, K., Muller, U., Kypka, R., Backus, C., Chiquet, M. et Reichardt, L.F. (1995) The integrin receptor $\alpha 8 \beta 1$ mediates interactions of embryonic chick motor and sensory neurons with tenascin-C. *Neuron.* **14**:1213-1222

Vogel, B.E., Tarone, G., Giancotti, F.G., Gailit, J. et Ruoslahti, E. (1990) A novel fibronectin receptor with an unexpected subunit composition ($\alpha v \beta 1$). *J. Biol. Chem.* **265**:5934-5937

Wang, A., Patrone, L., McDonald, J.A. et Sheppard, D. (1995) Expression of the integrin subunit $\alpha 9$ in the murine embryo. *Dev. Dyn.* **204**:421-431

Wayner, E.A., Garcia-Pardo, A., Humphries, M.J., McDonald, J.A. et Carter, W.G. (1989) Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J. Cell Biol.* **109**:1321-1330

Wayner, E.A., Orlando, R.A. et Cheresh, D.A. (1991) Integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface. *J. Cell. Biol.* **113**:919

Weinacker, A., Chen, A., Agrez, M., Cone, R.I., Nishimura, S., Wayner, E., Pytela, R. et Sheppard, D. (1994) Role of the integrin $\alpha v \beta 6$ in cell attachment to fibronectin. **269**:6940-6948

Wolfsberg, T.G., Primakoff, P., Myles, D.G. et White, J.M. (1995) ADAM, a novel family of membrane proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J. Cell Biol.* **131**:275-278

Xuan, J.-W., Hota, C., Shigeyama, Y., D'Errico, J.A., Somerman, M.J. et Chambers, A.F. (1995) Site-directed mutagenesis of the arginine-glycine-aspartic acid sequence in osteopontin destroys cell adhesion and migration functions. *J. Cell. Biochem.* **57**:680-690

Yasugi, S. (1993) Role of epithelial-mesenchymal interactions in differentiation of epithelium of vertebrate digestive organs. *Dev. Growth Differ.* **35**:1-9

Yokosaki, Y., Matsuura, N., Higashiyama, S., Murakami, I., Obara, M., Yamakido, M., Shigeto, N., Chen, J. et Sheppard, D. (1998) Identification of the ligand binding site for the integrin $\alpha 9 \beta 1$ in the third fibronectin type III repeat of tenascin-C. *J. Biol. Chem.* **273**:11423-11428

Yokosaki, Y., Matsuura, N., Sasaki, T., Murakami, I., Schneider, H., Higashiyama, S., Saitoh, Y., Yamakido, M., Taooka, Y. et Sheppard, D. (1999) The integrin $\alpha 9 \beta 1$ binds to a novel recognition sequence (SVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J. Biol. Chem.* **274**:36328-36334

Yokosaki, Y., Monis, H., Chen, J. et Sheppard, D. (1996) Differential effects of the integrins $\alpha 9 \beta 1$, $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 6$ on cell proliferative response to tenascin. Role of the β subunit extracellular and cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* **271**:24144-24150

Yokosaki, Y., Palmer, E.L., Prieto, A.L., Crossin, K.L. et Bourdon, M.A. (1994) The integrin $\alpha 9 \beta 1$ mediates cell attachment to a non-RGD site in the third fibronectin type III repeat of tenascin. *J. Biol. Chem.* **269**:26691-26696

Yoon, K., Buenaga, R. et Rodan, G.A. (1987) Tissue specificity and developmental expression of rat osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **148**:1129-1136

Zhang, Z. et Galileo, D.S. (1998) Retroviral transfer of antisense integrin $\alpha 6$ or $\alpha 8$ sequences results in laminar redistribution or clonal cell death in developing brain. *J. Neurosci.* **18**:6928-6938

Zhu, J., Motejlek, K., Wang, D., Zang, K., Schmidt, A. et Reichardt, L.F. (2002) $\beta 8$ integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. *Development* **129**:2891-2903

Zweibaum, A. et Chantret, I. (1989) Human colon carcinoma cell lines as in vitro models for the study of intestinal cell differentiation. Smith, M.W., Sepulveda, F.V. (ed), *Adaptation and development of gastrointestinal functions*. Manchester, England: Manchester University Press, p 103-112